РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Современные подходы к проведению биоаналитических исследований при создании лекарственных препаратов

Под редакцией Хохлова А.Л.

Москва
2018

УДК 615.2/.3
ББК 52.81
С 568

Авторы:
А.Л. Хохлов, М. Рыска, В.Г. Кукес, М. Писачкова, М. Печена, А.Н. Яворский, Л.Н. Шитов, Ю.А. Джурко, Д.П. Ромодановский, А.М. Шитова, М.К. Корсаков, Е.Г. Лилеева, А.А. Хохлов, Н.О. Поздняков, А.Е. Мирошников, Е.А. Воронина, Ю.В. Рыбачкова, И.И. Яичков

С 568 Современные подходы к проведению биоаналитических исследований при создании лекарственных препаратов / А.Л. Хохлов, М. Рыска, В.Г. Кукес [и др.]; под ред. А.Л. Хохлова. – Москва, 2018. – 244 с.

ISBN 978-5-906906-46-5

В монографии изложены основные принципы биоаналитических исследований при разработке оригинальных и воспроизведенных лекарственных препаратов. Представлена методология изучения лекарственных препаратов in vitro, организация биоаналитических и клинических исследований с учетом отечественных и международных требований. Освещены методы обработки, анализа, интерпретации данных исследований фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных препаратов в свете требований к их регистрации. Изложены основные подходы к биоаналитическим исследованиям высокомолекулярных веществ. Приведены примеры валидированных методик, результаты собственных биоаналитических и фармакокинетических исследований лекарственных препаратов, разбор основных методических ошибок. Обсуждаются вопросы взаимодействия лабораторий и клинических центров при выполнении биоаналитических исследований.

Монография предназначена для клинических фармакологов, провизоров, фармакологов, биоаналитиков, медицинских химиков, медицинских статистиков, других специалистов в области исследований лекарственных препаратов.

ISBN 978-5-906906-46-5

© Хохлов А.Л., Рыска М.,
Кукес В.Г., Писачкова М., 2018.

АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ

Хохлов Александр Леонидович, д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ярославль;

Рыска Мирослав, доктор естественных наук, RNDr, экс-президент компании «Квинта Аналитика», г. Прага;

Кукес Владимир Григорьевич, д. м. н., профессор, академик РАН, почетный зав. кафедрой клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет» им. И.М. Сеченова Министерства Здравоохранения Российской Федерации, г. Москва;

Писачкова Марцела, вице-президент компании «Квинта Аналитика», г. Прага;

Печена Марика, вице-президент компании «Квинта Аналитика», г. Прага;

Яворский Александр Николаевич, д. м. н., профессор, главный научный сотрудник Пущинского естественно-научного института Минобрнауки России, г. Пущино;

Шитов Леонид Николаевич, к. б. н., директор ООО «Квинта-Аналитика-Ярославль»;

Джурко Юрий Александрович, к. ф. н., старший аналитик ООО «Квинта-Аналитика-Ярославль»;

Ромодановский Дмитрий Павлович, к. м. н., главный эксперт УЭЛС № 2 ЦЭК ГЛСФГБУ «Научного Центра Экспертизы Средств Медицинского Применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва;

Шитова Анастасия Михайловна, к. физ.-мат. наук, специалист по фармакокинетическому анализу ООО «Квинта-Аналитика-Ярославль», г. Ярославль;

Корсаков Михаил Константинович, к.х.н, директор Центра трансфера фармацевтических технологий имени М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского»;

Лилеева Елена Георгиевна, к. м. н., доцент кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ярославль;

Хохлов Александр Александрович, к. м. н., директор ООО «КлинФармИнвест», г. Ярославль;

Поздняков Николай Олегович, к. м. н., менеджер по клиническим исследованиям ООО «КлинФармИнвест», г. Ярославль;

Мирошников Алексей Евгеньевич, к. м. н., ассистент кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ярославль;

Воронина Елена Алексеевна, к. м. н.; ассистент кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ярославль;

Рыбачкова Юлия Владимировна, к. м. н., ассистент кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ярославль;

Яичков Илья Игоревич**,** аспирант кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ярославль, младший научный сотрудник Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского».

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений 8

1. Введение 11

2. Общие принципы разработки оригинальных и воспроизведенных лекарственных препаратов 13
2.1. Разработка оригинальных лекарственных препаратов 13
2.1.1. Доклинические исследования на животных 19
2.1.2. Создание биотехнологических лекарственных препаратов 21
2.1.3. Стратегия проведения исследований оригинальных лекарственных препаратов 22
2.1.4. Планирование клинических исследований оригинальных лекарственных препаратов: выбор популяции, расчет выборки 27
2.2. Создание воспроизведенных лекарственных препаратов 30
2.2.1. Виды эквивалентности 35
2.2.2. Порядок исследований и регистрации воспроизведенных лекарственных препаратов в ЕС 39
2.2.3. Стратегия проведения исследований воспроизведенных лекарственных препаратов 45
2.3. Исследование фармацевтически альтернативных лекарственных препаратов 45
2.4. Подходы к изучению биоаналогов 48
2.5. Планирование клинических исследований воспроизведенных лекарственных препаратов. Пилотные исследования 49

3. Основные правила регистрации и исследований лекарственных препаратов на пространстве ЕвразЭС 75

4. Исследования лекарственных препаратов in vitro 82
4.1. Биофармацевтическая система классификации 83
4.2. Биовейвер 83
4.3. Тест сравнительной кинетики растворения, используемые среды, оценка результатов 85
4.4. Виды используемого оборудования 87
4.4.1. Виды тестеров растворения 87
4.4.2. Методы анализа проб в тесте «Растворение» и ТСКР 90
4.5. Требования к валидации аналитических методик определения концентрации действующего вещества в среде растворения 94

5. Критерии выбора здорового добровольца 97

6. Основы законодательства в области этики клинических исследований. Получение информированного согласия 100

7. Организация и проведение биоаналитических исследований 112
7.1. Способы пробоподготовки при биоаналитических исследованиях 112
7.1.1. Депротеинизация 112

7.1.2. Жидкостно-жидкостная экстракция . . . 112
7.1.3. Твердофазная экстракция . . . 115
7.2. Методы анализа, используемые при биоаналитических исследованиях . . 117
7.2.1. Иммунохимические методы анализа . . . 117
7.2.2. Хроматографические методы с масс-спектрометрическим детектированием . . . 117
7.2.3. Методы элементного анализа . . . 122
7.2.4. Методы анализа пептидных препаратов . . . 124
7.3. Требования к валидации биоаналитических методик . . . 129
7.4. Способы расчета концентрации, используемые при количественном определении веществ в биологических средах . . . 138
7.5. Проблемы, возникающие при биоаналитических исследованиях . . . 139
7.5.1. Эффект матрицы . . . 139
7.5.2. Анализ веществ, содержащих нестабильные функциональные группы . . . 140
7.5.3. Обратная конверсия метаболитов . . . 144
7.5.4. Разделение хиральных соединений . . . 147
7.5.5. Проблемные вещества с точки зрения детектирования и хроматографии . . . 147
7.6. Взаимодействие лаборатории и клинического центра . . . 149

8. Возможные причины получения неэквивалентных результатов . . . 151
8.1. Анализ проблем разработки лекарственной формы . . . 151
8.1.1. Ошибки, вызванные физико-химическими свойствами активных фармацевтических субстанций . . . 151
8.1.2. Неправильный выбор вспомогательных веществ . . . 153
8.2. Технология изготовления препарата и параметры технологического процесса . . . 153
8.3. Некорректный выбор дизайна исследования биоэквивалентности и расчет размера выборки; внутрииндивидуальная и межиндивидуальная вариабельность; недостаточная статистическая мощность . . . 154
8.3.1. Факторы, влияющие на правильность выбора дизайна исследования . . . 155
8.3.2. Корректность определения размера выборки субъектов в исследование БЭ; внутрииндивидуальная и межиндивидуальная вариабельность; недостаточная статистическая мощность в исследованиях БЭ . . . 159
8.4. Химическая нестабильность молекулы действующего вещества препарата или его метаболита. Ошибки аналитической части исследования биоэквивалентности . . . 160

9. Биоаналитические исследования на животных: методика количественного определения оригинального лекарственного препарата ревазол в плазме крови крысы и кролика методом ВЭЖХ-МС/МС . . . 162

10. Опыт биоаналитических исследований воспроизведенных лекарственных препаратов в РФ 166
10.1. Структура клинических исследований биоэквивалентности в РФ 166
10.2. Результаты биоаналитических исследований некоторых воспроизведенных лекарственных препаратов 169

11. Фармакогенетика в клинических исследованиях 192

Заключение 204
Список литературы 205
Приложение. Примеры валидированных методик и результаты их применения в исследованиях фармакокинетики 226

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААС	– атомно-абсорбционная спектрометрия
АБС	– амиотрофический боковой склероз
АФС	– активная фармацевтическая субстанция
АЭС-ИСП	– атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой
БИ	– биоаналитические исследования
БЭ	– биоэквивалентность
ВВП	– высоковариабельные лекарственные препараты
ВМА	– Всемирная Медицинская Ассоциация
ВТО	– Всемирная торговая организация
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
ВЭЖХ-МС/МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием
ГЖХ	– газожидкостная хроматография
ГХ-МС	– газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
ГХ-МС/МС	– газовая хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием
ГФ	– Государственная фармакопея Российской Федерации
ДВ	– действующее вещество
ДИ	– доклиническое исследование
ДЛС	– дженерическое лекарственное средство
ДМСО	– диметилсульфоксид
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ЖНВЛП	– жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты
ИЛС	– информационный листок субъекта
ИМТ	– индекс массы тела
ИС	– информированное согласие
ИФА	– иммуноферментный анализ
КИ	– клиническое исследование
КИО	– контрактно-исследовательские организация
КП	– коэффициент пересчета
КЭ	– капиллярный электрофорез
ЛИА	– люминисцентный иммуноанализ
ЛВ	– лекарственное вещество
ЛП	– лекарственный препарат
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротены низкой плотности
ЛС	– лекарственное средство
ЛФ	– лекарственная форма
ЛЭК	– локальный этический комитет

МНН – международное непатентованное наименование
МРНД – максимальная рекомендуемая начальная доза
МС-ИСП – масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой
НМДА – N-метил-D-аспартат
НЛР – нежелательная лекарственная реакция
НПКО – нижний предел количественного определения
НПР – неблагоприятная побочная реакция
НФ – неподвижная фаза
НЯ – нежелательные явления
ОЛС – оригинальное лекарственное средство
ОФС – общая фармакопейная статья
ПАВ – поверхностно-активные вещества
ПД – персональные данные
ПОБ – периодический отчет о безопасности
ПФ – подвижная фаза
ПФИА – поляризационный флюроиммуноанализ
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РИА – радиоиммунный анализ
РУ – регистрационные удостоверения
Р – референтный препарат
СКФХ-МС/МС – сверхкритическая флюидная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием
СНЯ – серьезное нежелательное явление
СОП – стандартная операционная процедура
СТКР – сравнительный тест кинетики растворения
СФМ – спектрофотометрия
ТГ – триглицериды
УЛФ – уполномоченное лицо по фармаконадзору
УЭЖХ – ультраэффективная жидкостная хроматография
ФД – фармакодинамика
ФЗ – федеральный закон
ФК – фармакокинетика
ХСЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности
ЭДЧ – эквивалентные дозы для человека
ATD – предполагаемая терапевтическая широты
CTD – common technical document (общий технический документ)
GCP – надлежащая клиническая практика
GLP – надлежащая лабораторная практика
GMP – надлежащая производственная практика
GPCRs – трансмембранные рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCRs)
GTAC – Консультативный комитет по генетической терапии
ICH – The International Council for Harmonisation (Международная конференция по гармонизации)
ELISA – enzyme linked immunosorbent assay (гетерогенный ИФА)
EMA – European Medicines Agency (Европейское медицинское агенство)

EP – The European Pharmacopeia (Европейская фармакопея)
FDA – Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)
MABEL – минимальный предполагаемый биологически эффективный уровень
MALDI-TOF – масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией лазерной десорбцией при содействии матрицы и времяпролетным анализатором
PAD – фармакологически активная доза
QSAR – количественного соотношения «структура-активность»
R – референтный препарат
T – тестируемый препарат
USP – TheUnited States Pharmacopeia (Фармакопея США)
WHO / ВОЗ – The World Health Organization (Всемирная Организация Здравоохранения)

Лекарственные препараты

ADP – амлодипин
AZM – Азитромицин
dAZM – Азитромицин-$^{13}CD_3$
DTS – Дутастерид
cDTS – Дутастерид-$^{13}C_6$
VST – валсартан
MFX – Моксифлоксацин
dMFX – Моксифлоксацин-d_4

1. ВВЕДЕНИЕ

Целью биоаналитических исследований (БИ) является качественное и/или количественное определение веществ в биологических объектах. БИ выполняются при изучении фармакокинетики лекарственных препаратов (ЛП), терапевтическом лекарственном мониторинге, судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях, а также допинг-контроле.

В данной монографии БИ рассматриваются в контексте изучения фармакокинетики лекарственных препаратов, так как это направление имеет определенную специфику и требует отдельного внимания. Фармакокинетические исследования (ФК) могут проводиться в рамках доклинических (ДИ) [301, 328, 260] и клинических исследований (КИ) оригинальных ЛП [45], подтверждения биоэквивалентности воспроизведенных ЛП [69, 80]. В некоторых случаях такие исследования проводятся после регистрации ЛП для оценки влияния различных факторов: межлекарственного взаимодействия, функционального состояния различных органов и систем и т. д. на фармакокинетические показатели ЛП [187]. Вместе с тем успешность БИ во многом зависит от правильного проведения и интерпретации исследований лекарственных препаратов in vitro.

Соответствующая организация БИ, основанная на современных достижениях науки, необходима для создания инновационных и качественных воспроизведенных лекарственных препаратов. В настоящее время фармацевтическая индустрия по праву считается одним из перспективных и динамично развивающихся секторов мировой экономики, что является актуальным и для Российской Федерации. На отечественном фармацевтическом рынке фиксируется значительное увеличение количества воспроизведенных и в меньшей степени оригинальных лекарственных препаратов [5, 73, 103, 104]. Драйверами роста выступают перспективные развивающиеся рынки (Китай, Бразилия, РФ, Индия, Мексика, Венесуэла) в результате экономической экспансии, демографических и эпидемиологических изменений [120].

Однако по-прежнему тремя главными фармацевтическими центрами планеты остаются США, Европа и Япония, на которые в 2016 – 2017 гг. приходится 59 % мирового фармацевтического рынка. Увеличиваются расходы на препараты-дженерики с 242 млрд дол. США в 2011 г. до 400 – 430 млрд дол. США в 2017 г., в то время как объемы продаж оригинальных ЛС сократятся. Активное развитие также получает новый сектор биофармацевтической промышленности – рынок биосимиляров, объем их мировых продаж к 2017 г. составляет 4 млрд дол. США. В настоящее время объем продаж воспроизведенных лекарственных препаратов следующий: в США – около 25 %, Германии – 35 %, Великобритании – 55 %, Венгрии – 55 %, Польше – 61 %, Словакии – 66 % [282, 309]. Совмещение географических и товарных сегментов позволяет сделать вывод о том, что в развитых странах в процентном отношении в объеме потребления лидируют оригинальные лекарственные препараты – 2011 г.: 73 %; 2015 г.: 69 %, но их доля незначительно сокращается за счет увеличении доли дженериков – 2011 г.: 14 %; 2015 г.: 18 %. Для развивающихся рынков характерна обратная тенденция с превалированием дженериков, доля которых возрастает: 2011 г. – 57 %;

2015 г. – 65 % и снижением объемов потребления инновационных препаратов: 2011 г. – 30 %; 2015 г. – 24 %.

Следующей особенностью мирового фармацевтического рынка является рост эффективности процессов открытия, разработки и обращения новых видов лекарств. Анализ данных позволяет сделать вывод о стабильности инвестируемых средств на исследования и разработку новых видов лекарственных препаратов – от 120 до 141 млрд долл. за период 2007–2016 гг. Необходимо отметить, что на динамике вложений в научные разработки практически не отражаются колебания мировой экономики в период кризисов. Доля США в исследуемый период по данному показателю колеблется в пределах от 36 до 40 %, при этом стоимость разработки нового препарата в США составляет в среднем 2,5 млрд. долларов по сравнению с 138 млн долларов в 1975 году. Это значительное увеличение расходов отражает различные технические, нормативные и экономические проблемы, стоящие перед сферой научных исследований. При этом только 2 из 10 лекарств имеют выручку, сопоставимую или превосходящую вложенные затраты на исследования и разработки [27].

Проблема разработки, производства и применения генерических препаратов является очень актуальной в государствах ЕврАзЭС, поскольку их лекарственные рынки развиваются преимущественно за счет дженериков [31, 120]. На российском рынке дженерики занимают большую долю (около 77 %), и этот сектор фармрынка продолжает развиваться опережающими темпами по отношению к общему рынку лекарственных средств [29]. В России, согласно данным аналитической компании DSM Group, 85,5 % упаковок лекарств, проданных аптеками с января по август 2016 года, приходятся на дженерики. Их продажи в стоимостном выражении выросли на 2 % и достигли 239 млрд рублей. Это означает открытие новых ниш для воспроизведенных лекарственных средств и общий рост сегмента дженериков [54, 80, 184]. Показательно распределение видов препаратов-лидеров розничных продаж в России. В отличие от западных стран и США, где наибольшие обороты обеспечивают оригинальные лекарства, в России они делят ведущее положение с воспроизведенными препаратами. Например, в портфелях 10 ведущих по оборотам на российском рынке фармкомпаний (чей совокупный оборот составил около 25 % общего объема аптечного рынка) в числе первых трех лидеров оказались 12 оригинальных монопрепаратов, 10 дженериков (т. е. копий оригинальных монопрепаратов) и 8 комплексных лекарственных средств [41, 115].

Следует отметить, что необходимым условием для разработки и регистрации оригинальных и воспроизведенных лекарственных препаратов является проведение биоаналитических и фармакокинетических исследований, соответствующих принципам надлежащих практик (GCP, GLP, GCLP), что отвечает интересам Российской Федерации как в плане импортзамещения, так и выводе препаратов на зарубежные рынки. Авторский коллектив надеется, что анализ зарубежного и отечественного опыта биоаналитических исследований будет полезен при планировании и выполнении качественных исследований оригинальных и воспроизведенных лекарственных препаратов.

2. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ РАЗРАБОТКИ ОРИГИНАЛЬНЫХ И ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

2.1. РАЗРАБОТКА ОРИГИНАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Создание инновационных лекарств играет важнейшую роль в здравоохранении любой страны и способствует появлению более эффективных инструментов в лечении различных заболеваний. Следует отметить, что начиная с 2006–2010 гг. количество новых лекарственных средств (ЛС) химического или биологического происхождения, выведенных на рынок, снизилось с 211 до 151 по сравнению с предыдущим десятилетием [73]. Свидетельством такой низкой эффективности R&D разработок, отчасти может служить снижение их рентабельности. Далеко не все препараты по разным причинам доходят до клинических исследований. В Российской Федерации отмечается тенденция к увеличению разработок оригинальных препаратов наряду с ростом исследований дженериков. Судя по локальным клиническим исследованиям российских спонсоров, в 2016 г. основная доля исследований приходится на дженерики – 31 % (61 исследование). На втором месте у российских компаний также идут оригинальные препараты на основе малых молекул – 19 % (38 исследований). Довольно большую долю – 10 % (19 исследований) занимают биоаналоги. Что касается локальных пострегистрационных исследований отечественных спонсоров, то их доля составляет 8 %, или 16 исследований. Из них три пришлось на оригинальные препараты (малые молекулы), одно – на оригинальный биологический препарат, три – на вакцины, пять – на дженерики и четыре – на биоаналоги [39,46].

Разработка нового ЛП представляет длинный путь, в котором участвуют разные специалисты, в том числе медицинские химики. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Соединенных Штатов Америки (US FDA) определяет ***пять этапов*** процесса создания новых лекарственных средств [196]:

1) лабораторная (in vitro) идентификация и разработка новых лекарственных средств (Discovery and Development);

2) доклинические исследования (Preclinical research);

3) клинические исследования (Clinical research);

4) рассмотрение собранных данных в Управлении по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA Review);

5) мониторинг безопасности после вывода лекарственного средства на рынок (FDA Post-Market Safety Monitoring).

Таким образом, первый этап процесса создания лекарственного средства полностью представлен in vitro исследованиями, объектами для которых является большое разнообразие химических соединений – потенциальных кандидатов в лекарственные средства. В ходе проведения процедур отбора происходит уменьшение объема исследуемой выборки с выводом на этап

доклинических исследований одного или нескольких соединений лидеров. In vitro исследования направлены на высокопроизводительный сбор информации о тестируемых соединениях для оценки:

– активности в отношении предполагаемых биологических мишеней;
– механизмов действия;
– сравнительной эффективности и дозировки;
– фармакокинетических и фармакологических параметров адсорбции, распределения, метаболизма и экскреции (ADME панель – абсорбция, распределение, метаболизм и выведение).
– токсичности, побочных действий;
– способа введения в организм;
– скорости высвобождения;
– взаимодействия с другими лекарственными средствами.

На рис. 2.1 представлен этап Discovery and Development в виде циклического процесса, требующего многократного повторения поисковых процедур с изменением ряда параметров исследуемых объектов.

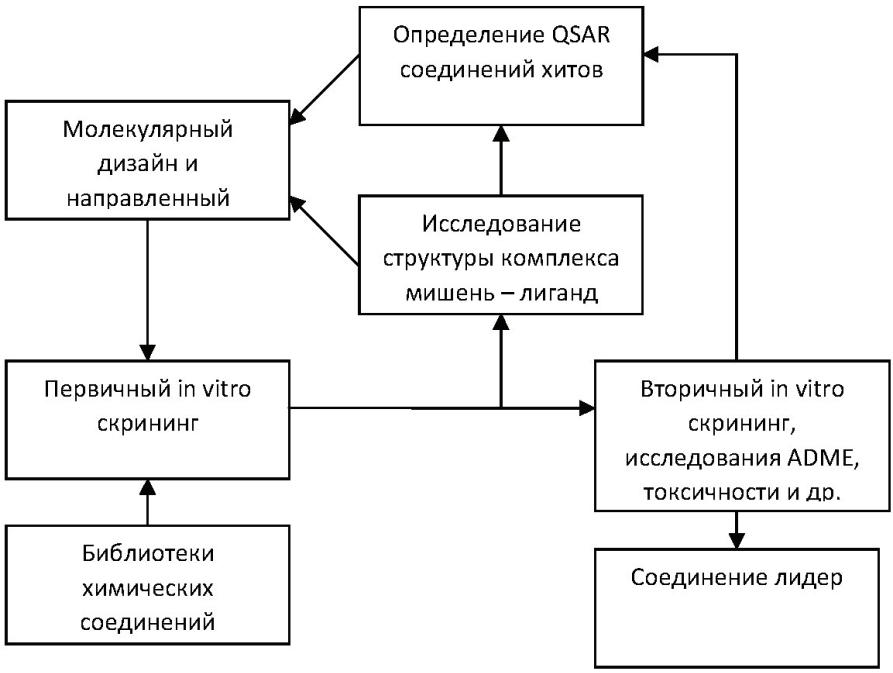


Рис. 2.1. Схема этапа Discovery and Development создания новых лекарственных средств

Процесс создания новых ЛС приводит к неудаче по двум причинам: они оказываются неэффективными или могут быть небезопасными. Поэтому одним из наиболее важных этапов, определяющих успешность всех последующих исследований, является идентификация и валидация биомишени. Биомишенью в данном случае следует понимать молекулярную структуру организма (например, нативный белок), взаимодействие которого с эндо-

генным веществом (лекарственным средством) приводит к изменению его функций и определенному эффекту, желательному или нежелательному. Наиболее распространенными типами биомишеней для используемых в настоящее время лекарственных средств являются: трансмембранные рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCRs), ферменты, ионные каналы, транспортные белки, нуклеиновые кислоты. Биомишень в первую очередь должна быть доступной для молекулы лекарственного средства, взаимодействие с которой вызывает ожидаемый биологический ответ. Известно, что некоторые классы биомишеней, например, GPCRs белки, чаще используются в поиске лекарственных средств на основе малых молекул, тогда как антитела более предпочтительны для воздействия на белок-белковые взаимодействия [149, 295]. Как правило, идентификация биомишеней есть результат фундаментальных биологических исследований взаимосвязи между заболеванием и ассоциированных с ним биомишеней. Среди распространенных подходов для идентификации биомишеней можно отметить фенотипический скрининг для определения ассоциированных с заболеванием мишеней. Например, в эксперименте Kurosawa et al., 2008 использовали библиотеку антител методом фагового дисплея для выделения человеческих моноклональных антител, которые связываются с поверхностью опухолевых клеток [248]. Клоны подвергали скринингу с помощью иммуноокрашивания и выбирали те, которые преимущественно и сильно окрашивали злокачественные клетки. Антигены, распознаваемые этими клонами, выделяли иммунопреципитацией и идентифицировали с помощью масс-спектроскопии. С помощью 2114 уникальных моноклональных антител был идентифицирован 21 антиген, экспрессируемый рядом карцином. В результате эксперимента были идентифицированы биомишени для терапии карциномы и обнаружены несколько моноклональных антител, потенциальных лекарственных средств. Среди альтернативных подходов для идентификации биомишеней следует отметить исследования в области экспрессии генов, протеомики, генной инженерии.

После идентификации биомишень должна быть тщательно валидирована. Валидация позволяет убедиться, что модуляция структуры мишени приводит к достижению требуемого терапевтического эффекта. Валидация направлена на установление функции мишени, связанной с определенным фенотипическим проявлением заболевания. Валидация включает в себя как in vitro методы, так и модуляцию исследуемых биомишеней in vivo на животных моделях заболеваний. Среди методов валидации следует отметить нарушение функционирования мишени путем воздействия на нее малыми молекулами или моноклональными антителами, разрушение хромофор модифицированной мишени с помощью излучения, подавление синтеза мишени методами генного нокаута.

После того, как биомишень идентифицирована и валидирована, процесс создания лекарственного средства переходит на этап идентификации хитов (hit compound) и поиска молекул лидеров (lead compound). Несмотря на существование различных интерпретаций понятия “хит”, в данном случае понимается молекула, проявившая подтвержденную активность в используемом методе скрининга. Можно выделить несколько подходов к поиску хитов:

1. *Высокопроизводительный скрининг (high throughput screening, HTS).* Высокопроизводительный скрининг используется для автоматизированного исследования большого количества химических соединений в отношении как отдельной биомишени, так и более сложных систем. Например, высокопроизводительный скрининг на клеточных моделях является экспресс-методом установления опосредованного влияния исследуемых молекул на функциональное состояние клеток через биологический ответ мишени. Этот подход не предполагает необходимость знаний о характере хемотипа, который будет иметь активность в отношении исследуемой мишени. Библиотеки химических соединений больших размеров создаются с использованием методов комбинаторного синтеза, и огромные трудозатраты для осуществления процесса поиска компенсируются благодаря использованию высокоавтоматизированной робототехники.

2. *Структурно-обоснованный дизайн молекул (structure-based drug design)* [155] для направленного скрининга (focused screening) осуществляется на основе данных о строении биомишени и хемотипах с наибольшей вероятностью проявления активности по отношению к ней. Для такого подхода требуются значительно меньшие по размерам библиотеки химических веществ с заранее прогнозируемыми свойствами и биологической активностью. Одним из методов определения потенциальных структур для поиска является докинг-компьютерное моделирование для определения предпочтительной геометрии молекулы для взаимодействия с активным центром фермента.

В качестве примера реализации подхода структурно-обоснованного дизайна можно привести исследование по поиску ингибиторов карбоангидразы II для создания лекарственного средства от открытоугольной глаукомы. Исследование было проведено коллаборацией Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского, Санкт-Петербургского государственного университета, Флорентийского университета и Пизанского университета [197, 250, 251, 252]. На основе информации о трехмерной структуре карбоангидраз II [189, 243] был предложен дизайн библиотеки потенциальных ингибиторов, предполагающих следующую общую структуру: первичный сульфонамид, связанный через бензольный либо тиофеновый линкер с замещенным биполярным азолом. В результате проведения докинга была спроектирована и синтезирована сфокусированная библиотека структурных аналогов. Докинг комплекса мишень-лиганд предсказал наличие характерной координации сульфонамидного фрагмента с каталитически активным ионом цинка II активного центра карбоангидраз, обеспечивающей потентное ингибирующее действие, а также ряд липофильных и гидрофильных взаимодействий молекулярной периферии с аминокислотными остатками белкового скелета каталитической щели фермента, обеспечивающих высокую изоформную селективность (рис. 2.2).

In vitro ингибирующая активность соединений определялась кинетическим методом остановленной струи. Раствор фермента инкубировался с растворами исследуемого вещества в различных концентрациях, после чего моментально смешивался с раствором субстрата (углекислого газа) в камере скринингового аппарата в присутствии индикатора. Скорость протекания

реакции, катализируемой ферментом, измерялась по скорости падения адсорбции раствора при длине волны 557 нм. Константа ингибирования рассчитывалась на основании уравнения Ченга-Прусова по результатам не менее двух измерений для каждой концентрации. В результате в исследуемой библиотеке был идентифицирован ряд хитов с ингибирующей активностью и селективностью, превышающей параметры известного ингибитора карбоангидраз Дорзоламида.

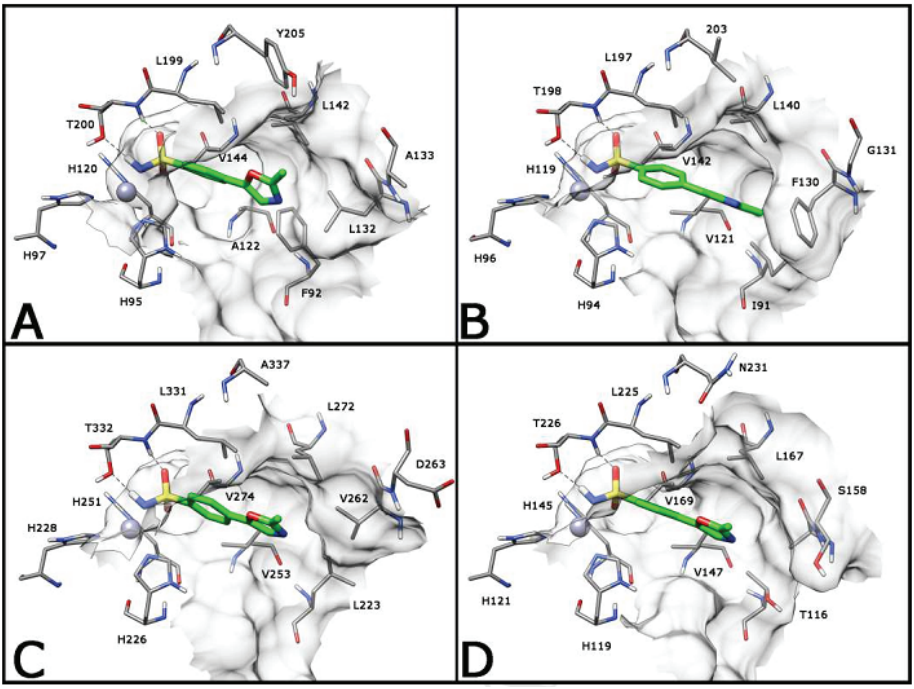


Рис. 2.2. Результаты докинга карбоангидраз с биядерным азолсодержащим сульфонамидом

3. *Лиганд-обоснованный дизайн молекул (ligand-based drug design)* для направленного скрининга основан на данных о структуре известной молекулы, активной по отношению к исследуемой мишени. Такая молекула рассматривается как фармакофорная модель, определяющая минимальный набор структурных характеристик для того, чтобы обеспечить взаимодействие с мишенью. Фармакофор, по сути, представляет собой модель мишени, построенной на основе данных о том, какие структурные элементы лиганда связываются с ней. Эта модель позволяет сконструировать новые структурные аналоги с подобной активностью к связыванию с мишенью. Следует отметить широкое использование для этого подхода компьютерных моделей количественного соотношения структура-активность (QSAR).

Методы in vitro скрининга можно разделить на две категории: клеточные анализы (cell assay) и биохимические анализы (biochemical assay). Как правило, клеточные анализы применяются в случае исследования в качестве биомишени ионных каналов, трансмембранных и клеточных рецепторов и

основаны на измерении биологического ответа клетки в присутствии раствора исследуемого вещества [268]. Биохимические анализы используются в случае исследования аффинности исследуемых молекул к ферментам и рецепторам. Выбор методов анализа для скрининга определяется природой мишени, техническим оснащением исследовательской лаборатории и опыта исследовательской группы. В независимости от выбранного метода скрининга необходимо учитывать несколько факторов:

1. Фармакологическая релевантность исследования. Если возможно, исследования должны проводиться с использованием известных лигандов с описанной активностью. Это позволяет определить, что исследование моделирует состояние заболевания и способно идентифицировать соединения с ожидаемой активностью.

2. Воспроизводимость анализа. Результаты должны воспроизводиться на разных планшетах в течение всех дней эксперимента и всего времени реализации исследовательского проекта.

3. Качество анализа в соответствии с Z-фактором. Значение Z-фактора имеет диапазон от 0 до 1 и приемлемым считается значение более 0,4.

4. Влияние химических компонентов анализа. Вещества для анализа обычно хранятся в виде замороженных растворов в ДМСО. Клеточные анализы чувствительны к концентрации ДМСО более 1 %, тогда как биохимические анализы возможно проводить при содержании ДМСО до 10 %.

В случае поиска нового лекарственного средства среди малых молекул библиотека для скрининга должна соответствовать нескольким физико-химическим параметрам в соответствии с широкоизвестными правилами Липинского (Lipinski) [262]. При этом многие исследовательские группы стараются ужесточить эти параметры, например, уменьшая значения молекулярной массы до 400 и logP до 4. Это особенно оправдано в начале процесса поиска, так как последующая оптимизация соединений, как правило, связана с увеличением молекулярной массы и может привести в результате к ряду проблем с фармакокинетикой вещества.

После получения серии хитов в ходе первичного скрининга, например, методом высокопроизводительного скрининга, необходимо провести отбор соединений по нескольким параметрам. Во-первых, необходимо отобрать PAINs соединения (pan-assay interference compounds) (если это не было по каким-то причинам сделано на стадии планирования скрининга), которые дают в результатах анализа фальш-позитивный результат. Это химически активные вещества, которые неспецифично взаимодействуют с многочисленными биомишенями, не проявляя специфической активности к одной исследуемой [148]. В настоящее время описано большое количество классов подобных соединений, и использование специальных фильтрующих алгоритмов позволяет удалить их из библиотеки еще на стадии виртуального компьютерного скрининга. Во-вторых, в ряду хитов необходимо удалить близкие по структуре соединения для достижения максимального структурного разнообразия выборки. Для этого также разработаны специальные компьютерные алгоритмы определения структурного подобия.

Найденные хиты должны пройти ряд подтверждающих процедур. Для каждого хита требуется построить кривую доза-ответ. Ситуация, когда у со-

единения не наблюдается нормальный ответ на изменение дозы, свидетельствует о необратимом связывании с мишенью, что менее предпочтительно по сравнению с обратимым связыванием. На основе кривой доза-ответ можно рассчитать концентрацию полумаксимального ингибирования IC_{50} для сравнительного анализа хитов и определения направления оптимизации их структуры. Для подтверждения хитов используется подход ортодоксального тестирования, заключающийся в сравнительном исследовании их в условиях какого-либо другого анализа. Кроме того, на этой стадии поиска хиты оцениваются в отношении патентоспособности, уникальности, доступности получения и возможности масштабирования синтеза. Для получения экспериментальной информации о структуре комплекса лиганд-мишень применяется метод рентген-кристаллографии.

Одновременно на стадии отбора хитов проводится in vitro исследование их фармакологических параметров абсорбции, распределения, метаболизма и экскреции (ADME), а также токсичности. Предпочтительными результатами для соединений являются низкая лекарственная интерференция с цитохромами P450, низкая связываемость сывороточным альбумином человека, низкая цитотоксичность, стабильность в микросомах, фракции S9 печени и гепатоцитах, стабильность в искусственном желудочном и кишечном соке.

На основе полученных данных медицинскими химиками принимаются корректирующие решения по оптимизации структур хитов с использованием информации о QSAR хитов и методов докинга (если известна пространственная структура биомишени). Путем увеличения эффективности и селективности, снижения токсичности, а также улучшения фармакокинетических параметров целью оптимизации является получение соединения лидера (lead compound), которое рассматривается как потенциальный кандидат в лекарственное средство и используется в in vivo доклинических исследованиях. Для поиска соединения лидера может потребоваться перебор нескольких сотен тысяч соединений – это во многом подтверждает мнение, что в настоящее время для медицинской химии самой сложной задачей является получение не вещества, а свойства.

Прежде чем потенциальное ЛС можно будет испытано на человеке, разработчики препарата обязаны провести полномасштабные исследования на животных. Биоаналитические исследования с определением фармакокинетики оригинального лекарственного препарата проводятся уже на этапе доклинического исследования на лабораторных животных (см. также главу 10).

2.1.1. Доклинические исследования на животных

Основные цели доклинических исследований на животных заключаются в следующем:

1) выявление действия препарата на системы организма (фармакодинамика);

2) определение содержания препарата в крови, механизмов всасывания, распределения, метаболизма и выведения после попадания в организм (фармакокинетика);

3) оценка острой токсичности диапазона доз препарата для животных, во много раз превышающих планируемые для людей, и в случае токсичности определение поражаемых органов и пределов безопасности, выраженных: а) в дозе, при которой не наблюдаются нежелательные эффекты (NOAEL) относительно массы тела, и б) в воздействии препарата – концентрации препарата в кровотоке в течение 24 часов (токсикокинетика) [33];

4) оценка токсичности многократного введения препарата (хронической токсичности);

5) оценка местно-раздражающего действия препарата;

6) разработка оптимальной лекарственной формы препарата.

После того, как в доклинических исследования были определены величины NOAEL, их пересчитывают в эквивалентные дозы для человека (ЭДЧ). Для этого нужно выбирать самый подходящий метод экстраполяции дозы для животных на эквивалентную дозу для человека [22, 23]. Чем меньше животное, тем быстрее протекают у него биохимические процессы. Таким образом, при пересчете величины дозы с животных на человека необходимо разделить дозу, полученную на животных, на коэффициент пересчета (КП) (табл. 2.1).

Таблица 2.1. Коэффициенты пересчета доз в мг/кг с животных на человека с массой тела 50–80 кг

Вид животного	КП
Мышь	11,8
Крыса	5,9
Морская свинка	4,7
Кролик	3,2
Собака	1,8
Мини-свинья	1,4
Обезьяна	3,1

Если виды используемых животных отсутствуют в таблице или вес выходит за стандартные границы, то можно использовать следующую формулу для расчета ЭДЧ:

$$\text{ЭДЧ} = \frac{\text{доза для животных (мг/кг)} \times \text{масса тела животного (кг)}}{\text{масса тела человека (кг)}}$$

Для большей безопасности человека при первом назначении нового препарата дозу ЭДЧ необходимо разделить на коэффициент безопасности, стандартная величина которого равна 10. Однако при наличии опасений развития нежелательных эффектов у добровольцев данный коэффициент может быть увеличен [22, 298].

В методике расчета безопасной начальной дозы, предлагаемой FDA [230], используется поэтапный подход:

1. Сначала доза, при которой не наблюдаются нежелательные эффекты, полученная из токсикологических исследований (NOAEL) [274], переводится в эквивалентную человеческую дозу (ЭДЧ) исходя из площади поверхности тела;

2. Затем ЭДЧ выбирается от наиболее подходящих особей;

3. После этого для получения максимальной рекомендуемой начальной дозы (МРНД) применяется коэффициент безопасности (10-кратный);

4. МРНД корректируется с учетом предполагаемого фармакологического действия препарата.

Данная методика отличается простотой и подтверждается обширным предшествующим опытом применения. Однако упор делается не на выборе дозы с минимальным фармакологическим эффектом у людей, а на дозе с минимальным риском токсичности с учетом NOAEL. Кроме того, целью является доза, а не воздействие препарата [312]. Таким образом, дополняющим методом определения безопасной начальной дозы может быть расчет на основе ожидаемой дозы, при которой наблюдается минимальный биологический эффект. В этом методе учитываются все имеющие значение данные и принимаются во внимание: новизна, активность, механизм действия, степень видоспецифичности, данные о зависимости дозы и ответной реакции в клетках человека и животных in vitro, данные о зависимости дозы/концентрации и ответной реакции у животных in vivo, результаты фармакокинетического и фармакодинамического моделирований, рассчитанная вовлеченность мишени в зависимости от концентрации и концентрация мишени или клеток-мишени у людей in vivo. Если по разным методикам получаются разные расчеты, берется минимальное значение и в фактической начальной дозе необходимо заложить предел безопасности. Если есть вероятность, что доклинические данные будут служить ненадежным ориентиром ответной реакции у людей, рассчитанная начальная доза уменьшается и повышается с небольшим шагом, чтобы кривая «доза – ответная реакция» не была крутой.

На этапе доклинических исследований осуществляется изучение ФК субстанции нового лекарственного препарата при различных путях введения, распределения ЛВ по органам и тканям, его метаболизм и экскреция, а также выбор и оптимизация состава лекарственной формы на основании расчета относительной биодоступности. При этом наиболее сложным и трудоемким является количественное определение аналитов в тканях лабораторных животных. Данный процесс включает стадии гомогенизации/настаивания биологического материала с использованием определенных растворителей или их смеси с солями или кислотами, стадии экстракции аналита с возможным последующим концентрированием и стадии анализа экстракта с применением современных инструментальных методов анализа.

Только после тщательного изучения потенциального ЛП на животных и получения перспективных и безопасных результатов приступают к исследованиям I фазы.

2.1.2. Создание биотехнологических лекарственных препаратов

Биотехнологические ЛС (также называемые биологические лекарственные препараты) – это рекомбинантные белки, гормоны, цитокины, моноклональные антитела, генетические модифицированные микроорганизмы

(ГММ) и генетические лекарственные препараты. В мировой практике рассмотрение экспериментальных биологических препаратов высокой степени риска отличается от процедуры для других препаратов (увеличена продолжительность рассмотрения подобных исследований, клинические исследования генетических препаратов должны быть разрешены Консультативным комитетом по генетической терапии (GTAC)).

Для проведения исследований препаратов белкового происхождения и моноклональных антител предусмотрены дополнительные требования к исследователю. Например, он должен уметь купировать иммунные реакции, в т. ч. анафилактические [225]. Многие белки характеризуются длительным периодом полувыведения и требуют редкого приема пациентами. Поэтому для получения исчерпывающей картины о фармакокинетическом профиле и достоверной оценки иммунного ответа необходимо обеспечить достаточный период последующего наблюдения – 3 месяца или даже дольше.

Потенциальные ЛС, имеющие биологическое происхождение, относят к препаратам с более высоким риском, чем другие исследуемые препараты.

К биологическим лекарственным средствам повышенного риска относятся:

1. Любые соединения, способные вызвать тяжелое нарушение жизненно важных систем организма;
2. Препараты с агонистическим или стимулирующим действием;
3. Новые препараты или механизмы действия, для которых нет предшествующего опыта использования;
4. Видоспецифичные препараты, из-за которых доклиническая оценка риска осложнена или невозможна;
5. Сильнодействующие препараты, например, по сравнению с естественными лигандами;
6. Многофункциональные препараты, например, двухвалентные антитела;
7. Мишени, связанные с клетками;
8. Мишени, действующие в обход нормальных механизмов регуляции;
9. Мишени иммунной системы;
10. Мишени в системах с потенциалом значительного биологического усиления in vivo.

Термин «повышенный риск» подразумевает, что оценка ЛС должна быть еще более тщательной и качественной, чем обычно, и не означает, что риск для субъектов может быть выше минимального.

2.1.3. Стратегия проведения исследований оригинальных лекарственных препаратов

Цель I фазы КИ состоит в определении безопасности, а также основных фармакокинетических констант нового ЛП на людях при однократном и последующем многократном приеме, в решении вопроса о возможном изменении дозы. С учетом этого биоаналитическим исследованиям при планировании и выполнении клинических исследований I фазы придается особое значение. Большинство исследований I фазы проводится с участием здоровых добровольцев, предпочтительнее на лицах мужского пола [23]. Однако по

этическим причинам и соображениям безопасности в некоторых исследованиях участвуют только пациенты с заболеванием, для которого разрабатывается препарат (например, ВИЧ, онкопатология). Участники подобных исследований могут сталкиваться с определенным риском для здоровья, поскольку способность исследователей прогнозировать влияние потенциально нового лекарственного средства на людей ограничена до того, как кандидат в препараты будет изучен при участии добровольцев. I фаза клинических исследований является ключевым шагом в разработке лекарственных средств, требует всесторонних знаний. Результат исследований зависит от правильно поставленных целей и задач, а также качества выполнения (рис. 2.2). Вместе с тем безопасность и благополучие субъектов исследования – как здоровых добровольцев, так и пациентов – должны всегда быть на первом месте, что необходимо учитывать при разработке стратегии исследования [96].

При планировании исследования I фазы учитывается происхождение лекарственного препарата, например:

1. Химические структурные элементы,
2. Биотехнологические препараты,
3. Препараты клеточной терапии,
4. Препараты генной терапии,
5. Препараты, полученные из плазмы,
6. Другие экстрактивные средства,
7. Препараты растительного происхождения;
8. Радиофармацевтические соединения и т. д.

Как правило, в первом исследовании I фазы исследуются однократные дозы с их возрастанием. В ряде случаев (исследования на пациентах) оцениваются некоторые фармакодинамические эффекты. Исследования I фазы могут иметь адаптивный дизайн с этапным возрастанием доз. К I фазе относятся исследования по оценке:

1. Воздействия на активность препарата потенциальных факторов влияния, таких как пища, пол субъекта, возрастные и генетические различия;

2. Зависимость ответной реакции от дозы или концентрации препарата (например, с помощью исследования биомаркеров или введения стимулирующих препаратов (аллергены, серотонин, гистамин и т. п.) [256];

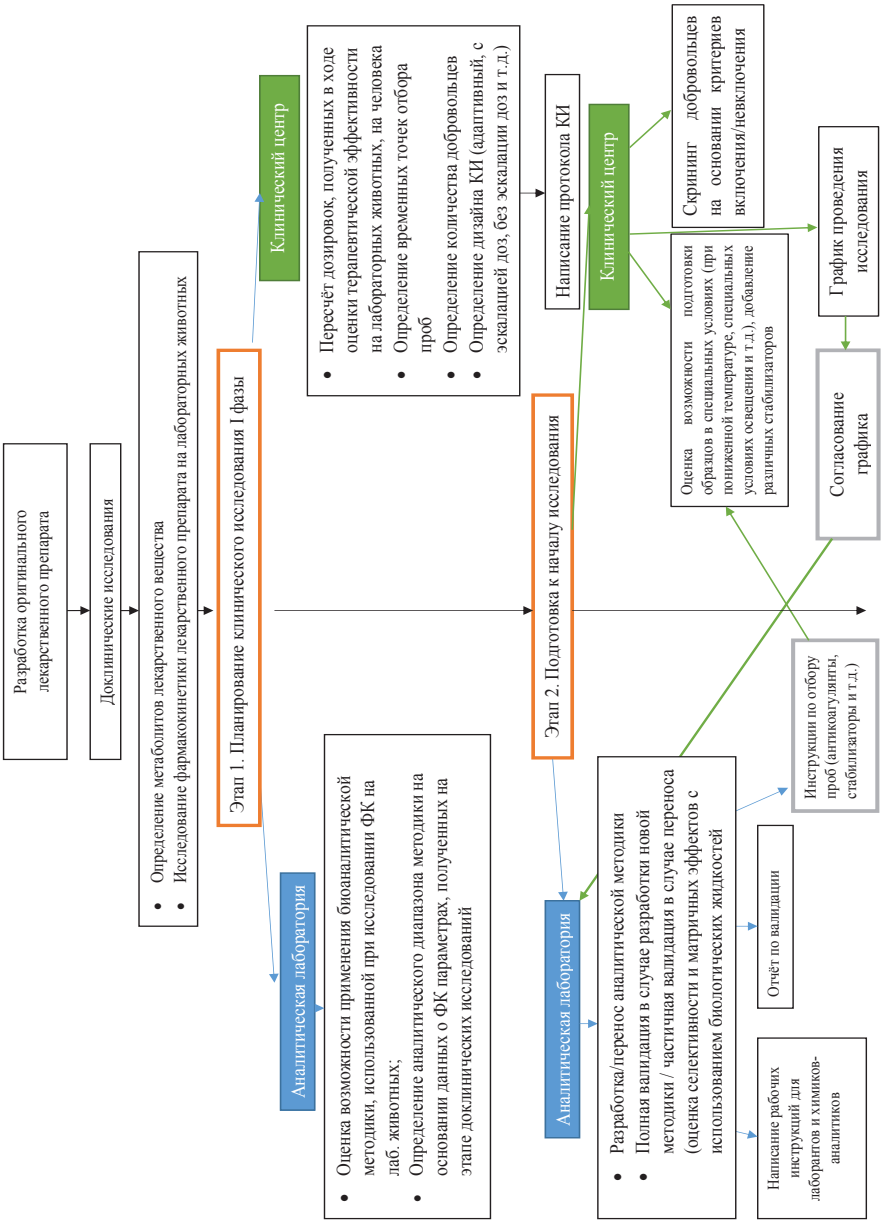
3. Возможного взаимодействия препарата с зарегистрированными препаратами;

4. Всасывания, распределения, метаболизма и выведения препарата, меченных радиоактивным изотопом;

5. Биодоступности или биоэквивалентности препарата [222];

6. Влияния исследуемого продукта на интервал QT на электрокардиограмме (ЭКГ) [296].

В ряде случаев планируется совмещение в одном исследовании изучения однократной дозы и многократных доз лекарственного средства. Таким образом, исследование с первым включением людей – всего лишь первый этап в большом комплексе исследований. До начала какого-либо исследования I фазы, помимо оценки рисков и обоснования такой оценки, необходимо выработать стратегию, гарантирующую минимальный риск на протяжении всего исследования. Выбор начальной дозы является важнейшим аспектом управления рисками в исследовании.


Разработка оригинального лекарственного препарата
Доклинические исследования
Определение метаболитов лекарственного вещества
Исследование фармакокинетики лекарственного препарата на лабораторных животных
Этап 1. Планирование клинического исследования I фазы
Клинический центр
Пересчёт дозировок, полученных в ходе оценки терапевтической эффективности на лабораторных животных, на человека
Определение временных точек отбора проб
Определение количества добровольцев
Определение дизайна КИ (адаптивный, с эскалацией доз, без эскалации доз и т.д.)
Аналитическая лаборатория
Оценка возможности применения биоаналитической методики, использованной при исследовании ФК на лаб. животных;
Определение аналитического диапазона методики на основании данных о ФК параметрах, полученных на этапе доклинических исследований
Этап 2. Подготовка к началу исследования
Написание протокола КИ
Клинический центр
Скрининг добровольцев на основании критериев включения/невключения
Оценка возможности подготовки образцов в специальных условиях (при пониженной температуре, специальных условиях освещения и т.д.), добавление различных стабилизаторов
График проведения исследования
Согласование графика
Аналитическая лаборатория
Разработка/перенос аналитической методики
Полная валидация в случае разработки новой методики / частичная валидация в случае переноса (оценка селективности и матричных эффектов с использованием биологических жидкостей
Отчёт по валидации
Инструкции по отбору проб (антикоагулянты, стабилизаторы и т.д.)
Написание рабочих инструкций для лаборантов и химиков-аналитиков

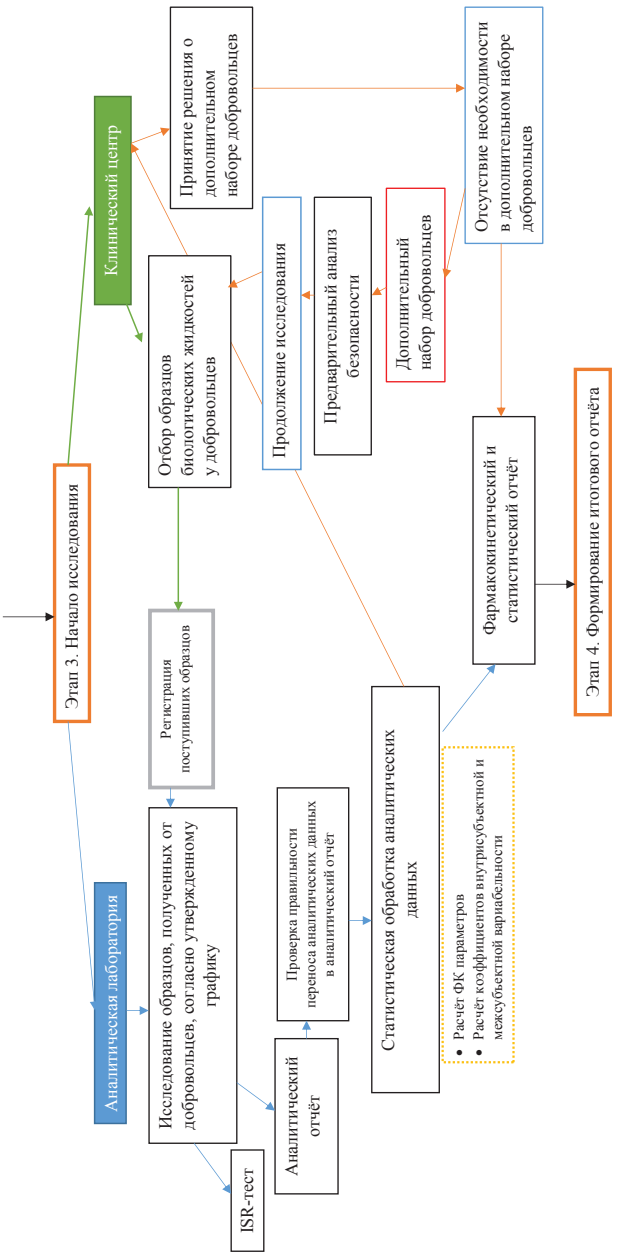


Рис. 2.2. Алгоритм принятия решений при проведении клинических исследований первой фазы

В исследованиях I фазы с повышением доз, как правило, с каждым приращением дозировка удваивается, и эта практика подтверждается логарифмически-линейной кривой «доза – ответная реакция». Однако увеличение дозы должно осуществляться только после тщательного анализа всех имеющихся данных об опыте применения предыдущих доз. Последовательные измерения содержания лекарственного средства в крови во время исследования позволяют повышать дозу исходя из воздействия ЛС [312]. Исследователи (врачи, клинические фармакологи, аналитики) должны рассмотреть все имеющиеся данные, в т. ч. из доклинических исследований, прежде чем принимать решение о повышении дозы. В случае опасений о переносимости и безопасности ЛС или превышения дозы, при которой не наблюдаются нежелательные эффекты, необходимо использовать промежуточную дозу при условии, что это предусмотрено протоколом. Основания для всех решений о повышении дозы должны регистрироваться в документах.

В 2017 году EMA пересмотрела руководство по проведению первой фазы. В обновленном руководстве приведены стратегии смягчения и управления рисками для участников исследований: правила расчета начальной дозы, схемы последующей эскалации, критерии прекращения исследования. Дизайн КИ должен предусматривать конкретный план мониторинга неблагоприятных событий [225]. В частности, фармакодинамические эффекты, полученные в доклинических исследования, включая ex vivo и in vitro на тканях человека, должны быть использованы для определения минимального предполагаемого биологически эффективного уровня (MABEL) у людей и расчета фармакологически активной дозы (PAD) и/или предполагаемой терапевтической широты (ATD) (см. главу 2.1.1).

Стартовая дозировка у здоровых добровольцев должна быть ниже, чем PAD, если не будет получено надежное научное обоснование для более высокой дозы.

Чтобы дополнительно снизить потенциал неблагоприятных реакций у людей, должны учитываться факторы безопасности, как правило, при расчете начальной дозы. Факторы безопасности должны учитывать потенциальные риски, связанные с:

1. Новизной действующего вещества;
2. Его фармакодинамическими характеристиками;
3. Актуальностью моделей животных, используемых для исследований безопасности;
4. Характеристиками результатов безопасности;
5. Неопределенностями, связанными с оценкой MABEL, PAD и ожидаемого воздействия на людей.

Начальная доза должна также учитывать характер исследуемой болезни и ее тяжести среди пациентов, включенных в клиническое исследование. В некоторых случаях начальная доза, которая существенно ниже ожидаемой фармакологической дозы человека, может оказаться неприемлемой.

Также важнейшими аспектами управления рисками в исследованиях первой фазы является количество пациентов, получающих препарат в определенный момент времени, промежуток времени между приемами отдельными субъектами, состав групп, которые зависят от лекарственно-

го средства, способа приема и типа исследования. Так, при самом первом назначении средства повышенного риска препарат назначается только одному субъекту, а если способ введения внутривенный – лекарство вводится медленной инфузией в течение нескольких часов, а не в виде быстрой инъекции, если основания для применения для второго метода нет. И наоборот, если изучаемое средство пониженного риска и применяется внутрь, группы субъектов могут получать препарат одновременно и с короткими промежутками, например, через каждые 5–10 минут. Также надо принимать во внимание возможность оказания экстренной медицинской помощи в случае необходимости.

Считается, что исследования ЛС с первым включением людей сопряжены с более высоким риском, чем более поздние исследования II-IV фаз. Однако риск на этапе перехода от доклинических исследований к исследованию с первым включением людей может быть не выше, чем в других случаях. Например, при переходе от однократной дозы к многократным, при смене молодых на пожилых добровольцев, при переключении с монотерапии на сочетанное применение с зарегистрированными препаратами во время исследований лекарственного взаимодействия. Надо отметить, что анализ результатов исследований I фазы содержит подробный отчет безопасности: при необходимости выполняются промежуточные отчеты по безопасности [96, 298]. Риски оценивает команда исследователей путем изучения протокола, брошюры исследователя, досье испытуемого препарата, соотносят предсказуемые риски и неудобство с ожидаемой пользой для отдельно взятого субъекта и для будущих. Разрешение на проведение исследования выдает уполномоченный федеральный орган на основании государственной научной, этической и правовой экспертизы, всесторонне оценивающий обоснованность и безопасность предстоящего клинического исследования I фазы. Каждый пациент получает разъяснения в информационном листке пациента.

2.1.4. Планирование клинических исследований оригинальных лекарственных препаратов: выбор популяции, расчет выборки

Общепринятым является выделение четырех фаз клинических исследований. Следует отметить, что исследования фармококинетики на основе биоаналитических методик проводятся при выполнении I и II клинических исследований, реже – при выполнении отдельных задач III фазы (например, оценка межлекарственных взаимодействий и т. д.). С развитием персонализированной медицины в реальной клинической практике стали внедряться исследования лекарственного мониторинга при выполнении отдельных исследований IV фазы, хотя это пока редкое явление.

Основной целью первого клинического этапа, *фазы I*, является оценка безопасности, переносимости, определение фармакокинетических и в отдельных случаях фармакодинамических параметров, а также предоставление доказательств эффективности, необходимых для планирования иссле-

дования второй фазы. Для исследований первой фазы нехарактерно выдвижение статистических гипотез, поскольку рассматриваемые исследования должны иметь описательный характер (рис. 2.2). По указанной причине проведение расчета объема выборки с целью обоснования выбранного количества добровольцев не требуется. При оценке безопасности общепринятым является подход с использованием нескольких когорт и эскалацией дозы исследуемого лекарственного средства (как правило, 3–6 добровольцев в когорте) [223, 278].

Основной целью исследований *второй фазы* наряду с оценкой безопасности является доказательство клинической эффективности лекарственного средства, а также выбор терапевтического уровня дозирования при испытании на группе пациентов. По данным Huang J.-H. et al. [236], в большинстве случаев объем выборки не превышает 40 человек в каждой группе (было проанализировано 2103 клинических исследования). Только в 17,2 % клинических исследований второй фазы объем выборки превысил 100 человек в группе. Медиана количества пациентов в группе для исследований в двух группах составила 30 [15–51] человек, для исследований в трех группах – 35 [16–68] (в квадратных скобках приведен межквартильный размах). Как правило, в исследованиях с параллельным дизайном принимает участие существенно большее число пациентов, чем в исследованиях с перекрестным дизайном. С точки зрения статистики, исследования с большим объемом выборки являются более предпочтительными, однако это существенно удорожает исследования и увеличивает его продолжительность. С другой стороны, слишком маленький объем выборки может привести к тому, что поставленная задача не будет достигнута.

Важной целью в исследованиях второй фазы является подтверждение эффективности исследуемого препарата. В случае исследования препаратов с неподтвержденной эффективностью возникает вопрос об этичности использования большого объема выборки. В первую очередь это касается препаратов для лечения онкологических заболеваний, в которых невозможно вводить «группу контроля». Пациенты могут умереть, если не получат должного лечения. В таких исследованиях важно выбрать точный параметр терапевтической эффективности – относительное число «успеха» в рассматриваемой популяции. Если частота успеха в рассматриваемой популяции меньше или равна заранее выбранному значению, терапия считается неэффективной. В целях снижения общего числа пациентов, получающих неэффективную терапию в рамках исследования, в подобных случаях дизайн исследований может быть адаптивным: двух- или более этапным. В простейшем случае в первую фазу исследования включается n_1 пациентов и фиксируется процент наблюдаемого «успеха» r_1. В зависимости от значения r_1 исследование либо останавливается, либо продолжается на новых n_2 пациентах. Таким образом, общее число пациентов в исследовании составит n_1+n_2, а общее число достижения клинического «успеха» – r_1+r_2 [236].

С целью определения необходимого объема выборки для каждого из этапов исследования с адаптивным дизайном было предложено несколько схем. Исторически первый алгоритм набора данных был описан в публикации Gehan E.A. в 1961 году [249]. Позднее были предложены более сложные

схемы (дизайны Fleming's, Simon's, Ensign's и другие [203]). В оригинальной версии Gehan's дизайна в первую фазу производится набор 14 пациентов и, если не наблюдается ни одного клинического ответа, исследование прекращается. В противном случае начинается вторая фаза исследования. Число пациентов во второй фазе исследования зависит от частоты клинического ответа в первой фазе исследования и заранее установленной стандартной ошибки. После завершения второй фазы исследования результаты, полученные по итогам первой и второй фаз, объединяются. Основные недостатки представленной схемы – фиксированный объем выборки для первой фазы и слишком большой объем выборки для второй фазы в случае выбора стандартной ошибки на уровне 5 % или менее. Таким образом, Gehan's дизайн не давал возможности остановки исследования низкоэффективного препарата на ранних этапах, что заставляло задуматься об этической стороне вопроса. Тем не менее долгое время Gehan's дизайн был довольно распространен в связи с его простотой. Более поздние дизайны (например, Simon's) давали возможность минимизировать объем выборки и остановить исследование на первом или втором этапах в случае, если эффективность исследуемого препарата будет низкой.

Адаптивный дизайн позднее также был вовлечен в исследования биоэквивалентности (по-видимому, первая работа в этом направлении – Gould A.L., 1995 [210]), однако в течение нескольких лет научное обоснование используемых методов было недостаточно для полноценного внедрения адаптивного дизайна в область биоэквивалентности. Ситуация изменилась с появлением работ Д. Потвин и др. [288]. Было разработано несколько методов, проведены симуляции данных и представлены простые алгоритмы для принятия решений о подтверждении или не подтверждении биоэквивалентности препаратов. В процессе разработки научной обоснованности методов выяснилось, что в некоторых случаях возможна инфляции ошибки первого рода, то есть увеличение риска потребителя. Позднее были предложены новые методы, при разработке которых учитывался контроль за ошибкой первого рода [200, 271, 328]. В данный момент исследования продолжаются, в частности, до сих пор не разработан метод, обобщающий использование адаптивного подхода на исследования с репликативным дизайном.

На этапе *III фазы* подтверждается эффективность и безопасность препарата у целевой группы пациентов, что становится основной для принятия решения о регистрации лекарственного препарата. Исследования III фазы, как правило, проводятся на большом объеме выборки в нескольких научно-исследовательских центрах (многоцентровые исследования). В исследованиях III фазы после выдвижения статистических гипотез в отношении первичных конечных точек с целью достижения целевого уровня мощности производится оценка объема выборки. В общем случае объем выборки зависит от первичной конечной точки, дизайна исследования, выбора статистических тестов и вероятности ошибок I и II рода Подробное описание методов расчета выборки можно найти в книге Chow S.C., Shao J., Wang H. [161].

Исследования *IV фазы* являются пострегистрационными. Они позволяют получить новые доказательства эффективности препарата, а также выявить нежелательные реакции, возникающие в условиях реального исполь-

зования у большого количества пациентов. Таким образом, наличие новых данных может привести к пересмотру клинической эффективности и безопасности лекарственных препаратов.

По наличию вмешательства в тактику обследования и лечения пациентов клинические исследования подразделяют на интервенционные и неинтервенционные, а также обсервационные (наблюдательные). В обсервационных исследованиях распространенности какого-то явления для оценки необходимого объема выборки используют формулу Кокрана: $n=Z^2p(1-p)/d^2$, где Z=1,96 для 95 %-доверительного интервала, p-ожидаемая распространенность, d-точность (обычно 2.5 %-10 %) [165].

2.2. СОЗДАНИЕ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Оценка биоэквивалентности (или фармакокинетической эквивалентности) лекарственных средств (ЛС) в настоящее время считается одним из основных видов медико-биологического контроля качества дженериков – ЛС, содержащих одно и то же лекарственное вещество в одинаковой дозе и в той же лекарственной форме, что и оригинальное ЛС [173]. В идеале дженерик должен обладать доказательной терапевтической взаимозаменяемостью с оригинальным лекарственным препаратом [26,80]. В настоящее время существуют проблемы выбора между оригинальным препаратом и дженериком. Решить эту проблему однозначно нельзя, исследования биоэквивалентности способствуют решению данной проблемы [58,73,104].

В ряде случаев пациенты и врачи ставят под сомнение безопасность и эффективность генерических препаратов по сравнению с оригинальными [299, 311]. Однако исследования биоэквивалентности с наибольшей очевидностью показывают, что генерические и оригинальные препараты являются эквивалентными [265]. В недавнем докладе Всемирной организации здравоохранения недостаточное использование дженерических препаратов было включено в число 10 основных факторов, относящихся к неэффективности систем здравоохранения. Кроме того, введение все большей доли доступных отпускаемых по рецепту ЛП приводят как к прямой, так и косвенной экономии для государства и высвобождает больше ресурсов для инвестирования в научные исследования и инновации [231]. Результаты изучения системы здравоохранения США показали, что применение дженериков сохранило более 200 миллиардов долларов в год [206]. В связи с экономическим кризисом, затрагивающим многие западные страны, в последние годы применяют экономическую политику для поощрения выписки рецептов универсального лекарства для больных, получающих льготы государства [156].

Проблемы, связанные с дженериками, представляют собой важную проблему в области здравоохранения и имеют неопровержимые клинические, эпидемиологические, социальные и экономические последствия. В январе 2013 года был проведен обзор исследований дженериков в период с 1954 года до конца 2012 года из найденных статей FDA – Orange Book [199]. Впоследствии они были проанализированы количественно по их частоте появления и качественно по способу действия через Международную

анатомо-терапевтическо-химическую классификационную систему [226]. В поиске pubmed в medline создано 4197 записей, из которых в 1356 статьях повторяется слово «дженерики». Известно, что рост числа публикаций по дженерическим препаратам наблюдается с 1984 года, особенно с 2000 года по настоящее время, что может быть объяснено следствием Акта Хэтча-Ваксмана 1984 года, принятом в США [183]. Описание дженериков было связано с 110 различными тематическими категориями, в том числе медицинскими мультидисциплинарными категориями (27 %) и категориями фармации и фармакологии (18 %), здравоохранения (5,9 %) и медицинских учреждений (4,9 %). Дженерикам, действующим на нервную систему, было посвящено 22,2 % публикаций, антибиотикам для системного применения – 19,9 %, сердечнососудистым лекарственным препаратам – 16,4 % статей. Реже публикации были связаны с исследованиями противоопухолевых и иммуномодулирующих лекарств (по 9,0 %), препаратов для лечения заболеваний крови и кроветворных органов (8,1 %). По фармакологическим группам наиболее часто в исследуемых документах встречались статины, препараты антиретровирусной терапии и антитромботические агенты. Симвастатин, циклоспорин, ламивудин и карбамазепин были самыми часто встречаемыми во всем библиографическом поиске, достигнув почти 50 поисковых запросов каждый [321]. Следует отметить, что 58,5 % – это препараты, действующие на сердечно-сосудистую систему, антибиотики для системного применения и препараты, действующие на нервную систему; заболевания этих систем являются ведущими причинами смертности и инвалидности во всем мире за последние десятилетия [206]. В обзоре подчеркнуто, что большие споры ведутся по поводу классических критериев биоэквивалентности для иммунодепрессантов и биологических препаратов, включая антитромботические средства, что связано с их частым появлением в поиске [244, 324]. Генерические препараты рассмотрены FDA в качестве утвержденных препаратов с их терапевтической эквивалентностью брендовым лекарствам.

Главным и единственным различием между дженериком и брендом должна быть более низкая стоимость непатентованных лекарственных средств [73]. В связи с этим в целях снижения национальных медицинских расходов и улучшения доступности лекарственных средств применение генерических препаратов поощряется в большинстве стран мира [36].

В Российской Федерации увеличение доли дженериков, с одной стороны, обеспечило доступность лекарственных препаратов для населения. С другой стороны, специалисты отмечают у некоторых дженериков более низкое качество, недостаточную эффективность, более высокую частоту побочных эффектов или отсутствие эквивалентности по отношению к соответствующим инновационным препаратам [31,119]. Медицинская общественность выдвигает различные решения проблемы дженериков. Предлагается проводить фармакокинетические доклинические исследования, исследовать связь доза – концентрация – эффект. На повестке дня стоит вопрос об ужесточении требований к различиям фармакокинетических параметров бренда и дженерика, что позволило бы уменьшить число препаратов с пограничными фармакокинетическими параметрами. Для доказательства терапевтической эквивалентности некоторые специалисты предлагают более широкое

проведение сравнительных клинических исследований оригинального препарата и дженерика на больных, а также изучение профиля безопасности последнего. В связи с возрастающими требованиями к фармаконадзору целесообразно более широкое проведение фармакоэпидемиологических ретро- и проспективных исследований дженериков. Предлагается при полном обеспечении населения России конкретным лекарством не регистрировать очередной дженерик. Кроме того, ряд авторов считает, что необходимо сократить сроки действия регистрации препарата при его отсутствии на фармацевтическом рынке [105].

В нашей стране актуальность исследований биоэквивалентности генерических лекарственных средств обусловлена как экономическими (генерики значительно дешевле оригинальных лекарственных средств), так и медицинскими (объективное исследование эквивалентности генерических и оригинальных лекарственных средств с позиции доказательной медицины) аспектами [69, 84]. Федеральный закон Российской Федерации № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» также предусматривает необходимость проведения исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств [24, 69, 74].

В Европе перспективы воспроизведения лекарственных средств в настоящее время также многообещающи. Начало нового столетия стало тем рубежом, когда в ряде стран-членов ЕС было принято политическое решение государственного вмешательства в лекарственное обеспечение и регулирование в целях сдерживания ростра затрат в системе бюджетно-страхового финансирования. Комплекс мер, предпринимаемых для сдерживания роста затрат на лекарственное обеспечение в системе бюджетно-страхового финансирования, сводится к двум основным принципам:

1. Регулирование ценообразования в государственном/страховом секторах фармрынка;

2. Стимулирование потребления воспроизведенных ЛС [120].

Правила ценообразования действуют во многих государствах ЕС уже много лет, эти нормы увязаны с государственными/страховыми системами возмещения финансовых средств за отпуск бесплатных и льготных рецептов, нередко включающими соплатежи населения. Однако в последние годы введены новые положения, такие как дисконтные договоры с компаниями-производителями. Это ужесточает конкуренцию между фирмами и, соответственно, способствует снижению конечных цен на лекарства.

Вот лишь некоторые из действий, предпринятых Брюсселем. В 2004 г. Директивой 2004/27/ЕС внесены дополнения в Европейский фармкодекс (Директива 2001/83/ЕС). Введена сокращенная процедура регистрации воспроизведенных препаратов, что должно облегчить их ускоренный доступ на фармрынки государств ЕС [115].

Проведен ситуационный анализ вхождения воспроизведенных препаратов на европейские фармрынки. В отчете, представленном Европейской комиссией Европарламенту, говорится, что имели место случаи недобросовестной конкуренции – создания препятствий для выхода дженериков в обращение со стороны инновационных компаний. Отмечены соответствующие методы: формирование «патентных кластеров» для оригинальных ЛС,

судебные иски по поводу нарушений прав интеллектуальной собственности при регистрации дженериков, наконец, даже прямой подкуп производителей воспроизведенных препаратов с целью оттянуть выход дженерика в обращение. Выявив такие факты, Европейская комиссия предприняла ряд мер по ограничению недобросовестной конкуренции со стороны инновационных фармконцернов и потребовала от национальных правительств устранения барьеров на пути вывода дженериков в обращение [282].

Особый акцент большинство государств делают на синонимической (генерической) замене, при этом национальные нормы в отношении стимулирования генерической замены могут сильно различаться. Например, в Бельгии генерическая замена законодательными нормами предусмотрена, однако на практике применяется нечасто. В Дании аптекам разрешено производить замену препарата только в том случае, если врач не исключил ее. Эстонские врачи могут выписывать лекарства по МНН, правда, они могут выписать по торговому наименованию и указать на запрет замены. В Финляндии введена генерическая замена: работник аптеки должен заменить прописанный препарат на более дешевый, если на это согласны и врач, и пациент. Отметим, что финская система в большей степени, чем другие европейские модели генерической замены, уважает права пациентов.

Наиболее последовательными в отношении мер по сдерживанию роста затрат на лекарственное обеспечение оказались немецкие правительства. Модель замены выписанного лекарственного препарата aut idem («или такой же») начала функционировать в 2004 г. Теперь аптеки должны выдавать пациенту вместо назначенного врачом ЛС его дженерик, причем из наиболее дешевых. Правда, врач имеет право исключить возможность замены, зачеркнув в «окошке» напротив названия препарата слова aut idem. Аптекам вменяется выдавать по льготным рецептам именно те препараты, на которые получены скидки (право врача на запрет замены сохранено) [41].

Не во всех государствах ЕС работает модель генерической замены, в ряде стран такая практика запрещена вовсе, например, в Великобритании, где действует иная система рационального использования ЛС и финансовых ресурсов. Некоторые государства пошли по пути ограничительных перечней лекарственных препаратов для льготного/бесплатного обеспечения. Так называемый «экономичный перечень» является ориентиром для выписки бесплатных препаратов в Австрии. В Люксембурге список взаимозаменяемых лекарственных препаратов составляет Министерство здравоохранения: аптека должны выдать самый экономичный препарат из этого списка.

Европейский фармрынок стал заманчивым для производителей дженериков из других стран. В качестве перспективного его рассматривают ближневосточные компании, производители из Индии и Китая. Всем памятно событие 2010 г. – приобретение израильской компанией Teva одного из трех гигантов генерического сектора Германии Ratiopharm [309]. В результате генерические препараты в Европе производят сегодня 700 производителей ЛС (по данным Европейской ассоциации производителей дженериков – EGA). Воспроизведенные ЛС производятся во всех без исключения государствах ЕС. Это означает открытие новых ниш для воспроизведенных ЛС и общий рост сегмента дженериков [41].

На сегодняшний день примерно 20 % готовых лекарственных форм дженериков и более 40 % субстанций на рынке США произведены в Индии или Китае [55]. По прогнозам, в течение ближайших лет их доля увеличится до 80 %. Качество этих субстанций вызывает еще большую озабоченность, так как FDA проводит крайне мало инспекций в Китае и Индии из-за недостаточности финансовых средств и сложностей с организацией визитов на заводы этих стран. Низкое качество субстанций ассоциируется с наличием токсичных примесей и продуктов деградации. Последние, в свою очередь, могут оказывать негативное влияние как на эффективность, так и на безопасность и переносимость лекарственных средств. Например, в США крупнейшая индийская фармкомпания Ranbaxy отозвала 27 заявок на одобрение дженериков – как следствие подписанного в 2011 г. мирового соглашения с Управлением контроля качества продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) об урегулировании разногласий в отношении производственной практики и подлинности данных. В том числе Ranbaxy исключила из заявок неправдоподобную информацию. Компания отозвала заявки на препараты флуконазол, метформин, офлоксацин и правастатин [14].

В Индии становится все больше аналогов (дженериков) оригинальных противовирусных препаратов, которые, как правило, не уступают в эффективности оригиналу, а их цена в десятки, а то и сотни раз меньше. Индия – страна, где гепатитом С болеет 12 млн человек. Правительство и компании Индии потратили немало усилий на лоббирование низкой цены препаратов дженериков софосбувира (sofosbuvir) и ледипасвира (ledipasvir), чтобы с чистой совестью можно было говорить о прорыве в лечении гепатита С. При помощи комбинации препаратов софосбувира (sofosbuvir) и ледипасвира (ledipasvir) в ходе клинических исследований продемонстрировано полное избавление от вируса гепатита С у 97 % пациентов. Схемы лечения гепатита С, которые стоят свыше $90 000 в США и более 50 000 евро в Европейском Союзе, доступны в Индии по цене около $1000 и даже меньше благодаря конкуренции между производителями генериков. Софосбувир был зарегистрирован в Индии в январе 2015 года, даклатасвир – в ноябре 2015 года и софосбувир + ледипасвир (харвони) в декабре 2015 г. [14, 41].

Однако не всегда генерический продукт, произведенный в Индии, оказывался качественным. Ряд исследований был посвящен сравнению оригинальных и генерических парентеральных форм азитромицина. Авторы исследования выявили, что оригинальный продукт сумамед отвечал всем требованиям по содержанию активного вещества в препарате, содержание азитромицина составило 100,1±1,9 % от указанного на этикетке. Генерический препарат азитрал (Shreya Life Sciences Pvt. Ltd., Индия) не отвечал требованиям Британской фармакопеи по содержанию активного вещества в лекарственном препарате, флаконы данного продукта содержали 94,3±2,9 % азитромицина. Генерический продукт азинорт (Neon Laboratories Ltd, Индия) не соответствовал требованиям Британской, Американской и Европейской фармакопей, содержание азитромицина составило 89,3±4,7 % от должного. Растворение азитрала занимало в 4 раза больше времени, чем

оригинального препарата (18,1 и 4,5 мин соответственно). Исходя из полученных результатов, исследователи сделали вывод о том, что ни один из представленных воспроизведенных препаратов не является фармацевтически эквивалентным оригинальному продукту [42, 87].

Согласно данным исследования, проведенного специалистами британской маркетинговой компании GBI Research, через пять лет крупнейшим рынком дженериков в мире, опередив США, станет Китай. Неотъемлемой чертой китайского рынка, как и индийского, является подавляющее преобладание объемов продаж дженериков над оригинальными средствами, составляющее в совокупности 94,6 % по результатам 2014 года. Опять же встает вопрос о качестве этих дженериков. Государственное управление Китая по контролю за пищевыми продуктами и лекарствами (SFDA) в конце сентября обнародовало результаты начатой в 2015 году проверки качества клинических испытаний 1622 препаратов, поданных за это время на государственную регистрацию. Серьезные нарушения правил исследований были обнаружены в 73 % случаев, а если исключить 165 препаратов, для регистрации которых клинические исследования по закону не требуются, доля неверно проведенных испытаний достигает 81 % от общего количества заявок [27,133].

