

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА

На правах рукописи

Гильдеева Гэлия Нязыфовна

ФОРМИРОВАНИЕ МЕЖДИСЦИПЛИНАРНОГО ПОДХОДА
К СТАНДАРТИЗАЦИИ И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА
ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
И ПРЕКВАЛИФИКАЦИОННОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ПРЕПАРАТОВ

14.03.06 — Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор
Зырянов С.К.

Москва - 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	24
1.1. Стандартизация подходов к оценке эффективности, безопасности и качества лекарственных препаратов.....	24
1.1.1. Категории стандартизация и контроль при обращении лекарственных средств	24
1.1.2. Контрольно-разрешительные системы России, Европейского союза и других стран.....	27
1.1.3. Жизненный цикл лекарственного средства	38
1.1.4. Классификация лекарственных средств	42
1.2. Воспроизведенные лекарственные средства.....	48
1.2.1. Оценка безопасности, эффективности и качества воспроизведенных лекарственных средств	48
1.2.2. Взаимозаменяемость.....	53
1.3. Факторы, влияющие на фармакологическую активность фармацевтической субстанции. Взаимосвязь «структура-эффект».....	63
1.3.1. Подлинность активной фармацевтической субстанции	63
1.3.2. Полиморфизм и псевдополиморфизм активной фармацевтической субстанции	66
1.3.3. Примеси.....	70
1.3.4. Стабильность	72
1.3.5. Вспомогательные вещества. Влияние на биодоступность	73
1.4. Экспериментальные исследования безопасности лекарственных средств	74
1.4.1. Доклинические исследования референтных лекарственных средств	74
1.4.2. Доклинические исследования воспроизведенных лекарственных	

средств	75
1.4.3. Современные методы доклинических исследований. Переход к альтернативной <i>in vitro</i> токсикологии.....	76
1.5. Методы подтверждения эквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов.....	87
1.5.1. Испытания биодоступности лекарственных препаратов без проведения клинических исследований. Процедура «биоверификация».....	87
1.5.2. Исследования биоэквивалентности как один из основных видов контроля воспроизведенных лекарственных препаратов	96
1.5.3. Влияние фармакогенетики и фармакогеномики на безопасность и эффективность воспроизведенных лекарственных препаратов.....	101
1.6. Преквалификация зарегистрированных лекарственных препаратов	109
1.7. Научно-теоретическая концепция исследования обращения лекарственных средств	115
1.7.1. Междисциплинарные подходы в науке	115
1.7.2. Евразийский экономический союз как единое пространство для лекарственного обращения	118
1.8. Выводы по главе.....	120
ГЛАВА 2. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СУБСТАНЦИИ КАК ПРЕДИКТОР БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБАТЫВАЕМЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	122
2.1. Материалы и методы	123
2.2. Сравнение различных серий субстанции одного производителя	124
2.3. Сравнение субстанций разных производителей.....	128
2.4. Алгоритмы изучения полиморфных и сольватных модификаций фармацевтических субстанций	136
2.5. Методы анализа в нормативной документации при регистрации	

фармацевтических субстанций как лекарственных средств.....	139
2.6. Выводы по главе.....	142
ГЛАВА 3. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ПРОВЕДЕНИЮ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	143
3.1. Материалы и методы	144
3.2. Программа фармакодинамических исследований ритуксимаба in vitro	147
3.3. Собственные доклинические исследования фармакодинамики	148
3.3.1. Комплемент-зависимая цитотоксичность	149
3.3.2. Антителозависимая клеточная цитотоксичность	151
3.3.3. Связывание с Fc-рецепторами (поверхностный плазмонный резонанс)	153
3.3.4. Цитотоксическое действие препаратов гемцитабина	154
3.4. Выводы по главе.....	157
ГЛАВА 4. «БИОВЕЙВЕР» КАК АЛЬТЕРНАТИВА ИССЛЕДОВАНИЯМ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	158
4.1. Материалы и методы	159
4.2. Результаты собственных сравнительных тестов кинетики растворения применительно к различным регистрационным задачам	168
4.2.1. Препараты изотретиноина.....	168
4.2.2. Препараты леветирацетама	170
4.2.3. Препараты этилметилгидроксипиридина сукцината	172
4.3. Алгоритм применения сравнительного теста кинетики растворения в зависимости от регистрационных целей.....	175
4.4. Выводы по главе.....	176
ГЛАВА 5. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ	

ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ	179
5.1. Материалы и методы	180
5.2. Результаты исследований.....	201
5.2.1. Препараты дезогестрела	201
5.2.2. Препараты, содержащие фиксированную комбинацию дезогестрел+этинилэстрадиол	210
5.2.3. Препараты, содержащие фиксированную комбинацию хлормадион+этинилэстрадиол.....	221
5.2.4. Препараты митотана	230
5.3. Выводы по главе.....	242
ГЛАВА 6. ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ПРИ ПЛАНИРОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ.....	244
6.1. Материалы и методы	245
6.2. Результаты собственных исследований.....	248
6.2.1. Генотипирование.....	248
6.2.2. Фенотипирование	256
6.3. Результаты исследования биоэквивалентности препаратов небиволола....	258
.....	258
6.4. Выводы по главе.....	259
ГЛАВА 7. ФАРМАКОЭКОНОМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ТЕСТ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ КАК ЭЛЕМЕНТЫ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	261
7.1. Материалы и методы	264
7.2. Результаты исследования	265
7.2.1. Результаты фармакоэкономического исследования.....	265

7.2.2. Результаты сравнительного теста кинетики растворения препаратов левофлоксацина	269
7.3. Выводы по главе.....	271
ГЛАВА 8. РАЗРАБОТКА МЕЖДИСЦИПЛИНАРНОГО ПОДХОДА К ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ, ЭФФЕКТИВНОСТИ И КАЧЕСТВА ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	273
8.1. Материалы и методы	273
8.2. Научное консультирование в основе междисциплинарного алгоритма принятия решения по оценке безопасности, эффективности и качества воспроизведенных лекарственных средств	273
8.3. Выводы по главе.....	277
ОБСУЖДЕНИЕ	281
ВЫВОДЫ	285
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	287
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	288
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	291
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	338
Приложение 1. Акты внедрения результатов диссертационной работы.....	339

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

На сегодняшний день в мире сложились определенные правила работы контрольно-разрешительных структур, которые подходят по-разному к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств (ЛС) на доклиническом и клиническом этапе. Существующие правила регистрации воспроизведенных лекарственных препаратов (ВЛП) в России отличаются от требований европейских, американского и японского регуляторных агентств.

Одной из важных медико-социальных проблем отечественного здравоохранения является обеспечение регуляторными органами тщательной экспертизы эквивалентности ВЛП и надлежащей документации, подаваемой при их регистрации. Воспроизведенные (генерики), как и оригинальные (референтные) препараты, должны отвечать общим требованиям, предъявляемым в рамках единого технического документа: эффективность, безопасность, качество [142].

Использование генериков, безусловно, несет определенный позитив в виде снижения затрат на лечение и повышения доступности современных ЛС для большинства пациентов. Оно сдерживает рост цен на оригинальные препараты, более того приводит к их регрессии. Наконец, появление на рынке воспроизведенных лекарств, стимулирует лидеров фарминдустрии к разработке принципиально новых препаратов [43].

Вместе с тем, чрезмерное количество копий оригинального лекарства, которое в России достигает десятков и даже сотен, существенно затрудняет оценку качества конкретного генерика. В принципе требования, предъявляемые к генерическим препаратам, хорошо известны. Этот препарат должен быть эквивалентен оригиналу по своим фармацевтическим, фармакокинетическим и фармакотерапевтическим свойствам [72, 119].

Обеспечение эффективной и персонализированной терапии является актуальной проблемой клинической фармакологии. К большому сожалению, как свидетельствует практика, эффективность и безопасность ВЛП по-прежнему оставляют желать лучшего. Мы видим, что ряд допущенных на фармацевтический рынок ВЛП не работают, работают плохо, небезопасно, иногда с серьезными последствиями. По данным исследований ВОЗ, 10-20% воспроизведенных лекарственных препаратов, отобранных для проведения исследований по контролю качества, не смогли пройти такую проверку. Так, например, в одном из исследований был проведен сравнительный анализ качества оригинального кларитромицина и 40 его генериков [310]. У 28 генериков количество высвобождаемого при растворении вещества было значительно меньше, чем у оригинального, у 24 был превышен рекомендованный 3% лимит примесей и порог содержания 6,11-ди-0-метил-эритромицина А – соединения, ответственного за возникновение нежелательных реакций. В дальнейшем, при сравнительном исследовании 65 генериков было снова продемонстрировано, что большинство из них не эквивалентны оригинальному препарату по вышеописанным показателям [311].

На сегодняшний день требования по контролю и обеспечению стабильности показателей безопасности и эффективности препаратов на всех этапах их жизненного цикла недостаточны, а требования к объему доклинических и клинических исследований на этапах формирования регистрационного досье по ряду препаратов преувеличены, и вместе они зачастую не полностью обеспечивают соответствие заявленных при регистрации параметров безопасности и эффективности воспроизведенного препарата оригинальному. При этом не всегда требуется учитывать влияние вспомогательных веществ, содержание токсических примесей и продуктов деградации, возможность образования полиморфных модификаций (ПМ), а также сообщать о характере и частоте нежелательных лекарственных реакций, выявленных в ходе фармакокинетического исследования у добровольцев [79,88,153]. Допускается

отклонение в содержании действующего вещества на 5% и площади под кривой (AUC) на 20% в ту и другую сторону. Нетрудно подсчитать, что два вполне официально зарегистрированных генерика могут отличаться по содержанию активного вещества на 10%, а по их фармакокинетическим параметрам до 40% [12,33,39,41].

В России, где большинство генериков производятся из субстанций, импортируемых из развивающихся стран азиатского региона проблема структурного соответствия, а, следовательно, сопоставимости по показателям эффективности и безопасности таких препаратов стоит особенно остро [46].

Это обусловлено удешевленным технологическим процессом синтеза и производства, не соответствующим правилам надлежащей производственной практики (GMP) [100], и использованием более дешевых и слабо очищенных химических веществ и субстанций [44,213]. При изготовлении активных фармацевтических субстанций (АФС) в этих странах используются модифицированные методы синтеза, которые могут приводить к образованию токсичных примесей, продуктов деградации и т.д. [45]. Для выявления этих нарушений требуется более тщательная химико-аналитическая экспертиза субстанции [62].

2013 г. был первым годом реализации государственной программы «Развитие здравоохранения Российской Федерации до 2020 года» и других стратегий, разработанных в соответствии с указами Президента Российской Федерации [5].

С конца 2014 г. российский фармацевтический рынок оказался под влиянием общей экономической ситуации в стране (девальвация национальной валюты, снижение темпов роста экономики, покупательской способности населения) и геополитической ситуации в мире (введение санкций против России и т.д.), что привело к необходимости государства изменить как отдельные положения законодательства (например, в сфере регулирования цен на жизненно-необходимые и важнейшие лекарственные препараты (ЖНВЛП)) [1], так и

непосредственную реализацию политики по импортозамещению (постановление Правительства РФ по ограничению закупок некоторых видов медицинских изделий для государственных и муниципальных нужд принято в феврале 2015 г. [4], а соответствующее постановление в отношении лекарственных препаратов (ЛП) подписано в ноябре 2015 г.) [6].

Избавление фармацевтического рынка России от импортозависимости и стимулирование экспорта фармацевтической продукции - основные задачи «Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года» [8]. На сегодняшний день лидерами среди импортеров российской фармацевтической продукции являются страны постсоветского пространства: Узбекистан (19%), Украина (15%), Киргизия (6%), Азербайджан (5%) (по данным RNC Pharma, 2014 г.).

Мировая экономика в настоящий момент (2016 г.) находится в периоде выхода из глобального мирового кризиса. Фармацевтический рынок является одним из доходных и быстрорастущих секторов мировой экономики. Российская фармацевтическая отрасль - тесно интегрированный сегмент в мировом фармацевтическом рынке [106].

Рассматривая взаимоотношения России и стран, инициировавших санкции, следует отметить, что значительная часть необходимых воспроизведенных ЛП нам поставляются американскими, европейскими и канадскими компаниями. В общей сложности более чем 450 западных производителей активно работают на российском рынке с общим объемом ожидаемой реализации более 15 млрд. долл. США в 2016 г [121].

Крупные западные фармацевтические компании организовали производство ЛП на территории РФ, активно сотрудничают с российскими научными лабораториями, доклиническими и клиническими центрами.

Динамика развития фармацевтической отрасли России обеспечивается социально-направленной политикой государства. Развитие медицинского страхования увеличивает доступность населения к дорогостоящим

высокотехнологичным методам лечения. Строительство во многих регионах центров по оказанию высокотехнологичной медицинской помощи населению в разных областях медицины требует большего количества импортного оборудования и лекарственных средств. По прогнозу IMS Health, к 2017 г. Россия займет восьмое место в мире по объему рынка ЛС.

Активная локализация фармацевтического производства, собственная промышленность требуют также более серьезного подхода к контролю эффективности и безопасности вновь выпускаемых в обращение ЛС.

Как мы отмечали, большая часть ЛП на современном фармацевтическом рынке является воспроизведенными (генерическими) препаратами и Россия не исключение. Согласно данным розничного аудита (IMS Health и DSM Group), доля генериков в настоящее время составляет от 77 до 88% в натуральном выражении [80]. При этом согласно прогнозам, эта доля будет неуклонно расти. По объему генерического сектора наша страна занимает третье место в мире после Китая и Индии [18]. В то же время, структура рынка стран большой семерки формируется следующим образом: в США - 12%, в Японии - 30%, в Германии - 35%, во Франции - 50%, в Англии - 55%, в Италии - 60%, в Канаде - 64% генериков [132].

Очевидно, что для того чтобы воспользоваться экономическим преимуществом ВЛП, не уступающих по безопасности, эффективности и качеству референтам, необходима действенная система контроля их фармакологических и фармацевтических параметров и внедрение в практику современных научно обоснованных критериев оценки эффективности и безопасности генерических препаратов, производимых различными разработчиками лекарственных средств. Помимо актуализации контрольно-разрешительной системы допуска ЛС, необходима модернизация ряда особенностей научных экспертиз, заключающихся в том, что каждое задействованное подразделение в силу исторических причин (разные научные школы, нормативные документы, ведущие специалисты) работает в своем обособленном направлении, утверждает

методические указания и руководства, зачастую не используя достижения коллег сопричастных научных областей.

В связи с вышеизложенным, разработка и формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств на этапах доклинической и клинической разработки, отработки производственных процессов, предрегистрационной и пострегистрационной экспертизы и мониторинга основных показателей безопасности, эффективности и качества, представляет собой актуальное направление научных исследований в рамках решения важных государственных задач согласно стратегии «Развитие здравоохранения до 2020 г.».

Цели и задачи исследования

Целью данной работы стало научное обоснование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю эффективности, безопасности и качества воспроизведенных ЛС, а также преквалификационной экспертизе ЛП.

Для достижения поставленной цели решались следующие конкретные задачи:

1. Теоретически обосновать и разработать процедуру анализа полиморфизма субстанций. Подтвердить необходимость контроля наличия полиморфных форм и обязательность фиксации их кристаллического состояния в составе субстанций при рутинном анализе структуры активных фармацевтических ингредиентов для предварительной оценки эквивалентности воспроизведенных препаратов в виду различной фармакодинамической активности стереоизомеров.

2. Разработать и валидировать методы производства субстанции, готовой формы орфанного воспроизведенного ЛС и способ его количественного определения в крови человека для подтверждения сопоставимости фармакокинетических свойств с оригинальным препаратом.

3. Обосновать возможность оптимизации фармакодинамических доклинических исследований биоаналоговых препаратов путем замены исследований моделей *in vivo* на *ex vivo*.

4. Теоретически оценить и экспериментально подтвердить перспективность концепции использования процедуры «биоверификация» в пред- и пострегистрационном периоде.

5. Используя клинико-фармакологические подходы, разработать, валидировать и апробировать новые универсальные методики количественного определения подобных эндогенным метаболитам АФС в составе лекарственных препаратов в плазме крови здоровых добровольцев для установления фармакокинетических параметров с целью сравнительного изучения их биоэквивалентности.

6. Обосновать теоретически и подтвердить практически необходимость проведения предварительного фармакогенетического тестирования при проведении исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов, метаболизм которых в значительной степени зависит от генетического полиморфизма.

7. Оценить объем необходимых процедур для пострегистрационной преqualификационной экспертизы с целью оптимизации бюджетных закупок и подтвердить важность фармакоэкономического анализа при замене оригинального лекарственного препарата воспроизведенным.

8. Обосновать структуру и критерии междисциплинарной комплексной оценки ВЛП.

Научная новизна исследования

Впервые разработан метод изучения полиморфных превращений АФС, позволяющий на этапах предрегистрационного изучения и производства зафиксировать кристаллическое состояние вещества для предварительной оценки эквивалентности воспроизведенных препаратов и прогнозирования эффективности и безопасности. Разработан алгоритм изучения гидратов (сольватов) активных субстанций.

Впервые обоснована возможность замены исследований *in vivo* на модели *ex vivo* фармакодинамических доклинических исследований биоаналогового

препарата ритуксимаба и химически-синтезированного препарата гемцитабина. Испытания спланированы и проведены.

Разработаны классификационные признаки и предложена схема, подтверждённая результатами экспериментальных исследований, для замены биоэквивалентных исследований отдельной группы ВЛП на процедуру «биовейвер», обосновано использование данного подхода для оценки эффективности и безопасности воспроизведенных ЛС в пострегистрационном периоде.

Впервые предложены научно обоснованные методики количественного определения отдельных комбинаций фармакологически активных веществ в плазме крови здоровых добровольцев для установления фармакокинетических параметров с целью сравнительного изучения их биоэквивалентности в составе готовых лекарственных форм отдельных ВЛП. На их основе были полноценно изучены параметры хлормадинона, этинилэстрадиола, этоноргестрела, дезогестрела и их комбинаций.

Разработана и валидирована методика генотипирования здоровых добровольцев в рамках клинического исследования биоэквивалентности небиволола с целью повышения однородности популяции добровольцев. Оценено влияние активности метаболизма на изменения индивидуальных фармакокинетических параметров участников, и таким образом получена возможность снижения межиндивидуальной вариации фармакокинетических параметров в регистрационных исследованиях биоэквивалентности.

Впервые, с использованием разработанных и валидированных методик стандартизации и контроля качества АФС, произведена субстанция не зарегистрированного в России, орфанного ВЛП митотана, а также разработана методика его количественного определения в плазме крови человека с целью изучения параметров фармакокинетики.

Разработан регламент пострегистрационной преквалификационной экспертизы, как комплексной оценки и перспективного регуляторного подхода

при проведении отбора ВЛП для закупки лечебными учреждениями с целью обеспечения приоритетных потребностей здравоохранения.

Практическая значимость

Разработан междисциплинарный алгоритм принятия решения по оценке безопасности, эффективности и качества ВЛП на основных этапах жизненного цикла, основанный на научном консультировании.