На территории СНГ, где традиционно производится большой процент дженериковых препаратов, на первый план сегодня выходит проблема взаимозаменяемости как с терапевтической, так и с экономической точки зрения. В декабре 2012 года Главное управление Министерства юстиции по Москве зарегистрировало некоммерческую организацию – Ассоциацию фармацевтических производителей Евразийского экономического сообщества (Ассоциация фармацевтических производителей ЕврАзЭС). Главная задача Ассоциации – содействие достижению членами Ассоциации соблюдения правил надлежащей производственной практики (GMP), лекарственному обеспечению населения и ЛПУ и научным исследованиям в области лекарственного обращения [78].

Суммируя всю приведенную информацию, можно заключить: использование дженериков в клинической практике только тогда будет благом, когда воспроизведенный препарат будет обладать теми же свойствами, что и бренд, что повышает порог ответственности при проведении исследований биоэквивалентности.

2.2.1. Виды эквивалентности

Согласно ФЗ от 22.12.2014 № 429-ФЗ воспроизведенный лекарственный препарат – это лекарственный препарат, который имеет такой же качественный и количественный состав действующих веществ (фармацевтическая эквивалентность), выпускаемый в той же лекарственной форме, что и референтный лекарственный препарат, биоэквивалентность (фармакокинетическая эквивалентность) или терапевтическая эквивалентность которого референтному лекарственному препарату подтверждена соответствующими исследованиями [60, 81, 99].

Соответственно, можно выделить ***три вида эквивалентности генерика референтному лекарственному препарату: фармацевтическая, фармакокинетическая (биоэквивалентность) и терапевтическая.***

Фармацевтическая эквивалентность

«Фармацевтическая эквивалентность», «фармацевтические эквиваленты» (pharmaceutical equivalence) – лекарственные препараты в идентичных лекарственных формах, которые содержат одинаковое количество действующего вещества (активную фармацевтическую субстанцию), удовлетворяющие идентичным требованиям фармакопейной статьи или спецификации по подлинности, чистоте и количественному содержанию. Допустимое расхождение в контролируемых параметрах оригинального и воспроизведенного препарата не должно превышать 5 % [32, 215]. Фармацевтические эквиваленты необязательно должны содержать одинаковые вспомогательные вещества.

Вспомогательные вещества, входящие в состав лекарственного препарата, помимо стабильности, растворимости и других важных фармакологических характеристик, также могут влиять на частоту развития нежелательных лекарственных реакций, изменять профиль лекарственных взаимодействий и, как следствие, оказывать действие на клиническую эффективность и безопасность препарата [101].

Изменение состава вспомогательных веществ может существенно изменить фармакокинетику лекарственного препарата, что в свою очередь может привести к изменению его режима дозирования, профилю безопасности и эффективности.

В связи с этим подбор качественного и количественного состава исследуемых препаратов играет важную роль в последующем использовании воспроизведенного препарата в реальной клинической практике.

Фармакокинетическая эквивалентность, или биоэквивалентность

Биоэквивалентность – это эквивалентность воспроизведенного ЛС оригинальному ЛС по фармакокинетическим параметрам, т. е. биоэквивалентыми признаются два препарата, если они обладают одинаковыми степенью и скоростью всасывания, распределения и вывода ЛС из организма в равных условиях [69].

Согласно EMA, два лекарственных препарата биоэквивалентны, если они фармацевтически эквивалентны или альтернативны и если их биодоступность (скорость и степень всасывания) после введения в одинаковой молярной дозе сходна в такой степени, что их эффективность и безопасность в основном одинаковы [222].

В соответствии с FDA, биоэквивалентные лекарственные препараты – это фармацевтически эквивалентные или фармацевтически альтернативные средства, которые имеют сравнимую биодоступность при исследовании в сходных экспериментальных условиях [199].

Согласно тексту ФЗ-61 «исследование биоэквивалентности лекарственного препарата – вид клинического исследования лекарственного препарата, проведение которого осуществляется для определения скорости и степени всасывания и выведения одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ, количества лекарственного препарата, достигающего системного кровотока, и результаты ко-

торого позволяют сделать вывод о биоэквивалентности воспроизведенного лекарственного препарата в определенных лекарственной форме и дозировке, соответствующих форме и дозировке референтного лекарственного препарата».

Учитываются три основных фармакокинетических параметра:

1. Биодоступность препарата (системная экспозиция – доля общей дозы активного вещества, которая попадает в системный кровоток) – площадь под фармакокинетической кривой – AUC;

2. Максимальная концентрация в плазме крови – C_{max};

3. Время достижения максимальной концентрации от приема препарата – T_{max}.

Считается, что отношение C_{max} и AUC генерического препарата к референтному препарату должно лежать в интервале 80,00–125,00 % при 90-процентном доверительном интервале [69].

Исследования включают определение скорости и степени всасывания оригинального и воспроизведенного препаратов при приеме в одинаковых дозах и лекарственных формах внутрь или другими способами на основании определения концентрации в жидкостях и тканях организма (чаще всего в плазме крови).

Биоэквивалентность в большинстве своем изучается на здоровых добровольцах с помощью рандомизированного перекрестного метода. В некоторых случаях (при исследовании некоторых противоопухолевых и противовирусных препаратов в исследование включаются пациенты с определенным заболеванием). Количество добровольцев рассчитывается на основании коэффициента внутрисубъектной вариабельности (CV_{intra}), значение которого изучают на основании данных, полученных в ранее проведенных исследованиях. Если таковые данные отсутствуют, выборка рассчитывается на основе CV препаратов, сходных по химической структуре (например, из одной группы). Если и такой вариант недоступен, то предполагается использование адаптивного дизайна, в котором на первом этапе рассчитывается CV, а затем, исходя из полученного значения, определяется объем конечной выборки (подробная информация представлена в разделе 4).

Как правило, исследования лекарственных препаратов осуществляются по открытой рандомизированной и перекрестной сбалансированной схеме – каждый испытуемый последовательно получает исследуемый препарат (T) и препарат сравнения или референтный препарат (R) или наоборот [1, 115]. Количество этапов исследования зависит от количества от CV: если он менее 30 %, то исследование проводится в 2 этапа, если более,– то в 4 этапа (в некоторых случаях в 3); это позволяет в случае получения высоковариабельных данных расширить границы доверительных интервалов для оценки биоэквивалентности.

Биоэквивалентность, как правило, изучается при однократном введении лекарственного препарата. При исследовании некоторых препаратов, однократный прием которых не может создать необходимые для детектирования концентрации ЛС (например, эзомепразол), используется многократный прием для достижения равновесной концентрации ЛС в крови с последующей оценкой фармакокинетических параметров.

Терапевтическая эквивалентность

Исследование терапевтической эквивалентности лекарственных препаратов – вид клинического исследования лекарственных препаратов, проведение которого осуществляется для выявления одинаковых свойств лекарственных препаратов определенной лекарственной формы, а также наличия одинаковых показателей безопасности и эффективности лекарственных препаратов, одинаковых клинических эффектов при их применении [74].

По результатам исследований биоэквивалентности/фармацевтической эквивалентности можно сделать предположение, что фармакокинетически эквивалентные оригиналу воспроизведенные препараты будут обладать одинаковой эффективностью и безопасностью при применении их у пациентов. Однако в реальной практике не всегда препараты, являющиеся биоэквивалентными, обладают одинаковыми фармакологическими свойствами [34, 48].

Дизайн исследований терапевтической эквивалентности может быть различным. Для некоторых лекарственных препаратов он является единственным способом регистрации в качестве воспроизведенного ЛС (например, гели, спреи для местного применения; пероральные формы, для которых невозможно оценить биодоступность – ферменты, аминокислоты, нифуроксазид).

Как правило, при регистрации препарата по результатам исследования биоэквивалентности дополнительных исследований терапевтической эквивалентности не проводится. Однако в некоторых случаях эффекты от применения воспроизведенных препаратов отличны от таковых у референтного, что зачастую может приводить к изменению порядка назначения и применения дженерика, вплоть до полной его отмены.

В отличие от биоэквивалентности, определение которой регламентируется жесткими стандартами и не вызывает, как правило, неоднозначности трактовки результатов, отсутствие четких определений терапевтической эквивалентности приводит к неуверенности как врачей, так и пациентов в правильности выбора тех или иных препаратов генерического ряда. В одной из научных публикаций проф. Nightingale (США) приводит данные сравнительного анализа качества оригинального кларитромицина производства компании Abbott и 40 его дженериков из 13 стран Азии и Латинской Америки. Результаты оказались малоутешительными: в 8 препаратах содержание активного вещества не соответствовало стандартам компании-разработчика. У 28 дженериков количество высвобождающегося при растворении активного компонента было значительно ниже, чем у оригинального, хотя все они имели соответствующую спецификацию. У 24 из 40 был превышен рекомендованный компанией Abbott 3-х процентный лимит посторонних примесей [36].

В опубликованном в 1998 году Управлением по контролю качества продуктов и лекарственных средств США (FDA) проекте правил оценки терапевтической эквивалентности дженериков было предложено указывать на этикетке препарата наличие или отсутствие терапевтической эквивалентности, а также препарат, с которым производилось сравнение (как правило, это оригинальный препарат) [324]. При выборе генерического препарата в настоящий момент можно руководствоваться тем, что биоэквивалентность

лекарственных веществ является косвенным подтверждением их терапевтической эффективности. Кроме того, важным нерешенным на сегодняшний день вопросом остается доступность информации о взаимозаменяемости оригинального ЛС и дженерика. FDA не рекомендует в качестве замены отпускать лекарственные препараты, которым оно присвоило код «B». К категории препаратов с кодом «B» относятся лекарственные средства, которые по разным причинам на данный момент нельзя считать терапевтически эквивалентными соответствующим препаратам сравнения.

Полная уверенность в сходной эффективности препаратов одной генерической линии может быть только после проведения сравнительных испытаний на терапевтическую эквивалентность, данные позволят в полной мере воспользоваться экономическими преимуществами широкого применения генериков [98].

2.2.2. Порядок исследований и регистрации воспроизведенных лекарственных препаратов в ЕС

Европейский фармрынок широко открыл свои двери для дженериков около 16 лет назад, когда вступила в силу новая система регистрации (допуска в обращение) воспроизведенных препаратов. При разработке лекарственных препаратов важную роль играют вспомогательные вещества, выбор которых для каждой лекарственной формы должен быть обоснован оценкой физико-химических и технологических характеристик, изучением их влияния на эффективность, безопасность и стабильность лекарственных средств. При этом в ЕС выделяют изученные вспомогательные вещества, которые не нуждаются в дальнейшем изучении и активно используются при производстве различных препаратов, а также новые вспомогательные вещества, безопасность которых в полной мере еще не установлена [192].

Производители дженериков, решившие зарегистрировать свой продукт, как правило, по сокращенной процедуре на основе доказательства биоэквивалентности референтному препарату, могут выбрать одну из трех процедур:

1. Централизованная процедура регистрации (Centralized Procedure – CP) в Европейском агентстве по ЛС (EMA, ранее – EMEA), однако на это нужно получить специальное согласие агентства. Прохождение централизованной процедуры обеспечивает фармацевтическому продукту доступ на всей территории ЕЭС.

2. Децентрализованная процедура регистрации (Decentralized Procedure – DCP) – модель регистрации, позволяющая обеспечить доступ на рынки нескольких государств-членов ЕС. Децентрализованная регистрация связана с процедурой взаимного признания регистрации (Mutual Recognition Procedure – MRP). Собственно, взаимное признание в выбранных производителем странах и вход на их рынки со своим продуктом и является целью данной модели. Регистрация в этих случаях производится в национальных регуляторных органах.

3. Национальная (локальная) процедура в стране производства остается еще одним из вариантов регистрации дженерика [78, 311].

Европейская регуляторная система допуска в фармобращение воспроизведенных продуктов, при всей жесткости требований к доказательной базе, оказалась достаточно дифференцированной для работы в ее рамках компаний разных масштабов и маркетинговых стратегий. Она обеспечивает оптимальную пенетрацию генерических препаратов на фармрынки. Особую роль играют при этом децентрализованная процедура и взаимное признание, к которым производители дженериков прибегают гораздо чаще, чем к более сложной и затратной централизованной процедуре.

Эффективную и прозрачную систему регистрации ЛС в ЕС эксперты назвали «двойным двигателем», и это верно, в первую очередь, в отношении генерических продуктов. В общей сложности – по централизованной и децентрализованной процедуре – на их долю приходится более 70 % рассматриваемых заявок [1]. При этом большинство заявок на регистрацию ЛС по децентрализованной процедуре касаются именно дженериков.

Ежегодно количество заявок на регистрацию дженериков увеличивается и на фармрынок выходит все больше генерических продуктов. Так, по данным EMA, если среди ЛС, зарегистрированных по централизованной процедуре в 2013 г., дженерики ставили около 40 %, то по децентрализованной процедуре они лидируют (83 % заявок). Превалируют дженерики и по процедуре взаимного признания (68 % заявок) [68]. В настоящее время в ЕС основные положения системы обеспечения качества и системы сертификации изложены главным образом в Директиве Европейского парламента и Совета ЕС № 2004/27/ЕС от 31.03.2004 г. о внесении изменений в Директиву № 2001/83/ЕС от 06.11.2001 г. «О своде законов Сообщества в отношении лекарственных препаратов для человека» [81]. В ЕС чаще используется термин «дженерики – по существу аналогичные лекарственные препараты»: «Лекарственный препарат является по существу аналогичным оригинальному препарату, если он удовлетворяет критериям одного и того же количественного и качественного состава в отношении активных субстанций, одной и той же лекарственной формы и является биоэквивалентным. Исключение составляют те препараты, для которых в свете научных знаний очевидно, что они отличаются от оригинального препарата в отношении безопасности и эффективности» [82].

В государствах ЕС обращение по существу аналогичных препаратов и относящиеся к ним критерии регламентируются определенными законодательными положениями, руководствами и Европейской Фармакопеей.

Так, статьей 8(3) (i) Директивы 2001/83/ЕС предусмотрено, что в общем случае заявка на получение торговой лицензии сопровождается результатами следующих испытаний:

1. Физико-химических;
2. Биологических или микробиологических;
3. Токсикологических и фармакологических;
4. Клинических.

Статья 10 (1) этой же директивы в порядке ограничения статьи 8(3) (i) не требует от заявителя предоставления результатов токсикологических и фармакологических испытаний или результатов клинических испытаний, если он может представить одно из доказательств:

Во-первых, «лекарственный препарат является по существу аналогичным лекарственному препарату, уже лицензированному государством ЕС, в котором подается заявка, и владелец торговой лицензии на оригинальный лекарственный препарат согласен с тем, что при изучении заявки на аналогичный лекарственный препарат будут использованы данные фармакологических, токсикологических и/или клинических испытаний, содержащиеся в лицензионной документации на оригинальный лекарственный препарат». Совершенно очевидно, что такое условие осуществимо в том случае, если владелец оригинального препарата предоставил лицензию на производство.

Во-вторых, «медицинское применение вещества или веществ, входящих в состав лекарственного препарата, хорошо изучено, признаны их эффективность и удовлетворительная степень безопасности (посредством предоставления подробных библиографических ссылок на опубликованные научные данные)».

В-третьих, лекарственный препарат является по существу аналогичным лекарственному препарату, который был лицензирован в ЕС в соответствии с действующим законодательством ЕС не менее чем за шесть лет до этого и находится в продаже в том государстве члене, куда подается заявка. Указанный минимальный срок лицензирования может быть увеличен до 10 лет в отношении тех лекарственных препаратов, которые получены методами высоких технологий и были лицензированы в соответствии с процедурой, установленной в статье 2 (5) Директивы Совета 87/22/ЕЕС. Кроме того, государство ЕС может также продлить этот срок на 10 лет односторонним решением, распространяющимся на все лекарственные препараты, которые реализуются на его территории, если оно полагает, что это необходимо в интересах здоровья населения. Государство ЕС вправе не применять указанный выше шестилетний период после истечения срока патентной защиты оригинального лекарственного препарата.

То есть государство ЕС вправе определить законом свою позицию относительно препаратов-дженериков. Что же касается доказательств того, что препарат является по существу аналогичным оригинальному лекарственному препарату, то они должны быть предоставлены заявителем, а убедиться в корректности этих доказательств должны те эксперты и экспертные организации, которые имеют право доступа к регистрационному досье на оригинальный препарат.

Статья 10 (1) (a) Директивы 2001/83/ЕС предусматривает конкретные ограничения для предоставления сокращенного регистрационного досье. Так, если данный лекарственный препарат предназначен для иного терапевтического применения, чем другие находящиеся в продаже лекарственные препараты, или для другого способа введения, или для приема в иной дозе, необходимо предоставить результаты соответствующих токсикологических, фармакологических и/или клинических испытаний. В соответствии со статьей 10 (1) (b) указанной директивы их надо предоставить также в том случае, если новые лекарственные препараты содержат в своем составе известные ингредиенты, которые ранее не применялись в данной комбинации в терапевтических целях.

Для того чтобы разъяснить заявителю положения статей 8 и 10 Директивы 2001/83/ЕС, Комиссия ЕС и Европейское агентство по оценке лекарственных препаратов опубликовали специализированные руководства. В частности, руководства по оценке биоэквивалентности в различных лекарственных формах с различными характеристиками выпуска:

1. Руководство по исследованию биоэквивалентности CPMP/EWP / QWP/1401/98.

2. Руководство по клинической разработки фиксированных комбинаций лекарственных средств EMA/CHMP/158268/2017.

3. Руководство по фармакокинетике и клинической оценке модифицированного высвобождения лекарственных средств (EMA/CPMP /EWP /280/96 Corr1).

Эти руководства помимо основного назначения могут быть использованы заявителями и экспертами в качестве ориентиров, чтобы определить, насколько существенными являются изменения в разработанных препаратах-дженериках по отношению к оригинальному препарату, как их классифицировать, какие требования предъявить к объему исследований по разработке препарата-дженерика и до какой степени допустимо сокращение регистрационного досье. Прежде чем коротко рассмотреть эти руководства, следует отметить, что в ЕС изменения относительно первоначальной заявки делятся на изменения: типа I (IA и IB) – несущественные изменения, которые требуют предоставления уведомления и могут быть одобрены при соблюдении определенных условий и наличия предусмотренных документов. Если при разработке препарата-дженерика эти условия соблюдены, то его, видимо, можно считать по существу аналогичным лицензированному ранее лекарственному препарату. В ЕС предусмотрено 47 видов изменений, которые отнесены к типу I (IA и IB) [324]. Они могут также служить ориентиром при определении объема дополнительных исследований для дженерика, обусловленных изменением типа I по отношение к оригинальному препарату.

Любое изменение по отношению к лицензированному препарату, которое не относится к изменениям типа I, рассматривается как изменение типа II и требует процедуры полной научной оценки (как при выдаче новой торговой лицензии).

Рассмотрим, какие изменения однозначно относят к изменениям типа II.

Приложение II к Постановлению Комиссии ЕС № 1085/2003 от 3 июня 2003 г. указывает 3 основные категории изменений [81]:

1. Изменения активной субстанции:

1. Замена активной субстанции солью/эфиром или комплексом/производным (с той же самой терапевтической сущностью) при условии, что характеристики эффективность/безопасность существенно не отличаются;

2. Замена другим изомером, другой смесью изомеров или замена смеси изолированным изомером (например, рацемата одним из энантиомеров) при условии, что характеристики эффективность/безопасность существенно не отличаются;

3. Замена биологической или биотехнологической субстанции препаратом с незначительными отличиями в молекулярной структуре. Изменение вектора, используемого для продуцирования антигена и исходного сырья,

включая новый главный банк клеток из другого источника, при условии, что характеристики эффективность/безопасность существенно не отличаются;

4. Новый лиганд или механизм связывания для радиофармацевтического препарата;

5. Изменение растворителя-экстрагента или содержания лекарственного растительного сырья в лекарственных растительных препаратах при условии, что характеристики эффективность/безопасность существенно не отличаются.

2. Изменения силы действия, лекарственной формы и пути введения:

1. Изменение биодоступности;

2. Изменение фармакокинетики;

3. Изменение силы действия/активности или добавление новой дозировки;

4. Изменение или добавление новой лекарственной формы;

5. Изменение или добавление нового пути введения (при парентеральном пути введения необходимо разграничение между внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, подкожным и другими путями введения).

3. Другие изменения, специфичные для ветеринарных лекарственных препаратов, предназначенных для введения животным, используемых в пищу:

1. Изменение или добавление видов животных.

Модуль 3 CTD гораздо шире и имеет другую структуру, а его разделы составляются в соответствии со стандартами – руководствами по качеству и биотехнологии [32, 80]. Эти руководства представляют собой методическую основу разработки и исследования субстанций и ЛС. В странах СНГ такая методическая основа отсутствует.

Чтобы разработать регистрационное досье в формате CTD, необходимо пользоваться руководствами по качеству и биотехнологии, руководствами по фармакологии и токсикологии, включая руководящие указания по GLP, руководствами по окружающей среде, а также общими и специальными руководствами по клиническим испытаниям, в том числе руководством по GCP.

Чтобы правильно организовать и провести фармацевтические и биологические исследования, а затем составить модуль 3 «Качество», в ЕС приняты 45 руководств по качеству и 22 – по биотехнологии, в которых даются рекомендации в отношении отдельных аспектов исследований. Каждому разделу, пункту и подпункту в CTD соответствуют определенные руководства. В текущем году МЗ Украины запланировано разработать и ввести в действие 6 таких гармонизированных руководств, которые устанавливают методическую основу:

1. Фармацевтической разработки,

2. Производства готовых ЛС,

3. Валидации процессов,

4. Изучения стабильности и условий хранения,

5. Включения вспомогательных веществ в состав ЛС,

6. Спецификаций: критериев приемлемости и контрольных испытаний.

Если сравнить структуру регистрационной документации в странах ЕС и СНГ относительно качества действующих веществ и лекарственных препаратов, то, очевидно, что у нас много «белых пятен». Например, в досье

отсутствует подробная информация о действующих и вспомогательных веществах, отчет о фармацевтической разработке, сведения о валидации процессов и многое другое. В странах ЕС, в отличие от стран СНГ, в регистрационном досье документы по контролю качества неотделимы от технологической документации.

При существующих требованиях к регистрационному досье и практикуемом уровне разработки регистрационной документации в странах СНГ, как и в некоторых третьих странах, прогнозировать качество, эффективность и безопасность препаратов-генериков крайне затруднительно. Не помогут в этом ни углубленные фармакологические и токсикологические исследования, ни расширенные клинические испытания; в лучшем случае они смогут лишь фиксировать удовлетворительные или неудовлетворительные результаты испытаний. Положение усугубляется отсутствием адекватных требований к отчетам экспертов и самим экспертам, отсутствием соответствующего набора руководств по качеству, биотехнологии, фармакологии, токсикологии и клиническим испытаниям, а также Фармакопеи СНГ, гармонизированной с Европейской Фармакопеей.

Проблему препаратов-генериков можно решить только в рамках гармонизации всей системы сертификации ЛС с нормами ЕС. Система сертификации ЛС в ЕС включает:

1. Лицензирование (т. е. регистрацию) ЛС;
2. Лицензирование производства и импорта;
3. Лицензирование дистрибьюции;
4. Независимый контроль качества;
5. Фармакологический надзор;
6. Сертификацию субстанций Европейской Фармакопеей.

Поскольку система сертификации является комплексной, то и проблему генериков можно решить только комплексно. Подтверждением этому служит Руководство по исследованию биодоступности и биоэквивалентности, которым следует пользоваться вместе с Директивой 2001/83/ЕС и еще как минимум с 19 нормативными документами [54]. Для того чтобы избежать двусмысленности и ошибок при представлении сравнительных данных исследования эффективности и безопасности, были даны подробные определения лекарственной формы, активности, формы выпуска, пути введения и т. д., приведены принципы и конкретные примеры, как следует кодифицировать изменения в том или ином случае. Например, другой объем или другая масса наполнения при той же активности обуславливает отнесение изменения к типу II для парентеральных препаратов и к типу I – для непарентеральных препаратов [81].

Если изменения могут влиять на биодоступность и биоэквивалентность (например, при замене вспомогательного вещества другим вспомогательным веществом), необходимыми условиями являются аналогичные функциональные характеристики вспомогательного вещества; для твердых лекарственных форм профиль растворения как минимум для двух опытно-промышленных серий должен быть сравнимым с прежним профилем растворения. При этом, кроме научного обоснования замены и выбора вспомогательных веществ, сравнительных данных о профиле растворения для

твердых лекарственных форм, а также данных о стабильности, необходимо представить обоснование отсутствия в заявке новых данных по биоэквивалентности в соответствии с руководством по исследованию биодоступности и биоэквивалентности [36]. Если такое обоснование не может быть сделано, эти исследования необходимо провести.

2.2.3. Стратегия проведения исследований воспроизведенных лекарственных препаратов

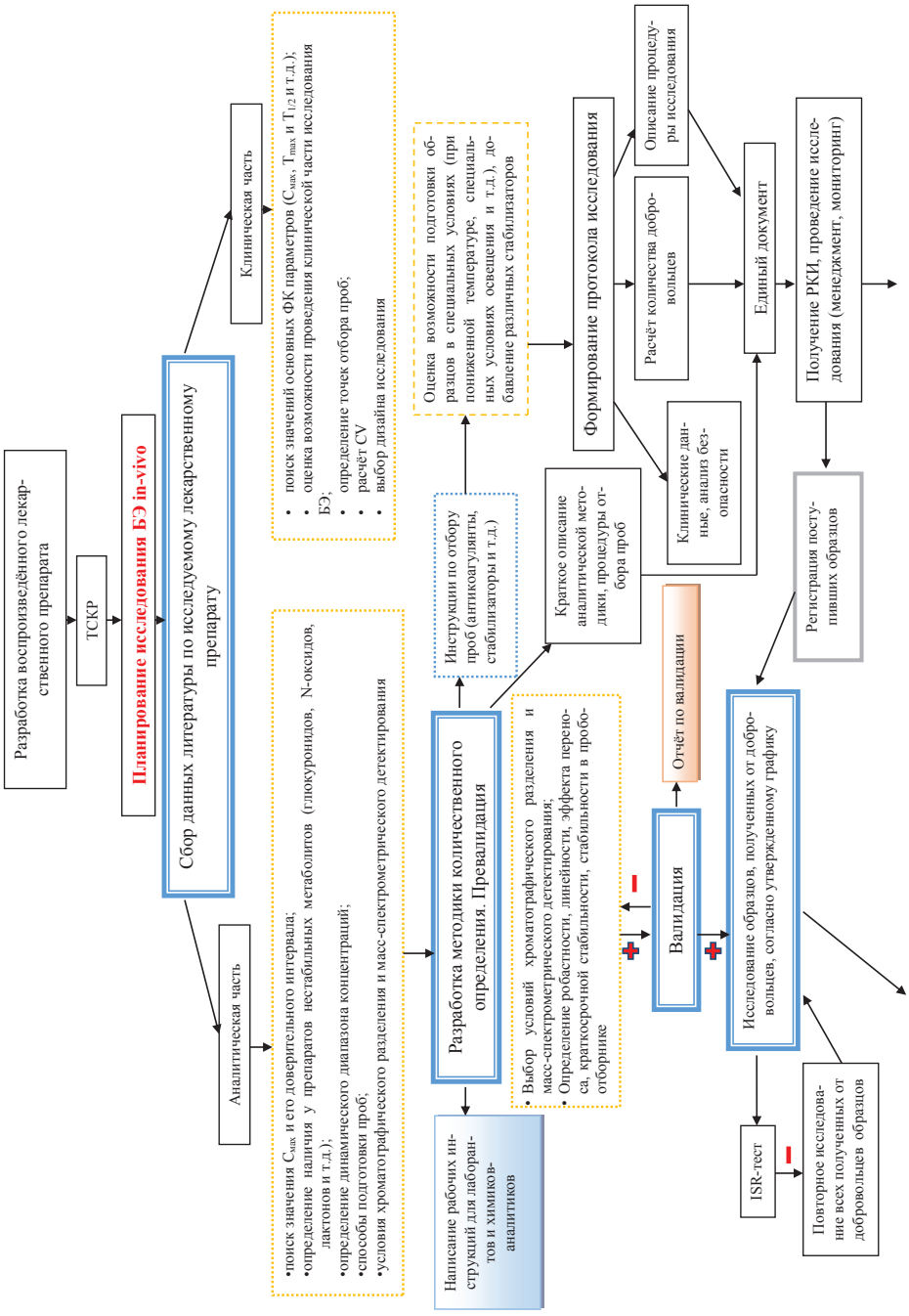
Таким образом, в настоящее время в связи с ограниченностью государственных средств на здравоохранение во всем мире увеличивается внимание к использованию дженериков. Вместе с тем, как показывает анализ отечественного и зарубежного опыта исследований в области создания воспроизведенных препаратов, для создания качественных дженериков требуется научно-обоснованный подход с вовлечением различных специалистов, обладающим необходимыми знаниями и компетенциями, в том числе планирование биоаналитических исследований. Недооценка некоторых незаметных, на первый взгляд, проблем может обернуться серьезными систематическими ошибками и приведет к неэквивалентным результатам. Основные принципы комплексного подхода к проблеме изучения дженериков отражены на рис. 2.3.

2.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

В ряде случаев при создании новых лекарственных средств используется специфический метод фармацевтической альтернативы. Данный метод заключается в оптимизации показателей исходной молекулы за счет изменения ее солеобразующих компонентов или лекарственной формы [71].

Согласно правилам ЕврАзЭС**,** «фармацевтически альтернативные лекарственные препараты (pharmaceutical alternatives)» – лекарственные препараты, содержащие одинаковую активную часть молекулы действующего вещества или его предшественник (прекурсор), (необязательно в одинаковом количестве или лекарственной форме) или одинаковую соль или эфир. Каждый такой лекарственный препарат в индивидуальном порядке удовлетворяет идентичным либо своим собственным соответствующим фармакопейным или другим применимым стандартам по подлинности, дозировке, качеству и чистоте (включая активность и в применимых случаях однородность содержимого, время распадения и (или) скорость растворения).

ВОЗ указывает, что лекарственные препараты являются фармацевтически альтернативными, если они содержат одинаковое количество одного и того же активного начала, но различаются по лекарственной форме (например, таблетки и капсулы) и/или по химической форме (различные соли, эфиры). Фармацевтически альтернативные препараты предназначены для одного пути введения [26, 229, 273]. В определении фармацевтически альтернативных препаратов такого же подхода придерживается FDA [199].


Разработка воспроизведённого лекарственного препарата
ТСКР
Планирование исследования БЭ in-vivo
Сбор данных литературы по исследуемому лекарственному препарату
Аналитическая часть
Клиническая часть
• поиск значений основных ФК параметров (C_{max}, T_{max} и $T_{1/2}$ и т.д.);
• оценка возможности проведения клинической части исследования БЭ;
• определение точек отбора проб;
• расчёт CV
• выбор дизайна исследования
•поиск значения C_{min} и его доверительного интервала;
•определение наличия у препаратов нестабильных метаболитов (глюкуронидов, N-оксидов, лактонов и т.д.);
•определение динамического диапазона концентраций;
•способы подготовки проб;
•условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования
Разработка методики количественного определения. Превалидация
Написание рабочих инструкций для лаборантов и химиков-аналитиков
• Выбор условий хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования;
• Определение робастности, линейности, эффекта переноса, краткосрочной стабильности, стабильности в пробоотборнике
Инструкции по отбору проб (антикоагулянты, стабилизаторы и т.д.)
Оценка возможности подготовки образцов в специальных условиях (при пониженной температуре, специальных условиях освещения и т.д.), добавление различных стабилизаторов
Краткое описание аналитической методики, процедуры отбора проб
Валидация
Отчёт по валидации
Формирование протокола исследования
Расчёт количества добровольцев
Описание процедуры исследования
Клинические данные, анализ безопасности
Единый документ
Получение РКИ, проведение исследования (менеджмент, мониторинг)
Регистрация поступивших образцов
Исследование образцов, полученных от добровольцев, согласно утвержденному графику
ISR-тест
Повторное исследование всех полученных от добровольцев образцов

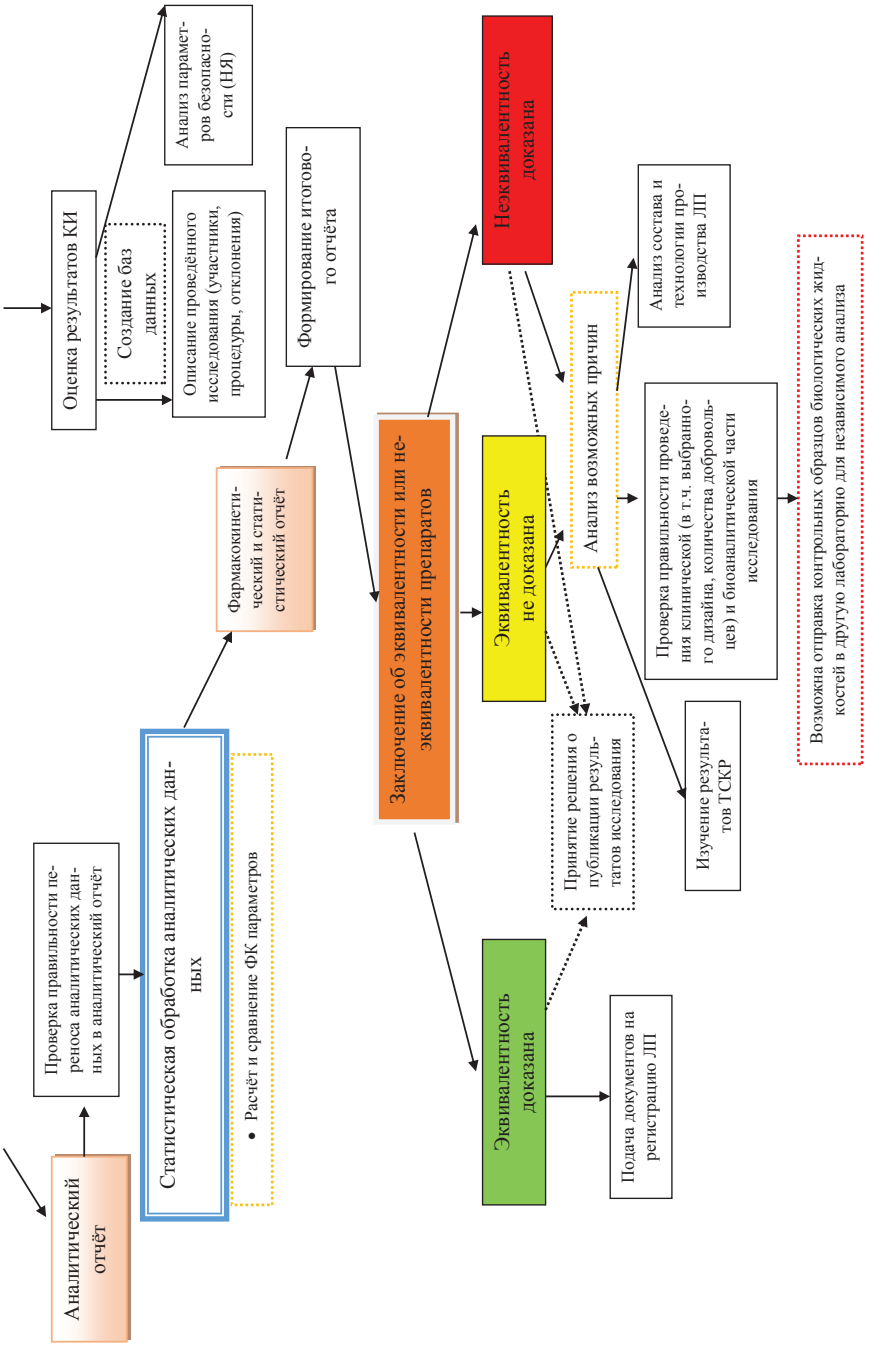


Рис. 2.3. Алгоритм принятия решений при проведении исследований биоэквивалентности

Специалисты FDA такие препараты не считают терапевтически эквивалентными, и с этим необходимо согласиться, потому что в общем случае химические модификации действующих веществ преследуют цели изменения растворимости, стабильности, кристалличности, размеров частиц, биодоступности и др., что, в конечном счете, влияет на безопасность и эффективность препарата.

Радикальная смена лекарственной формы может вообще дать отрицательный эффект. Например, ЛС для парентерального и перорального введения не эквивалентны и не взаимозаменяемы. Более того, пациент может быть без сознания, и ему требуются инъекции. Может требоваться препарат для ректального введения ввиду того, что пациент не может глотать. Препараты для местного и системного применения, даже если они применяются для лечения одной патологии, имеют совершенно разную эффективность (системные эффективнее).

Известно, что ЛС, имеющие разные пути введения, могут применяться по разным показаниям. Классический пример – фенотерол. Препарат Беротек, раствор или аэрозоль для ингаляций – бронходилататор (например, для купирования приступов бронхиальной астмы), а Партусистен, таблетки или концентрат для инфузий – токолитик (предотвращение преждевременных родов).

Фармацевтически альтернативными препаратами являются порошки для инъекций, подлежащие растворению, концентрированные растворы для инъекций, подлежащие разведению, и готовые растворы для инъекций, не требующие подобных предварительных манипуляций. Такие препараты, согласно FDA, также не являются терапевтически эквивалентными [30].

Европейское медицинское агентство (EMA) и FDA одинаково утверждают, что воспроизведенный лекарственный препарат должен быть биоэквивалентен референтому. В этом контексте исследуемый препарат должен содержать качественно и количественно одно и то же активное вещество в той же фармацевтической форме, что и эталонный продукт. Однако, несмотря на точку зрения ВОЗ и FDA, Европейское медицинское агентство (EMA), Согласно Директиве 2001/83/EC [177] Ст. 10.2, придерживается понятия, что «тот же самый» для лекарственных веществ включают «различные соли, сложные эфиры, простые эфиры, изомеры, смеси изомеров, комплексов или производных» лекарственного вещества. В то же время, согласно 21 CFR Part 320 A [166], данное определение в США только включает различные соли или сложные эфиры одного и того же активного вещества [188]. Таким образом, рекомендации EMA позволяют регистрировать фармацевтически альтернативные вещества как биоэквивалентные.

2.4. ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ БИОАНАЛОГОВ

Согласно определению ВОЗ, биоаналогом является биотерапевтический продукт, который по показателям качества, безопасности и эффективности аналогичен эталонному биотерапевтический продукту [80].

Действующим началом биологических медицинских препаратов являются активные субстанции, получаемые с использованием биологических (живых) систем (продукты на основе компонентов крови, вакцины, ал-

лергены, рекомбинантные человеческие белки, моноклональные антитела, продукты клеточной и генной терапии). Исследования биологических препаратов имеют ряд существенных отличий от исследований препаратов низкомолекулярных веществ. Установление характеристик биологических препаратов является более сложной задачей, чем в случае продуктов, получаемых путем химического синтеза. В частности, такие параметры, как трехмерная структура, количество функциональных групп, проявляющих кислотно-основные свойства, посттрансляционные модификации, такие как профиль гликозилирования, могут существенно меняться в зависимости от условий производства.

К основным регуляторным документам, описывающим порядок проведения исследований биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, относятся методические указания ВОЗ [227], EMA [224], Руководство по экспертизе лекарственных средств ФГБУ НЦЭСМП, том IV, 2014. Регуляторный базис биоаналитической части исследований биоаналогов представлен в руководстве Guideline on bioanalytical method validation EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 [221] и Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением №85 от 03.11.2016).

2.5. ПЛАНИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ. ПИЛОТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Успех исследования фармакокинетической эквивалентности во многом определяется грамотным планированием. Фармакокинетические параметры, а значит, и общий вывод исследования напрямую зависят от выбора популяции (раса, пол, возраст, особенности метаболизма, наличие сопутствующих заболеваний) и условий проведения исследования (натощак, после приема пищи, в специальных условиях, например, в темноте). По этой причине первоочередная задача исследователя – работа по анализу данных литературы. Для многих воспроизводимых препаратов уже сформулированы рекомендации (в том числе рекомендации FDA и EMA) по проведению исследований биоэквивалентности [215]. При отсутствии специальных показаний и ограничений исследования проводят на здоровых добровольцах. Необходимо определить исследуемую дозировку лекарственного препарата, выбрать в зависимости от препарата, будет ли это исследование натощак или после приема пищи, подобрать соответствующий референтный препарат.

Поскольку общий вывод о взаимозаменяемости оригинального препарата и воспроизведенного формулируется на основе границ доверительных интервалов для фармакокинетических параметров, в конечном счете именно статистический анализ играет ключевую роль в заключении об успехе или провале всего исследования. В этой связи представляется важным осветить некоторые статистические аспекты, знание которых необходимо при планировании исследования биоэквивалентности.

Выбор исследуемой дозировки

Одним из важных аспектов планирования исследований воспроизведенных лекарственных препаратов является выбор дозировки, которая будет направлена на исследование in vivo. При выборе дозировки должны учитываться следующие факторы:

– безопасность для испытуемых;
– уровни концентраций, создаваемых при приеме данной дозировки;
– линейность фармакокинетики действующего вещества;
– вариабельность фармакокинетики в зависимости от дозировки.

Как правило, для исследования выбирают высшую дозировку, если это не противоречит требованиям безопасности и не приводит к значимому увеличению вариабельности фармакокинетики по сравнению с более низкими дозировками. Для ряда препаратов информация по выбору исследуемых дозировок содержится в частных рекомендациях FDA и EMA. Общие подходы к выбору исследуемых дозировок также содержатся в ряде регуляторных документов, в частности, в Правилах проведения исследований биоэквивалентности в рамках ЕврАзЭС.

Если регистрации подлежат несколько дозировок, то в зависимости от пропорциональности состава между различными дозировками и другими свойствами лекарственного препарата, исследование биоэквивалентности достаточно провести в отношении одной или двух дозировок. Выбор дозировки (дозировок) зависит от линейности фармакокинетики действующего вещества. Если фармакокинетика нелинейна (увеличение AUC непропорционально принимаемой дозе), пригодность различных дозировок для определения потенциальных различий между сравниваемыми лекарственными препаратами может отличаться. Линейность фармакокинетики признается в том случае, если разница между скорректированными по дозе средними AUC для исследуемой дозировки (дозировки, использованной в исследовании биоэквивалентности) и дозировки (дозировок), в отношении которой(ых) проведение исследования биоэквивалентности не планируется, не превышает 25 %. Для оценки линейности заявитель должен изучить и критически оценить всю доступную научную литературу на предмет пропорциональности дозы. Линейность констатируется, если различия между скорректированными по дозе AUC находятся в пределах ±25 %. Если биоэквивалентность для дозировок, обладающей наибольшей чувствительностью в отношении установления различий между сравниваемыми лекарственными препаратами, подтверждена, то в проведении исследований биоэквивалентности in vivo с другими дозировками нет необходимости.

Основные фармакокинетические параметры

Основными фармакокинетическими параметрами являются: максимальная концентрация C_{max}, время достижения максимальной концентрации T_{max}, а также площадь под фармакокинетической кривой в координатах «концентрация-время» AUC.

Максимальное измеренное значение концентрации лекарственного препарата в плазме крови $C_{max.}$ Для получения информативных значений фармакокинетических параметров C_{max} и T_{max} при планировании исследования следует обратить особое внимание на частоту отбора проб во время абсорбции лекарственного вещества и достижения пиковой концентрации. Слишком редкий отбор проб может оказать критическое влияние на результаты оценки биоэквивалентности [69, 80, 111]. Для планирования адекватного дизайна исследования необходимо обладать информацией о времени достижения максимальной концентрации анализируемого вещества: в фазе абсорбции должно быть не менее 3-х точек отбора проб, в области достижения максимума стоит предусмотреть как можно более частый отбор проб, важно, чтобы C_{max} не было первой точкой. Для исследования веществ, присутствующих в организме человека до приема лекарственного препарата, следует запланировать отбор нескольких проб для определения эндогенного уровня. Отдельно следует подчеркнуть необходимость адекватного выбора отмывочного периода (не менее 5–6 периодов полувыведения, в ряде случаев и больше). В случае выбора чрезмерно короткого отмывочного периода возникает опасность обнаружения исследуемого вещества в нулевой пробе во втором (или дальнейших) периоде исследования. И если концентрация вещества в нулевой пробе у некоторого добровольца превысит 5 % от максимальной концентрации для данного добровольца в рассматриваемом периоде, этот субъект должен быть исключен из анализа (за исключением исследований эндогенных веществ) [69, 80]. Может сложиться ситуация, когда при исключении данных значительного числа добровольцев по обозначенной причине в исследовании останется менее 12 субъектов, – в этом случае выводы исследования будут некорректными. По данной причине особое внимание необходимо уделять отмывочному периоду в исследовании препаратов, для которых характерна энтерогепатическая циркуляция, обеспечивающая циклическое поступление вещества в кровоток (например, для урсодезоксихолевой и микофеноловой кислот, капецитабина и многих других [131]). Это будет проявляться в виде нескольких пиков на фармакокинетической кривой: после первого спада концентрации в фазе элиминации возникает подъем. При неадекватном планировании отмывочного периода в нулевой точке отбора проб при этом может детектироваться значительная концентрация. Кроме того, для таких веществ определение некоторых фармакокинетических параметров, как например, λ_z, $AUC_{0-\infty}$ и $T_{1/2}$, может представлять существенную проблему.

Время достижения максимальной концентрации лекарственного препарата в плазме крови добровольца $T_{max.}$ Время достижения максимальной концентрации определяется однозначно по первому моменту отбора проб, соответствующего максимальному значению концентрации C_{max}. Сравнение оригинального и тестируемого препаратов по данному показателю, как правило, не является обязательным, однако если быстрое высвобождение действующего вещества является клинически важным либо связано с нежелательными явлениями, между T_{max} тестируемого и референтного препаратов не должно быть значимых отличий. Поскольку время достижения максимальной концентрации может принимать только дискретные зна-

чения, для сравнения по данному фармакокинетическому параметру нужно использовать непараметрические критерии.

Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» AUC_{0-t}. В отличие от параметров T_{max} и C_{max} в определении параметра AUC присутствует неоднозначность. Во-первых, это связано со способами расчета площади под фармакокинетической кривой: можно использовать метод простых трапеций, логарифмических трапеций или их комбинацию [111]. Поскольку терминальная часть кривой хорошо описывается экспоненциальной зависимостью, метод аппроксимации фазы элиминации экспоненциальной функцией вида $k \cdot e^{-\beta t}$, где k и β – некоторые константы, а t – время, представляется более точным. При этом площадь под кривой рассчитывается через логарифмы концентрации (метод логарифмических трапеций). Комбинация двух методов (т. н. метод «linear-up/log-down», имплементированный во многие программы) использует до достижения максимальной концентрации метод простых трапеций, после – логарифмических. В настоящее время существует достаточно широкий спектр статистических программ, позволяющих провести анализ фармакокинетических параметров и последующую оценку эквивалентности. Среди наиболее известных можно указать Phoenix WinNonLin®, SAS®, Statsoft Statistica®, IBM SPSS®, Kinetica®, а также различные модули пакета статистических программ R). К сожалению, необходимо констатировать отсутствие аналогичных валидированных отечественных программ.

Определение и способ расчета фармакокинетических параметров должны быть четко описаны в протоколе исследования. Неоднозначность в формулировках может привести к некорректным значениям, вплоть до провала исследования. Например, необходимо подчеркнуть различие между возможными определениями параметра AUC_{0-t}: «площадь под кривой «концентрация-время» от нуля до момента времени отбора последней пробы» или «площадь под кривой «концентрация-время» от нуля до момента времени отбора последней пробы, при котором концентрация равна или выше нижнего предела количественного определения». Казалось бы, несущественное дополнение, однако от него зависит результат вычисления данного параметра. Для определенности обозначим AUC_{all} первый из двух вариантов AUC_{0-t} и AUC_{last} – второй. Если в последней временной точке отбора проб концентрация действующего вещества выше нижнего предела количественного определения, параметры AUC_{all} и AUC_{last} в точности совпадают, в противном случае значение AUC_{all} выше значения AUC_{last} на величину, равную площади треугольника в терминальной части кривой (при условии, что концентрации меньше нижнего предела количественного определения считаются нулевыми). Было отмечено, что разница в определении AUC_{0-t} играет существенную роль в выводах всего исследования [111]. В частности, для AUC_{all} условие $AUC_{0-t} \geq 80\ \% AUC_{0-\infty}$ может быть выполнено, тогда как для AUC_{last} – нет (в определение $AUC_{0-\infty}$ входит именно AUC_{last}). Указанное условие описывает критерий достаточности длительности наблюдения. Для соблюдения данного условия продолжительность отбора проб должна составлять не менее 4-х периодов полувыведения (особое внимание нужно уделять выбору продолжительности отбора проб при планировании иссле-

дований лекарств с модифицированным высвобождением действующего вещества). При условии, что $AUC_{0-t} < 80\ \% AUC_{0-\infty}$, в качестве основного фармакокинетического параметра должен использоваться параметр AUC_{0-t}.

В случае если отбор проб ограничивается значением 72 ч, что, как правило, достаточно для препаратов с немедленным высвобождением действующего вещества, независимо от длительности периода полувыведения вместо AUC_{0-t} используется параметр AUC_{0-72} – площадь под фармакокинетической кривой от нуля до 72 ч. Значения этого параметра численно равно AUC_{all}, если последняя точка отбора проб – 72 ч. Однако при наличии отклонений во времени отбора проб или при отсутствии одной или нескольких последних проб значения AUC_{all} и AUC_{0-72} будут различаться, поскольку в последнем случае кривая аппроксимируется до точки 72 ч.

Статистическая гипотеза в исследованиях биоэквивалентности заключается в следующем. В отличие от других исследований эквивалентности, нулевая гипотеза H_0 в исследованиях биоэквивалентности предполагает наличие, а не отсутствие различий между препаратами, то есть бионеэквивалентность. Гипотеза формулируется в отношении сравниваемых параметров: H_0: $\mu_T/\mu_R < Q_1$ или $\mu_T/\mu_R > Q_2$, где Q_1 и Q_2 – нижняя и верхняя принятые допустимые границы биоэквивалентности, а μ_T и μ_R – генеральные средние показателя для тестируемого препарата и препарата сравнения соответственно. Альтернативная гипотеза предполагает наличие биоэквивалентности: H_A: $Q_1 \leq \mu_T/\mu_R \leq Q_2$.

Распределение основных фармакокинетических параметров, максимальной концентрации, C_{max} и площади под фармакокинетической кривой AUC_{0-t}, как правило, не является нормальными. Планирование исследований и статистической оценки конечных фармакокинетических параметров принято проводить в предположении о логнормальном распределении этих параметров, что позволяет использовать параметрические подходы к анализу логарифмически преобразованных данных. При этом отношение генеральных средних μ_T/μ_R заменяется на разность соответствующих логарифмов: $\ln \mu_T - \ln \mu_R$, тогда среднее арифметическое разностей логарифмов будет соответствовать среднему геометрическому отношений параметров в исходных единицах. Для логарифмически преобразованных данных границы доверительного интервала симметричны относительно нуля. Интересно отметить, что логарифмирование концентраций выглядит вполне естественным в силу близкого к экспоненциальному закону спада значений концентраций на терминальной части фармакокинетических кривых большинства веществ. Логарифмирование в данном случае позволяет линеаризовать финальный участок кривой.

Важно подчеркнуть: подтверждение биоэквивалентности означает, что границы доверительного интервала находятся полностью внутри допустимого диапазона. Напротив, подтверждение небиоэквивалентности (истинная небиоэквивалентность) – это ситуация, когда границы доверительного интервала лежат полностью за границами допустимого диапазона. Все другие ситуации, когда одна из границ доверительного диапазона выходит за допустимые рамки, не означают, что небиоэквивалентность доказана

(рис. 2.4). В таких случаях мы можем лишь сделать вывод, что биоэквивалентность в рамках данного исследования подтвердить не удалось. При этом не исключается вероятность, что при повторном исследовании данных препаратов, спланированном с учетом возможных ошибок предыдущего, биоэквивалентность все-таки подтвердится.

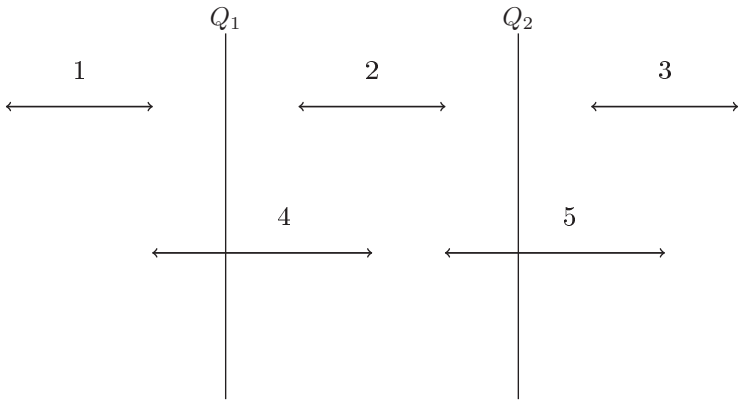


Рис. 2.4. Зависимость формулировки вывода в исследовании от соотнесения границ доверительного интервала с допустимым диапазоном: 2 – биоэквивалентность подтверждена, 1, 3 – подтверждена бионеэквивалентность, 4, 5 – подтвердить биоэквивалентность не удалось

В соответствии со стандартной терминологией в статистике выделяют ошибку первого рода и ошибку второго рода: под ошибкой первого рода понимают ошибочное заключение о биоэквивалентности препаратов, под ошибкой второго рода – ошибочное заключение об отсутствии биоэквивалентности (табл. 2.2). Ошибка первого рода (α) связана с риском потребителя – в случае выхода на рынок некачественного препарата пострадают принимающие это лекарство люди. По этой причине ошибка первого рода должна быть жестко закреплена на уровне не более 5 %. Ошибка второго рода (β) связана с риском производителя. Величина (1–β) называется мощностью исследования и обычно устанавливается на уровне 80 %. Расчет мощности исследования после его проведения, так называемой апостериорной мощности, является избыточным [111]. Когда исследование уже завершено и выводы сделаны, не имеет смысла говорить о возможных рисках: проведенное исследование либо позволяет констатировать биоэквивалентность, либо нет.

Таблица 2.2. Ошибки первого и второго рода в исследованиях биоэквивалентности

Результаты	Нулевая гипотеза отклонена	Нулевая гипотеза не отклонена
Препараты биоэквивалентны	Верно	Ошибка второго рода (β)
Препараты не биоэквивалентны	Ошибка первого рода (α)	Верно

Одни из наиболее частых причин провала исследований биоэквивалентности – неправильное планирование дизайна исследования и недостаточ-

ный объем выборки. Ниже приводится подробное описание процедуры оценки размера выборки для стандартных исследований.

В настоящее время существует множество возможностей для расчета размера выборки в клинических исследованиях, успешно реализуемых в различных статистических программах [111]. Для исследований биоэквивалентности вопрос расчета объема выборки наиболее актуален. Существует ряд тонкостей, которые необходимо иметь в виду при планировании исследований.

Прежде всего необходимо подчеркнуть, что объем выборки это всегда оценка. Точный расчет по формуле принципиально не реализуем, а часть исходных параметров является предположением или оценкой. Результат оценки зависит от перечисленных ниже основных параметров.

1. Допустимые границы доверительного интервала для рассматриваемого фармакокинетического параметра (Q_1, Q_2). Как правило, в большинстве клинических исследований допустима разница между эффективностью препаратов не более 20 %; в исследованиях биоэквивалентности эффективность заменяется значениями основных фармакокинетических параметров. Границы допустимого диапазона для отношений этих параметров в большинстве случаев составляют 80,00 % – 125,00 %. Очевидно, что диапазон несимметричен относительно 100 %, зато после логарифмической трансформации он становится симметричен относительно нуля: $\ln 0{,}8 = -\ln 1{,}25 \approx -0{,}22314$. Для препаратов с узким терапевтическим диапазоном границы для одного или обоих основных фармакокинетических параметров, в соответствии с рекомендациями EMA, ЕАЭС, должны быть уже и составлять 90,00 – 111,11 % (диапазон также симметричен для логарифмически преобразованных данных). Согласно рекомендациям FDA границы для препаратов с узким терапевтическим диапазоном могут масштабироваться и быть более или менее диапазона 90,00 – 111,11 %, но не более 80,00 – 125,00 % [93]. Для препаратов, характеризующихся высокой вариабельностью одного или нескольких фармакокинетических параметров, границы доверительных интервалов могут быть расширены в соответствии с методом SABE (ScaledAverageBioequivalenceApproach) [92].

2. Потребительский риск (α). В настоящее время считается, что риск потребителя должен быть не более 5 % (α=0,05). Нулевая гипотеза разбивается на два односторонних теста ($\mu_T/\mu_R<Q_1$ или $\mu_T/\mu_R>Q_2$). Поскольку граница одностороннего 95 % доверительного интервала совпадает с соответственно верхней или нижней границей 90 % двустороннего, доказательство биоэквивалентности опирается на вычисление двусторонних 90 % доверительных интервалов для отношения средних геометрических основных фармакокинетических параметров.

3. Мощность исследования (β). При оценке выборки мощность обычно устанавливается на уровне 80 %. Это означает, что спонсорский риск составляет 20 %. Отсюда следует достаточно парадоксальный вывод – теоретически каждое пятое исследование (1/0,2=5) может быть провалено по чистой случайности, независимо от качества тестируемого препарата [111]. С другой стороны, устанавливать значение мощности выше 90 % при оценке выборки не является этичным, поскольку в этом случае требуется значительно больший объем выборки.

4. Предполагаемая точечная оценка (point estimation, PE) отношения значений рассматриваемого фармакокинетического параметра или соответствующая величина отклонения тестируемого препарата от референтного (Δ). Как правило, если нет дополнительной информации, точечную оценку предполагают равной 95 % или 90 % (Δ=0,05 или Δ=0,1).

5. Внутрииндивидуальная вариабельность (CV_{intra}) рассматриваемого фармакокинетического параметра. Значение коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности (CV_{intra}) фармакокинетических параметров оценивают по данным аналогичных исследований или по данным пилотного исследования. Коэффициент вариабельности рассчитывают из соответствующего значения остаточной вариабельности после проведения дисперсионного анализа. В литературных источниках часто не приводится значение CV_{intra}, однако указываются границы доверительных интервалов. Зная границы доверительных интервалов, дизайн исследования и число добровольцев в последовательностях, можно определить соответствующий коэффициент вариабельности. Оценку объема выборки необходимо проводить независимо для каждого из фармакокинетических параметров, входящих в определение критерия биоэквивалентности (как правило, C_{max} и AUC_{0-t}, или $AUC_{0-\infty}$). В случае если данные литературы, позволяющие оценить внутрииндивидуальную вариабельность, отсутствуют, можно рекомендовать адаптивный дизайн. При планировании исследований с параллельным дизайном вместо коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности следует использовать общий («pooled») коэффициент вариабельности $CV_{total.}$

В отличие от перекрестного, **параллельный дизайн** не предполагает повторного приема препарата, что позволяет существенным образом сократить продолжительность исследования для веществ с длительным периодом полувыведения. Однако исследования с параллельным дизайном позволяют получить значительно меньше информации об исследуемых препаратах. В частности, по результатам таких исследований невозможно определить коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров. Возможен расчет лишь общей вариабельности. По этой причине нельзя планировать исследование биоэквивалентности с перекрестным дизайном на основании данных исследования в параллельных группах. С другой стороны, зная коэффициенты внутрииндивидуальной и межиндивидуальной вариабельности из перекрестного исследования, произведя расчет, можно оценить полную вариацию CV_{total} (в некоторых источниках обозначается CV_{pooled}). Для этого необходимо обратить внимание на формулы для внутри- и межиндивидуальной вариабельности [111]: $CV_{intra}=100(e^{MSEw}-1)^{1/2}$, $CV_{inter}=100\ (e^{(MSEb-MSEw)/2}-1)^{1/2}$ и сравнить их с $CV_{total}=100(e^{(MSEb+MSEw)/2}-1)^{1/2}$, где MSE_W – остаточная вариация, MSE_b – межиндивидуальная вариация (от параметра «Субъекты в Последовательности»), полученные в результате выполнения дисперсионного анализа. Таким образом, полная вариация всегда выше межиндивидуальной. Восстановить CV_{intra} на основании значений только CV_{inter} или только CV_{total} невозможно, связь между этими параметрами не всегда однозначна, в некоторых случаях CV_{inter} может быть меньше,

чем CV_{intra}. В табл. 2.3 приведена оценка необходимого числа добровольцев для исследований с параллельным дизайном. Расчет выполнен с помощью пакета статистических программ Rv. 3.3.2, модуль PowerTostv. 1.4–3 (D. Labes, 2016) [111].

Таблица 2.3. Оценка необходимого объема выборки для исследования с параллельным дизайном T/R(1–β=0,8, α=0,05, диапазон БЭ 80,00 – 125,00 %)

CV_{total}	PE	
	95,00 %	90,00 %
10 %	12	20
11 %	12	24
12 %	14	28
13 %	16	32
14 %	20	38
15 %	22	42
16 %	24	48
17 %	26	54
18 %	30	60
19 %	32	66
20 %	36	72
21 %	40	80
22 %	44	86
23 %	46	94
24 %	50	102
25 %	54	110
26 %	58	118
27 %	62	128
28 %	68	136
29 %	72	146
30 %	76	156
31 %	82	166
32 %	86	176
33 %	92	186
34 %	96	198
35 %	102	208

Таблицы оценок значений объема выборки в исследованиях с параллельным дизайном можно найти также, например, в следующих публикациях: [161, 230].

Стандартные двухэтапные перекрестные исследования выполняются наиболее часто: «2 x 2 x 2» (два препарата – тестируемый (T) и референтный (R), две последовательности (TR и RT) и два периода). Для оценки необходимого объема выборки можно использовать следующую итерационную формулу [111]:

$$n \geq \left[t(\alpha, n-2) + t(\beta, n-2)\right]^2 \frac{2 \cdot \sigma^2}{\left(\delta - |\theta|\right)^2}, \quad (1)$$

где t – коэффициент Стьюдента, зависящий от вероятности ошибок первого (α) или второго (β) рода и числа степеней свободы;

δ – граница пределов биоэквивалентности (δ = 0,223 в случае границ доверительного интервала соотношения средних значений фармакокинетических параметров 80,00 – 125,00 %);

σ – остаточная внутрииндивидуальная вариация;

θ – отношение средних после логарифмического преобразования.

Итерации предполагают последовательное использование этой формулы несколько раз, используя на каждом последующем шаге предшествующее значение.

В настоящее время в программное обеспечение для расчета выборки имплементируют более точные формулы для расчета мощности. В таблице 3 приведены значения объема выборки в зависимости от коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности для значений ошибки первого рода α=0,05, мощности 1–β=0,8 и стандартных допустимых границ доверительного интервала 80,00 % – 125,00 % (расчет выполнен с помощью пакета статистических программ Rv. 3.3.2, модуль PowerTostv. 1.4–3 (D. Labes, 2016) [111]. Необходимо дополнительно отметить, что согласно современным требованиям минимальное значение объема выборки в стандартном исследовании биоэквивалентности должно составлять 12 человек [69, 80]. Из таблицы 2.4 видно, что объем выборки, необходимый для проведения стандартных двухэтапных исследований, растет при увеличении коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности оцениваемого фармакокинетического параметра. По этой причине для стандартных двухэтапных исследований объем выборки можно оценить на основании значения вариабельности только одного из фармакокинетических параметров, а именно того параметра, вариабельность которого больше. Чаще всего таким параметром является C_{max}, однако имеются примеры веществ, для которых вариабельность AUC_{0-t} выше, чем C_{max}, поэтому при планировании исследований нужно иметь информацию о возможных значениях обоих параметров.

Таблица 2.4. Оценка необходимого объема выборки для стандартного двухэтапного исследования 2x2x2 TR/RT (1-β=0,8, α=0,05, диапазон БЭ 80,00 – 125,00 %)

CV	PE	
	95,00 %	90,00 %
10 %	8	12
11 %	8	14
12 %	8	16
13 %	10	18
14 %	12	20
15 %	12	22
16 %	14	26
17 %	14	28
18 %	16	30
19 %	18	34
20 %	20	38
21 %	22	40

CV	PE	
	95,00 %	90,00 %
22 %	22	44
23 %	24	48
24 %	26	52
25 %	28	56
26 %	30	60
27 %	32	66
28 %	34	70
29 %	38	74
30 %	40	80
31 %	42	84
32 %	44	90
33 %	46	94
34 %	50	100
35 %	52	106

При наличии в источниках литературы данных нескольких однородных исследований можно проводить метаанализ данных – «пулировать» значения коэффициента вариабельности. «Пулированное» значение коэффициента вариабельности – это взвешенное среднее значений нескольких исследований, при этом наибольший вес имеют исследования с большим числом участников (при расчете также играет роль число последовательностей). Поскольку при оценке объема выборки в стандартном двухпериодном перекрестном исследовании чем больше коэффициент вариабельности, тем больше выборка, для расчетов можно рекомендовать использовать верхнюю границу доверительного интервала усредненного значения коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности. Необходимо, однако, тщательно подбирать исследования для усреднения. Коэффициенты вариабельности фармакокинетических параметров могут существенно зависеть от типа и условий проведения исследования (натощак или после приема пищи), особенностей лекарственных форм (таблетки, суспензии, порошки), антропометрических и демографических особенностей групп испытуемых (возраст, пол, раса, здоровые добровольцы или пациенты), а также множества других факторов.

Подводя итоги, можно сформулировать следующие рекомендации по расчету объема выборки в исследованиях с двухэтапным перекрестным дизайном:

1. Если нет дополнительной информации, точечная оценка должна находиться в пределах 95,00 % – 105,26 %[1] или 90,00 % – 111,11 %. Никогда не предполагайте, что отношение средних равно единице (100 %).

2. Доказательство биоэквивалентности, как правило, основывается на двух параметрах, поэтому проводите независимую оценку для каждого, а затем выбирайте наибольшее.

3. Значение коэффициента вариации определяет выборку. При наличии данных нескольких исследований можно проводить мета-анализ. Обращай-

[1] Границы симметричны относительно логарифмически преобразованных данных, для 105,00 % объем выборки будет меньше, чем для 95,00 %

те внимание на дозировку, лекарственную форму, прием пищи и другие особенности исследований – это может существенным образом сказаться на вариации.

4. Мощность исследования должна быть не менее 80 %.

5. Ошибка первого рода должна быть 5 %.

***Пример**: в ранее проведенном исследовании биоэквивалентности препарата XX были получены следующие значения коэффициентов внутриндивидуальной вариабельности: C_{max} 21 %, AUC 15 %. Предполагая точечную оценку равной 95,00 %, для значений α=0,05; 1-β=0,8, получаем, что для проведения исследования необходимо не менее 22 добровольцев.*

Исследования с репликативным дизайном требуют специального обоснования. В отличие от стандартного двухпериодного перекрестного исследования для исследований с более сложным дизайном (например, репликативным) расчет объема выборки опирается на проведение симуляционных вычислений. Расчеты такого рода имплементированы в программы [111].

Рассмотрим вначале наиболее распространенный полный репликативный четырехпериодный дизайн исследований. Репликативность означает наличие повторений при приеме препарата, то есть один и тот же пациент за время исследования принимает тестируемый или референтный (или оба препарата) более одного раза. Чем более сложный дизайн исследования, тем больше информации можно извлечь. К примеру, в рамках полного репликативного четырехпериодного дизайна становится доступна независимая оценка коэффициентов внутриидивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров тестируемого и референтного препаратов в отдельности (CV_R и CV_T). В этом смысле четырехпериодный дизайн обладает очевидным преимуществом.

Другой распространенный частично репликативный дизайн имеет три периода: TRR/RTR/RRT [111]. Четырехпериодный дизайн «2 x 4 x 4» с четырьмя последовательностями (TRTR, RTRT, RTTR и TRRT), как было показано [215], не является оптимальным для проведения исследований биоэквивалентности с репликативным дизайном и в настоящее время не используется, в отличие от дизайна с двумя последовательностями.

Вернемся к вопросу оценки объема выборки. В наиболее общем случае при консервативной оценке объема выборки доверительные интервалы считаются фиксированными. Таблицы значений необходимого объема выборки при соблюдении описанного условия были приведены в публикации [176]. Любопытно, что зная необходимое число добровольцев для стандартного двухпериодного исследования, можно, не проводя дополнительных вычислений, оценить соответствующее значение для четырехпериодного исследования как половину от исходного значения.

Поскольку четырехпериодные исследования более сложные, с точки зрения экономической эффективности разумно проводить их для препаратов с предполагаемой высокой вариабельностью фармакокинетических параметров. В этом случае согласно действующим рекомендациям теоретически становится возможным расширение доверительного интервала для параметра C_{max}. При этом при расчете объема выборки необходимо учитывать

данную возможность, что позволит сократить выборку (для некоторых значений – более чем в два раза).

Также данный дизайн исследования может быть рекомендован при оценке препаратов с узким терапевтическим диапазоном с позиций повышенных требований к безопасности таких препаратов [93].

На практике оценка размера выборки производится в ходе соответствующих симуляций [111]. По мере наращивания компьютерных мощностей, становятся доступны для анализа все более и более тонкие моменты. К примеру, недавно было показано, что использование масштабирования доверительных интервалов может привести к инфляции ошибки первого рода, т. е. к возрастанию риска для потребителя (для коррекции данного эффекта в ходе расчета объема выборки была предложена новая процедура sampleN. scABEL. ad (H. Schütz, D. Labes) в модуле PowerTOST пакета статистических программ R). При использовании данной процедуры необходимо в завершении исследования проводить дополнительные расчеты для наблюдаемого значения α и использовать соответствующие доверительные интервалы.

В табл. 2.5 приведены значения необходимого размера выборки для четырехпериодных репликативных исследований высоковариабельных препаратов. Отметим, что хотя таблица ограничена значением внутрииндивидуальной вариабельности в 60 %, в исследованиях некоторых веществ может наблюдаться и более высокая вариабельность.

Таблица 2.5. Оценка необходимого объема выборки для четырехэтапного исследования 2 x 2 x 4 TRTR/RTRT, расширение доверительного интервала (ДИ) осуществляется по методу SABE (в скобках приведены значения с учетом контроля за уровнем ошибки α)

CV	PE 95,00 %		PE 90,00 %	
	Без учета расширения ДИ	С учетом расширения ДИ	Без учета расширения ДИ	С учетом расширения ДИ
30 %	20	18 (22)	40	34 (42)
31 %	22	18 (22)	42	36 (42)
32 %	22	18 (22)	44	36 (40)
33 %	24	18 (22)	48	34 (40)
34 %	24	20 (22)	50	34 (38)
35 %	26	20 (22)	52	34 (38)
36 %	28	20 (22)	56	34 (36)
37 %	30	20 (22)	58	32 (36)
38 %	30	20 (22)	62	32 (34)
39 %	32	20 (22)	64	32 (34)
40 %	34	20	68	30 (32)
41 %	34	20	70	30 (32)
42 %	36	20	74	30 (30)
43 %	38	20	78	28 (30)
44 %	40	20	80	28
45 %	42	20	84	28
46 %	42	20	86	28
47 %	44	20	90	28
48 %	46	20	94	28

CV	PE 95,00 %		PE 90,00 %	
	Без учета расширения ДИ	С учетом расширения ДИ	Без учета расширения ДИ	С учетом расширения ДИ
49 %	48	20	98	28
50 %	50	22	100	28
51 %	52	22	104	28
52 %	52	22	108	28
53 %	54	22	112	28
54 %	56	22	116	28
55 %	58	22	120	30
56 %	60	22	124	30
57 %	62	24	126	30
58 %	64	24	130	30
59 %	66	24	134	32
60 %[2]	68	24	138	32

Полезно сравнить значения, полученные в результате симуляционных вычислений с соответствующими значениями, рассчитанными по консервативному принципу, то есть для фиксированных границ 80,00 – 125,00 %. Для больших значений коэффициентов вариабельности объем выборки во втором случае более чем в два раза завышен!

Однако есть нюансы, принимая во внимание которые на стадии планирования исследования, разумно увеличить выборку по отношению к расчетным значениям, приведенным в табл. 2.2. Погрешности в оценке предполагаемого коэффициента вариабельности (даже в случае наличия результатов ранее проведенных исследований).

1. Если обратить внимание на зависимость оценочного объема выборки от коэффициента вариации в исследованиях с масштабированием границ доверительных интервалов, можно заметить парадоксальную, на первый взгляд, тенденцию: до определенных значений, чем больше вариабельность, тем меньше объем выборки. Таким образом, если полученное в результате проведения исследования значение коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности референтного препарата окажется ниже предполагаемого, расширение границ доверительных интервалов при условии малой выборки может быть недостаточным для признания препаратов биоэквивалентными. В случае оценки коэффициента вариабельности на основании данных мета-анализа нескольких исследований для расчета можно использовать нижнюю границу доверительного интервала для усредненного коэффициента вариации. Однако, строго говоря, ввиду немонотонного поведения графика зависимости оценочного объема выборки от значения коэффициента вариации существуют ситуации, когда для большей вариабельности, будет больший объем выборки.

2. Возможное выбывание добровольцев в ходе исследования. Как правило, в исследованиях биоэквивалентности можно допускать до 10 % выбывших («drop-outs»), причем, чем больше периодов, тем больше вероятность

[2] Для некоторых препаратов (например, агомелатина, коэффициент внутрисубъектной вариабельности составляет 65-85 %

того, что какой-то доброволец не закончит исследование. В случае проведения исследований на пациентах, процент выбывших может быть и больше. В данном случае речь идет именно о выбывании добровольцев в процессе исследования, а не о количестве добровольцев, необходимом для скрининга.

3. Точечная оценка геометрических средних отношений. Четырехпериодные исследования, как правило, проводят с целью масштабирования соответствующих границ доверительных интервалов, что возможно только для высоковариабельных препаратов и препаратов с узким терапевтическим диапазоном. Для высоковариабельных препаратов разумно предполагать точечную оценку геометрических средних в пределах 90,00 % – 111,11 %.

4. Разница в вариабельности тестируемого и референтного препарата. Хотя теоретически мы предполагаем наличие похожей фармакокинетики тестируемого и референтного препаратов (мы же хотим доказать эквивалентность!), на практике между препаратами могут быть существенные отличия. Особенности лекарственных форм могут влиять на внутрииндивидуальную вариабельность. Несмотря на то, что расширение границ доверительного интервала зависит только от вариабельности референтного препарата, при оценке объема выборки в ходе симуляций существенное значение имеет и вариабельность параметров тестируемого препарата. В качестве примера: для значений внутрииндивидуальной вариабельности тестируемого препарата $CV_T = 35$ % и референтного $CV_R = 45$ % расчеты приводят к значению в 44 добровольца, тогда как если считать вариабельность тестируемого и референтного препаратов равной 45 %, в исследование нужно было бы включить 34 человека.

Для препаратов с узким терапевтическим диапазоном, согласно рекомендациям FDA, оценка различий в вариабельности тестируемого и референтного препарата является одним из ключевых критериев подтверждения эквивалентности наравне с границами биоэквивалентности [93].

5. Эффект оценки нескольких показателей на одной группе («Side effect»). Недавно было показано, что теоретически возможно наблюдать инфляцию ошибки первого рода в случае, если для доказательства биоэквивалентности используются разные границы доверительных интервалов для разных фармакокинетических параметров.

Проведение исследований для препаратов с модифицированным высвобождением имеют некоторые особенности. В 2015 году в EMA было пересмотрено и расширено Руководство по изучению биодоступности и для препаратов с модифицированным высвобождением биоэквивалентности (Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1) новая версия). К таким препаратам относятся те, скорость и (или) место высвобождения активного(ых) ингредиента(ов) которых отличаются от таковых в лекарственной форме с немедленным высвобождением, вводимой тем же путем. Такая модификация достигается за счет особого состава и (или) методов производства, например, лекарственные формы с пролонгированным высвобождением, отсроченным высвобождением, с многофазным высвобождением, трансдер-

мальные системы доставки, в/м или подкожные депо-препараты, а также осмотические таблетки или формы, содержащие микропеллеты и прочее.

В зависимости от регистрационных целей, стоящих перед Компанией разработчиком, различные подходы к составлению досье и проведению клинических исследований используются.

Так, например, в случае разработки модифицированной формы препарата, которая фактически является абсолютно новой, требуется проведение полного пакета исследований, включая доклинические, фармакокинетические, исследования взаимодействия, исследования влияния приема пищи, а также исследования на специальных популяциях пациентов.

В случае разработки новой трансдермальной системы, помимо полного пакета клинических исследований, требуется исследования, подтверждающие кинетику проникновения субстанции, а также тестируются состав препарата и кожная проницаемость. Подобные исследования осуществляются при однократном и многократном дозировании, а также при различных дозировках с оценкой дозо-пропорциональности. Помимо прочего, оценивается тест раздражения кожи, чувствительность, фототоксичность и адгезивные свойства системы.

Для последующей регистрации при разработке модифицированной формы препарата, который уже существовал на рынке в другой форме, например, форме немедленного высвобождения, подходы к программе клинических исследований в таком случае несколько иные. Как правило, целью разработки такой новой формы является возможность поддержания нужной концентрации препарата в крови при меньшей частоте приема. Очевидно, что форма немедленного высвобождения не может быть эквивалентна фармакокинетическим параметрам у препарата с модифицированной формой высвобождения. Другой режим дозирования и дозы должны быть ясно описаны в Инструкции по применению препарата. Разработчик должен доказать преимущества новой формы. Во многих случаях новая модифицированная форма должна пройти фармакокинетические исследования, а также клинические исследования по эффективности/безопасности. Терапевтические исследования должны доказать, что новая модифицированная форма по эффективности и безопасности соответствует уже ранее известной форме немедленного высвобождения. Однако в исключительных случаях, при наличии доказательств на основе ФК исследований о том, что существует высокоопределенная связь между концентрацией препарата в плазме и клиническим эффектом, непроведение терапевтических исследований может обосновано.

Фармакокинетические исследования должны быть проведены на здоровых добровольцах или в случае специальных указаний по безопасности – на пациентах. Их целью является оценка следующих параметров:

1. Степень и скорость абсорбции;
2. Колебания концентрации при достижении равновесного состояния (steady state);
3. Межсубъектная вариабельность фармакокинетики;
4. Дозопропорциональность;
5. Факторы, влияющие на поведение новой модифицированной формы;

6. Возможные риски, связанные с новой формой выпуска.

Исследования с однократной дозой (single-dose) позволят оценить скорость и степень абсорбции по сравнению с препаратом немедленного высвобождения. Исследования с многократной дозой (multiple dose study) должны продемонстрировать достижение стационарной концентрации (steady state status). Оценка стабильного состояния производится на основе сравнения как минимум 3 пред дозовых уровней концентрации для каждого препарата. В случае отсутствия эффекта аккумуляции (т. е. определяется незначительный уровень в конце каждого интервала дозирования) исследования с многократными дозами не потребуются.

Отдельно следует заметить, что при проведении исследования с многократной дозой, при решении проведении исследования натощак или после приема пищи, необходимо оценивать в соответствии с Инструкцией по приему препарата. В случае, если инструкция описывает прием препарата натощак или не дает указаний на прием пищи, дозирование препарата стандартно проводится после 10 часового перерыва в приеме пищи, т. е. натощак (fasting condition). Согласно руководству EMA (Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1) в исследованиях лекарственных форм с модифицированным высвобождением действующего вещества следует использовать нижеперечисленные наборы фармакокинетических параметров.

Фармакикинетические параметры для исследования с однократной дозой:

– $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, C_{max}, t_{max}, $t_{1/2}$ и t_{lag}, где

– AUC_{0-t}, площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени (момент приема препарата) до времени отбора последнего образца крови с определяемой концентрацией активного вещества;

– $AUC_{0-\infty}$, площадь под кривой, экстраполированная от 0 до ∞;

– C_{max}, максимальное измеренное значение концентрации активного вещества в плазме крови;

– t_{max}, время достижения максимальной концентрации активного вещества в плазме крови C_{max};

– $t_{1/2}$, период полувыведения;

– tlag, время задержки, т. е. интервал времени между непосредственным приемом лекарственного средства и первой наблюдаемой концентрацией в плазме выше нижнего предела количественного определения.

Для исследований с многократным приемом лекарственного средства:

– $AUC_{(0-\tau)}$, – $t_{max,ss}$, $C_{max,ss}$, – $C_{min,ss}$ и флуктуация, где

– $AUC_{0-\tau, ss}$, площадь под фармакокинетической кривой в течение интервала дозирования в стационарном режиме (steady state);

– $C_{max, ss}$, максимальная концентрация в стационарном режиме (steady state);

– $t_{max, ss}$, время достижения $C_{max, ss}$;

– $C_{min, ss}$, минимальная концентрация в стационарном режиме (steady state). В некоторых случаях вместо Cmin, ss рассчитывается параметр Cτ, концентрация на момент окончания интервала дозирования;

– флуктуация, рассчитываемая по формуле: $(C_{max}-C_{min})/C_{av}$, где Cav – средняя концентрация в течение интервала дозирования ($AUC_{0-\tau/\tau}$).

Выбор дозировки для проведения исследований зависит от линейности фармакокинетики препарата. В случае линейности достаточно проводить исследование на одной дозировке препарата с модифицированным высвобождением. В случае отсутствия линейной фармакокинетики сравнение между препаратами немедленного высвобождения и модифицированного высвобождения проводятся в большинстве случаев в наивысшей и наименьшей дозировках.

Наиболее часто возникает вопрос о том, какая программа исследований должна быть предложена для дженериковых препаратов, разработанных на основе уже существующих аналогичных оригинальных препаратов с модифицированным высвобождением. В настоящее время ***для пероральных препаратов с пролонгированным высвобождением*** стандартным является подход с проведением трех исследований:

1. С однократной дозой натощак;
2. С однократной дозой после приема пищи;
3. С многократной дозой.

При линейной фармакокинетике для исследований выбирается наивысшая дозировка из возможных, при отсутствии линейности выбирается наиболее подходящая дозировка с учетом чувствительности, а также параметров безопасности. Исследования рекомендуется проводить на здоровых добровольцах. Однако в случае невозможности, исходя из соображений безопасности, исследования можно проводить на пациентах.

Для ***препаратов с отсроченным высвобождением*** подход в программе исследований является схожим, однако исследования с многократной дозой не требуются, за исключением невозможности проведения исследований с однократной дозой по соображениям безопасности [111,215].

Проведение исследований для комбинированных препаратов с фиксированными дозировками (Fixed dose combination, FDC) требует отдельного рассмотрения. В 2017 году в EMA вышла обновленная версия Руководства по клинической разработке комбинированных препаратов с фиксированными дозировками (EMA/CHMP/158268/2017), которая вышла в силу с 1 октября 2017 года. В английской версии *комбинированные препараты с фиксированными дозировками* носят имя *Fixed dose combination, FDC.*

Клиническая программа по этим исследованиям зависит от свойств комбинации. Наличие фармакологического и медицинского обоснования является обязательным документом в процессе планирования и регистрации препарата, поскольку само по себе наличие возможности скомбинировать разные группы препаратов в одной таблетке не является основанием для новой комбинации. С учетом современных реалий многие производители пытаются скомбинировать разные лекарственные средства в одном для дальнейшей регистрации и продвижения. Однако это не всегда обосновано научно. Совокупность оценки возможных рисков и преимуществ данной комбинации для определенного показания является частью данного обоснования.

Обоснование делается для всех наименований препаратов, входящих в состав комбинированных препаратов с фиксированными дозировками. Делается это с учетом показаний, режимов дозирования, применяемых дозировок, указанных в инструкции, на основании Инструкции по применению (SmPC). В качестве обоснования также принимается во внимание удобство назначения и применения пациентами.

В настоящее время существует 3 основных сценария для применения и регистрации *комбинированных препаратов с фиксированными дозировками:*

1. Дополнение к терапии (add-on treatment) для пациентов, недостаточно хорошо отвечающих на уже существующую терапию,

2. В качестве замещения терапии у хорошо отвечающих на лечение пациентов, принимающих мототерапию комбинированным препаратом (substitution therapy),

3. Назначение комбинированной терапии впервые у пациентов, ранее не получавших лечение.

Для каждого из вышеописанных сценариев существует свой подход в организации и проведении клинических исследований, применяемый компаниями, разрабатывающими ***оригинальные комбинированные препараты с фиксированными дозировками.***

Так, для обоснования использования комбинированных препаратов с фиксированными дозировками в качестве Дополнение к терапии (add-on treatment), необходимо проведение рандомизированного контролируемого исследования клинической эффективности/безопасности для доказательства превосходства или дополнительной эффективности. Исследование фармакокинетики, в том числе исследование межлекарственного взаимодействия (Drug-drug interaction study), или фармакокинетические исследования на специальных популяциях, а также исследования фармакодинамики являются частью программы при отсутствии доказательств о незначительности влияния комбинации препаратов.

Для обоснования регистрации при сценарии с замещением монотерапии у пациентов особое внимание при планировании исследований обращают на обоснование дозировок и режима приема препаратов. При назначении комбинации препаратов в другие временные интервалы дополнительное исследование фармакодинамики и терапевтическое исследование могут потребоваться для доказательства терапевтической эквивалентности.

Для впервые назначаемой комбинации в целом схожей с подходами, описанными для комбинированных препаратов с фиксированными дозировками в качестве дополнения к терапии, однако потребуются еще клинические исследования превосходства комбинации и/или большей безопасности.

В случае ***дженериковой комбинации препаратов*** рекомендовано проведение биоэквивалентного исследования с уже существующим оригинальным комбинированным препаратом в той же форме и дозировке. При исследовании биоэквивалентность должна быть продемонстрирована для обоих препаратов в комбинации.

Подобные исследования проводятся натощак или, наоборот, после приема пищи в зависимости от информации в Инструкции по применению препарата.

В случае невозможности провести исследование в сравнении с комбинацией с фиксированными дозами ввиду ее отсутствия, допустимо обосновать

и проводить исследование с оригинальными препаратами по отдельности. Проведение фармакодинамического и исследования терапевтической эффективности/безопасности не представляется необходимым. Также важно отметить, что при планировании регистрации дженериковой комбинации препаратов, необходимо иметь данные о доказательстве рациональности приема и отсутствии взаимодействия между активными препаратами. Это возможно сделать на основании данных литературы по результатам регистрации оригинального препарата, если данные результатов лекарственного межвзаимодействия между препаратами в комбинации не находятся под защитой монопольного права на использование (data exclusivity). Однако при наличии таковой защиты данных и недостаточности литературного обзора в последнее время в рамках регистрации в различных Европейских регулирующих органах, помимо классического исследования биоэквивалентности между препаратом сравнения и тестовым препаратом, запрашивается исследование лекарственного взаимодействия (Drug-druginteractionstudy). Обычно оно проводится в 3-х периодах: в первом добровольцем принимается препарат А, во втором – В, а в третьем – их комбинация. Особого внимания в данных исследованиях требует рандомизация, которая может быть организована по методу латинских квадратов и потребует разделения добровольцев на 3 блока.

При наличии различных дозировок у комбинированного препарата подход к выбору дозировки описан в основном руководстве по биоэквивалентности. Он включает в себя оценку пропорциональности дозировок, линейности фармакокинетики и параметров безопасности и переносимости. При регистрации множественности непропорциональных промежуточных дозировок *комбинированных препаратов с фиксированными дозировками* возможно проведение исследований на высшей и низшей дозировках (так называемых bracketingapproach) [111].

В завершение еще раз обратим внимание на рекомендательный характер описанных процессов оценок объема выборки. Кроме вышеперечисленных нюансов, необходимо учитывать и другие особенности при сравнении конкретных препаратов. По этой причине для каждого исследования нужна независимая и грамотная оценка объема выборки, даже если аналогичное исследование уже проводилось ранее.

Сравнительные исследования эффективности и безопасности дженериков в настоящее время сохраняют свою актуальность. Большое количество дженериков на рынке приводит к возникновению огромного количество торговых наименований и проблему ранжирования их по качеству и выбору [32, 34].

Однако не является секретом то, что зачастую эффективность дженерика и оригинального препарата сложно сопоставить. Можно выделить несколько возможных причин, из-за которых свойства оригинального препарата и дженерика могут отличаться [111].

1. Качество исходных материалов

Стоимость сырья оригинального препарата составляет 10 % себестоимости его производства; стоимость сырья дженерика часто превышает 50 %

себестоимости производства, что может подтолкнуть производителей к поиску более дешевого и менее качественного сырья.

2. Метод синтеза субстанции является важным фактором, обеспечивающим качество препарата. Изменение метода синтеза приводит к получению продукта, обладающего отличными от оригинального препарата свойствами чаще всего за счет высокого содержания продуктов деградации и технологических примесей.

3. Вспомогательные вещества

Вспомогательные вещества часто составляют основную часть прописи готового продукта (80–90 %).

Возможные влияния вспомогательных веществ:

1) усиление или снижение терапевтической активности;

2) изменение характера действия лекарственных веществ;

3) обеспечение локализации и продолжительности действия лекарственных веществ; регулирование скорости всасывания лекарственных веществ; обеспечение стабильности лекарственных препаратов.

Помимо влияния на биодоступность самого лекарственного вещества вспомогательные вещества взаимодействуют и оказывают влияние на организм человека, поэтому целесообразно привести предъявляемые к эксципиентам требования:

1. Способствование проявлению надлежащего фармакологического эффекта активного лекарственного вещества.

2. Отсутствие нежелательных явлений, например: аллергических и токсических реакций.

3. Соответствие своему назначению и функциям (наполнители, связующие, дезинтегранты и т. д.), а также обеспечение биодоступности лекарственных субстанций.

4. Отсутствие химических или физико-химических взаимодействий с лекарственными веществами во избежание снижения эффективности лекарственного соединения или же возникновения побочных реакций.

5. Контроль чистоты вспомогательных веществ во избежание микробной контаминации.

Важно еще раз подчеркнуть, что вспомогательные вещества должны быть подобраны индивидуально в каждом случае, и этот выбор должен быть научно обоснован.

4. Упаковочные материалы/контейнеры

Первичная упаковка (блистеры, стрипы, флаконы) находится в прямом контакте с фармацевтическим продуктом. Адсорбция упаковочных материалов может изменить стабильность продукции. Изменения состава лекарственного продукта в результате прилипания к стенкам контейнера может также изменить стабильность, что может вызвать плохую переносимость или токсические явления.

Дженерики, несмотря на значительную схожесть с оригинальным препаратом, зачастую являются «новыми» ЛС, т. к. в большинстве случаев доклинические токсикологические исследования выполняются не в полном объеме, хотя и соответствуют требованиям страны-производителя и, кроме того,

отсутствуют данные длительных крупных исследований по эффективности лекарства, и, что особенно важно, безопасности и переносимости.

Например, у оригинального отечественного препарата мексидол (этилметилгидроксипиридина сукцинат), разработанного в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН в середине 80-х годов, по данным Государственного реестра лекарственных средств на 2015 год, в России зарегистрировано 10 генериков. Коллективом авторов из Рязанского медицинского университета им. И.П. Павлова было проведено исследование на 14 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла, в котором они сравнили фармакокинетические параметры референтного препарата мексидола и его генерика после их перорального введения в дозе 100 мг/кг массы (3 таблетки/кролик, без нарушения целостности оболочки таблеток) с применением оригинальной методики [136].

Полученные в эксперименте на кроликах результаты свидетельствуют о том, что мексидол по сравнению с мексипримом полнее и быстрее всасывается из желудочно-кишечного тракта, что проявляется достоверно более высоким (в среднем на 26,1 %) значением максимальной концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината и меньшим временем ее достижения (мексидол – 30 минут, мексиприм – 1 час). Общий клиренс, период полувыведения и среднее время удерживания этилметилгидроксипиридина сукцината достоверно не различались после введения мексидола и мексиприма, что свидетельствует о схожем выведении исследуемых препаратов из организма животных.

Полученные результаты согласуются и с информацией, указанной в инструкциях препаратов мексидол и мексиприм. Так, максимальная концентрация этиметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови при приеме мексидола внутрь в дозах 400–500 мг составляет 3,5–4,0 мкг/мл, а при приеме мексиприма – 50 – 100 нг/мл. Выявленные различия могут быть связаны с разницей в технологии производства препаратов (степень измельчения, различный уровень компрессионного давления при прессовании таблеток), а также с наличием неодинаковых вспомогательных веществ как в составе ядра таблеток, так и в их оболочке. Возможно также наличие ряда неодинаковых свойств, применяемых фирмами фармацевтической субстанции (примеси, иная кристаллическая структура).

Как известно, исследования биоэквивалентности проводятся с участием здоровых добровольцев, при этом фармакокинетические параметры исследуемого продукта могут иметь существенные различия от таковых у больных. Помимо этого, при изучении биоэквивалентности препараты, как правило, вводят однократно, а при многократном применении параметры фармакокинетики могут существенно меняться. Также при исследовании биоэквивалентности не всегда определяются (не всегда есть возможность) метаболиты лекарственных препаратов, которые могут обладать собственной фармакологической активностью (согласно современным рекомендациям, биоэквивалентность необходимо оценивать по нативному веществу даже в том случае, если оно не обладает фармакологической активностью) [65].

Несмотря на важность показателей биоэквивалентности при регистрации дженерика, важным критерием взаимозаменяемости лекарственных

препаратов в реальной клинической практике является терапевтическая эквивалентность. Согласно пункту 46 ФЗ от 22.12.2014 № 429-ФЗ (ред. от 13.07.2015) исследование терапевтической эквивалентности лекарственных препаратов – вид клинического исследования, проведение которого осуществляется для выявления одинаковых свойств лекарственных препаратов определенной лекарственной формы, а также наличия одинаковых показателей безопасности и эффективности лекарственных препаратов, одинаковых клинических эффектов при их применении [74]. Наиболее подробно подходы к определению терапевтической эквивалентности описаны в США, в так называемой «Оранжевой книге» (OrangeBook). В ней выделено 2 категории препаратов:

Категория А – препараты, терапевтическая эффективность которых сходна с рекомендуемыми ВОЗ для сравнения с оригинальными препаратами.

Категория В – лекарственные средства, которые по разным причинам на данный момент нельзя считать терапевтически эквивалентными соответствующим препаратам сравнения.

В аптеке провизор может отпустить больному препарат только с тем торговым названием, которое выписал врач.

В РФ отсутствует база данных по результатам сравнительных клинических исследований дженериков между собой. Поэтому основным источником данных об эффективности, безопасности и переносимости дженериков в РФ могут быть фармакоэпидемиологические исследования, основанные, в частности, на анализе баз данных, содержащих спонтанные сообщения медицинских работников и производителей ЛС о НПР и о случаях терапевтической неэффективности ЛС. Немногочисленные клинические исследования, финансируемые как производителями оригинатора, так и дженерика, сравнивающие эффективность и переносимость ОЛС и ДЛС (при кратковременном применении), давали неоднозначные результаты: в некоторых из них соответствие было довольно полным. В других, напротив, выявлены достаточно существенные различия в терапевтическом действии и частоте побочных эффектов между оригинальным препаратом и дженериком [32, 34].

По данным С.Ю. Марцевича в некоторых случаях исследования терапевтической эквивалентности дженериков эналаприла, амлодипина, бисопролола, индапамида не позволили в полной мере их сопоставить по эффективности [65].

Много вопросов в последнее время возникает в отношении статинов. В России зарегистрировано более 25 дженериков симвастатина и около 20 дженериков аторвастатина. Результаты клинических исследований, в которых сравнивали эффективность и безопасность оригинальных препаратов статинов и их дженериков, показали, что некоторые дженерики статинов, снижая уровень общего холестерина почти так же, как и оригинальный препарат, в меньшей степени влияют на уровень холестерина липопротеидов высокой плотности и меньше снижают индекс атерогенности. Например, установлено, что оригинальный препарат аторвастатина в дозе 20 мг снижал индекс атерогенности на 62 %, а дженерик, назначаемый в такой же дозе, – на 50 %. Аналогичные данные получены при сравнении оригинального симвастатина и дженерика симло, и вопрос – могут ли такие

дженерики снижать риск сердечно-сосудистых осложнений при длительной терапии, как оригинальные препараты, до сих пор остается открытым. Результаты другого сравнительного исследования позволили сделать вывод о близкой клинической эффективности оригинального симвастатина и дженерика симвалимита, в котором не наблюдалось существенных различий действия оригинального препарата и дженерика на уровень общего холестерина и холестерина ЛПНП, ЛПВП, ТГ. Одинаковым было влияние изучаемых препаратов на содержание печеночных ферментов и креатинфосфокиназы. Частота побочных эффектов в двух группах больных также была практически одинаковой [34].

Основным источником данных об эффективности, безопасности и переносимости дженериков в РФ могут быть фармакоэпидемиологические исследования, основанные, в частности, на анализе баз данных, содержащих спонтанные сообщения медицинских работников и производителей ЛС о побочных реакциях и случаях терапевтической неэффективности ЛС. Но ввиду отсутствия постоянных источников финансирования исследований такого рода они зачастую носят эпизодический характер, и, к сожалению, не могут использоваться для систематической оценки эффективности.

Пилотное исследование предназначено для получения предварительных данных, важных для планирования дальнейших этапов исследования (определение возможности проведения исследования у большего числа испытуемых, размера выборки в будущем исследовании, необходимой мощности исследования и т. д.). Пилотные исследования выполняются также для получения предварительной информации о фармакинетике лекарственных препаратов, статистических данных о вариабельности.

Проведение пилотного исследования позволяет исследователю проектировать и выполнять крупномасштабный проект более методично и помогает сэкономить время и затраты, уменьшив риск ошибок или проблем. Пилотные исследования полезны по ряду причин, в том числе:

1. Определение или уточнение исследовательских целей;
2. Определение или уточнение гипотезы или набора гипотез;
3. Определение и оценка выборки исследуемой популяции;
4. Тестирование исследовательских инструментов;
5. Оценка и определение методов исследования;
6. Выявление и разрешение как можно большего числа потенциальных проблем или вопросов;
7. Оценка времени и затрат, необходимых для проекта;
8. Определение того, являются ли цели исследования и дизайн реалистичными;
9. Подготовка предварительных результатов, которые могут помочь обеспечить финансирование и другие формы институциональных инвестиций, если они эффективны [171, 254].

Пилотные исследования регулярно проводятся во многих клинических областях. Необходимо отметить, что многие крупные клиническое исследования начинались с проведения какого-либо пилотного исследования для оценки возможности проведения более масштабного исследования: оказа-

ние помощи при критических состояниях организма [146], лечение сахарного диабета [169], сердечно-сосудистые исследования [234], первичной медико-санитарной помощи [157] и т. д.

Однако в нашей стране пока нет широкой практики как одобрения проведения пилотных исследования со стороны регуляторных органов, так и проведения данных исследований со стороны заказчиков.

Необходимо отметить, что появляются определенные предпосылки к внедрению пилотных исследований. Так, в *Правилах проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза* уже встречаются упоминания о пилотных исследования. В частности, говорится, что если исследуемое вещество является эндогенным, то измерение фармакокинетических параметров необходимо осуществлять с поправкой на его фоновое содержание, чтобы исследуемые фармакокинетические параметры относились к дополнительным концентрациям, полученным вследствие приема лекарственного препарата. При условии приемлемой переносимости и если концентрацию, превосходящую фоновую и достигаемую после приема лекарственного препарата, можно достоверно измерить, в исследованиях биоэквивалентности эндогенных веществ допустимо применение доз, превышающих максимальные разовые дозы. Если после приема различных доз эндогенного вещества разница в экспозиции ранее не была показана, ее необходимо определить либо в пилотном исследовании, либо в рамках одного из периодов основного исследования биоэквивалентности с использованием различных доз референтного лекарственного препарата при условии, что использование этих доз позволит определить потенциальные различия между лекарственными препаратами.

Фармакодинамические исследования не рекомендованы в отношении лекарственных препаратов, действующее вещество которых проникает в системный кровоток. При этом для оценки системной экспозиции и установления биоэквивалентности можно использовать фармакокинетический подход. Это обусловлено тем, что фармакодинамические и клинические конечные точки характеризуются более низкой чувствительностью к выявлению разницы между лекарственными препаратами в отношении их биофармацевтических свойств, высвобождения и абсорбции. Поскольку кривые зависимости «доза – эффект» для фармакодинамических и клинических конечных точек обычно более пологие, чем соответствующие кривые зависимости фармакокинетических параметров от дозы, необходимо доказать достаточную аналитическую чувствительность исследования, то есть способность различать реакцию, полученную при применении разных доз. Важно проводить сравнения в дозах, вызывающих наиболее значимую реакцию, для определения которых может потребоваться проведение пилотного исследования. Фармакодинамические показатели имеют всегда большую вариабельность, чем фармакокинетические данные [80].

Всегда задается вопрос объема выборки для пилотного исследования. Согласно Connelly [233] объем выборки должен составлять 10 % от объема выборки основного исследования. Однако Hertzog [171] предупреждает, что это не простой вопрос, и его нельзя решить, используя жесткий предел в 10 %, т. к. на эти виды исследований влияют многие факторы.

В идеале размер выборки пилотного исследования должен быть настолько большим, насколько позволяет размер бюджета.

Таким образом, пилотные исследования предоставляют серьезный шаг к оценке возможности проведения крупных полномасштабных исследований. Они представляют лучший способ оценить осуществимость большого дорогостоящего полномасштабного исследования [307]. Проведение пилотного исследования до основного может повысить вероятность успеха основного исследования и потенциально помочь избежать проведения неудачного исследования.

3. ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РЕГИСТРАЦИИ И ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОСТРАНСТВЕ ЕВРАЗЭС

Рабочая группа Евразийской экономической комиссии по формированию общих подходов к регулированию обращения лекарственных средств в Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС) разработала проект Правил регистрации и экспертизы лекарственных препаратов для медицинского применения. Правила содержат детализированные требования к подаче заявлений на регистрацию лекарственных препаратов, формату и содержанию регистрационного досье для различных групп лекарств (включая обычные лекарственные, биологические, гомеопатические препараты, препараты из растительного сырья, препараты с хорошо изученным опытом применения, препараты крови и другие). Использование данных Правил позволит создать транспарентную систему взаимодействия уполномоченных органов (экспертных организаций) стран Союза в процессе экспертизы и рассмотрения заявлений на регистрацию и регистрационных досье на лекарства. Регистрации в соответствии с правилами Евразийской экономической комиссии подлежат лекарственные препараты, предназначенные для обращения на общем рынке лекарственных средств, в рамках Союза или на территории одного из государств-членов.

Безусловно, самым крупным участником соглашения является Российская Федерация. Обращение лекарственных средств (ЛС) в Российской Федерации регулируется Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (61-ФЗ), согласно которому государственной регистрации подлежат (статья 13) [74]:

1) все лекарственные препараты (ЛП), впервые подлежащие вводу в обращение в Российской Федерации;

2) лекарственные препараты, зарегистрированные ранее, но произведенные в других лекарственных формах в соответствии с перечнем наименований лекарственных форм, в новой дозировке при доказательстве ее клинической значимости и эффективности;

3) новые комбинации зарегистрированных ранее лекарственных препаратов.

Государственной регистрации не подлежат:

1) лекарственные препараты, изготовленные аптечными организациями, ветеринарными аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, которые имеют лицензию на фармацевтическую деятельность, по рецептам на лекарственные препараты и требованиям медицинских организаций, ветеринарных организаций;

2) лекарственные препараты, приобретенные физическими лицами за пределами Российской Федерации и предназначенные для личного использования;

3) лекарственные препараты, ввозимые в Российскую Федерацию для оказания медицинской помощи по жизненным показаниям конкретного па-

циента на основании разрешения, выданного уполномоченным федеральным органом исполнительной власти;

4) лекарственные средства, ввозимые в Российскую Федерацию на основании выданного уполномоченным федеральным органом исполнительной власти разрешения и предназначенные для проведения клинических исследований лекарственных препаратов и (или) проведения экспертизы лекарственных средств для осуществления государственной регистрации лекарственных препаратов;

5) фармацевтические субстанции;

6) радиофармацевтические лекарственные препараты, изготовленные непосредственно в медицинских организациях в порядке, установленном уполномоченным федеральным органом исполнительной власти;

7) лекарственные препараты, производимые для экспорта.

Необходимо отличать ЛП от ЛС. Так, согласно 61-ФЗ ЛС – вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий. К ЛС относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты. ЛП – ЛС в виде лекарственных форм (ЛФ).

Регистрация лекарственного препарата – процесс получения разрешения для медицинского применения лекарственного препарата на территории государства или союза государств, где происходило рассмотрение регистрационного досье согласно требованиям, установленным в данном государстве или союзе государств. Для регистрации заявитель предоставляет в уполномоченный орган регистрационное досье на ЛП

С момента выхода в 2010 году 61-ФЗ процесс регистрации лекарственных средств претерпел многочисленные изменения. Первоначально для получения разрешения на проведение клинических исследований, необходимых для проведения исследования биоэквивалентности (для генерических ЛП) или I фазы клинических исследований (для оригинальных ЛП), требовалось предоставление в регуляторный орган готового регистрационного досье, а затем вторым этапом – документы на получение разрешения на проведение клинических исследований.

Федеральный закон от 22 декабря 2014 г. № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» обозначил несколько важных изменений:

1. Регистрационное досье должно предоставляться в формате общего технического документа (common technical document, CTD), что соответствует международной практике;

2. Введено правило проведения инспектирования иностранных производителей ЛС на соответствие требованиям надлежащей производственной практики уполномоченным органом РФ;

3. Процедура получения разрешения на проведение клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения разведена во времени с подготовкой и подачей регистрационного досье. Для получения разрешения требуется минимально необходимый пакет документов, который обозначен в 61-ФЗ, статья 39;

4. Внесено новое понимание воспроизведенного ЛП, сделан акцент на идентичности к референтному ЛП по количественному и качественному составу ЛП;

5. Введено понятие «взаимозаменяемый ЛП», который отличается от воспроизведенного ЛП не идентичностью по количественному и качественному составу к референтному ЛП, а эквивалентностью по данным показателям;

6. Обговорена возможность предоставления обзора научных работ о результатах доклинических и клинических исследований ЛП вместо проведения таковых для ЛП, разрешенных для медицинского применения в Российской Федерации (РФ) более двадцати лет (за исключением биологических лекарственных препаратов);

7. Обзор научных работ о результатах доклинических исследований ЛП допускается предоставлять взамен собственных исследований для воспроизведенных лекарственных препаратов и комбинаций ранее зарегистрированных ЛП;

8. Обозначено, что не требуется предоставление отчета о результатах исследований биоэквивалентности для воспроизведенных ЛП, которые:

1) предназначены для парентерального (подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутриглазного, внутриполостного, внутрисуставного, внутрикоронарного) введения и представляют собой водные растворы;

2) представляют собой растворы для перорального применения;

3) произведены в форме порошков или лиофилизатов для приготовления растворов;

4) являются газами;

5) являются ушными или глазными лекарственными препаратами, произведенными в форме водных растворов;

6) предназначены для местного применения и приготовлены в форме водных растворов;

7) представляют собой водные растворы для использования в форме ингаляций с помощью небулайзера или в качестве назальных спреев, применяемых с помощью сходных устройств.

В связи с решением о создании общего рынка ЛС стран Евразийского экономического союза (ЕАЭС), помимо национального регулирования процедуры регистрации ЛС, вводится наднациональная процедура регистрации, имеющая ряд отличий от национальной процедуры. «Соглашение о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза» (заключено в Москве 23.12.2014) определяет основные принципы формирования общего рынка ЛС, которые затем были транслированы в нормативные документы второго и третьего уровней, из которых наиболее значимыми с точки зрения регистрации воспроизведенных ЛС являются:

1. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» (Правила ЕАЭС) [82];

2. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» [80].

Правилами ЕАЭС вводятся два новых определения: «государство признания» – государство-член, в котором лекарственный препарат зарегистрирован (регистрируется) с проведением экспертизы, включающей оценку экспертного отчета об оценке безопасности, эффективности и качества лекарственного препарата, подготовленного референтным государством; «референтное государство» – государство-член, осуществляющее подготовку экспертного отчета об оценке безопасности, эффективности и качества лекарственного препарата на основании экспертизы лекарственного препарата.

Правилами ЕАЭС предусмотрено две процедуры регистрации ЛП: процедура взаимного признания, которая будет проходить последовательно в нескольких государствах ЕАЭС, либо децентрализованная процедура, которая предусматривает регистрацию сразу на территории всего ЕАЭС.

Процедура взаимного признания осуществляется:

а) референтным государством в соответствии с настоящими Правилами с целью обращения лекарственного препарата на рынке только этого государства (национальная процедура регистрации);

б) в государствах признания – по желанию заявителя после регистрации лекарственного препарата в референтном государстве по процедуре взаимного признания.

Децентрализованная процедура регистрации осуществляется одновременно несколькими государствами-членами, с одновременной подачей досье как в референтную страну, так и в страну признания.

Заявитель самостоятельно осуществляет выбор референтного государства и при необходимости государства признания при подаче заявления на регистрацию лекарственного препарата, только одно государство может выступать в качестве референтного государства. Требования к документам и данным регистрационного досье в формате общего технического документа, представляемого на регистрацию лекарственного препарата, установлены Правилами ЕАЭС.

Важно отметить, что до 31 декабря 2020 г. национальная процедура регистрации ЛС также будет доступна для заявителя, однако в этом случае обращение такого ЛС будет возможно только на территории данного государства по национальному регулированию. Все ЛП, обращающиеся на национальных рынках государств, должны пройти процедуру приведения регистрационного досье в соответствие с Правилами ЕАЭС в срок до 31 декабря 2025 г.

При проведении процедуры регистрации ЛП необходимо отличать следующие термины:

«производитель лекарственных средств» – организация, осуществляющая деятельность по производству лекарственных средств и имеющая раз-

решение (лицензию) на такой вид деятельности, выданную уполномоченным органом страны-производителя;

«держатель регистрационного удостоверения» – юридическое лицо, на имя которого выдано регистрационное удостоверение на лекарственный препарат и которое несет ответственность за безопасность, эффективность и качество лекарственного препарата;

«представитель держателя регистрационного удостоверения» – юридическое лицо, зарегистрированное в соответствии с законодательством (РФ, или государства-члена ЕАЭС), или обособленное подразделение юридического лица, расположенные на территории государства и уполномоченное держателем регистрационного удостоверения на выполнение действий, связанных с обращением лекарственных средств на территории государства;

«заявитель» – юридическое лицо, правомочное подавать заявление на регистрацию, подтверждение регистрации (перерегистрацию), внесение изменений в регистрационное досье лекарственных препаратов, иные процедуры, связанные с регистрацией, и несущее ответственность за достоверность информации, содержащейся в представленных им документах и данных регистрационного досье.

Согласно классификации нормативной документации ЕАЭС ЛП делятся на:

1. Препараты химического синтеза:

1) оригинальный ЛП – «первая» молекула, досье которой содержит полный объем исследований безопасности и эффективности;

2) генерический ЛП – имеют такой же качественный и количественный состав, как оригинальный ЛП, ту же лекарственную форму и сопоставимую биодоступность;

3) гибридный ЛП («Инновационный») – имеет отличия в составе, лекарственной форме, дозировке, показаниях к применению или пути введения, понятие является новым;

Необходимо отметить, что согласно 61-ФЗ выделены:

4) референтный лекарственный препарат (ЛП), который впервые зарегистрирован в РФ, и его качество, эффективность и безопасность доказаны на основании результатов доклинических исследований лекарственных средств и клинических исследований лекарственных препаратов, используется для оценки биоэквивалентности или терапевтической эквивалентности, качества, эффективности и безопасности воспроизведенного или биоаналогового (биоподобного) лекарственного препарата;

5) воспроизведенный лекарственный препарат – лекарственный препарат, который имеет такой же качественный состав и количественный состав действующих веществ в такой же лекарственной форме, что и референтный лекарственный препарат, и биоэквивалентность или терапевтическая эквивалентность которого референтному лекарственному препарату подтверждена соответствующими исследованиями;

2. Биологические препараты:

1) референтный ЛП – молекула, досье которой содержит полный объем исследований безопасности, эффективности, иммуногенности;

2) биоаналогичный ЛП – версия референтной молекулы, имеющая доказано сходное происхождение, показатели качества, биологическую активность, эффективность и безопасность.

3) «Бабушкины» лекарства («Grandma-Drug»):

1. ЛП с хорошо изученным применением – эффективность и безопасность молекулы признаны на основе пострегистрационных или эпидемиологических клинических исследований (КИ), опыт обращения составляет более 10 лет не менее чем в 3-х государствах. К этой группе относятся препараты, изготовленные из растительного сырья и других природных материалов. В отношении этих препаратов, к которым относятся витамины, гомеопатические лекарственные препараты и антисептики будет применяться упрощенная процедура регистрации в рамках единого рынка [82].

2. Лекарственный растительный препарат – содержит в качестве действующего вещества лекарственное сырье либо продукты его переработки;

3. Гомеопатический ЛП – произведен из гомеопатического сырья по гомеопатической технологии.

Состав регистрационного досье, особенно 4 и 5 модулей, зависит от того, к какой группе относится ЛП. Для воспроизведенных ЛП не требуется предоставлять отчеты о собственных доклинических и клинических исследованиях в объеме, который необходим для оригинальных ЛП.

Согласно определению, используемому в ЕврАзЭС, «биоаналогичный лекарственный препарат (биоаналог, биоподобный лекарственный препарат, биосимиляр)» – биологический лекарственный препарат, который содержит версию действующего вещества зарегистрированного биологического оригинального (референтного) препарата и для которого продемонстрировано сходство (подобие) на основе сравнительных исследований с референтным препаратом по показателям качества, биологической активности, эффективности и безопасности [40].

В отношении биоаналогов (биосимиляров) должна быть произведена сравнительная оценка фармакодинамического эффекта исследуемого и эталонного препарата у групп населения, характеристики которых позволяют наилучшим образом выявить различия. Необходимо проведение обоснования структуры и продолжительности исследований. Комбинированные исследования ФК/ФД могут быть источником необходимой информации о взаимосвязи между количеством использованного средства и эффектом.

Показания выбранной дозы должны отражаться на крутом участке кривой «доза-эффект». Полезными могут быть данные исследований с использованием более чем одной дозы. Если исследования ФК/ФД используются для доказательства сходства биологических лекарственных препаратов, необходимо в обязательном порядке исследовать допустимый диапазон доз, чтобы продемонстрировать чувствительность анализа.

В отношении биоаналогов-биосимиляров в результатах оценки клинической безопасности должны быть выделены любые потенциально значительные клинические различия между профилями безопасности эталонного и биоаналога-биосимиляра. Особое внимание должно уделяться аспектам иммуногенности, например, выработке и характеристикам антител. Кроме того, должны быть рассмотрены любые результаты постмаркетингового на-

блюдения после выдачи разрешения на продажу или мониторинга в рамках фармаконадзора

Следует уделять особое внимание сравнению типов, степеней тяжести и частоты возникновения общих побочных реакций, отмеченных при применении биоаналога-биосимиляра и эталонного лекарственного препарата [82].

Биоаналогичный лекарственный препарат должен быть высоко аналогичен оригинальному лекарственному препарату по физико-химическим и биологическим характеристикам. Любые выявленные различия необходимо должным образом обосновать с позиций их потенциального влияния на безопасность и эффективность [80]

Необходимо подчеркнуть, что производство лекарственных средств должно соответствовать Правилам надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза. Выдвигаемые предложения не должны противоречить нормам Всемирной торговой организации (ВТО) и Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для человека (ICH). Проблема дженериков должна решаться комплексно в рамках реформирования всей системы сертификации лекарственных средств [119].

Необходимо отметить, что соглашение о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках ЕАЭС и Правила экспертизы и регистрации лекарственных средств для медицинского применения предусматривают несколько переходных периодов, чтобы обеспечить максимально комфортное вхождение в общий рынок как производителей лекарственных средств, так и регуляторов. В частности, предполагается, что до 31 декабря 2020 года производитель будет вправе выбирать, по каким правилам, национальным или единым, он будет осуществлять регистрацию лекарственных средств. Досье всех лекарств, которые были зарегистрированы по национальным правилам до 1 января 2016 года и в период с 1 января 2016 года по 31 декабря 2020 года, должны быть приведены в соответствие с правилами Союза, то есть пройти перерегистрацию по единым правилам в срок до 31 декабря 2025 года. При подаче досье на регистрацию лекарственного препарата в срок до 31 декабря 2018 года производитель лекарственных средств будет вправе предоставлять вместо сертификата GMP ЕАЭС национальные документы, выданные государствами-членами и подтверждающие соответствие его производства требованиям национальных правил GMP одного из государств-членов. Согласно Правилам регистрации и экспертизы безопасности, качества и эффективности медицинских изделий, утвержденным ЕЭК, в переходный период до 31 декабря 2021 года регистрация медицинского изделия по выбору производителя может осуществляться либо в соответствии с этими правилами, либо в соответствии с законодательством государства-члена Союза [82].

4. ИССЛЕДОВАНИЯ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ IN VITRO: ЗАРУБЕЖНЫЕ И РОССИЙСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Как известно, технология таблетирования имеет более чем вековую историю. Одним из первых упоминаний, связывающих технологию производства таблетированных лекарственных форм и их растворение, является «Трактат о фармации», изданный в 1895 г. В нем среди прочего обсуждается, что «…состав всех таблеток, полученных методом прессования должен быть таковым, чтобы они быстро распадались и растворялись в желудке…» [181]. На протяжении более чем века методы оценки качества таблетированных лекарственных форм совершенствовались, и в настоящее время главным показателем качества, а также показателем скорости высвобождения действующего вещества (ДВ) из лекарственной формы является испытание «Растворение».

Испытание «Растворение» впервые было введено в фармакопею СССР в 1990 г. [21]. В настоящее время данное испытание включено практически во все фармакопеи мира для подтверждения высвобождения ДВ из лекарственной формы.

Испытание «Растворение» (как метод контроля качества in vitro) направлено на рутинный контроль качества серий лекарственных препаратов (ЛП) за счет определения растворенного количества ДВ с одним контрольным временным периодом отбора проб (реже несколькими) для ЛП с немедленным высвобождением (НВ) и с тремя и более контрольными временными периодами для ЛП с модифицированным высвобождением (МВ). Фактические результаты растворения сравниваются со значением (диапазоном), указанным в спецификации (нормативной документации (НД)) на готовый препарат.

Также испытание «Растворение» проводится с целью сравнения профилей кинетики растворения in vitro (тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР)) – скорости высвобождения ДВ из готовой лекарственной формы (ГЛФ) и перехода ее в жидкую фазу – для установления эквивалентности биофармацевтических свойств ЛП при изменении состава, места и технологии производства, изменений объема промышленных серий ЛП; для обоснования отказа от проведения исследований биоэквивалентности (БЭ) некоторых ЛП (биовейвер по биофармацевтической системе классификаций), для обоснования отказа от проведения исследований БЭ дозировок ЛП, не изученных в исследовании БЭ in vivo (биовейвер на основании пропорциональности состава дозировок); для обоснования биовейвера при внесении пострегистрационных изменений; а также для определения серий исследуемого ЛП для клинического изучения (например, изучения БЭ); для определения in vivo/in vitro корреляции между растворением in vitro и биодоступностью по результатам клинического изучения биодоступности in vivo.

Требования к проведению ТСКР строго регламентированы российскими и международными нормативными документами [80, 84, 205, 217, 219, 220, 222].

4.1. БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА КЛАССИФИКАЦИИ

Биофармацевтическая система классификации (БСК) – это научный подход, позволяющий разделить лекарственные вещества на основании степени их растворимости в воде и проницаемости через кишечную стенку. Согласно данной классификации активные фармацевтические субстанции (далее – действующие вещества) разделяют на 4 класса (табл. 4.1).

Таблица 4.1. Классификация фармацевтических субстанций по растворимости в воде и проницаемости через кишечную стенку

	Растворимость	Проницаемость	Пример
I класс	Высокая	Высокая	Зидовудин, пропранолол
II класс	Низкая	Высокая	Ибупрофен, кетопрофен
III класс	Высокая	Низкая	Атенолол, лизиноприл
IV класс	Низкая	Низкая	Ципрофлоксацин, фуросемид

ДВ считается высоко растворимым, если его максимальная однократная дозировка растворима в 250 мл или менее буферного раствора при диапазоне pH от 1 до 6,8 (в США pH до 7,5) при температуре 37±1 °С. ДВ считается высоко проницаемым, если степень абсорбции по сравнению с внутривенным введением составляет не менее 85 % [217, 218, 220, 222].

4.2. БИОВЕЙВЕР

Биовейвер – это процедура оценки биоэквивалентности воспроизведенного ЛП и ЛП сравнения по результатам ТСКР без проведения клинических исследований [217, 218, 220, 222]. Биовейвер, основанный на биофармацевтической системе классификации (БКС), направлен на уменьшение количества исследований биоэквивалентности in vivo, то есть он может служить заменой биоэквивалентности in vivo. В отдельных случаях проведение исследований биоэквивалентности in vivo не требуется, если эквивалентность in vivo подтверждается обоснованными данными, полученными in vitro.

Согласно международным требованиям и требованиям Евразийского экономического союза данная процедура возможна для ДВ, относящихся к I классу по БСК, если воспроизведенный и референтный препараты, содержащие данное ДВ, являются очень быстро растворимыми или быстро растворимыми; или ДВ, относящихся к III классу по БСК, если оба препарата являются очень быстро растворимыми. Для ДВ II и IV класса, для препаратов с узкой терапевтической широтой (узким терапевтическим диапазоном), для препаратов, в состав которых входят вспомогательные вещества, влияющие на абсорбцию, процедура биовейвер не применима [80, 217, 218, 220, 222].

Следует более критично подходить к оценке выполнения условий (например, место абсорбции, возможность взаимодействия с белками-переносчиками в месте абсорбции, состав вспомогательных веществ и терапевтические риски) в отношении лекарственных препаратов III класса по БКС, чем к препаратам I класса по БКС. Возможность регистрации лекарственного препарата, действующее вещество которого принадлежит III классу по БКС, без проведения исследований биоэквивалентности in vivo необходимо согласовать регуляторными органами, в частности, с Экспертным комитетом по лекарственным средствам при Евразийской экономической комиссии.

ЛП считаются очень быстро растворимыми, если при температуре 37±1 °С в аппаратах «лопастная мешалка» при скорости вращения 75 об/мин или «вращающаяся корзинка» при скорости вращения 100 об/мин во всех средах растворения в объеме 900 мл и менее высвободится не менее 85 % от номинального количества ДВ в течение 15 минут. ЛП считаются быстро растворимыми, если 85 % от указанной дозировки ДВ растворится в течение 30 мин.

При заявлении на регистрацию лекарственного препарата по процедуре биовейвера рекомендуется подтвердить полную абсорбцию действующего вещества у человека. Под полным всасыванием понимают абсорбцию ≥85 %. Полное всасывание обычно обусловлено высокой проникающей способностью действующего вещества через кишечный барьер.

Наличие полного всасывания должно быть обосновано исследованиями у человека. В качестве обоснования допускается использовать результаты исследований:

– абсолютной биодоступности;

– материального баланса.

При использовании метода материального баланса для вычисления всосавшейся фракции необходимо удостовериться, что метаболиты, учтенные при расчете всосавшейся фракции, образовались после абсорбции. В связи с этим при расчете общей радиоактивности, экскретируемой с мочой, необходимо удостовериться, что в желудочном или кишечном соке не произошла частичная деградация или биотрансформация неизмененного действующего вещества. Реакции биотрансформации I фазы (например, окисление) или II фазы (например, конъюгация) метаболизма могут происходить лишь после абсорбции (не в желудочном или кишечном соке). Таким образом, основываясь на данных исследований материального баланса, всасывание признается полным, если общее содержание исходного соединения в моче и его метаболитов (прошедших I и (или) II фазы метаболизма) в моче и кале составляет ≥85 % от принятой дозы.

Биовейвер может использоваться для дополнительных дозировок препарата в случае, если доказана биоэквивалентность для одной дозировки (как правило, самой высокой). При этом состав ЛП с различными дозировками должен быть пропорционален или должны соблюдаться следующие условия: содержание ДВ составляет не более 5 % от массы ядра таблетки/содержимого капсулы, количественное содержание ДВ в лекарственной форме одинаковое, меняется только содержание АФС и наполнителя [69, 84, 222].

4.3. ТЕСТ СРАВНИТЕЛЬНОЙ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СРЕДЫ, ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

ТСКР – вид исследования *in vitro*, включающее в себя сравнение профилей растворения воспроизведенного и референтного ЛП в средах, имитирующих значения pH в различных отделах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и среде, используемой для контроля качества в испытании «Растворение» [70].

ТСКР может преследовать различные цели:

– при экспертизе качества лекарственного препарата: для получения характеристик серии, использованной в исследованиях биодоступности (биоэквивалентности) и опорных клинических исследованиях, чтобы обосновать спецификации (нормативный документ по контролю качества); как инструмент контроля качества серий лекарственных средств в целях подтверждения постоянства производства; для получения характеристик референтного лекарственного препарата, использованного в исследованиях биодоступности (биоэквивалентности) и опорных клинических исследованиях;

– как замена исследований биоэквивалентности: чтобы подтвердить (в определенных случаях) аналогичность различных составов исследуемого лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата (биовейверы, например, при внесении изменений, изменении состава в ходе разработки лекарственного препарата и воспроизведенные лекарственные препараты;

– чтобы установить постоянство качества серий лекарственных препаратов (исследуемого и референтного лекарственного препарата), на которых будет основываться выбор соответствующих серий для использования в исследованиях in vivo.

Методы испытаний необходимо разрабатывать применительно к каждому лекарственному препарату на основании общих и (или) частных фармакопейных требований. Если указанные требования не удовлетворительны и (или) не отражают процесс растворения и всасывания in vivo (биорелевантность), допустимо использовать альтернативные методы, при условии наличия у них достаточной дискриминационной способности, то есть способности улавливать разницу между сериями с приемлемой и неприемлемой биодоступностью лекарственного препарата в условиях in vivo. Необходимо всегда принимать во внимание актуальные сведения (включая взаимодействие характеристик лекарственного препарата, основанных на биофармацевтической системе классификации и вид лекарственной формы.

При этом особое внимание должно уделяться дискриминирующей способности (дискриминирующей мощности) применяемых методов. **Дискриминирующая способность (дискриминирующая мощность)** – это способность процедуры ТСКР выявлять различия между сериями, изготовленными с использованием различных критических параметров процесса и /

или критических характеристик материала, которые могут влиять на биодоступность. В идеале все небиоэквивалентные партии должны быть обнаружены с помощью результатов испытаний in vitro [112].

Исследование необходимо проводить не менее чем в 3-х средах растворения с различными pH. Обычно в качестве сред используются раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2; ацетатный буфер с pH 4,5; фосфатный буфер с pH 6,8 и среда для контроля качества. При исследовании капсул и таблеток с желатиновой оболочкой допустимо использовать имитацию желудочного и кишечного сока с ферментами пепсином или панкреатином (для растворения оболочки или капсулы) соответственно. При исследовании ТСКР согласно международным требованиям [217, 218, 220, 222] и актуальным российским рекомендациям проводят не менее 12 параллельных исследований в каждой из сред [69, 70]. Перед проведением исследований данные растворы необходимо дегазировать. Составы сред растворения указаны в ОФС 1.4.2.0014.15 «Растворение твердых дозированных лекарственных форм» Государственной фармакопее (ГФ) XIII [20]. Также можно использовать буферные растворы, указанные в других фармакопеях. Добавление в среду растворения поверхностно-активных веществ (ПАВ), за исключением среды контроля качества, не допускается. Приготовление сред может производиться вручную или с помощью станций подготовки среды. Если ДВ нерастворимо или нестабильно при данных значениях pH, возможен отказ от использования данных сред. Например, ибупрофен не растворяется при pH 1,2, метилдопа не стабильна при pH 6,8 [112].

Отбор проб производят как минимум в трех заранее установленных точках. Для ЛП с немедленным высвобождением является обязательной временная точка 15 мин [69, 217, 222]. Для таблеток с отсроченным высвобождением, например, в кишечнорастворимых лекарственных формах, отбор проб проводят сначала в 0,1 N HCl или среде с pH 1,2 в течение 2 часов с последующим испытанием в буферной среде в диапазоне pH 4,5 – 7,5 с отбором проб через 15 мин, 30 мин, 45 мин, 60 мин, 120 мин до высвобождения 80 % от дозировки. Для лекарственных форм с пролонгированным высвобождением временные интервалы составляют 1 ч, 2 ч, 4 ч и т. д. каждые 2 часа до высвобождения 80 % от дозировки [219]. Также для выбора временных точек можно воспользоваться базой данных FDADissolutionDatabase [195].

Кинетика растворения считается эквивалентной, если значение фактора сходимости (f_2) принадлежит к интервалу от 50 до 100, величина относительного стандартного отклонения для первой временной точки не превышает 20 %, для остальных временных точек – 10 % [69, 80]. Также, если в течение 15 минут более 85 % ДВ переходит в среду, профили растворения признаются сопоставимыми без дальнейшего математического анализа [217, 222].

Полученные данные также можно сравнивать, используя модельные или немодельные методы, включая многомерное статистическое сравнение параметров распределения Вейлбулла или доли растворения в разных временных точках при неприемлемости фактора сходимости [99].

4.4. ВИДЫ ИСПОЛЬЗУЕМОГО ОБОРУДОВАНИЯ

4.4.1. Виды тестеров растворения

Существует три типа тестеров: с ручным отбором, полуавтоматические, автоматические. В системах с ручным отбором все операции, такие как заполнение сосудов средой растворения, отбор проб, внесение ЛП, контроль температуры и скорости вращения мешалок, выполняются вручную. Это делает данное оборудование не удобным для проведения ТСКР, особенно для ДВ I класса по БСК, где необходим частый отбор проб и добавление среды растворения. К преимуществам таких приборов можно отнести невысокую стоимость и простоту использования. В полуавтоматических системах отбор проб, мониторинг температуры, скорости вращения и времени отбора проб выполняются автоматически, внесение препаратов в сосуды, заполнение сосудов средой растворения и их мойка осуществляются вручную. В автоматических тестерах все операции выполняются автоматически [112].

В Государственной фармакопее XIII издания в ОФС 1.4.2.0014.15 «Растворение твердых дозированных лекарственных форм» описаны 3 вида тестеров растворения [20]:

1. Аппарат «Вращающаяся корзинка». Состоит из сосудов для растворения, изготовленных из инертного материала, погруженных в водяную баню (для термостатирования), корзинки, сваренной из металлической проволочной сетки, в которую помещают лекарственную форму, и двигателя, вращающего вал, на котором закреплена корзинка (рис. 4.1). Скорость вращения корзинки в тесте «Растворение» составляет 100 об/мин. Данная разновидность тестера наилучшим образом подходит для капсул и лекарственных форм, которые флотируют (всплывают) или медленно распадаются.

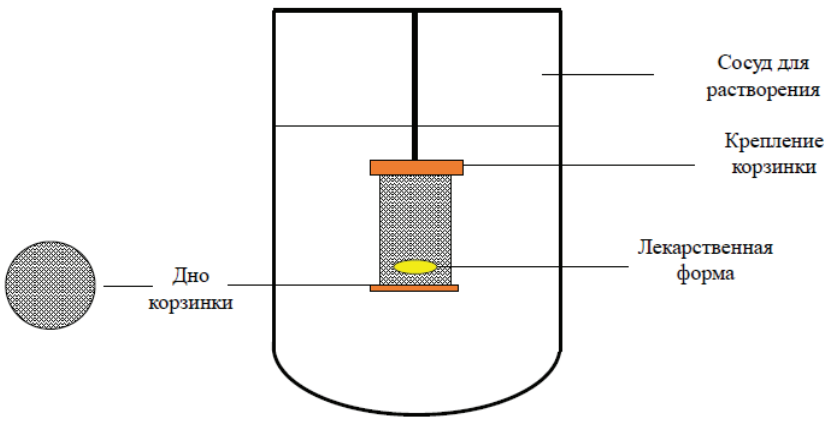


Рис. 4.1. Аппарат «Вращающаяся корзинка»

2. Аппарат «Лопастная мешалка». В качестве перемешивающего элемента используется лопастная мешалка вместо корзинки. Лекарственную форму помещают на дно сосуда (рис. 4.2). Скорость вращения «Лопастной

мешалки» в испытании «Растворение» составляет 50 об/мин во избежание избегания образования эффекта «конуса». Данный тип оборудования целесообразно использовать для оценки таблетированных лекарственных форм.

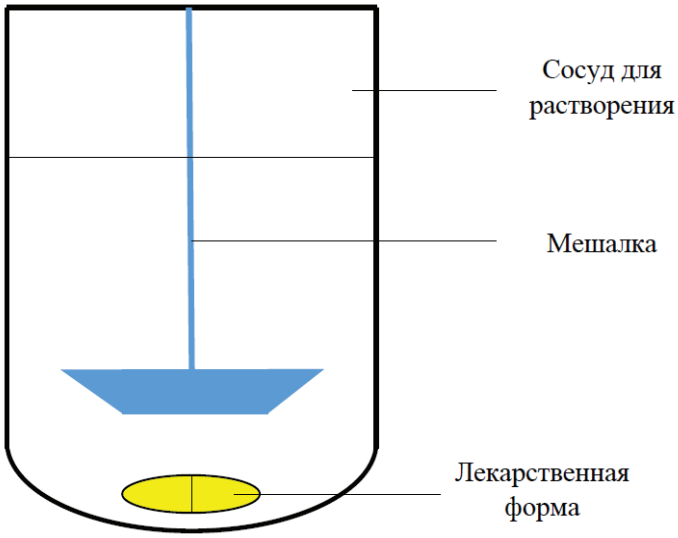


Рис. 4.2. Аппарат «Лопастная мешалка»

3. Аппарат «Проточная ячейка». Состоит из резервуара для среды растворения, проточной ячейки, установленной вертикально над фильтрующей системой (чтобы избежать утечки нерастворенных частиц), насоса с синусоидальным профилем скорости 120±10 импульсов/мин, который прокачивает среду растворения через ячейку. Проточная ячейка находится в водяной бане для термостатирования. Существуют 2 конфигурации данного аппарата: открытая – при подаче чистой среды растворения и удалении элюата (рис. 4.3), и закрытая – при рециркуляции среды растворения.

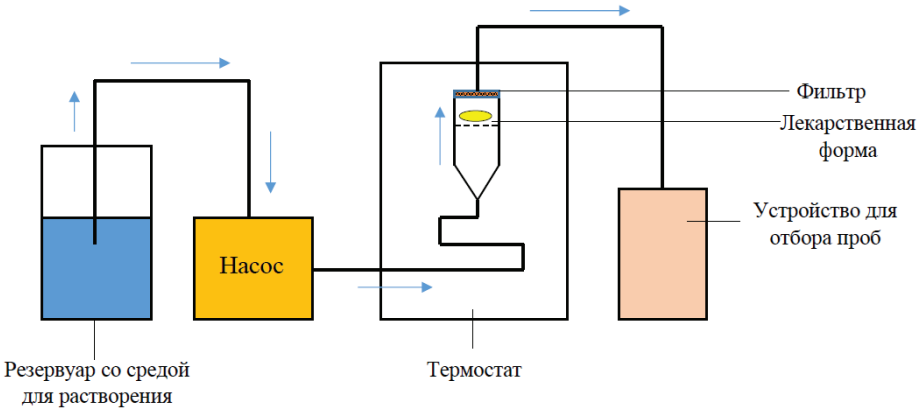


Рис. 4.3. Аппарат «Проточная ячейка» открытого типа

В Европейской фармакопее (EP) и в Американской фармакопее (USP) в ОФС описаны еще 4 вида тестеров [308, 310]:

4. Аппарат «Качающийся цилиндр» (Аппарат № 3 по USP и EP). В цилиндр, сделанный из инертного материала, сверху и снизу имеющий проволочную сетку, помещают единицу лекарственной формы и погружают в сосуд, заполненный средой растворения (рис. 4.4). При включении электродвигателя цилиндр совершает возвратно-поступательные движения с амплитудой 10±1 см.

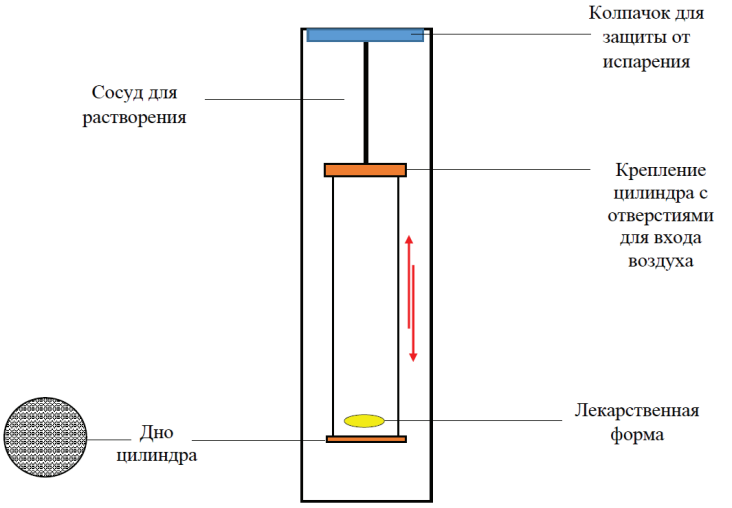


Рис. 4.4. Аппарат «Качающийся цилиндр»

5. Аппарат «Лопасть над диском» (Аппарат № 5 по USP и EP). Имеет такую же конструкцию, как и аппарат «Лопастная мешалка», но единицу лекарственного препарата на дне сосуда закрепляют с помощью диска из стальной проволоки (рис. 4.5).

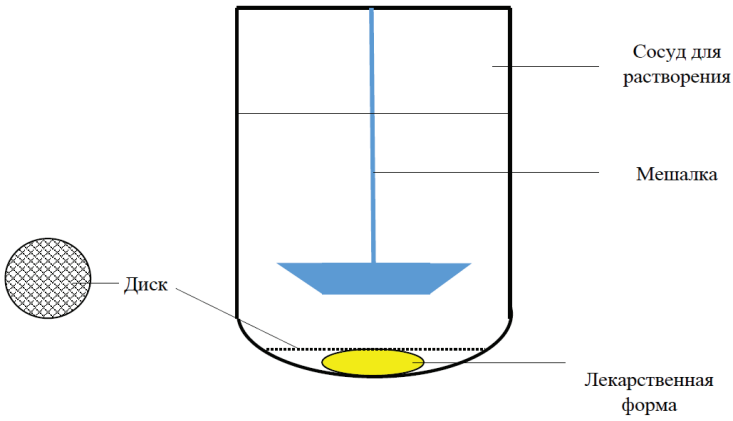


Рис. 4.5. Аппарат «Лопасть над диском»

6. Аппарат «Вращающийся цилиндр» (Аппарат № 6 по USP и EP). Является модификацией аппарата «Вращающаяся корзинка», где вместо корзинки используется цилиндр специальной формы с 4 отверстиями.

7. Аппарат «Качающийся держатель» (Аппарат № 7 по USP и EP). Является модификацией Аппарата № 4 «Качающийся цилиндр», в котором цилиндр заменен на специальный держатель. Применяется для растворения мягких лекарственных форм.

Аппараты № 5 и № 6 находят широкое применение в анализе трансдермальных терапевтических систем. Они также включены в ГФ XIII в ОФС 1.4.2.0017.15 «Растворение трансдермальных пластырей» для контроля качества данных лекарственных форм [20].

4.4.2. Методы анализа проб в тесте «Растворение» и ТСКР

Для анализа проб в тесте «Растворение» и ТСКР используют хроматографию, титрование, спектрофотометрию и, реже, флюориметрию.

Хроматография – это физико-химический метод анализа, основанный на разделении компонентов смеси за счет их различия в скорости их перемещения в системе несмешивающихся неподвижной и подвижной фаз с последующим их детектированием [108]. В большинстве аналитических методик, используемых для теста растворения твердых лекарственных форм, применяется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). ВЭЖХ – является разновидностью хроматографии, где в качестве подвижной фазы используется жидкость, а в качестве неподвижной – сорбент с привитой органической фазой, состоящий из частиц мелкого размера. Современный ВЭЖХ-хроматограф состоит из следующих основных узлов: насоса высокого давления плунжерного типа, дегазатора, ручного или автоматического инжектора (устройства для ввода пробы), термостата колонок и детектора.

Наибольшее распространение нашел обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ. В обращенно-фазовой системе подвижная фаза (ПФ) более полярная, чем неподвижная фаза (НФ). В качестве НФ в обращенно-фазовой ВЭЖХ используются октил-, октадецил- и фенилгексилсиликагели с диаметром частиц 3 – 5 мкм, заключенные в колонку – металлическую трубку длиной от 5 до 25 см и внутренним диаметром от 2 до 4,6 мм. В качестве элюента применяются системы, состоящие из воды или водного буферного раствора и смешивающегося с водой органического растворителя, чаще всего ацетонитрила или метанола. Также в состав ПФ могут входить различные органические добавки, такие как триэтиламин, трихлоруксусная кислота или натрия лаурилсульфат. В нормально-фазовой ВЭЖХ используются цианопропильные, диольные и аминопропильные фазы, смеси гексана с хлороформом, тетрагидрофураном и спиртами применяются в качестве элюента [108, 109]. Ионообменная и эксклюзионная хроматография при ТСКР не применяются. В ВЭЖХ могут использоваться 2 режима элюирования: изократическое (с постоянным составом ПФ и градиентное) с программируемым изменением состава ПФ в течение анализа. Для детекции компонентов применяются спектрофотометрические и диодно-матричные, реже флюориметрические детекторы.

К примеру, в Фармакопее США количественное определение алпразолама, лизиноприла, микофенолата мофетила в средах растворения рекомендовано проводить методом ВЭЖХ-УФ, а для анализа дроспиренона допускается использование флюориметрического детектора [310].

Ультраэффективная жидкостная хроматография (УЭЖХ) представляет собой вариант ВЭЖХ, отличающийся большей производительностью. В УЭЖХ применяются короткие колонки от 30 до 100 мм в длину, от 1 до 3 мм в диаметре и диаметром частиц от 1,6 до 2,7 мкм и детекторы с высокой частотой сбора данных (около 100 Гц). При этом давление в хроматографической системе достигает 80–120 МПа. Оборудование, предназначенное для УЭЖХ, может использоваться и в классическом варианте ВЭЖХ [10].

Также встречаются методики анализа с применением ***газожидкостной хроматографии (ГЖХ)***. В данном методе в качестве ПФ используется инертный газ (азот, водород или гелий) в качестве НФ – пленка высококипящей жидкости, нанесенная на твердый инертный носитель (стенки капиллярной колонки). Разделение компонентов происходит за счет многократного установления равновесия между подвижной и стационарной фазами, обусловленное многократным повторением процессов растворения веществ и их испарения. Для разделения используются полярные и неполярные колонки. В тех случаях, когда аналитами являются высокополярные вещества (например, низшие спирты и кислоты), используются полярные колонки с НФ на основе полиэтиленгликоля или его сополимеров. При анализе веществ, обладающих низкой полярностью (например, углеводороды и эфиры), используются неполярные фазы на основе диметилполисилоксана. Соединения, обладающие относительно невысокой полярностью (например, ароматические соединения), анализируют с применением фаз на основе диметилполисилоксана с включением определенного процента фенильных групп.

Основными частями газожидкостного хроматографа являются регулятор расхода газа-носителя, испаритель, в котором происходит испарение компонентов пробы, термостат (печь), способный контролируемо набирать и удерживать температуру до 350 – 400 °С, в котором располагается хроматографическая колонка, и детектор. Существует два варианта ввода пробы: жидкофазный, который используется для анализа труднолетучих соединений, и парофазный – для анализа легколетучих веществ. В жидкофазном варианте проба вводится с использованием хроматографического шприца вручную или с помощью автосемплера через самоуплотняющуюся мембрану (септу) в испаритель. В парофазном варианте точное количество анализируемого раствора переносят в специальную плотно закрывающуюся виалу и помещают в парофазный пробоотборник (head-space). В нем виала термостатируется, через определенное время в ней устанавливается равновесие между жидкостью и газовой фазой, затем происходит отбор газовой фазы и проба через испаритель попадает в хроматографическую колонку. При ТСКР, исследованиях фармакокинетики и биоэквивалентности используется, как правило, жидкофазный вариант ввода.

Для анализа лекарственных препаратов методом ГЖХ обычно применяют пламенно-ионизационный детектор (ПИД). Принцип действия данного детектора основан на том, что элюент, смешиваясь с потоком водорода, по-

падает в горелку, где компоненты пробы ионизируются в пламени. Затем ионизированные частицы заполняют межэлектродное пространство, сила тока резко увеличивается, что приводит к формированию сигнала [94].

Метод ГЖХ используют для количественного определения амантадина и пропоксифена в среде растворения [310].

Спектрофотометрия (СФМ) – абсорбционный оптический метод анализа, основанный на поглощении исследуемым веществом монохроматического света в ультрафиолетовой (УФ) или видимой областях спектра. Количественной характеристикой данного метода является оптическая плотность, величина которой подчиняется закону Бугера – Ламберта – Бера:

$D = E^{1\%}_{1\text{см}} * C * l$, где

D – оптическая плотность;

$E^{1\%}_{1\text{см}}$ – удельный показатель поглощения, величина которого равна оптической плотности 1 % раствора вещества при толщине поглощающего слоя 1 см – зависит от природы вещества, является показателем подлинности;

C – концентрация вещества, %;

l – толщина кюветы поглощающего слоя (кюветы).

Качественной характеристикой в данном методе является УФ-спектр – зависимость оптической плотности от длины волны. Количественное определение обычно проводят в максимумах поглощения.

Основными частями спектрофотометра являются: источник излучения, диспергирующая призма и щель для выделения полосы длин волн (монохроматор), которые позволяют выделить монохроматическое излучение в области от 190 до 800 нм, кюветы для образцов, фотоэлементы и регистрирующее устройство. Различают две конфигурации данных приборов: однолучевые, при работе на которых сначала измеряют оптическую плотность раствора сравнения (растворителя пробы), а затем самой пробы, и двухлучевые, в которых световой поток разделяется на два пучка и одновременно сравниваются оптическая плотность раствора образца и раствора сравнения, что делает анализ более точным. Проведение теста ТСКР требует анализа большого количества образцов, поэтому целесообразно использовать модификацию спектрофотометра с проточной кюветой.

Преимуществами метода СФМ является высокая производительность (время одного анализа – несколько секунд), простота в использовании и относительная дешевизна оборудования. Недостатками метода являются невозможность анализа веществ, непоглощающих в УФ и видимой областях спектра, и отсутствие разделения компонентов пробы, что делает затруднительным анализ многокомпонентных смесей [20, 94].

С помощью СФМ проводят количественное определение большого количества лекарственных веществ в средах растворения: например, пентоксифиллина, омепразола, флуоксетина [310].

Титриметрия – химический метод количественного определения, основанный на добавлении раствора с известной концентрацией к раствору с неизвестной концентрацией до точки эквивалентности. По типу химической реакции различают кислотно-основное (реакции нейтрализации), окислительно-восстановительное, осадительное и комплексонометрическое титрование; по

способу различают прямое (определяемое вещество непосредственно титруют раствором титранта), косвенное (титруют продукт реакции определяемого вещества) и обратное (титруют непрореагировавшего вещества, которое прибавлено в избытке к анализируемому раствору). Определение точки эквивалентности может проводиться визуально – по смене окраски раствора или осадка (есть индикаторный и безиндикаторный вариант), и с помощью инструментальных методов: потенциометрии (по изменению pH раствора), кондуктометрии (по изменению электропроводности), амперометрии (по изменению силы тока).

Измерения данным методом можно проводить как вручную, так и с помощью полуавтоматических и автоматических титраторов. Полуавтоматические приборы позволяют автоматически дозировать титрант в определенном объеме и с определенной скоростью, а автоматические также могут самостоятельно фиксировать точку эквивалентности.

К преимуществам данного метода можно отнести отсутствие необходимости в специальном оборудовании. К недостаткам метода можно отнести высокую погрешность измерений, низкую селективность, субъективность определения точки эквивалентности при визуальном способе индикации [121].

Данным титриметрии проводят количественное определение, например, кальция лактата, ацетилсалициловой кислоты в средах растворения [310].

Флюориметрия **–** это эмиссионный метод анализа, основанный на измерении вторичного излучения, возникающего при облучении вещества монохроматическим светом. Явление флюоресценции заключается в том, что молекула вещества при поглощении электромагнитной энергии переходит в возбужденное состояние и через некоторое время излучает избыточную над тепловой энергию в виде кванта света. Флюориметр состоит из следующих частей: источника излучения, первичного светофильтра, выделяющего из спектра необходимую длину волны для возбуждения, кюветы с определяемым веществом, вторичных светофильтров, для выделения из спектра испускания длины волны эмиссии, фотоэлемента и регистрирующего устройства. При этом источник излучения и первичный светофильтр находятся под прямым углом по отношению к вторичному светофильтру и фотоэлементу. Качественной характеристикой вещества в данном методе является спектр испускания, который является примерно симметричным спектру поглощения (правило Левшина), но при этом всегда сдвинут в сторону больших длин волн (правило Стокса-Ломмеля). Количественной характеристикой в методе флюориметрии является интенсивность излучения, которая зависит от концентрации вещества, растворителя, величины pH и присутствия в растворе посторонних примесей. Данный метод является в 10 – 100 раз чувствительней спектрофотометрии, но способностью к флюоресценции обладает ограниченный спектр веществ [121].

Согласно Фармакопее США с помощью флюориметрии проводят количественное определение, например, бромокриптина мезилата, эрготамина тартрата и малеата в средах растворения [310].

Количественное определение АФС в средах растворения можно осуществлять и с помощью других фармакопейных методов, таких как капиллярный электрофорез, сверхкритическая флюидная хроматография, атомно-абсорбционная спектрометрия (например, для препаратов стронция или кальция). Однако при этом потребуется полная валидация аналитической методики.

4.5. ТРЕБОВАНИЯ К ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА В СРЕДЕ РАСТВОРЕНИЯ

Согласно ГФ XIII валидация аналитической методики определения действующего вещества в тесте «Растворение» проводится по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитическая область. При необходимости проводится испытание по показателю устойчивость (робастность).

Специфичность – это способность аналитической методики достоверно определить анализируемое вещество в присутствии других компонентов образца – вспомогательных веществ, примесей, промежуточных продуктов синтеза и др. [10].

Специфичность считается доказанной, если ни используемая среда растворения, ни компоненты матрикса (плацебо) не влияют на достоверность результатов. При использовании в качестве метода анализа СФМ необходимо сравнить оптическую плотность раствора плацебо и стандартного образца в среде растворения. Данное соотношение не должно превышать 2 % [94]. При использовании ВЭЖХ на хроматограммах раствора плацебо не должно быть посторонних пиков в области выхода лекарственного вещества. Для ТСКР специфичность необходимо оценивать на всех используемых средах.

Линейность – способность методики давать результаты, прямо пропорциональные концентрации вещества в пробе. Для теста «Растворение» она подтверждается в диапазоне концентраций от 50 % до 120 % от ожидаемой концентрации действующего вещества в среде растворения. При этом анализируется не менее 5 концентраций, причем результаты для каждой концентрации получают путем вычисления среднего значения как минимум из 3-х анализов. Полученные результаты обрабатывают методом наименьших квадратов с использованием линейной модели. Далее рассчитывают коэффициент корреляции калибровочной кривой, который должен отвечать условию линейной зависимости $r \geq 0.99$ [20]. При изучении кинетики растворения линейность определяют в диапазоне ±20 % от ожидаемого диапазона профиля растворения [237].

Прецизионность – показатель, характеризующий степень близости между серией измерений, полученных при анализе однородного образца в определенных условиях. Данная характеристика может оцениваться в 3-х вариантах: сходимость, промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность и воспроизводимость.

Сходимость (повторяемость) – оценивается по независимым результатам, полученным в одинаковых условиях в одной лаборатории (один исполнитель, одно оборудование, один набор реактивов и т. д.) в пределах короткого промежутка времени. Согласно ГФ XIII [20] проводится не менее 3-х определений для каждого из 3-х уровней концентраций (нижнего, среднего и верхнего), лежащих в пределах аналитической области методи-

ки, или не менее 6 определений для образцов с содержанием определяемого вещества в среде растворения, близким к номинальному. Критерием оценки служит величина относительного стандартного отклонения (RSD, %) (или коэффициента вариации CV, %), которая не должна превышать 2 % [310]. Также, согласно ICH Q2 R1 «Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology», в отчете по валидации приводят величины стандартного отклонения и доверительный интервал.

Для подтверждения того, что методика обеспечивает получение согласующихся результатов независимо от изменений внешних обстоятельств (разные аналитики, разные дни, разное оборудование) при условии однородности исследуемой пробы проводится исследование *промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности*. Согласно ГФ XIII [20] определение данного показателя не является обязательным. *Воспроизводимость* оценивается при проведении испытаний в разных лабораториях.

Правильность (точность) – показатель, характеризующий степень близости полученных результатов к истинному значению. Правильность подтверждается путем анализа стандартных образцов или модельных смесей, содержащих компоненты плацебо, с известным содержанием определяемых веществ; путем сравнения результатов с результатами, полученными с использованием ранее валидированной методики. Согласно ICH Q2 R1 [237] правильность может быть определена теоретически, если будут доказаны специфичность, прецизионность и линейность. Определение точности проводят не менее чем на 3-х уровнях концентраций, входящих в аналитический диапазон. При этом проводят не менее 3-х измерений для каждого уровня. Согласно USP [310] правильность должна находиться в диапазоне 95 – 105 % от номинальной концентрации, согласно руководству «Валидация аналитических методик для производителей лекарств» – в диапазоне 97,5 – 102,5 % от номинальной концентрации [10]. Аналитическая лаборатория вправе самостоятельно установить более жесткие критерии приемлемости и зафиксировать их в стандартной операционной процедуре по валидации аналитических методик.

Аналитическая область методики – это интервал между верхним и нижним значением концентрации определяемого вещества в объекте анализа (среде растворения), в рамках которого подтверждена линейность, правильность и внутрилабораторная прецизионность. Аналитический диапазон должен составлять ±20 % от ожидаемого диапазона профиля растворения, т. е. минимальной и максимальной ожидаемой концентрации.

Устойчивость (робастность) – способность методики сохранять свои характеристики при небольших изменениях в условиях испытаний. Для теста «Растворение» такими параметрами могут быть изменение объема и pH среды растворения, скорости вращения мешалки, способа отбора проб и т. д. [112]. Для ВЭЖХ изменяют соотношение компонентов подвижной фазы или параметры градиентной программы, pH буферного раствора, скорость потока, температуру термостат колонок, длину волны УФ-детектора, хроматографическую колонку (тип сорбента и размеры подбирают одинаковые). Для ГЖХ также можно изменить хроматографическую колонку, температурную программу и скорость потока [237].

Также при валидации методик для ТСКР целесообразно дополнительно оценить степень сорбции лекарственных веществ на фильтрах, каналах пробоотборника (перенос веществ с предыдущей пробы) [112, 135].

Таким образом, применение ТСКР имеет большое значение при регистрации воспроизведенных препаратов («Биовейвер»), разработке новых лекарственных форм, а также пострегистрационных изменениях. Для проведения данной процедуры при исследовании твердых дозированных лекарственных форм в основном используются аппараты «Лопастная мешалка», «Вращающаяся корзинка» и «Проточная ячейка». Наиболее распространенными методами анализа являются ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрия. Выбор нужного типа аппарата и аналитического оборудования осуществляется на основании данных частной фармакопейной статьи на препарат. Все методики для количественного определения лекарственных веществ в среде растворения должны быть валидированы согласно требованиям ГФ XIII [20] и других фармакопей [308, 310], документам ICH [237] и руководствам по валидации [10]. Это гарантирует получение точных результатов измерений и, как следствие, качество воспроизведенных препаратов.

5. КРИТЕРИИ ВЫБОРА ЗДОРОВОГО ДОБРОВОЛЬЦА

Согласно Методическим рекомендациям по оценке биоэквивалентности лекарственных средств в исследованиях биоэквивалентности принимают участие здоровые добровольцы, за исключением психотропных и средств, применяемых при ВИЧ-инфекции, которые исследуются на пациентах [73], хотя и в данном пункте бывают исключения. Понятие «здоровье» является многокомпонентным состоянием. Так, согласно ВОЗ, здоровьем является состояние полного физического, душевного и социального благополучия, а не только отсутствие болезней и физических дефектов [86]. В клинических исследованиях не удается в полной мере выдерживать все критерии понятия здоровья при включении добровольцев в исследование. Если физические и душевные аспекты можно определить с помощью сбора анамнеза, физиикального осмотра, лабораторных и инструментальных методов, то социальное благополучие состояние неоднозначное и не имеет четких критериев. Следовательно, с учетом определения ВОЗ, называя добровольцев в клинических исследованиях «здоровыми», мы сознательно опускаем элемент социального благополучия.

Вследствие этого в клинических исследованиях четко прописывается данный аспект: добровольцам, принимающим участие в исследованиях биоэквивалентности, должен быть поставлен верифицированный диагноз: «здоров» по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования. Таким образом, социальный аспект не учитывается, что целесообразно, т. к. за участие в исследованиях биоэквивалентности полагается денежное вознаграждение, поэтому лица, принимающие в них участие, довольно часто не имеют полного социального благополучия.

В целом критерии включения для исследования добровольца очерчивают рамки понятие здоровья добровольца и, следовательно, его пригодности для участия в них. Основные критерия включения для исследований биоэквивалентности:

1. Возраст 18 – 45 лет;

2. Верифицированный диагноз: «здоров» по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования;

3. ИМТ 18,5–24,9 кг/м^2 по весо-ростовому индексу Кетле;

4. Для женщин – отрицательный тест на беременность и согласие придерживаться адекватных методов контрацепции; в случае использования гормональных контрацептивов они должны быть отменены не менее чем за два месяца до начала исследования.

Нижний возрастной предел – 18 лет связан с юридическим аспектом, т. к. человек при достижении 18-летнего возраста не является ребенком и может самостоятельно от своего имени подписывать документы. Верхний возрастной предел – 45 лет связан с соматическим состоянием, имеется в виду тот факт, что до 45 лет риск наличия хронических заболеваний значительно ниже, чем после достижения этой цифры. Также кинетика препаратов может меняться после 45 лет.

В протоколах клинических исследований устанавливаются относительные цифры показателя ИМТ 18,5–24,9 кг/м^2, указывающие на нормальную массу тела человека. Однако тенденция последних лет заключается в том, что верхняя граница чаще увеличивается до 30,0 кг/м^2, это связано с большим количеством людей, имеющих повышенную массу тела, однако еще не достигших уровня ожирения.

Соблюдение контрацепции во время проведения исследования является безопасностью для плода. Часто в протоколах также указывается о необходимости соблюдения контрацепции и мужчинами во время проведения исследования.

Критерии, наличие которых не позволяет включить добровольца в исследование, также могут описывать состояние соматического здоровья, либо выявлять факторы, которые могут повлиять на кинетику исследуемых препаратов, либо они могут быть направлены на сохранение здоровья добровольца:

1. Отягощенный аллергологический анамнез;
2. Лекарственная непереносимость;
3. Хронические заболевания сердечно-сосудистой, бронхолегочной, нейроэндокринной системы, а также заболевания желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови;
4. Хирургические вмешательства на желудочно-кишечном тракте (за исключением аппендэктомии), на мочевыводящих путях, а также другие вмешательства, которые могут изменить фармакокинетику;
5. Острые инфекционные заболевания менее чем за 4 недели до начала исследования;
6. Регулярный прием лекарственных средств, в т. ч. безрецептурных лекарственных препаратов, БАДов, витаминов и травяных сборов менее чем за 2 недели до начала исследования;
7. Прием лекарственных средств, оказывающих выраженное влияние на гемодинамику, функцию печени и др. (барбитураты, омепразол, циметидин и т. д.), менее чем за 30 дней до начала исследования;
8. Донорство (450 мл крови или плазмы и более) менее чем за 2 месяца до начала исследования;
9. Прием более чем 10 ед. алкоголя в неделю (1 ед. алкоголя эквивалентна пол-литра пива, 200 мл вина или 50 мл спирта) или анамнестические сведения об алкоголизме.