Предложена схема предварительной оценки биоэквивалентности ЛП *in vitro* с использованием сравнительного теста кинетики растворения (СТКР). Рекомендации по общим принципам планирования и проведения сравнительных фармакокинетических исследований *in vitro* для отдельных групп воспроизведенных ЛП были использованы при подготовке нормативно правового акта ЕАЭС: «Правила проведения исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств в сфере обращения лекарственных средств на территории Евразийского экономического союза», который включен в распоряжение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 22.12.1015 № 170 «О проекте решения Совета Евразийской экономической комиссии «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

Предложенная система преквалификационной оценки ЛП в сфере внедрения различных методов оценки технологий здравоохранения использована в постановлении Правительства Российской Федерации от 28.08.2014 №871 «Об утверждении Правил формирования перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи».

Разработаны предложения по внесению дополнений в регистрационное досье и введению дополнительных методов анализа в нормативную документацию на фармацевтические субстанции и соответствующую статью Государственной Фармакопеи XIII (ОФС «Полиморфизм»), а также в проекты

дополнений в Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» в части, касающиеся определения и контроля АФС.

Синтезирована и изучена субстанция митотана, характеризующаяся высокой чистотой, стабильностью и обеспечивающая благоприятный фармакологический профиль изготовленных из них лекарственных форм. С использованием разработанных и валидированных методик ЗАО «Обнинская химико-фармацевтическая компания» отработан производственный процесс, стандартизация и контроль фармакокинетических параметров АФС и готовой лекарственной формы препарата Митотан, таблетки. Спланировано пострегистрационное сравнительное фармакокинетическое клиническое исследование.

Разработан план и проведены фармакодинамические доклинические исследования воспроизведенного препарата ритуксимаба, одобренные Минздравом России. Практические рекомендации по проведению доклинических исследований были использованы ООО «Международный Биотехнологический Центр «Генериум»» при планировании и проведении исследований специфической активности моно- и поликомпонентных биоаналогичных ЛП. По результатам, полученным на уровне доклинического изучения, спланировано и проведено клиническое исследование I фазы.

Общие принципы и методики работы использованы для проведения исследований параметров фармакодинамики, фармакокинетики генерических гормональных лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции хлормадинон+этинилэстрадиол (Ангелетта, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 2 мг+0,03 мг), дезогестрел (Диамилла, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 75 мкг), дезогестрел+этинилэстрадиол (Бенидетта, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мкг+30 мкг) и дезогестрел+этинилэстрадиол (таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мкг+20 мкг) с целью подтверждения их терапевтической эквивалентности препаратам Белара® (Грюненталь ГмбХ, Германия), Чарозетта® (Н.В. Органон),

Нидерланды), Марвелон[®] (Н.В. Органон, Нидерланды) и Мерсилон[®] (Н.В. Органон, Нидерланды).

В Минздрав России в установленном порядке поданы документы и данные с целью получения разрешения на проведение клинических исследований и, после успешного их завершения, оценки результатов:

✓ Отчет о результатах исследования биоэквивалентности по протоколу № ВЕ-08-2013-АСТ-CHLOR «Открытое, рандомизированное, перекрестное исследование по изучению сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Ангелетта, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 2 мг+0,03 мг, производитель «Лабораториос Леон Фарма С.А.» Испания и Белара[®], таблетки, покрытые пленочной оболочкой 2 мг+0,03 мг, производитель «Грюненталь ГмбХ», Германия».

✓ Отчет о валидации аналитической методики № V- CHLOR-EE -01/15 «Количественное определение концентрации хлормадинона и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».

✓ Аналитический отчёт №А- CHLOR-EE -01/15 «Количественное определение концентрации хлормадинона и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».

✓ Отчет о результатах исследования биоэквивалентности по протоколу № ВЕ-09-2013-АСТ-DES «Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Диамилла, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 75 мкг, производитель «Лабораториос Леон Фарма С.А.» Испания и Чарозетта[®], таблетки, покрытые пленочной оболочкой 75 мкг, производитель «Н.В. Органон», Нидерланды».

✓ Отчет о валидации аналитической методики № V-Etonogestrel-01/14 «Количественное определение концентрации этоногестрела в крови человека

методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».

✓ Аналитический отчёт “Определение концентрации этоногестрела в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием”.

✓ Отчет о результатах исследования биоэквивалентности по протоколу № ВЕ-05-2014-АСТ-ДЕЕ-30 «Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Бенидетта (дезогестрел + этинилэстрадиол), таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мкг + 30 мкг, «Лабораториос Леон Фарма А.С.», Испания и Марвелон[®] (дезогестрел + этинилэстрадиол), таблетки 150 мкг + 30 мкг, производитель «Н.В. Органон», Нидерланды».

✓ Отчет о валидации аналитической методики «Количественное определение концентрации 3-кетодезогестрела (этоногестрела) и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».

✓ Аналитический отчёт «Количественное определение концентрации 3-кетодезогестрела (этоногестрела) и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».

✓ Отчет о результатах исследования биоэквивалентности по протоколу № ВЕ-10-2014-АСТ-ДЕЕ-20 «Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Бенидетта мини (дезогестрел + этинилэстрадиол), таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мкг + 20 мкг, производства «Лабораториос Леон Фарма А.С.», Испания и Мерсилон[®] (дезогестрел + этинилэстрадиол), таблетки 150 мкг + 20 мкг, производства «Н.В. Органон», Нидерланды».

✓ Отчет о валидации аналитической методики «Количественное определение концентрации 3-кетодезогестрела (этоногестрела) и

этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».

✓ Аналитический отчёт «Количественное определение концентрации 3-кетодезогестрела (этоногестрела) и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием» (см. приложения).

На основании внедренных методик, препараты прошли установленную законом процедуру регистрации в РФ с принятием положительного решения о возможности их медицинского применения.

Монография «Полиморфизм лекарственных веществ», методическое пособие «Взаимосвязь кристаллической структуры субстанции вещества, биодоступности и эффективности лекарственного средства», учебное пособие «Эффективность и безопасность в системе контроля качества лекарств», учебно-методическое пособие «Планирование экспериментальных исследований при разработке воспроизведенных лекарственных средств» предлагаются для использования в учебном процессе в рамках последипломного профессионального образования провизоров.

Подготовлен профессиональный стандарт для специалистов в области фармаконадзора и представлен на обсуждение на сайте Минтруда России (<http://profstandart.rosmintrud.ru>).

Связь задач исследования с проблемным планом

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО Первый МГМУ имени И.М.Сеченова, номер государственной регистрации темы ВНИЦ 01201168237.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Существующие требования к контролю безопасности, эффективности и качества ВЛП не достаточны и нуждаются в совершенствовании и оптимизации при подтверждении соответствия воспроизведенного препарата оригинальному на всех этапах его жизненного цикла.

2. Исследование структуры фармацевтически активных субстанций современными, валидированными физико-химическими методами, включающими оценку полиморфизма кристаллических субстанций - эффективный способ контроля параметров безопасности и эффективности ВЛП.

3. Подтверждение эквивалентности ВЛП референтным ЛП процедурой «биовейвер» в России возможно для препаратов, содержащих АФС I класса по БКС.

4. Современные методы фенотипирования и генотипирования здоровых добровольцев необходимы перед включением их в исследования биоэквивалентности ЛП, обладающих высокой межиндивидуальной вариабельностью.

5. Процедуры фармаконадзора, биовейвера, фармакоэкономический анализ в рамках пострегистрационной преквалификационной экспертизы – перспективные инструменты для комплексной оценки эффективности и безопасности ВЛП, обеспечивающих приоритетные потребности здравоохранения.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на научно-практических конференциях и семинарах различного уровня - международном Форуме «Европа и Россия. Вектор развития. Гармонизация (г. Рига/Латвия, 2011; г. Москва, 2012; г. Казань, 2013), 15, 16 и 19 Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 2008, 2009, 2012), международной научно-практической конференции «Европейская наука XXI века» (г. Москва, 2011 г.), всероссийской конференции о вопросам государственного регулирования в сфере обращения

лекарственных средств и медицинских изделий «Фарммедобращение» (Москва, 2006, 2009 г.), конференции АРФП «Государственное регулирование и российская фармпромышленность 2009: продолжение диалога» (Москва, 2009), межрегиональной конференции «Актуальные проблемы качества лекарственной и медицинской помощи» (Сочи, 2009).

Первичная экспертиза диссертации проведена на совместном заседании кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств, кафедры экономики и управления, кафедры фармацевтической технологии и фармакологии, кафедры экономики и менеджмента, кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России 22 апреля 2016 года.

Личный вклад автора

Автором осуществлен выбор научного направления, сформулированы цель и задачи исследования, обоснован выбор адекватных путей их решения. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах научно-практического исследования. Автором предложены дизайн и схемы проведения исследований. Автор принимал активное участие в разработке методик количественного определения АФС митотана, хлормадинона, этинилэстрадиола, этоногестрела, дезогестрела и их комбинаций. При личном участии автора спланированы и описаны со статистической обработкой результаты доклинических и биоэквивалентных исследований ВЛП следующих международных непатентованных наименований: небиволол, хлормадинона, этинилэстрадиола, этоногестрела, дезогестрела, ритуксимаб, гемцитабин, подтвердившие их безопасность и потенциальную эффективность. Автором разработан дизайн дальнейшего проведения экспериментальных исследований и протоколы планируемых клинических исследований. Автором предложено использование типового научного консультирования в основе междисциплинарного алгоритма принятия решения по оценке безопасности,

эффективности и качества ВЛП. В публикациях, написанных в соавторстве, авторский вклад составляет пропорционально не менее 70 %.

Публикации

По теме диссертации опубликована 61 печатная работа, из них 41 статья в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Методологическая основа, предмет, объекты и методы исследования.

Методологическую основу исследования составляют концепции и принципы системного, комплексного, логико-структурного, инновационного подходов, представленные в трудах ведущих отечественных и зарубежных ученых в области стандартизации, технологии производства, изучения связи “структура-эффект” лекарственных средств, фармакологии и клинической фармакологии (Р.У.Хабриев, Ю.Б.Белоусов, С.К.Зырянов, В.И.Петров, С.Б.Середенин, В.П.Жердев, В.Г.Кукес, Н.С. Григорьева и другие).

В рамках диссертации использовались основные методы клинической фармакологии, указанные в паспорте специальности - эксперименты на животных и *in vitro*, клиническое изучение лекарственных средств у здоровых добровольцев, а также современные методы медицины, молекулярной биологии, генетики, физики, химии и других смежных дисциплин. Объектами исследований являлись ЛС (субстанции и препараты) различных фирм-производителей, документация, регламентирующая стандартизацию процедур контроля показателей эффективности и безопасности ЛС, а также плазма крови здоровых добровольцев, принимавших участие в исследовании биоэквивалентности препаратов дезогестрел, дезогестрел+этинилэстрадиол, хлормадион+этинилэстрадиол, небиволол.

Исходной информацией служили ведомственные и другие материалы открытого доступа, законодательные акты, нормативная документация, статистические данные, результаты экспериментальных исследований различных авторов.

В исследовании использованы методы исторического, логического, системного анализа.

Предметом исследования выступили процессы стандартизации и контроля безопасности, эффективности и качества воспроизведенных лекарственных средств. Обработку исходной информации и результатов проведенных анализов проводили с использованием современных компьютерных технологий.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 358 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 34 таблицами и 47 рисунками. Библиографический указатель включает 382 источника, из них 214 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Стандартизация подходов к оценке эффективности, безопасности и качества лекарственных препаратов.

1.1.1. Категории стандартизация и контроль при обращении лекарственных средств

Основными показателями, подтверждающими возможность использования ЛП в клинической практике, и, соответственно, подвергающимся стандартизации, контролю и мониторингу являются «безопасность», «эффективность» и «качество».

Безопасность ЛС – характеристика лекарственного средства, основанная на сравнительном анализе его эффективности и риска причинения вреда здоровью [1].

Эффективность ЛП – характеристика степени положительного влияния ЛП на течение, продолжительность заболевания или его предотвращение, реабилитацию, на сохранение, предотвращение или прерывание беременности [1].

Качество ЛС – соответствие лекарственного средства требованиям фармакопейной статьи либо в случае ее отсутствия нормативной документации или иного нормативного документа [1]. Другими словами, качество лекарства отражает, насколько точно реальное содержимое серийно произведенного препарата идентично заявленному составу. Последний должен соответствовать стандарту, одобренному государством [102].

То есть, если оперировать термином «идеальное лекарство», то тремя важнейшими составляющими этого лекарства будут эффективность, безопасность и качество.

Чтобы подтвердить или опровергнуть возможность применения конкретного ВЛП, необходимо контролировать его по вышеупомянутым

показателям. Для этого существуют определенные стандарты, которые являются определяющими при доказательстве аналогичности его референтному ЛП.

Под стандартизацией обычно подразумевают разработку и установление нормативов, характеристик и требований к объектам исследований как обязательных для выполнения, так и рекомендуемых, которые обеспечивают право потребителя на приобретение товаров надлежащего качества, в нашем случае безопасного, эффективного и качественного ВЛП.

Стандартизацией в области обращения ЛС добиваются упорядочения положений, требований, норм для контроля ЛС на всех этапах его жизненного цикла. В результате стандартизованных подходов повышается степень соответствия ВЛП их функциональному назначению, устраняются технические барьеры при контроле качества, появляется возможность сотрудничества в различных областях.

В Законе РФ «О стандартизации» [3], принятом в 1993 г, конкретно говорится, что общие цели стандартизации вытекают прежде всего из содержания понятия. Конкретизация общих целей для российской стандартизации связана с выполнением тех требований стандартов, которые являются обязательными. К ним относятся разработка норм, требований и правил, обеспечивающих безопасность продукции, работ, услуг для жизни и здоровья людей, окружающей среды и имущества; совместимость и взаимозаменяемость изделий; качество продукции, работ и услуг в соответствие с уровнем развития научно-технического прогресса; единство измерений; экономия всех видов ресурсов.

Предметами стандартизации как науки являются варианты повторяющихся ситуаций, а объектами - отрасли практической деятельности и конкретная продукция, нормы, правила, методы, термины, требования, имеющие перспективу многократного применения, в том числе в здравоохранении.

Для фармации и фармакологии к области стандартизации можно отнести обращение лекарственных средств, а объектами стандартизации могут быть

технологические процессы, структура АФС, качество ЛС, безопасность и эффективность ЛП.

Стандартизация может быть международной, региональной и национальной, в зависимости от принимающих стандарт участников. Так, если участие в стандартизации открыто для соответствующих органов любой страны, то это международная стандартизация [41,64,151]. Региональная и международная стандартизация осуществляется специалистами стран, представленных в соответствующих региональных или международных организациях. Национальную стандартизацию, как правило, используют на отраслевом уровне.

Примером международного стандарта на ЛС является введенная в действие в 1996 г. Европейская фармакопея, которая разработана в целях обеспечения общественного здоровья населения путем создания общественных стандартов, регламентирующих качество лекарственных препаратов. Европейская международная фармакопея удобна для использования членами Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ). Она определяет приемлемые стандарты подлинности, чистоты и качества ЛС, поступающих на международный рынок и ее отличительной особенностью от национальных фармакопей является использование для контроля качества ЛП методов, разработанных на основе классических методик. Это делает их доступными и для развивающихся стран, так как методы просты в исполнении и не требуют больших материальных затрат.

Россия также имеет свои национальные стандарты в области обращения лекарственных средств: Государственная Фармакопея XIII издания, Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств, Руководство по экспертизе лекарственных средств, Клинические рекомендации, Стандарты лечения заболеваний и т.д. [117, 118, 119].

В мировом сообществе вектор развития стандартизации в последние десятилетия направлен на гармонизацию нормативных документов, устранение технических барьеров в производстве и торговле, создание единого

международного механизма технического регулирования. Этот объективный процесс охватил и нормирование в обращении лекарственных средств [237,306].

1.1.2. Контрольно-разрешительные системы России, Европейского союза и других стран

Опираясь на международные и национальные стандарты, различные страны имеют свои контрольно-разрешительные системы выпуска в свободное обращение ЛС.

В Европейском союзе (ЕС) это Европейское медицинское агентство (EMA), в США - Агентство по пищевым продуктам и лекарственным средствам (FDA), в Японии – Министерство здравоохранения, труда и социального благополучия Японии (MHLW) и Агентство по фармацевтической продукции и медицинским приборам (PMDA, KIKO). В России экспертиза выпускаемых ЛС проводится Минздравом России. Все они имеют как общие требования к ВЛП, так и специфические отличия, определяющиеся национальными стандартами (рис. 1.1-1.3).

Надлежащая регуляторная практика (Good Regulatory Practice - GRP) предназначена для повышения эффективности и результативности деятельности этих регуляторных органов. Эти вопросы периодически рассматриваются на заседаниях Международной конференции органов по регулированию лекарственных средств (International Conference of Drug Regulatory Authorities - ICDRA).

Каждая страна сама определяет и публикует собственные стандарты GRP. Элементы GRP могут включать перечисленное ниже, но не ограничиваться этим: определение задач, идеологии и функций организации; механизмы подотчетности организации правительству и управления ей, а также обеспечения публичности; возможность оценки достижения поставленных целей; механизмы предоставления информации о результатах деятельности для заявителей,

медицинских работников и общественности; стремление к объективности; дискуссии, используемые для вынесения приемлемых для общественности решений; обоснованная длительность оценки, не приводящая к ухудшению показателей качества, безопасности и эффективности; ускоренное рассмотрение орфанных препаратов, а также лекарственных средств, имеющих высокую важность для общественного здравоохранения. Соответствие персонала следующим характеристикам - достаточный уровень квалификации, обеспеченность необходимыми средствами для поддержания высоких стандартов профессиональной деятельности, назначение на должность посредством справедливого и прозрачного механизма, высокие моральные качества. Кроме того, необходимым является наличие программы развития человеческих ресурсов; механизмы апелляции и подачи жалоб гражданами; доступ к соответствующим знаниям и технологиям; обеспечение граждан точной и адекватной информацией в отношении лекарственных средств; механизмы обеспечения качества операционных процедур.

Элементы GRP различных стран связаны друг с другом и во многих случаях частично совпадают.

Большинство технических требований в отношении ВЛП нашли отражение в соответствующих руководствах, опубликованных ВОЗ [25]. Гармонизация технических руководств является важной задачей по следующим причинам: компаниям достаточно сформировать единое досье для всех регионов, что позволяет сократить количество исследований с участием животных и людей; сокращается стоимость разработки новых ЛС, что предполагает возможность снижения цен на них; повышается возможность экспорта продукции местного производства в другие страны (однако с учетом местных условий могут потребоваться дополнительные исследования, например: исследование взаимозаменяемости с представленными на рынке страны препаратами; исследование стабильности лекарственного средства в условиях высокой температуры и/или влажности, чтобы гарантировать возможность использования

в местных условиях; клинические и/или токсикологические исследования как основание для использования при эндемических заболеваниях; специальные исследования в этнических группах). Такие исследования могут проводиться и в какой-либо другой стране при условии, что они непосредственно направлены на решение специфических для данной местности проблем и проводятся на достаточно высоком научном уровне.

Особенности процесса регистрации в России

В конце декабря 2014 года в России были приняты поправки и дополнения в Федеральный закон от 12.04.2010 № ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств» (ФЗ-61), которые направлены на совершенствование существующей в настоящее время регуляторной базы и регистрационных процедур в сфере обращения ЛП для медицинского применения [2].

Внесен ряд существенных поправок в действующий порядок проведения государственной регистрации ЛП. Первый блок изменений касается сроков. Стандартный срок государственной регистрации лекарственных препаратов сокращен с 210 до 160 рабочих дней. Однако при этом срок ускоренной регистрации увеличен с 60 до 80 дней. Закон уточняет перечень лекарственных препаратов, в отношении которых может применяться ускоренная процедура регистрации: орфанные лекарственные препараты; первые три лекарственных препарата, регистрируемых в России в качестве ВЛП; ЛП, предназначенные исключительно для применения несовершеннолетними лицами.

Наряду с этим уточняется и дополняется перечень ЛС, не подлежащих государственной регистрации. В этот перечень теперь включены фармацевтические субстанции и ЛП, производимые для экспорта. Закон вводит дополнительные основания для отмены государственной регистрации ЛП в случаях: отсутствия его в обращении в России в течение трех и более лет; невыполнения мероприятий по обеспечению безопасности; отказа от внесения изменений в инструкцию по применению препарата, касающихся новых

подтвержденных данных о том, что риск причинения вреда здоровью вследствие его приема превышает эффективность применения.

Закон существенно меняет состав и форму регистрационного досье на ВЛП. Указанное досье теперь представляет собой общий технический документ, включающий документацию административной природы, химическую, фармацевтическую, биологическую, фармакологическую и токсикологическую документацию. Общий технический документ по своему формату во многом аналогичен Common Technical Document (CTD), который используется большинством иностранных государств.

Таким образом, поправка в части наполнения и оформления регистрационного досье носит, безусловно, прогрессивный характер и направлена на унификацию с международно-признанными стандартами.

В течение продолжительного времени отчеты о результатах доклинических исследований ВЛП были обязательным компонентом регистрационного досье. С 01 января 2016 г. допускается возможно предоставлять литературный обзор научных работ о результатах доклинических исследований референтного ЛП в едином техническом документе на ВЛП.

В новой редакции ФЗ-61 шестилетний срок эксклюзивности данных, относящихся к результатам доклинических и клинических исследований ЛС для медицинского применения, распространяется только на случаи их использования только в коммерческих целях. Прежняя формулировка запрещала в принципе получение и разглашение таких данных и предполагала проведение полномасштабных исследований для ВЛП. При этом следует отметить, что институты «data exclusivity» и «data protection» защищают результаты доклинических и клинических исследований независимо от того, отвечают ли они признакам новизны, изобретательского уровня и промышленной применимости: «охраняться должно любое произведение только в силу того, что автор вложил в него свой труд, и независимо от художественных качеств и прочих достоинств» [264].

Согласно ФЗ-61 органы исполнительной власти дополнительно уполномочены вводить порядок осуществления государственного контроля качества ЛС и утверждать правила надлежащих практик, в т.ч. лабораторной практики, клинической практики, практики хранения и перевозки лекарственных препаратов, практики реализации ЛП для медицинского применения, аптечной практики. Закон уполномочивает регуляторов проверять соответствие производителя ЛС требованиям надлежащей производственной практики.

Помимо выше озвученных поправок, значительно дополнен понятийный и категорийный аппараты. В законодательстве получили закрепление такие положения, как орфанные, иммунобиологические, генотерапевтические, биотехнологические, гомеопатические лекарственные препараты. Фармацевтические субстанции переведены в разряд ЛС. Наиболее детально урегулированы вопросы обращения орфанных препаратов. Разработана и внедрена понятийная платформа для установления взаимозаменяемости ЛП.

В целом инициатива, заложенная ФЗ-61 в отношении приведения действующих в России стандартов в соответствие с мировыми, является прогрессивной. Любая детализация ранее существовавших правил, утверждение новых, является безусловным плюсом. Однако, для того чтобы оценить и прогнозировать реальное претворение практик в жизнь, необходима разработка целой группы подзаконных актов.

Особенности процесса регистрации в Европе

В 1983 году в ЕС была введена процедура взаимного признания, что сделало возможным рассмотрение заявки органом одного государства в случае фармацевтического продукта/товара медицинского назначения, чтобы получить разрешение на его реализацию во всех странах ЕС. Главной целью этой процедуры было создать единый стандарт рассмотрения продукта для национальных контролирующих органов всех стран.

Процесс регистрации препаратов в европейских странах также включает две фазы: клинические исследования и собственно регистрацию. Чтобы провести

клинические исследования в ЕС, в компетентный государственный орган подается Заявление на проведение клинических исследований. Компетентный орган данного государства-члена оценивает заявку. Клинические исследования проводятся только после получения одобрения.

После завершения всех трех фаз клинических исследований, подается заявка на регистрацию, которая включает все данные, полученные для животных и людей, их анализ, а также данные о фармакокинетике, производстве и предлагаемой маркировке.

Особенности процесса регистрации в Японии

Как и в странах Европейского Союза, для того чтобы иметь возможность вывести лекарственный препарат на рынок Японии, необходимо предварительно получить официальное регистрационное удостоверение на препарат в Министерстве здравоохранения, труда и социального благополучия и лицензию. Система выдачи регистрационных удостоверений и лицензий была пересмотрена в 2005 г. и включена в Закон о фармацевтической деятельности под названием «Регистрация препарата для продажи».

Регистрационное удостоверение является государственным разрешением на препарат соответствующего качества, эффективности и безопасности или препарат, который производится способом в соответствии с производственным контролем и стандартами контроля качества на основании соответствующей утвержденной системы, и, как правило, дистрибуция которого осуществляется на общих условиях с последующим использованием для оказания медицинских услуг в Японии.

Основное условие для получения регистрационного удостоверения лекарственного препарата — это соответствие предприятия правилам GMP. Поэтому в ходе экспертизы регистрационного досье в обязательном порядке проводится анализ на соответствие производства правилам GMP для гарантии того, что предприятие, производящее препарат, соблюдает требования стандартов производственного контроля и контроля качества. Кроме того, лица, желающие

производить лекарственные средства, косметические средства или медицинские устройства, экспортируемые в Японию из других стран (зарубежные производители), должны пройти аккредитацию. Требования аккредитации аналогичны требованиям лицензии на производство, выдаваемой японским производителям.

Таким образом, контрольно-разрешительные системы различных стран, опираясь на GRP, имеют значительное сходство в подходах оценки ВЛП, постоянно обновляют свои нормативные базы, обмениваются данными по безопасности, имеют в открытом доступе информацию о проводимых клинических исследованиях и возможности взаимозаменяемости ВЛП (например, Orange Book, «Оранжевая книга»). Россия отличается значительной закрытостью системы информирования других участников регуляторного процесса. Кроме того, ряд критериев и требований к ВЛП (например, Государственная фармакопея (ГФ)) до сих пор не гармонизированы с таковыми в ЕС, США и Японии.



Рисунок 1.1 - Регулирование фармацевтического сектора в России

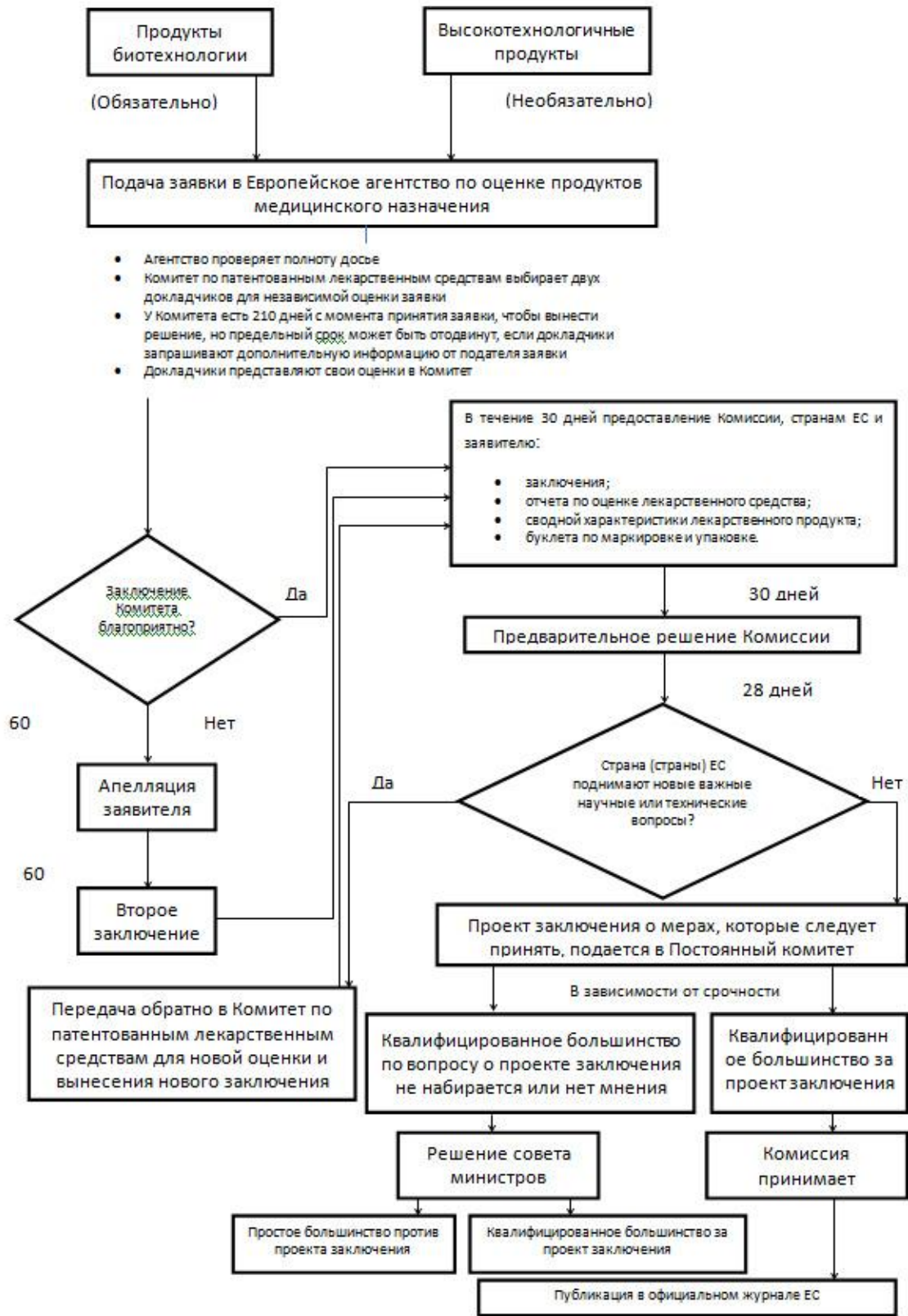


Рисунок 1.2 - Регулирование фармацевтического сектора в Европе

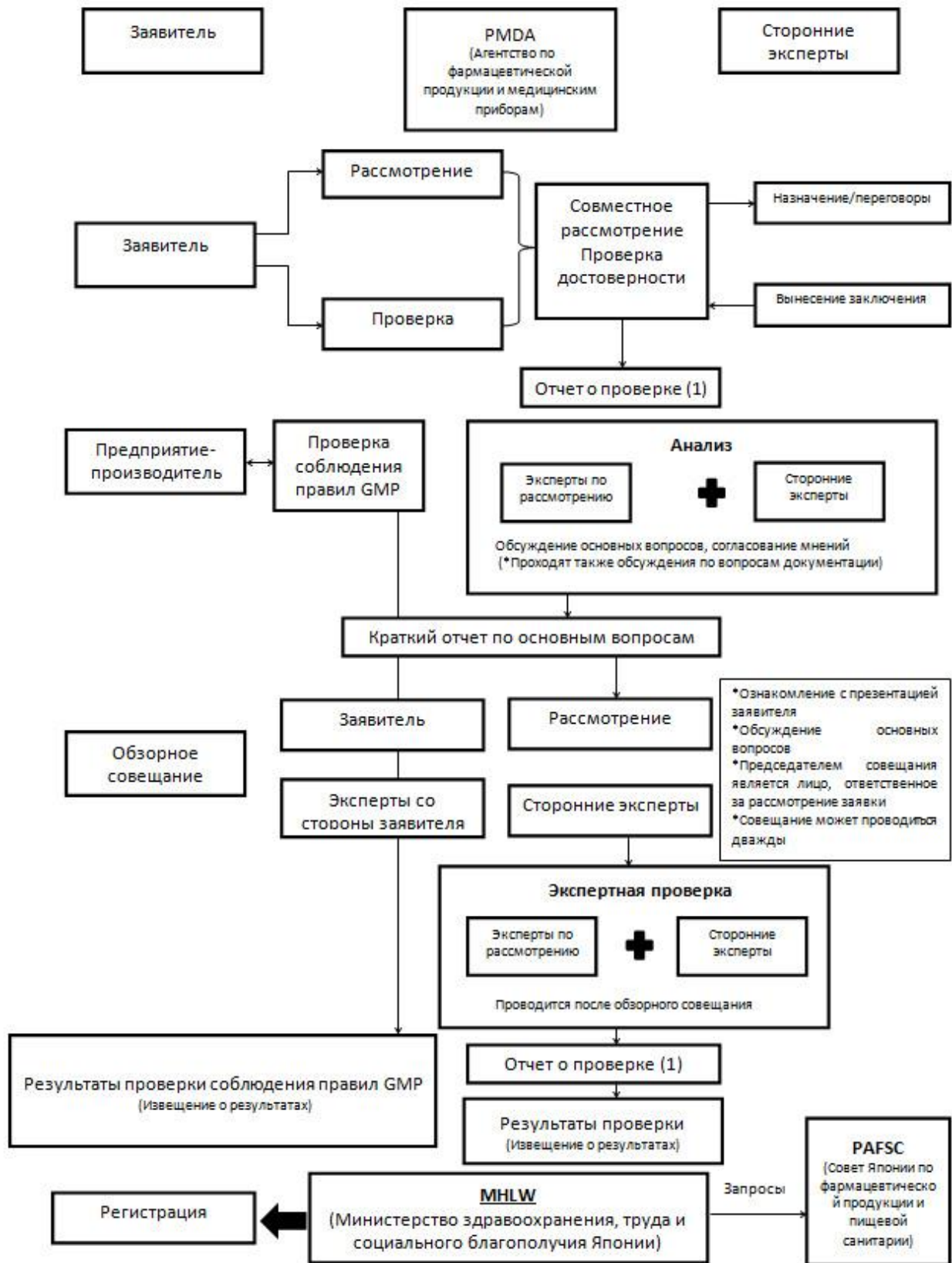


Рисунок 1.3 - Регулирование фармацевтического сектора в Японии

Международная конференция по гармонизации (ICH) - инициатива, осуществляемая при поддержке регуляторных органов и ассоциаций промышленных предприятий трех крупнейших мировых экономических зон: США, Европейского Союза и Японии. Другие стороны, например ВОЗ, участвуют в ней в качестве наблюдателей. Выпускаемые ICH руководства [201] содержат требования к данным, которые необходимы для выдачи регистрационных удостоверений на новые химические соединения и биологические препараты, предназначенные для использования в государствах-членах ICH. В целях гармонизации эти руководства зачастую принимают и другие страны.

Аналогичным образом ведется процесс создания согласованных руководств в других региональных объединениях, включая Ассоциацию государств Юго-Восточной Азии (Association of South-East Asian Nations - ASEAN) [183] и Конвенцию Иполито Унануэ (Conventio Hipolito Unanue - соглашение между группой стран Южной Америки).

Руководства в отношении предоставления данных нуждаются в гибкой интерпретации. Могут использоваться способы определения качества, безопасности и эффективности, которые отличаются от указанных в определяющем документе. Положения общего руководства не всегда применимы к конкретному препарату. Заявителям дается возможность представлять данные, не соответствующие ему, однако в этом случае они должны обосновать приемлемость предлагаемой альтернативы с помощью научно обоснованных аргументов.

Россия также имела бы большую возможность получения научной информации для разработчиков ЛС и структурирования своих подходов к оценке ВЛП, присоединившись к ICH.

1.1.3. Жизненный цикл лекарственного средства

При создании препарата главным образом учитываются потребности пациента, врача и системы здравоохранения. Лекарственное средство может являться разработкой *de novo* или воспроизведенной копией препарата, срок патентной защиты которого истек. В 2005 г. ИСН был создан документ Q8 Pharmaceutical development (Фармацевтическая разработка), который содержит понятие жизненного цикла лекарственного средства и алгоритм его разработки [272]. Фармацевтическая разработка — это комплексные экспериментальные исследования, в рамках которых осуществляется обоснование состава, этапов технологического процесса, условий производства для дальнейшего включения этой информации в регистрационное досье. Специальная экспертная комиссия анализирует этот документ и определяет, сможет ли конкретный кандидат в препараты после проведения доклинических и клинических исследований быть допущен на рынок. Таким образом, фармакологическая активность и качество закладываются в ЛС уже на этапе разработки его химиками и другими специалистами.

Далее следуют доклинические исследования препаратов на моделях *in vitro* и *in vivo* с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice — GLP). GLP охватывает организационный процесс и условия, в которых проводятся доклинические исследования, связанные с определением профиля безопасности и экологическими аспектами. Благодаря этой системе результаты доклинических исследований признаются на международном уровне. Именно на этом этапе изучается безопасность препаратов и зависимость их эффективности от дозы. Доклинические исследования непосредственно входят в область деятельности биологов, поскольку в основном эксперименты проводятся на животных.

После успешных доклинических исследований подается заявка на проведение клинических исследований. На этом этапе жизненного цикла ЛС

создается протокол, после утверждения которого проводятся клинические исследования с участием пациентов (оригинальные препараты) и/или здоровых добровольцев (эквивалентность ВЛП). Клинические исследования проводятся в соответствии с требованиями надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice — GCP). GCP — международный этический и научный стандарт качества планирования и проведения клинических исследований ЛС с участием людей, а также документального оформления и представления их результатов.

Далее следует лицензирование препаратов (в России — регистрация). Получение регистрационного удостоверения означает одобрение производства препарата в промышленном масштабе и его дальнейшей реализации. Производство ЛС контролируется специфической для фармацевтического производства системой качества — GMP. Принципиальным отличием стандартов GMP от системы качества, существовавшей ранее, основной упор в которой делался на контроль готового продукта, является обеспечение качества на всех этапах производства — от закупки сырья, материалов и их контроля (через валидацию и тщательный мониторинг технологического процесса) до проверки качества конечного продукта и контроля первого этапа дистрибуции.

Далее следует хранение и транспортировка, которые осуществляются согласно стандарту надлежащей практики хранения (Good Storage Practise — GSP), и могут быть реализованы как производителем, так и дистрибутором.

Этап оптовой реализации лекарственных средств осуществляется в соответствии с надлежащей дистрибуторской практикой (Good Distribution Practice — GDP). Основные требования GDP заключаются в соблюдении условий хранения, в том числе и в период транспортировки, исключении возможности контаминации, обеспечении доставки необходимых препаратов в медицинские и аптечные учреждения в течение определенного периода.

Непосредственно после оптовой реализации следует розничная, регламентируемая надлежащей аптечной или фармацевтической практикой (Good Pharmacy Practice — GPP). Эта система стандартов создана Международной

фармацевтической федерацией (International Pharmaceutical Federation — FIP), и рекомендована ВОЗ к исполнению. В то же время был сформулирован специальный термин — «фармацевтическая опека», который подразумевает, что в аптечном учреждении осуществляются не столько продажа препаратов, сколько консультации и оказание помощи пациентам в их выборе.