Если первые 5 пунктов направлены на выявлении состояний, отклоняющихся от понятия «здоровье», то остальные пункты касаются возможного влияния на кинетику препарата и на сохранение соматического здоровья добровольца. Донорство, участие в исследованиях связаны с забором крови добровольца, поэтому необходимо наличие временного промежутка между этими процедурами и повторным участием добровольца в исследовании, с целью соблюдения максимальной безопасности добровольца.

В исследованиях, где изучается фармакокинетика препаратов, имеющих почечный путь выведения, целесообразно также анализировать клиренс креатинина и его параметры, не укладывающиеся в нормальные показатели, следует указывать в критериях невключения.

Достаточно часто в критериях «невключения» для исследований препаратов, оказывающих влияние на гемодинамику, указываются границы АД и ЧСС более узкие, по сравнению с общепринятыми нормами. Это связано со стремлением обеспечить большую безопасность добровольца и лучшую переносимость препарата.

Критерии включения и критерии, которые не позволяют принимать участие добровольцу, оцениваются врачами по результатам опроса, анамнеза, физиикального осмотра, инструментальных и лабораторных методов исследования.

В некоторых случаях, когда препарат может причинить вред или, согласно инструкции по применению, не может применяться у лиц моложе среднего возраста, в протоколах клинического исследования указывается нижний возрастной предел 45 лет. Такие меры направлены на снижение риска развития нежелательных явлений и причинения вреда добровольцу.

К препаратам, для исследованиях которых нижний возрастной предел составляет 45 лет, можно отнести средства для лечения аденомы предстательной железы, нейролептики, гормональные препараты, предназначенные для лечения женщин, находящихся в менопаузе, либо наличие менопаузы необходимо для отсутствия эндогенного аналита. Например, частота возникновения дистонических реакций на арипипразол (нейролептик) в 15 раза выше у лиц до 35 лет, чем у пациентов в возрасте 60 – 80 лет. Поэтому в исследования биоэквивалентности арипипразола рекомендуется включать добровольцев старше 45 лет [179].

В этом случае возникает трудность поиска здорового добровольца, т. к. в данной возрастной когорте людей резко увеличивается заболеваемость, в том числе онкологическими заболеваниями [35].

В 2013 году уровень заболеваемости лиц, достигших пожилого возраста, составлял 208 228,9 человека на 100 тыс. человек населения, что в 1,3 раза превышает аналогичный показатель по населению страны в целом (161 061,8 человека на 100 тыс. человек населения) [102].

Таким образом, понятие «здоровье» носит в клинических исследованиях более узкий смысл, нежели в определении ВОЗ. Оно охватывает соматический и психический аспект, сознательно опуская социальный, что не может являться недоработкой, а обусловлено отсутствием необходимости учета социального аспекта при проведении исследований биоэквивалентности.

6. ОСНОВЫ ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВА В ОБЛАСТИ ЭТИКИ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. ПОЛУЧЕНИЕ ИНФОРМИРОВАННОГО СОГЛАСИЯ

Необходимость клинических исследований не вызывает сомнения, но при их планировании и реализации необходимо разрешить две, зачастую, плохо совместимые задачи: получение обоснованных доказательств эффективности медицинского вмешательства и отсутствие риска для участников эксперимента. Для клинициста однозначно и четко регламентирует взаимоотношения пациента, исследователя и лечащего врача при проведении медицинского исследования с участием людей Хельсинкская декларация всемирной медицинской ассоциации (WMA). В течение длительного времени этот аспект биомедицинской деятельности регулировался только моральными установками конкретного клинициста. Первым юридическим документом, регулирующим проведение экспериментов с участием людей, был изданный в 1900 году в Пруссии указ, содержащий инструкции для руководителей клиник. В 1903 году А. Моль в фундаментальной работе «Врачебная этика» отмечал, что рано или поздно клинические нововведения будут применяться на больных людях и при этом нужно получить их согласие на медицинские опыты. Он считал, что предпочтительнее проводить эксперименты на людях интеллигентных и лучше медиках. В 1914 году Верховный суд США поддержал определение о том, что хирург, выполняющий операцию без согласия больного, совершает «физическое насилие, по которому он обязан возместить ущерб». В 1938 году в США был принят закон о пищевых продуктах, лекарствах и косметических средствах, согласно которому ни один лекарственный препарат не мог быть разрешен к применению без разрешения Управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) [111].

Современная мировая история этической экспертизы медицинских исследований начинается с Нюрнбергского кодекса (1947), разработанного для Нюрнбергского военного трибунала в качестве стандарта, на основании которого проводили судебные заседания в связи с экспериментами на людях, осуществленными нацистами. Документ провозгласил неотъемлемость добровольного согласия испытуемого на участие в эксперименте и регламентировал основные принципы проведения исследования, права и обязанности сторон. В 1963 году Британская медицинская ассоциация объявила об ответственности врача за проведение эксперимента. В 1964 году в Хельсинки на 18-й Генеральной ассамблее Всемирной медицинской ассоциации была принята декларация «Рекомендации для врачей по проведению биомедицинских исследований с участием человека в качестве объекта исследования». Страны Европы, Австралия, Япония приняли соответствующие законы для своих государств на основе данной декларации. В 1977 году в США был принят свод положений, в соответствии с которыми проводятся современные клинические испытания (Good Clinical Practice). В Россий-

ской Федерации подобные инициативы появились на рубеже XXI века (ОСТ 42–511–99 «Правила проведения качественных клинических исследований в РФ» от 29.12.1998 г., 19.06.2003 г. приказ «Об утверждении правил клинической практики в РФ» в соответствии с Федеральным законом «О лекарственных средствах» от 22.06.1998 г.) [56].

Проблемой этического и правового регулирования биомедицинских исследований занимается целый ряд международных организаций. Это ООН, ЮНЕСКО, ВОЗ, Совет Европы, Европейский Союз, ВМА, Международный совет медицинских научных обществ (CIOMS) и другие. Принятые этими организациями документы играют важную роль в определении норм и правил биомедицинских исследований. Защите прав испытуемых посвящена работа Комитетов по Этике (КЭ) различных стран, одобряющих или не одобряющих медицинские, социологические, эпидемиологические, психологические и другие исследовательские проекты. Все чаще экспертизе и испытаниям по Протоколам исследований, первоначально разработанным и принятым для лекарственных средств, подвергают биологически активные добавки к пище, косметические средства, пищевые продукты, приборы и материалы, используемые в повседневной практике и в быту [7].

Международные документы:

1. Хельсинкская декларация ВМА «Этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве испытуемого», (2013). www.jama.com.
2. Дополнительный протокол к Конвенции Совета Европы о биомедицине и правах человека, касающийся биомедицинских исследований (2005).
3. Всеобщая декларация ЮНЕСКО о биоэтике и правах человека, (2005).
4. Рекомендации Совета Европы относительно исследований, проводимых на биологических материалах человеческого происхождения (2006).

Законодательство РФ в области этической экспертизы:

1. Конституция РФ.
2. Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ред. от 03.07.2016) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2017).
3. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 12 апреля 2010 г.
4. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379–2005 «Надлежащая клиническая практика», 2005.
5. Федеральный закон «О психиатрической помощи и гарантиях прав граждан при ее оказании» от 21 ноября 2011 г. № 3185-I. Статьи 11.5 и 29.
6. Приказ Министерства Здравоохранения Российской ФЕДЕРАЦИИ от 1 апреля 2016 г. № 200 н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики».

Права пациентов, участвующих в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения, отражены в ст. 43 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (с изменениями и дополнениями). В ней постулируются принципы добровольности, информированности, конфиденциальности, справедливости, гарантируется право пациенту или его законному представителю отказаться от участия в клиническом исследовании лекарственного

препарата для медицинского применения на любой стадии проведения такого исследования, ограничивает сферу исследований с участием в качестве пациентов детей. В соответствии с документом запрещается проведение клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения с участием в качестве пациентов:

1) детей-сирот и детей, оставшихся без попечения родителей;

2) женщин в период беременности, грудного вскармливания, за исключением случаев, если проводится клиническое исследование лекарственного препарата, предназначенного для указанных женщин, при условии необходимости получения информации только во время проведения соответствующих клинических исследований и принятия всех необходимых мер по исключению риска нанесения вреда ей в период беременности и грудного вскармливания, плоду или ребенку;

3) военнослужащих (за исключением некоторых случаев);

4) сотрудников правоохранительных органов;

5) лиц, отбывающих наказание в местах лишения свободы, а также лиц, находящихся под стражей в следственных изоляторах.

Допускается проведение клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения, предназначенного для лечения психических заболеваний, с участием в качестве пациентов лиц с психическими заболеваниями, признанных недееспособными в порядке, установленном законодательством Российской Федерации. Клиническое исследование лекарственного препарата в этом случае проводится при наличии согласия в письменной форме законных представителей указанных лиц [77].

Этичное применение лекарства – это применение изученного препарата с доказанной эффективностью и безопасностью:

1) по разрешенным показаниям;

2) у пациента соответствующего возраста (разрешенное для применения в педиатрии);

3) в рекомендуемой (разрешенной дозе);

4) в рекомендуемой (разрешенной у детей) лекарственной форме

5) получив информированное согласие пациента.

Клиническое исследование с участием детей может рассматриваться как этически приемлемое, если:

1) ожидаемая польза от исследования превышает потенциальный риск, а потенциальный риск является минимальным;

2) исследователь обладает достаточной информацией о любых возможных неблагоприятных последствиях исследования;

3) испытуемым и их законным представителям предоставлена вся информация, необходимая для получения их осознанного и добровольного согласия.

В соответствии с Федеральным Законом РФ [74] «Об обращении лекарственных средств» этическую экспертизу проводит Совет по этике Минздрава России, который действует в целях защиты жизни, здоровья и прав пациентов, принимающих участие в клинических исследованиях лекарственных препаратов, в том числе и воспроизведенных (дженериков) [77]. Этической экспертизе подлежат следующие документы: протокол изучения

дженерика, брошюра исследователя, информационный листок пациента с формой информированного согласия [69]. Там же прописано требование получения одобрения каждого клинического исследования федеральным органом – Министерством здравоохранения, в рамках которого работает Комитет по этике, а также курация исследований в локальных этических комитетах по месту их проведения (больницы, исследовательские центры, университеты, академии, институты и т. д.). Локальный этический комитет проводит этическую экспертизу планируемого клинического исследования, глубину и качество предоставляемой пациенту информации, одобряет начало исследования, а затем в течение всего срока проведения наблюдает за его ходом, оперативно реагирует на сообщения о серьезных нежелательных явлениях, отклонениях от протокола и сообщениях о форс-мажорных обстоятельствах, произошедших с больными-субъектами исследования, при необходимости инспектирует исследовательские центры, реагирует на обращение граждан.

Комитеты по Этике (КЭ) в своей деятельности должны руководствоваться принципами независимости, компетентности, плюрализма, справедливости и прозрачности. КЭ являются в настоящее время структурами, в поле зрения которых скрещиваются научные интересы, медицинские факты и нормы морали и права. Они осуществляют функции экспертизы, консультирования, рекомендаций, побуждения, оценки, ориентирования в этических и правовых вопросах клинических и иных исследований. Они работают для того, чтобы в исследованиях были гарантированы все возможные меры предосторожности и нормы безопасности добровольцев клинических исследований, а также являются гарантами этичности деятельности исследователей [117].

Клинические исследования лекарственных препаратов I фазы проводятся на здоровых добровольцах или на пациентах (некоторые лекарственные препараты могут причинить вред здоровым добровольцам и изучаются на пациентах). Клинические исследования дженериков в основном проводятся в виде оценки биоэквивалентности дженерика и оригинального препарата, зарегистрированного в РФ с участием здоровых добровольцев (волонтеров) [79]. Оценка биоэквивалентности противоопухолевых и ряда психотропных препаратов, а также некоторых средств, применяемых для лечения ВИЧ-инфекции, проводится с участием пациентов соответствующего заболевания. Протокол клинических исследований в виде биоэквивалентности должен быть составлен в соответствии с рекомендациями, касающимися данного вида исследований. Задачей этической экспертизы протокола является оценка безопасности проведения исследований биоэквивалентности для здоровых добровольцев (волонтеров). В настоящее время в зарубежных материалах здоровые добровольцы (волонтеры) рассматриваются как бессимптомные пациенты. Необходимо оценивать не только состояние здоровья добровольца при включении его в клиническое исследование биоэквивалентности препаратов, но и обращать внимание на анамнез каждого добровольца. Неэтично включать в исследование волонтера, если в его анамнезе были заболевания, последствия которых являются противопоказанием к применению оригинального препарата, поскольку это может быть небез-

опасно для человека. Кроме того, неэтично проводить изучение биоэквивалентности на волонтерах одного пола, если препарат применяется у лиц другого пола [12, 83].

Очень важным с точки зрения этики является включение в протокол клинических исследований вопроса о контрацепции. Если оригинальный препарат имеет противопоказание «беременность», то в клиническом исследовании биоэквивалентности дженерика участие женщин с сохраненной функцией деторождения находится в зоне особого внимания этических комитетов и разрешается при обосновании необходимости включения данного контнгента. Кроме того, следует предупредить женщин с сохраненной функцией деторождения о необходимости использовать контрацепцию во время клинических исследований и после окончания участия в клиническом исследовании на срок, определенный протоколом исследования. Если у исследуемого препарата известны эмбриотоксические или тератогенные свойства, то необходимо рекомендовать женщинам применение нескольких видов контрацепции. Длительность использования контрацепции в этих случаях должна определяться полным выведением препарата из организма женщины. В том случае, когда у исследуемого препарата описано отрицательное влияние на сперматогенез, необходимо предупреждать добровольцев-мужчин о необходимости соблюдения методов контрацепции не только участником клинического исследования, но и его партнершей. Все это должно быть изложено в протоколе исследования по биоэквивалентности в разделе «Критерии включения», а также в информационном листке с формой информированного согласия. Если препарат обладает фотосенсибилизирующим действием, то это также необходимо отметить в протоколе исследования [137].

В брошюре исследователя должны быть изложены все имеющиеся сведения об оригинальном препарате, который взят в качестве препарата сравнения. Особое значение с этических позиций имеют сведения о побочных эффектах препарата. Особенно тщательной этической экспертизе подвергается «Информационный листок для пациента». Этот документ оформляется в письменном виде в двух экземплярах. Его подписывает участник клинического исследования лекарственного средства или его законный представитель. Один экземпляр информационного листка выдается участнику исследования, а другой хранится в документах исследователя. При оценке биоэквивалентности лекарственных препаратов, предназначенных для лечения психических заболеваний, с участием в качестве пациентов лиц с психическими заболеваниями, признанных недееспособными в порядке, установленном законодательством Российской Федерации, информационный листок подписывает законный представитель указанных лиц. Оказание медицинской помощи в рамках клинической апробации запрещается с участием в качестве пациентов: лиц, страдающих психическими расстройствами, за исключением случаев, если соответствующие методы предназначены для лечения психических заболеваний [75].

Информационный листок должен быть составлен на родном языке добровольца в доступной для понимания форме и содержать полную информацию об оригинальном препарате, взятом в качестве сравнения при оценке

биоэквивалентности дженерика. Особое внимание участника исследования должно быть обращено на вопросы контрацепции, если в брошюре исследователя имеются указания на повреждающее действие препарата сравнения на репродуктивную функцию. Если у препарата отмечено фотосенсибилизирующее действие, то доброволец должен быть предупрежден о необходимости избегать прямых солнечных лучей во время исследования [24].

Участник любого клинического исследования должен быть застрахован, о чем также необходимо указать в информационном листке. В этот документ должно быть внесено предупреждение о том, что участие в клиническом исследовании может нарушить условия имеющегося у добровольца добровольного медицинского страхования (ДМС) и лишить его права получения медицинской помощи в рамках ДМС. В связи с этим, если у добровольца есть действующий полис ДМС, ему необходимо изучить условия страхования и ознакомиться с имеющимися в них ограничениями. Сведения об обязательном страховании должны быть представлены в соответствии с Постановлением правительства № 714 от 13.09.2010 г. Оригинал страхового полиса, а также условия страхования (если предусмотрено полисом) должны выступать в качестве обязательного приложения к информационному листку пациента, в котором должна содержаться информация о выдаче пациенту экземпляра полиса страхования, а также индивидуальный идентификационный код участника клинического исследования. В информационном листке должно быть указано, что добровольцам полагается вознаграждение за участие в исследовании биоэквивалентности и даны координаты Комитета по этике. Информированное согласие должно быть изложено от первого лица добровольца, подписано им собственноручно и входить в информационный листок в качестве единого документа [117].

В 1964 году в Хельсинки на 18 Генеральной ассамблее Всемирной медицинской ассоциации была принята декларация «Рекомендации для врачей по проведению биомедицинских исследований с участием человека в качестве объекта исследования». Первый пересмотр декларации состоялся в 1975 году, когда после большого количества выявленных нарушений этических принципов Всемирная медицинская ассоциация внесла требование о необходимости предварительного утверждения протокола клинического испытания независимым этическим комитетом и соблюдении правил Хельсинской декларации как одного из обязательных условий публикации результатов исследования [123]. Поправки, внесенные в последнюю версию Хельсинской декларации, являются не столько радикальными, сколько отражающими современные взгляды и терминологию клинических испытаний. Основная масса изменений представляет собой определенные нюансы, уточняющие существующие стандарты. Самым глобальным с практической точки зрения является требование по созданию открытого регистра испытаний, поскольку оно определяет необходимость в пересмотре организации многоцентровых исследований и прежде всего связано с конфиденциальностью результатов клинического испытания, что крайне важно для спонсора. Кроме того, они отражают наметившуюся в последние годы тенденцию к смещению акцентов от безоговорочного доминирования индивидуального здоровья и прав испытуемых к более полноценному учету общества и по-

пуляций. Например, озвучена необходимость обеспечения доступа к участию в исследованиях представителей популяций, недостаточно представленных в них. К основным целям проведения медицинских исследований добавлены и эпидемиологические – понимание причин развития и эффектов заболевания не только по отношению к испытуемым, но и по отношению к обществу. Еще одной существенной поправкой можно назвать смягчение требований к этическим комитетам действовать в соответствии с законодательством той страны, где проводится исследование. Рекомендуется принимать во внимание местную нормативно-правовую базу и международные нормы и стандарты, только если они не уменьшают или не аннулируют защиту субъектов исследования, установленную Декларацией.

В 2000 году Декларация была существенно пересмотрена и расширена прежде всего за счет введения новой концепции ответственности исследователей и спонсоров в стремлении к получению знаний, выгодных для всего сообщества стран. В настоящее время в биомедицинские исследования вовлечены не только исследователь и пациент, но и спонсор, а зачастую и контрактная исследовательская организация. Клинические испытания проводятся крупномасштабно с вовлечением многих стран и клиник. Появляются проблемы, связанные с тем, что «богатые» страны переносят их в менее развитые, а результаты используют только у себя, так как для «бедных» стран новшества оказываются недоступными с экономической точки зрения. Для искоренения подобных несправедливостей медицинская общественность приняла ряд мер, отраженных в версии-протоколе Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине от 1999 года. Данный документ готовился в течение 5 лет и открыт для подписания 25.01.2005 г. В 2005 году Конвенцию подписала 31 стран из 46 входящих в Совет Европы. И 19 стран ее ратифицировали. Из числа ведущих стран Европы ее не подписали Великобритания, Германия и Россия. В мае 2007 года Совет Всемирной медицинской ассоциации санкционировал работу над новой версией документа, которая была принята на ее 59 Генеральной ассамблее в октябре 2008 года.

Последняя редакция Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации – важное событие в медицинском сообществе. В Хельсинкской Декларации BMA, 2013 в новой, 10 редакции документа, для удобства восприятия была введена дополнительная рубрикация с подзаголовками: «Преамбула», «Общие принципы», «Риски, осложнения и польза», «Уязвимые группы», «Комитеты по этике», «Персональные данные и конфиденциальность», «Информированное согласие», «Использование плацебо», «Гарантии по завершении исследования», «Регистрация исследований, публикация и распространение результатов», «Неапробированные вмешательства в клинической практике» [12].

Ранее Декларация содержала лишь три крупных раздела (Приложение 1). Одновременно увеличилось число параграфов до 37 (в предыдущем было 35). Текст стал более строгим: чаще стали применяться слова «обязан», «должен» вместо «следует» [128].

Особое внимание уделено уязвимым группам населения, которым необходимы различные формы защиты. Вместе с тем уязвимые группы возможно привлекать к участию в исследованиях в исключительных случаях,

если нет другого пути решения медицинской проблемы. Существенно, что исследователи обязаны обеспечить уязвимым сообществам доступ к методикам и технологиям, польза которых доказана в результате экспериментов.

Спонсоры, исследователи и правительственные структуры обязаны до начала исследования четко гарантировать его участникам доступ к вмешательствам, чья польза доказана в ходе эксперимента, и результатам исследования. О подобных обязательствах добровольцы должны быть проинформированы исследователями до начала эксперимента.

Ряд новых положений касается безопасности участников исследований и деятельности этических комитетов. В параграфе 15 указывается на необходимость обеспечивать адекватные компенсацию и лечение добровольцам, пострадавшим в результате исследований. В параграфе 17 зафиксированы обязательные меры по минимизации рисков для участников, включая постоянный мониторинг рисков в течение всей работы. Некоторые изменения коснулись документации исследований. Установлено, что «дизайн и выполнение каждого исследования с привлечением человека должны быть четко описаны в протоколе».

В требования к деятельности комитетов по этике, наряду с прозрачностью, добавлена информация о достаточной квалификации членов. Кроме того, исследователи обязаны предоставлять на рассмотрение комитетов окончательный доклад о проведенной работе по ее окончании. В параграфах о плацебо этот термин заменен на более широкое понятие «любое вмешательство, менее эффективное, чем наилучшее из доказанных, использование плацебо или отсутствие лечения» [128].

Несмотря на то что Декларация не является частью международного права, ее во многих странах, в том числе в США, при необходимости законодатели и суды признают как основополагающий документ. Тем не менее Декларация остается «моральным ориентиром», а не инструментом регулирования. Современная версия Декларации требует регистрации всех КИ до начала набора участников. Такое положение появилось вследствие того, что фармацевтические компании избирательно публиковали результаты преимущественно тех исследований, которые способствовали продвижению препарата на рынок [123]. В заключение следует отметить, что развитие клинических исследований предъявляет новые требования ко всем участникам процесса, в котором вопросы этики имеют одну из ключевых позиций.

Важнейшим аспектов в организации клинических исследований является ***получение информированного согласия.*** Основополагающим документом, определяющим этические принципы проведения биомедицинских исследований с участием людей, является Хельсинская Декларация Всемирной Медицинской Ассоциации (ВМА). Хельсинская Декларация гласит: «При проведении любого исследования с участием людей в качестве субъектов каждый потенциальный субъект исследования должен быть надлежащим образом проинформирован о целях, методах, ожидаемой пользе и возможном риске исследования, а также о неудобствах, которые могут быть вызваны экспериментом. Участники исследования должны быть проинформированы о том, что они имеют неограниченное право отказаться от участия в исследовании и в любое время взять назад согласие на участие.

Врач должен получить такое согласие – свободное и информированное – от субъекта исследования, желательно в письменном виде» [123, 316].

Добровольцы могут включаться в научное исследование только после того, как они получили полную информацию о нем и дали осознанное и добровольное согласие на участие. КЭ уделяет пристальное внимание информации для пациента и форме информированного согласия, их содержанию и процессу получения. Информированное согласие (ИС) – процесс добровольного подтверждения пациентом его согласия участвовать в том или ином исследовании после того, как он был ознакомлен со всеми аспектами исследования. Информированное согласие документируется с помощью письменно подписанной и датированной формы Информированного Согласия [212]. Говоря об ИС, хотелось бы обсудить несколько особенно важных аспектов [73]:

1) какие основные моменты должна отражать форма ИС;

2) каковы требования, предъявляемые к тексту;

3) когда и как получать ИС;

4) какие действия следует предпринять при внесении изменений или поправок в тексте ИС, возникающих в ходе исследования;

5) каковы требования к ИС для пациентов, относящихся к особо уязвимому контингенту (дети, беременные, военнослужащие, лица с когнитивными нарушениями, пожилые и т. д.).

ИС должно быть составлено в соответствии с законами страны, где проводится клиническое исследование, правилами GCP и принципами Хельсинкской Декларации ВМА. Форму ИС для конкретного клинического испытания составляет тот, кто инициирует клиническое исследование (фирма-спонсор, врач-исследователь и т. д.). Правильно составленное ИС должно содержать в себе следующие разделы:

1) положение о том, что предполагает проведение научного исследования;

2) цели клинического испытания;

3) показания, противопоказания к приему препарата, его побочные действия: наиболее часто встречаемые, часто встречаемые и, возможно, остальные, написанные понятным для добровольца языком.

4) описание процедур исследования;

5) обязанности пациентов, участвующих в испытании;

6) предсказуемый риск, возможные неудобства;

7) ожидаемая польза;

8) альтернативные методы лечения (преимущества и недостатки);

9) компенсации за ущерб здоровью;

10) условия оплаты участникам за участие в исследовании (если предусмотрено);

11) возможные расходы субъекта в ходе исследования;

12) положение о добровольности участия в исследовании;

13) возможность отказа от участия в исследовании в любое время без неблагоприятных последствий;

14) конфиденциальность информации и гарантия того, что имена участников исследования не будут указаны при публикации результатов исследования;

15) возможность проведения проверок (при соблюдении конфиденциальности) представителями официальных инстанций;

16) имена и телефоны контактных лиц;

17) ожидаемая продолжительность участия в исследовании;

18) приблизительное (планируемое) количество участников исследования;

19) предупреждение о том, является ли участие в исследовании препятствием для участия в других программах.

ИС должно быть переведено на родной язык добровольца, а сотрудники компании-спонсора или(и) исследователь (если это инициативное исследование) несут ответственность за качество перевода и его соответствие оригиналу. При разработке и переводе ИС следует избегать специальных терминов и языковых сложностей, а при наличии специальных терминов, необходима расшифровка или объяснение в тексте. Шрифт формы ИС должен быть четким и крупным, разделы отделены друг от друга, важная информация выделена. Окончательный вариант ИС должен включать все необходимые содержательные элементы. ИС должна быть одобрена внутри компании-спонсора, утверждена официальными инстанциями страны, где проходит клиническое исследование и Комитетом по Этике. Очень важным моментом является время получения ИС. ИС должно быть получено до совершения любого действия, если оно:

1) выполняется для целей исследования;

2) не было бы совершено по отношению к пациенту в рамках обычной медицинской практики, например, планируется включение пациента в исследование по лечению внебольничной пневмонии, однако рентгенологическое исследование ему в любом случае будет проведено в поликлинике. В этом случае до проведения обследования ИС можно не получать, т. к. оно в рамках обычной медицинской практики.

В процессе клинического исследования могут появиться изменения в Протоколе или любая новая информация, которая может повлиять на решение пациентов продолжать участвовать в исследовании. Эти изменения могут быть связаны с необходимостью:

1. Повышения/снижения дозы препарата;

2. Увеличения/уменьшения количества инвазивных или диагностических процедур;

3. Появления новых данных о нежелательных явлениях, выявленных в ходе исследования и др.

Возникшие изменения должны быть отражены в форме ИС, а измененная форма ИС должна быть передана в КЭ с сопроводительным письмом и может использоваться только после одобрения КЭ. Копия письма в КЭ должна храниться в файле исследователя. Добровольцы, уже подписавшие форму ИС и участвующие в исследовании, должны подписать новую версию ИС, одобренную КЭ.

«Процесс получения информированного согласия больше, чем просто подписание формы, это информационный обмен, который включает в себя материалы, использовавшиеся для привлечения пациентов к участию в исследовании, документы, устные инструкции, вопросы и ответы, а также меры, помогающие пациенту лучше понять происходящее». Доброволец

должен принять решение только сам, на основании информации, содержащейся в форме ИС, и сведений, полученных от врача [275]:

1. Должен иметь достаточно времени для принятия решения и обдумывания ответов, полученных от врача на заданные вопросы, в связи с чем информацию для пациента и форму ИС потенциальный участник исследования может забрать домой для обсуждения с родственниками, лечащим врачом, юристом и т. д.;

2. Должен не только подписать, но и собственноручно датировать два экземпляра формы ИС;

3. Форму ИС подписывает и датирует исследователь после беседы с добровольцем;

4. Один экземпляр формы ИС остается у исследователя, хранится в материалах исследования, второй выдается добровольцу на руки;

5. В исходных медицинских документах необходимо сделать запись о получении ИС с указанием даты и имени лица, проводившего беседу. Если форма ИС была подписана в тот день, когда добровольцу начали проводить какие-либо исследования, форма ИС должна быть подписана ранее начала любой процедуры;

6. Если в ходе исследования была принята, одобрена КЭ и подписана добровольцем новая форма ИС, и в исследовательском центре, и на руках у добровольца остаются два варианта ИС – старый и новый.

Процесс получения ИС достаточно сложен, проблемы возникают даже у опытных специалистов, и прежде всего из-за того, что исследователи считают наиболее важной медицинскую сторону исследования, однако абсолютный приоритет в клинических исследованиях имеют правила GCP. Не уделяется должного внимания пользе участия в клиническом исследовании, риску, альтернативным методам исследования, конфиденциальности, возможности отказаться от участия в любой момент и т. д. [7].

Возможны случаи, когда доброволец или его законный представитель не могут сами прочесть текст формы ИС. Тогда во время получения ИС должен присутствовать свидетель, который должен быть независимым, т. е. не связан подчиненными отношениями с исследователем. Свидетель должен присутствовать при получении ИС, если доброволец не может сам прочесть текст ИС или доброволец относится к уязвимому контингенту (пожилые, тяжелобольные люди и т. д.). Свидетель подписывает и датирует форму ИС наряду с добровольцем и врачом-исследователем. Таким образом, выбор участвовать или не участвовать в исследованиях является персональным решением добровольца, принятым без принуждения, а задача КЭ – это квалифицированная экспертиза ИС, являющегося одним из важнейших элементов системы, гарантирующей этичность биомедицинских исследований с участием людей и соблюдение их прав.

В соответствии с принципами Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (ВМА) [123], риски исследования не должны превышать потенциальные выгоды как для субъекта, так и для общества, при этом интересы отдельных субъектов исследования всегда имеют приоритет над интересами науки и общества. Необходимость осуществления выплат здоровым добровольцам этически обусловлена отсутствием других воз-

можных преимуществ, связанных с участием в клиническом исследовании (КИ), например, получение потенциально лучшего лечения имеющегося заболевания. В редких случаях возможно осуществление выплат добровольцам, участвующим в КИ, например, если испытывается чувствительность диагностического препарата у пациентов с заранее установленным диагнозом, так как в этом случае пациенты не получают никакой пользы медицинского характера.

Несмотря на отсутствие официальной статистики, можно предположить, что чаще всего выплаты выполняются силами контрактно-исследовательских организаций (КИО), осуществляющих организацию КИ. При этом должны быть предусмотрены процедуры по сохранению персональных данных. Также возможно осуществление выплат непосредственно исследовательским центром, либо независимой компанией, привлекаемой исследовательским центром и КИО.

Осуществление выплат субъектам исследования – это комплексная задача, требующая от организаций, проводящих клинические исследования соблюдения не только требований GCP и законодательства, регламентирующего проведение КИ, но также гражданского и налогового законодательств, решения множества вопросов организационного характера. Однако необходимо помнить о том, что осуществление выплат субъектам исследований, в первую очередь, должно рассматриваться с этической точки зрения, поскольку в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации: «В то время как основная цель медицинских исследований – получение новых знаний, эта цель никогда не должна превалировать над правами и интересами отдельных субъектов исследования».

7. ОРГАНИЗАЦИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основным этапом исследований биоэквивалентности является анализ биологических жидкостей, полученных от добровольцев. Требования к проведению данного этапа строго регламентированы руководствами Администрации по пищевым продуктам и лекарственным препаратам США (FDA) и Европейского агентства по лекарственным препаратам (EMA) [214, 220, 221, 222]. В данной главе рассмотрены основные методы пробоподготовки и анализа биообъектов, приведены требования к валидации аналитических методик, проанализированы способы обсчета полученных данных и освещены основные проблемы, возникающие при биоаналитических исследованиях.

7.1. СПОСОБЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПРИ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Для пробоподготовки при исследованиях биологических объектов используется депротеинизация, жидкостно-жидкостная и твердофазная экстракция. Выбор того или иного способа осуществляется исходя из задач исследования и технического оснащения лаборатории [97, 114].

7.1.1. Депротеинизация

Депротеинизация плазмы является самым простым и быстрым способом пробоподготовки. Данный метод осуществляется за счет добавления к плазме смешивающегося с водой органического растворителя (метанола, ацетонитрила, этанола и т. п.) или раствора внутреннего стандарта в данном органическом растворителе, что вызывает коагуляцию белков. Затем проводят центрифугирование и в надосадочной жидкости определяют концентрацию лекарственных веществ [97]. Однако осаждение белков имеет ряд недостатков, таких как низкая степень очистки аналита от компонентов биологической пробы, низкая селективность и ограниченная возможность концентрирования образца. Обычно депротеинизацию применяют при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в качестве метода анализа [4, 257, 292].

7.1.2. Жидкостно-жидкостная экстракция

Жидкостно-жидкостная экстракция основана на распределении анализируемых веществ между двумя контактирующими несмешивающимися растворителями, т. е. на их различной растворимости в данных растворителях. Данный процесс подчиняется закону распределения Нернста: вещество распределяется между двумя несмешивающимися фазами таким образом, что отношение его концентраций в обеих фазах есть величина постоянная при постоянной температуре [121].

$$D = \frac{C_{орг.раств.}}{C_{вода}}$$, где

D – коэффициент распределения;

$C_{орг. раств.}$ – концентрация аналита в органическом растворителе;

$C_{вода}$ – концентрация аналита в водной фазе;

При необходимости на предварительном этапе пробоподготовки проводят осаждение белков растворами кислот (например, уксусной или трихлоруксусной кислотой) или оснований (например, раствором аммиака). Затем корректируют pH надосадочной жидкости до нужной величины: наиболее высокая степень извлечения лекарственных веществ достигается при переводе их из ионизированной формы в молекулярную. Так, препараты, являющиеся органическими основаниями, извлекают при щелочных значениях pH (pH>pKв) (рис. 7.1), а препараты, являющиеся органическими кислотами, извлекают при кислых значениях pH (pH<pKа) (рис. 7.2).

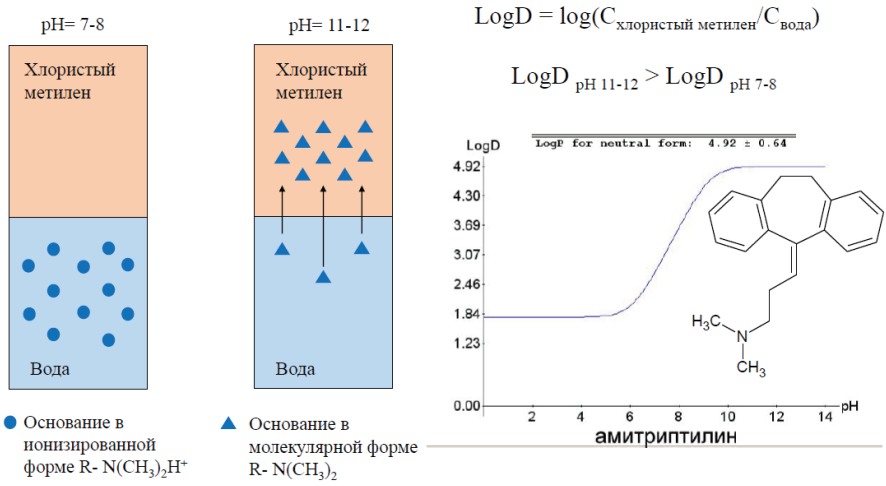


Рис. 7.1. Схема процесса экстракции органического основания – амитриптилина

В случае исследования амфотерных соединений оптимальную величину pH для перехода из водной в органическую фазу устанавливают эмпирически или с использованием компьютерных программ, рассчитывающих зависимость величины logD от величины pH. При экстрагировании лекарственных веществ, не обладающих кислотными и основными свойствами, величина pH не оказывает влияние на степень извлечения аналита, но ее контролируют для постоянства извлечения со-экстрактивных веществ (рис. 7.3). Далее к объекту добавляют не смешивающийся с водой органический растворитель (хлороформ, хлористый метилен, диэтиловый эфир, этилацетат, н-гексан и т.п.) и производят экстракцию при перемешивании. Перемешивание обычно осуществляют с помощью смесителей вибрационного типа («вортекс») или вращающего типа («ротамикс»). Затем полученную

эмульсию разрушают центрифугированием и экстракт упаривают либо в атмосфере инертного газа, либо при помощи вакуумного концентратора. Далее сухой остаток реконструируют небольшим объемом органического растворителя или дериватизирующего агента и в полученном растворе определяют концентрацию аналитов. Данный способ позволяет произвести очистку пробы от эндогенных веществ, сконцентрировать определяемые вещества, чтобы повысить предел количественного определения метода [4, 114].

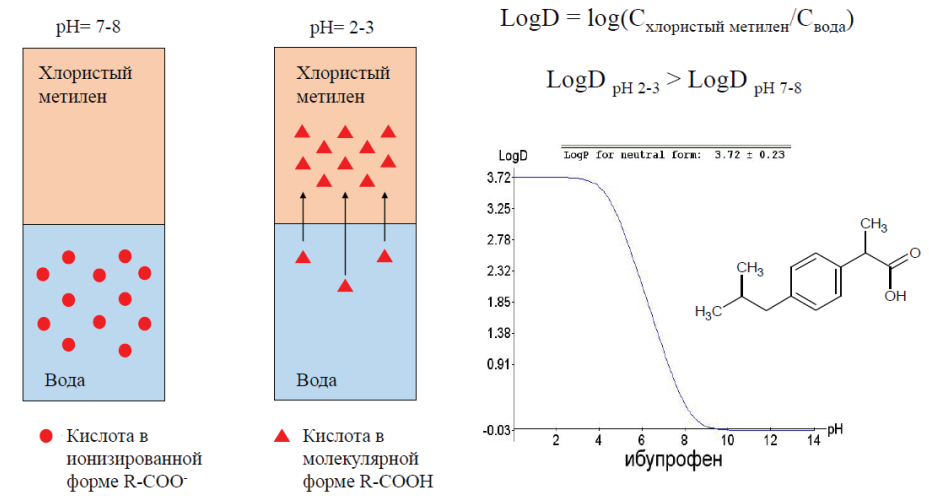


Рис. 7.2. Схема процесса экстракции органической кислоты – ибупрофена

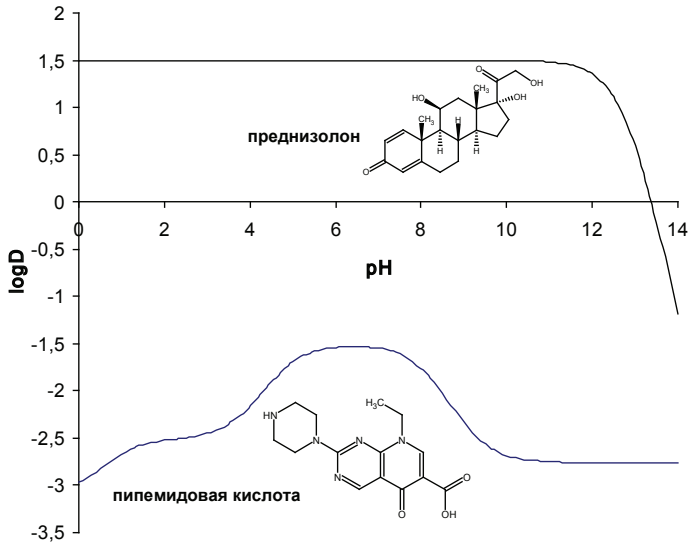


Рис. 7.3. Зависимость значения коэффициента распределения от величины pH для нейтральных (преднизолон) и амфотерных молекул (пипемидовая кислота)

Известна модификация метода жидкостно-жидкостной экстракции, которая заключается в нанесении пробы на крупнопористый инертный сорбент (например, кизельгур), зафиксированный между двумя бумажными фильтрами в специальной стеклянной или полиэтиленовой колонке, с последующим элюированием, без образования эмульсии (рис. 7.4).

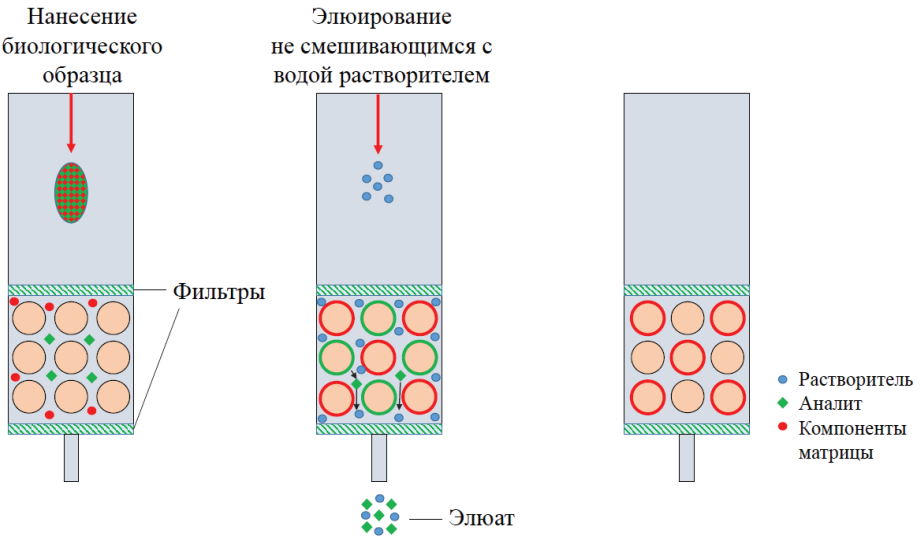


Рис. 7.4. Схема модифицированного метода жидкостно-жидкостной экстракции

Преимуществами данного способа являются повышение производительности и возможность автоматизации процесса пробоподготовки, низкий расход органических растворителей, наилучшее разделение органической и водной фаз, минимальное количество со-экстрактивных веществ в элюате и высокая степень извлечения целевых компонентов. Среди недостатков способа можно выделить высокую стоимость используемых колонок [193].

7.1.3. Твердофазная экстракция

Твердофазная экстракция (ТФЭ) – это метод пробоподготовки, в котором применяются картриджи, содержащие твердый сорбент, для концентрирования и отделения целевых компонентов с последующим элюированием подходящим растворителем. Процедура ТФЭ состоит из следующих стадий: кондиционирование сорбента, нанесение объекта, сушка сорбента, промывка для удаления сопутствующих соединений, элюирование аналитов (рис. 7.5).

В зависимости от методики та или иная стадия может отсутствовать [4]. Картриджи отличаются видом сорбента, его количеством и диаметром пор. В них чаще всего используются сорбенты на основе силикагелей с привитыми функциональными группами (C_{18}, $C_{8,}$ фенил гексил- и т. п.), в т. ч. ионообменными (R-$NH_{2,}$ R-COOH) и модифицированного полистирола

(HLB-картриджи). Преимуществами силикагелей является короткое время установления равновесия между процессами сорбции и десорбции и постоянство объема (отсутствие набухания) при взаимодействии с органическими и водными растворами. HLB-картриджи обладают одновременно гидрофильными и липофильными свойствами и подходят для анализа как полярных, так и неполярных соединений [97, 140]. Основные типы взаимодействий при сорбционном концентрировании представлены на рис. 7.6.

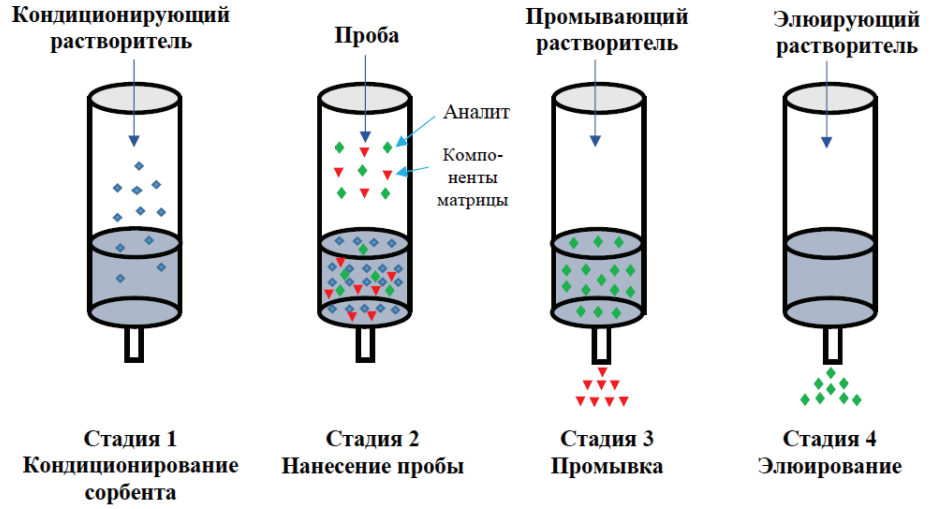


Рис. 7.5. Схема проведения твердофазной экстракции

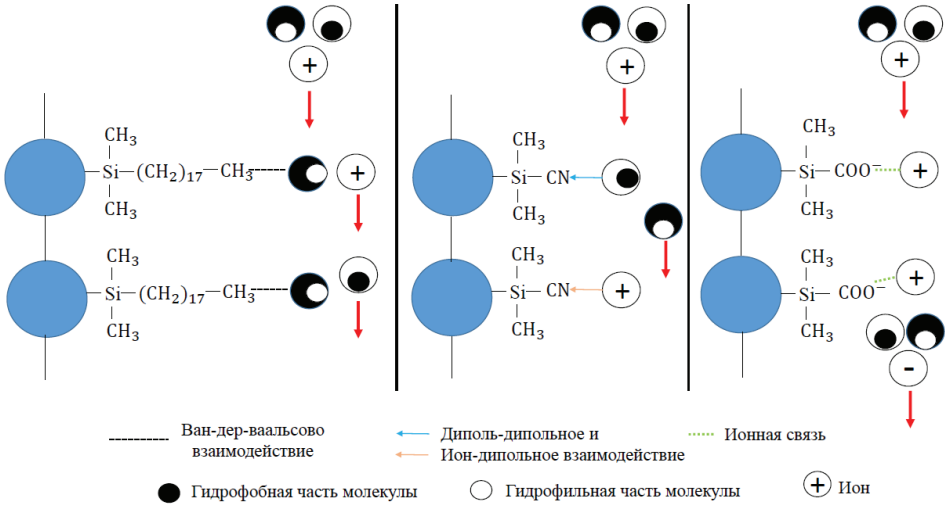


Рис. 7.6. Типы взаимодействий между компонентами матрицы и функциональными группами сорбентов

Преимуществами данного способа является высокая селективность извлечения целевых компонентов, что ведет к получению чистых экстрактов,

практически свободных от компонентов биологической матрицы и возможность концентрирования аналитов [114]. ТФЭ можно выполнять как «офф-лайн», так и с использованием «он-лайн» модулей для ВЭЖХ, что позволяет автоматизировать процесс пробоподготовки. Разновидностью твердофазной экстракции является сверхкритическая флюидная экстракция, в которой одним из элюентов является сверхкритический флюид диоксида углерода. Благодаря изменению давления и температуры можно изменять растворяющую способность углекислого газа, в связи с чем пробоподготовка обычно осуществляется в автоматизированном режиме, т. к. необходимо строго контролировать данные параметры [118].

7.2. МЕТОДЫ АНАЛИЗА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

7.2.1. Иммунохимические методы анализа

Иммунохимический анализ основан на связывании молекулы лекарственного препарата со специфическим меченым антителом. В результате данной реакции изменяется аналитический сигнал, который зависит от вида метки, величина которого пропорциональна концентрации аналита в пробе. Так, может происходить изменение оптической плотности (ИФА), интенсивности флуоресцентной поляризации (ПФИА), интенсивности люминесценции (ЛИА) [266] или радиоактивности при связывании АТ с радиоактивной меткой (РИА) [266, 229]. В настоящее время иммунохимические методы практически не используются для изучения биоэквивалентности низкомолекулярных соединений.

7.2.2. Хроматографические методы с масс-спектрометрическим детектированием

Основным методом анализа лекарственных препаратов органической природы при исследованиях биоэквивалентности является хромато-масс-спектрометрия. Хромато-масс-спектрометрия – это метод анализа, сочетающий в себе хроматографическое разделение компонентов пробы и их масс-спектрометрическое детектирование. Масс-спектрометрия – метод анализа, основанный на переводе молекул анализируемого вещества в ионизированную форму с последующим их разделением и регистрацией.

С масс-спектрометрическим детектированием сочетаются ВЭЖХ и ГЖХ. Ультраэффективная жидкостная хроматография (УЭЖХ), которая является разновидностью ВЭЖХ, позволяет сократить время анализа до 1–2 минут. Например, при исследовании биоэквивалентности препаратов рилузола разделение компонентов матрицы проводили на короткой УЭЖХ-колонке Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (50 мм × 2,1 мм, 1,7 мкм) с использованием градиентного режима элюирования – время анализа составило 1,2 мин [6]. Данные хроматографические методы анализа подробно описаны в разделе 3.

Составными частями масс-спектрометрического детектора являются:

1) источник ионов, в котором происходит ионизация молекул аналитов,

2) система ионной оптики, направляющая поток ионов в анализатор, где происходит разделение образовавшихся ионов в соответствии с отношением их массы к заряду (m/z),

3) электронный умножитель, который усиливает сигнал от прошедших через анализатор ионов,

4) детектор, регистрирующий данный сигнал [61].

Основным способом ионизации в методе ***газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием*** (ГХ-МС) является ионизация электронами (ИЭ, EI). В основе данного способа лежит взаимодействие молекул веществ с электронами, образующимися в результате термоэмиссии на филаментах, что приводит к образованию катион-радикалов: $M + e^- = M^{\cdot+} + 2e^-$. Энергия ионизации обычно составляет 70 эВ, что значительно превышает энергию химической связи. Полученные ионы подвергаются фрагментации, что приводит к формированию характерного масс-спектра, который воспроизводится на любой модели ГХ-МС. В настоящее время созданы библиотеки, содержащие сотни тысяч масс-спектров органических веществ, полученных при энергии ионизации 70 эВ. Это позволяет проводить идентификацию исследуемых соединений в автоматическом режиме.

В качестве устройства для разделения образующихся ионов в ГХ-МС обычно применяется квадрупольный масс-фильтр, который состоит из четырех параллельных стержней. На одну пару противоположных стержней подается постоянный ток – это необходимо для выбора полярности ионов, проходящих через анализатор, на другую пару – переменный ток. Через квадруполь проходят только те ионы, частота колебаний которых находится в резонансе с частотой переменного тока (рис. 7.7). Частота колебаний ионов, в свою очередь, зависит от отношения их массы к заряду (m/z).

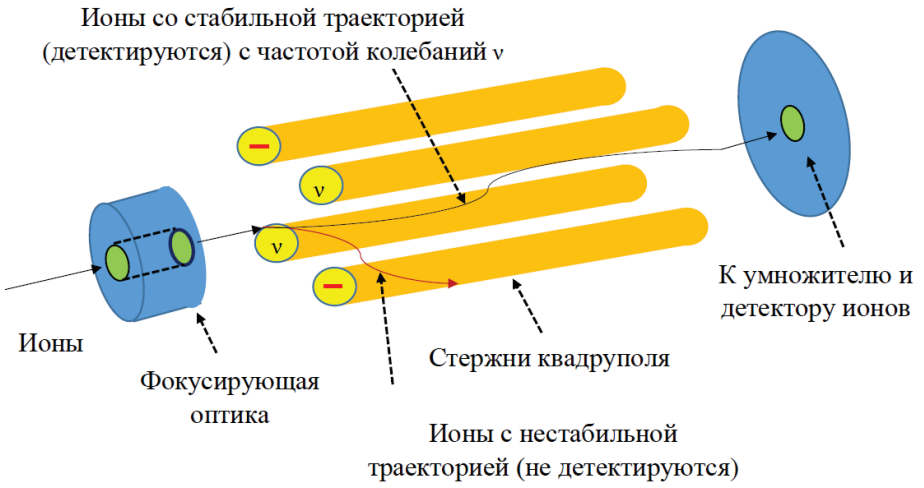


Рис. 7.7. Схема работы квадрупольного масс-спектрометрического детектора

В биоаналитических исследованиях применяются также тандемные масс-спектрометрические детекторы. В ГХ-МС/МС обычно используются системы из трех квадруполей: первый квадруполь используется для выделения нужного родительского иона, на втором квадруполе (камера соударения) под действием инертного газа (аргона или гелия) происходит фрагментация данного иона, на третьем происходит выделение нужного осколочного иона (рис. 7.8). Применение тандемного масс-спектрометрического детектора в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) позволяет улучшить соотношение «сигнал/шум», что повышает чувствительность метода [62].

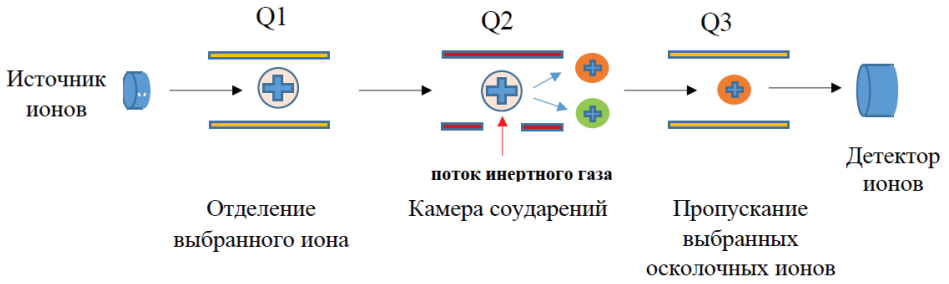


Рис. 7.8. Схема работы трехквадрупольного масс-спектрометрического детектора в режиме мониторинга выбранных реакций (Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Для улучшения хроматографических свойств аналита (изменение аналитических свойств образца) и повышения предела количественного определения методики после извлечения и концентрирования можно применять дериватизацию образца. Для газовой хроматографии используются следующие способы дериватизации:

1. Метилирование с помощью метилиодида или тетраметиламмония гидроксида;
2. Ацетилирование с помощью уксусного ангидрида;
3. Получение триметилсилил-производных (TMS-производных) с помощью N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетамида (BSTFA);
4. Получение трифторацетил-производных (TFA-производных) с помощью трифторуксусного ангидрида;
5. Получение пентафторпропионовых производных (PFP – производных) с помощью пентафторпропионового ангидрида;

Наиболее распространенным способом дериватизации является триметилсилилирование [97].

К преимуществам метода можно отнести относительную дешевизну оборудования по сравнению с ВЭЖХ-МС/МС и отсутствие необходимости в использовании дорогостоящих органических растворителей. Как правило, недостатками ГХ-МС являются более низкая по сравнению с ВЭЖХ-МС/МС чувствительность и, как следствие, долгая пробоподготовка биообъекта с применением жидкостно-жидкостной экстракции с возможной последующей дериватизацией, низкая производительность, отсутствие возможности анализа термолабильных (например, белков, антибиотиков из-за жестких условий хроматографического разделения и ионизации) и труднолетучих

соединений. Из-за этих недостатков данный метод анализа в настоящее время крайне редко применяется при исследованиях биоэквивалентности.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием является основным аналитическим методом, используемым при исследованиях фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных препаратов, содержащих действующие вещества органической природы.

В ВЭЖХ-МС применяются следующие способы ионизации:

1. Электрораспылительная ионизация (электроспрей, ESI) – при данном способе компоненты вводятся в источник через капилляр, на конце которого имеется напряжение порядка 3,5 – 5 кВ. На выходе из капилляра образуется аэрозоль из заряженных капель с высоким поверхностным зарядом, который распыляется сильным потоком азота (5–10 л/мин). По мере движения капли уменьшаются в размерах из-за испарения растворителя за счет обдува потоком азота до образования микрокапель, содержащих одну заряженную частицу. Данный способ пригоден для анализа полярных соединений, содержащих амино- или карбоксильные группы. При использовании электроспрея нельзя использовать солевые буферы, т. к. это приведет к закупориванию капилляра [61, 62].

2. Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI) – элюент распыляется в источнике ионов с помощью нагретого потока азота и попадает в зону коронного разряда (на электрод в виде острой иглы), где сначала происходит ионизация молекул растворителя, а затем молекул аналита. Данный способ ионизации применяется при анализе малополярных (например, стероидных) веществ и веществ с низкой молекулярной массой. При использовании APCI возможно применение солевых буферов. Существуют источники ионов, сочетающие ESI и APCI [61, 62].

3. Фотоионизация при атмосферном давлении (APPI) – является одним из самых мягких способов ионизации. Элюент распыляется в источнике ионов и компоненты пробы подвергаются облучению ультрафиолетовой криптоновой лампой. Энергии излучаемых фотонов достаточно для перевода неполярных соединений в ионизированную форму, но не хватает для ионизации растворителей, используемых в обращенно-фазовой ВЭЖХ [61, 62]. APPI сравнительно редко применяется для биоаналитических исследований. Так, данный метод был использован при количественном определении 4β-гидроксихолестерола в плазме крови, что позволило достичь НПКО 10 нмоль/мл без дериватизации [314].

Анализаторы, применяемые в ВЭЖХ-МС, можно разделить на масс-фильтры высокого и низкого разрешения:

К анализаторам низкого разрешения относятся:

1. Квадрупольный анализатор – принцип его действия описан выше.

2. Сферическая ионная ловушка (IT) – состоит из двух концевых (полюсных) электродов и расположенного между ними центрального кольцевого электрода, на который подается радиочастотное напряжение. Ионы, попадающие в ловушку, удерживаются полем центрального электрода. При изменении частоты переменного тока ионы с определенным значением m/z покидают ловушку, попадая на электронный умножитель для усиления сигнала [60].

3. Линейная (квадрупольная) ионная ловушка (LIT) – принцип действия данного анализатора основан на фиксации ионов в квадруполе за счет запирающих потенциалов на входном и выходном концах ловушки. Затем при импульсном изменении амплитуды радиочастотного напряжения на кольцевых электродах ионы выводятся из ловушки в соответствии с m/z и попадают на умножитель. Преимуществом данного анализатора является высокая чувствительность [62].

К анализаторам высокого разрешения относятся:

1. *Времяпролетный анализатор (TOF)* – в данном анализаторе ионы, попавшие из источника, ускоряются за счет действия электрического поля и движутся с разной скоростью в зависимости от соотношения их массы к заряду: чем легче ион, тем быстрее он достигает детектора. TOF работает с практически неограниченным диапазоном масс и его разрешающая способность более 10000 Да [61, 62].

2. *Орбитальная ионная ловушка* – состоит из 3-х электродов, попадая в зону которых ионы начинают движение по устойчивым траекториям, которые сочетают три периодических движения: вращательное движение вокруг центрального электрода с частотой вращения ω_{φ}, радиальное движение с частотой ω_r; осевые колебания вдоль центрального электрода с частотой ω. При этом движение ионов приобретает спиралевидный характер. В зависимости от частоты осевых колебаний происходит разделение ионов по их соотношению массы к заряду с высоким разрешением. Полученный частотный сигнал подвергается преобразованию Фурье в частотный спектр, а затем – в спектр отношений массы к заряду [11, 64].

Анализаторы высокого разрешения необходимы для расчета точных масс лекарственных препаратов и их структурных фрагментов, и тем самым позволяют повысить точность их идентификации. Например, при наличии у лекарственного вещества близких по структуре метаболитов с одинаковыми MRM-переходами использование масс-спектрометрических детекторов на основе TOF или орбитальной ионной ловушки позволяет не прибегать к сложному и длительному по времени хроматографическому разделению данных соединений.

Недостатком моноквадрупольного анализатора является ограниченная селективность, т. к. существуют лекарственные вещества и компоненты биологической матрицы с близкими значениями m/z, и более низкая чувствительность. Поэтому возникает необходимость подбирать условия хроматографического разделения данных веществ. Использование линейной ионной ловушки приводит к более высокой погрешности количественного определения аналитов, а применение сферической ионной ловушки также приводит к дискриминации ионов с низкими значениями m/z. Тандемное масс-спектрометрическое детектирование позволяет повысить избирательность, чувствительность и точность, использовать более простые и быстрые способы пробоподготовки (депротеинизация), повысить производительность анализов из-за отсутствия необходимости в сложном хроматографическом разделении компонентов пробы.

Существует несколько типов тандемных масс-спектрометрических детекторов: трехквадрупольные, квадрупольно-времяпролетные (Q-TOF), сочетание квадруполей с квадрупольной (Q-TRAP) и орбитальной ионной

ловушкой. Известно сочетание квадрупольной ионной ловушки с времяпролетным анализатором (IT-TOF), что значительно повышает чувствительность и разрешающую способность.

К недостаткам ВЭЖХ-МС/МС можно отнести высокую стоимость оборудования и отсутствие воспроизводимых на другом оборудовании библиотек масс-спектров и MRM-переходов.

В методе ***сверхкритической флюидной хроматографии*** (СКФХ) используют подвижные фазы на основе сверхкритического флюида диоксида углерода, свойства которого являются промежуточными между свойствами газа и жидкости. Подобно жидкости данный элюент обладает текучестью, растворяющей способностью, но его плотность и вязкость значительно меньше. Из-за высокой проникающей способности коэффициенты диффузии в сверхкритических фазах выше, чем в жидкостях, поэтому разрешающая способность данного метода значительно выше, чем ВЭЖХ. Благодаря низкой вязкости элюента анализ можно проводить при высоких скоростях потока, что позволяет увеличить производительность и использовать более длинные колонки без риска сильного увеличения давления. Разделение в данном методе проводится при более низких температурах, чем в ГЖХ, что позволяет анализировать термолабильные вещества.

Диоксид углерода переходит в состояние сверхкритического флюида при значениях температуры (33,1°С) и давления (73,8 бар) выше критических. В сверхкритическом состоянии данное вещество проявляет свойства неполярного растворителя, поэтому в состав подвижной фазы вводят полярные сорастворители, такие как спирты и эфиры. Хроматографическая система СКФХ схожа по составу с ВЭЖХ: в ее состав входят охлаждаемый насос для подачи CO_2, обычный насос высокого давления для подачи сорастворителей, инжектор, термостат с колонкой, детектор и автоматический регулятор давления. В такой хроматографической системе необходимо постоянно поддерживать определенный уровень давления и температуры для поддержания подвижной фазы в состоянии сверхкритического флюида. В методе СКФХ-МС/МС в конфигурацию системы (между колонкой и детектором) может быть включен дополнительный насос для подачи сорастворителя для усиления ионизации. Хроматографические колонки и сорбенты, применяемые в данном методе, аналогичны применяемым в ВЭЖХ и ГЖХ. Используемые в данном методе масс-спектрометрические детекторы аналогичны детекторам, применяемым в методе ВЭЖХ-МС/МС [20, 118].

7.2.3. Методы элементного анализа

Металлы в биологических объектах находятся в виде прочных комплексов, что мешает точному количественному определению. Поэтому перед проведением элементного анализа образцы, полученные от добровольцев, подлежат минерализации для разрушения органической матрицы. Существуют три способа минерализации [114]:

1. Сухая минерализация: сухое озоление на воздухе и в атмосфере кислорода, термическое разложение, пиролиз.

2. Мокрая минерализация: смесями азотной, серной, хлорной кислот, иногда с добавлением окислителей (пероксида водорода и др.). Данный способ используют при анализе легколетучих элементов.

3. Микроволновая минерализация: смесь пробы и окислителей помещают в сосуд из стекла, фторопласта или кварца, затем реакционную смесь нагревают в сверхвысокочастотном (СВЧ) поле с использованием специальной микроволновой системы. Применение данного способа позволяет намного сократить время пробоподготовки.

Атомно-абсорбционная спектрометрия – абсорбционный метод элементного анализа, основанный на поглощении невозбужденными атомами тяжелого металла, находящихся в газообразном состоянии, характеристического излучения определяемого элемента. Атомно-абсорбционный спектрометр состоит из следующих основных узлов: источника излучения – лампы полого катода, либо безэлектродной лампы, устройства для ввода пробы, атомизатора, монохроматора для выделения длины волны, характерной для каждого металла, и фотоэлемента [16]. В качестве способа атомизации используют:

1. Атомизация пламенем: пропан/воздух (температура – 2200 °С), ацетилен/воздух (температура – 2700 °С), для легкоатомизируемых элементов; ацетилен/закись азота (температура – 3200 °С) – при анализе трудно атомизируемых элементов [16].

2. Электротермическая атомизация. В данном способе используется графитовая печь. Данный процесс состоит из следующих стадий: сушки для удаления растворителя, пиролиза для разрушения кислотных, солевых и органических компонентов матрицы, атомизации и очистки печи (высокотемпературного отжига) [16].

3. Способ атомизации с помощью ртутно-гидридной приставки – для элементов, способных образовывать летучие гидриды (мышьяк, селен, германий, теллур и др.). Гидриды металлов образуются в результате восстановления боргидридом натрия, затем уносятся током инертного газа в атомизатор. Для анализа ртути используется разновидность метода – метод холодного пара, который заключается в восстановлении ионов ртути раствором дихлорида сурьмы или боргидридом натрия с последующим переносом ртутного пара в графитовую печь [16].

Атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС) – это эмиссионный метод элементного анализа, основанный на переходе атомов элементов в возбужденное состояние под действием высоких температур с последующим излучением электромагнитной энергии на определенных длинах волн при переходе в состояние с меньшей энергией. Основным источником возбуждения является аргоновая плазма (индуктивно-связанная плазма – ИСП), температурой около 10000 °С. ИСП получается благодаря наложения магнитного поля с помощью катушки индуктора на верхний конец горелки, в результате чего электроны инертного газа захватываются магнитным полем и ускоряются. Атомно-эмиссионный спектрометр состоит из перистальтического насоса для ввода пробы; распылителя; плазменной горелки; диспергирующего устройства, разлагающего излучение от возбужденных атомов на спектр и детектора. Преимуществами метода АЭС-ИСП является широ-

кий динамический диапазон концентраций и высокая чувствительность – пределы обнаружения элементов составляют около 1 нг/мл [94].

Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой – метод элементного анализа, основанный на переводе атомов химических элементов в ионизированное состояние с помощью аргоновой плазмы с последующим разделением и регистрацией полученных ионов. Данный тип масс-спектрометра состоит из устройства ввода пробы (перистальтического насоса с распылителем), плазменной горелки, системы ионной оптики, масс-фильтра, умножителя и детектора. В качестве масс-фильтров в данном методе обычно используются квадрупольные [62].

7.2.4. Методы анализа пептидных препаратов

В анализе высокомолекулярных веществ наиболее широкое применение находят методы, обозначаемые термином «ligand binding assays» – методы связывания лиганда или иммунохимические методы; данные методы имеют существенные отличия от методов на основе хроматографии, применяемых в исследованиях низкомолекулярных веществ, и их выполнение регламентировано отдельными разделами указанных выше руководств. Основным достоинством данных методов является высокая чувствительность детектирования крупных молекул, а основными недостатками – необходимость синтеза специфических антител, ограниченная селективность из-за возможной перекрестной реакции с метаболитами или другими препаратами, отсутствие возможности выявить структурные различия в молекулах биоаналогов, низкая точность и прецизионность в сравнении с хромато-масс-спектрометрическим методами. Наряду с иммунохимическими методами в рассматриваемой области исследований применяются методы на основе масс-спектрометрии высокого разрешения. Перспективным направлением в исследовании биоаналогов является использование количественных методов на основе времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией лазерной десорбцией при содействии матрицы (MALDI-TOF) [158, 170, 185, 194].

Иммунохимические методы анализа основываются на специфическом связывании определяемого соединения соответствующими антителами или антигенами. Индикация образующегося комплекса антиген-антитело может быть осуществлена, если в один из исходных компонентов реакционной системы ввести метку, которая легко детектируется соответствующим высокочувствительным физико-химическим методом. Весьма удобными для этой цели оказались изотопные, ферментные, флуоресцентные, люминесцентные и др. метки, использование которых дало возможность увеличить чувствительность классических иммунохимических методов анализа в миллионы раз, а время анализа уменьшить до нескольких минут. Исторически первым среди них был радиоиммунный анализ (РИА), предложенный в конце 50-х годов прошлого века. Благодаря возможности определять метку, которой являлся изотоп ^{125}I в очень малых концентрациях, удалось достигнуть высокой чувствительности анализа (на уровне пг/мл). В середине 60-х годов для

идентификации и локализации антигенов в гистохимических препаратах и выявления полос преципитации в иммунодиффузных и иммуноэлектрофоретических методах в качестве высокочувствительной метки было предложено использовать молекулы ферментов. Являясь по своей природе мощными химическими катализаторами, ферменты способны эффективно осуществлять наработку легко детектируемого продукта, что делает возможным определение ферментной метки в весьма малых концентрациях (до 10^{-12} М и ниже). На протяжении последних трех десятилетий иммуноферментные методы анализа интенсивно развивались как в теоретическом, так и практическом плане, и к настоящему времени они сформировались в самостоятельное научное направление, имеющее важное прикладное значение. Наибольшее распространение получили гетерогенные методы иммуноферментного анализа, основанные на использовании полистирольных планшетов для иммобилизации антител или антигенов, специфическом связывании определяемого вещества на стенках лунок планшета и последующем выявлении образовавшихся иммунокомплексов с помощью меченных ферментами компонентов. В последние десятилетия появилось значительное количество аналитического оборудования, позволяющего автоматизировать все этапов реакции. Благодаря своей невысокой стоимости и экологической безопасности, ИФА перешел в разряд стандартных, «рутинных» анализов.

В аналитике биоаналогов наибольшее применение нашел один из видов ИФА – ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) – лабораторный гетерогенный иммунохимический метод выявления антигенов и антител с использованием иммуносорбентов, основанный на определении комплекса «антиген-антитело» за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску. Существует три базовых варианта проведения этого метода [158, 170, 185, 194]:

1. Прямой (Direct ELISA);
2. Непрямой (Indirect ELISA);
3. Сендвич-метод (Sandwich ELISA).

Direct ELISA – этот метод является наиболее простым вариантом проведения ИФА. Сущность проведения этого метода состоит в следующем:

– на первом этапе растворенный в буфере анализируемый антиген вносится в пластиковую лунку (твердая фаза). Затем в течение определенного времени происходит инкубация антигена в лунках. Время и температура при этом не являются критическими параметрами, как правило, эти условия стандартизированы и указаны в стандартных протоколах определения. Стандартная температура инкубации 37°С. В процессе инкубации происходит иммобилизация антигена на твердую фазу. После инкубации проводят отмывку, чтобы удалить свободные (неиммобилизованные) молекулы антигена. Для процедуры отмывки используют нейтральный буферный раствор (например, фосфатный);

– после этого к иммобилизованному на пластиковой поверхности антигену добавляются антитела, конъюгированные с ферментом, которые специфичны данному антигены и напрямую связываются с ним;

– после инкубации вновь проводят процедуру отмывки и вносят в лунки соответствующий ферменту субстрат. В результате происходит ферментативная реакция с появлением окрашенного соединения. Через определенное время после развития окраски ферментативную реакцию останавливают, добавляя ингибирующий реагент;

– последним этапом является количественное определение оптической плотности окрашенного раствора с помощью спектрофотометрического оборудования.

Indirect ELISA – второй базовый метод, используемый в различных вариантах ELISA. Начальные этапы этого метода соответствуют стадиям direct ELISA, т. е. на этих стадиях происходит иммобилизация антигена на твердой фазе;

– на следующем этапе в лунки вводятся специфичные антитела, не связанные с ферментативной меткой. Антитела должны быть растворены в специальном буфере, который предотвращает неспецифическое связывание антител с компонентами твердой фазы. После инкубации и отмывки (удалении несвязавшихся антител) в лунке остаются только связавшиеся иммунные комплексы антиген-антитело;

– на следующем этапе в лунки добавляют антивидовые антииммуноглобулиновые антитела, связанные с ферментом. Эти антитела специфически связываются не с антигеном, а с антителами специфичными к анализируемому антигену. Антивидовые антитела (часто называемые вторые антитела) получают против иммуноглобулинов тех видов животных, которых иммунизировали антигеном. Например, если специфические к анализируемому антигену антитела были получены иммунизацией мыши, то антивидовые антитела получат путем введения иммуноглобулинов мыши другому животному. Достоинством меченных антивидовых антител является их универсальность, что позволяет использовать одни и те же антивидовые антитела для анализа различных антигенов;

– заключительные этапы этого метода соответствуют direct ELISA. Они также включают в себя стадии добавления субстрата, развития окраски и определение оптической плотности раствора.

Sandwich ELISA – третий базовый вариант проведения ELISA. Свое название получил из-за того, что на стадии выявления иммунного комплекса антиген оказывается как бы зажатым между молекулами иммобилизованных и меченных антител, образуя сендвич-структуру. Этот метод используют для определения антигенов, имеющих два и более неперекрывающихся антигенных эпитопа. Против каждого из эпитопов получают специфические антитела. Использование сендвич-методики позволяет увеличить чувствительность. Схема проведения в свою очередь может проходить по двум вариантам: прямой сэндвич ELISA (direct sandwich ELISA) и непрямой сэндвич ELISA (indirect sandwich ELISA).

Прямой сэндвич ELISA.

Схема прямого сэндвич ELISA включает в себя:

– пассивное прикрепление антител на твердую фазу;

– затем эти антитела (прикрепленные антитела), специфичные к одному эпитопу антигена, связываются с антигеном (во избежание неспецифи-

ческого связывания с твердой фазой антиген растворен в блокирующем буфере);

– после инкубации и отмывки иммунные комплексы (прикрепленное антитело-антиген) остаются на твердой фазе. На следующем этапе для последующей детекции иммунных комплексов в лунки добавляют антитела, конъюгированные с ферментом (эти антитела специфичные к другому эпитопу антигена);

– на заключительном этапе добавляют хромогенный субстрат и после остановки реакции измеряют оптическую плотность раствора.

Следует учитывать некоторые недостатки этого варианта. Основной лимитирующий фактор связан с использованием антител, конъюгированных с ферментом. Так как эти антитела специфичны только для одного антигена, то для определения различных антигенов необходимо каждый раз создавать новые антитела, конъюгированные с ферментом. Это значительно снижает универсальность и увеличивает стоимость метода.

Непрямой сэндвич ELISA. Схема проведения этого варианта метода ИФА состоит в следующем:

– начальные стадии этого метода схожи с прямым сэндвич ELISA и заключаются в иммобилизации на твердой фазе антител, специфичных к одному эпитопу антигена, связывании этих антител с антигеном, инкубации и отмывки;

– на следующей стадии к иммунным комплексам добавляют антитела (специфичные к другому эпитопу антигена), не несущие ферментативной метки;

– для детектирования иммунных комплексов, как и во всех непрямых методах ИФА, в лунки вносят антивидовые антииммуноглобулиновые (вторые) антитела, конъюгированные с ферментом;

– на заключительном этапе добавляют хромогенный субстрат и после остановки реакции измеряют оптическую плотность раствора.

Главным преимуществом этого метода является его универсальность, связанная с использованием вторых антител. Благодаря этому свойству вторых антител создано большое количество различных тест-систем, используемых для определения разных аналитов.

Кроме простых базовых методик в биоаналитике часто используются более сложные варианты ELISA. Как правило, в сложных вариантах ELISA используются конкурентный или ингибиторный тип реакции. В современной иностранной литературе эти варианты соответственно имеют аббревиатуру C – тест (Competition) и I – тест (Inhibition). Кроме того, выбор варианта метода зависит от того, что является определяемым компонентом: антиген или антитело. Таким образом, сложные варианты ELISA могут быть следующими:

– прямой конкурентный ELISA для определения антигена (Direct C-ELISA for Antigen);

– прямой конкурентный ELISA для определения антитела (Direct C-ELISA for Antibody);

– прямой ингибиторный ELISA для определения антигена (Direct I-ELISA for Antigen);

– прямой ингибиторный ELISA для определения антитела (Direct I-ELISA for Antibody);

– непрямой конкурентный ELISA для определения антигена (Indirect C-ELISA for Antigen);

– непрямой конкурентный ELISA для определения антитела (Indirect C-ELISA for Antibody);

– непрямой ингибиторный ELISA для определения антигена (Indirect I-ELISA for Antigen);

– непрямой ингибиторный ELISA для определения антитела (Indirect I-ELISA for Antibody);

– прямой конкурентный Sandwich ELISA для определения антигена (Direct Sandwich C-ELISA for Antigen);

– прямой конкурентный Sandwich ELISA для определения антитела (Direct Sandwich C-ELISA for Antibody);

– прямой ингибиторный Sandwich ELISA для определения антигена (Direct Sandwich I-ELISA for Antigen);

– прямой ингибиторный Sandwich ELISA для определения антитела (Direct Sandwich I-ELISA for Antibody);

– непрямой конкурентный Sandwich ELISA для определения антигена (Indirect Sandwich C-ELISA for Antigen);

– непрямой конкурентный Sandwich ELISA для определения антитела (Indirect Sandwich C-ELISA for Antibody);

– непрямой ингибиторный Sandwich ELISA для определения антигена (Indirect Sandwich I-ELISA for Antigen);

– непрямой ингибиторный Sandwich ELISA для определения антитела (Indirect Sandwich I-ELISA for Antibody).

Капиллярный электрофорез с масс-спектрометрическим детектированием также используется при анализе пептидных молекул. Капиллярный электрофорез – физико-химический метод анализа, основанный на разделении веществ в кварцевом капилляре в среде буферного раствора при постоянном токе за счет различий в их электрофоретической подвижности с последующим их детектированием. Данный метод обладает самой высокой эффективностью разделения – сотни тысяч теоретических тарелок, которая необходима при анализе близких по структуре фрагментов пептидных молекул. При кислых значениях pH буферного раствора движение электролитов в капилляре проходит за счет их собственной электрофоретической подвижности, при щелочных значениях pH определяемые вещества движутся благодаря сильному электроосмотическому потоку, который образуется после гидролиза силоксановых групп. Системы капиллярного электрофореза состоят из следующих частей: устройства для ввода пробы, электродов, подключенных к источнику высокого напряжения и расположенных по обе стороны от кварцевого капилляра, на котором происходит разделение, и детектора [49]. При анализе пептидных препаратов, как правило, используют масс-спектрометрические детекторы. В качестве способа ионизации в данном методе обычно применяется электрораспыление [61].

Опубликованы методики количественного определения олигопептидов динорфина А, энкефалина, эндоморфина с использованием ионной ловушки в качестве анализатора. Пробоподготовку проводили двумя способами: путем осаждения белков ацетонитрилом и твердофазной экстракцией [277]. Анализ более сложных молекул моноклональных антител проводят с использованием тандемных масс-спектрометрических детекторов высокого разрешения QTOF [147].

Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием. Анализ низкомолекулярных белков можно проводить с использованием ВЭЖХ-МС. Например, количественное определение дипептида ГБ-115 в плазме проводится с использованием детектора с электрораспылительной ионизацией и квадрупольной ионной ловушки. В качестве способа пробоподготовки авторы применили двукратную экстракцию хлороформом после осаждения белков ацетонитрилом. Разделение компонентов пробы проводили на колонке Zorbax C_{18} (150*2,1 мм, 5 мкм) при градиентном режиме элюирования и скорости потока 0,25 мл/мин [38].

Для исследования более сложных молекул используют ВЭЖХ-МС/МС. Так, для исследования фармакокинетики антикоагулянтного препарата бивалирудина, состоящего из 20 аминокислотных остатков, применяли трехквадрупольный детектор. Разделение проходило на обращенно-фазовой колонке с использованием подвижной фазы на основе метанола и 0,1 % раствора муравьиной кислоты. Детектирование проводилось в режиме MRM при регистрации положительных ионов [24].