Надлежащая практика фармаконадзора (Good Pharmacovigilance Practice — GVP) — руководство по осуществлению фармаконадзора, предназначенное для гармонизации методологических подходов к выявлению редких нежелательных эффектов, угрожающих жизни и здоровью человека, связанных с рисками обращения и применением новых и уже известных ЛП, а также объективной оценки соотношения ожидаемой пользы применения ЛП к потенциальному вреду, который оно может нанести человеку из-за наличия нежелательных (побочных) действий; выявления на рынке ЛС неэффективных ЛП и исключения их из дальнейшего оборота [101,307].

В первую очередь данный документ направлен на защиту интересов пациентов, а также системы здравоохранения в целом посредством обеспечения использования безопасных и эффективных ЛП.

Введение в России в 2016 году в связи с изменениями в ФЗ-61 новой процедуры мониторинга эффективности и безопасности ЛС, находящихся в обращении в нашей стране — фармаконадзора, предполагает принятие данного стандарта и в других странах ЕАЭС (Евразийский экономический союз). В настоящий момент подготовлен проект документа, который во многом разрабатывался на основе GVP, принятого в Европейском союзе. Адресатами регулирования, предусматриваемого GVP, являются субъекты предпринимательской деятельности — держатели регистрационных удостоверений на ЛС, уполномоченные лица по фармаконадзору, а также уполномоченные органы государств-членов ЕАЭС в сфере здравоохранения.

GVP предполагает создание каждым из производителей ЛС специального функционального подразделения или уполномоченных специалистов, которые

проводят сбор, обработку и анализ сведений относительно безопасности и эффективности выпускаемых ими ЛП, в условиях их реального использования потребителями. Поставщиками информации в рамках регулирования должны выступать медицинские и фармацевтические работники как напрямую, так и через публикуемые ими отчеты, статьи, а также иные информационные источники. Конечным потребителем указанных сведений являются органы государственной власти, уполномоченные на осуществление и (или) координацию деятельности в сфере обращения ЛС.

В целях подтверждения соблюдения держателями регистрационных удостоверений требований и выполнения обязательств по фармаконадзору регуляторные органы государств-членов ЕАЭС обязаны проводить инспекции по фармаконадзору держателей регистрационных удостоверений или иных организаций, привлеченных владельцем регистрационных удостоверений для выполнения обязательств по фармаконадзору. Держатели регистрационного удостоверения обязаны по требованию регуляторного органа представлять мастер-файл системы фармаконадзора, который составлен в соответствии с правилами надлежащей практики фармаконадзора. Надлежащая практика фармаконадзора в последнее время стала неотъемлемым элементом гарантий безопасности, эффективности и качества ЛП во всем мире, фармаконадзор применим ко всем стадиям “жизни” препарата, от разработки (начиная с доклинических исследований и далее клинических исследований I-III фаз) и на протяжении всего времени обращения препарата на рынке (пострегистрационные исследования, периодические отчеты по безопасности и т.д.). Введение в России правил GVP и развитие полноценной системы фармаконадзора является важным шагом, направленным на гармонизацию с международными нормами.

1.1.4. Классификация лекарственных средств

В целом на российском рынке, с точки зрения контроля эффективности, безопасности и качества, представлены три вида лекарственных препаратов: оригинальные препараты (референтные), т.е. препараты, эффективность и безопасность которых тщательно изучены в контролируемых клинических испытаниях, проведенных в строгом соответствии с существующими стандартами; воспроизведенные препараты или генерики, на которые часто автоматически переносятся достоинства препаратов оригинальных, а также фальсификаты [113].

Кроме того, выделяют еще две группы ЛС, к которым применяются особые условия контроля: орфанные ЛП – предназначенные исключительно для диагностики или патогенетического лечения редких заболеваний и биоаналогичные ЛП, которые схожи по параметрам эффективности, безопасности и качества с референтным биологическим ЛП, выпускаемые в такой же лекарственной форме, имеющие идентичный способ введения, но в различных странах относимые то к оригинальным, то к воспроизведенным ЛП [190].

По официальным источникам соотношение инновационных и воспроизведенных препаратов в России определяется как 1:4. Количество же лекарственных подделок поддается учету с трудом, считается, что их доля на российском рынке не превышает 6-12% от числа проверяемых ЛП [113].

Согласно стратегии национальной безопасности Российской Федерации до 2020 г., одним из главных направлений в среднесрочной перспективе является гарантированное снабжение населения высококачественными и доступными ЛП, для чего формируются условия преодоления зависимости фармацевтической отрасли от зарубежных поставщиков. Проблема импортозамещения в настоящее время успешно реализуется за счет производства ВЛП на территории России.

В силу различных причин зарубежные производители референтных (оригинальных) высокоэффективных препаратов не регистрируют в Российской

Федерации эти препараты. При этом, некоторые передовые отечественные производители, улучшая и наращивая объем и ассортимент производимой продукции, готовы выпускать такие ЛП.

Орфанные ЛС

В качестве примера вышеуказанной проблемы можно привести препарат с международным непатентованным наименованием митотан (торговое название оригинального препарата Лизодрен, производитель в США «Bristol-Myers Squibb», в Евросоюзе «Laboratoire HRA Pharma», Франция), который в 2004 г. по решению Европейской Комиссии по здравоохранению принят в качестве базового препарата для лечения аденокортикального рака (АКР). Препарат используется в качестве основного средства химиотерапии АКР и в США с 1970 года рекомендован FDA. В СССР с 1975 г. производился и успешно применялся химический аналог митотана препарат Хлодитан, однако сейчас регистрации в России нет.

АКР – редкое злокачественное заболевание с крайне неблагоприятным исходом. Ежегодное выявление составляет 0,5-2 случаев на миллион, 0,04-0,2% в структуре онкологической смертности [295]. Пятилетняя выживаемость неранжированных по стадиям больных не превышает 40%. Единственным вариантом излечения является операция, однако, она эффективна у 10% больных, очень высокая частота метастатической болезни обуславливает паллиативный характер лечения [175]. В течение длительного времени считалось, что АКР является стойким к стандартной цитостатической химиотерапии. На молекулярном уровне при АКР выявляется высокий уровень Р-гликопротеина, с которым связывают резистентность опухоли к химиотерапевтическому воздействию. Этот белок функционирует, как АТФ-зависимая лекарственная помпа, транспортирующая из клетки гидрофобные цитостатические препараты. Нормальная ткань коры надпочечника производит большое количество Р-гликопротеина, и эта секреция сохраняется в большинстве АКР [232,234,320]. Хотя наличие Р-гликопротеина является вероятной и существенной причиной

мультилекарственной резистентности в АКР, также есть Р-гликопротеин-независимые механизмы мультилекарственной резистентности, которые могут объяснять неэффективность не только гидрофобных, но и гидрофильных лекарственных средств типа цисплатины [233,319,328,331,376].

Следует отметить, что злокачественное новообразование надпочечника, коры надпочечника, согласно перечня редких заболеваний, опубликованного Минздравом России 19.02.2016 г., относится к орфанным заболеваниям (код по МКБ-10: С74.0) [90]. Митотан на настоящий момент является единственным эффективным, не имеющим альтернативы, препаратом для лечения пациентов с АКР [259,343]. Наиболее успешным сочетанием препаратов полихимиотерапии признан “итальянский” протокол: в качестве составляющих используются этопозид, доксорубин и цисплатин, на фоне постоянного приема митотана (схема EPD-M) исследование FIRM-ACT, на данный момент завершённое, включало 304 пациента с распространенным вариантом АКР. При сравнении частоты ответа на терапию EPD-M в сравнении со схемой стрептозотоцин+митотан (S+M) показана достоверно более высокая частота ответа на EPD-M: 23,2% против 9,2% на S+M ($P < 0,001$), и большее время стабилизации заболевания (5 месяцев против 2), но не показало значимых различий в общей выживаемости (14,8 месяцев против 12,0) [198].

Прогноз, в основном, зависит от стадии заболевания: 5-летняя выживаемость при I стадии – составляет 60%, для II стадии 58%, при III – 24%, при IV – 0. Общая, неранжированная по стадиям, пятилетняя выживаемость колеблется от 16 до 38%. Медиана общей выживаемости при IV стадии менее 12 месяцев [198,274,294,353,358].

Референтный препарат на настоящий момент в России не зарегистрирован, так как фирма-производитель в этом не заинтересована. Пациенты покупают препарат за пределами России и самостоятельно его ввозят. Уровень препарата в крови требует постоянного лабораторного мониторинга и, при условии его переносимости, рекомендованный диапазон терапевтической концентрации

составляет от 14 до 20 мг/л. При отсутствии рецидива АКР адъювантное лечение должно проводиться от 2 до 5 лет. Необходимость обеспечения нуждающихся пациентов в России этим высокоэффективным, жизнеспасающим препаратом хорошо осознается государством. Так, создание отечественной фармацевтической субстанции митотан с технологией лабораторного фармакокинетического контроля концентрации активного вещества в крови запланировано в Государственной Программе РФ «Развитие здравоохранения до 2020 г.». Таким образом, учитывая орфанный статус заболевания, высокую социальную значимость проекта и доказанную клиническую эффективность митотана, позволяющую значительно повысить выживаемость пациентов с АКР, разработка отечественного аналога наряду с методами контроля его качества и количественного определения в крови человека представляет собой актуальное направление научных исследований. Регистрация такого аналога позволила бы нашим онкологам использовать препараты “золотого стандарта” и участвовать в многоцентровых международных протоколах по изучению эффективных схем лекарственной терапии АКР.

Биоаналогичные ЛС

В основе взаимозаменяемости биоаналогов лежит концепция биоаналогичности [361], представляющая разновидность терапевтической эквивалентности в отношении ЛП биологического происхождения. В США вопросы взаимозаменяемости биоаналогов стоят достаточно остро, однако FDA до сих пор не утвердило научные подходы и детальные нормативно-правовые требования к подтверждению биоаналогичности. Такие требования прописаны в в секции 262 главы 42 Кодекса федеральных постановлений (регулирующей вопросы регистрации биологических ЛП). В части «i» обновленной секции 262 главы 42 упомянутого Кодекса дано определение биоаналогам.

Термин «биоаналог», или «биоаналогичность», в отношении биологического лекарственного препарата означает, что биологический лекарственный препарат высокоаналогичен лекарственному препарату сравнения, несмотря на небольшие различия в клинически неактивных компонентах, а также,

что отсутствуют клинически значимые различия между биологическим лекарственным препаратом и лекарственным препаратом сравнения с точки зрения безопасности, чистоты и активности.

При этом в пункте 4 части «i» секции 262 главы 42 упомянутого Кодекса отдельно указано, что подтверждение биоаналогичности влечет за собой признание взаимозаменяемости, которая трактуется как отсутствие необходимости в медицинском вмешательстве при замене одного биологического лекарственного препарата другим.

К тому же ведомство в середине 2012 г. опубликовало проекты руководств о научных принципах подтверждения биоаналогичности [332]. При этом научный диспут все более и более набирает обороты, на первое место встают вопросы подтверждения аналогичного качества – метод «отпечатков пальцев», выделяются разные степени аналогичности, на основании которых предполагается предъявлять разные требования к объему доклинических и клинических исследований. Таким образом, несмотря на возможность признания взаимозаменяемости биологических ЛП в принципе, США не выработали четких критериев такого признания.

В Европейском Союзе согласно части 4 статьи 10 Директивы 2001/83/ЕС [208]: если биологический ЛП, аналогичный биологическому ЛП сравнения, не подпадает под определение ВЛП, особенно в силу различий по сырью или различий в процессах производства между биологическим ЛП и биологическим ЛП сравнения, в отношении таких различий необходимо представить соответствующие результаты доклинических и клинических исследований.

Вид и объем представляемых дополнительных данных должны удовлетворять соответствующим критериям, указанным в Дополнении I и соответствующих подробных руководствах [345]. Прочие результаты испытаний и исследований из досье ЛП сравнения представлять не требуется.

Необходимость подтверждать биоаналогичность, декларирует и Министерство здравоохранения Канады (Health Canada) - 21 января 2013 г.

принято коммюнике о лекарственных препаратах, содержащих ботулотоксин. Все они: Ботокс, Ксеомин, Диспорт, Миоблок – были зарегистрированы в качестве оригинальных, их биологическая аналогичность друг другу не подтверждалась, поэтому они не являются терапевтически эквивалентными (взаимозаменяемыми), что и требует отражать регулятор в инструкции по применению каждого из лекарственных препаратов [309].

В отличие от терапевтической эквивалентности ВЛП с немедленным высвобождением концепция терапевтической эквивалентности биоаналогов, а также липосомальных ЛП, ЛП с разным механизмом модифицированного высвобождения, ЛП для местного и наружного применения и т.п. в Европе, как и в США, проработана недостаточно полно [361]. Тем не менее отдельные страны ЕС так или иначе регулируют такие вопросы. Например, в упомянутом перечне, разработанном Агентством лекарственных препаратов Швеции, помимо замещаемых ВЛП представлены также замещаемые биоаналоги [367].

Комиссия по оценке лекарственных препаратов (Medicines Evaluation Board) – регулятор Королевства Нидерландов – считает возможным применение биоаналогов, таким образом признавая их терапевтическую эквивалентность, однако рекомендует воздерживаться от бесконтрольной замены биологических ЛП и продолжать терапию одним препаратом как можно дольше.

В Германии взаимозаменяемость биоаналогов и их регистрация – это две разные процедуры. Биоаналоги не являются автоматически взаимозаменяемыми. Автоматическая взаимозаменяемость признается лишь в отношении параллельно дистрибутируемых биоаналогов, поскольку они производятся на одной площадке. В остальных случаях решающее слово о взаимозаменяемости остается за врачом. Таким образом, саму взаимозаменяемость, как указывалось, признает не регистрирующий орган, а субъекты, занимающиеся снабжением лекарственными препаратами или их назначением.

Подходы к терапевтической эквивалентности биоаналогов ВОЗ проработаны лишь на принципиальном уровне [254]. ВОЗ настаивает, что

подтверждение биоаналогичности равносильно подтверждению терапевтической эквивалентности, влекущему за собой признание взаимозаменяемости. Согласно ВОЗ взаимозаменяемость биологических лекарственных препаратов носит в первую очередь социальную направленность; ее основной целью является равный доступ каждого человека к качественным, безопасным и эффективным лекарственным препаратам.

Тем не менее в отличие от ЕС, распространившего правила биоаналогичности на все лекарственные препараты, содержащие биологические фармацевтические субстанции, ВОЗ на сегодняшний день фокусирует свое внимание лишь на биотехнологических лекарственных препаратах, полученных с помощью технологии рекомбинантной ДНК.

В России требования к биоаналогичным препаратам в части объема доклинических исследований носят смешанный характер – с одной стороны они больше, чем требования к ВЛП – помимо исследования общей токсичности и местнораздражающего действия необходимо провести исследования специфической активности. С другой стороны, они меньше, нежели предъявляемые к оригинальным ЛП – отсутствует необходимость проводить исследования специфической токсичности (канцерогенность, репродуктивная токсичность и т.д.).

1.2. Воспроизведенные лекарственные средства

1.2.1. Оценка безопасности, эффективности и качества воспроизведенных лекарственных средств

В совместном заявлении Международной фармацевтической федерации и Международной федерации фармацевтических производителей и ассоциаций, принятом в 1999 году, говорится, что замена оригинального лекарственного средства на воспроизведенное "должна проводиться только в том случае, когда

имеется соответствие принятым международным стандартам, включая биоэквивалентность (БЭ), с целью гарантирования качества всех препаратов на рынке". В этом же документе указывается: "Все правительства должны предпринять шаги к обеспечению качества, безопасности и эффективности всех лекарственных средств, доступных в соответствующих государствах, согласно принятым международным стандартам. Это относится как к оригинальным, так и к воспроизведенным лекарственным средствам, к частному и государственному секторам и к импортируемой и производимой на местном рынке продукции".

Таким образом, к любому лекарственному средству предъявляются три требования: эффективность, безопасность и качество. Требования "эффективность" и "безопасность" относятся к медико-биологическим вопросам. Категория "качество" является чисто фармацевтической проблемой и отражает соответствие ЛС требованиям нормативной документации по показателям идентичности содержимого упаковки, по содержанию примесей и по содержанию действующего вещества (или веществ - если препарат комбинированный).

ВЛП выводятся на рынок после истечения срока патентной защиты, они должны полностью соответствовать оригинальному продукту по составу действующих веществ (вспомогательные вещества могут быть иными) и лекарственной форме, соответствовать фармакопейным требованиям, быть произведенными в условиях GMP.

Виды эквивалентности воспроизведенных лекарственных средств

«Эквивалентности» ВЛП как термина не существует. Видов «эквивалентности» генериков выделяют несколько – терапевтическая, фармацевтическая, биологическая, а также так называемая «эквивалентность *in vitro*» (*in vitro equivalence*) [140]. ВОЗ предлагает применять термин «взаимозаменяемость» (*interchangeability*) воспроизведенных лекарственных средств. Взаимозаменяемое воспроизведенное ЛС – это терапевтически эквивалентное воспроизведенное ЛС, которым можно заменить препарат сравнения в клинической практике [305]. ЛС считаются фармацевтически

эквивалентными, если они содержат одни и те же действующие вещества в одинаковом количестве и в одинаковой лекарственной форме и отвечают требованиям одних и тех же или сходных стандартов [305]. Таким образом, фармацевтическая эквивалентность – это полное соответствие состава и лекарственной формы препаратов. Исследование БЭ ЛП – вид клинического исследования, проведение которого осуществляется для определения скорости всасывания и выведения АФС, ее количества, достигающего системного кровотока, и результаты которого позволяют сделать вывод о БЭ ВЛП в определенной лекарственной форме и дозировке соответствующих оригинальному ЛП [125,262,303]. То есть биоэквивалентность лекарственных средств обозначает их одинаковую биодоступность. ЛС являются терапевтически эквивалентными, если они фармацевтически эквивалентны и можно ожидать, что они будут иметь одинаковый клинический эффект и одинаковый профиль безопасности при использовании пациентами в соответствии с указаниями в инструкции. Доказанную клиническую эффективность и безопасность устанавливают на основании сравнительных клинических исследований.

Исследование терапевтической эквивалентности лекарственных препаратов, согласно законодательству России, – это вид клинического исследования ЛП, проведение которого осуществляется для выявления одинаковых свойств препаратов определенной лекарственной формы, а также наличия одинаковых показателей безопасности и эффективности и одинаковых клинических эффектов при их применении. Согласно ФЗ-61, экспертиза эффективности и безопасности ВЛП проводится на основании проведения исследований БЭ или терапевтической эквивалентности. Исследования биоэквивалентности БЭ позволяют сделать обоснованные заключения о качестве сравниваемых препаратов по относительно меньшему объему первичной информации и в более сжатые сроки, чем при проведении клинических исследований.

Внедрение концепции Quality-by-Design при разработке воспроизведенных лекарственных препаратов

Как отмечалось ранее, эффективность и безопасность оригинальных и воспроизведенных ЛС может существенно различаться. Основными причинами таких различий могут быть фармацевтическая технология производства ЛП, вспомогательные вещества, (неактивные ингредиенты, наполнители, консерванты, красители и др.), их природа и количество, упаковка препарата, условия его хранения и транспортировки [161].

Темпы развития мировой фармацевтической индустрии и растущая конкуренция среди отечественных компаний требует от разработчиков генериков не только быстроты реакции, значительных экономических вложений и качества продукта, идентичного оригинальному препарату, но и применения современных научных концепций. Одной из таких концепций в разработке лекарств, последние несколько лет по праву считается концепция Quality-by-Design, заявленная в руководстве ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» [287]. Основное ее преимущество – это возможность повысить эффективность фармацевтического производства за счет организации контроля качества в режиме реального времени, уменьшения доли брака и несоответствующих серий, временных потерь в ходе рутинного производства, за счет сокращения количества отклонений и несоответствующих результатов контроля качества (Out-of-Specification), перехода от реактивной системы принятия решений к проактивной системе, основанной на своевременной оценке риска.

Quality-by-Design (QbD) – это системный подход к разработке лекарственных препаратов, который начинается с четко определенных целей и до получения лекарственного препарата, понимания его процесса изготовления и стратегии контроля, основываясь на надежных научных данных и оценке рисков, связанных с качеством. В методических указаниях ICHQ8 концепция QbD представлена улучшенным подходом к фармацевтической разработке.

В противоположность традиционному подходу, концепция QbD изначально предлагает сфокусировать внимание на готовом продукте и его потребителе. Другими словами, сначала мы стремимся к глубокому пониманию рисков для потребителя, связанных с применением препарата, и только затем в обратном порядке по ходу разработки устраняем все возможные критические опасности, связанные с используемым сырьем и параметрами производственного процесса.

По сравнению с традиционным в данном подходе заложена фармакологическая основа разработки генерика. Это и определение свойств сырья, которые могут оказать влияние на эффективность и безопасность свойств ГЛС с помощью углубленной оценки рисков, степени влияния изменчивости свойств сырья и параметров технологического процесса на свойства ГЛС с помощью полнофакторного математического моделирования, формирование стратегии контроля исходя из результатов комплексной оценки рисков и проведенных экспериментов, смещение акцентов с эпизодической ревалидации на непрерывное подтверждение пригодности параметров процесса, и организацию выпуска по параметрам.

Основные преимущества концепции Quality-by-Design по отношению к традиционной фармацевтической разработке представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 - Основные положения концепции Quality-by-Design

Аспект	Традиционный подход	Улучшенный подход Quality-by-Design
Вся фармацевтическая разработка	<ul style="list-style-type: none"> • В основном эмпирический • Исследования по разработке часто проводятся с одной переменной за один раз 	<ul style="list-style-type: none"> • Систематическое, относительно механистическое понимание свойств используемого сырья и параметров процесса в отношении критических параметров качества продукта • Многофакторные эксперименты для понимания продукта и процесса • Создание пространства разработки • Применение инструментов PAT
Производственный процесс	<ul style="list-style-type: none"> • Постоянный • Проверка в основном базируется на исходных полномасштабных пробах • Фокусирование на воспроизводимости и оптимизации 	<ul style="list-style-type: none"> • Регулируемый в рамках пространства разработки • Валидация на протяжении всего жизненного цикла и, в идеале, непрерывный процесс контроля • Фокусирование на стратегии контроля и надежности продукта • Использование методов статистического контроля процессов
Элементы управления процессом	<ul style="list-style-type: none"> • Тестирование в процессе производства в основном на предмет решений «соответствует – не соответствует» • Автономный режим (off-line) анализа (контроль образцов в лабораториях) 	<ul style="list-style-type: none"> • Инструменты PAT используются с опережающими элементами управления, базирующихся на откликах • Действия процесса отслеживаются и направляются для поддержки постоянных попыток улучшения и совершенствования продукта после утверждения
Аспект	Традиционный подход	Улучшенный подход Quality-by-Design
Спецификации продукта	<ul style="list-style-type: none"> • Основные средства контроля • Базируется на данных серий, доступных на момент регистрации 	<ul style="list-style-type: none"> • Часть стратегии полного контроля продукта • Основано на желаемом действии продукта с необходимой существенной информацией
Стратегия контроля	<ul style="list-style-type: none"> • Качество лекарственного препарата в основном контролируется промежуточными и конечными тестированиями продукта 	<ul style="list-style-type: none"> • Качество продукта обеспечивается стратегией контроля, учитывающей риски и разработанной для понятного продукта и процесса • Стратегия, направленная на контроль качества с возможностью выпуска в реальном времени или сокращения тестирований конечного продукта
Управление жизненным циклом продукта	<ul style="list-style-type: none"> • Реактивный (то есть, присутствуют действия по исправлению и решению проблем) 	<ul style="list-style-type: none"> • Преимущественно, предупреждающие действия • Облегчено непрерывное улучшение и совершенствование продукта

1.2.2. Взаимозаменяемость

Практический врач далеко не всегда имеет возможность назначать самые современные лекарства, в первую очередь те, которые проявили свои лучшие свойства. Причин тому несколько, основная - проблемы финансового плана. Поэтому врач часто вынужден (а иногда делает это и бессознательно) заменять

одно лекарство другим, допуская в принципе, что это не приведет к ухудшению результата лечения. Такие замены можно подразделить на несколько типов:

1. Замена одного препарата на другой такого же класса. При этом считается, что все препараты внутри одного и того же класса обладают одинаковыми свойствами (класс-эффект).
2. Замена одной лекарственной формы препарата другой лекарственной формой того же самого препарата.
3. Замена референтного препарата воспроизведенным.
4. Замена одного ВЛП другим ВЛП.

Любая такая замена далеко не всегда обеспечивает лечение такого же качества и такой же безопасности, и, главное, далеко не всегда приводит к желаемому конечному результату – лечебному эффекту и снижению риска осложнений [69,113,116,126].

Безусловно, препараты одного и того же класса обладают весьма похожими свойствами, однако иногда между ними могут выявляться весьма существенные различия, как по основным, так и по побочным действиям [77]. Так, например, из более чем 15 бета-адреноблокаторов лишь 4 (бисопролол, метопролол сукцинат продленного действия, карведилол и небиволол) доказали свою способность улучшать прогноз жизни больных хронической сердечной недостаточностью, соответственно только они имеют показания к назначению при этом заболевании [199,219,296,301,334,356].

Аналогично, способность снижать вероятность осложнений у больных стабильно протекающей ишемической болезнью сердца изучалась с использованием 4 разных ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, однако положительный эффект был доказан лишь для двух - рамиприла и периндоприла и не был доказан для квинаприла и трандолаприла [239,380].

Нередко препараты внутри одного и того же класса существенно отличаются между собой и по побочным действиям. Хорошо известен пример

церивастатина, значительно чаще вызывавшего рабдомиолиз, чем другие представители этого же класса препаратов [366].

Как правило, возможность или невозможность использования конкретного представителя класса при том, или ином состоянии отражена в официально зарегистрированных показаниях к его назначению, и эти показания врач ни в коем случае не должен нарушать. Так, например, далеко не для всех ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента официально зарегистрировано показание сердечная недостаточность. Однако нередко особенности применения конкретного препарата не вполне ясны из официально утвержденных показаний к его назначению [110,112,220,226,302]. Например, руководствуясь официальными справочниками, трудно составить впечатление, какой именно бета-адреноблокатор в первую очередь следует назначить больному, перенесшему инфаркт миокарда [76,186].

Иногда считают, что для улучшения прогноза жизни больного после перенесенного инфаркта миокарда можно назначить любой бета-адреноблокатор, однако это действие доказано лишь для немногих препаратов этого класса, в первую очередь для метопролола и карведилола [221,222,335,354,356]

Поэтому, принимая решение о возможности назначения конкретного препарата из определенного класса лекарств, целесообразно руководствоваться не показаниями к назначению препаратов этого класса в целом, а доказанностью действия этого препарата в определенных клинических условиях, установленной в первую очередь результатами клинических исследований [113].

Создание усовершенствованных лекарственных форм, обладающих способностью обеспечивать равномерное поступление препарата в системный кровоток, нередко оказывает значительное влияние и на эффективность, и на безопасность препарата [135]. Классическим примером являются дигидропиридиновые антагонисты кальция и, в частности, нифедипин. Доказано, что долговременная эффективность и безопасность этого препарата существенно зависят от того, как изменяется концентрация этого препарата в крови.

Лекарственные формы короткого действия, создающие быстрый подъем концентрации препарата в крови, а затем такое же быстрое ее падение, вызывают значительные колебания артериального давления (что само по себе может вызывать сердечно-сосудистые осложнения) [68,223], а также способствуют появлению побочных эффектов, связанных с усилением тонуса симпатической нервной системы (сердцебиение, покраснение кожных покровов, чувство жара и прочее) [67]. Вместе с тем лекарственные формы этого же препарата, создающие постоянную его концентрацию в крови (в первую очередь так называемые гастроинтестинальные терапевтические системы) значительно реже дают эти побочные действия, их благоприятный эффект на вероятность сердечно-сосудистых осложнений доказан (в отличие от лекарственных форм нифедипина короткого действия) в рандомизированных клинических исследованиях [218,245,263]. Кроме того, лекарственные формы нифедипина пролонгированного действия значительно более удобны в применении, поскольку их достаточно принимать один раз в день [263].

Существует термин «генерическая замена», когда врач может быть уверен в идентичности терапевтических свойств ВЛП оригинальному препарату. При этом подразумевается, что генерик доказал свою эквивалентность оригинальному препарату [72]. Однако данные БЭ существуют не для всех генериков и не всегда доступны.

Но даже при доказанной БЭ, как упоминалось выше, если его значения смещены к крайним, существует реальная возможность различий в содержании препарата при использовании генерика, а значит и различий в эффективности. Вследствие названных выше причин можно утверждать, что далеко не все присутствующие на рынке генерики терапевтически эквивалентны оригинальным препаратам [20,35,70,74].

Появление новых генериков, при наличии хорошо зарекомендовавших себя ранее ВЛП, с чисто медицинской точки зрения, бесполезно и создает дополнительные проблемы для врачей. Тем не менее, это реальный факт, с

которым приходится считаться, и задачей врача является получение максимума объективной информации о каждом новом генерике, хотя бы о результатах его доклинических испытаний [89]. В идеале врач должен обладать данными сравнительных клинических исследований с референтным ЛП, однако по разным причинам это представляется малореальным. Поэтому является обязательным наличие данных о доклинических испытаниях каждого конкретного генерика и способе его производства и соблюдении GMP [100].

Требование взаимозаменяемости становится актуальным в тех случаях, когда пациента могут перевести на прием препарата с другим торговым наименованием. Например, это может произойти, если врач назначает препарат по его общепринятому (непатентованному) наименованию; национальное законодательство разрешает генерическую замену; одна и та же торговая марка препарата может быть доступна не во всех случаях (например, в отдаленных районах страны); в клинике пациент получает препарат той торговой марки, которая имеется в наличии; пациент получает ЛП с другим торговым названием после выписки из стационара.

С учетом существенных объемов закупаемых в России генериков установление на законодательном уровне критериев определения взаимозаменяемости оригинального и ВЛП позволит использовать их при подборе лекарственного препарата врачом пациенту. Однако тут же возникают дополнительные вопросы, связанные с отсутствием достаточной нормативной базы для точного определения взаимозаменяемости того или иного препарата. Существует, например, сложившаяся практика ВОЗ, говорящая о том, что эквивалентными являются препараты, содержащие одинаковое количество того же активного вещества в одной и той же лекарственной форме, отвечающие сопоставимым стандартам качества и предназначенные для одного пути введения [40]. Российский же законодатель в критериях взаимозаменяемости лекарственных препаратов делает упор на БЭ, безопасность и состав действующих веществ.

За рубежом концепция взаимозаменяемости широко развита и применяется как для ЛП, полученных путем химического синтеза, – истинно ВЛП, так и для лекарственных препаратов биологического происхождения – биоаналогов.

Взаимозаменяемость в мировой практике напрямую не является предметом условий регистрации ЛП, на нее влияют такие факторы, как ценообразование, локализация производства. Органы, уполномоченные вести предрегистрационный контроль качества, безопасности и эффективности ЛП, за взаимозаменяемость, как правило, не отвечают [361].

В США еще в 1970-х годах в целях сдерживания неуклонно растущих цен на ЛП отдельные штаты стали принимать законы об их взаимозаменяемости. Ряд обращений вынудил FDA подготовить перечень терапевтически эквивалентных лекарственных препаратов (Orange Book, «Оранжевая книга») и научные принципы подтверждения такой эквивалентности [181,315]. Лишь ЛП, входившие в перечень, могли в дальнейшем признаваться взаимозаменяемыми.

В основах законодательства Европейского союза о ЛП для медицинского применения [208] прямое юридическое определение взаимозаменяемости отсутствует. Европейский союз оставил решение этого вопроса на усмотрение стран-членов [361]. Однако на законодательном уровне достаточно глубоко проработан вопрос терапевтической эквивалентности, который, как правило, сводится к подтверждению БЭ (часть 1 статьи 10 Директивы 2001/83/ЕС) ЛП, полученных путем химического синтеза, или биоаналогичности – для ЛП, содержащих в качестве действующего вещества биологическую АФС (часть 4 статьи 10 Директивы 2001/83/ЕС).

Таким образом, указывается, что доказательство БЭ направлено на подтверждение терапевтической эквивалентности. А страны-члены, руководствуясь данными о терапевтической эквивалентности, в дальнейшем вправе самостоятельно решать вопросы взаимозаменяемости (замещения) одних ЛП другими [367,370].

В Германии перечень взаимозаменяемости не составляется, признание взаимозаменяемости происходит после подтверждения БЭ, т.е. на пострегистрационном этапе. Субъектами, признающими взаимозаменяемость, являются либо больничные кассы, либо работники аптек – те, кто напрямую осуществляет снабжение и отпуск лекарственных препаратов [258]. Таким образом, согласно ЕМА и FDA термины «взаимозаменяемость» и «терапевтическая эквивалентность» представляют собой грани одной проблемы [304].

Согласно подходам ВОЗ концепция терапевтической эквивалентности лекарственных препаратов, полученных методом химического синтеза, т.е. воспроизведенных, целиком и полностью основана на БЭ сравнимых средств [441]. Таким образом, в целом воспроизводятся подходы, используемые в США и странах Европейского союза [277].

Наиболее подробно подходы к определению терапевтической эквивалентности описаны в FDA. Согласно подходу FDA терапевтически эквивалентными признаются ЛП, являющиеся:

1. Фармацевтическими эквивалентами в силу идентичного содержания одинаковой фармацевтической субстанции в одинаковой лекарственной форме при одинаковом пути введения и соответствия фармакопейным или иным действующим стандартам по дозировке, качеству, чистоте и подлинности;

2. Являются биоэквивалентными, т.е.:

- а) в отношении них отсутствуют известные или потенциальные причины небиоэквивалентности (например, водные растворы для внутривенного введения заведомо признаются биоэквивалентными), и они удовлетворяют приемлемым стандартам *in vitro* (биовейвер);

или

- б) при наличии таких известных или потенциальных причин они удовлетворяют надлежащим стандартам биоэквивалентности (т.е. проведены исследования биоэквивалентности).

3. Подтверждены их безопасность и эффективность.
4. Сопровождаются правильной (обоснованной) информацией о лекарственном препарате в его инструкции по применению.
5. Производятся в соответствии с текущими GMP.

Следует отметить, что на основании этого определения можно заключить, что не всякий ВЛП является взаимозаменяемым по отношению к оригинальному.

Первый критерий: фармацевтическая эквивалентность и соответствие стандартам качества

ЛП признаются фармацевтическими эквивалентами, если они содержат одинаковую(-ые) фармацевтическую(-ие) субстанцию(и) в той же лекарственной форме, с тем же путем введения и совпадают по дозировке или концентрации. Фармацевтически эквивалентные ЛП содержат одинаковое количество фармацевтической субстанции в той же лекарственной форме и удовлетворяют тем же фармакопейным требованиям или, в их отсутствие, стандартам препарата сравнения (т.е. по дозировке, качеству, чистоте и подлинности), но могут различаться по характеристикам, например форме, конфигурации риска, механизму высвобождения, упаковке, вспомогательным веществам (включая красители, ароматизаторы, консерванты), сроку годности и, в определенных пределах, информации о препарате [236].

ЛП признаются фармацевтически альтернативными, если они в качестве фармацевтической субстанции содержат одинаковое(-ые) действующее(-ие) начало(-а), но представляющее(-ие) собой разные соли, эфиры или комплексы действующего начала или различаются по лекарственной форме или дозировке. Таким образом, лекарственные формы и дозировки в пределах одного действующего начала (международного непатентованного/группировочного наименования) являются фармацевтическими альтернативами, равно как и препараты с модифицированным высвобождением по сравнению с лекарственными формами с немедленным высвобождением, содержащими одинаковую фармацевтическую субстанцию [181]. То есть фармацевтические

альтернативы (например, фармацевтические субстанции в виде разных солей: периндоприла аргинин и периндоприла эрбумин) не признаются терапевтически эквивалентными.

Кроме того, важным аспектом в этом критерии является указание на удовлетворительное качество (соответствие фармакопейным или иным стандартам) ЛП. Следует отметить, что соответствие производства правилам GMP не является тем же, что и удовлетворительное качество. Требование о соблюдении принципов и правил GMP является отдельным требованием терапевтической эквивалентности лекарственных препаратов. Таким образом, лекарственный препарат должен удовлетворять стандартам качества и производиться надлежащим образом, поскольку в некоторых случаях ВЛП не удовлетворяют требованиям о надлежащем их качестве [36].

Второй критерий: подтверждение БЭ

В основе концепции БЭ лежит тезис, что если лекарственный препарат содержит АФС, которая химически идентична и поступает к месту своего действия с той же скоростью и в той степени (количестве), что и референтного ЛП, то он эквивалентен такому ЛП и может заменить его [181]. Согласно подходам США [188], ЕС [236] БЭ можно подтвердить с помощью следующих методов:

- 1) сравнительные фармакокинетические исследования *in vivo*;
- 2) сравнительные фармакодинамические исследования *in vivo*;
- 3) сравнительные клинические исследования;
- 4) исследования *in vitro* (биовейвер) [211]:
 - сравнительный тест кинетики растворения (сравнительный профиль растворения);
 - биовейвер на основании биофармацевтической классификационной системы (принадлежность фармацевтической субстанции к I или III классу по данной системе);
 - наличие подтвержденной корреляции *in vitro*–*in vivo*.

Выбор исследования зависит от места действия АФС и способности дизайна исследования сравнить доставку фармацевтической субстанции, содержащейся в двух препаратах, к месту действия.

Под биоэквивалентными ЛП понимаются фармацевтически эквивалентные или фармацевтически альтернативные препараты, которые при исследованиях в схожих экспериментальных условиях проявляют сопоставимую биодоступность. Следует отметить, что в отличие от модели терапевтической эквивалентности в модели БЭ фармацевтические альтернативы могут быть биоэквивалентными.

В некоторых случаях БЭ можно подтвердить с помощью *in vitro* стандарта БЭ, особенно если такое исследование *in vitro* коррелирует с данными биоэквивалентности у человека *in vivo* [211]. В иных случаях БЭ также подтверждают с помощью сравнительных клинических или фармакодинамических исследований [214].

Третий критерий: подтверждение эффективности и безопасности

Взаимозаменяемость ВЛП должна признаваться лишь по отношению к референтным лекарственным препаратам (лекарственным препаратам сравнения), безопасность и эффективность которых подтверждена адекватными и строго контролируемыми исследованиями [360] и зарегистрированными на основании полного регистрационного досье.