В 2009 году L. Tuli и H.W. Ressom описали случаи применения различных видов неподвижных фаз для разделения белковых молекул [300].

В статье R.G. Jenkins приведены подходы к анализу пептидных препаратов в плазме крови в зависимости от их молекулярной массы с использованием трехквадрупольных, квадрупольновремяпролетных анализаторов и сочетания квадруполей с орбитальной ловушкой [222].

7.3. ТРЕБОВАНИЯ К ВАЛИДАЦИИ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК

Все биоаналитические методики, используемые для изучения биоэквивалентности и фармакокинетики, должны быть валидированы [69, 80, 214, 220, 221, 222]. Данная процедура проводится согласно Руководствам по валидации биоаналитических методов EMA [221] и FDA [214], Руководства по экспертизе лекарственных средств [69], Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» (Приложение №6) [80]. При этом перечень валидационных характеристик, требующих обязательной оценки, приведенный в нормативных документах EMA, ЕАЭС и Руководства ФГБУ НЦЭСМП (Том 1) отличается от перечня руководства FDA. Кроме того, в руководстве FDA приведены отдельные критерии для

иммунохимических методов анализа. Так, в американском руководстве отсутствуют валидационые тесты «эффект матрицы», «эффект переноса», которые могут в значительной степени повлиять на точность количественного определения (табл. 7.1). Перенос анализируемого вещества из предыдущей пробы, который часто встречается при использовании хроматографических методов анализа, может значительно искажать результаты измерений. В европейском и российском руководствах четко прописаны требования к оценке матричных эффектов. Согласно указаниям FDA необходимо оценивать еще один дополнительный параметр – степень извлечения.

Таблица 7.1. Различия в требованиях руководств по валидации FDA, EMA, ФГБУ НЦЭСМП (Том 1), решения Совета Евразийской экономической комиссии № 85

Валидационная характеристика	Руководство по экспертизе лекарственных средств (ФГБУ НЦЭСМП, Том 1)	Решения Совета Евразийской экономической комиссии № 85	Руководство EMA по валидации аналитических методик	Руководство FDA по валидации аналитических методик
Селективность	Исследование не менее чем 6 образцов холостой плазмы, полученных от разных доноров, на предмет наличия хроматографических пиков эндогенных веществ в области времени удерживания аналита и внутреннего стандарта: отклик компонентов биологической матрицы не должен превышать 20 % от уровня НПКО и 5 % от среднего отклика внутреннего стандарта			Исследование не менее чем 6 образцов холостой плазмы, полученных от разных доноров, на предмет наличия хроматографических пиков эндогенных веществ в области времени удерживания аналита и внутреннего стандарта. Требования к максимальному отклику компонентов матрицы отсутствуют
Эффект матрицы	Анализ не менее чем 6 модельных смесей на образцах холостой плазмы, полученных от разных доноров (в т. ч. гемолизированной и гиперлипидэмической) на двух уровнях концентрации. При этом коэффициент вариации NMF не должен превышать 15 %			Отсутствуют специальные требования
Эффект переноса	Если превышает 20 % от уровня НПКО и 5 % от среднего отклика внутреннего стандарта, то необходимо вводить холостой образец между анализами			отсутствует
Разведение (Линейность отклика)	Точность должна находится в пределах ±15 %; прецизионность (CV) не должна превышать 15 %			Включен в пункт «правильность, прецизионность и степень извлечения»
Степень извлечения	отсутствует			Сравнивают результаты после обработки биологического образца с результатами анализа раствора аналита

Далее будут подробно рассмотрены основные валидационные характеристики методики, а именно: селективность, влияние (эффект) переноса, линейность калибровочной кривой, прецизионность, правильность, степень извлечения, отсутствия влияния разведения образцов, оценки влияния матрицы, стабильность.

Для оценки селективности холостые образцы биологических жидкостей, полученные не менее чем из 6 независимых источников, исследуются на

предмет интерференции в области времени удерживания аналита и внутреннего стандарта. Затем проводят испытание не менее 6 образцов на уровне нижнего предела количественного определения: правильность должна находиться в диапазоне от 80 до 120 %, коэффициент вариации не должен превышать 20 %. Отсутствие искажающего влияния компонентов биологического объекта признается в случае, если их отклик не превышает 20 % от уровня нижнего предела количественного определения анализируемого вещества и 5 % от концентрации внутреннего стандарта. При наличии у лекарственного препарата нестабильных метаболитов (например, глюкуронидов, лактонов или N-оксидов) необходимо оценить степень влияния обратной конверсии данных веществ на точность определения концентраций аналита. Для этого к плазме добавляют данный метаболит и через определенное время хранения при лабораторной температуре измеряют концентрацию определяемого лекарственного вещества: она должна находиться в пределах 20 % от НПКО [69].

НПКО – это наименьшая концентрация анализируемого вещества в образце, которая поддается надежному количественному определению с приемлемой правильностью и прецизионностью. При исследовании биоэквивалентности данный показатель не должен превышать 5 % от Cmax.

Показатель «Градуировочная кривая» оценивается путем анализа не менее 6 различных калибровочных концентраций не менее чем в 3-х повторностях [154]. Каждый калибровочный образец готовится путем добавления стандартных растворов к бланковой плазме. После анализа образцов по средним значениям отклика строится калибровочный график. Далее по данному графику рассчитываются концентрации данных градуировочных образцов: значения не менее 75 % концентраций должны быть в пределах ± 15 % от номинальных значений, (для НПКО в пределах ± 20 %).

Правильность и прецизионность методики оцениваются внутри цикла и между циклами путем исследования не менее 5 образцов одной концентрации не менее чем для 4 различных концентраций, входящих в диапазон применения методики. В руководстве по экспертизе лекарственных средств рекомендованы следующие концентрации: НПКО, тройная величина НПКО (образец контроля качества низкой концентрации), около 50 % диапазона калибровочной кривой (образец контроля качества средней концентрации), около 75 % диапазона калибровочной кривой (образец контроля качества высокой концентрации). Среднее значение рассчитанных концентраций должно находиться в пределах ±15 % от номинальных значений для образцов контроля качества, для НПКО – до ±20 % от номинальных значений, относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации) не должно превышать 15 % для образцов контроля качества, для НПКО – не должно превышать 20 % [69, 80, 214, 221].

Отсутствие влияния разведения образцов оценивается путем добавления к матрице анализируемого вещества в концентрации выше верхней границы определяемых концентраций и разведения полученного образца бланковой плазмой, после чего проводят не менее 5 определений на каждое разбавление. Правильность и прецизионность должны находиться в пределах установленных критериев приемлемости не более ± 15 % [69, 80, 214, 221].

Оценка данного показателя необходима, чтобы в случае превышения концентрации анализируемого вещества в крови добровольца уровня верхнего предела количественного определения (ВПКО) получить точный результат. В статье C. T. Viswanathanetal, 2007 [317] рекомендуется использовать для разведения образца бланковую плазму, полученную от другого донора для того, чтобы доказать отсутствие влияния различий в биологической матрице на правильность измерений.

Эффект переноса оценивается путем введения холостых образцов после образцов с высокой концентрацией или градуировочных растворов верхних уровней количественного определения. Перенос в холостой образец после стандартного раствора с высокой концентрацией не должен превышать 20 % величины нижнего предела количественного НПКО и 5 % от концентрации внутреннего стандарта. Если перенос не избежен, то после анализа образцов необходимо вводить, либо холостой образец плазмы, либо органический растворитель [69, 80, 221].

Для оценки влияния матрицы на детекцию аналита и внутреннего стандарта должны быть исследованы не менее шести модельных смесей, приготовленных на образцах биологического объекта из независимых источников, а также должны быть проведены не менее 6 измерений стандартных растворов. В случае работы с плазмой целесообразно использовать гемолизированные и гиперлипидэмические образцы [69, 80]. После этого рассчитывают фактор матрицы и нормализованный фактор матрицы. Фактор матрицы (MF) рассчитывают как отношение среднего значения площади пика в плазме к среднему значению площади пика в растворе (рассчитывается отдельно для аналита и внутреннего стандарта). Нормализованный фактор матрицы (NMF) рассчитывается как отношения MF аналита и MF внутреннего:

$$NMF = \frac{\text{MF аналита}}{\text{MF внутреннегостандарта}},$$

Далее рассчитывают коэффициент вариации между значениями NMF: он не должен превышать 15 %. Матричные эффекты целесообразно оценивать на низких и высоких уровнях концентраций [75, 88, 214].

В рамках валидации необходимо провести следующие испытания стабильности [69, 80, 214, 221]:

1) стабильность исходных и рабочих растворов анализируемого вещества и внутреннего стандарта;

2) стабильность после не менее 3 циклов замораживания/ размораживания;

3) краткосрочная стабильность анализируемого вещества в биологическом образце при комнатной температуре или температуре условий пробоподготовки;

4) долгосрочная стабильность анализируемого вещества в биологическом образце в замороженном виде;

5) стабильность подвергшихся пробоподготовке образцов при установленной температуре в устройстве для автоматического ввода пробы.

Для этого проводят анализ не менее 6 образцов сразу после приготовления и по истечении нужного промежутка времени. Полученные результаты должны находиться в интервале ± 15 % от номинальных значений.

Степень извлечения, согласно руководству FDA, оценивается путем сравнения отклика анализируемого вещества после анализа модельной смеси с откликом аналита в чистом растворе на трех уровнях концентрации [214]. Данный параметр можно исследовать с помощью альтернативного подхода: путем анализа 2 видов образцов с последующим сравнением откликов анализируемых компонентов или соотношения «аналит/внутренний стандарт». Для приготовления 1 вида образцов в бланковую плазму, которая подвергалась пробоподготовке, вносят растворы аналита и внутреннего стандарта (если используют). Так, при осаждении белков аналит добавляют к надосадочной жидкости, при твердофазной экстракции – к элюату, при жидкостно-жидкостной экстракции – к органической фазе после извлечения или используют его раствор для реконструирования сухого остатка. Для приготовления второго вида раствора бланковую плазму с внесенным раствором определяемого вещества подвергают обычной пробоподготовке.

Далее описаны основные требования к валидации биоаналитических методик, применяемых в исследованиях биоаналогов, в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза [80, 95, 221, 224, 227].

Одним из важных факторов, определяющих надежность применяемой биоаналитической методики, являются **стандартные образцы**. Поскольку макромолекулы являются гетерогенными, поэтому активность и иммунореактивность могут варьироваться. Стандартный материал должен быть хорошо описан и документирован (например, должен иметь сертификат анализа и документы, подтверждающие происхождение стандартного материала). Необходимо использовать наиболее чистый стандартный образец из доступных. При приготовлении калибровочных образцов и образцов контроля качества рекомендуется использовать серию стандартного образца, которая использовалась при проведении доклинических и клинических исследований. При смене серии стандартного образца перед ее использованием необходимо провести описание ее аналитических характеристик и оценить ее биоаналитическую пригодность, чтобы удостовериться, что функциональные свойства метода (методики) не нарушены.

Под **специфичностью** связывания с реактивами понимается способность реактивов связываться исключительно с изучаемым анализируемым веществом. Специфичность связана с концепцией перекрестной реактивности. Теоретически связывающий реактив должен быть специфичным и не должен обладать перекрестной реактивностью со «структурно родственными соединениями» (например, эндогенными соединениями, изоформами, вариантными формами анализируемого вещества и аналогичными по физико-химическим свойствам соединениями) и лекарственными препаратами, сопутствующий прием которых вероятен субъектами исследования. При разработке метода и его валидации такие «структурно родственные соединения», как правило, отсутствуют. Изучение специфичности допускается осуществлять после завершения валидации и накопления данных о свой-

ствах анализируемого вещества. Специфичность следует испытывать с использованием образцов контроля качества. Это выполнялось посредством прибавления в биологические образцы, никогда ранее не содержавшие действующего вещества (биологические образцы, полученные от животных или субъектов, которым никогда не вводили анализируемое вещество), возрастающих концентраций доступных «структурно родственных молекул» или лекарственных препаратов. ЛП, как ожидается, будут применяться одновременно, а также посредством определения правильности методики при анализе рассматриваемой макромолекулы как на уровнях НПКО, так и верхней границы определяемых концентраций. Критерии приемлемости методики для образцов контроля качества должны находиться в пределах ± 25 % от номинальных значений.

Под **селективностью** методики связывания лиганда понимается способность определять рассматриваемое анализируемое вещество в присутствии неродственных соединений в биологическом образце. Ввиду присущих макромолекулам свойств их извлечение, как правило, не проводят. В связи с этим неродственные соединения, содержащиеся в биологическом образце (например, ферменты, осуществляющие деградацию макромолекул, гетерофильные антитела или ревматоидный фактор) могут оказывать влияние на результат количественного определения при данном анализе. Селективность испытывают не менее чем на 10 независимых источниках биологических образцов посредством добавления в них аналита на уровне НПКО или близком к нему. Такие источники должны включать гиперлипидемические и гемолизированные образцы. Следует включить в испытание источники биологических образцов, полученные у популяции пациентов с соответствующим заболеванием. Селективность следует изучить на уровне НПКО или близком к нему. Также целесообразно изучить селективность при более высоких концентрациях анализируемого вещества. Если влияние носит концентрационно зависимый характер, необходимо установить минимальную концентрацию, при которой такое влияние значимо. Значения правильности методики должны находиться в пределах ± 20 % (± 25 % при НПКО) от номинальной концентрации по меньшей мере в 80 % изученных биологических образцов.

При использовании автоматизированных дозирующих устройств необходимо изучить возможность переноса анализируемого вещества в образцы посредством помещения холостых образцов после образцов с высокой концентрацией анализируемого вещества или калибровочного стандарта на уровне верхней границы определяемых концентраций.

Ввиду значительного влияния высоких концентраций структурно родственных эндогенных соединений на результат анализа определение некоторых макромолекул без предварительного их извлечения из сложных биологических образцов невозможно. Поэтому необходим выбор разновидности биологического образца. Несмотря на то, что использование извлечений из биологических образцов (например, с использованием сорбции на угле, иммуноаффинных сорбентов) или альтернативных матриц (например, модельных белковых буферных растворов, диализированной сыворотки) не рекомендуется, в некоторых случаях это является вынужденной мерой,

поскольку иная стратегия определения рассматриваемого анализируемого вещества отсутствует. Калибровочную стандартную кривую допускается строить с помощью таких «модельных образцов». Образцы для контроля качества следует готовить в фактическом биологическом образце с оценкой правильности, подтверждающей отсутствие эффекта матрицы.

Поскольку биологические образцы могут давать высокий фоновый сигнал, может потребоваться определение **минимально необходимого разведения.** Под минимально необходимым разведением понимается наименьшее разведение, до которого следует развести образец в буферном растворе для оптимизации правильности и прецизионности аналитического цикла посредством снижения соотношения «аналитический сигнал / фоновый сигнал». Для определения минимально необходимого разведения образцы следует готовить в той же разновидности биологического образца, что и испытуемые образцы.

При построении **калибровочной кривой** зависимость измеряемого сигнала от концентрации, как правило, является нелинейной, обычно сигмовидной. Следует использовать по меньшей мере 6 калибровочных стандартов в не менее чем 2 повторностях. Калибровочные стандарты следует приблизительно равномерно распределить на логарифмической шкале в пределах ожидаемого аналитического диапазона. Помимо калибровочных стандартов, для построения кривой можно использовать якорные точки, лежащие вне области аналитического диапазона. В ходе валидации следует изучить по меньшей мере 6 независимых калибровочных циклов. Чтобы установить совокупную устойчивость регрессионной модели калибровочной кривой, результаты следует проанализировать в виде таблицы. Допускается исключать калибровочный стандарт из кривой вследствие технической ошибки (промаха) при выявлении ее причины (например, ошибка отмеривания дозатором). Целевые концентрации калибровочных стандартов, рассчитанные из калибровочной кривой методом пересчета, должны находиться в пределах ± 20 % от номинального значения (± 25 % для НПКО и верхней границы определяемых концентраций) для не менее чем 75 % проанализированных калибровочных стандартов.

Для оценки **прецизионности и правильности** не следует использовать свежеприготовленные образцы контроля качества, их необходимо предварительно заморозить и работать с ними так же, как при анализе испытуемых образцов. Для оценки правильности, прецизионности и общей ошибки метода (методики) следует использовать по меньшей мере 5 образцов для КК (ожидаемый уровень НПКО, уровень не более, чем в 3 раза превышающий НПКО, средний уровень, верхний уровень и ожидаемую верхнюю границу определяемых концентраций). Валидация должна имитировать реальный анализ испытуемых образцов, то есть если в соответствии с рекомендациями испытуемые образцы подвергаются двукратному определению (например, с использованием 2 лунок), то в ходе валидации образцы контроля качества следует подвергать двукратному анализу (то есть с использованием 2 лунок на каждый образец контроля качества). Измерения следует проводить по меньшей мере в 6 независимых аналитических циклах в течение нескольких дней. В отношении правильности внутри цикла и между циклами

средние значения концентраций должны укладываться в ± 20 % от номинального значения для каждого уровня (± 25 % для НПКО и верхней границы определяемых концентраций). Кроме того, общая ошибка (то есть сумма абсолютного значения относительной ошибки, выраженной в процентах, и коэффициента вариации, выраженного в процентах) не должна превышать 30 % (40 % для НПКО и верхней границы определяемых концентраций).

Ввиду узости аналитического диапазона стандартной калибровочной необходимо, используя образцы контроля качества, подтвердить, что рассматриваемое анализируемое вещество, присутствующее в концентрациях, превышающих область количественного определения (выше верхней границы определяемых концентраций), можно точно измерить с помощью методики после разведения образца холостой матрицей, чтобы получить концентрации анализируемого вещества, укладывающиеся в валидированный аналитический диапазон (**линейность разведения образцов**). Дополнительной причиной проведения экспериментов с разведением служит обнаружение потенциальных прозон или «эффекта сползания», то есть подавления сигнала, обусловленного высокими концентрациями анализируемого вещества. Концентрация для каждого разведения, вычисленная методом пересчета, должна находиться в пределах ± 20 % от номинального значения концентрации после поправки на разведение, прецизионность конечных концентраций всех разведений не должна превышать 20 %.

Если реальные образцы доступны, в целях выявления возможного эффекта матрицы или различающейся аффинности к метаболитам необходимо оценить **параллелизм** между соответствующими значениями на градуировочной кривой и результатами испытуемых образцов, подвергшихся серийному разведению. Испытуемый образец с высокой концентрацией (предпочтительно, близкой к C_{max}) следует развести с помощью холостого образца минимум в 3 раза. Прецизионность между образцами в сериях разведений не должна превышать 30 %. Если образцы разведены нелинейно (непараллельно), необходимо заранее определить процедуру представления результатов. Если в ходе валидации метода (методики) испытуемые образцы недоступны, параллелизм следует изучить, как только испытуемые образцы станут доступны.

Стабильность анализируемого вещества изучают, используя образцы контроля качества с низкими и высокими уровнями концентраций. При изучении стабильности необходимо установить краткосрочную стабильность при комнатной температуре или температуре пробоподготовки и стабильность при «замораживании-размораживании». Кроме того, следует изучить естественную стабильность в замороженном состоянии при каждой температуре, при которой будут храниться образцы. Среднее значение каждой концентрации должно находиться в пределах ± 20 % от номинального значения.

Ключевые **реактивы**, включая связывающие реактивы (например, связывающие белки, аптамеры, антитела или конъюгированные антитела), а также реактивы, содержащие соединения с ферментативной активностью, оказывают прямое влияние на результаты анализа, вследствие чего необходимо обеспечить их качество. Соответственно, при изменении серии ре-

актива в ходе валидации методики или анализа образцов необходимо подтвердить правильность аналитических функций метода (методики), чтобы убедиться, что она после использования исходной или предыдущей серии не нарушалась. В целях обеспечения отсутствия влияния на аналитические функции метода (методики) во времени необходимо документировать условия, гарантирующие поддержание стабильности как второстепенных реактивов (например, буферных растворов, растворителей и модификаторов значений pH), так и, что более важно, ключевых реактивов (реагентов). Коммерческие наборы необходимо повторно валидировать, чтобы обеспечить правильность и прецизионность при анализе образцов уровня НПКО и образцов контроля качества в аналитическом диапазоне, который будет использоваться для анализа испытуемых образцов.

Наиболее часто исследования с использованием иммунохимических методов могут быть реализованы планшет для микропроб. **Аналитический цикл** может состоять из нескольких планшетов, однако каждый из них должен содержать отдельный комплект калибровочных стандартов и образцов контроля качества для компенсации различия между характеристиками планшетов. Некоторые платформы вмещают ограниченное количество образцов. В связи с этим допустимо помещать комплект градуировочных стандартов в первую и последнюю платформы, а образцы контроля качества размещать в каждой платформе. Рекомендуется анализировать испытуемые образцы по меньшей мере в 2 повторностях.

Критерии приемлемости анализа испытуемых образцов:

Концентрации калибровочных стандартов, вычисленные методом пересчета, должны находиться в пределах ± 20 % от номинального значения их концентрации (за исключением НПКО и верхней границы определяемых концентраций, которые должны укладываться в ± 25 %). Этот критерий должен выполняться по меньшей мере для 75 % проанализированных калибровочных стандартов, минимальное количество которых для установления аналитического диапазона должно быть не менее 6. Каждый планшет должен включать не менее 3 концентраций образцов для КК (низкого, среднего и верхнего уровня) по меньшей мере в 2 повторностях. Кроме того, при валидации образцы контроля качества должны имитировать анализ испытуемых образцов по количеству лунок на каждый испытуемый образец. По меньшей мере 67 % проанализированных образцов для КК и 50 % образцов каждой концентрации должны укладываться в диапазон ± 20 % от номинального значения. Все несоответствия данному критерию необходимо обосновать [80, 95, 221, 224, 227].

При биоаналитических исследованиях необходим повторный анализ полученных от добровольцев образцов (ISR-тест) для дополнительной оценки воспроизводимости применяемой аналитической методики, в том числе с целью исключения влияния обратной конверсии метаболитов, различного связывания лекарственных веществ с белками и, как следствие, их различной степени извлечения и соосаждения, неоднородности биологических матриц у разных добровольцев на точность количественного определения [69, 80, 214, 221, 291]. Требования нормативной документации к проведению ISR-теста представлены в табл. 7.2.

Таблица 7.2. Требования руководств EMA, FDA и ФГБУ НЦЭСМП, решения Совета Евразийской экономической комиссии № 85 к проведению ре-анализа образцов

<table>
<tr><td colspan="2"></td><td>Руководство по экспертизе лекарственных средств (ФГБУ НЦЭСМП, Том 1); РешениеСовета ЕАЭС № 85</td><td>Руководство EMA по валидации аналитических методик</td><td>Руководство FDA по валидации аналитических методик</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Количество проб для проведения ре-анализа</td><td>Общее количество проб в исследовании меньше 1000</td><td>10 % от общего количества</td><td>10 % от общего количества</td><td rowspan="2">7 % независимо от общего количества</td></tr>
<tr><td>Общее количество проб в исследовании превышает 1000</td><td>5 % от общего количества</td><td>+ дополнительно 5 % от превышающего 1000 количества образцов</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">Критерии приемлемости</td><td colspan="3">Результаты измерений не менее 67 % проанализированных заново проб не должны отличаться</td></tr>
<tr><td colspan="2">Более чем на 20 % от ранее полученных результатов</td><td>Для низкомолекулярных веществ – более чем на 20 %, для высокомолекулярных – более чем на 30 %</td></tr>
</table>

Согласно Руководству по экспертизе лекарственных средств и решению Совета ЕАЭС [69, 80] при количестве отобранных проб меньше 1000, реанализу подвергается 10 % проб, а при количестве больше 1000 – 5 % проб. Руководство EMA [221] рекомендует анализировать дополнительно 5 % образцов от количества, превышающего 1000, руководство FDA [214] – 7 % образцов независимо от объема исследования. При этом результаты измерений не менее 67 % проанализированных заново проб не должны отличаться более чем на 20 % от ранее полученных результатов [69, 80, 221]. Правила FDA устанавливают менее жесткие требования для высокомолекулярных соединений – расхождение не выше 30 % от первоначального значения [29]. Для более объективной оценки целесообразно отбирать образцы, полученные от разных доноров [291, 317]. Таким образом, руководство EMA устанавливает более жесткие требования к проведению ISR-теста.

7.4. СПОСОБЫ РАСЧЕТА КОНЦЕНТРАЦИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

При биоаналитических исследованиях применяют два основных способа расчета концентрации: абсолютной калибровки и с использованием внутреннего стандарта (ВС) [114]. Построение абсолютного калибровочного графика является менее точным методом, т. к. не учитывает различий при извлечении целевых компонентов из образцов, полученных от разных добровольцев, и не позволяет нивелировать приборные ошибки, такие как

неточность при введении пробы в инжектор хроматографа. В связи с этим более предпочтительным является метод ВС. В качестве внутренних стандартов обычно используют либо структурные аналоги определяемого вещества, либо молекулы аналита, в которых несколько атомов заменены на стабильные изотопы дейтерия (^{2}H или D), углерода (^{13}C), азота (^{15}N) или кислорода (^{18}O). Преимуществами изотопно-меченных стандартов является почти полное устранение матричных эффектов, потому что данные вещества элюируются одновременно с анализируемым компонентом и имеют одинаковую с ним степень извлечения. В статье M. Ryska приведены примеры 85 биоаналитических методик, разработанных с применением ^{2}H-,^{13}C^{2}H- и^{13}C^{15}N-меченных стандартов: значение нормализованного фактора матрицы (NMF) находилось в диапазоне от 0,95 до 1,13, коэффициент вариации (CV) NMF находился в диапазоне от 1,09 до 5,81 %, что свидетельствовало о полном устранении влияния компонентов плазмы на точность количественного определения [292]. При исследовании ингибитора тубулина D-24851 требуемой точности и прецизионности удалось достигнуть также с использованием дейтерированного внутреннего стандарта: при расчете методом абсолютной калибровки значения CV составили от 4,2–20,5 %, точность находилась в диапазоне – 24,6 до 26,2 %, при расчете с использованием структурного аналога значения CV составили 12,3 – 29,7 %, диапазон точности – 30,5 % – 27,8 % [302]. Однако в статье S. Wang [319] показано, что матричные эффекты не всегда можно устранить путем применения ^{2}H-стандартов на примере методики определения энантиомеров карведилола.

Таким образом, использование изотопно-меченных стандартов позволяет в большинстве случаев почти полностью устранить матричные эффекты, что делает этот способ наиболее предпочтительным для расчета концентрации. Применение данного способа рекомендовано также в Решении ЕАЭС № 85 (Прил. 6, п. 7) [80].

7.5. ПРОБЛЕМЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

При разработке аналитических методик исследователи могут столкнуться с рядом проблем, таких как матричные эффекты, обратная конверсия метаболитов, подбор условий хроматографического разделения для хиральных и высокополярных соединений, стабилизация легкоразлагающихся веществ и т. д. Преодоление данных трудностей необходимо для получения точных результатов исследования биоэквивалентности.

7.5.1. Эффект матрицы

При анализе биологических объектов различные компоненты матрицы могут элюироваться с хроматографической колонки одновременно с молекулами определяемого вещества и вызывать тем самым подавление или усиление ионизации и снижение прецизионности количественного определения. Согласно требованиям нормативной документации для оценки эф-

фекта матрицы сравнивают отклик аналита в чистом растворителе и в образцах плазмы, полученных из не менее 6 разных источников. При этом для оценки влияния наблюдаемого эффекта матрицы на точность получаемых результатов рассчитывается коэффициент вариации нормализованного фактора матрицы по данным не менее 6 независимых измерений [69, 80, 214].

Основной вклад в выраженность матричного эффекта вносят фосфолипиды. В статье C. Ghosh, B. Chakraborty, 2012 [207] проанализировано проявление данного эффекта в зависимости от способа пробоподготовки (депротеинизации, жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракции), хроматографирования (ВЭЖХ и УЭЖХ), выбранного антикоагулянта, органического компонента подвижной фазы, способа ионизации и выбранной полярности

Выбор антикоагулянта также может повлиять на проявление матричного эффекта. В статье J. Smeraglia etal., 2002 [300] приведено сравнение двух антикоагулянтов ЭДТА и гепарината лития: коэффициент вариации при измерении концентраций аналита в первом случае составил 8,11 %, во втором случае – 24,5 %, что не укладывается в критерии приемлемости.

При использовании ESI подавление ионизации возникает значительно чаще, чем при использовании APCI [232]. Это может быть связано с тем, что эндогенные вещества, скапливаясь на поверхности капли и увеличивая ее вязкость и поверхностное натяжение, уменьшают испарение растворителя, тем самым препятствуя переходу ионов в газовую фазу [242]. Также компоненты матрицы могут конкурировать за заряд на поверхности капли с определяемым веществом, что препятствует достижению каплями критического радиуса и препятствует переходу аналита в газовую фазу [140, 145].

Таким образом, снизить матричные эффекты можно изменением условий хроматографического разделения, масс-спектрометрического детектирования, способа пробоподготовки, использованием другого растворителя для осаждения белков, подбором картриджа для твердофазной экстракции.

7.5.2. Анализ веществ, содержащих нестабильные функциональные группы

Одной из наиболее сложных аналитических задач является исследование фармакокинетики веществ, содержащих нестабильные функциональные группы, способные разрушаться на различных этапах исследования (отбор крови, отделение плазмы, хранение образцов, замораживание и размораживание образцов, выполнение аналитических процедур). Примерами таких функциональных групп являются сложноэфирные группы, легко подвергающиеся гидролитическому расщеплению, и фенольный гидроксил и меркаптогруппа, подверженные окислительным процессам [138].

Способность к окислению фенольных соединений зависит от количества данных функциональных групп в молекуле. Так, микофеноловая кислота, содержащая в своей структуре один фенольный гидроксил, является химически стабильной, а метилдопа, содержащая два фенольных гидроксила в плазме, легко разрушается. В рамках разработки методики для исследова-

ния биоэквивалентности была проведена оценка стабильности метилдопы в плазме крови на модельных смесях с концентрацией 3 мкг/мл без добавления стабилизатора и с добавлением раствора, содержащего аскорбиновую кислоту в концентрации 50 мг/мл, натрия сульфит в концентрации 2 мг/мл, натрия гидрокарбонат в концентрации 23,85 мг/мл в количестве 0,2 мл на 1 мл плазмы, при комнатной температуре и при замораживании до температуры – 20 °С. Затем аликвоту 100 мкл модельной смеси подвергали депротеинизации метанолом в количестве 400 мкл, полученную смесь встряхивали на вортексе в течение 30 сек. при частоте около 2400 мин$^{-1}$, подвергали центрифугированию в течение 10 мин при 3500 об./мин и температуре +4 °С, после этого в надосадочной жидкости измеряли концентрацию метилдопы хромато-масс-спектрометрическим методом с использованием приведенных выше условий. На данном этапе исследования оценку относительной концентрации проводили путем сравнения площади хроматографического пика метилдопы, полученного путем анализа образцов, сразу после приготовления модельных смеси с площадями пиков, полученных через определенные промежутки времени. Полученные данные представлены в табл. 7.3 и проиллюстрированы на рис. 7.10.

Таблица 7.3. Оценка стабильности метилдопы в плазме крови при комнатной температуре и при замораживании

Комнатная температура			Температура не выше – 20°С		
Время, ч	Концентрация, % от исходного уровня		Время, ч	Концентрация, % от исходного уровня	
	без добавления стабилизатора	с добавлением стабилизатора		без добавления стабилизатора	с добавлением стабилизатора
0	100,0	100,0	0	100,0	100,0
2,5	77,6	97,1	16	84,0	99,7
6	55,1	95,2	24	80,0	100,2
12	29,9	93,8	36	77,3	101,9

Из данных, приведенных в таблице 7.3, видно, что без добавления стабилизатора метилдопа разлагается: при комнатной температуре окисляется 70,1 % от исходного количества лекарственного вещества, при температуре – 20 °С – 22,7 %, что не укладывается в критерии приемлемости (концентрация должна быть в диапазоне 85 – 115 % от исходной). При добавлении аскорбиновой кислоты к плазме концентрация метилдопы укладывалась в данный диапазон. Для стабилизации аналогичного соединения – допамина N. C. VandeMerbel с соавторами использовали раствор натрия метабисульфита [315].

Для предотвращения димеризации легкоокисляющихся тиолов можно использовать дериватизацию. Так, для стабилизации меркаптогруппы активного метаболита прасугрела, R-138727, в качестве дериватизирующего агента использовался 2-бромо-3’-метоксиацетофенон (рис. 7.11). Для разделения энантиомеров данного соединения применяли две стереоселективные колонки ProntoSIL Chiral AXQN (150×2мм и 250×2мм) с предколонкой BetaBasic C4 Javelin Guard. Элюирование проводили в изократическом режиме с помощью смеси метанол: уксусная кислота: вода: 0,1н раствор

ацетата аммония в соотношении 200:1,2:0,6:0,025 при скорости потока 0,17 мл/мин. Результаты испытаний краткосрочной, долгосрочной стабильности, стабильности при замораживании/размораживании отвечали критериям приемлемости [322].

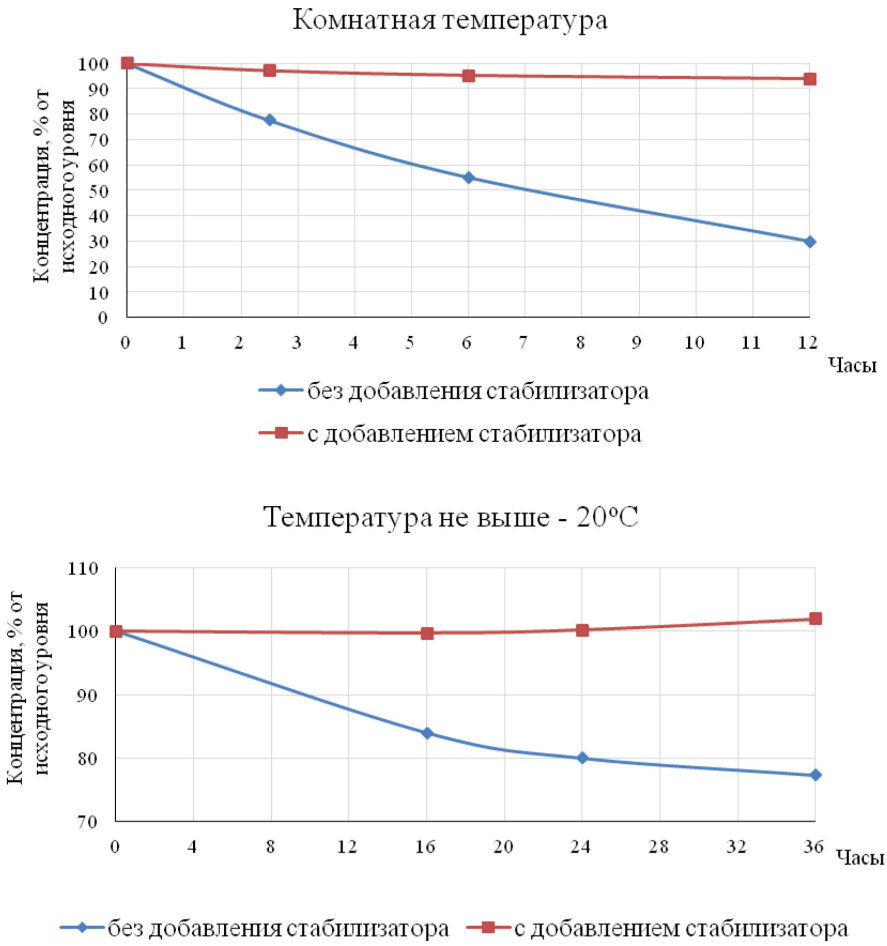


Рис. 7.10. Стабильность метилдопы в плазме крови при комнатной температуре и при замораживании

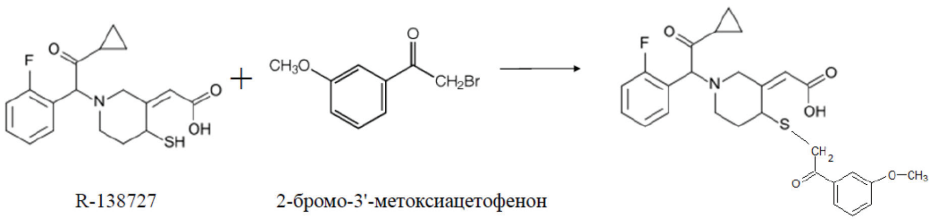


Рис. 7.11. Схема дериватизации метаболита прасугрела R-138727

Для предупреждения окисления меркаптогруппы ингибитора АПФ каптоприла авторы также применяли дериватизацию N,N,N',N'-тетраметил-2-бутендиамин с последующим количественным определением данного препарата с помощью метода ГХ-МС [142].

Стабилизации также можно достигнуть без добавки антиоксиданта с помощь подбора условий хранения. Так, 4ß-гидроксихолестерол в процессе хранения при температуре не выше -20 °С был подвержен значительной деградации, а при глубокой заморозке до температуры не выше -70 °С был относительно стабилен [314].

Ацетилсалициловая кислота содержит нестабильную сложноэфирную связь, способную легко гидролизоваться. Схема гидролиза показана на рис. 7.12.

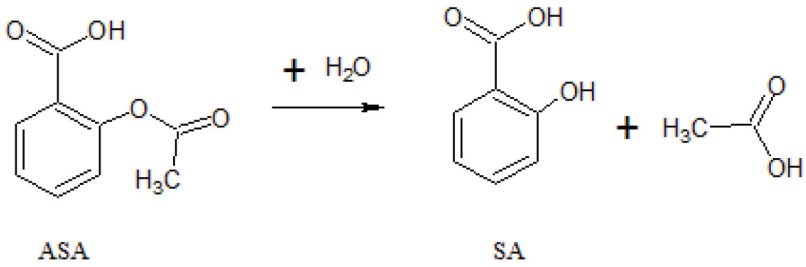


Рис. 7.12. Схема гидролиза ацетилсалициловой кислоты (ASA) до салициловой кислоты (SA)

Для предотвращения разложения на преаналитическом этапе образцы крови, полученные от добровольцев, немедленно после отбора подвергают центрифугированию при охлаждении при температуре +4 °С, а затем сразу замораживают с использованием сухого льда до температуры не более -20 °С. В качестве антикоагулянта целесообразно использовать смесь натрия фторида и калия оксалата. Перед проведением анализа образцы размораживают, незамедлительно подвергают пробоподготовке, а затем помещают в пробоотборник с установленной температурой +4 °С. На аналитическом этапе для предотвращения конверсии ацетилсалициловой кислоты в салициловую в источнике ионов ионизацию образцов проводят при минимально допустимой температуре. Добиться стабилизации сложных эфиров можно за счет использования ингибиторов эстераз, таких как натрия фторид и параоксон, дихлофос [235, 257, 261].

Известно явление интерконверсии хиральных соединений в плазме крови в процессе хранения. На протекание данного процесса оказывает влияние температура, свет, pH среды и активность ферментов [235]. Так, для предотвращения рацемизации оксазепама пробы плазмы подкисляли 0,1н раствором хлористоводородной кислоты [281], а для предотвращения перехода 13-*транс*-ретиноевой кислоты в 13-*цис*-ретиноевую кислоту использовалась смесь натрия аскорбината и N- этилмалеимида [318].

Некоторые лекарственные вещества способны разрушаться под действием света. Примерами таких соединений являются витамины группы D, мон-

телукаст [151, 245]. Для предотвращения их разложения для отбора проб и хранения образцов необходимо использовать пробирки, обернутые алюминиевой фольгой, либо изготовленные из темного стекла или окрашенного полипропилена, не пропускающие свет. Кроме того, целесообразно применять специальные источники освещения, не выделяющие излучения в УФ-диапазоне. Хранение при пониженной температуре также снижает скорость протекания фотохимических реакции [257].

7.5.3. Обратная конверсия метаболитов

Обратная конверсия – это обратный переход метаболитов в лекарственные вещества в процессе хранения плазмы или выполнения аналитических процедур. Наиболее часто данному процессу подвержены глюкурониды, лактоны и N-оксиды.

Конъюгат микофеноловой кислоты с глюкуроновой кислотой обладает способностью к обратной конверсии [258]. Схема данной реакции представлена на рис. 7.13.

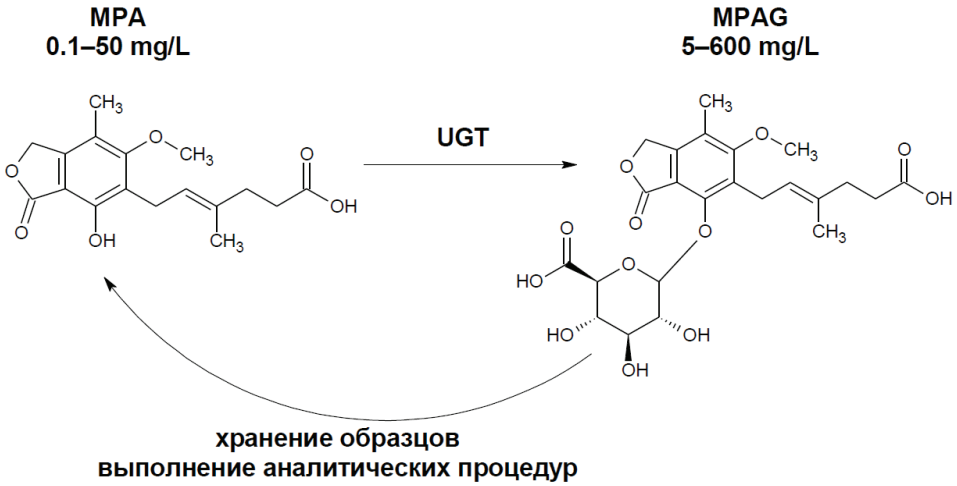


Рис. 7.13. Схема обратной конверсии глюкуронида (MPAG) в микофеноловую кислоту (MPA)

Для оценки обратной конверсии бланковая плазма с добавлением фенольного глюкуронида микофеноловой кислоты исследована в исходный момент времени и после 24 часов хранения при лабораторной температуре. Концентрация метаболита в плазме составляла 100 мкг/мл плазмы, что соответствует ожидаемым максимальным концентрациям этого метаболита в образцах от добровольцев. Разделение компонентов биологической матрицы проводилось на колонке Phenomenex Kinetex C18 (30 x 4.6 мм, 2.6 мкм) с предколонкой Phenomenex Security guard C18, 4 x 3 мм с использованием подвижной фазы на основе ацетонитрила и воды при градиентном режиме элюирования при комнатной температуре. Для детектирования использовали трехквадрупольный детектор, оборудо-

ванный источником электрораспылительной ионизации с термофокусировкой. Выполнялось сравнение откликов микофеноловой кислоты в свежеприготовленных образцах, содержащих ее глюкуронид, и аналогичных образцах после 24 часов хранения. Значимой обратной конверсии метаболита в исходное соединение через 24 часа не наблюдалось: полученные значения концентрации микофеноловой кислоты составили 2,58 % от уровня НПКО. В данном случае применение специальных условий хранения и стабилизации не потребовалось [126].

Также может происходить миграция сложноэфирной связи в положения С-2, С-3, С-4 глюкуронового кольца с образованием α- и β- аномеров [257]. Примерами таких соединений являются 1-О-ацилглюкуронид телмисартана и 1-О-ацилглюкуронид диклофенака [186]. Стабилизации данных конъюгатов можно добиться путем снижения pH до значения ниже 6,0; при щелочных значениях pH биологической жидкости проходит быстрый гидролиз [235].

Лактон розувастатина способен гидролизоваться в розувастатин в процессе хранения [255]. Схема данной реакции представлена на рис. 8.14.

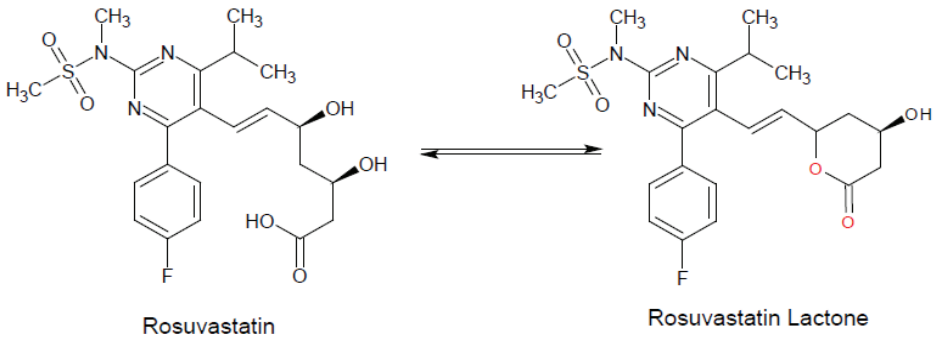


Рис. 7.14. Схема обратной конверсии лактона розувастатина

Для предотвращения гидролиза метаболита плазму подкисляли раствором ацетатного буферного раствора с pH 4,5. Для оценки обратной конверсии бланковая плазма с добавлением лактона розувастатина в концентрации 20 нг/мл исследовалась в исходный момент времени и после 24 часов хранения. Для анализа использовалась колонка Kinetex Phenyl-Hexyl (100 x 3.0 мм, 5 мкм) с предколонкой Luna C8 (2) Mercury (20 x 4.0 мм, 5 мкм), в состав подвижной фазы входили ацетонитрил, метанол, вода, раствор уксусной кислоты 1 %. При отсутствии стабилизатора наблюдалась значимая обратная конверсия – более 50 % от НПКО, а при введении буферного раствора значимой обратной конверсии не наблюдалось.

Основной метаболит вориконазола – N-оксид подвержен обратной конверсии в процессе хранения плазмы [111]. Схема реакции разложения представлена на рис. 7.15.

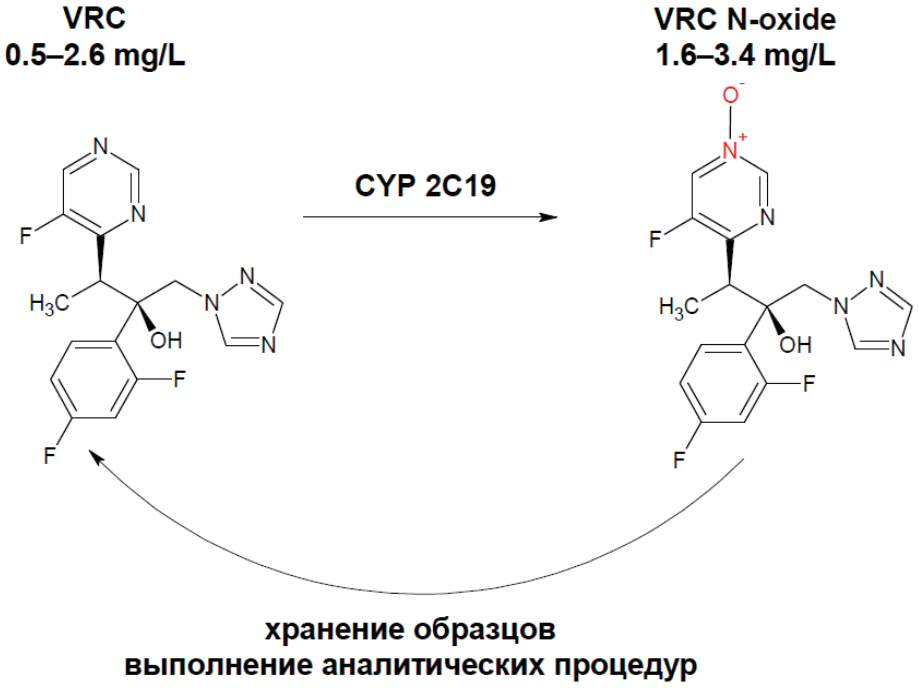


Рис. 7.15. Схема обратной конверсии N-оксида (VRCN-oxide) в вориконазол (VRC)

Стабилизация N-оксида вориконазола в составе биопроб была достигнута путем замораживания плазмы до температуры не выше -20 °С.

Для стабилизации N-оксидов препаратов фенотиазинового ряда (рис. 7.16) предложено использовать аскорбиновую кислоту, а для количественного определения использовать ВЭЖХ-МС/МС, оснащенный источником химической ионизации при атмосферном давлении [174], т. к. при использовании ГХ/МС наблюдается полная деградация данных метаболитов из-за жестких условий анализа (воздействие высоких температур в испарителе после ввода пробы и в колонке в процессе хроматографического разделения).

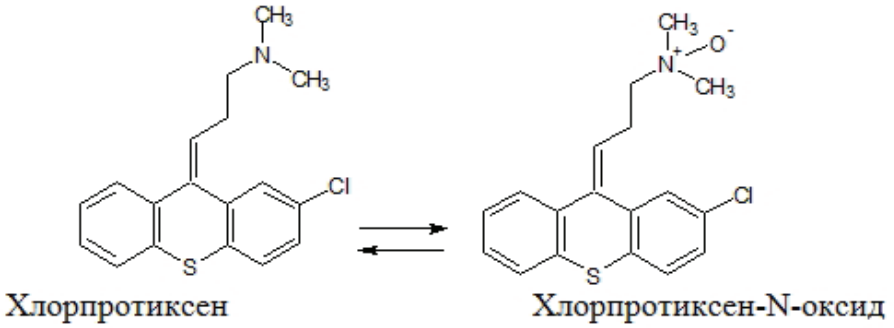


Рис. 7.16. Схема разложения N-оксида хлормпромазина

7.5.4. Разделение хиральных соединений

Разделение энантиомеров необходимо при различиях в фармакокинетических и фармакодинамических свойствах, а также, если соотношение площади под кривой «концентрация-время» (AUC) зависит от их скорости всасывания. Если фармакологически активен только один энантиомер, достаточно доказать только его биоэквивалентность [69, 80, 214, 221].

Для разделения стереоизомеров используют стереоселективные неподвижные фазы. Например, разделение энантиомеров лерканидипина проводили на колонке Chiralpak AD, (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм), содержащей сорбент на основе хиральных полисахаридов, с применением подвижной фазы, состоящей из гексана, этанола и диэтиламина в соотношении 95:5:0,1 %, с пост-колоночным добавлением смеси этанола и раствора ацетата аммония 10 ммоль/л в соотношении 95:5 для усиления ионизации [238]. При количественном определении R- и S- изомеров карведилола была использована дериватизация с помощью 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-глюкуранозилизотиоцианата, благодаря чему удалось достигнуть хроматографического разделения данных энантиомеров на колонке Ace 3 C_{18} (50*2,1 мм, 3 мкм) на основе октадецилсиликагеля [319].

7.5.5. Проблемные вещества с точки зрения детектирования и хроматографии

Проблемными с точки зрения ***детектирования*** являются слабо полярные соединения, например, лекарственные вещества стероидной структуры. Существует несколько путей решения:

1. Применение дериватизации: этинилэстрадиол и левоноргестрел после экстракции смесью метилтретбутилэфира и н-гексана подвергали дериватизации дансилхлоридом. В качестве источника ионов использовали обычную электрораспылительную ионизацию, как для полярных соединений [201]. Для дериватизации стероидных соединений можно также использовать пиридин-3-сульфонилхлорид [292].

2. Применение высокочувствительного оборудования: для количественного определения тестостерона использовали гибридный масс-спектрометрический детектор, сочетающий в себе систему из трех квадруполей и линейную ионную ловушку (QTRAP), что позволило достичь низкого НПКО – 10 пг/мл [284].

3. Концентрирование объекта с помощью твердофазной или жидкостно-жидкостной экстракции: Для анализа дутастерида использовали картриджи Waters Oasis HLB, 1 mL. Для кондиционирования сорбента применяли фосфатный буферный раствор pH 7,4, затем наносили 0,5 мл плазмы, после высыхания элюировали 0,25 мл метанола. Разделение компонентов матрицы проводили на колонке Phenomenex Gemini NX C18 110A (150 x 3,0 мм, 3 мкм) с предколонкой LunaC18 Mercury, (20 x 4.0 мм, 5 мкм) при скорости потока 0,5 мл/мин, температуре термостата 40 °С. В состав подвижной фазы входили ацетонитрил, метанол, формиатный буферный раствор в концен-

трации 40 ммоль/л и вода в соотношении 75:10:5:15. Детектирование осуществлялось в режиме отрицательных ионов с использованием сдвоенной системы ионизации DUIS-ESI, сочетающей ионизацию в электроспрее и химическую ионизацию при атмосферном давлении. Данный способ пробоподготовки позволил значительно улучшить соотношение «сигнал/шум» и добиться низкого значения НПКО – 50 пг/мл.

Проблемными с точки зрения ***хроматографии*** являются высокополярные молекулы с небольшой молекулярной массой, т. к. они имеют очень слабое удерживание на классических коммерчески доступных фазах на основе октил-, октодецил-, фенилгексилсиликагелей. Для решения данной проблемы можно использовать колонки с частично полярными сорбентами или добавлять в состав подвижной фазы ион-парный реагент.

Так, при количественном определении мельдония разделение компонентов матрицы проводилось с использованием колонки Luna NH_2 (150 х 4.6 мм, 5 мкм) и подвижной фазы на основе метанола, формиатного буферного раствора в концентрации 40 ммоль/л и воды в соотношении 70:5:25. Для анализа фосфомицина применяли колонку Synergi Fusion-RP 80 Å (150 х 4.6 мм, 4.0 мкм) с предколонкой Security guard Fusion-RP (4х3 мм) и градиентный режим элюирования (табл. 7.4).

Таблица 7.4. Параметры градиентного элюирования при количественном определении фосфомицина

Время (мин)	A (%)	B (%)	C (%)
0.00	95	5	0
1.00	95	5	0
1.25	90	5	5
1.50	85	5	10
1.75	80	5	15
2.00	75	5	20
2.25	70	5	25
3.25	70	5	25
3.50	75	5	20
3.75	80	5	15
4.00	85	5	10
4.25	90	5	5
4.50	95	5	0
6.00	95	5	0

Примечание: A – метанол, B – 100 mM ацетатный буферный раствор, C – вода.

Данные параметры хроматографического разделения позволили достичь высокой точности и прецизионности методики, а также избавиться от матричных эффектов.

7.6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛАБОРАТОРИИ И КЛИНИЧЕСКОГО ЦЕНТРА

Клинический центр и лаборатория должны совместно планировать и согласовывать свою работу. Основные направления работы биоаналитической лаборатории в рамках сотрудничества с клиническим центром кратко охарактеризованы ниже.

Подготовка лабораторных наборов («laboratory kits»). Лабораторные наборы, предоставляемые в клинический центр, как правило, включают в себя вакуумные пробирки с антикоагулянтом, предусмотренным протоколом, и криопробирки для отбираемой плазмы. Пробирки маркируются согласно требованиям протокола; обычно маркировка пробирок содержит такую информацию, как код исследования, номер добровольца, период исследования, номер пробы, тип аликвоты (аналитическая или резервная). В исследовательских центрах и лабораториях, оснащенных лабораторными информационными системами и автоматическими устройствами считывания, могут быть использованы наклейки со штрих-кодами, позволяющими идентифицировать каждую пробирку с автоматическим внесением информации в лабораторную информационную систему. Техника оформления этикеток должна быть валидирована на предмет устойчивости к воздействию факторов (низкие температуры, лед, вода и др.), способных привести к стиранию маркировки, повреждению и т. п.

Проведение тренингов и консультаций для персонала клинических центров. Для повышения качества и оптимизации работы на этапе отбора и обработки проб в клиническом центре специалисты биоаналитической лаборатории могут проводить обучение и повышение квалификации сотрудников, ответственных за выполнение соответствующего раздела работы на клиническом этапе исследования. Такие тренинги могут включать как общие вопросы, относящиеся к стандартному порядку работы (например, для клинических центров, не имеющих большого опыта работы), так и аналит-специфичные процедуры, связанные главным образом с необходимостью стабилизации проб, применения специальных технических средств и т. п. (см. ниже).

Разработка методических руководств для клинического центра. Специалисты биоаналитической лаборатории могут принимать участие как в разработке руководств общего плана, например, в формате стандартных операционных процедур, так и лабораторных руководств или инструкций («laboratory manual») в рамках каждого отдельно взятого проекта. Особое значение это имеет в случае работы с нестабильными аналитами, способными подвергаться химической модификации и разрушению при отборе и хранении проб. Получение сведений о стабильности определяемых веществ и, в случае выявления нестабильности, разработку мер по стабилизации необходимо выполнить заблаговременно по отношению к срокам проведения клинической части. В связи с этим разработку и валидацию аналитической методики необходимо проводить с учетом данных сроков, в том числе с учетом того, в течение какого интервала времени пробы будут храниться от

момента отбора до момента выполнения анализа, – период оценки долгосрочной стабильности должен охватывать данный временной интервал.

В случае исследования нестабильных лекарственных веществ сотрудники лаборатории должны составить подробные инструкции по приготовлению стабилизаторов, буферных систем, использованию антикоагулянтов, а также по специальным условиям режима температуры и освещения при отборе, хранении и транспортировке биологических образцов. После написания данных методических указаний с сотрудниками клинического центра необходимо провести тренинги.

Следует заключить, что результаты биоаналитического этапа клинических исследований имеют колоссальное значение для обеспечения эффективности и безопасности воспроизведенного лекарственного препарата. Поэтому к точности измерения количества лекарственных веществ в биологических средах предъявляются очень строгие требования. Метод расчета концентраций напрямую влияет на правильность полученных данных. В работе было показано, что наиболее предпочтительным является применение метода внутреннего стандарта с использованием изотопно-меченных лекарственных веществ. Российские требования к валидации методик и проведению анализов, приведенные в Руководстве по экспертизе лекарственных средств [69] и Решении Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» [80], практически совпадают с требованиями, изложенными в зарубежном руководстве EMA [221], но отличаются от требований руководства FDA [214].

Также в главе рассмотрены основные проблемы, возникающие на биоаналитическом этапе исследований биоэквивалентности. Главной трудностью является анализ химически нестабильных веществ. Так, для стабилизации фенольных соединений и N-оксидов было предложено использовать антиоксиданты, для тиолов – дериватизацию, для легкогидролизующихся сложных эфиров – ингибиторы эстераз и заморозку до температуры не выше -20 ^{0}C, для глюкуронидов – применять буферные растворы для коррекции pH среды [138]. Данные меры должны быть согласованы с сотрудниками клинического центра, занимающимися подготовкой и отправкой образцов в лабораторию.

8. ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ПОЛУЧЕНИЯ НЕЭКВИВАЛЕНТНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной главе рассмотрены основные причины получения неэквивалентных или отрицательных результатов исследований биоэквивалентности (БЭ). Описано влияние физико-химических свойств активных фармацевтических субстанций (АФС) лекарственных препаратов, а именно: их полиморфизма, степени измельчения, формы частиц, растворимости, остаточной влажности, на скорость всасывания и биодоступность. Состав вспомогательных веществ, технология производства, а также технологические параметры производственного процесса оказывают значительное воздействие на фармакокинетические параметры лекарственного препарата. Такие факторы, как некорректный дизайн исследования БЭ, неправильный расчет размера выборки, искаженные результаты биоаналитических исследований могут привести к ошибочному заключению о результатах исследования БЭ.

8.1. АНАЛИЗ ПРОБЛЕМ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

На растворимость и биодоступность лекарственных веществ, главным образом, влияют физико-химические свойства действующего вещества (ДВ) и состав вспомогательных веществ. Данные параметры необходимо учитывать при разработке воспроизведенного лекарственного препарата.

8.1.1. Ошибки, вызванные физико-химическими свойствами активных фармацевтических субстанций

Физико-химические свойства используемых АФС в значительной степени влияют на фармакокинетику. Такие характеристики АФС, как степень измельчения, форма частиц, растворимость и остаточная влажность, являются наиболее значимыми. Полиморфные модификации лекарственных веществ также часто становятся причиной изменения биофармацевтических свойств и, как следствие, могут привести к получению неэквивалентных результатов.

Полиморфизм

Полиморфизм – способность вещества существовать в нескольких кристаллических формах с различными физико-химическими свойствами. Данные формы могут отличаться растворимостью и биодоступностью, что важно для получения биоэквивалентных препаратов [18]. Одним из примеров вещества, имеющего различные кристаллические структуры, является парацетамол. Данная АФС имеет две полиморфные модификации: моноклинную с зигзагообразной структурой и орторомбическую с параллельными слоями, отличающиеся энергией кристаллической решетки [280]. Другим примером может служить конформационный полиморфизм, характерный для ритонавира, структурные модификации которого имеют разную растворимость [153].

Псевдополиморфизм – явление включения молекул растворителя в кристаллическую решетку вещества. Образование сольватов влияет на кристалллическую структуру АФС. Так, кристаллогидрат формотерола фумарата имеет кристаллическую структуру, а безводная форма является аморфной [240].

Явление совместной кристаллизации лекарственного веществ может в значительной степени повлиять на растворимость. Так, ко-кристаллы агомелатина с бензойной кислотой растворяются в 3 раза лучше, а с глутаровой кислотой – в 7 раз лучше [253].

Также важное значение имеет наличие у молекулы ДВ стереоизомеров с разными фармакологическими свойствами, поэтому в случае необходимости при биоаналитических исследованиях следует использовать стереоспецифичные методы анализа.

1. Степень измельчения и форма частиц

От данного параметра зависят скорость и полнота всасывания лекарственного вещества. Так, согласно патенту «Наноструктурированные композиции апрепитанта, приготовление данных фармацевтических композиций» [198], размер частиц АФС апрепитанта не должен превышать 200 нм. Данное вещество плохо растворимо в воде, при увеличении размера частиц его растворимость и, как следствие, биодоступность уменьшаются еще больше. Следовательно, площадь под кривой «концентрация-время» (AUC) воспроизведенного препарата будет меньше, чем у референтного, что приведет к получению неэквивалентного результата. Еще одним примером может служить микронизация субстанции валсартана, которая увеличивает биодоступность лекарственных препаратов на его основе [304], что необходимо учитывать при разработке воспроизведенных препаратов валсартана.

Степень измельчения и размер частиц обусловливают такие технологические характеристики действующего вещества, как сыпучесть, прессуемость, насыпная масса и удельная поверхность. Например, действующие вещества индапамид и лоратадин имеют анизометрическую форму, преднизолон – изометрическую форму, обладают низкой сыпучестью; феназепам – округлую форму, анаприлин – симметричную призматическую форму частиц, обладают высокими показателями сыпучести [33]. Различия данных параметров АФС требуют оптимизации технологических процессов. Например, в случае плохой сыпучести вместо прямого прессования можно использовать влажную грануляцию. Поэтому неправильный подбор параметров производственного процесса и использование АФС с другими характеристиками могут привести к получению неэквивалентных результатов.

2. Растворимость

Известно, что хорошо растворимые ДВ быстрее высвобождаются из лекарственных форм. Растворимость лекарственных веществ, являющихся слабыми кислотами и основаниями, зависит от pH среды растворения. В статье A. Pobudkowska и U. Domanska данная зависимость показана на примере диклофенака натрия, мефенамовой кислоты и ее натриевой соли, флуфенамовой и нифлумовой кислоты [283].

Использование разных солей одного лекарственного вещества может значительно повлиять на его растворимость и скорость всасывания. Так, хи-

нина гидрохлорид легко растворяется в воде, а хинина сульфат практически не растворим, что влияет на их терапевтический эффект [19, 110, 113].

Применение сложных эфиров также влияет на интенсивность абсорбции препаратов. Так, при использовании в составе таблеток и капсул эритромицина пропионата концентрации ДВ в крови в 2–4 раза выше, чем при использовании его основания, в то время как фармакопейный анализ активности антибиотиков дает одинаковый результат [19].

Растворимость труднорастворимых соединений может быть улучшена путем их солюбилизации. Так, после включения в состав гранулята ибупрофена неорганического основания значительно повышается его растворимость и распадаемость полученной лекарственной формы [211].

3. Остаточная влажность

Избыточная влажность гранулята при изготовлении субстанций ДВ могут получиться твердые лекарственные формы, распадаемость и скорость высвобождения ДВ которых уменьшиться вследствие повышения прочности получаемой таблетки [66]. Поэтому в процессе разработки воспроизведенного препарата данный параметр обязательно нужно контролировать во избежание получения в дальнейшем неэквивалентных результатов.

8.1.2. Неправильный выбор вспомогательных веществ

От вспомогательных веществ зависит скорость и степень высвобождения ДВ из лекарственной формы и соответственно скорость всасывания, а следовательно, и скорость наступления терапевтического эффекта. Так, лактоза ускоряет абсорбцию тестостерона, увеличивает полноту высвобождения аскорбиновой кислоты из гранулированной лекарственной формы. Использование парафина, холестерамина снижает скорость всасывания кортикостероидных гормонов [17]. Применение поливинилпирролидона в качестве связующего вещества ускоряет абсорбцию преднизолона и гризеофульвина [110]. Сорбит ускоряет всасывание ацетилсалициловой кислоты [113]. Данные факторы необходимо учитывать при разработке как нового, так и воспроизведенного лекарственного препарата.

Некоторые скользящие вещества, такие как тальк, стеараты, высшие углеводороды, ухудшают распадаемость таблетки за счет затруднения проникновения в ее структуру пищеварительных соков [19]. Поэтому их избыточное добавление может приводить к замедлению всасывания действующего вещества и, как следствие, получению неэквивалентного препарата.

8.2. ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА И ПАРАМЕТРЫ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Технология изготовления лекарственной формы сильно влияет на фармакокинетические параметры ДВ препарата. Так, при использовании грануляции в псевдосжиженном слое и грануляции с большим усилием сдвига получаются частицы с различной морфологией (формой, размером и т. д.), что приводит к различной растворимости, и, как следствие, к различной биодоступности ДВ. Применение влажной и сухой грануляции

приводит к получению гранул разного размера, которые также отличаются растворимостью. В процессе сушки гранулята могут возникать различные полиморфные модификации, которые отличаются фармакокинетическими параметрами.

Давление прессования напрямую влияет на время распадаемости лекарственной формы: чем оно сильнее, тем медленней таблетка распадается. Более медленная или быстрая распадаемость приведет к получению неэквивалентных результатов [66].

8.3. НЕКОРРЕКТНЫЙ ВЫБОР ДИЗАЙНА ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ И РАСЧЕТ РАЗМЕРА ВЫБОРКИ; ВНУТРИИНДИВИДУАЛЬНАЯ И МЕЖИНДИВИДУАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ; НЕДОСТАТОЧНАЯ СТАТИСТИЧЕСКАЯ МОЩНОСТЬ

В упрощенном представлении исследования БЭ служат, чтобы установить, обладает ли новый воспроизведенный препарат такой же скоростью и степенью абсорбции (т. е. «фармакокинетической» эквивалентностью в заранее установленных границах признания БЭ), что и соответствующий референтный препарат.

Эквивалентность или неэквивалентность сравниваемых препаратов, помимо свойств действующего вещества, состава готовой лекарственной формы препарата и особенностей технологии его производства, также во многом зависит от правильности планирования и корректности проведения самого исследования БЭ.

Так, на итоговые результаты исследования БЭ значительное влияние могут оказать:

1. Выбор дизайна исследования определенного ДВ в зависимости от его особенностей, таких как длительность периода полувыведения, наличие эндогенных концентраций, высокая вариабельность параметров фармакокинетики, широта терапевтического диапазона, энтерогепатическая рециркуляция;

2. Корректность определения размера выборки субъектов исследования для достижения необходимой мощности исследования.

Влияние данных факторов можно предусмотреть при планировании протокола исследования. Не менее важное значение имеет качество проведения клинической (соблюдение протокола исследования и правил отбора образцов крови у субъектов) и аналитической части исследования БЭ (см. главу 8).

Виды дизайна исследований БЭ:

1. Стандартный дизайн – двухпериодное, перекрестное исследование в 2 последовательностях, с приемом однократной дозы. Периоды должны быть разделены отмывочным периодом, достаточным для снижения концентрации ДВ ниже порога биоаналитического определения (обычно достаточно 5–6 периодов полувыведения).

2. Параллельный дизайн – сравнительное исследование в параллельных группах с приемом однократной дозы.

3. Повторный дизайн (репликативный) – трехпериодное или четырехпериодное, перекрестное исследование в 2 или 3 последовательностях (соот-

ветственно полный повторный или полуповторный), с приемом однократной дозы. Периоды должны быть разделены отмывочным периодом по аналогии со стандартным дизайном.

4. Двухэтапный (или адаптивный дизайн) – исследование с перекрестным или параллельным дизайном, с приемом однократной дозы, проводимое в два этапа. На первом этапе проводится исследование на начальной (первичной) группе субъектов с анализом полученных результатов. Если биоэквивалентность не подтверждается, то можно набрать дополнительную группу и объединить результаты, полученные в обеих группах для окончательного анализа (вероятность ошибки I рода для всего исследования должна быть неизменна, статистические критерии остановки исследования должны быть определены в протоколе исследования).

В редких случаях возможно проведение исследования с многократным приемом лекарственных препаратов (исследования с приемом многократной дозы) [91, 153].

8.3.1. Факторы, влияющие на правильность выбора дизайна исследования

Длительность периода полувыведения ДВ

Для препаратов с длительным периодом полувыведения рекомендуется применять параллельный дизайн, несмотря на то, что в случае параллельного дизайна могут быть получены менее точные результаты. Параллельный дизайн позволяет значимо сократить длительность исследования, т. к. не требуется длительный период отмывки как в исследованиях с перекрестным дизайном.

Известные данные о периоде полувыведения ДВ (например, описанные в литературе или инструкции референтного препарата) позволяют правильно оценить и выбрать длительность периода сбора образцов крови, т. к. в исследовании БЭ необходимо обеспечить достаточную длительность экспозиции ДВ в крови.

Количество отобранных образцов также должно быть достаточным, чтобы обеспечить надежную оценку длительности экспозиции. Это достигается, когда площадь под кривой «плазменная концентрация – время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке t ($AUC_{(0–t)}$) перекрывает не менее 80 % от площади под кривой «плазменная концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{(0–\infty)}$). С целью получения надежной оценки константы скорости терминальной элиминации (необходима для достоверной оценки $AUC_{(0–\infty)}$) в течение терминальной фазы следует отобрать не менее 3–4 образцов.

Если $AUC_{0–t}$ составляет менее 80 % от $AUC_{0–\infty}$, для оценки БЭ необходимо использовать показатель $AUC_{0–t}$, а не $AUC_{0–\infty}$.

Если фаза абсорбции ДВ лекарственного препарата для приема внутрь с немедленным высвобождением не превышает 72 ч, то для сравнения длительности экспозиции в качестве альтернативы $AUC_{(0–t)}$ может использоваться AUC, усеченная до 72 ч ($AUC_{(0–72\ ч)}$).

Если отбор образцов продолжается в течение 72 ч, и в точке 72 ч концентрация все еще поддается определению, то описывать $AUC_{(0-\infty)}$ и остаточную площадь нет необходимости: достаточно документировать сведения о AUC, усеченной в точке 72 ч ($AUC_{(0-72\ ч)}$) [91,111].

Неправильный выбор дизайна и точек отбора образцов крови (частота и длительность отбора проб) в исследовании БЭ приводит к недостоверным результатам исследования.

Наличие эндогенных концентраций определяемого вещества

Существует также и проблема некорректной разработки дизайна исследований сравнительной фармакокинетики *in vivo* препаратов – аналогов эндогенных веществ, учитывая, что в исследуемых биологических жидкостях могут присутствовать эндогенные концентрации вещества, которые не были взяты в расчет при проведении *in vivo* исследования или этот расчет был сделан не по правилам.

Фоновое содержание эндогенных веществ, особенно подверженных колебаниям, вносит дополнительное искажение при определении концентрации лекарственного препарата, являющегося аналогом эндогенного вещества, что затрудняет оценку БЭ таких препаратов, так как не всегда возможно вычленить влияние данного искажения на полученные результаты. Для преодоления этой особенности указанных лекарственных препаратов используется несколько научно обоснованных подходов, которые направлены на помощь исследователю для правильной разработки дизайна исследования БЭ и последующей оценки результатов.

При разработке дизайна исследования БЭ необходимо учитывать следующие общие положения [3, 92]:

1. Дизайн исследования БЭ должен быть максимально стандартизованным во всех отношениях;

2. Употребление эндогенных соединений с пищей должно строго контролироваться, необходимо учитывать циркадные ритмы;

3. При разработке дизайна необходимо принимать во внимание гомеостатические механизмы, регулирующие концентрацию эндогенных соединений, включая механизмы выведения соединений;

4. Необходимо подробно описывать метод поправки на эндогенную концентрацию или обосновать отсутствие необходимости в коррекции;

5. В некоторых случаях можно рассматривать дизайн в сверхтерапевтических дозах, чтобы в большей степени разграничить эндогенную концентрацию от концентрации, обусловленной приемом препарата;

6. Необходимо учитывать линейность фармакокинетики, т. к. зачастую такие ДВ обладают нелинейной фармакокинетикой в диапазоне терапевтических доз;

7. Перед подготовкой протокола исследования БЭ необходимо тщательно изучить предыдущий опыт проведения исследований БЭ или других фармакокинетических исследований *in vivo* планируемого к изучению препарата, что позволит избежать многих ошибок при разработке дизайна исследования.

При составлении отчета по проведенному КИ необходимо всесторонне описывать полученные результаты, включая предоставление отчета по валидации аналитического метода и не менее 20 % полученных хромато-

грамм, включая хроматограммы, подтверждающие базовую эндогенную концентрацию соединения и подробные расчеты поправки на нее [3].

Несоблюдение данных правил приводит к отрицательным результатам исследований БЭ.

Высокая вариабельность параметров фармакокинетики

Согласно наиболее часто используемому определению высоковариабельные лекарственные препараты (ВВП) – это препараты, у которых коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности (CV_{intra}), по крайней мере одного из 2 основных параметров БЭ (C_{max} и AUC), составляет ≥30 %. Другими словами, это препараты, чья скорость и степень всасывания демонстрирует высокую вариабельность у одного и того же субъекта при приеме лекарственного препарата в одинаковой дозировке. Это приводит к тому, что для таких препаратов очень проблематично продемонстрировать биоэквивалентность в исследовании со стандартным дизайном и в «классических» границах признания БЭ 80,00 – 125,00 % на небольшой выборке субъектов.

Вариабельность может быть обусловлена многими факторами, которые включают физиологические и патофизиологические различия абсорбции, пост-абсорбционное распределение, факторы, ассоциированные со свойствами фармацевтической субстанции, и факторы, ассоциированные с готовой лекарственной формой.

Таким образом, высоковариабельные лекарственные препараты – это лекарственные препараты с неустранимой высокой вариабельностью фармакокинетических параметров, а не любые лекарственные препараты, показавшие высокую вариабельность фармакокинетических параметров в исследовании БЭ по фармакокинетическим конечным точкам.

Если имеются предпосылки к отнесению лекарственного препарата к ВВП, необходимо использовать повторный дизайн исследования, т. к. при стандартном дизайне потребуется включение более 40 добровольцев для подтверждения БЭ. Общий принцип заключается в том, что для высоковариабельных препаратов в исследовании с повторным дизайном должна быть подтверждена высокая вариабельность фармакокинетического параметра референтного препарата. Дизайн может быть полным повторным – с тремя (каждый из добровольцев получает исследуемый или референтный препарат по два раза) или четырьмя периодами приема препаратов (каждый из добровольцев получает исследуемый и референтный препарат по два раза) и неполным повторным – с тремя периодами и одним перекрестом (каждый из добровольцев принимает референтный препарат не менее двух раз). Дизайны такого типа позволяют значительно сократить число субъектов, требуемых для достижения необходимой мощности в исследованиях БЭ высоковариабельного препарата. В исследовании БЭ с таким дизайном с использованием мультипликативной модели должен быть определен средний квадрат «ошибки» ($MSE = \sigma_{w^2}$) логарифмически преобразованных данных в рамках дисперсионного анализа ANOVA для референтного препарата. На основании полученного среднего квадрата ошибки референтного препарата и регуляторной константой $k = 0,76$ определяется граница признания БЭ.

Не рекомендуется использовать стандартный перекрестный дизайн исследования для высоковариабельных лекарственных препаратов, т. к. для

подтверждения БЭ в границах признания 80,00 – 125,00 % имеется высокий риск получить отрицательные результаты исследования или потребуется чрезмерное количество субъектов исследования и соответствующие финансовые затраты [111].

Широта терапевтического диапазона

Еще одним из факторов, влияющих на выбор дизайна исследования БЭ, является узость терапевтического диапазона для определенных ДВ.

Лекарственные препараты с узким терапевтическим диапазоном – это препараты, у которых терапевтический диапазон – разница между терапевтической и токсической сывороточными концентрациями ДВ – сужен относительно такового для большинства препаратов, что говорит о том, что такие препараты в терапевтических дозах могут вызывать серьезные нежелательные реакции.

Требования к препаратам, содержащим такие ДВ, более строгие. Для таких препаратов сужены границы признания БЭ до 90,00 — 111,11 % (EMA) или по аналогии с исследованиями БЭ ВВП (с повторным дизайном) нужно подтвердить, что вариабельность фармакокинетики воспроизведенного препарата будет эквивалентна референтному (FDA) [222].

В обоих случаях более строгие критерии признания БЭ могут привести к получению неблагоприятных результатов исследования, поэтому необходимо очень тщательно подойти к планированию исследованию БЭ и его проведению.

Энтерогепатическая рециркуляция

При энтерогепатической рециркуляции лекарственного вещества дизайн исследования должен учитывать возможное нарастание концентрации в терминальной части кривой. Если отбор проб не будет проводиться с достаточной частотой, то терминальная часть фармакокинетической кривой окажется без дополнительного прироста, и не будет объективно отражать фармакокинетику препарата [66, 131]. Примером таких соединений являются урсодезоксихолевая (рис. 8.1) и микофеноловая кислота (рис. 8.2).

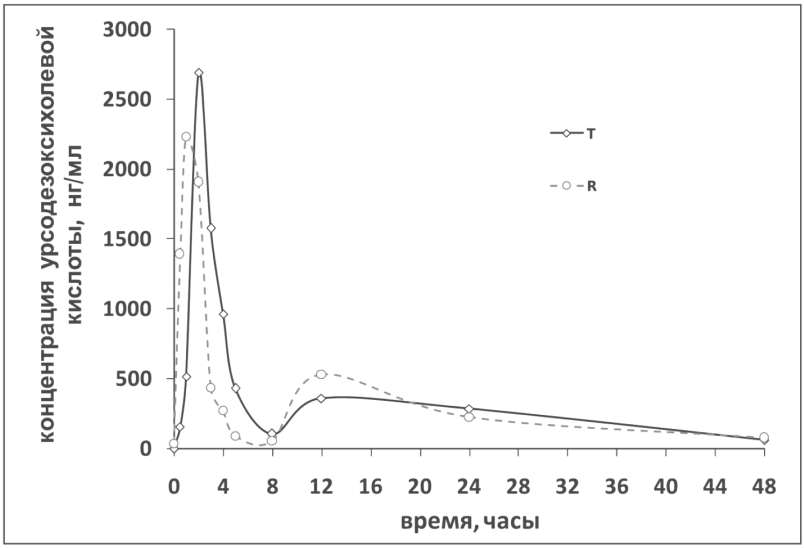


Рис. 8.1. Фармакокинетические профили уродезоксихолевой кислоты

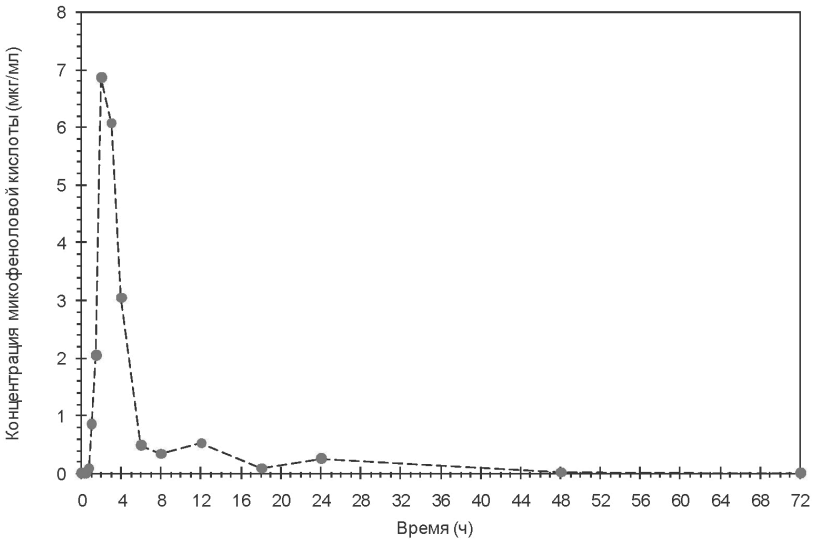


Рис. 8.2. Фармакокинетический профиль микофеноловой кислоты

8.3.2. Корректность определения размера выборки субъектов в исследование БЭ; внутрииндивидуальная и межиндивидуальная вариабельность; недостаточная статистическая мощность в исследованиях БЭ

Как уже было отмечено выше корректность определения размера выборки один из ключевых факторов получения положительного результата исследования БЭ, т. к. от размера выборки напрямую зависит мощность исследования.