Четвертый критерий: правильная, обоснованная информация в инструкции по применению

Информация о препарате, содержащаяся в инструкции по применению, является неотъемлемым условием при подтверждении терапевтической эквивалентности. Инструкция по применению терапевтически эквивалентного ЛП в целом не должна отличаться от инструкции по применению референтного ЛП. Отсутствие унифицированной с референтным ЛП информации (актуальной информации об опыте клинического применения) и путей решения этой проблемы является одним из препятствий на пути внедрения концепции взаимозаменяемости.

Следует отметить, что в ЕС аналоги типовых клинико-фармакологических статей активно используются и обеспечивают одинаковость инструкций по применению на всей его территории. К ним, в частности, относятся Core Summary of Product Characteristics (типовая инструкция по применению), а также инструкции по применению, согласованные ЕМА или Координационной группой по процедуре взаимного признания и децентрализованной процедуре по ЛП для медицинского применения (Coordination group for Mutual recognition and Decentralised procedures – Human, CMDh). Без обеспечения единства и непротиворечивости информации, содержащейся в инструкциях по применению терапевтически эквивалентных ЛП, внедрение системы взаимозаменяемости невозможно.

Пятый критерий: соблюдение правил GMP

Соблюдение правил GMP является необходимым условием для успешного прохождения процедуры регистрации ВЛП в США и ЕС. В ЕС сами правила, а также их обеспечение регламентируется примерно 40 документами, занимающими в общей сложности 500–600 страниц [374].

1.3. Факторы, влияющие на фармакологическую активность фармацевтической субстанции. Взаимосвязь «структура-эффект»

1.3.1. Подлинность активной фармацевтической субстанции

Невозможно получить высококачественный ЛП из некачественного сырья. В частности, исходные материалы должны, по крайней мере, соответствовать требованиям действующей фармакопеи, если в ней имеется подходящая статья. Это имеет особое значение для АФС.

Производители готовых ЛС должны гарантировать, что каждая серия исходных материалов прошла проверку на соответствие спецификациям в

отношении подлинности, количественного содержания, степени чистоты и других параметров качества перед ее использованием в производстве [377].

Другие показатели качества могут включать, например, предельно допустимые размеры частиц нерастворимого АФС или предельную вязкость раствора вспомогательного вещества.

Согласно положениям GMP [100] все поставки продукции должны сопровождаться списком номеров серий или контрольных номеров, а также сертификатами анализов серии или серий. Положения Руководства ВОЗ по GMP позволяют принимать сертификаты анализов АФС, предъявляемые поставщиком, при условии, что производитель готовой продукции установил достоверность этих анализов посредством периодической валидации результатов анализа поставщика [83,377].

Невозможность подтверждения надежности поставщика связана со значительным риском [201,355]. Однако даже если данные поставщика подтверждены, производитель готового препарата обязан, по крайней мере, проводить испытание на подлинность исходных материалов в каждой упаковке.

АФС следует, по возможности, закупать непосредственно у их производителей, а не у посредников [124]. Однако это далеко не всегда бывает возможным. Следовательно, при перечисленных ниже обстоятельствах рекомендуется проводить полную проверку каждой серии АФС (т.е. выполнять полный набор анализов, а не только испытание на подлинность).

Производитель готовой продукции обязан хранить сертификаты, выданные производителем исходного материала для каждой серии АФС, как минимум на протяжении срока хранения всех серий готового препарата, в производстве которых использовался АФС из данной серии.

Если обнаружится, что серия активного ингредиента оказалась недоброкачественной, то можно будет отследить все серии готовой продукции, для производства которых она использовалась.

Рекомендуется, чтобы контракты на поставку исходных материалов включали требования в отношении качества, например: «...должны соответствовать действующим требованиям Международной, Европейской, Индийской, Японской фармакопеи или Фармакопеи Соединенных Штатов Америки». Серии исходных материалов, которые не отвечают этим требованиям, должны быть возвращены поставщику.

Методы анализов и предельные значения для АФС и готового ЛС должны, как минимум, удовлетворять соответствующим требованиям фармакопеи, включая общие требования, например, приведенные в Международной фармакопее для парентеральных препаратов, капсул и т. д. Дополнительные анализы и предельные значения могут потребоваться, например, для анализа скорости растворения твердых лекарственных форм, содержащих нерастворимые в воде активные ингредиенты, методика которого отсутствует в фармакопее [49,51,56,73,75]. Примерами могут служить капсулы амоксициллина и таблетки примидона.

В фармакопее могут отсутствовать заданные спецификации для некоторых свойств, поскольку они не являются необходимыми для всех препаратов. Примером является размер частиц нерастворимых в воде АФС. Устанавливать предельные значения в фармакопее нецелесообразно, поскольку они могут изменяться в зависимости от предполагаемого использования исходного материала. Если АФС содержится в препарате в форме твердых частиц и не переходит в раствор в процессе производства, ограничение размера частиц, как правило, является необходимым [109,144,154,163,241,300]. Однако этот же материал может быть использован для приготовления раствора, для которого размер частиц не будет иметь никакого значения. Например, растворимость галоперидола в воде не превышает 0,001%. Представляется целесообразным включить предельные значения размеров частиц АФС, используемых для производства таблеток галоперидола, поскольку данное лекарственное средство содержится в твердой форме и не переходит в раствор в процессе производства. Диапазон размеров частиц может оказывать влияние на биодоступность препарата.

Однако этот же АФС содержится в концентрированном растворе галоперидола Британской фармакопеи в растворенной форме, что исключает необходимость ограничения размера частиц АФС, используемого в производстве этого препарата.

Если препарат получил регистрационное удостоверение, а его спецификации включают соответствие фармакопейной статье, в большинстве случаев может быть разрешено автоматическое обновление по мере выхода новых изданий этой же статьи, опубликованной в этой же фармакопее. При этом по-прежнему должны применяться необходимые анализы в дополнение к перечисленным в фармакопее, такие как размер частиц и определение предельного содержания примесей, связанных с конкретным методом синтеза [11,47,98,99,167,368].

В рамках контроля качества АФС должен выполняться анализ (либо анализы), позволяющий убедиться в использовании подходящего вещества [14,15,95,284,286]. Некоторые активные ингредиенты могут быть доступны в форме одного энантиомера, рацемата (например, дексамфетамин и амфетамин) либо нескольких изомеров (например, лабеталол); в этом случае необходимо убедиться, что активный ингредиент остается одинаковым от серии к серии (в случае лабеталола необходимо контролировать соотношение двух пар рацематов). Кроме того, может потребоваться контроль соединения в форме соли и состояния гидратации, например, для амоксициллина натрия в сравнении с амоксициллина тригидратом. Для некоторых (особенно старых) активных ингредиентов, таких как кломифен, может быть необходим контроль соотношения (Z)- и (E)-изомеров (цис- и транс-). Методики анализа подлинности должны быть валидированы [201].

1.3.2. Полиморфизм и псевдополиморфизм активной фармацевтической субстанции

Полиморфизм лекарственных веществ АФС может быть причиной фармацевтической неэквивалентности и, как следствие, фармакокинетической и терапевтической неэквивалентности препаратов в твердой лекарственной форме.

Имеющиеся существенные отличия в растворимости полиморфных модификаций АФС могут привести к различию кинетики их растворения *in vivo* и, как следствие, - биодоступности ЛС. Биодоступность/биоэквивалентность ЛС зависит от ряда факторов определяющих скорость и степень их абсорбции, таких как кинетика растворения и проникающая способность через мембраны клеток, гастроинтестинальная подвижность, метаболизм. Эти факторы учитываются в концепции биофармацевтической классификационной системы (БКС) АФС [171,191,379], которая уже принята в руководствах регулирующих органов в промышленно развитых странах [177, 365].

Большинство литературных данных укладываются в рамки БСК АФС и позволяют предсказать на основании фармацевтических свойств, будет ли различаться биодоступность ПМ АФС [13,24,28]. Тем не менее встречаются и противоречивые сведения относительно биодоступности кристаллических модификаций ЛВ [42,178,209,323]. Возможными причинами противоречий, по-видимому, являются следующие: 1) растворимость ПМ АФС часто сравнивается в апротонных органических растворителях или в деионизированной воде, т.е. в условиях отличных от процесса абсорбции АФС, 2) в подобных работах не учитывается степень дисперсности отдельных ПМ АФС.

В контексте исследования биофармацевтических свойств АФС в литературе практически не рассматривается вопрос, чем обусловлен наблюдаемый фармакокинетический эффект конформационных ПМ АФС: лишь разницей в растворимости и скорости растворения отдельных модификаций, либо отчасти и сохранением конформационного отличия ПМ АФС в водном растворе?

Согласно Европейской Фармакопее [229], свойства ПМ АФС в растворах и расплавах идентичны. Между тем первые наблюдения, указывающие на отличие свойств растворов ПМ низкомолекулярных органических соединений, были отмечены в первой половине XX в. В монографиях [57,138] приведены несколько примеров, согласно которым расплавы и растворы ПМ низкомолекулярных органических веществ отличающихся по вязкости, оптической рефракции, УФ-

поглощению, а также по реакционной способности в реакциях бромирования и гидрирования. Относительно недавно было сообщено о том, что раствор метастабильной ПМ местного анестетика дикаин проявляет в 2-3 раза более положительную анестезирующую активность по сравнению со стабильной модификацией при местном применении на роговицу глаза [61,65], при субарахноидальном введении препарата [61], как средства спинальной анестезии [127]. При этом токсичность дикаина в 3 раза превышает токсичность метастабильной ПМ. Эта группа авторов отмечает и более высокую репаративно-регенеративную активность бета-ПМ метилурацила по сравнению с его альфа-модификацией на клетки переднего эпителия роговицы глаз [86], что может объясняться различной диффузией через мембрану двух бионезквивалентных форм метилурацила [58]. Учитывая низкобарьерный характер конформационных состояний ПМ, сохранение различий между ПМ АФС в растворе после диссолюции объяснялось за счет их стабилизации кооперативными взаимодействиями [138], в частности, за счет внутримолекулярных связей, образования молекулярных ассоциатов и сольватации [59,60]. Действительно, супрамолекулярные ассоциаты возникают на стадии образования зародышей при кристаллизации [247]. Однако в условиях, отличных от пересыщенных растворов, молекулы АФС сольватированы. Например, результаты исследования флуоресценции дифлунизала в растворе и в четырех кристаллических ПМ не позволяют предположить возможность кооперативных взаимодействий в растворе [349].

В настоящее время большое внимание ученых уделяется хиральности как фундаментального свойства биологических систем [34,38,66,114,115]. Так, например, до последнего времени амлодипин использовали в виде рацемической смеси право- и левовращающих изомеров. Вместе с тем установлено, что способность блокировать кальциевые каналы L-типа принадлежит преимущественно левовращающему S-энантиомеру [63]. Изучение амлодипина показало, что присоединение к дигидропиридиновым рецепторам является

стерео- селективным и связь с S(-)изомером была в 1000 раз сильнее, чем с R(+)-изомером [16]. Стереоселективность рецепторов к S(-) и R(+)-изомерам объясняет различия в клиренсе, биодоступности и клинической активности препарата. Применение чистого левовращающего фармакологически активного S(-)изомера амлодипина вместо рацемической смеси имеет важные преимущества, ведь необходимая доза и системная токсичность могут быть снижены.

По-видимому, значимые различия в свойствах растворов ПМ можно ожидать для АФС большой молекулярной массы – липофильных, обладающих конформационной жесткостью полициклических соединений, в которых дополнительно реализуются сильные внутримолекулярные взаимодействия, например стероидов, гормонов, пептидов, природных высокомолекулярных биологически активных веществ, характеризующиеся высокой пространственной организацией молекул [120,147,152,155,256]. Однако это вопрос в полной мере не может быть решен без систематического исследования конформаций молекул. ПМ АФС в растворах методами спектроскопии циркулярного дихроизма и объемного ядерного магнитного резонанса.

С учетом вышесказанного важным вопросом является стабильность кристаллических модификаций АФС. Метастабильная ПМ может превращаться в термодинамически более стабильную форму, что в свою очередь может привести к уменьшению растворимости АФС. Высокая дисперсность АФС может негативно влиять на стабильность АФС при хранении за счет агрегации [333], превращений аморфной формы, изменения полиморфного состава. В процессе хранения вне плотной упаковки, в замороженном состоянии возможны кристаллизация аморфных образцов и образование гидратов, превращение метастабильных полиморфных модификаций в стабильные формы [200,244].

Таким образом, из многочисленных факторов, которые оказывают влияние на качество твердых АФС, краеугольным является кристаллическая структура АФС [270,278,279,289,292]. Понимание взаимосвязи кристаллической структуры, био- и фармацевтических свойств может позволить оптимизировать

технологический процесс получения и состав лекарственной формы с заданными свойствами, которые должны обеспечивать оптимальную биодоступность действующего вещества. При разработке готовых лекарственных форм и аналитической нормативной документации на ЛС необходима строгая регламентация полиморфного состава и степени измельчения частиц АФС, что является принципиальным для АФС 4-го и особенно 2-го класса по БСК. В мировой практике доклинические и клинические исследования при разработке новых ЛС включают биофармацевтический скрининг, связанный с выявлением фармацевтических факторов, влияющих на высвобождение, фармакокинетику, фармакодинамику и токсикодинамику АФС.

Все аналитические методики должны быть предварительно валидированы [316,318,350,351,359]. Разработан ряд руководств, в которых рассматриваются вопросы валидации аналитических процедур, например ICH [201]. Необходимо проверять использование описанных в фармакопеях аналитических методик для каждого состава [87,92,93,146,148,167].

Примером неправильного применения методики может служить состав, из которого при обработке в соответствии с фармакопейным методом образуется опалесцирующий раствор на этапе, на котором должно быть измерено поглощение УФ-излучения.

1.3.3. Примеси

Наличие тех или иных примесей в составе ЛП может оказывать существенное влияние на параметры безопасности и эффективности. Соответственно, можно предположить, что информация о безопасности и эффективности хорошо изученных референтных ЛП применима к новым воспроизведенным препаратам только при условии, что характер примесей препарата новой торговой марки не должен значительно отличаться от препарата сравнения. Пределы количественного содержания отдельных примесей в АФС не

должны быть расширены относительно препарата сравнения, и в идеале препарат новой торговой марки не должен содержать каких-либо новых примесей [11,48,96].

Если присутствуют новые примеси, они должны соответствовать токсикологическим требованиям [84,85,91,104,108,146]. Если эти условия не выполняются, то, строго говоря, следует рассмотреть проведение новых исследований по безопасности [156, 157,158,159,164,167,168].

Чтобы выполнить необходимое сравнение состава примесей, в идеале должно быть известно предельное содержание примесей в препарате сравнения, а также информация о том, какие примеси были обнаружены на самом деле. Фактически обнаруженные примеси могут не определяться или не контролироваться при помощи методик и предельных значений, указанных в фармакопеях, поэтому в некоторых случаях требуются дополнительные методы контроля. К сожалению, информация о фактическом содержании примесей в препарате сравнения во многих случаях недоступна для Минздрава России вследствие того, что препарат сравнения поступил в продажу до полноценного внедрения предрегистрационной оценки. Получение с целью оценки новой торговой марки воспроизведенного лекарственного препарата информации о примесях от компании, которая осуществляет продажи препарата сравнения, считается объективным не во всех странах, однако в некоторых странах такая информация может считаться оправданной с точки зрения общественной безопасности. Как правило, более приемлемым является требование к заявителю провести для воспроизведенного препарата физико-химические исследования с целью сравнения содержания примесей в новом препарате и в препарате сравнения.

Для всесторонней оценки допустимости предельного содержания примесей требуется также информация о методе синтеза и мнение опытного химика-органика относительно того, какие побочные продукты могут образовываться при данном методе синтеза. Это дает возможность оценить вероятность обнаружения побочных продуктов при помощи разрабатываемой методологии определения примесей. Кроме того, необходимо выполнить аналогичную оценку ожидаемых

путей распада и вероятности обнаружения продуктов распада при использовании предлагаемых методов определения примесей [92,93,148].

Процедуры анализа АФС должны по возможности быть специфичными для АФС в присутствии примесей [52,62,84,85,91,104]. Однако это может не являться обязательным требованием, если оставшаяся часть фармакопейной статьи позволяет полностью контролировать содержание всех видов примесей [108,130,131,146,148,156], в том числе (при необходимости) продуктов распада, побочных соединений, образовавшихся в процессе синтеза, тяжелых металлов и негорючих примесей [157,158,159,164,167,168].

Может потребоваться контроль физических свойств АФС, таких как (при необходимости) размер частиц и полиморфные формы, в тех случаях, когда эти параметры имеют критическое значение для производства готового препарата [26,122,150].

Если национальный регуляторный орган (НРО) уверен в том, что компания в достаточной степени обеспечивает отсутствие значимых количеств побочных продуктов синтеза в АФС, компании не требуется определять такие побочные продукты в готовом лекарственном препарате [78,84,85,91,104,108,130]. Однако необходимо осуществлять контроль соединений, которые могут образовываться при распаде активного ингредиента, а также при взаимодействии активного ингредиента со вспомогательными веществами или материалами контейнера.

В рамках своей регулирующей роли в процессе контроля качества НРО может по своему усмотрению выполнять проверку побочных продуктов синтеза в готовом ЛП [131,156,157,158,164,168]. Процедуры обнаружения и/или количественного определения примесей должны быть валидированы [11,47,201].

1.3.4. Стабильность

В дополнение к определению подлинности и количественного содержания АФС, а также отсутствия примесей, во многих случаях могут требоваться

испытания физико-химических свойств готового ЛС, в т.ч. и для доказательства стабильности. Примеры включают наличие загрязненности твердыми частицами в инъекционных растворах, недостаточное разделение фаз в эмульсии для инъекций, размер частиц суспензии, а также скорость растворения твердых пероральных лекарственных форм [122,128].

ЛП должны сохранять исходное качество на всем протяжении срока годности при хранении в окончательной торговой упаковке и при условиях хранения, указанных на этикетке. Допустимые условия хранения должны быть достижимы в местных условиях, например на складах и в системах распределения препарата.

Препарат должен также сохранять стабильность при обработке в соответствии с указанными на этикетке инструкциями, например во время приготовления раствора или разбавления.

1.3.5. Вспомогательные вещества. Влияние на биодоступность

Для вспомогательных веществ сложнее получить информацию о методе синтеза. Следовательно, по причинам, которые аналогичны описанным для АФС, рекомендуется соответствие вспомогательных веществ последнему изданию фармакопеи, а также полная проверка каждой полученной через посредника партии материалов производителем готового ЛП перед ее использованием в производстве.

Вспомогательные вещества, входящие в состав ЛП, влияют на его биодоступность. Так, например, для прессования таблеток и наполнения капсул используют вещества, которые могут отрицательно повлиять на скорость растворения действующего соединения. Растворению лекарственных веществ может препятствовать низкая диспергирующая способность частиц наполнителя, а их дезагрегации способствуют поверхностно-активные или другие вещества, влияющие на электростатические свойства частиц. Технология грануляции порошков на фармацевтических заводах также влияет на характер высвобождения

действующего вещества из лекарственной формы. Немаловажное значение для биодоступности препаратов имеют характер и состав покрытия таблеток и капсул.

1.4. Экспериментальные исследования безопасности лекарственных средств

1.4.1. Доклинические исследования референтных лекарственных средств

Стремление к сохранению здоровья населения, увеличению продолжительности жизни и улучшению ее качества является основным вектором развития биологии, медицины и системы здравоохранения в развитых странах. Наличие современных доступных лекарственных препаратов является основой лечения и профилактики подавляющего большинства болезней современного человека и показателем социального и экономического развития общества. Создание и внедрение новых высокоэффективных лекарственных средств является приоритетной задачей ученых, технологов, врачей и государственных органов здравоохранения.

Достижения современной науки позволяют разрабатывать и использовать для получения новых лекарственных препаратов самые передовые технологии. Однако успешное внедрение в клиническую практику новых методов лекарственного лечения предполагает наличие доказанной в соответствии с современными требованиями высокой степени эффективности и безопасности применения новых лекарств. Для этого должен выполняться определенный порядок проведения научных исследований на различных уровнях, важнейшим из которых является оценка специфической фармакологической активности и безопасности на этапе доклинических экспериментальных исследований. Целью доклинических исследований является получение научными методами оценок и доказательств безопасности, качества и эффективности ЛС [1].

Поскольку референтные ЛП как правило представляют собой новые, недавно разработанные средства, с небольшой базой предварительных исследований эффективности и безопасности, объем доклинических исследований таких препаратов довольно обширен и включает исследование общетоксических свойств (острая и подострая (субхроническая) токсичность, хроническая токсичность, местно-раздражающее действие), а также исследования специфических видов токсичности (репродуктивная токсичность, канцерогенное действие, аллергизирующее действие, иммунотоксическое действие), исследования фармакологической безопасности, специфической фармакологической активности и фармакокинетические исследования.

1.4.2. Доклинические исследования воспроизведенных лекарственных средств

Ненадежность ВЛП является актуальной проблемой, вызванной низким качеством субстанций и вспомогательных веществ, фальсификацией препаратов, обнаружением новых побочных эффектов в процессе мониторинга, низким качеством доклинических исследований.

Необходимый объем доклинических исследований ВЛП включает изучение общетоксических свойств (острая и подострая (субхроническая) токсичность), а также местнораздражающего действия в сравнении с зарегистрированным аналогом [117].

Острая токсичность - токсикометрическая характеристика ЛП, выражающая его способность вызывать гибель животных при однократном введении или при введении через короткие (не более 6 ч) интервалы времени в течение суток.

Целью изучения острой токсичности является определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества и причин наступления гибели животных с анализом клинической картины интоксикации. Параметры острой токсичности ЛС могут быть вычислены с помощью любых статистических

методов, однако предпочтительнее пользоваться методами, позволяющими провести сравнительную оценку исследованных параметров для двух или более фармакологических веществ. Использованный метод расчета среднелетальных доз должен быть обязательно указан в отчете, например, метод Литчфилда и Уилкоксона. В исследованиях с использованием крупных животных достаточно описания токсических эффектов без достижения летальности.

Целью субхронических токсикологических исследований является характеристика повреждающего действия фармакологического вещества при его длительном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, а также исследование возможности обратимости вызываемых повреждений. Продолжительность введения фармакологического вещества при изучении хронической токсичности зависит от предполагаемой длительности его применения в клинике, планируемой фазы клинического исследования и видовой принадлежности лабораторных животных.

При оценке местнораздражающего действия изучается возможное токсическое действие изучаемого ЛП в месте введения. Так, например, для ЛП, применяемых перорально, проводится макроскопическое и гистологическое изучение органов пищеварительного тракта.

1.4.3. Современные методы доклинических исследований. Переход к альтернативной *in vitro* токсикологии

Проблемы этического, разумного и экономного использования лабораторных животных в современных доклинических исследованиях лекарственных препаратов привлекают большое внимание специалистов и общественности. Безусловно, эксперименты на животных крайне важны для сохранения здоровья человека, однако эти исследования являются трудоемкими и дорогостоящими, а также они травмируют подопытных животных и приводят к их гибели. Поэтому сегодня вполне обоснованы усилия ученых, направленные на максимальное сокращение количества животных и замену их альтернативными

моделями и тест-системами в условиях *in vitro*. Современные методы позволяют не только свести количество подопытных животных к минимуму, но и полностью или частично заменить их. Такие методы помогают помимо решения этических проблем, связанных с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных, значительно удешевить и сократить сроки предварительного исследования новых лекарственных препаратов, прежде всего на стадии их доклинических исследований [32,54,246,268,344].

В настоящее время все большее внимание уделяется концепции усовершенствования, уменьшения и замены (Refinement, Reduction, and Replacement), которая также известна как «Три R», а методы, использующие эту концепцию, называются альтернативными [281]. В данной концепции Refinement (усовершенствование) включает методы, исключающие или вызывающие минимальную боль, страдания и стресс у животных. Reduction (сокращение) включает методические подходы, позволяющие получать информацию при использовании меньшего числа животных или получения большего количества данных на том же количестве животных. Replacement (замена) означает замену на методы, позволяющие достичь цели без проведения экспериментов на животных. За последние 50 лет концепция «трех R» получила выражение в законах, стандартах и руководящих документах во всем мире. Сегодня концепция «трех R» является самой передовой в области научных исследований. Благодаря этой концепции удалось сконцентрировать на данной проблеме внимание правительств и академических центров, что привело к существенному изменению техники исследований, испытаний и обучения с пользой как для науки, так и в интересах защиты экспериментальных животных [357].

Всемирная организация здравоохранения, международное медико-биологическое общество не только одобряют, но и настоятельно рекомендуют и поддерживают использование альтернативных моделей и методов в токсикологии [228]. Использование *in vitro* тестов при оценке безопасности, разработке лекарств и новых продуктов уже стало общепринятым. Согласно принципам

Правительства США по использованию животных в научных исследованиях, до проведения тестирования на животных должны использоваться *in vitro* тест-методы определения базальной цитотоксичности, где это приемлемо. Такие методы считаются частью взвешенного подхода для оценки начальной дозы при исследовании острой пероральной токсичности препаратов *in vivo*. Для некоторых исследуемых препаратов подобный подход уменьшает число используемых животных, а также долю животных, которые погибают или умерщвляются в процессе эксперимента. Многие крупные международные компании уже широко используют альтернативные методы.

FDA приветствует ограничение тестирования на животных. В 2007 г. Национальный научный совет США опубликовал доклад о будущем токсикологических исследований, в котором говорится, что настало время разработки новой парадигмы, не основанной на использовании животных. Основное предложение доклада заключалось в переориентации тестирования на молекулярный уровень вместо наблюдения фенотипических реакций целого организма, переходе от тестирования на целом животном на тестирование на клеточном уровне [268].

У таких предложений есть серьезные основания, поскольку несовершенство и ограничения тестирования на животных очевидны и понятны. Традиционная токсикология *in vivo* трудоемка, она требует много времени и расхода большого количества тестируемого продукта. Тестирование на животных трудно адаптировать к современному направлению высокопроизводительных скрининговых технологий [369], что в конечном счете создает препятствия на пути массового скрининга лекарственных препаратов и химических веществ.

Использование новейших научных инструментов для доказательства безопасности и эффективности новых продуктов в кратчайшие сроки, с большей надежностью и меньшими расходами является насущной необходимостью. Клетки *in vitro* являются средством, обеспечивающим дальнейшее развитие в этом направлении [269]. В настоящее время возможно культивировать широкий

спектр клеток различных типов, в том числе из разных тканей и видов. Это очень удобно, так как создаются условия для определения орган- и видоспецифичной токсичности. Если же используются клетки человека, то минимизируются проблемы межвидовой экстраполяции. Другими словами, преимущества тестов *in vitro* заключаются в том, что они быстры, недороги и позволяют исследовать специфические механизмы действия исследуемых агентов.

Еще одно преимущество моделей *in vitro* заключается в возможности работы непосредственно на культурах клеток человека, что делает полученные данные более адекватными при их проекции на организм человека. Кроме того, использование культур клеток позволяет установить характер биологической активности изучаемых соединений непосредственно на клеточном уровне и учесть сложные синергические и/или разнонаправленные эффекты смесей химических соединений.

Использование альтернативных методов доклинических исследований особенно актуально для ЛП биологического происхождения. В настоящее время до 10 % объема мирового фармацевтического рынка приходится на биотехнологические ЛП; их доля постоянно увеличивается и по оценке ряда специалистов к 2020 г. может достичь 50 % [19,149,160]. Сегодня уже более 150 ЛП в мире широко применяются для лечения больных: интерфероны, эритропоэтины, моноклональные антитела, инсулины, низкомолекулярные гепарины, человеческий гормон роста, колониестимулирующий фактор, факторы свертывания крови, тромболитики [22,341]. По выпуску биотехнологической продукции первое место в мире занимают США, которые ежегодно выделяют 3 млрд. долл. на поддержку фундаментальных исследований в области медицины, из которых 2,5 млрд. долл. относится к области биотехнологии. Второй страной по выпуску биотехнологической продукции является Япония, третье место принадлежит Израилю.

В ближайшие годы истекает срок патентной защиты на многие оригинальные биотехнологические ЛП, что открывает возможность для создания

России их аналогов, которые носят название «биологически аналогичные лекарственные препараты». По данным компании Frost&Sullivan, к 2017 г. объем европейского рынка биоаналогов достигнет 4 млрд долларов США на фоне патентного «обвала» [227]. Вопросы обращения биотехнологических ЛП в России в настоящее время рассматриваются на государственном уровне [53, 129]. В частности, согласно Стратегии развития фармацевтической промышленности РФ в результате научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы по доклинической разработке отечественных инновационных ЛП к 2020 г. должны быть получены патенты более чем на 400 биологически активных веществ и проведены их доклинические исследования.

Концепция «биологически аналогичный лекарственный препарат», в целом, применима к любому биологическому ЛП. Однако на практике успех такого подхода в разработке ЛП будет зависеть от способности изучить его свойства и, таким образом, подтвердить аналогичность физико-химических, биологических, доклинических и клинических свойств оригинальному биологическому ЛП.

Один из первых разработанных в мире биоаналогов ритуксимаб - иммуноглобулин (Ig) G-1к химерный, или химерное анти-CD20 моноклональное антитело, которое получают методом генной инженерии. Показаниями к применению ритуксимаба являются: В-клеточные неходжкинские лимфомы (НХЛ) (рецидивирующие или химиоустойчивые с низкой степенью злокачественности или фолликулярные) у взрослых пациентов, ревматоидный артрит, а также тяжелые формы активного гранулематоза с полиангиитом (гранулематоз Вегенера) и микроскопического полиангиита (комбинированная терапия с глюкокортикостероидами).

К настоящему времени накоплен внушительный объем экспериментальных исследований фармакологических эффектов ритуксимаба *in vitro* и *in vivo* на моделях с ксенотрансплантатами различных типов лимфом человека.

Golay J. и соавторы исследовали механизмы действия ритуксимаба на четырех клеточных линиях фолликулярной лимфомы, одной линии клеток

лимфомы Беркитта, трех образцах фолликулярной лимфомы пациентов и нормальных В-клетках *in vitro*. Так, ритуксимаб эффективно блокировал пролиферацию нормальных В-лимфоцитов, но не клеток лимфомы. Исследователи не зафиксировали значимых изменений апоптоза клеток в культурах в ответ на обработку ритуксимабом. При этом клетки всех патологических линий были мишенями антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), индуцированной ритуксимабом. С другой стороны, интенсивность комплемент-индуцированного лизиса существенно отличалась в зависимости от типа клеточных линий, варьируя от 100% до полной резистентности. Была проведена оценка эффектов рецепторов-ингибиторов комплемента CD35, CD46, CD55 и CD59, которая позволила заключить, что CD55 и в меньшей степени CD59 являются важными регуляторами комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) в отношении клеток различных линий фолликулярной лимфомы, а также клеток изолированных из клинических образцов фолликулярной лимфомы. Исследователи пришли к выводу, что КЗЦ и АЗКЦ являются принципиальными механизмами действия ритуксимаба на В-клеточные лимфомы, а гетерогенная восприимчивость клеток различных линий лимфом к комплементу может быть отчасти причиной гетерогенности ответов у пациентов на ритуксимаб. Кроме того, авторами впервые показано, что относительные уровни представленности маркеров CD55 и CD59 на поверхности В-клеток могут служить индикаторами клинического ответа на лечение ритуксимабом [189].

Позднее, в другом исследовании Golay J. ритуксимаб продемонстрировал способность к активации КЗЦ и АЗКЦ против CD20-позитивных клеточных линий НХЛ на фоне приобретенного иммунодефицита человека с увеличением лизиса опухолевых клеток на 60-98% и 20% соответственно. Эти данные, полученные *in vitro*, также указывают на рациональность терапевтического применения ритуксимаба в лечении пациентов с CD20-позитивной НХЛ на фоне СПИД [173].

В проведенном Manches O. и соавторами исследовании *in vitro*, на клеточных моделях лимфом была показана высокая чувствительность выбранных клеточных линий к ритуксимаб-индуцированной АЗКЦ, фагоцитозу и апоптозу, однако, следует отметить, что уровень чувствительности к КЗЦ был различным. Исследователи установили, что и содержание CD20, и экспрессия опухолевыми клетками регуляторных протеинов комплемента являются предикторами чувствительности к КЗЦ ритуксимаба *in vitro*. Так, ритуксимаб-индуцированная КЗЦ вызывала лизис клеток фолликулярной лимфомы, в то время как линии лимфомы из клеток мантии и диффузной В-крупноклеточной лимфомы были более устойчивы, а мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома проявила максимальную рефрактерность к терапии [277].

Функциональный каскад системы комплемента реализуется посредством последовательной активации ряда зимогенов, при участии компонентов-ингибиторов (наиболее изученными являются CD35, CD55 и CD59). Пара Fc-фрагментов антител, локализованных пространственно в непосредственной близости, запускает классический путь данного каскада, посредством активации C1-фрагмента, который в свою очередь является активатором для C4 и C2 компонентов. Данные реакции с высокой точностью контролируются свободным C1-ингибитором. Образовавшийся комплекс C1, C4, C2, известный как C3-конвертаза, инициирует функционирование C3-компонента и отделение C3b-фрагмента релокализующегося на клеточную мембрану. Данный фрагмент (C3b), связанный с клеточной мембраной трансформируется в C5-конвертазу. Примечательно, что именно функциональная активность мембранных белков CD35 (CR1) и CD55 (MAC, DAF) ингибируют обе вышеупомянутые конвертазы. Последовательно ассоциирующиеся друг с другом C5b, C6, C7, C8 и C9 фрагменты образуют мембрано-атакующий комплекс (MAC). Специфическая активность данного звена ингибируется другим мембранным ингибитором (CD59). Таким же образом, активация системы комплемента, инициируемая Fc-фрагментом ритуксимаба, обуславливает лизис CD20-экспрессирующих клеток

через КЗЦ, являющуюся одним из основных механизмов действия данного препарата. Так, принципиальная роль КЗЦ в реализации ритуксимабом своих цитотоксических эффектов в отношении различных линий лимфом была подтверждена во многих других исследованиях на клеточных моделях *in vitro* [238,283,179,312,203,363]. Ряд факторов, например тип и цитологические характеристики опухолевых клеток могут оказывать существенно различающееся воздействие на то, как реализуются ритуксимаб-индуцированная КЗЦ и АЗКЦ. Тем не менее, широко распространено мнение, что данные механизмы действия синергично влияют на раковые клетки посредством способности системы комплемента к усилению воспаления и изменения состояния активации внутренних эффекторных молекул [299].

Наряду с КЗЦ, АЗКЦ также играет важную роль в противоопухолевой активности молекулы ритуксимаба. Данный механизм является пусковым для уничтожения раковых клеток через взаимодействие Fc-фрагмента препарата с клеточными Fc γ -рецепторами, в частности с Fc γ RI и Fc γ RIII, что приводит к дальнейшей активации рецепторов, представленных на эффекторных иммунных клетках (моноцитах/макрофагах, гранулоцитах/нейтрофилах, НК-клетках). Это взаимодействие, опосредованное функционированием ритуксимаба, на активированные эффекторные клетки инициирует функционирование ряда сигнальных путей, которые предшествуют высвобождению воспалительных и/или цитотоксических иммуномодулирующих молекул, в частности цитокинов, хемокинов, протеаз и активных форм кислорода [382]. Активированные популяции моноцитов/макрофагов, а также гранулоциты/нейтрофилы способны осуществлять фагоцитоз опухолевых клеток, в то время как активированные НК-клетки выполняют элиминацию последних посредством гранзм-перфориновой системы. Прочие типы эффекторных клеток, у которых наблюдается доминантная экспрессия Fc γ RIIB остаются не функциональными, без дополнительной активации. Показано, что Fc γ RIIB являясь значимым регулятором АЗКЦ *in vivo*, осуществляет модуляцию функционирования Fc γ RIII у различных типов

эффекторных клеток [280]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* Veuillen С. и соавторы установили, что активация клеток натуральных киллеров (НК) является важным условием контроля уровня патологических В-лимфоцитов на фоне хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) и что активация НК синергетически увеличивает эффекты ритуксимаба на численность этих клеток [329]. Роль АЗКЦ в механизме действия ритуксимаба продемонстрирована также в других экспериментальных исследованиях *in vitro* [187,276,298,312,375]. Приведенные данные позволяют утверждать, что АЗКЦ также, несомненно, является, одним из ключевых механизмов уничтожения опухолевых клеток препаратом ритуксимаб.

В одном из исследований для оценки эффектов ритуксимаба использовались биоптаты опухоли пациентов с ХЛЛ (n=33), лимфомы из клеток мантии (n=16), фолликулярной лимфомы (n=4) и волосатоклеточного лейкоза (n=2). На фоне инкубирования биоптатов с ингибитором каспаз широкого спектра действия ритуксимаб продемонстрировал способность индуцировать апоптоз клеток посредством каспаза-независимого механизма, но с участием свободнорадикальных форм кислорода [275].

Целью экспериментов Zhang Н.У. и соавторов являлось исследование эффектов некоторых анти-CD20 моноклональных антител на индукцию апоптоза злокачественных В-клеток *in vitro* и выяснения его механизма. Эксперименты проводились на культурах клеток лимфомы Беркитта линий Daudi, Namalwa, Raji и Ramos. Уровень апоптоза оценивался методом проточной цитометрии. Экспрессию протеина bcl-2 в клетках экспериментальных линий после инкубирования с ритуксимабом в дозе 20 мкг/мл в течение 24 ч анализировали методом Western blot. Так, в ходе исследования было установлено, что ритуксимаб в качестве монокомпонента лишь незначительно индуцировал апоптоз клеток всех четырех линий. Экспрессия протеина bcl-2 снижалась в клетках линий Namalwa и Raji после 24-часового инкубирования с ритуксимабом. Исследователи заключили, что мономеры анти-CD20 антител слабо дозо- и время-независимо индуцируют апоптоз клеток всех четырех тестируемых линий.

Снижение экспрессии bcl-2 может быть одним из механизмов увеличения цитотоксичности химиотерапевтических агентов в случае их комбинирования с моноклональными антителами [327].

Целью исследования Ziółkowska E. и соавторов являлось сравнение эффектов *in vitro* различных типов сыворотки на жизнеспособность трансформированных клеток ХЛЛ в условиях спонтанного или ритуксимаб-индуцированного апоптоза. Зарегистрированное в рамках эксперимента увеличение цитотоксичности ритуксимаба в присутствии аутологической сыворотки указывает на то, что ритуксимаб действует на клетки ХЛЛ посредством реализации АЗКЦ, а также каспаз-зависимого апоптозного пути и возможно, посредством влияния на другие экстраклеточные факторы, присутствующие в сыворотки крови пациентов [364].