Необходимое количество субъектов исследования для надежного исследования фармакокинетической БЭ определяется:

1) дисперсией ошибки (коэффициентом внутрииндивидуальной вариабельности – CV_{intra} или коэффициентом общей вариабельности – CV_{total}) основных показателей сравнения (AUC и C_{max}), которая рассчитывается на основании пилотного исследования, на основании предыдущих исследований или опубликованных данных;

2) уровнем достоверности/ошибки I типа (α=5 %);

3) желаемой статистической мощностью (не менее 80 %, если не обосновано иное);

4) средним отклонением от препарата сравнения сопоставляемого по биоэквивалентности, безопасности и эффективности (обычно в пределах 0,95–1,05);

5) потребностью расчета 90 % доверительного интервала для среднего геометрического значения соотношения параметров БЭ, который должен находиться в установленных границах БЭ, обычно принимаемых как 80,00 – 125,00 %.

Стоит отметить, что в случае перекрестного дизайна для расчета выборки следует использовать значения CV_{intra}, в случае параллельного – CV_{total}. Перекрестный дизайн более предпочтителен, чем параллельный, т. к. он позволяет отделить межиндивидуальную вариабельность (не зависит от лекарственного препарата) от внутрииндивидуальной вариабельности (зависит от лекарственного препарата).

Как правило, с целью сокращения финансовых затрат исследования БЭ проводятся на минимальном числе субъектов. Однако занижение размера выборки может привести к драматическим последствиям. Неправильно рассчитанное количество субъектов приведет к отрицательному результату исследования, т. к. с высокой долей вероятности (90 %) доверительные интервалы для среднего геометрического значения соотношения параметров БЭ не будут находиться в установленных границах и мощность исследования окажется недостаточной. Если статистическая мощность исследования будет недостаточной, то может быть ошибочно отвергнута гипотеза о том, что сравниваемые препараты являются биоэквивалентными [131].

8.4. ХИМИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ МОЛЕКУЛЫ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА ПРЕПАРАТА ИЛИ ЕГО МЕТАБОЛИТА. ОШИБКИ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Химическая нестабильность молекулы ДВ или обратная конверсия его метаболита может исказить результаты биоаналитического исследования [см. раздел 7]. Перед началом разработки новой методики необходимо изучить данные литературы по фармакокинетике изучаемого лекарственного препарата. Если при биотрансформации данное вещество метаболизируется в глюкуронид, N-оксид или лактон, то в рамках валидации необходимо оценить обратную конверсию. Основные способы стабилизации представлены в табл. 8.1.

Таблица 8.1. Основные способы стабилизации аналитов в биологических жидкостях

Группа веществ	Способ стабилизации	Примеры
Легкоокисляющиеся соединения	Добавление антиоксидантов (растворов аскорбиновой кислоты, натрия метабисульфита и др.)	метилдопа, допамин,
	Дериватизация	Метаболит прасугрела R-138727, каптоприл
	Хранение при температуре не выше –70 °С	4ß-гидроксихолестерол
N-оксиды	Добавление антиоксидантов, мягкие условия анализа	Хлорпромазин, вориконазол
Светочувствительные соединения	Хранение в светонепроницаемой таре	Витамин D, монтелукаст
Глюкурониды	Коррекция pH биологической пробы до значений ниже 6,0	Телмисартан, диклофенак

Группа веществ	Способ стабилизации	Примеры
Сложные эфиры	Коррекция pH, использование ингибиторов эстераз (фторида натрия, параоксона, эсерина и др.)	Осельтамивир, ацетилсалициловая кислота
Лактоны		Статины
Стереоизомеры	Создание сильнокислой pH среды	Оксазепам
	Добавление раствора аскорбиновой кислоты и N-этилмалеимида	Ретиноевая кислота

Таким образом, для стабилизации лекгоокисляющихся соединений необходимо использовать антиоксиданты или дериватизацию для предотвращения гидролиза сложных эфиров, лактонов – ингибиторы эстераз и коррекцию pH, для предотвращения гидролиза глюкуронидов – коррекцию pH, для предупреждения интерконверсии стереоизомеров – закисление среды. Однако выбор условий хранения необходимо начинать с использования более глубокой заморозки до температуры не выше -70 ºС или не выше -90 ºС [138].

Следует отметить, что наиболее часто к расхождению в фармакокинетических параметрах приводят ошибки при разработке состава нового препарата, применение другой технологии производства лекарственной формы и неправильный подбор параметров технологического процесса.

Отрицательный результат также может быть следствием некорректного дизайна исследования и неправильной статистической обработки. Причиной получения завышенных или заниженных биоаналитических данных является нестабильность лекарственного вещества или его метаболитов после отбора биообъектов. Данные факторы приводят к ложному заключению о неэквивалентности препаратов. Поэтому перед началом клинической части исследования необходима детальная проработка опубликованных литературных данных по фармакокинетике и химическим свойствам изучаемого ДВ.

9. БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЖИВОТНЫХ: МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРИГИНАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА РЕВАЗОЛ В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫСЫ И КРОЛИКА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

Ревазол – новое лекарственное средство для лечения ревматоидного артрита на основе амида 3-имидазолзамещенной-4,5-дигидроизоксазолкарбоновой кислоты (рис. 9.1), механизм действия которого основан на блокаде PAR-2 – рецепторов, локализованных на мембранах клеток иммунной системы. Разработка данного препарата ведется на базе Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова (Ярославль).

Важнейшим этапом доклинического исследования является изучение фармакокинетики субстанции и лекарственной формы нового препарата. Для определения концентрации данного лекарственного вещества в плазме крови лабораторных животных был выбран метод ВЭЖХ-МС/МС, который обладает высокой чувствительностью и селективностью, что позволяет определять низкие концентрации аналита в биологических жидкостях при минимальной пробоподготовке [126, 127]

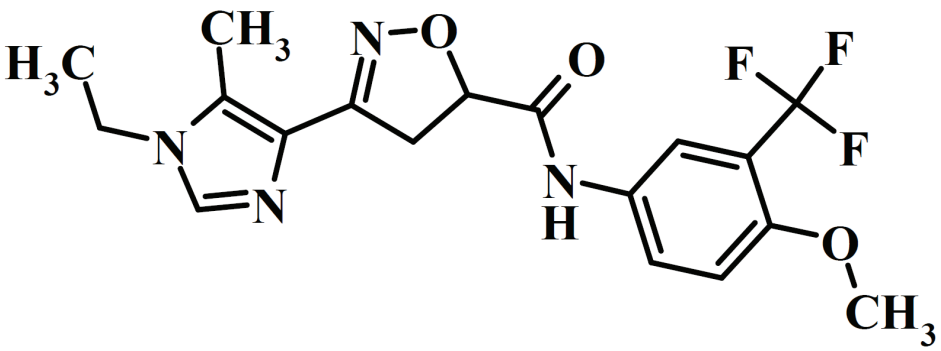


Рис. 9.1. Структурная формула ревазола.
НазваниепоИЮПАК:3-(1-Этил-5-метил-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил) фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид

Стандартные растворы ревазола готовились путем растворения точных навесок субстанции в ацетонитриле. Рабочие растворы (РР) аналита получали разведением аликвот стандартного раствора в мерных колбах. Для приготовления калибровочных образцов и образцов контроля качества (КК) к 190 мкл бланковой плазмы 10 мкл РР определенной концентрации. При этом концентрации определяемого вещества в калибровочных образцах и образцах КК (для оценки точности и прецизионности) составили соответ-

ственно 0,15; 0,50; 1,00; 2,50; 7,50; 12,50; 17,50; 22,5 мкг/мл и 0,15; 0,45; 10,00; 18,00 мкг/мл.

Приготовление основного раствора внутреннего стандарта (ВС) – толбутамида осуществлялось путем растворения точной навески субстанции 0,01 г в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл. Рабочий раствор ВС готовился путем растворения аликвоты 0,5 мл основного раствора в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл.

В качестве метода пробоподготовки использовалось осаждение белков. Для этого к 25 мкл плазмы добавляли 500 мкл ацетонитрильного раствора толбутамида в концентрации 0,5 мкг/мл, полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 с, затем центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об./мин. Затем надосадочная жидкость подвергалась хромато-масс-спектрометрическому определению.

Для хроматографического разделения была использована колонка Agilent Poroshell 120-EC-C18 (50*3,0 мм, 2,7 мкм) с предколонкой Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (12,5*2,1 мм, 5,0 мкм). В качестве подвижной фазы (ПФ) применяли систему растворителей ацетонитрил – вода в соотношении 50:50 (об./об.) при скорости потока 0,4 мл/мин. Температура термостата колонок составила 40 °С, термостата автосемплера – 4 °С. Масс-спектрометрическое детектирование осуществлялось в режиме регистрации положительных ионов в режиме MRM: ревазола 397→136 *m/z*; для Толбутамида – 271→91 *m/z*. Время анализа составило 3,2 мин.

Результаты валидации методики

Валидация разработанной методики проводилась согласно требованиям руководств ЕМА [221], Руководства по экспертизе лекарственных средств НЦЭСМП (Т. 1) [69].

При оценке селективности на хроматограммах образов бланковой плазмы, полученных из 6 независимых источников (плазма крыс и кроликов, включая гемолизированную), площади пиков эндогенных компонентов в области времени удерживания ревазола имели незначительную величину – 5,59 % от площади пика образца НПКО, что удовлетворяет критериям приемлемости (менее 20 % от образца НПКО). В области времени удерживания ВС хроматографические пики отсутствовали (рис. 9.2). При этом правильность на уровне нижнего предела количественного определения методики 0,15 мкг/мл составила 94,0 %, прецизионность (CV) – 3,11 %.

Линейность методики была подтверждена в диапазоне концентраций 0,15 – 22,50 мкг/мл: коэффициент корреляции 8-точечных калибровочных кривых, построенных по соотношению площадей пиков «аналит/внутренний стандарт», находился в диапазоне от 0,9958 до 0,9995 (весовой коэффициент $1/x^2$).

Результаты исследования внутрисерийной и межсерийной точности и прецизионности представлены в табл. 9.1. Полученные результаты отвечают критериям приемлемости – правильность находится в диапазоне от 85 до 115 %, коэффициент вариации не превышает 15 %. Разведение образцов плазмы с концентрацией ревазола 36,0 мкг/мл в 2 раза не повлияло на точность методики: она составила 99,2 % (при n=6).

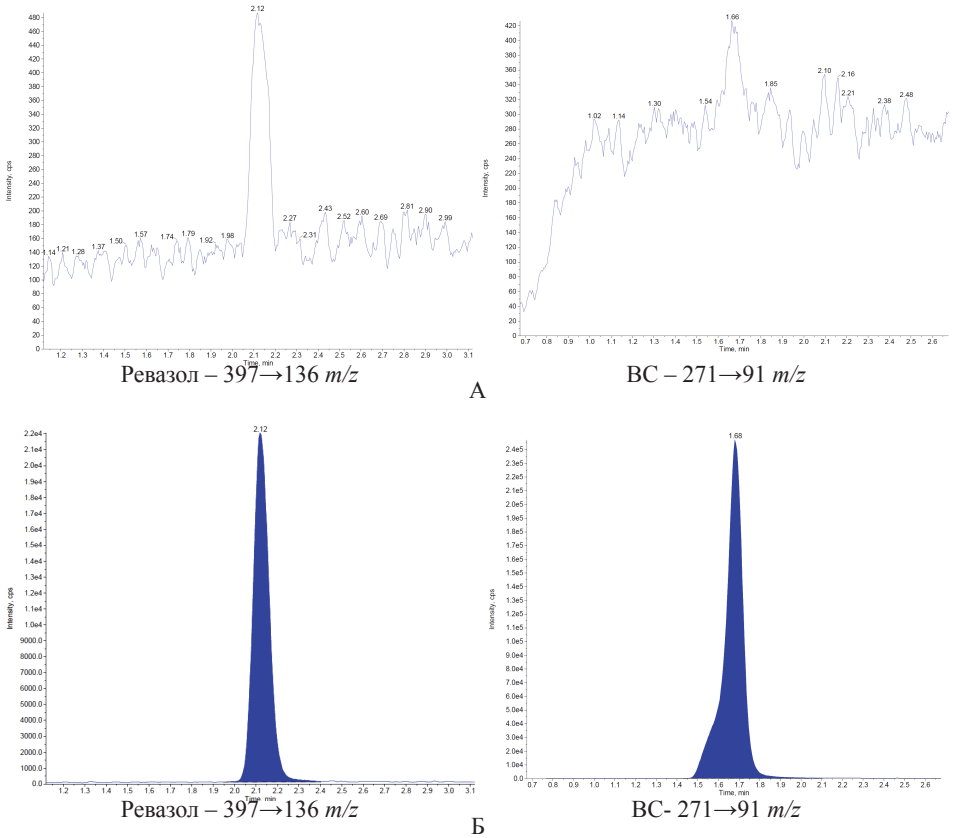


Рис. 9.3. Хроматограммы бланковой плазмы (А) и калибровочного образца ревазола в концентрации 0,15 мкг/мл (Б)

Таблица 9.1. Оценка прецизионности и правильности методики определения ревазола в плазме

Концентрация, мкг/мл	0,15	0,45	10,00	18,00
Внутрисерийная прецизионность и правильность (серия 1)				
Сред. знач.	0,140	0,450	9,720	16,500
SD	0,004	0,014	0,241	0,572
CV, %	3,11	3,10	2,477	3,464
Правильность, %	94,0	102,7	99,5	89,6
Внутрисерийная прецизионность и правильность (серия 2)				
Сред. знач.	0,156	0,495	10,800	18,200
SD	0,009	0,018	0,442	0,532
CV, %	5,996	3,563	4,092	2,921
Правильность, %	105,4	102,7	94,4	99,1

Концентрация, мкг/мл	0,15	0,45	10,00	18,00
Межсерийная прецизионность и правильность				
Сред. знач.	0,150	0,463	10,255	16,567
SD	0,011	0,015	0,463	0,988
CV, %	7,619	3,277	4,515	5,966
Правильность, %	99,889	102,833	102,550	92,037

Перенос исследуемого вещества из предыдущей пробы удалось преодолеть за счет ввода ацетонитрила между анализами образцов плазмы. Очистка иглы после ввода пробы осуществлялась путем последовательной промывки диметисульфоксидом, изопропанолом и ацетонитрилом. Перенос ВС из предыдущей пробы отсутствовал.

Оценка матричных эффектов проводилась на двух уровнях концентраций: 0,45 мкг/мл (нижний уровень), 18,00 мкг/мл (верхний уровень). При этом использовалась плазма, полученная от 6 разных кроликов и крыс. Как видно из данных, представленных в табл. 9.2, коэффициент вариации нормализованного фактора матрицы не превышает 15 %, что отвечает критериям приемлемости.

Таблица 9.2. Изучение матричных эффектов при количественном определении ревазола в плазме крови крыс и кроликов

Концентрация ревазола, мкг/мл	0,45	18,00
Фактор матрицы аналита	0,850	0,770
Фактор матрицы ВС	0,850	0,760
Нормализованный фактор матрицы	0,991	1,017
CV нормализованного фактора матрицы, %	3,211	1,750

Таким образом, разработанная экспрессная методика количественного определения ревазола в плазме крови крыс и кроликов методом ВЭЖХ-МС/МС отвечает всем требованиям, установленным международными и российскими руководствами по валидации. Данная методика была использована при изучении фармакокинетики субстанции исследуемого вещества на крысах и его капсулированной лекарственной формы на кроликах.

10. ОПЫТ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В РФ

10.1. СТРУКТУРА КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ В РФ

В Российской Федерации воспроизведенные препараты составляют значительную часть рынка лекарственных средств (ЛС) и их количество постоянно возрастает, поэтому вопросам оценки эффективности и безопасности при их регистрации уделяют большое внимание [7, 58]. Вне зависимости от производителя к дженерикам, точно так же, как и к оригинальным препаратам, предъявляются жесткие требования [73, 74].

В целом следует отметить, что с выходом 61-ФЗ в Российской Федерации значительно увеличилось количество клинических исследований, в первую очередь, локальных производителей (табл. 10.1).

Таблица 10.1. Количество одобренных клинических исследований в Российской Федерации в хронологической динамике

Год/месяц	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Январь	56	64	42	40	66	47
Февраль	71	67	56	63	79	67
Март	93	74	71	50	80	66
Апрель	90	82	67	71	77	57
Май	101	43	64	50	67	57
Июнь	66	74	64	73	83	64
Июль	7	74	66	66	80	
Август	122	63	61	58	82	
Сентябрь	81	63	53	79	78	
Октябрь	103	79	66	73	68	
Ноябрь	69	50	69	81	67	
Декабрь	57	58	74	100	71	
Всего	916	791	751	804	898	

В 2015 году инициировано почти равное количество исследований оригинальных препаратов – 394 (49 %) и дженериков – 409 (51 %). Преобладали исследования биоэквивалентности – 293 (36 %). Среди исследований биоэквивалентности на первом месте стояли исследования нестероидных противовоспалительных средств – 22 (7,6 %). До утверждения Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза в качестве препарата сравнения следовало использовать соответствующий оригинальный препарат, если он официально зарегистрирован в Российской Федерации, или его аналог, нашедший в Российской Федерации наиболее широкое медицинское применение [85, 105].

Однако в настоящее время при выборе референтного лекарственного препарата исходят из следующей последовательности:

а) оригинальный лекарственный препарат, качество, безопасность и эффективность которого были установлены при регистрации в Союзе («зарегистрированный в Союзе оригинальный препарат»);

б) оригинальный лекарственный препарат, зарегистрированный в государстве, где уровень требований к регулированию фармацевтического рынка не ниже уровня, установленного в Союзе, при невозможности выполнения подпункта «а» настоящего пункта;

в) воспроизведенный лекарственный препарат, зарегистрированный в каждом из государств-членов и подтвердивший свою биоэквивалентность оригинальному лекарственному препарату (при одобрении Экспертным комитетом при Комиссии) при невозможности выполнения подпунктов «а» и «б» настоящего пункта;

г) лекарственный препарат, имеющий опыт применения на территории одного из государств-членов не менее 25 лет (при одобрении Экспертным комитетом по лекарственным препаратам при Евразийской экономической комиссии) при невозможности выполнения подпунктов «а» – «в» [105].

Таблица 10.2. Структура рассматриваемых клинических исследований по нозологиям в 2016 г.*

Нозология	Количество (%)
Биоэквивалентность	404 (23,9 %)
Терапия	363 (21,5 %)
Онкология	328 (19,4 %)
Педиатрия	117 (6,9 %)
Ревматология	104 (6,2 %)
Неврология	78 (4,6 %)
Дерматология	40 (2,4 %)
Психиатрия	38 (2,2 %)
Вакцины	28 (1,7 %)
Другие	190 (11,2 %)
Итого:	1690 (100 %)

*данные из отчета Совета по этике Минздрава России (первичные и повторные рассмотрения).

Всего за 2016 год, согласно отчету Совета по этике Минздрава России, рассмотрено 404 (23,9 %) досье по биоэквивалентности (табл. 10.2) [130], при этом выдано 316 разрешений (табл. 10.3) [39].

Таблица 10.3. Структура одобренных в России КИ

Год	Всего	ММКИ	Локальные КИ (иностранные спонсоры)	БЭ (иностранные спонсоры)	Локальные КИ (российские спонсоры)	БЭ (российские спонсоры)
2016	897	302	82	146	197	170
2015	804	289	52	143	167	153
2016 vs	11,6	4,5	57,7	2,1	18,0	11,1
2016 vs 2015, %	11,6	4,5	57,7	2,1	18,0	11,1

Исследования биоэквивалентности были проведены с препаратами из 24 фармакотерапевтических групп. Чаще других планировалось исследовать средства для лечения ВИЧ-инфекции (16 КИ), кроме того 4 КИ с препаратами для лечения ВИЧ-инфекции в комбинациях. На втором месте находились исследования гипогликемических препаратов (12 КИ). Затем следуют исследования противовирусных средств, кроме средств для лечения ВИЧ инфекции (7 КИ). В дальнейшем чаще других планировалось исследовать нейролептики, ноотропы, противоэпилептические средства, противовирусные средства, противомикробные препараты, гиполипидемические средства, противоопухолевые средства, эстрогены, гестагены, их гомологи и антагонисты (по 4 КИ) [84].

Всего за 6 месяцев 2017 года было одобрено 358 КИ, в то же время данный показатель за 2013, 2014, 2015 и 2016 гг. составляет 404, 364, 347 и 452 КИ соответсвенно [111,130]. Однако анализ данных за январь 2017 года показал снижение количества одобренных клинических исследований (КИ) лекарственных препаратов по сравнению с прошлым месяцем и по сравнению с аналогичным периодом 2016 года. Распределение количества исследований по фазам в январе 2017 года не отличается от предыдущего месяца – доля исследований биоэквивалентности составила 32 % от всех инициированных исследований (в декабре 2016 – 30 %). В январе этого года 17 (36 %) КИ инициировали отечественные спонсоры и 30 (64 %) – зарубежные. Среди всех исследований более чем в половине случаев будут изучены оригинальные препараты (25 КИ, 53 %), в остальных случаях предметом исследований станут дженерики (22 КИ, 47 %). В 2016 году данный показатель был выше примерно в 1,4 раза (45 %). Исследования биоэквивалентности будут проведены с препаратами из 14 фармакотерапевтических групп. Чаще других планируется исследовать анксиолитики (2 КИ) [84].

В рамках программы соблюдения требований GCP в исследованиях биоэквивалентности выполняются инспекционные проверки и контрактными исследовательскими организациями. В результате выявлено много недостатков общего характера: неправильное составление протоколов (31 %), недостаточное обеспечение защиты испытуемых (19 %), отсутствие определения обязанностей исследователя (28 %), распределения обязанностей между спонсором и организаторами клинического исследования (24 %) и т. д. Нередко отмечали ошибки в биоаналитической части исследования (использование невалидированных методик, аппаратуры и т. п.), некорректность проведения статистического анализа. Часто наблюдали неправильное ведение документации (не указан спонсор, методы анализа фармакокинетических параметров, обоснование применения статистических методов), ошибки в сохранении данных, трудность доступа к ним. Иногда спонсоры не проводили мониторинг и аудит исследований в необходимом объеме, возникали сомнения в аутентичности результатов лабораторных и инструментальных методов исследований. Кроме того, нередко исходные данные вообще невозможно было найти [131].

Аналитический метод в исследованиях биоэквивалентности должен обеспечивать избирательное, точное и воспроизводимое определение концентрации препаратов при выбранных условиях в соответствии с утвер-

жденным протоколом фармакокинетического исследования. Фармакокинетические исследования проводятся в независимых (от фирм изготовителей) сертифицированных аналитических лабораториях [111].

Важнейшим условием получения достоверных результатов исследований биоэквивалентности актуальным, как для России, так и для других государств, является контроль за качеством на всех этапах выполнения данных исследований.

10.2. РЕЗУЛЬТАТЫ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НЕКОТОРЫХ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

В данном разделе представлены результаты изучения сравнительной фармакокинетики и бтоэквивалентности различных лекарственных препаратов с описанием клинической и биоаналитической частей исследований.

Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности комбинации препаратов амлодипина и валсартана

К современным стратегиям гипотензивной терапии, которые обеспечивают долговременную приверженность пациента лечению и антигипертензивную эффективность, необходимую для достижения целевых уровней давления, относится применение фиксированных (в 1 таблетке) комбинаций гипотензивных препаратов различных классов с установленной эффективностью, хорошей переносимостью и дополнительными преимуществами у определенных категорий пациентов, в частности блокаторы кальциевых каналов, производными дигидропиридина пролонгированного действия (амлодипин) и антагониста ангиотензиновых рецепторов II (валсартан) [47, 263, 328].

В результате клинических исследований установлено, что комбинация амлодипин + валсартан имеет аддитивный антигипертензивный эффект, снижая давление в большей степени, чем каждый из компонентов отдельно [51].

Также показано, что эта комбинация имеет благоприятный профиль переносимости, а дополнительные механизмы действия компонентов минимизируют их характерные побочные эффекты. Так, частота возникновения периферических отеков при применении комбинации амлодипин + валсартан была значимо ниже по сравнению с монотерапией амлодипином. Преимущества фиксированной комбинации амлодипин + валсартан продемонстрированы в клинических исследованиях у пациентов с гипертонией различной степени тяжести, в том числе при неэффективности предшествующей моно- и комбинированной терапии. Фиксированная комбинация амлодипин + валсартан может не только улучшить контроль давления у пациентов с гипертонией, но также обеспечить долговременную привержен-

ность лечению, способствуя, таким образом, максимальной защите от поражения органов-мишеней.

Исходя из всего вышеизложенного, можно утверждать, что препарат амлодипин+валсартан является эффективным и безопасным комплексным средством для лечения артериальной гипертензии пациентам, которым показана комбинированная терапия. Появление новых дженериков комбинации амлодипин + валсартан обеспечит в ближайшем будущем существенное снижение стоимости лечения артериальной гипертензии и повысит доступность лечения пациентов в РФ. Таким образом, целью настоящей работы являлось исследование биоэквивалентности оригинальной и воспроизведенной комбинации лекарственных препаратов амлодипина и валсартана.

Важность исследования подчеркивается тем, что один из компонентов исследуемой фиксируемой комбинации – амлодипин, входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2017 год [76].

Материалы и методы исследования

Данное исследование проводилось как исследование биоэквивалентности с целью доказательства эквивалентности воспроизведенного лекарственного препарата референтному лекарственному препарату по фармакокинетическим параметрам, т. е. биоэквивалентыми признаются два препарата, если они обладают одинаковыми степенью и скоростью всасывания, распределения и вывода ЛС из организма в равных условиях [69, 111].

Дизайн подобных исследований требует участия здоровых добровольцев и отсутствие приема ими любых лекарственных препаратов и веществ, влияющих на функцию ферментов печени [80, 84, 111].

Исследуемые препараты

В качестве тест-препарата (Тест; Т) использовали воспроизведенный препарат амлодипин+валсартан, в качестве препарата сравнения (Референс; R) использовался оригинальный препарат амлодипин+валсартан.

Дизайн исследования

Дизайн исследования соответствовал утвержденному протоколу исследования, а также требованиям «Надлежащей клинической практики» (GCP).

В исследовании принимали участие здоровые добровольцы обоего пола в возрасте 18–45 лет. Всего был скринирован 81 доброволец, из них 58 было рандомизировано, 17 человек – скрининговые неудачи, 6 человек включены в исследование в качестве дублеров, выбыли из исследования 4 добровольца. Таким образом, в популяцию для оценки безопасности вошло 58 добровольцев.

Завершили исследование по протоколу 54 добровольца, однако данные одного из 54 добровольцев исключены из фармакокинетической популяции. Следовательно, популяцию для оценки фармакокинетики составили 53 добровольца. Средний возраст добровольцев популяции анализа составил 27,23±7,16 лет, рост 170,70±9,97 см, масса тела 68,99±11,76 кг, средний ИМТ 23,78±3,31 кг/м^2.

Исследование проходило на базе клинического центра Негосударственное учреждение здравоохранения «Дорожная клиническая больница на станции Ярославль открытого акционерного общества «Российские железные дороги».

В соответствии с дизайном и схемой процедур исследование состояло из периода скрининга, 2-х периодов исследования и 1-го периода «отмывания». Скрининговый период длился 7 суток. Каждый период исследования длился около 3,5 суток. Период «отмывки» – 21 день. Общая продолжительность исследования – для добровольцев составила около 32 суток.

После подписания информированного согласия добровольцы проходили физикальный осмотр, лабораторные исследования крови и мочи, анализ мочи на следы наркотиков, тест на содержание алкоголя в выдыхаемом воздухе и тест мочи на беременность для женщин (проводились также перед каждой госпитализацией добровольцев), ЭКГ. Лабораторные исследования крови и мочи, ЭКГ также проводились в промежуточный период, во 2 периоде исследования и на визите завершения исследования.

Для удобства рандомизации и проведения исследования добровольцы были распределены на два блока: блок А (24 добровольца), блок В (34 добровольца). Отбор проб для определения концентраций валсартана осуществлялся у добровольцев обоих блоков, тогда как отбор проб для определения концентраций амлодипина осуществлялся только у добровольцев блока А.

В каждом периоде у добровольцев блока А отбиралось 23 пробы крови по 6 мл, у добровольцев блока В – 20 проб крови по 4 мл, кроме того проводился дополнительный забор при скрининге не более 18 мл, перед началом 2 периода и по завершении исследования – не более 12 мл.

График отбора проб у добровольцев блока А: 0 мин (до приема препарата); 30 мин,1 ч, 1 ч 20 мин, 1 ч 40 мин, 2 ч, 2 ч 20 мин, 2 ч 40 мин, 3 ч, 3 ч 30 мин, 4 ч, 4 ч 30 мин, 5 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 14 ч, 16 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч, 72 ч (всего 23 пробы).

График отбора проб у добровольцев блока В: 0 мин (до приема препарата); 30 мин; 1 ч; 1 ч 20 мин; 1 час 40 мин; 2 часа; 2 ч 20 мин; 2 ч 40 мин; 3 ч; 3 ч 30 мин; 4 ч; 4 ч 30 мин; 5 ч; 6 ч; 8 ч; 10 ч; 12 ч; 16 ч; 24 ч; 36 ч (всего 20 проб).

Аналитический метод

Определение амлодипина и валсартана в плазме крови производилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Подготовка фармакокинетических образцов

Для каждой временной точки кровь в объеме 4 мл отбиралась в предварительно маркированные полипропиленовые пробирки, обработанные K_2ЭДТА. Плазму отделяли центрифугированием в течение 8 минут при 2000 g при температуре 4 ± 4°C не позднее 30 минут после отбора пробы крови. Сразу после центрифугирования полученная плазма из каждой пробирки в равных объемах переносилась в 2 полипропиленовые пробирки (обозначенные как первая и дублирующая). Для промежуточного хранения пробирки помещали в вертикальном положении в ящике с сухим льдом. Образцы

плазмы хранились в морозильнике при температуре -20 ºС или ниже до отправки в лабораторию фармакокинетики.

Статистический анализ

Оценка фармакокинетических параметров была проведена с использованием программы WinNonlin (PharsightCorp., USA).Статистическая обработка данных была проведена с помощью программы SAS (The SAS InstituteInc., USA). Оформление результатов выполнялось в соответствии с «Руководством по экспертизе лекарственных средств» (Москва, 2014).

Статистический анализ выполнялся в один этап после завершения биоаналитических процедур и расчета фармакокинетических параметров.

Гипотеза о биоэквивалентности формулировалась в терминах отношения сравниваемых параметров:

1. Нулевая гипотеза об отсутствии эквивалентности:

H0: μT / μR< Q1 или μT / μR> Q2.

2. Соответствующая альтернативная гипотеза о наличии биоэквивалентности:

HA: Q1 ≤ μT / μR ≤ Q2, где

Q1 и Q2 – нижняя и верхняя принятые допустимые границы биоэквивалентности, а μT и μR – генеральные средние показатели сравнения для испытуемого лекарственного средства и препарата сравнения, соответственно.

Предполагалось, что AUC и C_{max} имеют ln-нормальное распределение, а все остальные параметры, исключая T_{max}, – нормальное распределение. Для T_{max} возможно использовать только непараметрический метод дисперсионного анализа (с использованием ANOVA Wilcoxon теста) и медианный тест (с использованием SAS-процедуры NPAR1WAY). В соответствии с этим положением сравнение средних значений параметров исследуемого и референтного препаратов проводилось на основе мультипликативной модели, а доверительные интервалы строятся для отношений соответствующих средних значений.

После проведения логарифмического преобразования эти показатели анализировались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA, параметрический метод).

Учитывались следующие факторы, вносящие вклад в наблюдаемую вариацию данных:

3. Различия между испытуемыми (межиндивидуальные различия);

4. Различия между лекарственными средствами;

5. Порядок приема препаратов.

Также был проведен дисперсионный анализ для определения статистической значимости фактора блок. Вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов был сделан с использованием подхода, основанного на оценке 90 % доверительных интервалов для отношений геометрических средних исследуемых фармакокинетических параметров. Препараты считаются биоэквивалентными, если границы оцененного доверительного интервала находятся в пределах:

Для Амлодипина

$AUC_{0–72}$ 80,00 – 125,00 %

C_{max} 80,00 – 125,00 %

Для Валсартана

AUC_{0-t} 80,00 – 125,00 %

C_{max} 80,00 – 125,00 %

Биоэквивалентными препараты считаются при подтверждении биоэквивалентности для обоих компонентов (амлодипин и валсартан).

Результаты

Данное исследование подтвердило биоэквивалентность исследуемых препаратов: 90 %-ные доверительные интервалы для основных параметров находились в пределах приемлемого диапазона биоэквивалентности, т.е. нулевая гипотеза неэквивалентности для соответствующего параметра была отклонена (табл. 10.1).

Таблица 10.1. Доверительные интервалы (ln- преобразованное распределение)

Параметр	Геометрические средние значения наименьших квадратов				Отношение T/R (%)	90 % доверительный интервал (%)		БЭ
	N	Тест.	N	Реф.		Нижний предел	Верхний предел	
ADP (Амлодипин)								
$AUC_{(0–72h)}$ (нг·ч/мл)	22	181.014	22	181.263	99.86	94.76	105.24	ДА
C_{max} (нг/мл)	22	5.113	22	5.089	100.46	92.78	108.79	ДА
VST (Валсартан)								
$AUC_{(0-t)}$ (мкг·ч/мл)	53	29.235	53	27.435	106.56	94.93	119.61	ДА
$AUC_{(0-\infty)}$ (мкг·ч/мл)	53	30.685	53	28.892	106.20	94.90	118.85	ДА
C_{max} (мкг/мл)	53	4.889	53	4.773	102.42	90.41	116.03	ДА

Геометрические средние значения наименьших квадратов не совпадают со значениями геометрических средних для VST, потому что исследование для VST не является сбалансированным по последовательностям.

Результаты и их обсуждение

На основании полученных данных о зависимости «концентрация – время» для каждого добровольца были рассчитаны индивидуальные фармакокинетические параметры, необходимые для оценки биоэквивалентности сравниваемых препаратов. Рассчитанные значения таких фармакокинетических параметров изученных препаратов статистически достоверно не различаются, а разброс индивидуальных значений идентичен для двух препаратов.

На рис. 10.1 представлены усредненные фармакокинетические кривые амлодипина/валсартана в образцах плазмы добровольцев после приема препаратов исследования).

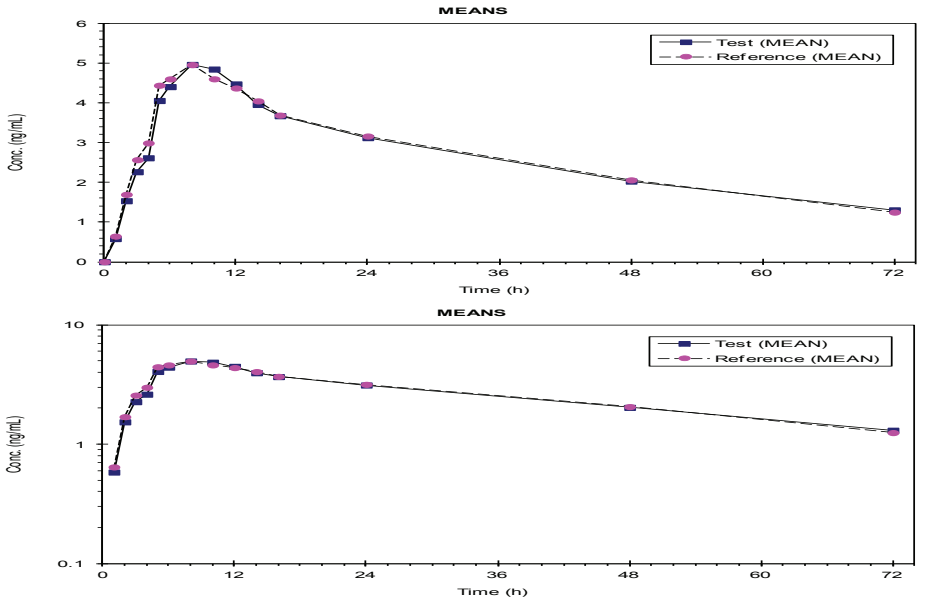


Рис. 10.1. Усредненные фармакокинетические кривые амлодипина/валсартана в образцах плазмы добровольцев после приема препаратов исследования ADP – Средние для 22 добровольцев (линейная и полулогарифмическая шкала)

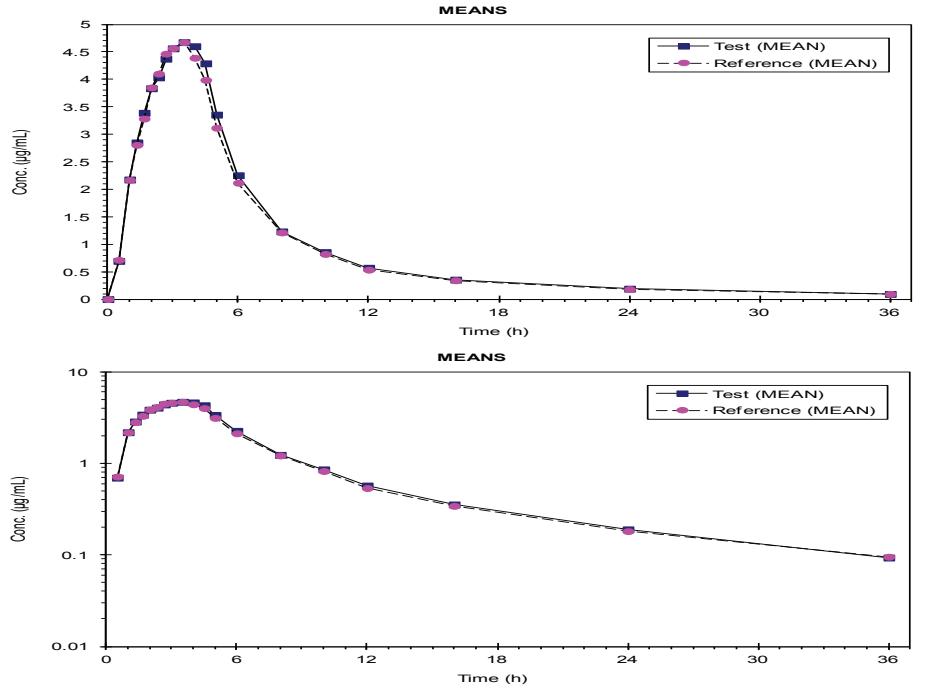


Рис. 10.2. Усредненные фармакокинетические кривые амлодипина/валсартана в образцах плазмы добровольцев после приема препаратов исследования ADP – Средние для 53 добровольцев (линейная и полулогарифмическая шкала)

Согласно полученным результатам 90 %-ные доверительные интервалы для основных параметров находились в пределах приемлемого диапазона биоэквивалентности, т. е. нулевая гипотеза неэквивалентности для соответствующего параметра была отклонена. Данное исследование подтвердило биоэквивалентность.

Влияние препарата, периода и последовательности для ADP было признано незначимым на 5 %-ом уровне значимости для $AUC_{(0–72h)}$ и Cmax.

Влияние препарата, периода и последовательности для VST было признано незначимым на 5 %-ом уровне значимости для $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, и Cmax. Влияние фактора блок для VST было признано незначимым на 5 %-ом уровне значимости согласно результатам проведенного анализа.

Различие между исследуемым препаратом и препаратом сравнения для tmax было найдено статистически незначимым в соответствии с непараметрическим медианным критерием и критерием Уилкоксона для VST, но значимым для ADP.

Таблица 10.2. ADP Резюме арифметических средних

Параметр	Исследуемый препарат			Препарат сравнения			Отношение T/R (%)
	N	MEAN	± SD	N	MEAN	± SD	
$AUC_{(0–72h)}$(нг·ч/мл)	22	186.598	46.185	22	188.409	50.891	99.04
C_{max}(нг/мл)	22	5.250	1.192	22	5.279	1.348	99.45
t_{max}(ч)	22	8.27	1.96	22	7.23	2.02	114.48
λ_z($ч^{-1}$)	22	0.01881	0.00417	22	0.01982	0.00343	94.88
$t_{1/2}$(ч)	22	38.83	9.50	22	36.01	6.43	107.83

Таблица 10.3. ADP Резюме геометрических средних

Параметр	Исследуемый препарат			Препарат сравнения			Отношение T/R (%)
	N	MEAN	CV (%)	N	MEAN	CV (%)	
$AUC_{(0–72h)}$ (нг·ч/мл)	22	181.014	4.91	22	181.263	5.65	99.86
C_{max} (нг/мл)	22	5.113	14.73	22	5.089	17.84	100.46

t_{max} медиана (диапазон):

Исследуемый препарат: 8.00ч (5.00ч – 12.00ч)

Препарат сравнения: 8.00ч (4.00ч – 12.00ч)

Таблица 10.4. VST Резюме арифметических средних

Параметр	Исследуемый препарат			Препарат сравнения			Отношение T/R (%)
	N	MEAN	CV (%)	N	MEAN	CV (%)	
$AUC_{(0-t)}$ (мкг·ч/мл)	53	32.403	15.037	53	31.404	17.098	103.18
$AUC_{(0-\infty)}$ (мкг·ч/мл)	53	33.864	15.495	53	32.980	17.771	102.68
C_{max} (мкг/мл)	53	5.412	2.471	53	5.378	2.731	100.62
t_{max} (ч)	53	3.09	1.03	53	2.94	0.96	105.14
λ_z ($ч^{-1}$)	53	0.07713	0.02460	53	0.08078	0.03024	95.48
$t_{1/2}$ (ч)	53	9.94	3.34	53	9.62	3.11	103.33

Таблица 10.5. VST Резюме геометрических средних

Параметр	Исследуемый препарат			Препарат сравнения			Отношение T/R (%)
	N	MEAN	CV (%)	N	MEAN	CV (%)	
$AUC_{(0-t)}$ (мкг·ч/мл)	53	29.154	13.91	53	27.396	16.26	106.42
$AUC_{(0-\infty)}$ (мкг·ч/мл)	53	30.685	13.38	53	28.892	15.83	106.20
C_{max} (мкг/мл)	53	4.875	29.80	53	4.768	32.20	102.24

t_{max} медиана (диапазон):

Исследуемый препарат: 3.00ч (1.50ч – 4.50ч)

Препарат сравнения: 3.00ч (1.33ч – 4.50ч)

В данном исследовании было установлено, что исследуемые препараты биоэквивалентны.

Результаты оценки безопасности

С момента подписания информированных согласий до окончания наблюдения за добровольцами было выявлено 161 нежелательное явление у 50 добровольцев. При анализе данных безопасности и переносимости учитывались все добровольцы, прошедшие рандомизацию и принявшие хотя бы одну дозу исследуемых препаратов. Таким образом, в анализ безопасности не вошли 5 НЯ, которые возникли до приема препаратов, а именно: снижение АД – 3, головокружение – 2.

После приема препарата сравнения было зарегистрировано 83 НЯ: гипотензия – 49, тахикардия – 16, тошнота – 1, брадикардия – 3, головная боль – 6, гипертензия – 2, рвота – 2, сонливость – 3, головокружение – 1. После приема исследуемого препарата было зарегистрировано 73 НЯ: брадикардия – 2, головная боль – 5, ОРЗ – 1, потеря сознания – 1, рвота – 3, гипотензия – 42, тахикардия – 16, головокружение – 1, сонливость – 2.

У 37 добровольцев развилось 2 и более НЯ, у 13 добровольцев – по одному НЯ. НЯ не отмечались у 5 добровольцев.

В одном случае тяжесть НЯ была расценена как «умеренная» – потеря сознания, во всех остальных – «легкая». Определенная связь с приемом препарата была отмечена в 28 случаях, возможная связь с приемом препарата отмечена в 36 случаях, вероятная – в 90 случаях, сомнительная – в 6 случаях, неклассифицируемая – в 1 случае. После приема исследуемого препарата определенная связь с препаратом развившегося НЯ была отмечена в 14 случаях, вероятная – в 41 случае, возможная – в 16 случаях, сомнительная – в 1 случае, неклассифицируемая – в 1 случае.

После приема препарата сравнения определенная связь с препаратом развившегося НЯ была отмечена в 14 случаях, вероятная – в 48 случаях, возможная – в 20 случаях, сомнительная – в 1 случае. Во всех случаях исходом НЯ являлось выздоровление. В 3 случаях возникшие НЯ (рвота у добровольца №32, ОРЗ у добровольца №11, брадикардия и гипотензия у добровольца №25) потребовали выведения добровольца из исследования.

Серьезных нежелательных явлений, а также случаев возникновения беременности выявлено не было.

Заключение

В данном исследовании было установлено, что исследуемые препараты показали биоэквивалентные результаты. Данное отделение имеет ограниченный доступ, и вход в него осуществляется только под контролем медицинского персонала. Выполнение процедур протокола добровольцами контролировалось персоналом клинического центра. Осуществление процедур исследовательской командой регулируется СОПами клинического центра. Заключение по безопасности препарата было сделано исходя из сравнительной оценки параметров безопасности при приеме исследуемого препарата (T) и препарата сравнения (R).

С учетом полученных в ходе исследования результатов был сделан вывод о сопоставимом профиле безопасности исследуемых препаратов.

Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов мемантина

В рамках открытого рандомизированного перекрестного исследования сравнительной фармакокинетики изучена биоэквивалентность воспроизведенного препарата мемантина в форме раствора для приема внутрь, 10 мг/мл и оригинального препарата мемантина в форме таблеток, покрытых пленочной оболочкой, 20 мг при однократном приеме у здоровых добровольцев. Определение мемантина в плазме крови производилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс - спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Для оценки биоэквивалентности использовались параметры $AUC_{(0–72h)}$ и C_{max} для мемантина. Препараты были признаны биоэквивалентными, так как 90 % доверительные интервалы для отношений средних геометрических значений основных фармакокинетических параметров сравнения (площади под фармакокинетической кривой f, максимальной концентрации f) находились в диапазоне от 80,00 до 125,00 %.

Введение

Во время нормального старения медиаторы (маркеры повреждения и/или старения белков) глутамат и ацетилхолин подвергаются сильным функциональным изменениям [150]. Было выявлено в качестве общего признака, что базальная секреция ацетилхолина и количество рецепторов уменьшаются, тогда как базальная секреция глутамата и количество рецепторов увеличиваются. Количество конечных продуктов усиленного гликозилирования увеличивается во время старения преимущественно в глутаматэргических пирамидальных нейронах коры головного мозга, склонных к нейродегенерации [63, 116].

Постоянная активация рецепторов N-метил-D-аспартата (НМДА) центральной нервной системы возбуждающим глутаматом аминокислоты была предложена в качестве фактора, способствующего развитию симптомов болезни Альцгеймера [50]. Антагонисты рецепторов НМДА обладают терапевтическим потенциалом при многих расстройствах центральной нервной системы (ЦНС) в диапазоне от острой нейродегенерации (например, удар и травма), хронической нейродегенерации (например, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, амиотрофический боковой склероз (АБС)), досимптоматической терапии (например, эпилепсия, болезнь Паркинсона, лекарственная зависимость, депрессия, беспокойство и хроническая боль). Однако многие антагонисты рецепторов НМДА также вызывают много побочных эффектов в дозах в пределах их предполагаемого терапевтического диапазона [15]. К сожалению, это привело к заключению, что применение антагонистов рецепторов НМДА не является подходящим терапевтическим подходом. Вместе с тем 1-амино-3,5-диметиладамантан (мемантин) является неконкурентным антагонистом рецепторов НМДА в терапевтических концентрациях, достигаемых при лечении деменции и совершенно лишен таких побочных действий в дозах, находящихся в пределах терапевтического диапазона [141]. Такое свойство было приписано умеренной мощности мемантина и связано с быстрой значительно потенциалозависимой блокирующей кинетикой. Мемантин снижает чрезмерное стимулирующее влияние кортикальных глутаматных нейронов на неостриатум. Данное средство регулирует ионный транспорт, блокирует кальциевые каналы, нормализует мембранный потенциал, улучшает процесс передачи нервного импульса, улучшает когнитивные процессы, повышает повседневную активность [327].

Мемантин, как утверждается, проявляет свой терапевтический эффект благодаря своей активности в качестве неконкурентного (открытый канал) антагониста рецепторов НМДА со степенью сродства к рецепторам от низкой до умеренной, который связывается преимущественно с катионными каналами, регулируемыми НМДА рецепторами. Свидетельство того, что мемантин предотвращает или замедляет нейродегенерацию у пациентов с болезнью Альцгеймера, отсутствует. Мемантин продемонстрировал низкое или незначительное сродство к рецепторам гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), бензодиазепина, допамина, адреналина, гистамина и глицина, а также потенциалозависимым Ca^{2+}, Na^{+} или K^{+} каналам. Мемантин также показал антагонистические эффекты к рецепторам 5-НТ3 с мощностью, подобной

мощности для рецепторов НМДА, и блокировал рецепторы никотина ацетилхолина с мощностью от одной шестой до одной десятой [239, 294, 327].

Амантадин (l-адамантамин), синтетическое противовирусное средство, был впервые описан Davies и соавт. в 1964 г. Антипаркинсоническая активность была обнаружена случайно. Мемантин (1-амино-3,5-диметиладамантан) был разработан и запатентован компанией Эли Лилли в 1968 г. Позже компания Мерц занялась разработкой этого препарата в сотрудничестве с Neurobiological Technologies. Inc. Затем компанией Forest laboratories была получена лицензия на разработку этого препарата в Соединенных Штатах, так же, как компания Лундбек получила лицензию на Европейские и другие международные рынки. Амантадин и мемантин использовались сначала для лечения болезни Паркинсона, хотя прямая допаминмиметическая активность соответствующих терапевтических концентраций амантадина или мемантина никогда не наблюдалась [323].

Предположение, что допаминмиметическая активность является основным механизмом действия амантадина, существовало до конца 1980-ых годов. Однако несколько исследований того времени дали стимул переоценке таких односторонних взглядов и стали предшественниками нового терапевтического подхода, т. е. антагонизма к рецепторам НМДА. Препарат мемантин является противопаркинсоническим средством, входит в перечень ЖНВЛП. В России зарегистрирован 31 препарат на основе этой молекулы. Однако выбор препарата при расстройствах центральной нервной системы, по-видимому, будет наиболее доказательным при оценке его биоэквивалентности. Безусловно, это будет способствовать повышению эффективности результатов лечения данного контингента больных [311, 359].

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты

В качестве тест-препарата (Тест; Т) использовали воспроизведенный препарат мемантина в форме раствора для приема внутрь, 10 мг/мл; в качестве препарата сравнения (Референс; R) использовался оригинальный препарат мемантина в форме таблеток, покрытых пленочной оболочкой, 20 мг (рис. 10.3).

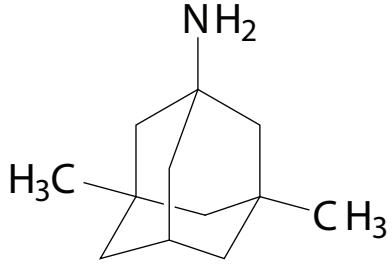


Рис. 10.3. Структурная химическая формула мемантина

Дизайн исследования

Дизайн исследования соответствовал утвержденному протоколу исследования, а также требованиям «Надлежащей клинической практики» (GCP).

В исследование было скринировано 34 здоровых добровольцев. После подписания информированного согласия участники исследования были направлены на клиническую базу ГАУЗ ЯО «Клиническая больница №2», Ярославль, где они были разделены на 2 группы случайным образом, согласно схеме рандомизации. В исследовании было рандомизировано 20 человек (8 мужчин и 12 женщин). Протоколом исследования предусмотрено 6 дублеров (2 выбыли по причине отзыва информированного согласия и 2 заменили участников основной группы). Для оценки фармакокинетики были использованы данные 20 добровольцев, завершивших исследование по протоколу.

Средний возраст добровольцев популяции анализа составил 24,0±4,8 лет, рост 168,5±10,1 см, масса тела 64,4±10,8 кг, средний ИМТ 22,6±2,8 кг/м^2.

Все участники были проверены на наличие наркотических веществ и алкоголя, кроме того, волонтерам женского пола был проведен тест на беременность. Общий и биохимический анализ крови, общий анализ мочи проведены до начала исследования на этапе скрининга. Серологическое исследование сыворотки крови (гепатиты В и С, ВИЧ, RW) и ЭКГ были выполнены на визите скрининга.

В соответствии с дизайном и схемой процедур исследование состояло из периода скрининга, 2-х периодов исследования и 1 «отмывочного» периода. Скрининговый период длился до 14 суток. Каждый период исследования длился около 3 суток и включал в себя стационарное пребывание добровольца в клинике в течение 24 часов (начало госпитализации утром до 08:00 в день приема препарата, завершение госпитализации – после забора крови в точке «+ 24 часа после приема препарата») и дополнительных амбулаторных визитов в точке «+ 48 часов и +72 часа после приема препарата». Период отмывки – 21 день. Общая продолжительность исследования составила для добровольцев около 33 суток.

В каждом периоде отбиралось 18 проб крови по 4 мл, кроме того проводился дополнительный забор 15 мл при скрининге и 10 мл в конце второго периода. Во время исследования забирались образцы крови (18 проб за каждый период) для определения концентраций мемантина за 0,5 часа до приема препарата и через 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 12,0; 16,0; 24; 48; 72 часа после приема препарата. На протяжении всего исследования было взято не более 235 мл крови.

Плазму отделяли центрифугированием в течение 8 минут при 4000 об/мин (2000 g) при температуре 4 ± 4°С не позднее 15 минут после отбора пробы крови. Плазму из супернатантав равных объемах переносили в две предварительно промаркированные криопробирки (обозначенные как первая и дублирующая). Для промежуточного хранения пробирки помещали в вертикальном положении в ящике с сухим льдом. Образцы плазмы хранились в морозильнике при температуре -20ºС или ниже до отправки в лабораторию фармакокинетики. Одна пробирка (первая) от каждого образца использовалась для фармакокинетического исследования, вторая (дублирующая) являлась запасной и хранилась при температуре не выше -20°С до дальнейших указаний Спонсора.

Аналитический метод

Определение мемантина в плазме крови производилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс - спектрометрическим детектированием.

Результаты фармакокинетики

Фармакокинетические параметры были рассчитаны, и результаты были подвергнуты статистическому анализу. 90 %-ные доверительные интервалы для $AUC_{(0–72h)}$ и C_{max} находились в пределах приемлемого диапазона биоэквивалентности, т. е. нулевая гипотеза неэквивалентности для соответствующего параметра была отклонена. Данное исследование подтвердило биоэквивалентность (рис. 10.4).

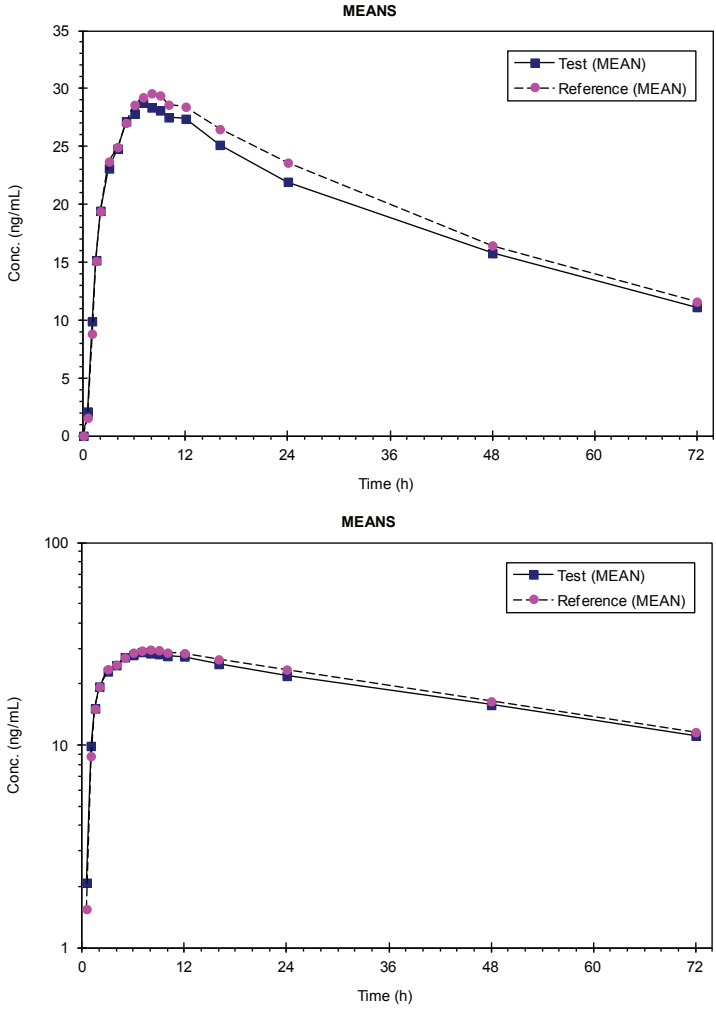


Рис. 10.4. Усредненные фармакокинетические кривые мемантина в образцах плазмы добровольцев после приема препаратов исследования (график в линейном масштабе)

Влияние препарата было найдено статистически значимым на уровне значимости 5 % для обоих $AUC_{(0–72h)}$ и C_{max}. Влияние периода было найдено статистически значимым на уровне значимости 5 % для $AUC_{(0–72h)}$. Влияние последовательности было признано незначимым на 5 %-ом уровне значимости для основных фармакокинетических параметров. Значимость влияний была обусловлена высокой статистической мощностью из-за низкой внутрииндивидуальной вариабельности в данном исследовании.

Различие между тестируемым и референсным препаратом для t_{max} было найдено статистически незначимым в соответствии с непараметрическим медианным критерием и критерием Уилкоксона.

Статистическая обработка полученных результатов

Оценка фармакокинетических параметров проведена с помощью программного пакета Phoenix 6.4 (Certara, USA). В соответствии с поставленной целью и задачей были определены концентрации мемантина в дискретные интервалы времени для построения фармакокинетических кривых, по которым в свою очередь рассчитаны фармакокинетические параметры действующего вещества для исследуемых препаратов. Исходя из данных о концентрациях исследуемого вещества в плазме крови, были рассчитаны фармакокинетические параметры с использованием модельно-независимого подхода.

Для каждого добровольца были рассчитаны следующие параметры, необходимые для оценки биоэквивалентности сравниваемых лекарственных препаратов:

1. $AUC_{0–72}$ – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» (от нуля до 72 часов);
2. C_{max} – величина максимальной концентрации в плазме крови добровольцев;
3. T_{max} – время достижения максимальной концентрации в плазме крови добровольцев;
4. $T_{½}$ – период полувыведения;
5. $f = AUC_{0–72}$, тест/ $AUC_{0–72}$, референс;
6. $f` = C_{max}$, тест/ C_{max}, референс.

С учетом длительного периода полувыведения ($T_{1/2}$ мемантина составляет 60–100 часов) отбор проб был ограничен 72 часами. $AUC_{0–72}$ принималась за основную конечную точку для характеристики степени абсорбции.

Результаты дисперсионного анализа представлены в таблицах 10.6 и 10.7.

Таблица 10.6. Дисперсионный анализ для ln($AUC_{(0–72h)}$)для 20 добровольцев

Источник вариации	DF	Сумма квадратов	Средние квадраты	F	Pr> F
Последовательность	1	0.00650331	0.00650331	0.07	0.8007
Доброволец (Послед.)	18	1.78316188	0.09906455	32.28	0.0000
Период	1	0.02186043	0.02186043	7.12	0.0156
Препарат	1	0.01949248	0.01949248	6.35	0.0214
Остаточная вариация	18	0.0552351	0.00306862	-	-
CV_{res} = 5.54 %					

Таблица 10.7. Дисперсионный анализ для ln(C_{max}) для 20 добровольцев

Источник вариации	DF	Сумма квадратов	Средние квадраты	F	Pr> F
Последовательность	1	0.00000793	0.00000793	0.00	0.9930
Доброволец (Послед.)	18	1.81295179	0.10071954	20.08	0.0000
Период	1	0.0047193	0.0047193	0.94	0.3449
Препарат	1	0.02484689	0.02484689	4.95	0.0390
Остаточная вариация	18	0.09027594	0.00501533	-	-
CV_{res} = 7.09 %					

Согласно Протоколу исследования, чтобы оценить биоэквивалентность, использовались параметры $AUC_{(0–72h)}$, C_{max}для мемантина. Препараты были признаны биоэквивалентными, т. к. 90 % доверительные интервалы для отношений средних геометрических значений основных фармакокинетических параметров сравнения (площади под фармакокинетической кривой f, максимальной концентрации f’ находились в следующих диапазонах:

$80.00 < f\,(\%) < 125.00$

$80.00 < f'\,(\%) < 125.00$.

На основании полученных данных можно сделать вывод о биоэквивалентности исследуемых препаратов (таблица 10.8).

Таблица 10.8. Сравнение тестируемого (T) и референтного препарата (R)

Параметр		N	Геометрическое среднее (LSM)		Отношение T/R (%)	90 % доверительный интервал (%)		БЭ
			Test	Ref.		Нижняя граница	Верхняя граница	
f	$AUC_{(0–72h)}$ (нг·ч/мл)	20	1325.11	1384.93	95.68	92.82	98.63	ДА
f˜	C_{max} (нг/мл)	20	28.69	30.16	95.14	91.51	98.90	ДА

Анализ безопасности

При анализе данных безопасности и переносимости учитывались все добровольцы, прошедшие рандомизацию и принявшие хотя бы одну дозу исследуемых препаратов. Всего было выявлено 2 нежелательных явления у 2 добровольцев на первом этапе до приема исследуемых препаратов – гипертензия, гипотензия. Данные нежелательные явления описаны как легкие, несерьезные, действий для их купирования не было, исход – выздоровление, связь с приемом препарата обозначена как неклассифицируемая. Данные НЯ послужили причиной исключения добровольцев из исследования и включения вместо них дублеров. После приема препаратов нежелательных явлений не было зарегистрировано. Серьезных нежелательных явлений, а также случаев возникновения беременности выявлено не было.

Заключение по безопасности

Переносимость препаратов была удовлетворительной. Нежелательных явлений после приема референтного и тестируемого препаратов не было выявлено. Препараты имеют сопоставимый профиль безопасности.

Результаты и их обсуждение

Исследование было проведено путем определения концентраций мемантина в плазме крови 20 здоровых добровольцев после однократного перорального приема сравниваемых препаратов в дозе 20 мг по открытой рандомизированной перекрестной схеме натощак в 2 этапа.

На каждом этапе исследования согласно схеме рандомизации, которая определяла последовательность приема исследуемого препарата (T) и препарата сравнения (R), каждый доброволец принимал внутрь однократную дозу исследуемого препарата или препарата сравнения.

На основании полученных данных о зависимости «концентрация – время» для каждого добровольца были рассчитаны индивидуальные фармакокинетические параметры, необходимые для оценки биоэквивалентности сравниваемых препаратов. Рассчитанные значения таких фармакокинетических параметров изученных препаратов статистически достоверно не различаются, а разброс индивидуальных значений идентичен для двух препаратов.

Дисперсионный анализ фармакокинетических параметров не выявил статистически значимых отличий между двумя препаратами ни по одному из следующих параметров – AUC_{0-t} и Cmax. Вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов был сделан с использованием подхода, основанного на оценке 90 %-ных доверительных интервалов. На основании полученных данных можно констатировать, что исследуемые препараты характеризуются высокой степенью сходства показателей фармакокинетики. Индивидуальные и усредненные профили фармакокинетических кривых тестируемого и референтного препаратов имеют совпадающие формы. Ни по одному из оцениваемых фармакокинетических параметров исследуемые препараты достоверно не различаются, характеризуясь близкими значениями относительной биодоступности, максимальной концентрации и скорости всасывания. Доверительные интервалы для отношений средних значений оцениваемых показателей тестируемого и референтного препаратов полностью соответствуют допустимым пределам.

Таким образом, исследуемые препараты являются биоэквивалентными.

Заключение по безопасности препарата было сделано исходя из сравнительной оценки параметров безопасности при приеме исследуемого препарата (T) и препарата сравнения (R). После приема препаратов нежелательных явлений не было зарегистрировано. Таким образом, исследуемые препараты имеют сопоставимый профиль безопасности.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о высокой степени доказательности применения исследуемых препаратов. Исследование доказало биоэквивалентность исследуемых препаратов.

Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Цитиколина

Сосудистые заболевания головного мозга остаются одной из острейших медико-социальных проблем, наносящих огромный экономический ущерб обществу [132]. В связи с неуклонной тенденцией старения населения пато-

генез и коррекция когнитивных нарушений являются актуальными вопросами в неврологической практике.

На рынке присутствуют препараты, позиционируемые как нейропротекторы, но не все они имеют достаточную доказательную базу, поэтому особое предпочтение для коррекции когнитивных нарушений отдается лекарственным средствам, проверенным в многочисленных многоцентровых рандомизированных исследованиях. Одним из представителей данной группы препаратов является цитиколин.

Способность цитиколина осуществлять нейропротекцию в острый период при ишемии головного мозга впервые была обнаружена в экспериментальных исследованиях, выполненных 30 лет назад. Были предложены два основных механизма, с помощью которых реализуется нейропротективный эффект цитиколина при его введении в первые часы после начала церебральной ишемии: 1) прямая репарация нейрональных мембран; 2) уменьшение дегенерации свободных жирных кислот [288].

Цитиколин служит донором холина при биосинтезе ацетилхолина. У животных с моделями инсульта введение цитиколина увеличивает высвобождение ацетилхолина в холинергических нервных окончаниях и улучшает внимание, обучение и память. Цитиколин увеличивает синтез допамина, вероятно, за счет усиления активности тирозингидроксилазы, тормозящей обратный захват допамина в нервные окончания.

В клинической практике цитиколин как нейропротективное и нейрорепаративное средство способен дополнять реканализационную терапию. Его введение в сроки, предшествующие реканализации, с помощью фармакологического фибринолиза или эндоваскулярных устройств способствует выживанию большего количества ткани до того момента, когда реваскуляризация будет выполнена и устранит ишемический стресс. При введении в ранние сроки после реканализации цитиколин ослабляет реперфузионные повреждения. В подостром постинсультном периоде цитиколин может усиливать нейрорепарацию и восстановление функции в тканях, сохраненных за счет реперфузии. В ряде исследований у животных с моделью инсульта было обнаружено, что совместное введение цитиколина и фибринолитиков (включая тканевой активатор плазминогена и урокиназу) приводило к уменьшению зоны инфаркта по сравнению с использованием монотерапии-фибринолитиком [288].

На территории РФ препаратами, содержащими цитиколин (МНН: цитиколин), являются: Цераксон® в лекарственной форме раствор для внутривенного и внутримышечного введения 500 мг/4 мл, 1000 мг/4 мл, раствор для приема внутрь 100 мг/мл производства «Феррер Интернасиональ СА», Испания, Пронейро «Галич Фарм», Украина в лекарственной форме раствор для внутривенного и внутримышечного введения, раствор для приема внутрь, Рекогнан ООО «Герофам», Россия в лекарственной форме раствор для внутривенного и внутримышечного введения, р-р для приема внутрь, Нейропилепт ЗАО «Фармфирма «Сотекс», Россия в лекарственной форме раствор для внутривенного и внутримышечного введения .

Доказательная база эффективности цитиколина представлена результатами 2 контролируемых исследований, проведенных в 1980-е гг. в неболь-

ших группах пациентов с острым ишемическим инсультом (ИИ) в дозах 750–1000 мг/сут внутривенно на протяжении 10–14 дней [208, 305]; 3 многоцентровых двойных слепых плацебо-контролируемых исследований, проведенных в США в конце 1990-х гг., в которых приняли участие в общей сложности 1652 пациента с ИИ, где цитиколин назначался внутрь в дозах 500, 1000 и 2000 мг/сут на протяжении 6 нед., начиная с первых суток заболевания [162, 163, 164]. Наиболее эффективным было лечение цитиколином в дозе 2000 мг (в этой подгруппе доля пациентов, достигших полного восстановления, составила 27,9 %). Вероятность полного восстановления при применении цитиколина увеличивалась на 33 % в общей группе и на 38 % – в группе терапии цитиколином в дозе 2000 мг по сравнению с плацебо. В 2012 г. были опубликованы результаты крупного международного многоцентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования ICTUS [103, 172].

Таким образом, цитиколин является одним из самых «доказанных» препаратов из группы нейропротекторов и может быть рекомендован к применению у пациентов с первых суток ИИ, особенно у больных с умеренной выраженностью неврологического дефицита (с оценкой по NIHSS 8–14 баллов), лиц старше 70 лет, а также тем пациентам, которым по тем или иным причинам не удалось провести внутривенный тромболизис. Результаты исследований вносят существенный вклад в оценку медицинских технологий, планирование расходов и влияние на бюджет [59].

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты

В качестве тест-препарата (Тест; Т) использовали воспроизведенный препарат цитиколина в форме таблеток, покрытых пленочной оболочкой, 500 мг, в качестве препарата-сравнения (Референс; R) использовался оригинальный препарат цитиколина в форме раствора для приема внутрь, 100 мг/мл.

Дизайн исследования

Дизайн исследования соответствовал утвержденному протоколу исследования, а также требованиям «Надлежащей клинической практики» (GCP) и действующему законодательству [69,73, 84].

В исследовании принимали участие здоровые добровольцы обоего пола в возрасте 18–45 лет. Всего было скринировано 50 добровольцев, из них 34 было рандомизировано, 15 человек – скрининговые неудачи, 1 человек включен в исследование в качестве дублера. Средний возраст добровольцев составил 27,12±7,68 лет, рост 171,26±8,77 см, масса тела 70,69±12,03 кг, средний ИМТ 24,05±3,34 кг/м^2.

Исследование проходило на базе одного клинического центра – Негосударственное учреждение здравоохранения «Дорожная клиническая больница на станции Ярославль открытого акционерного общества «Российские железные дороги».

В соответствии с дизайном и схемой процедур исследование состояло из периода скрининга, 2-х периодов исследования и 1-го периода «отмывания».

Скрининговый период длился 7 суток. Каждый период исследования длился около 3,5 суток. Период «отмывки» – 7 суток. Общая продолжительность исследования для добровольцев составила 17,5 суток.

После подписания информированного согласия добровольцы проходили физикальный осмотр, лабораторные исследования крови и мочи, анализ мочи на следы наркотиков, тест на содержание алкоголя в выдыхаемом воздухе и тест мочи на беременность для женщин (проводились также перед каждой госпитализацией добровольцев), ЭКГ.

В каждом периоде отбиралось 19 проб крови по 4 мл; кроме того проводился дополнительный забор при скрининге не более 18 мл, по завершении исследования – не более 12 мл.

График отбора проб: График отбора: 48 ч, 24 ч, 12 ч, и 15 мин (до приема лекарственного средства) и через 30 мин, 1 ч, 1 ч 30 мин, 2 ч, 2 ч 30 мин, 3 ч, 3 ч 30 мин, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 16 ч и 24 часа после приема препарата.

Аналитический метод

Биоаналитический метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) использовался для определения метаболита уридина для оценки биоэквивалентности цитиколина. Измеряемая концентрация образцов плазмы крови была скорректирована на основании эндогенных уровней уридина.

Подготовка фармакокинетических образцов

Во время периода госпитализация до приема препарата были забраны 3 пробы крови за 48 часов, 24 часа и 12 часов до приема препарата путем прямой венепункции.

Всем добровольцам в День 1 за 15 минут до приема препарата был установлен кубитальный катетер и была отобрана проба крови. Последующие заборы крови были выполнены через кубитальный катетер. Катетер мог быть заменен в случае его тромбирования.

Начиная со второго взятия крови, перед каждой точкой забора крови из катетера 1 мл крови должен удалялся для исключения попадания гепарина в образец крови. После каждого забора крови из катетера его промывали 0,5 мл гепаринизированного физиологического раствора (500 МЕ на 100 мл 0,9 % натрия хлорида) во избежание тромбирования катетера. Катетер удалялся после взятия образцов крови через 16 часов после приема препарата.

Всего во время каждого из периодов I-II у каждого добровольца было собрано по 19 образцов крови объемом 4 мл в предварительно маркированные вакуумные пробирки, содержащие оксалат калия (KOx) и фторид натрия (NaF) в качестве антикоагулянта. Сразу после этого пробирки осторожно перемешивали путем переворачивания 8–10 раз и охлаждали в ванне вода-лед с 5 до 10 минут. После того пробирки центрифугировали при 2000–2500 g в течение 8 минут при температуре 0 ± 4°C. Плазму из супернатанта переносили в две предварительно промаркированные криопробирки (аналитическая и архивная аликвоты), после чего пробирки незамедлительно замораживали на сухом льду не позднее чем 15 минут после центрифугации. В дальнейшем образцы хранились при температуре ≤ –70 °C. Индивидуальные комплекты хранились в

разных морозильниках. Таким образом, до отправки все образцы хранились в клиническом центре в морозильнике с контролируемой температурой ≤ –70 °С.

Метод ВЭЖХ/МС/МС был использован для определения URN в 1292 образцах плазмы, полученных в клинике. Аналитическая серия каждого добровольца состояла из образцов для проверки пригодности системы, образцов пустой плазмы (бланк), образца с нулевой концентрацией, восьми калибровочных образцов, шести образцов контроля качества, трех образцов для коррекции базовой линии и экспериментальных образцов (образцы 1–4 были перед дозированием для определения эндогенных уровней в плазме крови).

Для аналитического метода для каждого анализа использовали 200 мкл образца плазмы. Метод был валидирован для концентраций начиная с 0.150 мкг URN/мл плазмы. Взвешенную линейную регрессию оценивали в диапазоне концентраций 0.150 – 7.500 мкг URN/мл плазмы.

Образцы плазмы смешивали с раствором внутреннего стандарта с URN и осаждали. Супернатант анализировали на системе ВЭЖХ/МС/МС [6 – 10].

Статистический анализ

Оформление результатов было выполнено в соответствии с Руководством по экспертизе лекарственных средств [69].

Статистический анализ выполнялся после завершения биоаналитических процедур и расчета фармакокинетических параметров первого этапа исследования и при необходимости после завершения биоаналитических процедур и расчета фармакокинетических параметров второго этапа.

Уридин является эндогенным веществом, и его уровни в плазме строго регулируются печеночным метаболизмом в диапазоне от 3 до 8 мкм (uM)[12]. С другой стороны, различные внешние факторы (такие, как разнообразная потребляемая пища и физическая активность) могут повышать или снижать уровни уридина, и некоторые из них относительно быстро. Поэтому для адекватной стандартизации физической активности и диеты, а также для оценки исходных уровней уридина было предложено нахождение пациентов в клинике в течение 48 часов перед дозированием. Взятие четырех образцов в одни и те же временные точки (-48 ч, -24 ч, -12 ч и -0,25 ч, т.е. незадолго перед дозированием) позволило достоверно оценить исходные уровни с учетом возможной межсуточной вариации. Предозовый образец, собираемый через 12 часов, позволил дополнительно оценить возможную межсуточную вариацию. Среднее значение индивидуальных предозовых концентраций эндогенногоуридина вычиталось из всех постдозовых концентраций. Отрицательные значения приравнивались к 0 (нулю). Такой подход соответствует общим ориентировочным рекомендациям ЕС и Российской Федерации по БЭ в этом плане. Производился расчет следующих параметров внемодельным методом, после коррекции эндогенного уровня:

C_{max} – величина максимальной концентрации в плазме крови; Tmax – время достижения максимальной концентрации;

AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» в интервале времени от 0 до последнего отбора крови, при котором концентрация препарата равна или выше нижнего предела количественного определения; будет рассчитана методом трапеций;

f = AUC_{0-t}, тест / AUC_{0-t}, реф.
f' = C_{max}, тест / C_{max}, реф.

Гипотеза о биоэквивалентности формулировалась в терминах отношения сравниваемых параметров:

1. Нулевая гипотеза об отсутствии эквивалентности:

$$H_0: \mu_T / \mu_R < Q_1 \text{ или } \mu_T / \mu_R > Q_2$$

2. Соответствующая альтернативная гипотеза о наличии биоэквивалентности:

$$H_A: Q_1 \leq \mu_T / \mu_R \leq Q_2, \text{ где}$$

Q_1 и Q_2 – нижняя и верхняя принятые допустимые границы биоэквивалентности, а μ_T и μ_R – генеральные средние показатели сравнения для исследуемого лекарственного средства и препарата сравнения, соответственно.

Предполагалось, что AUC и C_{max} имеют ln-нормальное распределение, а все остальные параметры, исключая $T_{max,}$ – нормальное распределение. T_{max} могло принимать только определенные значения (временные точки, указанные в протоколе), соответственно этот параметр являлся дискретным, его распределение не могло быть нормальным и к нему были неприменимы параметрические методы анализа. В соответствии с этим положением сравнение средних значений параметров исследуемого и референтного препаратов проводилось на основе мультипликативной модели, а доверительные интервалы строились для отношений соответствующих средних значений. После проведения логарифмического преобразования эти показатели анализировались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA, параметрический метод). Для T_{max} было возможно использовать только непараметрический метод дисперсионного анализа (с использованием ANOVAWilcoxon теста) и медианный тест (с использованием SAS-процедуры NPAR1WAY) [401].

Результаты

Данное исследование подтвердило биоэквивалентность исследуемых препаратов: 90 %-ные доверительные интервалы для основных параметров находились в пределах приемлемого диапазона биоэквивалентности, т. е. нулевая гипотеза неэквивалентности для соответствующего параметра была отклонена (табл. 10.5).

Таблица 10.5. Доверительные интервалы (ln- преобразованное распределение)

Параметр	Геометрическое среднее (LSM)				Соотношение T/R (%)	90 % доверительный интервал(%)		БЭ	CV_{intra} (%)
	N	Test	N	Ref.		Нижняя граница	Верхняя граница		
$AUC_{(0-t)}$ (мкг·ч/мл)	34	5.192	34	5.179	100.24	86.44	116.25	Да	37.26
C_{max} (мкг/мл)	34	1.210	34	1.287	94.02	84.24	104.94	ДА	27.23

Результаты и их обсуждение

Результаты оценки фармакокинетики

На основании полученных данных о зависимости «концентрация – время» для каждого добровольца были рассчитаны индивидуальные фармакокинетические параметры, необходимые для оценки биоэквивалентности сравниваемых препаратов. Рассчитанные значения таких фармакокинетических параметров изученных препаратов статистически достоверно не различаются, а разброс индивидуальных значений идентичен для двух препаратов.

На рис. 10.6 представлены усредненные фармакокинетические кривые уридинас коррекцией эндогенного уровня в образцах плазмы добровольцев после приема препаратов исследования).

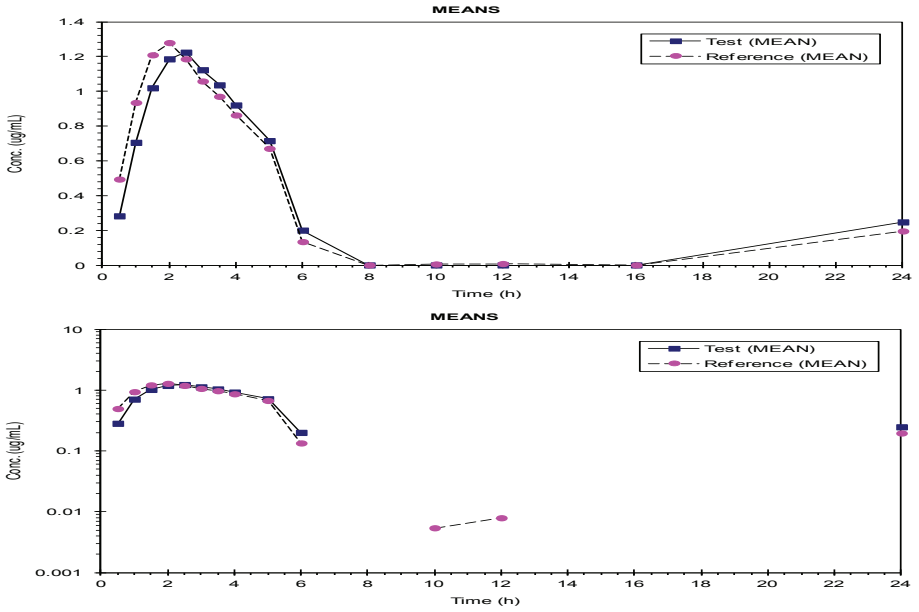


Рис. 10.6. Усредненные фармакокинетические кривые уридина с коррекцией эндогенного уровня средние для 34 добровольцев (линейная и полулогарифмическая шкала)

Согласно полученным результатам 90 %-ные доверительные интервалы для основных параметров находились в пределах приемлемого диапазона биоэквивалентности, т. е. нулевая гипотеза неэквивалентности для соответствующего параметра была отклонена. Данное исследование подтвердило биоэквивалентность (табл. 10.6, 10.7).

Таблица 10.6. Резюме арифметических средних

Параметр	Исследуемый препарат			Препарат сравнения			Соотношение T/R (%)
	N	MEAN	± SD	N	MEAN	± SD	
$AUC_{(0-t)}$ (мкг·ч/мл)	34	5.920	2.689	34	5.757	2.415	102.83
$AUC_{(0-\infty)}$ (мкг·ч/мл)	33	13.235	10.065	33	11.793	7.411	112.23

Параметр	Исследуемый препарат			Препарат сравнения			Соотношение T/R (%)
	N	MEAN	± SD	N	MEAN	± SD	
C_{max} (мкг/мл)	34	1.324	0.535	34	1.380	0.487	95.95
t_{max} (ч)	34	2.32	0.70	34	1.90	0.56	122.48

N = количество результатов

Таблица 10.7.Резюме геометрических средних

Параметр	Исследуемый препарат			Препарат сравнения			Соотношение T/R (%)
	N	GMEAN	CV (%)	N	GMEAN	CV (%)	
$AUC_{(0-t)}$ (мкг·ч/мл)	34	5.192	35.05	34	5.179	30.60	100.24
$AUC_{(0-\infty)}$ (мкг·ч/мл)	33	10.702	27.94	33	9.902	26.67	108.07
C_{max} (мкг/мл)	34	1.210	237.77	34	1.287	155.90	94.02

N = количество результатов

Результаты оценки безопасности

С момента подписания информированных согласий до окончания наблюдения за добровольцами было выявлено 4 нежелательных явления у 4 добровольцев. После приема препарата сравнения было зарегистрировано 1 НЯ – замедление AV-проведения. После приема исследуемого препарата было зарегистрировано 2 НЯ – головная боль. Также 1 НЯ – головокружение – было зарегистрировано до приема препарата. Все НЯ развились во втором периоде исследования.

Во всех случаях тяжесть НЯ была расценена как «легкая». Вероятная связь с приемом препарата была отмечена в 3 случаях, неклассифицируемая – в 1 случае. Во 3 случаях исходом НЯ являлось выздоровление, в 1 случае (нарушение AV проведения) исход НЯ неизвестен, т. к. доброволец отказался явиться в клинический центр для дальнейшего обследования. Выявленные НЯ не потребовали выведения добровольца из исследования. Серьезных нежелательных явлений, а также случаев возникновения беременности выявлено не было.

Исследование было выполнено в соответствии с протоколом, принципами надлежащей клинической практики и действующего законодательства. В ходе исследования было зарегистрировано 9 незначимых отклонений от протокола, связанных с задержкой отбора образцов крови. Они не повлияли на ход исследования и интерпретацию результатов.

Заключение

В данном исследовании было установлено, что исследуемые препараты показали биоэквивалентные результаты. Заключение по безопасности препарата было сделано исходя из сравнительной оценки параметров безопасности при приеме исследуемого препарата (T) и препарата сравнения (R). С учетом полученных в ходе исследования результатов был сделан вывод о сопоставимом профиле безопасности исследуемых препаратов.

11. ФАРМАКОГЕНЕТИКА В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Очевидно, что одним из путей повышения эффективности и безопасности фармакотерапии является внедрение в клиническую практику технологий так называемой персонализированной (персонифицированной) медицины. В основе этих технологий – индивидуальный подход к выбору ЛС и его режима дозирования с учетом факторов, влияющих на фармакологический ответ, которые имеются у конкретного пациента [44].

В настоящее время существуют следующие точки зрения в отношении необходимости проведения фармакогенетического тестирования при клинических исследованиях. Во-первых, фармакогенетическое тестирование стало абсолютно необходимо при разработке новых лекарственных препаратов как с целью изучения особенностей фармакодинамических эффектов и перспектив персонализированного лечения, так и особенностей метаболизма и межлекарственных взаимодействий. Во-вторых, внедрение фармакогенетики в исследованиях биоэквивалентности позволяет на ранних этапах ограничить критерии включения и невключения добровольцев по определенным полиморфизмам генов, определяющих скорость метаболизма. Такой подход может уменьшить количество субъектов, участвующих в исследованиях. Однако некоторые скептики утверждают, что в исследованиях биоэквивалентности это не имеет особого значения. В условиях репликативного дизайна одни и те же субъекты участвуют в обоих этапах исследования (тестируемого и референтного препарата) и их фармакогенетические особенности на этих этапах не меняются, а, следовательно, индивидуальные особенности мало влияют на результаты биоэквивалентности. В связи с этим фармакогенетические подходы к проведению клинических исследований требуют отдельного рассмотрения, так как имеют прямое отношение к особенностям фармакокинетики и результатам биоаналитики.

В основе фармакогенетического тестирования чаще используется полимеразная цепная реакция (ПЦР), а в качестве биологического материала может быть использована кровь больного или даже соскоб со слизистой оболочки щеки. Стоимость подобных анализов постепенно снижается с каждым годом. Кроме того, в настоящее время активно разрабатывают генетические микрочипы (microarray technology), позволяющие одномоментно и в короткие сроки получить информацию о носительстве большого числа аллельных вариантов генов, ответственных за фармакологические эффекты ЛС, что в будущем обернется созданием генетического паспорта пациента, на основании которого врач будет выбирать ЛС и его дозу для каждого конкретного пациента [44].

В настоящее время известно множество причин, которые могут лежать в основе межиндивидуальных различий фармакологического ответа: это пол, возраст, наличие вредных привычек, функциональное состояние органов и систем, прежде всего желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), печени, почек и крови, характер течения основного заболевания и его этиология, сопутствующая терапия, а также генетические особенности пациента и т. д.

Именно генетические особенности зачастую являются причиной НЛР организма человека на ЛС [43, 45, 57, 125, 129]. Изучение генетических особенностей пациентов легло в основу развития фармакогенетики, а в дальнейшем и персонализированной медицины.

Все этапы фармакокинетики ЛС (всасывание, распределение, метаболизм/биотрансформация, выведение) находятся под контролем соответствующих генов, поэтому полиморфизмы различных генов могут влиять на все вышеперечисленные фармакокинетические процессы.

Выявление генетических особенностей пациентов позволяет прогнозировать фармакологический ответ на ЛС, соответственно, повысить эффективность и безопасность применения ЛС, так как идентификация соответствующего аллельного варианта, приводящего к изменениям фармакокинетики и/или фармакодинамики у больного, требует коррекции терапии – дозы ЛС, кратности его применения, пути введения, необходимости замены на другой препарат и пр. [134]. То есть использование подобного подхода в клинической практике позволяет индивидуализировать фармакотерапию.

Доказано, что наибольшее клиническое значение имеют полиморфизмы генов, контролирующие синтез и работу ферментов биотрансформации ЛС, а также транспортных белков-переносчиков, то есть транспортеров, участвующих в процессах всасывания, распределения и выведения ЛС. В частности, генетический полиморфизм характерен для генов, кодирующих ферменты I фазы метаболизма, главным образом изоферменты цитохрома Р-450, и для транспортеров, главным образом Р-гликопротеина [2].

Внедрение персонализированного подхода в практическую медицину при различных заболеваниях внутренних органов направлено как на повышение эффективности лечения, так и на повышение безопасности фармакотерапии [124]. Это особенно важно для целого ряда лекарственных средств, таких как антикоагулянты, психотропные препараты, ингибиторы протонной помпы, ряд препаратов для лечения ишемической болезни сердца и АГ [72].

В настоящее время около 60 % лекарственных препаратов окисляются с помощью ферментативной системы CYP3A4, то есть являются субстратами этой системы. Система CYP3A4, которая является основной в организме человека, обладает индивидуальной активностью, а также характеризуется унимодальным распределением в популяции и отсутствием генетического полиморфизма [9, 276].

Межиндивидуальные различия в скорости метаболизма ЛС позволят выделить группы индивидуумов, различающиеся по активности того или иного изофермента метаболизма.

«Экстенсивные» метаболизаторы (extensivemetabolism, EM) – лица с «нормальной» скоростью метаболизма определенных ЛС, как правило, гомозиготы по «дикому» аллелю гена соответствующего фермента. К экстенсивным метаболизаторам принадлежит большинство населения.

«Медленные» метаболизаторы (poormetabolism, PM) – лица со сниженной скоростью метаболизма определенных ЛС, как правило, гомозиготы (при аутосомно-рецессивном типе наследовании) или гетерозиготы (при аутосомно-доминантном типе наследования) по «медленному» аллелю гена соответствующего фермента. У этих индивидуумов происходит синтез «де-

фектного фермента» либо вообще отсутствует синтез фермента метаболизма, результатом чего является снижение ферментативной активности или даже ее отсутствие. У медленных метаболизаторов ЛС накапливается в организме в высоких концентрациях, что приводит к появлению выраженных НЛР. В связи с этим для медленных метаболизаторов должен быть осуществлен тщательный подбор дозы ЛС: доза должна быть меньшей, чем для активных метаболизаторов.

«Сверхактивные», или «быстрые», метаболизаторы (ultraextensivemetabolism, UM) – лица с повышенной скоростью метаболизма определенных ЛС, как правило, гомозиготы (при аутосомно-рецессивном типе наследования) или гетерозиготы (при аутосомно-доминантном типе наследования) по «быстрому» аллелю гена соответствующего фермента. Следствием этого является недостаточная для достижения терапевтического эффекта концентрация ЛС в крови. Для сверхактивных метаболизаторов доза ЛС должна быть выше, чем для активных метаболизаторов [106].

Кроме того, важную роль в фармакокинетике ЛС играет, помимо изоферментов цитохрома Р450, Р-гликопротеин. Локализуясь в кишечном эпителии, Р-гликопротеин осуществляет эффлюкс лекарственных веществ – его субстратов в просвет кишечника, тем самым снижая их всасывание. В гепатоцитах и почечном эпителии он опосредует выведение ксенобиотиков в просвет желчных капилляров и почечных канальцев соответственно, а в гистогематических барьерах обеспечивает их непроницаемость для липофильных веществ [190]. На сегодняшний день наиболее изученным является полиморфизм, связанный с изменением функционирования Р-гликопротеина, – это «молчащая», т. е. не приводящая к замене аминокислоты однонуклеотидная замена в экзоне 26 в позиции 3435 (C3435T), замена цитозинового нуклеотида на тимидиновый в промоторной зоне ABCB1 (ранее именовался MDR1), гена, кодирующего синтез белка Р-гликопротеина [139, 160]. Доказано, что у гомозигот по аллелю СС экспрессия гена ABCB1 в тонком кишечнике более чем в 2 раза превышала экспрессию у гомозигот по аллелю ТТ, что свидетельствовало о более высокой активности Р-гликопротеина у лиц с генотипом СС [182]. Этот факт еще раз доказывает необходимость изучения генетического полиморфизма ABCB1 с целью индивидуализации фармакотерапии.

Функции Р-гликопротеина многочисленны и разнообразны. Имеются данные о том, что данный белок выполняет защитную функцию организма, сводя к минимуму всасывание ксенобиотиков и токсинов в гастроинтестинальном тракте и стимулируя их выведение печенью и почками [144, 246]; принимает участие в секреции надпочечниками альдостерона, кортизола, а также лимитирует проникновение глюкокортикостероидов в головной мозг через гематоэнцефалитический барьер; вносит существенный вклад в регуляцию процессов апоптоза в организме, что особенно актуально при лечении злокачественных новообразований, так как одним из ожидаемых эффектов от химиотерапии является именно активация самопроизвольной запрограммированной гибели мутировавших клеток [178, 272].

Немаловажная роль в последние годы отводится Р-гликопротеину как иммуномодулятору. Ген ABCB1 в физиологических условиях экспрессиру-

ется на периферических клетках (Т-лимфоцитах). При изучении нормальных Т-лимфоцитов человека в одном из экспериментов было продемонстрировано, что Р-гликопротеин участвует в трансмембранном транспорте таких цитокинов, как интерлейкин-2, интерлейкин-4, интерферон γ [182]. Предполагается, что Р-гликопротеин участвует в осуществлении внутриклеточного транспорта. Так, например, в некоторых исследованиях продемонстрировано, что Р-гликопротеин участвует в перераспределении холестерина в клеточной мембране и в перемещении его в эндоплазматический ретикулум, где в дальнейшем происходит его этерификация [175, 272, 306]. Гиперэкспрессия гена ABCB1 на поверхности энтероцитов приводит к тому, что холестерин мицелл из просвета кишечника активнее поступает внутрь энтероцитов. Таким образом, регуляция обмена холестерина является еще одной физиологической функцией Р-гликопротеина.

Биохимические соединения, взаимодействующие с Р-гликопротеином, могут быть разделены на субстраты и ингибиторы Р-гликопротеина. Изучение способностей лекарственных средств подавлять или усиливать функцию Р-гликопротеина имеет большое практическое значение, т. к. эти особенности могут изменять фармакокинетику и биодоступность ЛС при совместном их применении, а также привести к развитию токсических эффектов этих препаратов или, наоборот, к снижению концентрации субстратов в крови и, как следствие, к уменьшению их терапевтической активности [167].

В зависимости от различных условий одни и те же препараты могут одновременно являться и субстратами Р-гликопротеина, и его ингибиторами. Примером этого может служить препарат верапамил, который в небольших концентрациях является субстратом, а при увеличении дозы проявляет свойства ингибитора Р-гликопротеина [88].

В исследованиях биоэквивалентности накапливается все больше данных о связи полиморфизмов различных генов с индивидуальной фармакокинетикой, фармакодинамикой, эффективностью и безопасностью различных ЛС. Так результаты фармакогенетического тестирования являются критерием включения или не включения добровольца в исследование. Но в таком случае, если дойдет дело до регистрации ЛС, результаты фармакогенетического тестирования будут фигурировать в инструкции по медицинскому применению. Перспективным является использование фармакогенетического тестирования по ферментам биотрансформации для отбора добровольцев в исследования биоэквивалентности, что позволяет не включать в исследования «медленных» или «быстрых» метаболизаторов, что способствует уменьшению коэффициента вариации фармакокинетических показателей, а значит уменьшить количество необходимых для участия добровольцев, что может быть сопряжено со снижением стоимости исследования в целом [107].

С момента возникновения представлений о генетической природе вариабельности лекарственного ответа и на протяжении нескольких последующих десятилетий система клинических исследований (КИ) ЛС и фармакогенетика развивались независимо друг от друга, не имея общих точек соприкосновения. Однако появление в последнее время ряда научных публикаций, а также разработка соответствующих рекомендаций и указаний

свидетельствует о начале взаимодействия. Возможно, что уже в скором времени ни одно КИ не сможет проводиться без привлечения генетической информации. Использование фармакогенетической информации при КИ может иметь большое распространение, поскольку разработки сложного алгоритма интерпретации данных, полученных при генетическом тестировании, здесь не требуется. Дело в том, что задачи персонализированной терапии отличаются от задач КИ: одно дело – предсказать возможность развития побочных явлений или эффективность лечения у конкретного пациента, по многим параметрам отличающегося от других лиц, например, по предрасположенности к развитию определенных побочных явлений, и совсем другое – подобрать выборку участников КИ, близкую по определенным генетическим свойствам. Однако после подтверждения эффективности и безопасности исследуемого ЛС начинается этап более масштабных КИ с привлечением более широкого круга лиц. При этом возникает вопрос, будет ли препарат в той же степени проявлять свою активность и окажется ли он так же безопасным на генетически разнородной популяции пациентов. Для решения этой задачи понадобятся дополнительные исследования, которые являются ничем иным, как включением знаний и опыта фармакогенетики в КИ. На выходе такого исследования не обязательно должен появиться алгоритм учета генетических факторов в назначении лечащего врача, но сам факт подобных исследований должен обеспечивать безопасность генетически разнородного населения. Это предполагает, что исследователи должны хорошо представлять себе метаболизм и действие исследуемого ЛС и знать, какие генетические факторы могут повлиять на фармакологический ответ.

Известно, что на стадии доклинических исследований генетике модельных животных отводится большая роль. Как правило, для этого используют генетически однородные инбредные линии, полученные путем многократных близкородственных скрещиваний. Разумеется, подтвердить эффективность нового препарата на людях в рамках II фазы КИ в условиях ограниченного числа добровольцев часто возможно только при тщательном отборе участников КИ. Не менее чем «внешние» показатели (возраст, рост, индекс массы тела и т. д.), важен отбор пациентов, обладающих сходным восприятием испытуемого препарата [44]. Включение генетических факторов в критерии отбора участников КИ позволит снизить уровень межиндивидуальной вариабельности фармакологического ответа, и появится возможность получить более емкую информацию об эффективности и безопасности ЛС на небольшой выборке [216]. Для каждого препарата «набор» определяемых генов будет зависеть от особенностей метаболизма, путей выведения и механизма действия препарата, но круг полиморфизмов в принципе совпадает с перечнем генетических маркеров, для которых собрана доказательная база в рамках фармакогенетических исследований [44]. Среди них большое значение имеет полиморфизм генов изоферментов цитохрома Р-450, УДФ-глюкуронозилтрансфераз, N-ацетилтрансферазы-2, некоторых метилтрансфераз, транспортеров ЛС (гликопротеин-Р и др.) [44]. Следует также обратить внимание на гены, кодирующие молекулы-мишени ЛС (рецепторы, ферменты, ионные каналы), белки, участвующие в определенных патологических процессах (факторы свертывания крови, аполипопротеины, гены системы

HLA и т. д.), против которых направлено исследуемое ЛС [44]. Генетические анализы на современном уровне проводятся быстро и дают надежные результаты, действительные в течение всей жизни. Известно, что фармакокинетические процессы более предсказуемы, чем фармакодинамические, поэтому в клинической практике чаще применяются фармакогенетические тесты, определяющие индивидуальный уровень именно фармакокинетики [216, 303]. Во-первых, ее легко установить и/или проверить прямыми количественными измерениями. Во-вторых, изменения активности ферментов, как правило, схожим образом касаются ряда субстратов. Определение хорошо известных исследователям аллельных вариантов (например, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*17, CYP2D6*4 и др.) может применяться при изучении многих субстратов [44, 216, 303]. Напротив, фармакодинамические процессы менее предсказуемы, индивидуальны по отношению к определенным ЛС; особенности клинических эффектов их полиморфизмов более сложны и разнообразны, к тому же часто изменчивы во времени. Тем не менее влияние полиморфизмов молекул-мишеней может быть очень значительными (например, зависимость варфарина от полиморфизма VKORC1), и их изучение необходимо [44, 53].

Генетическое тестирование можно дополнять и фармакокинетическими исследованиями, например, применяя фенотипирование, заключающееся в измерении метаболического отношения в крови при приеме маркерного субстрата. Исследования генетических факторов приняты во многих странах. В США фармакогенетический подход регламентирован руководством «GuidanceforIndustry: ClinicalPharmacogenomics: PremarketEvalutioninEarlyPhaseClinicalStudiesandRecommendationforLabeling» FDA [216], в Евросоюзе приняты такие рекомендации, как «ReflectionPaperonPharmacogenomicSamples, TestingandDataHandling» идр. [289, 290]. Опубликовано руководство в рамках конференций по гармонизации «Guidance for Industry. E16 Biomarkers Related to Drug or Biotechnology Product Development: Context, Structure, and Format of Qualification Submissions» [218]. В России в 2009 г. были изданы «Рекомендации для фармацевтических компаний по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств», в которых указывается на необходимость учета генетических факторов [89]. Однако для активного взаимодействия фармакогенетического опыта и КИ этого, явно, недостаточно.

США обладает значительным опытом проведения фармакогенетических исследований и использования полученной информации. В Руководстве FDA приведены следующие цели их проведения в процессе КИ [216]:

1. Выявление причин значительных индивидуальных отклонений («выбросов») фармакокинетических процессов и определение межиндивидуальной изменчивости клинического ответа;

2. Исключение из клинических исследований участников с генетически обусловленными отклонениями протекания процессов фармакокинетики и фармакодинамики, влияющими на эффективность и безопасность применения ЛС;

3. Оценка потенциальных лекарственных взаимодействий;

4. Исследование молекулярных механизмов возможного отсутствия эффективности или развития нежелательных лекарственных реакций;

5. Разработка дизайна клинических исследований с целью проверки влияния полиморфизмов на фармакологический ответ в определенных подгруппах (т. е. использование в стратегии по «обогащению» популяции, согласно которой предлагается отбирать в исследование участников – носителей определенного генотипа).

Цель генетического тестирования при КИ различается в зависимости от стадии изучения нового препарата. На начальном этапе отбирают участников с наиболее распространенным генотипом (например, в исследования не включают пациентов, относящихся к «медленным» или «быстрым метаболизаторам»). В последние фазы КИ возможно включение участников со значительными генетически детерминированными отклонениями фармакологического ответа.

На I и II фазах КИ по генетическому признаку отбирают следующие группы участников КИ [216]:

1. Группы участников, которые должны получать более низкие или более высокие дозы изучаемого ЛС (что, как правило, обусловлено генетическими различиями абсорбции, распределения, выделения или обмена ЛС). Такие исследования помогают определить диапазон доз для последующих этапов КИ;

2. Группы участников, которые отвечают на терапию (этот подход получил распространение в онкологии);

3. Группы участников, которые имеют повышенный риск развития нежелательных лекарственных реакций (ЛС, которые их вызывают, нельзя допускать к применению, если побочные эффекты невозможно предсказать и/или предотвратить).

В руководящих документах Евросоюза также рассмотрен ряд принципиальных моментов, связанных с применяемостью генетической диагностики [289, 290].

Предполагается, что фармакогенетические исследования необходимы для оценки фармакокинетики нового ЛС в том случае, если в основных путях метаболизма или в транспортировке фармакологически активных соединений ЛС и/или их активных, либо токсичных метаболитов участвуют белки, активность которых зависит от генетических полиморфизмов. Для того, чтобы запланировать определение генетических полиморфизмов, исследователь должен хорошо представлять себе фармакокинетические и фармакодинамические процессы, в которых участвует новое ЛС. Если молекулярные механизмы недостаточно известны, тогда необходимо привлекать генетические подходы в том случае, если есть необъяснимая вариабельность фармакокинетических параметров. При этом не исключено, что может понадобиться поиск новых фармакогенетических факторов [289]. Постепенно, по мере снижения цены секвенирования, становится возможным секвенировать полиморфные участки, что может особенно пригодиться при поиске новых значимых полиморфизмов. Если выявлены необъяснимые изменения фармакокинетики, образцы биологического материала, содержащего ДНК, собирают и хранят для дальнейшей работы.

В документах Евросоюза определено, что если генотип прогнозируемо четко влияет на показатели фармакокинетики, эффективности и/или без-

опасности, то привлечение генетической информации должно осуществляться на всех фазах КИ [289, 290]. В таком случае собранная обширная информация может стать основой для разработки фармакогенетических рекомендаций. Предполагается, что вся необходимая фармакогенетическая информация должна быть собрана к концу III фазы КИ. По результатам исследования должна быть дана оценка клинических последствий генетических различий с применением статистических данных.

В Российской Федерации проводится большое количество международных КИ, в том числе с забором генетического материала и проведением фармакогенетического тестирования. Однако анализ фармакогенетической информации носит вторичный характер, генотипирование проводится на добровольной основе, и участники КИ могут от него отказаться, при этом оставаясь включенными в работу. В отечественных КИ на начальных стадиях, как правило, генетическая информация не учитывается, «обогащения» участников не производится, а фармакогенетические исследования осуществляются обычно в поздние фазы КИ, что пока характерно и для общемировой практики.

В 2009 г. в России были опубликованы «Рекомендации для фармацевтических компаний по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных и внесение информации в инструкции по применению». В рекомендациях по поводу привлечения генетической информации указано только следующее: «Определение у участников исследования in vivo генетических полиморфизмов ферментов, участвующих в биотрансформации, желательно при исследовании изоферментов цитохрома P 450 CYP2D6, CYP2C19 и CYP2C9» [101]. В вышедшей примерно в то же время брошюре «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств. Методические указания» предлагается проведение генотипирования в том случае, если известно, что исследуемое ЛС подвергается биотрансформации, контролируемой генетически полиморфными изоферментами цитохрома P 450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6), с целью исключения участия в исследовании лиц с генотипами «медленного» и «быстрого» метаболизма [84].

В обеих отечественных работах, носящих рекомендательный характер, лишь привлекается внимание к проблеме, однако подробные детали взаимодействия фармакогенетических и клинических исследований отсутствуют. Не описаны также стратегии, которые можно применять в КИ на основании генетического тестирования. Однако КИ, опорным пунктом которых является фармакогенетическое тестирование, несомненно, представляют не только научный интерес, но и практическую пользу. Хорошей иллюстрацией этого является мультицентровое клиническое исследование III фазы, целью которого являлось изучение эффективности тиотропия бромида в качестве альтернативы длительно действующим бета2-агонистам у пациентов с бронхиальной астмой, гомозиготных по 16Arg/Arg гена ADRB2 [165]. В основу этого исследования была положена концепция о том, что замена одной из аминокислот (Arg16Gly) в структуре бета2-адренорецептора обусловливает более тяжелое течение заболевания, приводит к снижению терапевтического ответа и ускорению процессов десенситизации рецепторов

при назначении бета2-агонистов. Именно поэтому у таких пациентов применение М-холинолитиков может внести дополнительный вклад в достижение контроля над симптомами бронхиальной астмы. Целью исследования являлось сравнение эффективности и безопасности тиотропия бромида с салметеролом и плацебо у пациентов со среднетяжелой неконтролируемой бронхиальной астмы с генотипом 16Arg/Arg ADRB2. Было скринировано 4225 пациентов с бронхиальной астмой, у которых был взят буккальный соскоб для проведения генотипирования. 715 (16,9 %) пациентов с бронхиальной астмой являлись гомозиготами 16Arg/Arg гена ADRB2, из них 388 пациента были рандомизированы на 3 группы: принимающих тиотропия бромид 5 мкг, принимающих салметерол 50 мкг 2 раза в сутки через дозированный аэрозольный ингалятор в сравнении и группа плацебо. Все пациенты продолжали использовать ингаляционные глюкокортикоиды. Длительность исследования составила 16 недель. Было показано, что тиотропия бромид, как и салметерол, значительно улучшают функцию легких по сравнению с плацебо у пациентов с персистирующей бронхиальной астмой, не контролируемой ингаляционными глюкокортикоидами, и имеющим гомозиготный генотип 16Arg/Arg гена ADRB2. Было также показано, что генетически обусловленная вариабельность действия не сильно отражается на эффективности и безопасности лечения, что и требуется от фармакогенетической составляющей КИ [152].

В настоящее время большое внимание уделяется клиническому значению генетических особенностей пациентов в виде полиморфизма гена SLCO1B1 (кодирует полипептид, транспортирующий органические анионы) в развитии миопатии при применении статинов, что необходимо для выбора режима их дозирования на основе результатов фармакогенетического тестирования. Статины широко применяются в клинической практике для лечения гиперлипидемии, для первичной и вторичной профилактики сердечно-сосудистых событий, а также при остром коронарном синдроме (наибольшая доказательная база – максимально допустимые дозы). Доказательная база эффективности статинов при данных состояниях обширна. Однако в последнее время все большую актуальность приобретает проблема безопасности при применении статинов, в частности, со стороны поперечно-полосатой мускулатуры. И если рабдомиолиз как опасное для жизни осложнение со стороны поперечно-полосатой мускулатуры при применении статинов встречается редко (0,15 на 1 миллион назначений), то другие формы статин-индуцированной миопатии у пациентов, принимающих данные лекарственные средства (ЛС) [107], могут встречаться часто. Частота развития статин-индуцированной миопатии значительно варьирует по данным разных исследований. Так, по данным исследования PRIMO при применении флувастатина она составляла 5,1 %, симвастатина – 18,2 % [44]. Именно таким образом в исследовании SERCH у 85 пациентов со статин-индуцированной миопатией (90 пациентов без данного осложнения составили группу контроля) был выявлен полиморфизм SLCO1B 1*5 (c. 521T>C) как генетический маркер развития данного осложнения [279]. Так, у пациентов с генотипом СС миопатия при применении симвастатина в дозе 80 мг развивалась в 17 раз чаще по сравнению с пациентами с генотипом ТТ, а у

пациентов с генотипом CT миопатия развивалась в 2,5 раза чаще по сравнению с пациентами с генотипом TT [279]. Объяснением этого феномена является тот факт, что полипептид, транспортирующий органические анионы, кодирующийся геном SLCO1B1, локализован на апикальной мембране гепатоцита и осуществляет захват статинов из крови. При этом у пациентов с генотипами CT и особенно CC по полиморфному маркеру SLCO1 B1*5 активность данного транспортера низкая, что приводит к нарушению транспорта статинов в гепатоцит (где они должны действовать), накоплению их в системном кровотоке и поражению поперечно-полосатой мускулатуры. Данные генотипы распространены и среди российских пациентов с гиперлипидемиями. Очевидно, что у носителей CC и CT генотипов будет отмечаться не только повышение риска миопатии при применении статинов в высоких дозах, но и недостаточная эффективность [в плане достижения целевых значений холестерина липопротеинов низкой плотности (ХСЛПНП)], поэтому у этой категории пациентов при недостижении целевых значений ХСЛПНП при применении в максимально безопасных дозах рекомендуется не увеличивать дозу статина, а комбинировать его с блокатором всасывания холестерина эзетимибом. В настоящее время разработаны алгоритмы персонализации применения статинов в зависимости от результатов фармакогенетического тестирования по SLCO1B1, которое в настоящее время стало доступно для проведения в некоторых коммерческих лабораториях в России. Применение генетического тестирования в клинических исследованиях применения статинов значительно повысит безопасность назначения данной группы препаратов, сократит сроки подбора рациональных доз статинов в каждом конкретном случае и, безусловно, будет выгодным в экономическом плане.

Применение фармакогенетического тестирования в исследованиях биоэквивалентности нашло отражение при изучении группы НПВС, в частности лорноксикама. Согласно полученным результатам присутствие в генотипе добровольца аллелей CYP2C9*2 и CYP2C9*3 гена цитохрома P450 имело разбросы в значениях, по-видимому, вызванных различиями в метаболизме добровольцев, связанными с полиморфизмом гена цитохрома P450 (CYP2C9). Например, было выявлено, что фармакокинетика лорноксикама в значительной степени зависит от полиморфизма CYP2C9, приводящего к значительному возрастанию AUC, и периода полувыведения препарата, а также к уменьшению клиренса в гетерозиготах по гену изофермента цитохрома P450 по сравнению с гомозиготами. Показано, что встречаемость аллелей CYP2C9*2 и CYP2C9*3 среди населения РФ составляет 18 %. Поскольку присутствие аллелей CYP2C9*2 и CYP2C9*3 (как у гетерозиготных, так и у гомозиготных форм) значительно изменяет метаболизм лорноксикама, поэтому целесообразным считается проведение определения полиморфизма гена цитохрома P450 у людей для снижения вариабельности фармакокинетических параметров лорноксикама [111,131].

При проведении фармакогенетических исследований в рамках КИ возможно применение ряда стратегий: дизайн КИ, основанный на генетическом тестировании, стратегия «обогащение» популяции участников КИ, дизайн с рандомизацией всех подгрупп [264]. Дизайн КИ, основанный на

генетическом тестировании, предполагает рандомизацию участников КИ на две группы, в одной из которых лечение корректируется на основании генетического тестирования, тогда как во второй группе применяется лечение без учета генетических факторов. Такой подход позволяет оценить влияние полиморфизма генов на клинический ответ и сделать вывод о том, нуждается ли данное ЛС в особых рекомендациях сообразно с генотипом пациента [264]. Если необходимости в учете генетических факторов в процессе лечения нет, то это очень хороший результат для данного ЛС, поскольку препарат можно применять, не оглядываясь на генетический статус больного. Если же генетические факторы сильно влияют на эффективность и безопасность, то, возможно, необходимо внесение фармакогенетической информации в инструкцию по данному ЛС. Стратегия «обогащения» популяции участников КИ позволяет на относительно небольшой группе пациентов продемонстрировать эффективность ЛС, «выключив» генетическое разнообразие [264]. Такой подход может применяться почти на всем протяжении КИ, с I по III фазу. Сначала отбирают преимущественно гомозиготных носителей дикого типа, обладателей наиболее распространенного генотипа. Это не всегда возможно, но, во всяком случае, следует избегать носительства полиморфизмов, ассоциированных с измененным состоянием функционирования белковых продуктов соответствующих генов. На поздних этапах КИ стратегию «обогащения» можно использовать для отбора участников КИ, наоборот, имеющих генетически детерминированные отклонения процессов фармакокинетики и/или фармакодинамики изучаемого ЛС, и на таких выборках можно отрабатывать дозирование ЛС для определенных индивидуумов в зависимости от их генотипа.

Дизайн клинических исследований, включающий стратегию «обогащения» популяции участников, предполагает следующие этапы [264]:

1. Проводится первоначальное тестирование по планируемым генетическим полиморфизмам;
2. В исследование принимаются только участники с определенным генотипом;
3. Проводится рандомизация участников, принятых в исследование на основании генотипов с выделением опытной и контрольной групп;
4. Проводятся КИ в опытной группе.

Иногда знания, полученные в ходе фармакогенетических исследований, применяются для «спасения» ЛС, ранее забракованных в ходе КИ. Так, на III фазе КИ перорального антикоагулянта ксимелагатрана, являющегося сильным конкурентным обратимым прямым ингибитором альфа-тромбина, конвертирующего превращение фибриногена в фибрин, были обнаружены явления гепатотоксичности иммунологической природы. Вследствие этого III фазу КИ препарат не прошел и не был зарегистрирован. Однако дальнейшие фармакогенетические исследования позволили установить, что гепатотоксичность ксимелагатрана связана с генетическими особенностями пациентов, в частности, с полиморфизмом генов одного из компонентов главного комплекса гистосовместимости. Таким образом, сам препарат может применяться, если исключить его назначение для определенных когорт

пациентов или скорректировать их лечение согласно индивидуальным генетическим особенностям.

Таким образом, по мере расширения области знаний, связанных с генетическим полиморфизмом человека, мы порой получаем массивы достаточно противоречивой информации, применять которую на практике в настоящее время достаточно сложно [84, 320]. Алгоритмов для использования фармакогенетических знаний при лечении относительно немного, хотя их число постоянно увеличивается. В то же время отсутствие (или наличие) у ЛС явной вариабельности фармакологического ответа, ассоциированного с генетическим полиморфизмом, представляет собой самостоятельное ценное знание, которое необходимо установить к окончанию КИ. С помощью фармакогенетического тестирования можно на начальных этапах клинических исследований биоэквивалентности исключить из опытной группы добровольцев и/или пациентов, в значительной степени отличающихся по фармакокинетическим и фармакодинамическим показателям от среднестатистического уровня, характерного для данной целевой группы, что будет, безусловно, экономически выгодным. На поздних фазах КИ, наоборот, возможно включение в опытные группы пациентов именно с генетически обусловленными «отклонениями» показателей метаболизма, транспорта активных компонентов препарата и/или активных метаболитов, изменениями должного фармакодинамического эффекта. КИ с привлечением фармакогенетических знаний могут иметь различный дизайн, и эти работы позволяют расширить понятия эффективности и безопасности изучаемого ЛС, в ряде случаев внести полученную информацию в инструкцию по применению ЛС. Фармакогенетика и КИ ЛС могут развиваться в тесном сотрудничестве, взаимно обогащая друг друга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить, что при разработке оригинальных и воспроизведенных лекарственных препаратов большое значение принадлежит качественным биоаналитических исследованиям, позволяющим получить объективную информацию о фармакокинетике лекарств. Результаты фармакокинетических исследований необходимы как при создании новых лекарственных препаратов, так и при исследованиях биоэквивалентности, изучении биосимиляров. Несомненное значение имеют биоаналитические исследования при лекарственном мониторинге, персонализированной фармакотерапии.

В конце 2014 года принят Федеральный закон РФ № 429-ФЗ от 22.12.2014 г. «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств». Большинство положений закона вступило в силу с 1 июля 2015 года. В 2015 году принято еще 7 федеральных законов, в соответствии с которыми внесены дополнительные поправки в ФЗ №61, в силу практически все поправки вступили с 01.01.2016. Федеральный Закон «Об обращении лекарственных средств» является основным законом Российской Федерации, регламентирующим все этапы разработки и применения лекарственных средств. Закон необходим как для эффективной работы фармацевтических компаний, так и организаций, участвующих в планировании и проведении клинических исследований лекарственных препаратов [74].

Таким образом, требования к отечественным препаратам постоянно возрастают как со стороны государства, так и пациентов и медицинской общественности. При условии высокой эффективности и безопасности отечественных препаратов достижения медицинской науки станут более доступными для нашего населения и системы здравоохранения [58]. В наше время создание высокотехнологичных лекарственных препаратов, качественных дженериков возможно только при условии интеграции фундаментальных научных знаний, взаимодействии специалистов различного профиля, изучении отечественного и зарубежного опыта. В этой связи надлежащие подходы к выполнению биоаналитических исследований позволяют создать необходимые условия для получения современных лекарственных препаратов, отвечающих всем международным требованиям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абдулкадыров К.М.* Дженерики иматиниба: мифы и реальность (обзор литературы и собственные данные) [Текст] / К.М. Абдулкадыров, В.А. Шуваев, М.С. Фоминых // Клиническая онкогематология. – 2014. – № 3. – С. 311–316.

2. *Авдеев Р.М.* Генетический полиморфизм и этнические аспекты фармакогенетики [Текст]: Р.М. Авдеев, А.Л. Пирузян, М.К. Саркисова // Медицинская генетика. – 2010. – Т. 5. – № 6. – С. 11–15.

3. *Адонин В.К.* Особенности проведения исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов – аналогов эндогенных соединений [Текст] / В.К. Адонин, Д.П. Ромодановский, Р.Р. Ниязов // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2015. – № 3. – С. 3–7.

4. Аналитическая химия. В 3 т. Т. 2. Методы разделения веществ и гибридные методы анализ`а [Текст]: учеб. для студ. высш. учеб. заведений / под. ред. Л.Н. Москвина. – М.: Академия, – 2008. – 304 с.

5. *Баво М.* Клинико-экономический анализ ведения больных с хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / М. Баво, А.Л. Стародубов, Е.Г. Лилеева // Фарматека. – 2009. – № 19. – С. 64–68.

6. *Безуглая Н.П.* Исследование биоэквивалентности рилузола с использованием УЭЖХ-МС/МС метода [Текст] / Н.П. Безуглая, И.А. Зупанец, Н.Н. Кравец [et al.] // Фармакокинетика Фармакодинамика. – 2012. – № 2. – С. 56–64.

7. *Белоусов Ю.Б.* Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации [Текст]: Ю.Б. Белоусов. – М.: Издательство ОКИ, – 2005. – 156 с.

8. *Бондарева И.Б.* Статистический анализ данных исследований биоэквивалентности [Текст] / И.Б. Бондарева //Клиническая фармакокинетика. – 2004. – № 1 – С. 14–22.

9. *Бородулин В.Б.* Ассоциация полиморфизма генов CYP2D6 и CYP2C9, кодирующих белки цитохрома Р-450, со степенью артериальной гипертензии [Текст] / В.Б. Бородулин, О.В. Шевченко, Е.Н. Бычков [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 8. – № 4 (). – С. 933–937.

10. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство для предприятий по производству лекарственных средств [Текст]: под ред. В.В. Береговых. – М.: «Литтерра», 2008 – 132 с, ил.

11. *Владимиров Г.Н.* Моделирование движения ионов в орбитальной ионной ловушке с учетом объемного заряда и неидеальности удержания электрического поля [Текст]/Г.Н. Владимиров, А.В. Харченко, Р. Хеерен [и др.] // Труды МФТИ. – Т. 3.– № 3. – 2013. – С. 11–15.

12. *Вольская Е.А.* Практика этической экспертизы: стандартные требования и процедуры независимого этического комитета: пособие для членов ЛЭК [Текст]: Е.А. Вольская, Н.В. Семенова, Д.В. Громыко. – М.: МГМСУ – РИО МГМСУ им. А.И. Евдокимова, 2015. – 40 с.

13. Ассоциация медицинских редакторов. Рекомендации Всемирной ассоциации медицинских редакторов по принципам этики научных публикаций [Текст] // Международный журнал медицинской практики. – 2005. – № 5. – С. 24–30.

14. Всемирная Организация Здравоохранения. Европейское региональное бюро [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.euro.who.int/ru/what-we-do/data-and-evidence [дата обращения 21.01.2017].

15. *Гаврилова С.И.* Разработка стандарта терапии болезни Альцгеймера [Текст] / С.И. Гаврилова, И.В. Колыхалов // Современная терапия в психиатрии и неврологии. – 2012. – № 1. – С. 5–10.

16. *Ганеев А.А.* Атомно-абсорбционный анализ [Текст]: учеб. пособ./ А.А. Ганеев, С.Е. Шолупов, А.А. Пушилев [и др.]. – СПб.: Лань, – 2011. – 304 с.: ил. – ISBN 978–5-8114–1117–7.

17. *Ганичева Л.М.* Биофармацевтические аспекты разработка, производства и применения лекарственных препаратов [Текст] / Л.М. Ганичева, Г.П. Вдовина // Вестник ВолгГМУ. – 2012. – № 3. – С. 1–9.

18. *Гильдеева Г.Н.* Структурные аспекты полиморфизма лекарственных веществ [Текст] / Г.Н. Гильдеева, Д.Ф. Гуранда // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2009. – № 6. – С. 74 – 80.

19. *Головкин В.А.* Избранные лекции по биофармации и современным достижениям фармацевтической технологии [Текст]: В.А. Головкин, В.П. Соловьева, В.В. Гладышев. – Запорожье: ЗГМУ, 2005. –223 с.

20. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том 1 [Текст]. – М.: ФЭМБ, 2015. – 1470 с.

21. Государственная Фармакопея СССР. XI издание. Том 2 [Текст]. – М.: Медицина, 1990. – 399 с.

22. *Гуськова Т.А.* Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований [Текст] / Т.А. Гуськова // Токсикологический вестник. – 2010 – Т. 104. – № 5. – С. 2–5.

23. *Гуськова Т.А.* Рекомендации по проведению I фазы клинических исследований лекарственных средств [Текст] / Т.А. Гуськова // Медицинская этика. – 2014 . – № 1. – С. 13–17.

24. *Гуськова Т.А.* Этическая экспертиза безопасности клинических исследований воспроизведенных лекарственных средств (короткое сообщение) [Текст] / Т.А. Гуськова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 3. – С. 74–75.

25. *Гурылева М.Э.* Организационные и этические аспекты проведения клинических исследований: Учебное пособие для слушателей послевузовского и дополнительного профессионального образования [Текст]: М.Э. Гурылева, А.И. Глушаков.– Казань: Первый печатный двор, 2012. – 57 с.

26. *Давыдова К.С.* Установление взаимозаменяемости воспроизведенных лекарственных средств [Текст] / К.С. Давыдова, И.Е. Шохин, Г.В. Раменская [и др.] // Ремедиум. – 2010. – № 7. – С. 36–38.

27. *Давыдов С.* Big Pharma – новые блокбастеры [Текст] / С. Давыдов // Ремедиум. – 2012. – № 7. – С. 41–46.

28. Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Рекомендации Российского медицинского общества по артериальной гипертонии и Всероссийского научного общества кардиологов. Четвертый пересмотр // Системные гипертензии. – 2010. – № 3. – С. 5–26.

29. Доклад Министра здравоохранения Вероники Скворцовой о состоянии конкуренции на рынках лекарственных препаратов и медицинских услуг [Электронный ресурс]: Стенограмма заседания Правительства РФ от 21.11.2013. – Режим доступа: http://government.ru/meetings/8325/stenogram [дата обращения:13.02.2017].

30. *Дорофеев В.Л.* Подходы к оценке взаимозаменяемости лекарственных средств [Текст] / В.Л. Дорофеев // Ремедиум. – 2011. – № 12. – С. 51–57.

31. *Дудченко В.В.* Международные непатентованные наименования лекарственных средств: требования к формированию заявки и порядок экспертизы и регистрации Всемирной Организацией Здравоохранения [Текст]/ В.В. Дудченко, А.Н. Яворский, Ю.В. Олефир [и др.] // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – № 2. – 2015. – С. 29–34.

32. *Духанин А.С.* Оригинальные и воспроизведенные лекарственные препараты: мифы и реальность [Текст] / А.С. Духанин, Л.Н. Шимановский // Международный медицинский журнал. – 2014. – № 1. – С. 81–88.

33. *Емшанова С.В.* Обеспечение качества отечественных лекарственных средств (оптимизация технологии и совершенствование стандартизации таблетированных лекарственных форм) [Текст]: Автореф. докт. дисс. доктора фармацевт. н. – М., 2007. – 47 с.

34. *Жукова Д.Я.* Вопросы эффективности и безопасности лекарственных средств, применяемых для лечения ишемической болезни сердца [Текст] / Д.Я. Жукова, Г.Н. Ковальская // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2015. – № 2. – С. 78–83.

35. Здравоохранение в России. 2015: Стат. Сб. [Текст] / Федеральная служба государственной статистики (Росстат). – М., 2015. – 174 с.

36. *Зырянов С.К.* Дженерики антибактериальных препаратов: за и против [Текст]// С.К. Зырянов, Ю.Б. Белоусов / Справочник поликлинического врача. – 2012. – № 5. – С. 11–13.

37. Информационно-аналитический бюллетень № 14: Итоги 2016 года [Электронный ресурс] // Ассоциация Организаций по Клиническим исследованиям. – М., 2017. – Режим доступа: http://acto-russia.org/files/bulletin_14.pdf [дата обращения : 15.10.2017].

38. *Ивашова Е.В.* Методика количественного определения ГБ-115 в биоматериале с использованием ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором [Текст] / Е.В. Ивашова, С.С. Бойко, Д.В. Бастрыгин [и др.]//Химико-фармацевтический журнал. – Т. 47 – № 6. – 2013. – С. 35–38.

39. Информационно-аналитический бюллетень № 14. Итоги 2016 [Электронный ресурс] / Ассоциация Организаций по Клиническим Исследованиям. – 2017. – Режим доступа: http://acto-russia.org/files/bulletin_14.pdf [дата обращения 22.04.2017].

40. Информационный справочник понятий, применяемых в рамках Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: pharmacopoeia.ru/informatsionnyj-spravochnik-ponyatij-primenyaemyh-v-ramkah-evrazijskogo-ekonomicheskogo-soyuza-v-sfere-obrashheniya-lekarstvennyh-sredstv/ [дата обращения: 15.10.2017].

41. *Ишмухаметов А.* Дженерики в Европе. Генерическая экспансия на фармрынке ЕС [Текст]/ А. Ишмухаметов // Ремедиум. – 2011. – № 1. – С. 7–13.

42. *Камер Б.* Быстрорастущие рынки развивающихся стран: блестящие умы, большие возможности [Текст] / Б. Камер // Ремедиум. – 2012. – № 2. – С. 25–30.

43. *Карпенко М.А.* Артериальная гипертензия: возрастные, половые и генетические особенности [Текст]. – Докт. дисс. … доктора мед.н. – М., 2007. – 302 с.

44. Клиническая фармакогенетика [Текст]: под общ. ред. В.Г. Кукеса, Н.П. Бочкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 248 с.

45. Клиническая фармакология [Текст]: учебник / под ред. В.Г. Кукеса. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – С. 229–230.

46. Клинические исследования лекарственных препаратов и медицинских изделий в России в 2015 году [Электронный ресурс] // Sciencefiles. – 2016. – Режим доступа: www.sciencefiles.ru/upload/uf/Review2015.pdf [дата обращения: 15.10.2017].

47. Клинические рекомендации. Диагностика и лечение артериальной гипертонии // Кардиологический вестник. – № 1. – 2015. – С. 3–79.

48. *Ковальская Г.Н.* Оригинальные и дженерические лекарственные средства: качество, эффективность и безопасность [Текст]: монография / Г.Н. Ковальская, Д.Я. Жукова. – Иркутск: РИО ГБОУ ДПО ИГМАПО, 2014. – 164 с.

49. *Комарова Н.В.* Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза “Капель” [Текст]: Н.В. Комарова, Я.С. Каменцев. – СПб.: ООО “Веда”, 2006. – 212 с.

50. *Комлева Ю.К.* Современные представления о патогенезе болезни Альцгеймера: новые подходы к фармакотерапии (обзор) [Текст] / Ю.К. Комлева, Н.В. Кувачева , О.Л. Лопатина // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7. – № 3. – С. 138–148.

51. *Конради А.О.* Ключевые достижения в комбинированной антигипертензивной терапии последних лет [Текст] / А.О. Конради // АГ. – 2012. – №6. – С. 491–496.

52. *Костылева М.Н.* Оценка безопасности лекарственной терапии в клинической практике [Текст] / Костылева М.Н., Белоусов Ю.Б., Грацианская А.Н. [и др.] // Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. – 2014. – № 1. – С. 26–31.

53. *Кох Н.В.* Вклад генетических маркеров в изменение терапевтической дозировки варфарина [Текст] / Н.В. Кох, Г.А. Цветовская, Я.В. Новикова [и др.] // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2011. – Т. 9. – № 4. – С. 48–154

54. Краткий обзор клинических исследований лекарственных препаратов и медицинских изделий, одобренных МЗ РФ и Росздравнадзором в январе 2017 года [Электронный ресурс] // Sciencefiles. – 2017. – Режим доступа: sciencefiles.ru/news/obzor-klinicheskikh-issledovaniy-za-yanvar-2017/ [дата обращения 25.02.2017].

55. *Кротков А.И.* Сравнительный анализ современного состояния и перспектив развития фарминдустрии Индии и Китая [Текст]/ А.И. Кротков // Региональные исследования. – 2009. – Т. 22. – № 1. – С. 27–33.

56. *Крылова, Н.Е.* Некоторые этико-правовые вопросы проведения биомедицинских исследований на человеке [Текст] / Н.Е. Крылова // Государство и право.– 2007. – № 4. – С. 32–39.

57. *Кукес В.Г.* Изучение биотрансформации лекарственных средств – путь к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии [Текст] / В.Г. Кукес, Д.А. Сычев, Е.В. Ших // Врач. – 2007. – № 1. – С. 23–27.

58. *Кукес В.Г.* Исследование биоэквивалентности генерических препаратов ЛС – основной этап их экспертизы [Электронный ресурс] / В.Г. Кукес, Г.В. Раменская, А.С. Насонов. – 2006. – Режим доступа: http://www.myshared.ru/slide/40674/ [дата обращения 11.02.2017].

59. Культура безопасности лекарственной терапии: монография [Текст] / Хохлов А.Л., Яворский А.Н., Игнатьев В.С., Синицина О.А., Степанов И.О., Воронина Е.А., Мельникова Ю.Е. – Ярославль: Ремдер, 2011. – 156 с.

60. *Лапач С.Н.* Основные принципы применения статистических методов в клинических испытаниях [Текст]: С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: МОРИОН, 2002. – 160 с.

61. *Лебедев А.Т.* Масс-спектрометрия в органической химии [Текст]: А.Т. Лебедев. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – 493 с.: ил. – ISBN 5–94774–052–4.

62. *Лебедев А.Т.* Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды [Текст]: А.Т. Лебедев. – М.: Техносфера, 2013. – 632 с. – ISBN 978–5-94836–363–9.

63. *Левин, О.С.* Диагностика и лечение деменции в клинической практике[Текст] / О.С. Левин. – М.: МЕДпресс-информ, 2010. – 255 с.

64. *Макаров А.* Масс-спектрометрия на основе орбитальной ловушки ионов: достижения и перспективы [Текст]/ А. Макаров // Аналитика. – № 5. – 2013. – С. 30–36.

65. *Мальцев В.И.* Этические принципы проведения клинических исследований [Текст] / В.И. Мальцев, Т.К. Ефимцева, Д.Ю. Белосов //Украинский медицинский часопис.– 2001. – № 5. – С. 66–80.

66. *Меньшутина Н.В.* Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства [Текст]: учеб. пособ. / Н.В. Меньшутина, Ю.В. Мишина, С.В. Алвес – Т. 1. – М.: Издательство БИНОМ, 2012. – 328 с.: ил. – ISBN 978–5-9518–0453–2.

67. *Месонжник Н.В.* Экспериментальное изучение биологической стабильности дипептидного соединения дилепт [Текст] / Н.В. Месонжник, С.С. Бойко, С.А. Аполонова // Химико-фармацевтический журнал. – Т. 44 – № 4. – 2010. – С. 3–6.

68. *Мешковский А.П.* Регистрация лекарственных препаратов в европейском союзе [Текст]/ А.П. Мешковский // Медицинские технологии. Оценка и выбор. – 2014. – Т. 15. – № 1. – С. 46–56.

69. *Миронов А.Н.* Руководство по экспертизе лекарственных средств [Текст] / А.Н. Миронов. – Т. 1. – М.: Полиграф – Плюс. – 2014. – С. 223.

70. *Миронов А.Н.* Экспертные подходы к планированию и анализу результатов сравнительного теста кинетики растворения воспроизведенных лекарственных препаратов в твердых лекарственных формах с немедленным высвобождением [Текст]/ А.Н. Миронов, Д.П. Ромодановский, Р.Р. Ниязов [и др.] // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2014. – № 2. – С. 3–9.

71. *Морковина Я.В.* Метод фармацевтической альтернативы при разработке нового 5-НТ2А-антагониста [Текст] / Я.В. Морковина, Д.С. Яковлев, Д.В. Мальцев [и др.] // Фармация и фармакология. – 2015. – № 1. – С. 76–77.

72. *Морозова Т.Е.* Фармакогенетические подходы к прогнозированию эффективности и безопасности фармакотерапии артериальной гипертензии [Текст] / Т.Е. Морозова, Д.А. Сычев, Н.В. Ших // Лечащий врач. – 2016. – № 3. – С. 77–81.

73. Надлежащая клиническая практика [Электронный ресурс]: Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379–2005. – 2005. – Режим доступа: base.garant.ru/12146180/ [дата обращения 19.01.2017].

74. Об обращении лекарственных средств [Электронный ресурс]: федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/ [дата обращения 21.02.2017].

75. Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации. Статья 36.1 [Электронный ресурс]: федеральный закон от 21.11.2011 N 323-ФЗ (ред. от 03.07.2016). – Режим доступа: consultant.ru/document/cons_doc_LAW_121895 [дата обращения 21.02.2017].

76. Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2017 год [Электронный ресурс]: Распоряжение Правительства Российской Федерации от 28 декабря 2016 г. № 2885-р. – 2016. – Режим доступа: http://docs.cntd.ru/document/420387743 [дата обращения: 15.10.2017].

77. Об утверждении порядка организации и проведения этической экспертизы возможности проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения и формы заключения совета по этике [Электронный ресурс]: приказ МЗ СР РФ от 26.08.2010 № 753н. – Режим доступа: http://base.garant.ru/12178437/[дата обращения 10.02.2017].

78. Об утверждении правил надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза [Электронный ресурс]: Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 79. – 2016. – Режим доступа: http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71373446/ [дата обращения 20.03.2017].

79. Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики [Электронный ресурс]: Приказ МЗ РФ от 01.04.2016 №199н. – Режим доступа: http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/12079613/.

80. Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза [Текст]: Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85. – 2016. – Режим доступа: http://docs.pravo.ru/document/view/89453867/102662693/.

81. О внесении изменений в Директиву № 2001/83/ЕС от 06.11.2001 г «О своде законов Сообщества в отношении лекарственных препаратов для человека» [Электронный ресурс]: директива Европейского парламента и Совета ЕС № 2004/27/ЕС от 31.03.2004. – 2004. – Режим доступа: www.wipo.int/wipolex/ru/details.jsp?id=13063 [дата обращения 10.02.2017].

82. О правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения [Электронный ресурс]: решение Совета Евразийской экономической комиссии № 78 от 03.11.2016. – 2016. – Режим доступа: http://docs.cntd.ru/document/456026097[дата обращения 20.03.2017].

83. О психиатрической помощи и гарантиях прав граждан при ее оказании. Статья 11.5 и 29 [Электронный ресурс]: федеральный закон от 21.11.2011 № 3185-I. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_4205/.

84. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств [Текст]: Методические указания ФГУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения". – М., 2008. – Режим доступа: http://rdg-cro.com/wp-content/uploads/2012/07/Guidelines-for-conducting-bioequivalence-studies-in-Russia.pdf.

85. *Петров В.И.* Воспроизведенные лекарственные препараты: проблемы оценки и выбора [Текст] / В.И. Петров, С.В. Недогода, А.В. Сабанов // Ведомости НЦЭСМП. – 2007. – № 1. – С. 32–36.

86. Протоколы работы комитета по техническим вопросам подготовки Международной конференции по здравоохранению в Париже [Электронный ресурс] / Documents officiels, OMS, Geneve, 19462. – Режим доступа: http://www.who.int/archives/info/fr/.

87. Развивающиеся рынки в 2012 году: Китай, Индия и Латинская Америка // Дайджест. – 09.10.2012 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://clinical-pharmacy.ru/digest/farmacevtrinok/2211-razvivayuschiesya-rynkiv-2012-godu-kitay-indiya-i-latinskaya-amerika.html [дата обращения 22.09.2016].

88. *Раменская Г.В.* Значение изменения функциональной активности и количества экспрессируемого Р-гликопротеина в фармакокинетике лекарственных средств [Текст] / Г.В. Раменская, С.Л. Файнштейн, Д.А. Сычев // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т. 70. – № 1. – С. 72–80.

89. Рекомендации для фармацевтических компаний по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных и внесение информации в инструкции по применению [Электронный ресурс]: под ред. Д.А. Сычева. – М.: 2009. – Режим доступа: http://www.regmed.ru/Content/Doc.aspx?id=26a9128c-ee32–4469–9c64–5c666339049e.

90. *Ромодановский Д.П.* Анализ международных рекомендаций к проведению сравнительного теста растворения в случае пострегистрационных изменений состава вспомогательных веществ лекарственных препаратов [Текст]/ Д.П. Ромодановский, Р.Р. Ниязов, Д.В. Горячев [и др.] // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2014. – № 3. – С. 39–45.

91. *Ромодановский Д.П.* Особенности планирования и оценки исследований биоэквивалентности эндогенных веществ на примере мелатонина [Текст] / Д.П. Ромодановский, А.П. Соловьева, А.С. Насонов, И.В. Кокин // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2014. – № 4. – С. 17–21.

92. *Ромодановский Д.П.* Планирование дизайна и оценка результатов исследований биоэквивалентности высоковариабельных препаратов на примере розува-

статина [Текст] / Д.П. Ромодановский, М.А. Драницына, Д.В. Горячев, Р.Р. Ниязов, Е.В. Гавришина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. – № 6. – С. 19–25.

93. *Ромодановский Д.П.* Планирование исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов с узким терапевтическим диапазоном [Текст] / Д.П. Ромодановский, Д.В. Горячев, Ю.В. Олефир, Н.Д. Бунятян // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50. – № 12. – С. 42–45.

94. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов [Текст]: Под ред. С.Н. Быковского, И.А. Василенко, М.И. Харченко [и др.]. – М.: Перо, 2014. –656 с.: ил. – ISBN 978–5-91940–743–0.

95. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том IV. – М.: Полиграфплюс, 2014 – 172 с.

96. *Савченко А.Ю.* Оригинальное лекарственное средство:первый опыт клинического применения (1 фаза).Современные требования [Текст] / А.Ю. Савченко, К.С. Давыдова, Г.В. Раменская [и др.] // Ремедиум. 2011. – № 9. – С. 49–51.

97. *Савчук С.А.* Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике [Текст]: С.А. Савчук, А.М. Григорьев. – М.: ЛЕНАНД, 2013. – 224 с.

98. *Сергиенко В.И.* Математическая статистика в клинических исследованиях [Текст]: В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева. – М.: ГЭОТАР-Медиа,2006. – 304 с.

99. *Сергиенко, В.И.* Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение [Текст]: В.И. Сергиенко, Р. Джеллифф, И.Б. Бондарева. – М.: РАМН, 2003 г. – 207 с.

100. *Середенин С.Б.* Лекции по фармакогенетике [Текст]: С.Б. Середенин. – М.: МИА, 2004. – 303 с.

101. *Соколов А.В.* Фармакокинетический подход в вопросе о взаимозаменяемости лекарственных средств [Текст] / А.В. Соколов, В.Г. Кукес, Н.Д. Бунятян [и др.] // Биомедицина. – 2015. – № 3. – С. 43–51.

102. Социальный бюллетень. Пожилое население России: проблемы и перспективы [Электронный ресурс] / Аналитический центр при Правительстве Российской Федерации. – 2016. – Режим доступа: ac.gov.ru/files/publication/a/8485.pdf.

103. *Стародубов В.И.* Оценка медицинских технологий. Международный опыт [Текст] / В.И. Стародубов, И.Н. Каграманян, А.Л. Хохлов [и др.], под ред. В.И. Стародубова, И.Н. Каграманяна. – М.: АІРМ, 2012. –102 с.

104. *Стародубов В.И.* Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств. Методические указания [Текст]: В.И. Стародубов. – М., 2011.

105. Стратегия развития фармацевтической промышленности на период до 2020 года [Электронный ресурс]. – 2008. – Режим доступа: -http://www.pharma2020.ru/spaw2/uploads/files/Strategiya_pharma2020=8bc819193e13b44f6f4eb60ad9e123af [дата обращения 01.02.2017].

106. *Сычев Д.А.* Фармакогенетические технологии персонализированной медицины: оптимизация применения лекарственных средств [Текст] / Д.А. Сычев, О.В. Муслимова, Е.В. Гаврисюк [и др.] // Terra Medica. – 2011. – №1. – С. 4–9.

107. *Сычев Д.А.* Фармакогенетическое тестирование в клинических исследованиях [Текст] / Д.А. Сычев // Фармакогенетика и фармакогеномика. – №1. – 2016. – С. 13.

108. *Сычев К.С.* Практический курс жидкостной хроматографии [Текст]. – М.: КОКОРО, 2013. – 272 с. – I SBN 978–5-9902902–2-8.

109. *Сычев С.Н.* Высокоэффективная жидкостная хроматография: аналитика, физическая химия, распознавание многокомпонентных систем [Текст]: учеб. пособ. / С.Н. Сычев, В.А. Гаврилина. – М.: Лань, 2013. – 256 с. – ISBN 978–5-8114–1377–5.

110. *Тенцова А.И.* Лекарственная форма и терапевтическая эффективность лекарств [Текст]: А.И. Тенцова, И.С. Ажгин. – М.: Медицина, 1974. –334 с.

111. Теоретические и практические основы проведения исследований воспроизведенных лекарственных препаратов: монография / А.Л. Хохлов, М. Рыска, В.Г. Кукес [и др.] ; под ред. А.Л. Хохлова. – Москва – Ярославль – Прага: ООО Фотолайф, 2017. – 227 с.

112. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств [Текст]: научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли/ под ред. И.Е. Шохина. – М.: Перо, 2015. – 320 с.: ил. – ISBN 978–5-00086–525–5.

113. *Тихонов А.И.* Биофармация [Текст]: учеб. для студ. Фарм. вузов и фак. / А.И. Тихонов, Т.Г. Ярных, И.А. Зупанец [и др.]. – Х.: Золотые страницы, 2003. –204 с.

114. Токсикологическая химия [Текст]: учеб. пособ./под ред. Плетеневой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – С. 512. – ISBN 978–5-9704–0768–4.

115. *Толпыгина С.Н.* Проблема дженерической замены: плюсы и минусы [Текст] / С.Н. Толпыгина, С.Ю. Марцевич // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2009. – № 1. – С. 63–68.

116. *Тювина Н.А.* Лечение болезни Альцгеймера [Текст] / Н.А. Тювина, В.В. Балабанова // Журнал неврологии, нейропсихиатрии, психосоматики. – 2015. – Т. 7. – № 3. – С. 80–85.

117. *Уйба, В.В.* Биомедицинская безопасность и этика клинических исследований [Текст] / В.В. Уйба, Р.М. Хаитов, Т.А. Гуськова // Физиология и патология иммунной системы. – 2010. – № 11. – С. 26–32.

118. *Фармаковский Д.* Швейцарский нож химика-аналитика: система для комплексной хроматографии Shimadzu Nexera UC SFE-SFC-MS [Текст]/ Д. Фармаковский // Аналитика. – №1. –2016. – С. 62–67.

119. Фармацевтический сектор: Общий технический документ для лицензирования лекарственных средств в ЕС [Текст]: под ред. А.В. Стефанова. – Киев: Морион, 2002. – 256 с.

120. *Филатова Ю.М.* Современное состояние мирового фармацевтического рынка [Текст] / Ю.М. Филатова // Известия Тульского Государственного Университета. – 2016. – № 1. – С. 163–171.

121. *Харитонов Ю.Я.* Аналитическая химия. В 2 кн. Кн. 1. Общетеоретические основы. Качественный анализ [Текст]: учеб. для вузов / Ю.Я. Харитонов. – 2 изд., испр. – М.: Высшая школа, 2003. – 615 с.: ил.

122. *Харитонов Ю.Я.* Аналитическая химия. В 2 кн. Кн. 2 Количественный анализ. Физико-химические методы анализа [Текст]: учеб. для вузов/Ю.Я. Харитонов. – 2 изд., испр. – М.: Высшая школа, 2003. – 559 с.: ил.

123. Хельсинская декларация Всемирной Медицинской Ассоциации Электронный ресурс]. – 2013. – Режим доступа: www.jama.com [дата обращения 01.02.2017].

124. *Хохлов А.Л.* Значение определения полиморфизмов генов, отвечающих за активность ангиотензинпревращающего фермента у больных с артериальной гипертензией и хронической сердечной недостаточностью для оптимизации стандартов лечения больных артериальной гипертензией [Текст] / А.Л. Хохлов, А.Г. Лилеева, Ю.В. Рыбачкова [и др.] // Проблемы стандартизации в здравоохранении. – 2012. – № 4. – С. 41–44.

125. *Хохлов А.Л.* Значение фармакогенетических исследований при различных формах ишемической болезни сердца [Текст]: Монография / А.Л. Хохлов, Н.О. Поздняков, Ю.В. Рыбачкова. – Ярославль: Ремдер, 2016. – 188 с.

126. *Хохлов А.Л.* Исследование сравнительной фармакокинетики таблетированных форм микофеноловой кислоты [Текст] / А.Л. Хохлов, И.И. Яичков, Л.Н. Шитов [и др.] // Фармакокинетика Фармакодинамика. – 2016. – № 4. – С. 3–8.

127. *Хохлов А.Л.* Исследование фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением [Текст] / А.Л. Хохлов, Ю.А. Джурко, Л.Н. Шитов [и др.] // Фармакокинетика Фармакодинамика. – 2017. – № 1. – С. 57–62.

128. *Хохлов А.Л.* Комментарии к статье «50-я годовщина Хельсинской Декларации: прогресс и проблемы которые остаются» [Текст] / А.Л. Хохлов // Медицинская этика. – 2014. – № 1. – С. 73.

129. *Хохлов А.Л.* Подходы к фармакогенетическим исследованиям заболеваний, связанных с нарушением липидного обмена и атеросклероза [Текст]: Монография / А.Л. Хохлов, В.Г. Кукес, Д.А. Сычев. – М., Ярославль, 2016. – 428 с.

130. *Хохлов А.Л.* Принципы этической экспертизы [Электронный ресурс] / А.Л. Хохлов, Т.А. Гуськова, Н.В. Чудова, Л.Г. Цызман. // Национальная ассоциация производителей фармацевтической продукции и медицинских изделий "АПФ". – 2017. – Режим доступа: http://pharmapf.ru/wp-content/uploads/2017/04/Hohlov_A_L. pdf [дата обращения 22.04.2017].

131. *Хохлов А.Л.* Проблемы проведения биоаналитической части исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в России [Текст] / А.Л. Хохлов, Е.Г. Лилеева, О.А. Синицина [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2014. – № 1. – С. 37 – 43.

132. *Хохлов А.Л.* Фармакоэпидемиологическое исследование антигипертензивной терапии в пожилом возрасте [Текст] / А.Л. Хохлов, Л.А. Лисенкова // Клиническая геронтология. – 2003. – Т. 9, № 7. – С. 31–34.

133. Центр высоких технологий ХимРар [Электронный ресурс] // Информационно-аналитический обзор мировой и российской индустрии разработки лекарств. – Режим доступа: www.chemrar.ru/private/files/journal/ChemRar-digest_No5. pdf [дата обращения 14.02.2017].

134. *Шевченко О.В.* Значение фармакогенетических исследований для оптимизации антигипертензивной терапии [Текст] / О.В. Шевченко, Е.Н. Бычков, О.М. Посненкова [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2012. – № 3. – С. 95–100.

135. *Шохин И.Е.* Современные подходы к валидации методик испытания «Растворение» [Текст]: И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, К.С. Давыдова // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45. – № 3. – С. 41–44.

136. *Щулькин А.В.* Роль гликопротеина Р в рациональной фармакотерапии в кардиологии [Текст] / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, Н.М. Попова // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2013. – Т. 9. – № 6. – С. 701–707.

137. *Юдин Б.Г.* Об ответственном поведении исследователей. Биоэтика и гуманитарная экспертиза. Вып. 4 [Текст]: Б.Г. Юдин. – М.: ИФ РАН, 2010. – С. 13–37.

138. *Яичков И.И.* Способы стабилизации лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях при биоаналитических исследованиях (Обзор) [Текст] / И.И. Яичков, А.Л. Хохлов, Ю.А. Джурко // Разработка ирегистрация лекарственных средств. – 2017. – № 2. – С. 160 -164.

139. *Якушева Е.Н.* Характеристика гликопротеина Р как белка транспортера лекарственных веществ [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.С. Бирюкова // Российский медико-биологический вестник им. ак. И.П. Павлова. – 2011. – № 3. – С. 142–148.

140. *Ярошенко Д.В*. Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных веществ в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии [Текст]: Канд. дисс. … к. хим. наук. – СПб., 2014. – 153 с.

141. *Яхно Н.Н. Деменции: Н.Н. Яхно, В.В. Захаров, А.Б. Локшина [и др.].* – М.: МЕДпресс-информ, 2011. –264 с.

142. *Abu-Shandi K.H.* Quantification and Stability Evaluation of the Highly Specific Angeotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor in Human Plasma Using a Gas Chromatography Method with N,N,N',N'-teteramethyl-2-butenediamine Derivatizing Agent [Текст] / K.H. Abu-Shandi, E. Redel // Jordan Journal of Chemistry. – 2009. – V. 4. – № 2. – P. 183–194.

143. *Agut J.* Bioavailability of Methyl -14C CDP – Choline by oral Route. [Текст] / J. Agut. E. Font [et al.] // Arzneim – Forsch. Drug Research. – 1983. – V. 33. – № 11. – P. 7.

144. *Andersen V.* Polymorphisms in the xenobiotic transporter Multidrug Resistance 1 (MDR1) and interaction with meat intake in relation to risk of colorectal cancer in a Danish prospective case-cohort study [Текст] / V. Andersen, M. Ostergaard, J. Christensen [et al.] // BMC Cancer. – 2009. – V. 407. – № 9.

145. *Antignac J.* The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequence in the field of residue analysis / J. Antignac, K. Wasch, F. Monteau [et al.] // Analitica Chimica Acta. – 2005. – V. 529. – P. 129–136.

146. *Arnold D.M.* The design and interpretation of pilot trials in clinical research in critical care [Текст] / D.M. Arnold, K.E. Burns, N.K. Adhikari [et al.] // Critical Care Medicine. – 2009. – V. 37. – P. 69–74.

147. *Babu S.* Analysis of N-glycans from a Monoclonal Antibody by Capillary Electrophoresis and Mass Spectrometry [Текст] / S. Babu, R. Gudihal // Agilent Technologis . – 2012. – Режим доступа: http://www.agilent.com/cs/library/applications/5991–1020EN. pdf.

148. *Baell J.* Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery [Текст] / J. Baell, M.A. Walters // Nature. – V. 513. – № 7519. – P. 481–483.

149. *Bakail M., Ochsenbein F.* Targeting protein–protein interactions, a wide open field for drug design [Текст] / M. Bakail, F. Ochsenbein. //Comptes Rendus Chimie. – 2016. – V. 1. – № 1–2. – P. 19–27.

150. *Barca M.L.* Quality of life among elderly patients with dementia in institutions [Текст] / M.L. Barca, K. Engedal, J. Laks [et al.] // Dementia and Geriatric Cognitive Disorders . – 2011. – V. 31. – P. 435–442.

151. *Bartoszewicz Z.* Can we accurately measure the concentration of clinically relevant vitamin D metabolites in the circulation? The problems and their consequences [Текст] / Z. Bartoszewicz, A. Kondracka, R. Jaźwiec [et al.] // Endokrynologia Polska. – 2013. – V. 64. – № 3. – P. 238–245.

152. *Bateman E.D.* Tiotropium is noninferior to salmeterol in maintaining improved lung function in B16-Arg/Arg patients with asthma [Текст] / E.D. Bateman, O. Kornmann, P. Schmidt [et al.] // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2011. – V. 128. – № 2. – P. 315–322.

153. *Bauer J.* Ritonavir: An extraordinary example of conformational polymorphism // J. Bauer, S. Spanton, R. Henry // Pharmaceutical Research. – 2001. – V. 18. – № 6. – P. 859–866.

154. *Bertholf R.L.* Chromatographic Methods in Clinical Chemistry and Toxicology: R.L. Bertholf, R. Winecker. – England: Jonh Wiley and Sons Ltd., 2007. – 294 p.

155. *Blundell T.L.* Structure-based drug design [Текст] / T.L. Blundell // Nature. – 1996. – V. 384. – № 6604. – P. 23–26.

156. *Bower A.D.* Family physicians and generic drugs: a study of recognition, information sources, prescribing attitudes, and practices [Текст] / A.D. Bower, G.L. Burkett // Journal of Family Practice. -1987. –V. 24. – № 6. – P. 612–616.

157. Cardiovascular Health Awareness Program [Электронный ресурс]. – Режим доступа : chapprogram.ca/resources.html [дата обращения: 15.10.2017].

158. *Challener C.A.* Ligand-Binding Assays and the Determination of Biosimilarity [Электронный ресурс] / C.A. Challener // BioPharm International. – 2015. – V. 28. – № 1. – Режим доступа: http://www.biopharminternational.com/ligand-binding-assays-and-determination-biosimilarity.

159. *Chen K.* Determination of Uridine in human plasma by HPLC and its application in Citicoline Sodium Pharmacokinetics and bioequivalence studies [Текст] / K. Chen, X. Liu, C. Wei [et al.] // Journal of Bioequivalence & Bioavailability. – 2011. – V. 3. – № 4. – P. 72 – 76.

160. *Chinn L.W.* ABCB1 pharmacogenetics: progress, pitfalls, and promise [Текст] / L.W. Chinn, D.L. Kroetz // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2007. – № 2 (81). – P. 265–269.

161. *Chow S.C.* Sample size calculations in clinical research [Текст]: S.C. Chow, J. Shao, H. Wang – Marcel Dekker, New York, 2003. – 371 p.

162. *Clark W.M.* A randomized dose-response trial of citicoline in acute ischemic stroke patients. Citicoline Stroke Study Group [Текст] / W.M. Clark // Neurology. – 1997. – V. 49 . – № 3. – P. 671–678.

163. *Clark W.M.* A randomized efficacy trial of citicoline in patients with acute ischemic stroke[Текст] / W.M. Clark // Stroke. – 1999. – V. 30. – № 12. – P. 2592–2597.

164. *Clark W.M.* A phase III randomized efficacy trial of 2000 mg citicoline in acute ischemic stroke patients[Текст] / W.M. Clark // Neurology. – 2001. – V. 57. – № 9. – P. 1595–1602.

165. *Cochran W.G.* Sampling Techniques. 2nd ed. [Текст]: W.G. Cochran. – NewYork: John Wiley and Sons, Inc., 1963. – P. 413.

166. Code of Federal Regulation, Title 21, Part 320 A (IDRAC № 8423) / Food and Drug Administration. – Режим доступа: www.idrac.com/idrac/DocInformation.aspx?ID=8423&region1=US (27/Sep/2013) [дата обращения: 15.10.2017].

167. *Collet J.P.* Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: A cohort study [Текст] / J.P. Collet, J.S. Hulot, A. Pena [et al.] // Lancet. – 2009. – V. 373. – P. 309–317.

168. *Connelly L.M.* Pilot studies [Текст]/ L.M. Connelly // Medsurg Nursing. – 2008. – V. 17. – № 6. – P. 411–412.

169. Computerization of Medical Practice for the Enhancement of Therapeutic Effectiveness [Электронный ресурс]. – Режим доступа: compete-study.com/index.htm [дата обращения: 15.10.2017].

170. *Cox K.L.* Immunoassay Methods / K.L. Cox, V. Devanarayan, A. Kriauciunas [et al.] // Assay Guidance Manual. – 2012. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/ [дата обращения: 15.10.2017].

171. *Crossman A.* Pilot Study [Электронный ресурс] / A. Crossman // ThoughtCo. – 2017. – Режим доступа: thoughtco.com/pilot-study-3026449 [дата обращения: 15.10.2017].

172. *Dávalos A.* Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial) [Текст] / A. Dávalos // Lancet. – 2012. – V. 380. – P. 349–357.

173. Decentralized Procedure. EUROPEAN COMMISSION [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://ec.europa.eu/health/fi les/eudralex/vol-2/a/vol2a_chap2_2007- 02_en.pdf [дата обращения 14.02.2017].

174. *Dell D.* Labile Metabolites/ D. Dell // Chromatographia Supplement. – 2004. – № 59. – C. 139–148.

175. *Debry P.* Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol esterification [Текст] / P. Debry, E.A. Nash, D.W. Neklason [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1997. – V. 272. – № 2. – P. 1026–1031.

176. *DinsdaleJ.R.* M. Pharmacokinetics of 14C-CDP Choline [Текст] / J.R.M. Dinsdale // Arzneim – Forsch. Drug Research. – 1983. – V. 33 – № 11. – P. 7.

177. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use [Электронный ресурс]. – Режим доступа ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol – 1/dir_2001_83/2001_83_ec_en.pdf (22/Nov/2012) [дата обращения: 15.10.2017].

178. *Dorn G.W.* Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodeling [Текст] / G.W. Dorn // Cardiovascular Research. – 2009. – V. 81. – № 3. – P. 465–473.

179. Draft Guidance on Aripiprazole [Электронный ресурс] / Food and Drug Administration. –2007. – Режим доступа: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecompliance regulatoryinformation/guidances/ucm082554.pdf.

180. *Drach J.* Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes [Текст] / J. Drach, A. Gsur, G. Hamilton [et al.] // Blood Journal. – 1996. – V. 88. – № 5. – P. 1747–1754.

181. *Dressman J.* Pharmaceutical Dissolution Testing [Текст]: J. Dressman, J. Kramer. – Boca Raton, FL.: Taylor & Francis Group; 2005.

182. *Drozdzik M.* Association of the MDR1 (ABCB1) gene 3435 C>T polymorphism with male infertility [Текст] / M. Drozdzik, J. Stefankiewicz, R. Kurzawa [et al.] // Pharmacological Reports. – 2009. – V. 61. – № 4. – P. 690–696.

183. Drug Price Competition and Patent Term Restoration Act of 1984 (Hatch-Waxman Amendments) [Электронный ресурс] / Food and Drug Administration. – Режим доступа: www.fda.gov/newsevents/testimony/ucm115033.htm. Published 2009 [дата обращения 14.03.2017].

184. DSM Group: россияне предпочитают генерики [Электронный ресурс]. – Режим доступа: dsm.ru/news/315/ [дата обращения: 13.02.2017].

185. *Duncan M.W.* Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [Текст] / W. Duncan, H. Roder, S.W. Hunsucker // Briefings in Functional Genomics. – 2008. – V. 7. – № 5. – P. 355–370.

186. *Ebner T.* Disposition and Chemical stability of Telmisartan 1-O-acylglucuronide [Текст] / T. Ebner, G. Heinzel, A. Prox [et al.] // Drug Metabolism and Disposition. – 1999. – V. 27. – № 1. – P. 1143–1149.

187. *Elbarty F.A.* Liquid chromatographic determination of mycophenolic acid and its metabolites in human kidney transplant plasma: Pharmacokinetic application / F.A. Elbarty, A.S. Shoke // Journal of Chromatography B. – 2007. –V. 859. – P. 276–281.

188. EMA versus US-FDA regulatory requirements regarding bioequivalence of orally administered generics [Электронный ресурс]. – Режим доступа: dgra.de/media/pdf/studium/masterthesis/master_heiss_k.pdf [дата обращения: 15.10.2017].

189. *Eriksson A.E.* Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution [Текст] / A.E. Eriksson, T.A. Jones, A. Liljas // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 1988. – V. 4. – № 4. – P. 274–282.

190. *Ernest S.* P-glycoprotein functions and substrates: possible roles of MDR1 gene in the kidney [Текст] / S. Ernest, E. Bello-Reuss // Kidney International Supplements. – 1998. – № 65. – P. 11–17.

191. *Everitt B.* Medical Statistics from A to Z: A Guide for Clinicians and Medical Students [Текст]: B. Everitt. – Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

192. Excipients in the label and package leaflet ofmedicinal products for human use. ENTR/F2/BL D(2003) [Электронный ресурс] / Europe Commision. – 2003. – Режим доступа: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-2/c/guidelines_excipients_july_2013_rev_1.pdf.

193. Extraction [Электронный ресурс] // Merck Millipore. – Режим доступа: www.merckmillipore.com/RU/ru/products/analytics-sample-prep/analytical-sample-preparation/extraction/3fSb.qB. 0IsAAAE_aP53.Lxi,nav.

194. *Ewles M.* Approaches to Analyzing Therapeutic Peptides and Proteins by LC-MS/MS [Текст] / M. Ewles, M. Pelzer // Bioanalysis. – 2011. – № 3. – P. 1379–1382.

195. FDA Dissolution Database [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/CDER/dissolution.

196. FDA's inactive ingredient database [Электронный ресурс] : Food and Drug Administration. – 2010. – Режим доступа: www.fda.gov/ForPatients/Approvals/default.htm [дата обращения : 15.10.2017].

197. *Ferraroni M.* 1,3-Oxazole-based selective picomolar inhibitors of cytosolic human carbonic anhydrase II alleviate ocular hypertension in rabbits: Potency is supported by X-ray crystallography of two leads [Текст] / M. Ferraroni, L. Lucarini, E. Masini [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2017. – V. 17. – № 25. – P. 4560–4565.

198. *Filipecsei G.* Nanostructured aprepitant compositions, process for the preparation there of and pharmaceutical compositions containing them: Patent US 20130209521 A1 / G. Filipecsei, Z. Otvos, F. Darvas. – 2013.

199. Food and Drug Administration. Orange Book: Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations, 33rd ed [Электронный ресурс] / Food and Drug Administration. – Режим доступа: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/ UCM071436.pdf [дата обращения 14.03.2017].

200. *Fuglsang A.* Sequential Bioequivalence Trial Designs with Increased Power and Controlled Type I Error Rates [Текст] / A. Fuglsang // AAPS Journal. – 2013. – V. 15. – № 3. – P. 659–661.

201. *Gandhi A.* High-sensitivity simultaneous liquid chromatography – tandem mass spectrometry assay of ethinylestradiol and levonorgestrel in human plasma [Текст] / A. Gandhi, S. Guttikar, P. Trivedi // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2015. – № 5. – P. 316–326.

202. *Garrigues A.* The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane [Текст] / A. Garrigues, A.E. Escargueil, S. Orlovski // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – V. 99. – № 16. – P. 10347–10352.

203. *Gehan E.A.* The determination of the number of patients required in a preliminary and a follow-up trial of a new chemotherapeutic agent [Текст] / E.A. Gehan // Journal of Chronic Diseases. – 1961. – V. 13. – P. 346–353.

204. General notes on Biopharmaceutics Classification System (BCS)-based biowaiver applications [Электронный ресурс]/ WHO Prequalification Team –Medicines. Guidance document. – 2014. – Режим доступа: http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21674en/s21674en.pdf.

205. Generic Drug Savings in the U.S. (Fourth Annual Edition: 2012) [Электронный ресурс] / Generic Pharmaceutical Association . – 2012. – Режим доступа: www.gphaonline.org/media//cms/IMSStudyAug2012WEB. pdf [дата обращения 14.03.2017].

206. Generic Drug Savings in the U.S. (Fourth Annual Edition: 2012) [Электронный ресурс] / Generic Pharmaceutical Association . – 2014. – Режим доступа: www.gphaonline.org/media//cms/IMSStudyAug2012WEB. pdf [дата обращения 14.03.2017].

207. *Ghosh C.* LC-MS Methods for Regulated Bioequivalence Studies: Do we Need to Worry about Matrix Effect [Текст]/ C. Ghosh, B. Chakraborty // Open access scientific

reports. – 2012. – № 9. – Режим доступа: http://www.slideshare.net/bhaswatchakraborty/lcms-methods-for-regulated-bioequivalence.

208. *Goas J.Y.* Bilana 90 jours du traitement des accidents vasculairespar la CDP-choline [Текст]. – Paris: Symposium International, 1980.

209. Goodyear M.D.E. Fresh thinking about the Declaration of Helsinki [Текст] / M.D.E. Goodyear, L.A. Eckenwiler, C. Ells // British Medical Journal. – 2008. – № 337. – P. 21 – 28.

210. *Gould A.L.* Group Sequential Extension of a Standard Bioequivalence Testing Procedure [Текст] / A.L. Gould // Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics.– 1995. – V. 23. – № 1. – P. 57–86.

211. *Gruber P.* Solubilized ibuprofen: Patent EP 1863460 A2 / P. Gruber. – 2007.

212. Guideline for Good Clinical Practice E6 (R1) [Текст] / ICH Harmonised Tripartite Guideline. – 1996. – Режим доступа: ingorts.ru/index.php/ru/library/base/262-e6 [дата обращения 14.10.2017].

213. Guideline on requirements for first-in-man clinical trials for potential high-risk medicinal products EMEA/CHMP/SWP/28367/2007 Corr. [Электронный ресурс] // European Medicines Agency. Committee for Medical Products of Human use. – 2007. – Режим доступа:www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002989.pdf [дата обращения: 15.10.2017].

214. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation [Электронный ресурс]/ Food and Drug administration. -2013. – Режим доступа: http://www.fda.gov/downloads/drugs/ guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.

215. Guidance for industry. Bioequivalence recommendations for specific products [Электронный ресурс] / Food and Drug administration. – 2010. – Режим доступа: https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072872.pdf [дата обращения 15.02.2017].

216. Guidance for Industry. Clinical Pharmacogenomics: Premarket Evaluation in Early-Phase Clinical Studies and Recommendations for Labeling [Электронный ресурс]. – Food and Drug Administration. – Режим доступа: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm337169.pdf.

217. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms [Электронный ресурс]/ Food and Drug administration. – 1997. – Режим доступа: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070237.pdf.

218. Guidance for Industry. E16 Biomarkers Related to Drug or Biotechnology Product Development: Context, Structure, and Format of Qualification Submissions [Электронный ресурс]. – Food and Drug Administration. – Режим доступа: file:///C:/Users/user/Desktop/%D0 %9F%D0 %B8 %D1 %82 %D0 %B5 %D1 %80/E16 %20 Biomarkers%20Related%20to.pdf.

219. Guidance for Industry. SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms [Электронный ресурс]/ Food and Drug administration. – 1997. – Режим доступа: http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070640.pdf.

220. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on Biopharmaceutics Classification System [Электронный ресурс]/ Food and Drug administration. – 2000. – Режим доступа: http://www.fda.gov/downloads/ Drugs/Guidances/ucm070246.

221. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 [Электронный ресурс] / European Medicines Agency. Committee for Medical Products of Human use. – 2010. – Режим доступа: ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.

222. Guidance on the investigation of bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ European Medicines Agency. Committee for Medical Products of Human use. – 2010. – Режим доступа: ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf.

223. Guideline on requirements for first-in-man clinical trials for potential high-risk medicinal products EMEA/CHMP/SWP/28367/2007 Corr. [Электронный ресурс] // European Medicines Agency. Committee for Medical Products of Human use. – 2007. – Режим доступа: ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002989.pdf [дата обращения: 15.10.2017].

224. Guideline on similar biological medicinal products EMA CHMP/437/0430 [Электронный ресурс] / European Medicines Agency. – 2005 . – Режим доступа: ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/10/WC500176768.pdf [дата обращения: 15.10.2017].

225. Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human and early clinical trials with investigational medicinal products. EMEA/CHMP/SWP/28367/07 Rev. 1[Электронный ресурс] / European Medicines Agency. Committee for Medical Products of Human use. – 2017. – Режим доступа: ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2017/07/WC500232186.pdf [дата обращения: 18.10.2017].

226. Guidelines for ATC Classification and DDD Assignment 2015. 18th edition [Электронный ресурс] / WHO, Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. – 2015. – Режим доступа: www.whocc.no/filearchive/publications/1_2013guidelines.pdf [дата обращения: 01.03.2017].

227. Guidelines on evaluation of similar Biotherapeutic Products (SBPs) [Электронный ресурс] / World Health Organization. – 2009. – Режим доступа: who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010.pdf [дата обращения: 15.10.2017].

228. Guidelines, 2005 [Электронный ресурс] / Resuscitation Council (UK). – 2005. – Режим доступа: www.resus.org.uk/archive/guidelines-2005/ [дата обращения: 18.10.2017].

229. Guidelines on submission of documentation for a multisource (generic) finished product. General format: preparation of product dossiers in common technical document format: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. 45th report [Электронный ресурс] / World Health Organization, 2011 (WHO Technical Report Series, No. 961), Annex 15. – Режим доступа: whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_961_eng.pdf [дата обращения: 15.10.2017].

230. Guidance for Industry. Estimating the maximum safe starting dose for healthy volunteers [Электронный ресурс] / Food and Drug Administration. – 2005. – Режим доступа: www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm078932.pdf [дата обращения: 18.10.2017].

231. Health systems financing: the path to universal coverage [Электронный ресурс] / WHO. – Режим доступа: http://www.who.int/whr/2010/10_summary_en.pdf?ua=1 [дата обращения 14.03.2017].

232. *Heller D.* Ruggedness testing of quantitative atmospheric pressure ionization mass spectrometry methods: the effect of co-injected matrix on matrix effects / D. Heller // Rapid. Commun. Mass Spectrom. – 2007. – V. 21. – P. 644–652.

233. *Hertzog M.A.*. Considerations in determining sample size for pilot studies [Текст] / M.A. Hertzog // Research in Nursing & Health. – 2008. – V. 31. – P. 180–191.

234. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study [Электронный ресурс]. – Режим доступа : www.ccc.mcmaster.ca/hope.htm [дата обращения: 15.10.2017].

235. *Hilhorst M.* Stabilization of clinical samples collected for quantitative bioanalysis – a reflection from the European Bioanalysis Forum [Текст] / M. Hilhorst, P. van Amsterdam, K. Heinig [et.al.] // Bioanalysis. –2015. – V. 7. – № 3. – P. 333–343.

236. *Huang J. H.* Sample sizes in dosage investigational clinical trials: a systematic evaluation [Текст] / J. –H. Huang, Q. –M. Su, J. Yang [et al.] // Drug Design, Development and Therapy. – 2015. – № 9. – P. 305–312.

237. ICH Q2 R1 «Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology» [Электронный ресурс] // ICH. – Режим доступа: www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.

238. *Jabor V.* Enantioselective pharmacokinetics of lercanidipine in healthy volunteers [Текст] / V. Jabor, E.B. Coelho, V.L. Lanchote // Journal of Chromatography B . – 2004. – № 1. – P. 343–346.

239. *Jain K.K.* Evaluation of memantine for neuroprotection in dementia [Текст] / K.K. Jain // Expert OpinInvestig Drugs. – 2000. – V. 9. – P. 1397–1406.

240. *Jarring J.* Thermodynamic stability and crystal structures for polymorphs and solvates of formoterol fumarate / J. Jarring, T. Larsson, B. Stensland [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2006. – V. 95. – № 5. – P. 1144 – 1161.

241. *Jenkins R.G.* Bioanalysis of Large Molecules by LC-MS/MS in Support of Drug Development [Текст]/ R.G. Jenkins / PPD. – 2011. – Режим доступа: http://www.ppdi.com/~/media/Files/PPDI%20Files/Expert%20Community/Whitepapers/BioanalysisofLargeMoleculesLCMS.

242. *Jessome L.L.* Ion Supression: A major Concern in Mass Specnrometry / L.L. Jessome, D.A. Volmer // LCGC North America. – 2006. – № 24. – P. 498–511.

243. *Kannan K.K.* Crystal Structure of Carbonic Anhydrase. In: Biophysics and Physiology of Carbon Dioxide. Proceedings in Life Sciences [Текст]: ed. by Bauer C., Gros G., Bartels H. – Berlin, Heidelberg: Springer, 1980. – 453 p.

244. *Karalis V.* Current regulatory approaches of bioequivalence testing [Текст] / V. Karalis, P. Macheras // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. – 2012. – V. 8. – № 8. – P. 929–942.

245. *Katteboina M.Y.* LC-MS/MS Method Development and Validation of Montelukast in human plasma and its clinical application [Текст] / M.Y. Katteboina, N.R. Pilli, S.R. Salta // American Journal of Pharmaceutical Research. – 2015. – V. 3. – № 5. – P. 646–657.

246. *Klaassen C.D.* Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation [Текст] / C.D. Klaassen, L.M. Aleksunes // Pharmacological Reviews. – 2010. – V. 62. – № 1. – P. 1–96.

247. *Knutsson M.* LC–MS/MS of large molecules in a regulated bioanalytical environment – which acceptance criteria to apply? [Текст]/ M. Knutsson, R. Schmidt , P. Timmerman // Bioanalysis . – 2013. – № 18. – P. 2211–2214.

248. *Kurosawa G.* Comprehensive screening for antigens overexpressed on carcinomas via isolation of human mAbs that may be therapeutic [Текст] / G. Kurosawa, Y. Akahori, M. Morita [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – V. 105. – № 20. – P. 7287–7292.

249. *Kramar A.* Multistage designs for phase II clinical trials: statistical issues in cancer research [Текст] / A. Kramar, D. Potvin, C. Hill // British Journal of Cancer. – 1996. – V. 74. – № 8. – P. 1317–1320.

250. *Krasavin M.* Carbonic anhydrase inhibitory profile of mono- and bis-sulfonamides synthesized via a direct sulfochlorination of 3-and 4-(hetero)arylisoxazol-5-amine scaffolds [Текст] / M. Krasavin, M. Korsakov, Z. Zvonaryova [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2017. – № 25. – P. 1914–1925.

251. *Krasavin M.* Primary mono- and bis-sulfonamides obtained via regiospecific sulfochlorination of N-arylpyrazoles: inhibition profile against a panel of human carbonic anhydrases [Текст] / M. Krasavin, M. Korsakov, O. Ronzhina [et al.] // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2017. – V. 32. – № 1. – P. 920–934.

252. *Krasavin M.* Probing the "bipolar" nature of the carbonic anhydrase active site: Aromatic sulfonamides containing 1, 3-oxazol-5-yl moiety as picomolar inhibitors of cytosolic CA I and CA II isoforms [Текст] / M. Krasavin, M. Korsakov, M. Dorogov [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2015. –V. 101. – P. 334–347.

253. *Lahamage S.R.* Co-Crystal Approach for Improving Poorly Soluble Drug Agomelatine by Using Acid Conformer for Tablets [Текст] / S.R. Lahamage, A.B. Darekar, A.G. Zalte [et al.] // International journal of pharmacy and pharmaceutical research. – 2016. – № 7. – P. 19–34.

254. *Last J.M.* A Dictionary of Epidemiology [Текст]: J.M. Last. – Oxford, Oxford University Press, 2001.

255. *Lee, H.B.* Occurrence and fate of rosuvastatin, rosuvastatin lactone, and atorvastatin in Canadian sewage and surface water samples [Текст] / H.B. Lee, T.E. Peart, M.L. Svoboda [et al.] // Chemosphere. – 2009. – № 10. – P. 1285–1291.

256. *Lesko L.* Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development [Текст] / L. Lesko, A. Atkinson // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. – 2001. –V. 41. – P. 347–366.

257. *Li W.* Handbook of LC-MS Bioanalysis [Текст]: W. Li, J. Zhang, F.L.S. Tse. – New Jersey: Jonh Wiley and Sons, 2013. – 675 p.

258. *Li W.* Strategies in quantitative LC-MS/MS analysis of unstable small molecules in biological matrices / W. Li, J. Zhang, F. Tse // Biomedical Chromatography. – 2011. – № 25. – P. 258 – 277.

259. *Li X.J.* Quantitation of bivalirudin, a novel anticoagulant peptide in human plasma by LC-MS/MS: Method development, validation and application to pharmacokinetics [Текст] / X.J. Li, Y.T. Sun, L. Yin [et al.] // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2013. – № 3. – P. 1–8.

260. *Lin Z.* Tissue analysis workflow [Текст] / Z. Lin // Future Science. – 2013. – № 10. – P. 36–44.

261. *Lindegardh N.* Importance of Collection Tube during Clinical Studies of Oseltamivir [Текст] / N. Lindegardh, G.R. Davies, T.T. Hien [et.al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2007. – V. 51. – № 5. – P. 1835–1836.

262. *Lipinski C.A.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [Текст] / C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2001. – V. 46. – № 1–3. – P. 3–26.

263. *Mancia G.* Guidelines for the management of arterial hypertension: the TaskForce for the management of arterial hypertension of the European Society ofHypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) [Текст] / G. Mancia, R. Fagard, K. Narkiewicz // Journal of Hypertension. - 2013. – V. 31. – № 7. – P. 1281–1357.

264. *Matsui S.* Genomic Biomarkers for Personalized Medicine: Development and Validation in Clinical Studies [Электронный ресурс] / S. Matsui // Computational and Mathematical Methods in Medicine. – 2013. – № 2013. – Режим доступа: www.hindawi.com/journals/cmmm/2013/865980/.

265. *McCormack J.* Generic versus brand name: the other drug war [Текст] / J. McCormack, J.T. Chmelicek // Canadian Family Physician. – 2014. –V. 60. – № 10. – P. 911.

266. *Mendes G.D.* Cyclosporine bioequivalence study: quantification using fluorescence polarization immunoassay (FPIA) and radioimmunoassay (RIA) [Текст] / G.D. Mendes, C.H. de Oliveira, M. Sucupira [et al.] // International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics. – 2004. –V. 42. – № 2. – P. 125–132.

267. *Mendoza-Tamayo G.* Bioavailability of Two Tablet Formulations of a Single Dose of Moxifloxacin 400 mg: An Open-Label, Randomized, Two-Period Crossover Comparison in Healthy Mexican Adult Volunteers [Текст] / G. Mendoza-Tamayo, A. Rosete-Reyes, R. Medina-Santillán [et al.] // Journal of bioequivalence & bioavailability. – 2014. – V. 6. – P. 197–201.

268. *Michelini E.* Cell-based assays: fuelling drug discovery [Текст]/ E. Michelini, L. Cevenini, L. Mezzanotte [et al.] // Analytical and Bioanalytical Chemistry – 2010. – V. 398. – № 1. – P. 227–238.

269. *Midha K.K.* Bioequivalence of two thorazine tablet formulations using radioimmunoassay and gas chromatographic-mass spectrometric methods [Текст] / K.K. Midha, G. McKay, B.S. Chakraborty [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1990. – V. 79. – № 3. – P. 196–201.

270. *Moffat A.C.* Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 4th Edition [Текст] / A.C. Moffat. – Pharmaceutical Press, 2011. – 2471 p.

271. *Montague T.H.* Additional results for 'Sequential design approaches for bioequivalence studies with crossover designs [Текст] / T.H. Montague, D. Potvin, C.E. DiLiberti [et al.] // Pharmaceutical Statistics. – 2011. – V. 11. – № 1. –P. 8–13.

272. *Mughal W.* Cell death signalling mechanisms in heart failure [Текст] / W. Mughal, L.A. Kirshenbaum // Experimental & Clinical Cardiology. – 2011. – V. 16. – № 4. – P. 102–108.

273. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Fortieth report [Электронный ресурс] / World Health Organization, 2006 (WHO Technical Report Series, № 937), Annex 7. – Режим доступа: http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_937_eng.pdf [дата обращения: 15.10.2017].

274. Non-clinical safety studies for clinical trials. CPMP/ICH/286/95 [Электронный ресурс] / European Medicines Agency. Committee for Medical Products of Human use. – 2000. – Режим доступа: http://www.iss.it/binary/scf1/cont/ICH_Topic_M_3_R1_.pdf [дата обращения: 18.10.2017].

275. *O'Neil P.* Ethics guidelines for clinical trials to be revised [Текст] / P. O'Neil // Canadian Medical Association Journal. – 2008. – V. 178. – № 2. – P. 138.

276. *Ozawa S.* Ethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2 D6, CYP2 C19, CYP3 As and MDR1/ABCB1 [Текст] / S. Ozawa, A. Soyama, M. Saeki [et al.] // Drug Metabolism and Pharmacokinetics. – 2004. – № 19. – P. 83–95.

277. *Pena-Pereira F.* Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review / F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho // Spectrochim. Acta. Part. B. –2009. –V. 64. – P. 1–15.

278. *Percy Ivy S.* Approaches to Phase 1 Clinical Trial Design Focused on Safety, Efficiency, and Selected Patient Populations: A Report from the Clinical Trial Design Task Force of the National Cancer Institute Investigational Drug Steering Committee [Текст] / S. Percy Ivy, L.L. Siu, E. Garrett-Mayer [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2010. – V. 16. – № 6. – P. 1726–1736.

279. *Pérez-Castrillon J.L.* Vitamin d levels and lipid response to atorvastatin [Электронный ресурс] / J.L. Pérez-Castrillon, L. Abad Manteca, G. Vega [et al.] // International Journal of Endocrinology. – 2010. – № 2010. – Режим доступа: www.hindawi.com/journals/ije/2010/320721/.

280. *Perlovich G.L.* Polymorphism of paracetamol. Relative stability of the monoclinic and orthorhombic phase revisited by sublimation and solution calorimetry / G.L. Perlovich, T.V. Volkova, A. Bauer-Brandi // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. – 2007. –V. 89. – № 3. – P. 767–774.

281. *Pham-Huy C.* Separation of oxazepam, lorazepam, and temazepam enantiomers by HPLS on a derivatizated cyclodextrin-bonded phase: application to the determination of oxazepam in plasma [Текст] / C. Pham-Huy, G. Villain-Pautet. H. Hua // Biochemical and biophysical methods. – 2002. – V. 54. – P. 287–299.

282. Pharmaceuticals. European Commission [Электронный ресурс]. – Режим доступа: ec.europa.eu/comm/competition/sectors/pharmaceuticals/inquiry/index.html [дата обращения: 17.02.2016].

283. *Podubowska A* Study of pH-dependent drugs solubility in water [Текст]/ A. Podubowska, U. Domanska // Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly. – 2014. – № 20. – P. 115–126.

284. *Pomara C.* Effects of Nandrolone Stimulation on Testosterone Biosynthesis in Leydig Cells [Текст]/ C. Pomara, R. Barone, A.M. Gammazza [et al.] // Journal of Cellular Physiology. – 2015. – № 6. – P. 1385–1391.

285. *Pont L.* An update for human blood plasma pretreatment for optimized recovery of low-molecular-mass peptides prior to CE–MS and SPE–CE–MS [Текст] / L. Pont, F. Benavente, J. Barbosa [et al.] // Journal of Separation Science. – 2013. – № 36. – P. 3896 -3902.

286. *Potvin D.* Sequential design approaches for bioequivalence studies with crossover designs [Текст] / D. Potvin, C.E. DiLiberti, W.W. Hauck [et al.] // Pharmaceutical Statistics. – 2008. – V. 7. – № 4. – P. 245–262.

287. Pharmaceutical innovation [Текст] // British Journal of Clinical Pharmacology. – 1988. – V. 25. – P. 387–396.

288. *Qureshi İ.* Citicoline: A Novel Therapeutic Agent with Neuroprotective, Neuromodulatory, and Neuroregenerative Properties [Электронный ресурс] / İ. Qureshi, J.R. Endres // Natural Medicine Journal. – 2010. – V. 6, № 2. – Режим доступа: https://www.naturalmedicinejournal.com/journal/2010–06/citicoline-novel-therapeutic-agent-neuroprotective-neuromodulatory-and.

289. Reflection Paper on the use of Pharmacogenetics in the Pharmacokinetic Evaluation of Medicinal Products [Электронный ресурс]. – European Medical Agency. – 2009. – Режим доступа: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003890.pdf.

290. Reflection Paper on Pharmacogenomic Samples, Testing and Data Handling [Электронный ресурс]. – European Medical Agency. – 2009. – Режим доступа: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientifi c_ guideline/2009/09/WC500003864.pdf.

291. *Rocci M.L.* Confirmatory Reanalysis of Incurred Bioanalytical Samples [Текст] / M.L. Rocci, V. Devanarayan, D.B. Haughey [et al.] // The AAPS Journal. – 2007. – V. 9. – № 3. – C. 336–343.

292. *Ryska M.* How to deal with the “matrix effect” as an unavoidable phenomenon [Текст]/ M. Ryska // European Journal of Mass Spectrometry. – 2015. – № 21. – C. 423–432.

293. *Roffey S.J.* The disposition of Voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human [Текст] / S.J. Roffey, S. Cole, P Comby [et al.] // Drug metabolism and Disposition. – 2003. – V. 31. – № 6. – P. 731–741.

294. *Schneider L.S.* Treatment with cholinesterase inhibitors and memantine of patients in the Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative [Текст] / L.S. Schneider, P.S. Insel, M.W. Weiner // Archives of neurology. – 2011. – V. 68. – P. 58–66.

295. *Schön A.* Thermodynamics-based drug design: strategies for inhibiting protein–protein interactions [Текст] / A. Schön, S.Y. Lam, E. Freire // Future Medicinal Chemistry. – 2011. – V. 9. – № 3. – P. 1129–1137.

296. *Shah R.* QT interval in drug development [Текст] / R. Shah // British Journal of Clinical Pharmacology. – 2002. –V. 54. – P. 188–202.

297. *Sher M.* Bioequivalence of two oral formulations of moxifloxacin and its analytical study by HPLC-UV method [Текст] / M. Sher, M.A. Hussain, S. Jahan [et al.] // Pakistan Journal of Science. – 2010. – V. 62. – № 2. – P. 84–88.

298. *Sibille M.* Is phase 1 still safe? [Текст] / M. Sibille // British Journal of Clinical Pharmacology. – 2006. – V. 62. – P. 502–503.

299. *Sicras-Mainar A.* Physicians' and patients' opinions on the use of generic drugs [Текст] / A. Sicras-Mainar, R. Navarro-Artieda // Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics. – 2012. – V. 3. – № 3. – P. 268–270.

300. *Smeraglia J.* Matrix Effects and Selectivity Issues in LC-MS-MS [Текст] / J. Smeraglia, S.F. Baldrey, D. Watson // Chromatographia. – 2002. – № 55. – P. 95–99.

301. *Smith K.M.* Tissue sample preparation in bioanalytical assays [Текст] / K.M. Smith, Y. Xu // Bioanalysis. – 2012. – T. 6. – № 4. – P. 741–749.

302. *Stokvis E., Rosing H., Beijnen J.H.* Stable isotopically labeled internal standards inquantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? // Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 2005. – № 19. – C. 401–407.

303. Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labels [Электронный ресурс]. – Food and Drug Administration. – Режим доступа:www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm.

304. *Tarur V.R.* Process for the Preparation of Micronized Valsartan: Patent US 20090304797 A1 / V.R. Tarur, D.G. Sathe, N. Rao [et al.]. – 2009.

305. *Tazaki Y.* Treatment of acute cerebral infarction with a choline precursor in a multicenter double-blind placebo-controlled study [Текст] / Y. Tazaki // Stroke. – 1988. – V. 19. – P. 211–216.

306. *Tessner T.G.* Overexpression of MDR1 in an intestinal cell line results in increased cholesterol uptake from micelles [Текст] / T.G. Tessner, W.F. Stenson // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2000. – V. 267. – № 2. – P. 565–571.

307. *Thabane L.* A tutorial on pilot studies: the what, why and how [Текст] / L. Thabane, J. Ma, R. Chu [et al.] // BMC Medical Research. – 2010. – № 10. – P. 1 [дата обращения: 15.10.2017].

308. The European Pharmacopaea [Текст]. – 8-е изд. – Vol. 1. – Strasbourg, 2013. – 1211 p.

309. The Pharmaceutical Industry in Figures [Электронный ресурс]. – Режим доступа: itam.org.tr/docs/EFPIA_Figures_2012.pdf [дата обращения: 09.02.2017].

310. The United States Pharmacopoeia 37 and National Formulary 32 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: uspnf.com.

311. *Toverud E. –L.* A Systematic Review of Physicians' and Pharmacists' Perspectives on Generic Drug Use: What are the Global Challenges? [Текст] / E. – L. Toverud, K. Hartmann, H. Hakonsen // Applied Health Economics and Health Policy. – 2015. – V. 13 – P. 35–45.

312. Toxicokinetics and exposure in toxicology studies. CPMP/ICH/384/95 [Электронный ресурс] / European Medicines Agency. Committee for Medical Products of Human use. – 1995. – Режим доступа: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002770.pdf [дата обращения: 18.10.2017].

313. *Tuli L.* LC–MS Based Detection of Differential Protein Expression [Текст] / L. Tuli, H.W. Ressom // Journal Proteomics and Bioinformatics. – 2009. – № 2. – P. 416–438.

314. *Van de Merbel N.C.* A validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of 4β-hydroxycholesterol in human plasma

[Текст] / N.C. van de Merbel, K.J. Bronsema, M.W.J. van Hout, [et.al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2011. – V. 55. – P. 1089 – 1095.

315. *Van de Merbel N.C.* Quantitative determination of free and total dopamine in human plasma by LC-MS/MS: the importance of sample preparation [Текст] / N.C. van de Merbel, G. Hendriks, R. Imbos [et.al.] // Bioanalysis. – 2011. – V. 17. – № 3. – P. 1949 – 1961.

316. *Vastag B.* Helsinki Discord? A Controversial Declaration [Текст] / B. Vastag // JAMA. – 2000. – V. 284. – № 23. – P. 2983–2985.

317. *Viswanathan C.T., Bansal S., Booth B., De Stefano A.J., Rose M.J.* Workshop/ Conference Report – Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays/ C.T. Viswanathan, S. Bansal, B. Booth [et al.] // The AAPS Journal. – 2007. – V. 9, № 1. – C. 30–42.

318. *Wang C.J.* Novel inhibition of cis/trans retinoic acid interconversion in biological fluids – an accurate method for determination trans and 13-cis retinoic acid in biological fluids [Текст] / C.J. Wang, L.H. Pao, C.H. Hsiong [et.al.] // Journal of Chromatography B. – 2003. – V. 796. – P. 283–291.

319. *Wang S.* Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma / S. Wang, M. Cyronak, E. Yang // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2007. – № 43. – C. 701–707.

320. *Weber W.W.* Pharmacogenetics [Текст]: W.W. Weber. – Oxford: Oxford University Press, 1997. – 599 p.

321. WHO. Global Health Observatory (GHO) data [Электронный ресурс] / Food and Drug Administration. – Режим доступа: www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en [дата обращения 14.03.2017].

322. *Wickremsinhe E.R.* Stereoselective Metabolism of Prasugrel in Humans Using a Novel Chiral Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method [Текст] / E.R. Wickremsinhe, Y. Tian, K.J. Ruterbories [et al.] // Drug Metobalism and Disposition. – 2007. – V. 35. – № 6. – P. 917–921.

323. *Wilkinson D.* Analysis of the effect of memantine in reducing the worsening of clinical symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease [Текст] / D. Wilkinson, H.F. Andersen // Dementia and Geriatric Cognitive Disorders – 2007. – V. 24. – P. 138–145.

324. *Williams R.L.* Equivalence approaches [Текст] / R.L. Williams, M.L. Chen, W.W. Hauck // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2002. – № 72. – P. 229 – 237.

325. *Wurtman R.J.* Effects of oral CDP – Choline on Plasma Choline and Uridine levels in humans [Текст] / R.J. Wurtman, M. Regan, I. Ulus [et al.] // Biochemical Pharmacology. – 2000. – V. 60. – P. 989 – 992.

326. *Yamamoto T.* Biochemistry of uridine in plasma [Текст] / T. Yamamoto, H. Koyama, M. Kurajoh [et al.] // Clinica Chimica Acta. – 2011. – V. 412. – P. 1712 – 1724.

327. *Xiong G.* Combination drug therapy for Alzheimer's disease: what is evidencebased, and what is not? [Текст] / G. Xiong, P.M. Doraiswamy // Geriatrics. – 2005. – V. 60. – P. 22–26.

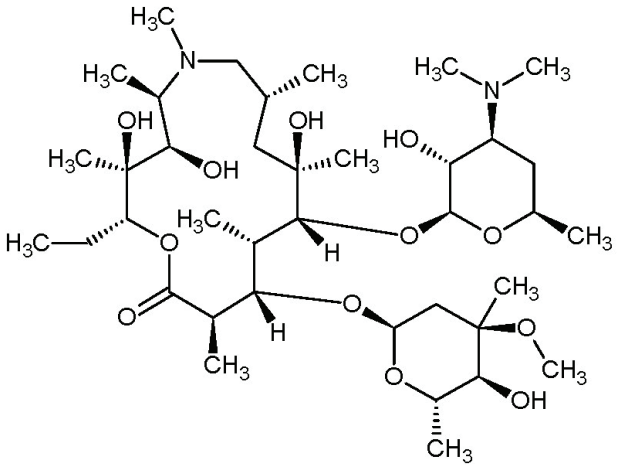
328. *Xu J.* Optimal adaptive sequential designs for crossover bioequivalence studies [Текст] / J. Xu, C. Audet, C.E. DiLiberti [et al.] // Pharmaceutical Statistics. – 2016. – V. 15. – № 1. –P. 15–27.

329. *Xue Y.J.* Bioanalysis of drug in tissue: current status and challenges [Текст] / Y.J. Xue, H. Gao, Q.C. Ji [et al.] // Bioanalysis. – 2012. – № 4 (21). – P. 2637–2653.

ПРИЛОЖЕНИЕ

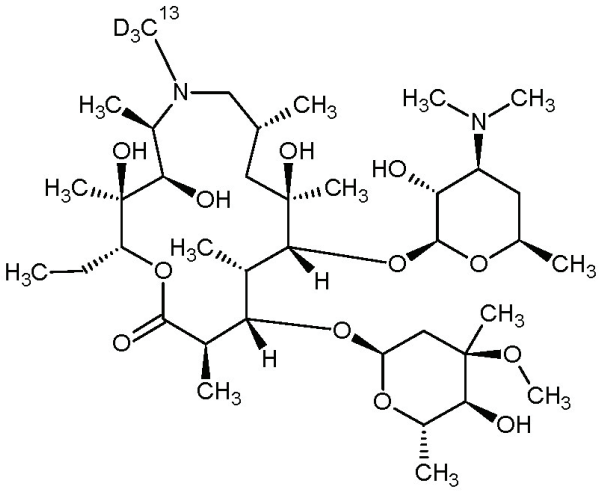
ПРИМЕРЫ ВАЛИДИРОВАННЫХ МЕТОДИК И РЕЗУЛЬТАТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Азитромицин



Молекулярная формула: $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$
M_r: 748.98

Внутренний стандарт: Азитромицин-13CD3



Молекулярная формула: $C_{37}H_{69}N_2O_{12}{}^{13}CD_3$
M_r: 753.01

Диапазон измеряемых концентраций: 4.0 – 800.0 нг/мл
Метод подготовки проб: осаждение белка
Аналитический метод: ВЭЖХ-МС/МС

Детектор	TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific)
Колонка 1	Luna 3 um C8(2) 100Å, 20 x 4.0 mm, MercuryMS, Phenomenex
Колонка 2	Luna 5u C8(2) 100Å, 150 x 4.6 mm, Phenomenex
Ионизация	Электрораспыление с термофокусировкой
Детектирование	Полярность: положительная MS/MS (SRM): AZM 749.5 → 591.5, 749.5 → 158.0; dAZM 753.6 → 595.6
Подвижная фаза	Ацетонитрил, карбинол, 100 мМ ацетат аммония, вода ультрачистая

Разработанная биоаналитическая методика была успешно использована при проведении нескольких исследований биоэквивалентности препаратов азитромицина. Фармакокинетические параметры, рассчитанные по результатам нижеприведенных исследований, приведены в таблицах.

Все исследования азитромицина имели стандартный двухэтапный перекрестный дизайн. Фармакокинетические параметры, представленные в таблицах ниже, были рассчитаны с помощью программ Phoenix WinNonLin, SAS или R (модуль bear) и Statsoft Statistica.

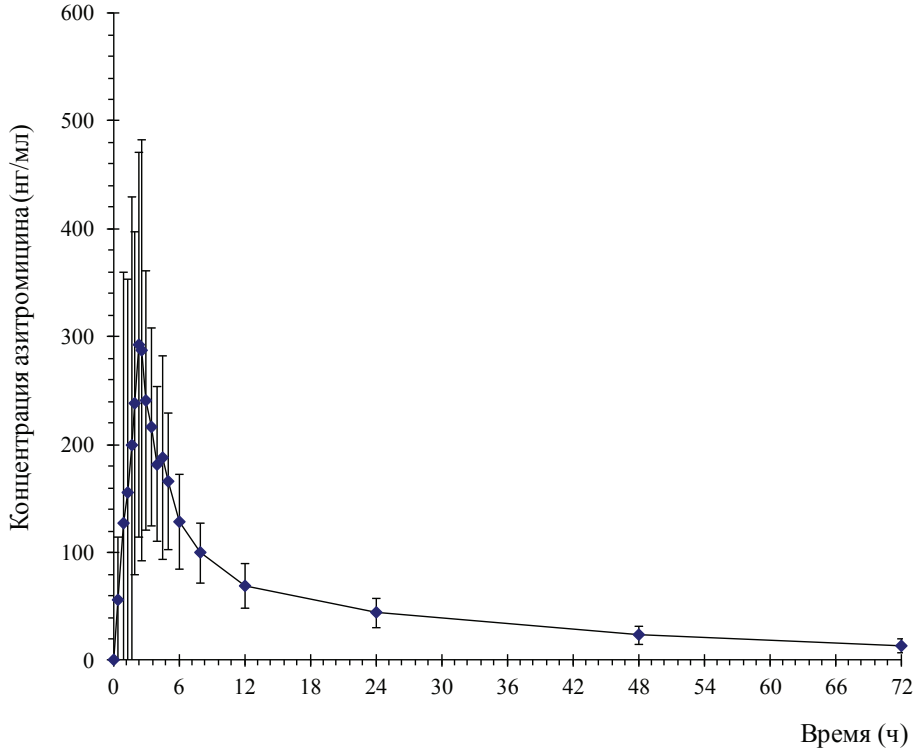
В исследовании № 1 (МНН: азитромицин, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 500 мг) принимали участие 36 здоровых добровольцев. Все добровольцы завершили оба этапа, и их данные были проанализированы в соответствии с Протоколом. В качестве референтного средства был выбран препарат Сумамед® (МНН: азитромицин), таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг, производства «Плива Хрватска д.о.о.», республика Хорватия. Дизайном исследования был предусмотрен следующий порядок временных точек отбора проб: 0 мин (до приема препарата), 30 мин, 1 час, 1 час 20 минут, 1 час 40 мин, 2 часа, 2 часа 20 мин, 2 часа 40 мин, 3 часа, 3 часа 30 мин, 4 часа, 4 часа 30 мин, 5 часов, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа после приема лекарственного препарата. Коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров азитромицина C_{max} и AUC_{0-t} составили 25,9 % и 17,3 % соответственно.

Основные фармакокинетические параметры приведены в таблице ниже. Значения в таблице являются следующими элементами описательной статистики: Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, Median – медиана, Minimum и Maximum – минимальное и максимальное значения соответственно, CV – коэффициент вариации (Mean/SD·100 %).

Фармакокинетические параметры азитромицина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг (N=36), по данным исследования № 1.

ФК параметры	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	CV
C_{max}, нг/мл	500,8	191,1	462,3	183,9	977,1	38,16
T_{max}, ч	2,27	0,91	2,33	0,50	4,50	40,13
AUC_{0-t}, нг·ч/мл	3552,5	1010,8	3622,7	1244,6	5736,3	28,45
$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	4085,1	1166,9	4171,1	1439,9	6984,2	28,56
$T_{½}$, ч	26,62	5,34	25,91	18,68	39,38	20,05
MRT, ч	31,68	5,90	30,42	22,45	44,07	18,61

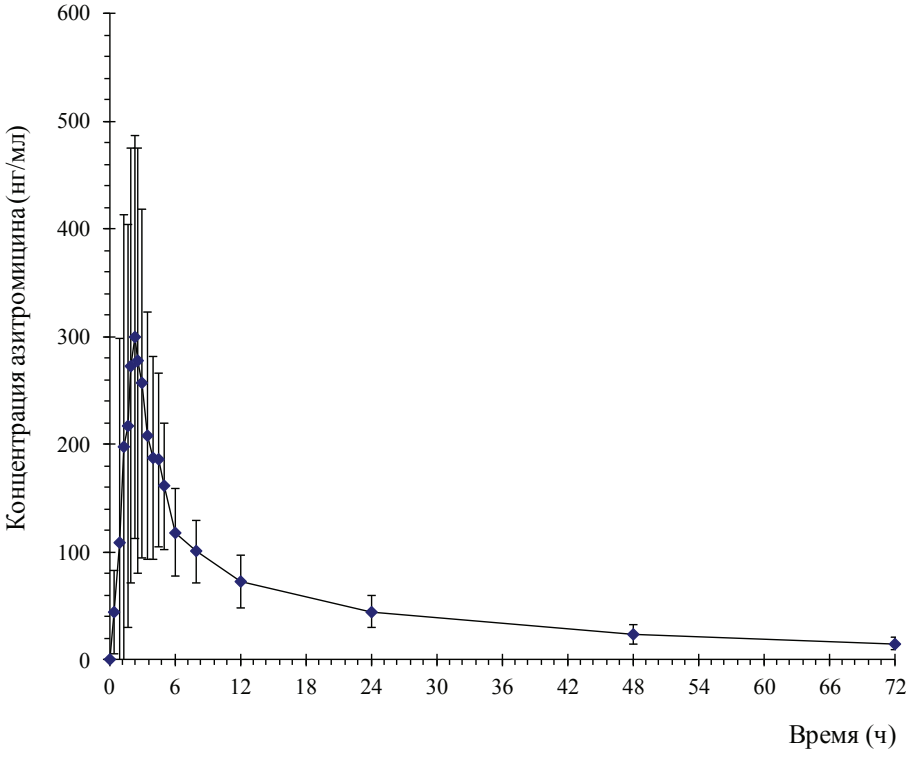
Усредненная фармакокинетическая кривая азитромицина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 500 мг (по данным исследования № 1).



В аналогичном исследовании № 2 (МНН: азитромицин, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 500 мг) с тем же препаратом в качестве референтного приняли участие 48 здоровых добровольцев, все завершили исследование в соответствии с Протоколом. Порядок временных точек отбора проб см. выше.

Коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров азитромицина C_{max} и $AUC_{0–72}$ составили 29,0 % и 24,8 % соответственно.

Усредненная фармакокинетическая кривая азитромицина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 500 мг (по данным исследования № 2)



Фармакокинетические параметры азитромицина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг (N=36), по данным исследования № 2.

ФК параметры	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	CV
C_{max}, нг/мл	469,4	207,5	446,7	111,6	1129,9	44,21
T_{max}, ч	2,39	0,89	2,33	1,00	4,50	37,19
AUC_{0-t}, нг·ч/мл	3632,0	1169,8	3492,3	1048,6	6871,5	32,21
$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	4253,0	1382,4	3998,9	1355,2	7871,8	32,50
$T_{½}$, ч	28,56	5,39	27,45	19,36	42,86	18,88
MRT, ч	33,92	6,55	32,12	23,15	50,15	19,32

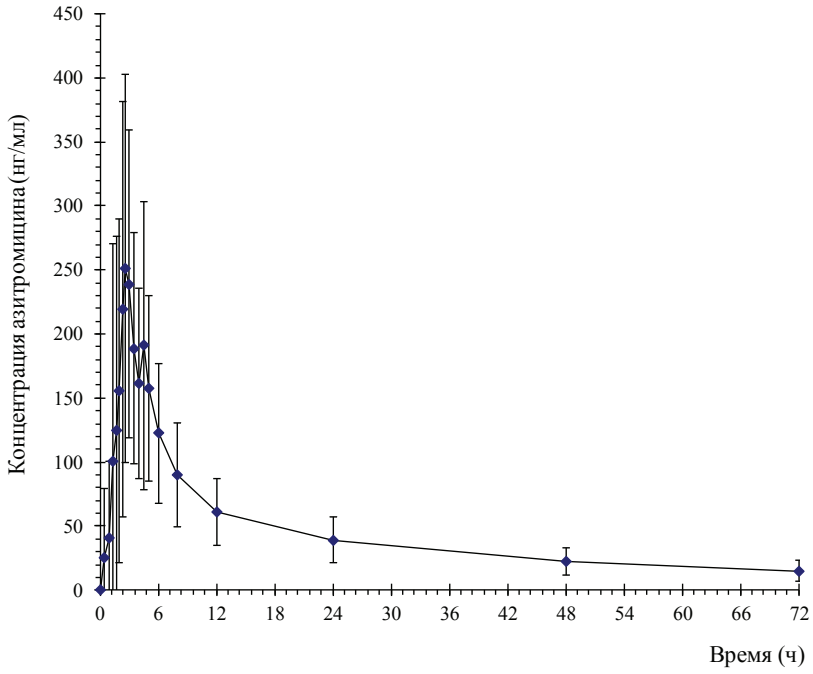
Очевидно, фармакокинетические параметры, оцененные по итогам этого исследования биоэквивалентности, находятся в согласии с данными исследования № 1.

В исследовании № 3 (МНН: азитромицин, капсулы 250 мг) принимали участие 36 здоровых добровольцев. Все добровольцы завершили оба этапа, и их данные были проанализированы в соответствии с Протоколом. В качестве референтного средства был выбран препарат Сумамед® (МНН: азитромицин), капсулы, 250 мг, производства «Плива Хрватска д.о.о.», республика Хорватия. Порядок временных точек отбора проб см. выше. Коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров азитромицина C_{max} и AUC_{0-t} составили 27,8 % и 20,6 % соответственно.

Фармакокинетические параметры азитромицина после однократного приема референтного препарата, капсулы, 250 мг (N=36), по данным исследования № 3.

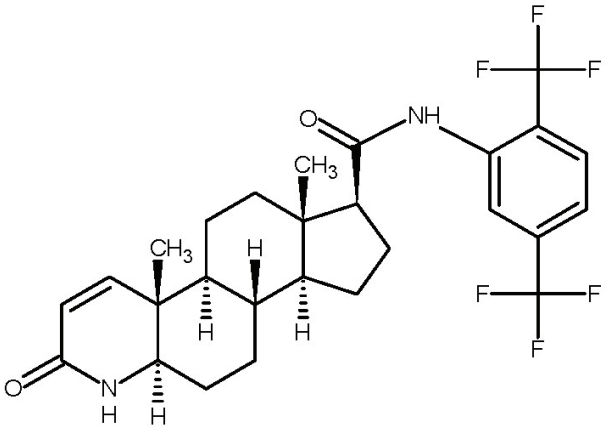
ФК параметры	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	CV
C_{max}, нг/мл	355,0	156,7	328,1	89,3	735,8	44,13
T_{max}, ч	2,62	0,90	2,67	1,33	5,00	34,46
AUC_{0-t}, нг·ч/мл	3161,9	1318,4	2931,4	1086,7	6607,7	41,70
$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	3920,2	1682,7	3630,8	1314,7	8436,3	42,93
$T_{½}$, ч	33,70	10,64	30,72	22,61	74,22	31,57
MRT, ч	40,32	13,15	37,74	26,45	97,15	32,62

Усредненная фармакокинетическая кривая азитромицина после однократного приема референтного препарата, капсулы 250 мг (по данным исследования № 3)



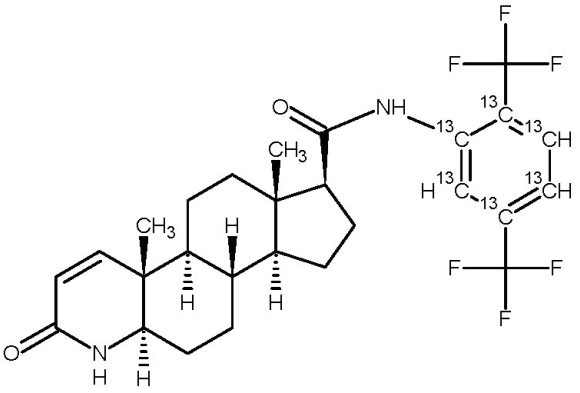
Полученные в исследованиях 1–3 значения согласуются с известными данными литературы о фармакокинетике азитромицина, см., например [270].

Дутастерид



Молекулярная формула: $C_{27}H_{30}F_6N_2O_2$
M_r: 528.54

Внутренний стандарт: Дутастерид-$^{13}C_6$



Молекулярная формула: $C_{21}{}^{13}C_6H_{30}F_6N_2O_2$
M_r: 534.48

Диапазон измеряемых концентраций: 0.050 – 10.000 нг/мл
Метод подготовки проб: твердофазная экстракция
Аналитический метод: ВЭЖХ-МС/МС

Детектор	LCMS-8060 (Shimadzu Corporation)
Колонка 1	Luna C18(2) Mercury, 20 x 4.0 mm, 5 µm, Phenomenex
Колонка 2	Luna C18(2), 30 x 3.0 mm, 100Å, 5 µm, Phenomenex
Ионизация	Электроспрей
Сканирование	Полярность: отрицательная MS/MS (SRM): DTS 527 → 228; cDTS 533 → 234
Подвижная фаза	Ацетонитрил, карбинол, 40 мМ формиат аммония, вода ультрачистая

Разработанная биоаналитическая методика была успешно использована при проведении двух исследований биоэквивалентности препаратов дутастерида. Фармакокинетические параметры, рассчитанные по результатам нижеприведенных исследований, приведены в таблицах.

Оба исследования имели стандартный двухэтапный перекрестный дизайн. В качестве референтного средства был выбран препарат Аводарт® (МНН: дутастерид), капсулы 0,5 мг, «ГлаксоСмитКляйн Трейдинг», Россия. Фармакокинетические параметры, представленные в таблицах ниже, были рассчитаны с помощью программ Phoenix WinNonLin, SAS или R (модуль bear) и Statsoft Statistica.

В исследовании № 1 (МНН: дутастерид, капсулы 0,5 мг) принимали участие 50 здоровых добровольцев. 49 Добровольцев завершили оба этапа, и их данные были проанализированы в соответствии с Протоколом. Дизайном исследования был предусмотрен следующий порядок временных точек отбора проб: 0 мин (до приема препарата), 20 мин; 40 мин; 1 ч; 1 ч 20 мин; 1 ч 40 мин; 2 ч; 2 ч 20 мин; 2 ч 40 мин; 3 ч; 3 ч 30 мин, 4 ч; 5 ч, 6 ч; 7 ч, 9 ч; 12 ч; 24 ч; 48 ч; 72 ч.

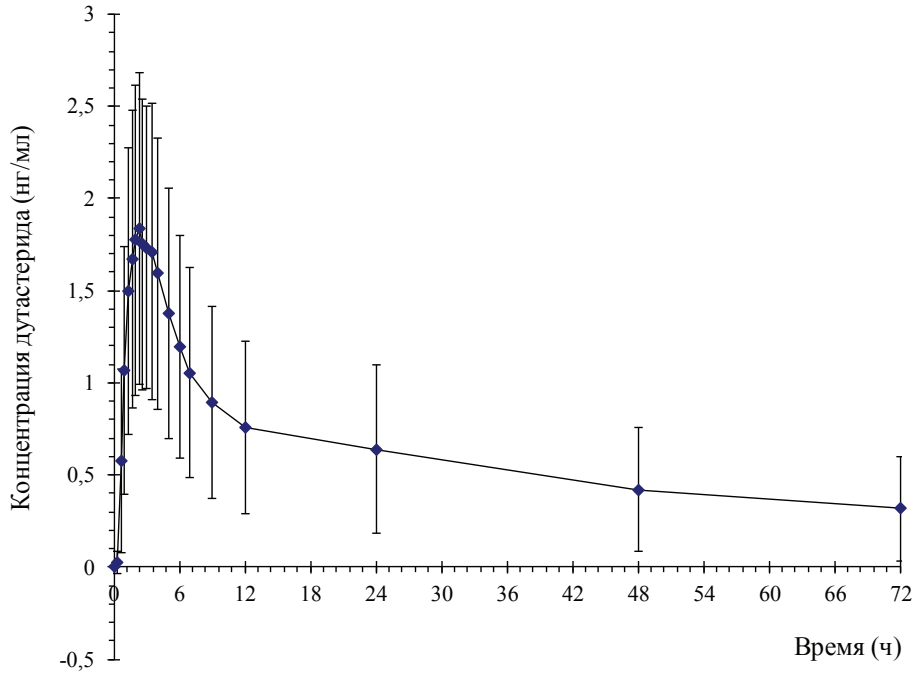
Коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров дутастерида C_{max} и AUC_{0-t} составили 20,7 % и 11,7 % соответственно.

Основные фармакокинетические параметры приведены в таблице ниже. Значения в таблице являются следующими элементами описательной статистики: Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, Median – медиана, Minimum и Maximum – минимальное и максимальное значения соответственно, CV – коэффициент вариации (Mean/SD·100 %).

Фармакокинетические параметры дутастерида после однократного приема референтного препарата, капсулы, 0,5 мг (N=49), по данным исследования № 1.

ФК параметры	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	CV
C_{max}, нг/мл	2,030	0,836	1,855	0,774	3,931	41,20
T_{max}, ч	2,35	0,88	2,33	0,67	5,00	37,33
AUC_{0-t}, нг·ч/мл	43,544	28,765	37,778	6,722	117,391	66,06
$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	69,253	54,497	49,790	8,385	224,360	78,69
$T_{½}$, ч	42,82	21,91	37,39	8,51	104,91	51,18
MRT, ч	57,39	31,08	51,81	8,90	140,49	54,15

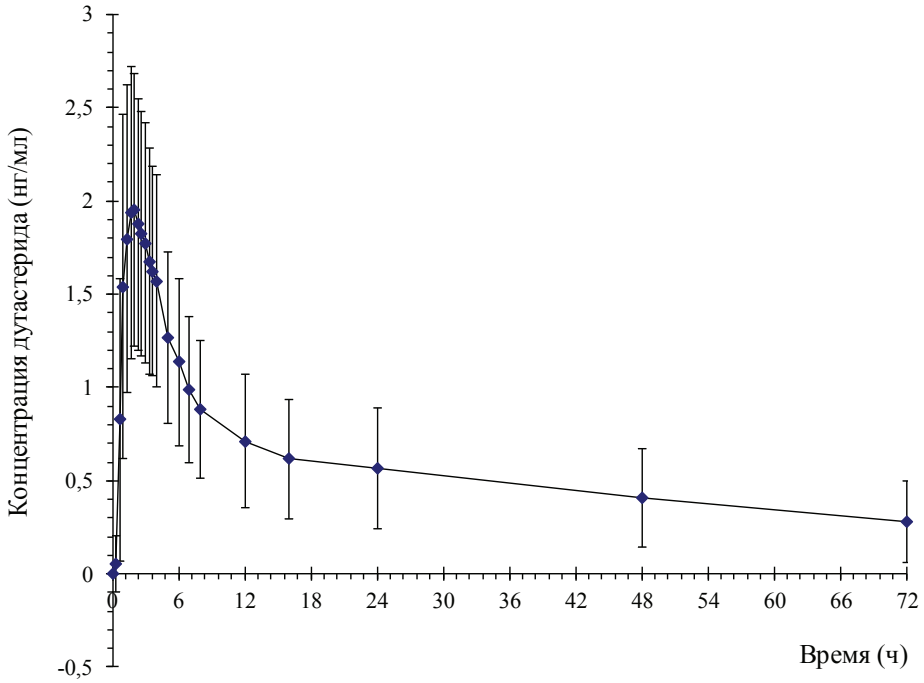
Усредненная фармакокинетическая кривая дутастерида после однократного приема референтного препарата, капсулы 0,5 мг (по данным исследования № 1)



В аналогичном исследовании № 2 (МНН: дутастерид, капсулы 0,5 мг) приняли участие 52 здоровых добровольца, из них 48 завершили исследование в соответствии с Протоколом. Дизайном исследования был предусмотрен следующий порядок временных точек отбора проб: 0 мин (до приема препарата), 20 мин, 40 мин, 1 час, 1 час 20 мин, 1 час 40 минут, 2 часа, 2 часа 20 минут, 2 часа 40 минут, 3 часа, 3 часа 20 минут, 3 часа 40 минут, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов и 72 часа после приема лекарственного препарата.

Коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров дутастерида C_{max} и $AUC_{0–72}$ составили 29,0 % и 24,8 % соответственно.

Усредненная фармакокинетическая кривая дутастерида после однократного приема референтного препарата, капсулы 0,5 мг (по данным исследования № 2)

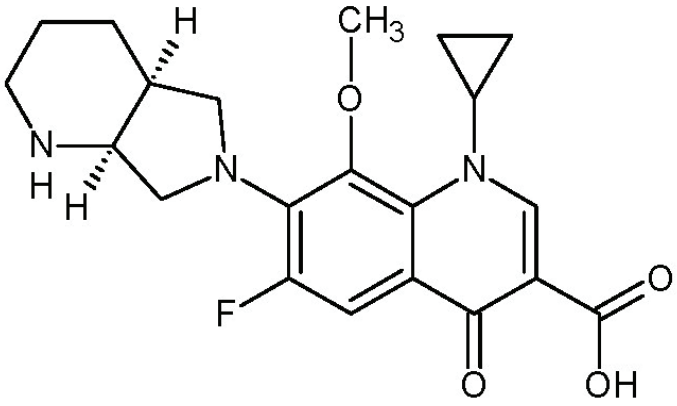


Фармакокинетические параметры дутастерида после однократного приема референтного препарата, капсулы, 0,5 мг (N=48), по данным исследования № 2.

ФК параметры	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	CV
C_{max}, нг/мл	2,213	0,776	2,075	0,586	4,035	35,04
T_{max}, ч	2,01	0,93	2,00	1,00	5,00	46,31
AUC_{0-72}, нг·ч/мл	41,055	21,202	38,995	3,710	107,250	51,64
$T_{½}$, ч	48,45	20,89	41,91	3,49	113,39	43,11

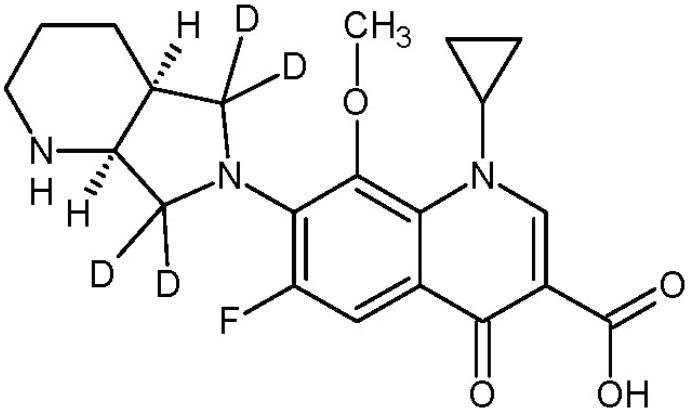
Очевидно, фармакокинетические параметры, оцененные по итогам этого исследования биоэквивалентности, находятся в согласии с данными исследования № 1.

Моксифлоксацин



Молекулярная формула: $C_{21}H_{24}FN_3O_4$
M_r: 401.43

Внутренний стандарт: Моксифлоксацин-d_4



Молекулярная формула: $C_{21}H_{20}D_4FN_3O_4$
M_r: 405.46

Диапазон измеряемых концентраций: 50.0 – 5000.0 нг/мл
Метод подготовки проб: осаждение белка
Аналитический метод: ВЭЖХ-МС/МС

Детектор	TSQ Quantum Discovery Max (Thermo Scientific)
Предколонка	SecurityGuard Cartridge Fusion-RP, 4 x 3.0 mm, Phenomenex
Колонка	Synergi 4u MAX-RP 80Å, 150 x 4.6 mm, Phenomenex
Ионизация	Электрораспыление с термофокусировкой
Сканирование	Полярность: положительная MS/MS (SRM): MFX 402 → 358; dMFX 406 → 263; 406 → 362
Подвижная фаза	Карбинол, 6 % муравьиная кислота, вода ультрачистая

Разработанная биоаналитическая методика была успешно использована при проведении нескольких исследований биоэквивалентности. Фармакокинетические параметры, рассчитанные по результатам нижеприведенных исследований, приведены в таблицах.

Ниже подробно описаны основные результаты пяти независимых исследований биоэквивалентности. Все исследования имели стандартный двухэтапный перекрестный дизайн. В качестве референтного средства был выбран препарат Авелокс®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 400 мг (производства Байер Шеринг Фарма АГ, Германия). Фармакокинетические параметры, представленные в таблицах ниже, были рассчитаны с помощью программ Phoenix WinNonLin, SAS или R (модуль bear).

В исследовании № 1 (МНН: моксифлоксацин, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг) принимали участие 28 здоровых добровольцев. Дизайном исследования был предусмотрен следующий порядок временных точек отбора проб: 0 мин (до приема препарата), 10 мин, 20 мин, 40 мин, 1 час, 1 час 20 мин, 1 час 40 минут, 2 часа, 2 часа 30 минут, 3 часа, 3 часа 30 минут, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов после приема лекарственного препарата. На основании значений остаточной площади, составившей в среднем не более 7 % от $AUC_{0-\infty}$, был сделан вывод о достаточности периода отбора проб для корректной оценки фазы элиминации.

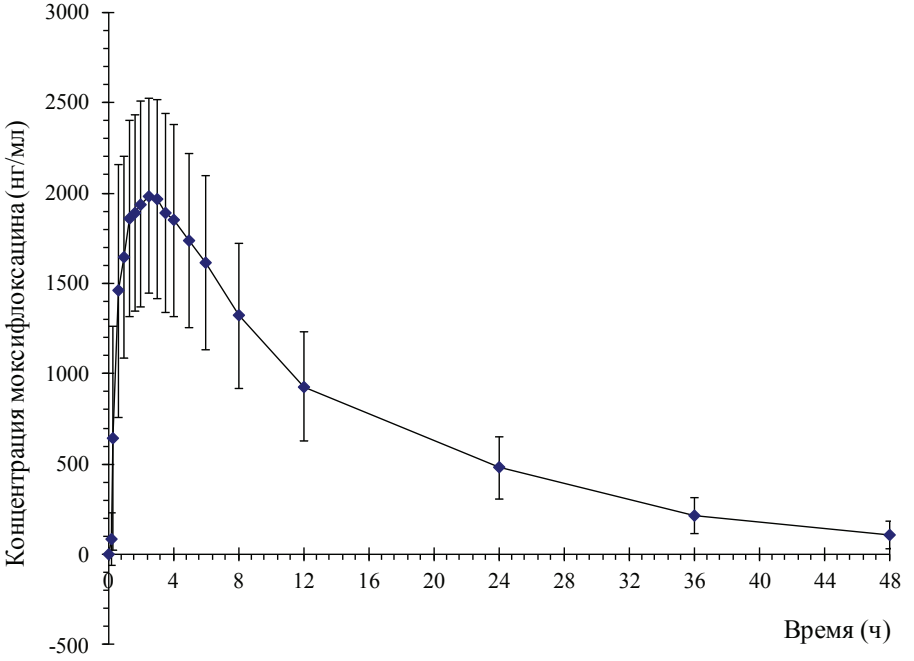
Коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров моксифлоксацина C_{max} и AUC_{0-t} составили 13,0 % и 4,7 % соответственно.

Основные фармакокинетические параметры приведены в таблице ниже. Значения в таблице являются следующими элементами описательной статистики: Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, Median – медиана, Minimum и Maximum – минимальное и максимальное значения соответственно, CV – коэффициент вариации (Mean/SD·100 %).

Фармакокинетические параметры моксифлоксацина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг (N=28), по данным исследования № 1.

ФК параметры	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	CV
C_{max}, нг/мл	2197,4	482,2	2232,1	1370,5	3116,3	21,94
T_{max}, ч	1,90	0,92	1,67	0,33	4,00	48,39
AUC_{0-t}, нг·ч/мл	31972,2	9563,9	30701,9	14613,2	51170,6	29,91
$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	34133,4	10325,7	32881,8	15621,6	56238,0	30,25
$T_{½}$, ч	11,35	2,22	11,35	7,22	17,37	19,52
MRT, ч	15,95	3,19	15,91	11,02	24,80	20,01

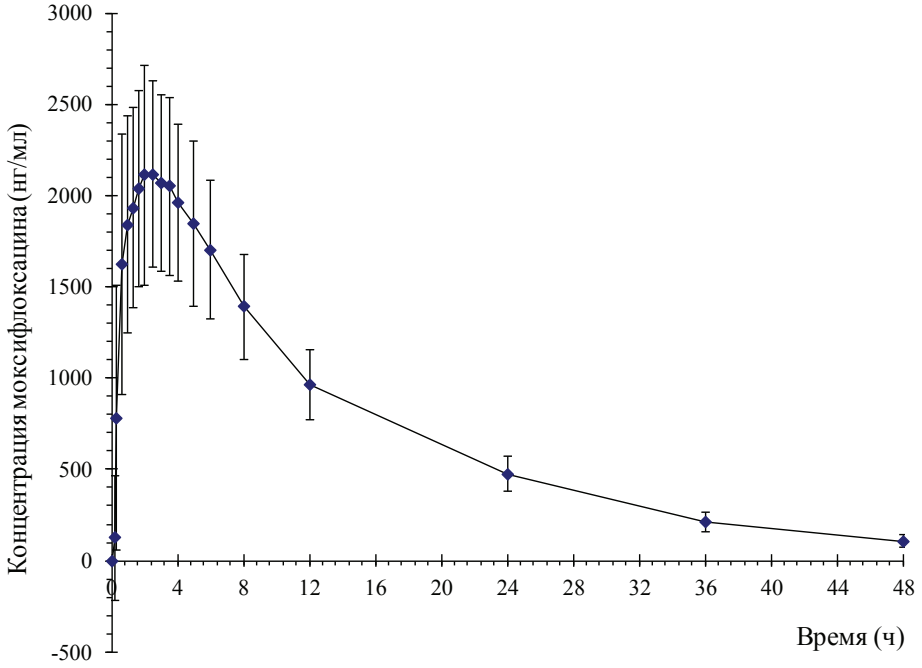
Усредненная фармакокинетическая кривая моксифлоксацина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 400 мг (по данным исследования № 1).



В аналогичном исследовании № 2 (МНН: моксифлоксацин, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг) принимали участие 26 здоровых добровольцев. Дизайном исследования был предусмотрен следующий порядок временных точек отбора проб: 0 мин (до приема препарата), 10 мин, 20 мин, 40 мин, 1 час, 1 час 20 мин, 1 час 40 минут, 2 часа, 2 часа 30 минут, 3 часа, 3 часа 30 минут, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов после приема лекарственного препарата. На основании значений остаточной площади, составившей в среднем не более 5 % от $AUC_{0-\infty}$, был сделан вывод о достаточности периода отбора проб для корректной оценки фазы элиминации.

Коэффициенты внутриндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров моксифлоксацина C_{max} и AUC_{0-t} составили 7,7 % и 6,2 % соответственно.

Усредненная фармакокинетическая кривая моксифлоксацина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 400 мг (по данным исследования № 2).



Фармакокинетические параметры моксифлоксацина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг (N=26), по данным исследования № 2.

ФК параметры	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	CV
C_{max}, нг/мл	2366,1	488,1	2303,8	1536,1	3500,9	20,63
T_{max}, ч	1,90	0,94	1,83	0,67	3,50	49,50
AUC_{0-t}, нг·ч/мл	33261,9	6326,2	32752,8	22694,9	45411,7	19,02
$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	34936,1	6553,6	33931,4	23789,4	47394,3	18,76
$T_{½}$, ч	10,85	1,26	10,94	8,14	13,08	11,61
MRT, ч	15,28	1,82	15,27	11,47	19,26	11,92

В исследовании № 3 (МНН: моксифлоксацин, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг) принимали участие 24 здоровых добровольца. Дизайном исследования был предусмотрен следующий порядок временных точек отбора проб: 0 мин (до приема препарата), через 30 мин, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 2,5 ч, 3 ч, 3,5 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч и 72 ч после приема лекарственного препарата.

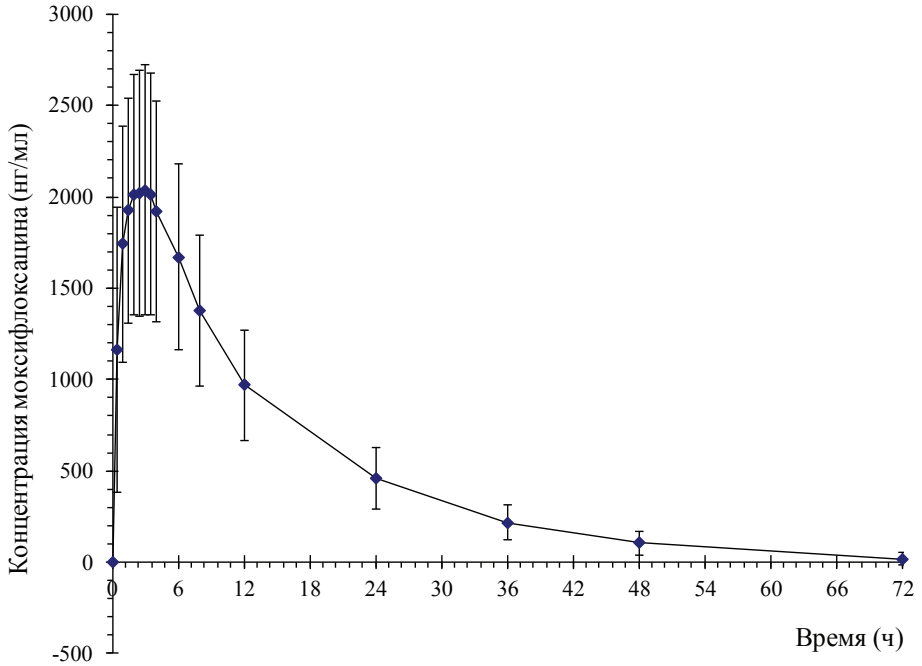
Коэффициенты внутриндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров моксифлоксацина C_{max} и AUC_{0-t} составили 10,8 % и 5,1 % соответственно.

Основные фармакокинетические параметры приведены в таблице ниже.

Фармакокинетические параметры моксифлоксацина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг (N=24), по данным исследования № 3.

ФК параметры	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	CV
C_{max}, нг/мл	2225,8	658,0	2017,2	1344,6	4213,1	29,56
T_{max}, ч	2,06	1,34	1,75	0,50	6,00	64,86
AUC_{0-t}, нг·ч/мл	33509,6	11064,9	32183,7	19110,3	66294,8	33,02
$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	35122,9	11172,3	33939,6	19936,6	67351,8	31,81
$T_{½}$, ч	11,70	2,77	11,35	7,72	19,67	23,68
MRT, ч	16,01	3,17	15,83	10,32	22,35	19,81

Усредненная фармакокинетическая кривая моксифлоксацина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 400 мг (по данным исследования № 3)



В исследовании № 4 (таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг) принимали участие 26 здоровых добровольцев. Дизайном исследования был предусмотрен следующий порядок временных точек отбора проб: 0 мин (до приема препарата), через 10 мин, 20 мин, 40 мин, 1 ч, 1 ч 20 мин, 1 ч 40 мин, 2 ч, 2,5 ч, 3 ч, 3,5 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 36 ч и 48 ч после приема лекарственного препарата. На основании значений остаточной площади, составившей в среднем не более 7 % от $AUC_{0-\infty}$, был сделан вывод о достаточности периода отбора проб для корректной оценки фазы элиминации.

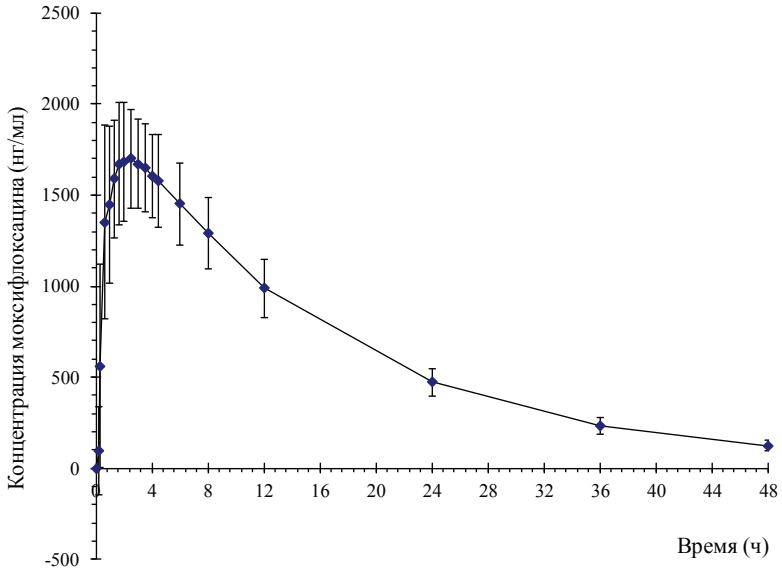
Коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров моксифлоксацина C_{max} и AUC_{0-t} составили 6,5 % и 3,7 % соответственно.

Основные фармакокинетические параметры приведены в таблице ниже.

Фармакокинетические параметры моксифлоксацина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг (N=26), по данным исследования № 4.

ФК параметры	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	CV
C_{max}, нг/мл	1830,71	311,63	1823,04	1335,06	2520,27	17,02
T_{max}, ч	2,22	0,97	2,25	0,67	4,50	43,55
AUC_{0-t}, нг·ч/мл	30822,56	4100,15	31163,30	21118,94	37896,74	13,30
$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	32866,50	4388,60	33182,70	21857,63	39644,45	13,35
$T_{½}$, ч	11,86	1,22	11,58	9,71	14,47	10,29
MRT, ч	17,09	1,77	16,81	13,80	20,70	10,35

Усредненная фармакокинетическая кривая моксифлоксацина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 400 мг (по данным исследования № 4)



В качестве сравнения приведем в пример результаты аналогичного исследования, выполненные в другой аналитической лаборатории.

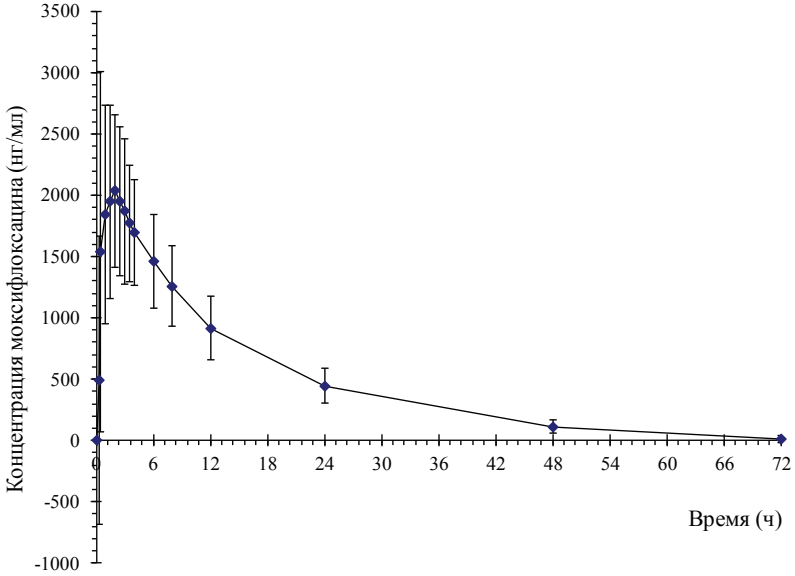
В исследовании № 5 (МНН: моксифлоксацин, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг) принимали участие 34 здоровых добровольца. Дизайном исследования был предусмотрен следующий порядок временных точек отбора проб: 0 мин (до приема препарата), через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 2,5 ч, 3 ч, 3,5 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч после приема лекарственного препарата.

Коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров моксифлоксацина C_{max} и AUC_{0-t} составили 16,5 % и 6,1 % соответственно.

Фармакокинетические параметры моксифлоксацина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг (N=34), по данным исследования № 5.

ФК параметры	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	CV
C_{max}, нг/мл	2654,7	1036,8	2315,0	1480,0	5500,0	39,05
T_{max}, ч	1,67	1,04	1,50	0,25	4,00	62,22
AUC_{0-t}, нг·ч/мл	32401,1	9483,1	29962,1	20060,5	62892,4	29,27
$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	34101,7	9729,2	31740,7	20957,4	65965,0	28,53
$T_{½}$, ч	12,05	1,92	11,69	7,55	17,04	15,93
MRT, ч	16,12	2,50	15,95	10,92	21,69	15,48

Усредненная фармакокинетическая кривая моксифлоксацина после однократного приема референтного препарата, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 400 мг (по данным исследования № 5)



Полученные в исследованиях 1–5 значения согласуются с известными данными литературы о фармакокинетике моксифлоксацина, см., например [310,311, 312],

Современные подходы к проведению биоаналитических исследований при создании лекарственных препаратов

Под редакцией Хохлова А.Л.

Издатель – Российская академия наук

Публикуется в авторской редакции

Издается по решению Научно-издательского совета
Российской академии наук (НИСО РАН) и
распространяется бесплатно

Все права автора защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без письменного разрешения автора

Подписано в печать 15.05.2018.
Формат 70x100/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Уч.-изд. л. 14,48. Усл.-печ. л. 14,66. Заказ № 2329.7. Тираж 300.

Отпечатано в типографии ООО «Принт».
426035, г. Ижевск, ул. Тимирязева, 5.