Выше упоминалось об исследовании Zhang H., целью которого являлось исследование эффектов терапевтических анти-CD20 антител *in vitro* в культурах клеток лимфомы Беркитта линий Daudi, Namalwa, Raji и Ramos. В ходе исследования было установлено, что ритуксимаб оказывает слабый антипролиферативный эффект на клетки линий Daudi, Namalwa, Raji и не оказывает влияния на клетки Ramos. Корреляции между интенсивностью ответов и концентрацией ритуксимаба не прослеживалось. Степень ингибирования пролиферации клеток варьировала в диапазоне 3-10%.

В своем исследовании Mattila A. и Meri S. на двух типах культур клеток фолликулярной лимфомы, отличающихся стадией созревания, установили, что ритуксимаб оказывает различное влияние на клетки фолликулярной лимфомы (HF-1 и HF-4b) в зависимости от степени их зрелости. Линия HF-1 представляет собой centroциты герминального центра лимфомы, а HF-4b – центробласты. Обе клеточные линии отвечали на инкубирование с ритуксимабом активацией апоптоза. Однако клетки линии HF-1 были более чувствительны к действию антитела. Главное различие в эффектах ритуксимаба на эти популяции опухолевых клеток заключалось в пролиферативном ответе, ритуксимаб вызывал

ингибирование пролиферации только в культуре HF-1. В присутствии нормальной сыворотки крови человека ритуксимаб полностью ингибировал синтез ДНК и индуцировал некроз клеток обеих линий посредством комплемент-зависимой цитотоксичности. Исследователи пришли к выводу, что CD20-позитивные клетки фолликулярной лимфомы HF-1 и HF-4b реагируют на ритуксимаб-индуцированный апоптоз и ингибирование пролиферации по-разному, но одинаково чувствительны к воздействию по механизму КЗЦ. Увеличение чувствительности клеток HF-1 к апоптозу и ингибирование пролиферации может отражать тенденцию centroцитов фолликулярной лимфомы к CD20-негативной селекции и значение CD20 в этом процессе, что может явиться предпосылкой для развития резистентности [297].

Несмотря на то, что уже при однократном введении ритуксимаба происходит практически полная деплеция популяции CD20-положительных В-лимфоцитов из периферической крови, тем не менее, во вторичных лимфоидных органах/тканях остается некоторая популяция клеток данного типа. Kamburova E.G. и соавторы провели исследования *in vitro* с целью анализа эффектов ритуксимаба на пролиферацию, активацию и дифференцировку CD19-положительных В-клеток с использованием метода проточной цитометрии. Так, ритуксимаб ингибировал пролиферацию CD27-негативных наивных, но не CD27-положительных В-клеток памяти. При этом на фоне анти-CD40 моноклонального антитела, IL-21 и ритуксимаба отмечалось увеличение популяции В-клеток, которые подвергались 1-2 клеточным делениям и демонстрировали наивный фенотип CD27(-)IgD(+) CD38(-/+). Способность предварительно стимулированных В-лимфоцитов (анти-CD40 антителом и IL-21) индуцировать пролиферацию Т-клеток увеличивалась на фоне обработки В-лимфоцитов ритуксимабом. При этом пролиферирующие Т-клетки более очевидно демонстрировали Th2-подобный фенотип. Таким образом, показано, что ритуксимаб может изменять не только пролиферацию В-клеток, но и их фенотип, а также их функции, приводя в последствии к изменению межклеточных иммунных взаимодействий В- и Т-лимфоцитов [276].

Изученные и описанные основные механизмы действия ритуксимаба, приводящие к снижению популяции CD20-положительных В-лимфоцитов, использованы при разработке методов исследования этих механизмов в системах *in vitro*. Описанные механизмы актуальны и в клинических условиях, о чем свидетельствуют результаты доклинических исследований. Дальнейшее развитие современных методов исследований *in vitro* позволит дать ответы на существующие вопросы, а также предаст импульс созданию новых эффективных биологически аналогичных препаратов.

1.5. Методы подтверждения эквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов

1.5.1. Испытания биодоступности лекарственных препаратов без проведения клинических исследований. Процедура «биоверификация»

В настоящее время в России зарегистрировано более 18 тысяч лекарственных препаратов различных фирм-производителей, при этом номенклатура лекарственных средств включает в себя не более 2 тысяч наименований действующих веществ. Это свидетельствует о том, что подавляющую часть фармацевтического рынка России занимают воспроизведенные ЛС [30].

Для предварительной оценки относительной биодоступности генериков в настоящее время большое значение приобрели испытания *in vitro*, в том числе широко известный тест «Растворение» [23,170,182,238,249].

На текущий момент тест «Растворение» включен практически во все нормативные документы (НД) на твердые дозированные лекарственные формы и является фармакопейным [26,39,48,111].

Испытание «Растворение» является как технологическим, так и биофармацевтическим методом определения качества лекарственных препаратов, отражающим скорость высвобождения фармацевтической субстанции из

лекарственной формы и переход ее в раствор, что в некоторой степени имитирует поведение лекарственной формы в условиях желудочно-кишечного тракта человека [17].

Кроме того, данный тест широко используется для проведения сравнительных исследований лекарственных препаратов *in vitro* с целью уменьшения исследований *in vivo*. Цель СТКР заключается в подтверждении эквивалентности профиля кинетики растворения фармацевтической субстанции исследуемого препарата по отношению к препарату сравнения, как правило референтному, в условиях, близких к физиологическим условиям желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [225,230,314].

Взаимосвязь между растворением и биодоступностью

Безопасность и эффективность ЛП напрямую зависят от его качества. Взаимосвязь между растворением и биодоступностью (БД) является одним из примеров такой тесной связи. БД действующего вещества после приема внутрь твердой лекарственной формы зависит от распадаемости лекарственной формы, высвобождения действующего вещества АФС из лекарственного препарата, ее растворения (солюбилизации) в физиологических условиях, проникновения через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта (всасывание субстанции).

В настоящее время FDA, ВОЗ и ЕМА принята предложенная G.L.Amidon с соавторами в 1995 г. [171] биофармацевтическая классификационная система АФС как один из инструментов замены изучения биодоступности какого-либо вещества на *in vitro* тест [250]. БКС – это система научной классификации АФС по их важнейшим биофармацевтическим свойствам: растворимости в водных растворах и степени проницаемости через биомембраны, т.е. абсорбции в ЖКТ. В соответствии с этими свойствами все АФС разделены на четыре класса, примеры представлены в таблице 1.2 [338]:

I – высокая растворимость, высокая проницаемость;

II – низкая растворимость, высокая проницаемость;

III – высокая растворимость, низкая проницаемость;

IV – низкая растворимость, низкая проницаемость.

Таблица 1.2 - Система биофармацевтической классификации

<p style="text-align: center;">Класс I</p> <p>Высокая степень растворимости Высокая степень проницаемости <i>Парацетамол, амлодипин</i></p>	<p style="text-align: center;">Класс II</p> <p>Низкая степень растворимости Высокая степень проницаемости <i>Ибупрофен, верапамил, хлормадинон</i></p>
<p style="text-align: center;">Класс III</p> <p>Высокая степень растворимости Низкая степень проницаемости <i>Циметидин, атенолол, мексидол</i></p>	<p style="text-align: center;">Класс IV</p> <p>Низкая степень растворимости Низкая степень проницаемости <i>Фуросемид, гидрохлортиазид, этинилэстрадиол, изотретиноин</i></p>

БКС преследует несколько целей: идентификацию ограничивающих скорость стадий, лимитирующих скорость абсорбции, для биофармацевтически проблемных соединений; а также определение класса ФС в лекарственной форме (ЛФ) с немедленным высвобождением, для которой биоэквивалентность может быть оценена *in vitro* [196]. Для определения факторов, ограничивающих всасывание АФС в организме, выделены три основных параметра: время растворения, эффективная кишечная проницаемость и абсорбируемая доза [207].

Место сравнительного теста кинетики растворения на этапах «жизненного цикла» лекарственного препарата за рубежом

Возможность замены исследования БЭ на СТКР зависит от определенных условий. Это должна быть твердая ЛФ с немедленным высвобождением системного действия [140]. АФС должна обладать широким терапевтическим индексом, относиться к I, II или III классу по БКС (таблица 1.3). Вспомогательные

вещества, входящие в состав исследуемых ЛП, не должны влиять на проницаемость АФС при проведении испытаний.

Учитываются и свойства ЛП. В зависимости от скорости высвобождения АФС из ЛП последние делятся на быстрорастворимые и медленно растворимые (по FDA [252]) или очень быстрорастворимые, быстрорастворимые и остальные (по ВОЗ [255]). ЛП считается очень быстрорастворимым, если не менее 85% активной субстанции переходит в среду растворения за 15 мин при испытании на лопастной мешалке (ЛМ) (75 об/мин) или вращающейся корзинке (ВК) (100 об/мин) в каждом из буферных растворов с рН 6,8; 4,5 и 1,2, объемом 900 мл. ЛП считается быстрорастворимым, если в этих же условиях не менее 85% ФС переходит в среду растворения уже за 30 мин.

Рекомендательные документы ВОЗ, FDA, ЕМА содержат ряд одинаковых положений: гармонизированные монографии по растворению; использование одинаковых аппаратов (ВК и/или ЛМ); допустимость процедуры «биоэквивалентности» для ЛП с АФС I класса; особые требования к АФС с узким терапевтическим индексом; расчет коэффициента подобия как критерия подобия профилей растворения; совпадение одной среды растворения; тестирование 12 единиц ЛП [285].

В то же время в документах имеются некоторые различия. Так, в соответствии с научным руководством FDA для того, чтобы ЛП был зарегистрирован по процедуре «биоэквивалентности», он должен: содержать АФС только I класса; быть «быстрорастворимым», не абсорбироваться в ротовой полости [285]. В настоящее время документ находится на пересмотре для включения ФС III класса.

Требования ВОЗ мягче, чем требования FDA, и допускают регистрацию ЛП, содержащих не только АФС I, но и других классов по БКС. Если ЛП содержит АФС I класса, он должен быть быстро- или очень быстрорастворимым, как и препарат сравнения. В то же время очень быстрое растворение не обязательно гарантирует биоэквивалентность их ЛП, авторы считают, что требование «быстрое растворение» и подобие профилей растворения являются достаточным критерием.

Если ЛП содержит АФС II класса, то субстанция должна обладать слабокислыми свойствами, иметь высокую растворимость только при значении рН 6,8; ЛП должен быть быстрорастворимым, а профиль его растворения - подобен профилю растворения препарата сравнения в трех средах [136,137,162,202,381].

В случае если ЛП содержит ФС III класса, то он должен быть очень быстрорастворимым; профиль его растворения - быть подобен профилю растворения препарата сравнения в трех средах; отношения риск – польза должны быть дополнительно подтверждены с точки зрения степени, места и механизма абсорбции [192]. Для ЛП с АФС IV класса необходимо определять биоэквивалентность только *in vivo* [255].

В 2010 г. ЕМА утвердило документ, регламентирующий проведение процедуры «биоверификация» и допускающий ее для ЛП с АФС I и III класса БКС [352]. Среда растворения аналогична указанной в документе ВОЗ. Составы буферов должны соответствовать Европейской Фармакопее. Дополнительно можно проводить исследования при значении рН, при котором субстанция имеет минимальную растворимость. Необходимо подтверждение неизменности гранулометрического состава и полиморфного состояния субстанций исследуемого ЛП и препарата сравнения [285].

Документы по процедуре «биоверификация» в Японии предназначены для генериков. Основное их отличие в том, что БКС не признается, т. к. считается, что причинами бионеэквивалентности пероральных ЛП являются не проницаемость и растворимость ФС, а различия в ЛФ и/или производственных процессах. Процедура «биоверификация» может применяться для АФС любого класса, разрешена для ЛП с модифицированным высвобождением [285].

В Швеции одобрена процедура «биоверификация» для ЛП, содержащих ибупрофен, парацетамол, преднизолон [210]. В Канаде опубликован для обсуждения проект документа по процедуре «биоверификация», допускающий ее для ЛП, содержащих ФС I и III классов [242].

В зарубежных странах (в странах Европейского Союза, в Соединенных Штатах Америки) БКС является базовой предпосылкой для проведения СТКР [238,252,314,365].

СТКР проводится в следующих целях (в странах ЕС, США):

- при государственной регистрации воспроизведенного лекарственного препарата: для подтверждения сопоставимости профиля растворения воспроизведенного лекарственного препарата и препарата сравнения. Биовейвер применим для ЛП с широким терапевтическим индексом, относящимся к I, II или III классу по БКС.

- при государственной регистрации дополнительных дозировок воспроизведенного лекарственного препарата, не изученных в исследовании биоэквивалентности *in vivo*, в качестве замены такого исследования на испытание *in vitro*;

- при изменении состава вспомогательных веществ (в случае изменения до 5% проводится тест «Растворение» по НД, в случае изменения 5-10 % СТКР лекарственного препарата, подвергшегося изменению, с лекарственным препаратом до такого изменения и в случае изменения более 10% - исследование БЭ).

- при изменении технологии производства, оборудования: для подтверждения сопоставимости профиля растворения лекарственного препарата, подвергшегося изменению, с лекарственным препаратом до такого изменения [165].

В обобщенном виде, регистрационное применение СТКР в США и странах ЕС представлено в таблице 1.3.

Таблица 1.3 - Применение СТКР в зависимости от регистрационных целей

Регистрационная цель	США	ЕС
СТКР как дополнение исследования биоэквивалентности <i>in vivo</i> при государственной регистрации	Допускается проведение СТКР в фармакопейных условиях растворения, описанных в USP или в условиях, рекомендованных	В целях определения эквивалентности профилей растворения серии исследуемого лекарственного препарата, изученного в

воспроизведенных лекарственных препаратов.	FDA.	исследовании биоэквивалентности <i>in vivo</i> , и препарата сравнения, СТКР проводят в трех средах растворения с рН 1,2; 4,5; 6,8 (которые соответствуют крайним физиологическим значениям рН в средах желудка и тонкой кишки); а также в среде для контроля качества (фармакопейной среде растворения).
СТКР как замена исследования биоэквивалентности <i>in vivo</i> (биовейвер) для дополнительных дозировок ЛП с широким терапевтическим индексом, относящимся к I, II или III классу по БКС.	В рамках биовейвера допускается представить профиль растворения в одной среде растворения, если были разработаны соответствующие условия растворения, а результаты испытания подтверждают, что растворение препарата не зависит от дозировки ЛП.	В отношении дополнительных дозировок, не изученных в исследовании биоэквивалентности <i>in vivo</i> , следует представить научное обоснование отсутствия необходимости проведения исследования биоэквивалентности <i>in vivo</i> и профили кинетики растворения (высвобождения фармацевтической субстанции из лекарственной формы в раствор) дополнительных дозировок, профиль растворения которых должен быть подобен профилю растворения серии ЛП, для которого была подтверждена биоэквивалентность <i>in vivo</i> (профили растворения должны быть подобны в не менее чем в трех средах растворения в диапазоне значений рН 1,2–6,8 (рекомендуемые среды: буферы с рН 1,2; 4,5; 6,8))
СТКР при внесении изменений в состав вспомогательных веществ, технологию производства, оборудования	В зависимости от степени (уровня) пострегистрационных изменений, производитель должен провести различный объем исследований, который подробно описан в соответствующем	В зависимости от степени изменений, необходимо представить результаты СТКР в условиях, описанных в Руководстве по БЭ. При значимых изменениях (изменение II типа, которое может оказать значимое

	<p>руководстве. Выделяют три степени изменений: для изменений 1 или 2 уровня может быть достаточно проведения испытания «Растворение» (т.е. испытание в рамках НД препарата), СТКР (без проведения исследования БЭ), для изменений места производства 3 степени может быть достаточно СТКР (без проведения исследования БЭ), для всех других изменений 3 степени необходимо проведение СТКР и исследования БЭ.</p>	<p>влияние на качество, безопасность или эффективность рассматриваемого лекарственного препарата) требуется представление обоснования отсутствия необходимости проведения исследования БЭ in vivo или проведение нового исследования. Алгоритм по категории изменений и четкие требования к объему предоставляемых данных отсутствуют.</p>
--	--	--

Регуляторные аспекты и возможности применения сравнительного теста кинетики растворения в качестве процедуры «биоэквивалентности» в России

В Российской Федерации существует ряд документов, регулирующих проведение СТКР. Самым новым из них является «Руководство по экспертизе лекарственных средств» за авторством ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России [119]. Данный документ описывает требования, предъявляемые к проведению СТКР, обработке его результатов и структуре отчётов. Существуют также методические указания «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств», приложение 4, 2008 г. [72], и документ рекомендательного характера Росздравнадзора «Методические рекомендации для разработчиков и производителей лекарственных средств по оценке эквивалентности in vitro дженерических лекарственных средств согласно процедуре «биоэквивалентности» [71]. На данную область исследований также распространяется действие нового документа (проект), разработанного в 2015 году, «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза» [103].

Главной национальной программой в области фармации на сегодняшний день является «Стратегия развития фармацевтической промышленности РФ на период до 2020 года», цель которой - переход на инновационную модель развития российской фармацевтической промышленности. Большое значение в реализации данной программы придается разработке новых оригинальных и воспроизведенных лекарственных средств отечественного производства. Согласно законодательству Российской Федерации для подтверждения эффективности и безопасности ВЛП, необходимо проведение либо сравнительных клинических исследований, либо сравнительных фармакокинетических исследований (исследований биоэквивалентности), проводимых на здоровых добровольцах. Достоинством таких исследований является их высокая информативность, однако они обладают и рядом значительных недостатков: этические сложности, поскольку они требуют вовлечения здоровых добровольцев, а в некоторых случаях - пациентов (онкологические и некоторые другие ЛС), длительность и высокая стоимость. В связи с этим, как уже упоминалось выше, большинством ведущих регуляторных агентств мира по здравоохранению (FDA, ВОЗ, ЕМА) была утверждена процедура упрощенной государственной регистрации ЛС - «биоверификация», которая позволяет в некоторых случаях оценить взаимозаменяемость воспроизведенного ЛС и препарата сравнения на основании их биофармацевтических свойств и профилей растворения *in vitro*, отражающих физиологический состав сред разных отделов ЖКТ. При этом общепризнанными объектами исследования кинетики растворения по процедуре «биоверификация» являются ЛС I класса биофармацевтической классификационной системы.

Фактически, процедура «биоверификация» является ключевым трендом биофармации последнего десятилетия. Подтверждением этому может служить тот факт, что она принята на государственном уровне в США и Европейском Союзе, создание Международной Фармацевтической Федерацией (PIF) специальной группы по биофармацевтической классификационной системе и процедуре «биоверификация», а также существование сотен публикаций в ведущих зарубежных и

российских рецензируемых фармацевтических журналах. Данная процедура успешно зарекомендовала себя в реальной регуляторной практике.

В России на данный момент процедура не принята на государственном уровне, однако активно внедряется среди разработчиков воспроизведенных лекарственных средств с целью выбора и обоснования состава при создании новых лекарственных препаратов. Сфера регистрационного применения СТКР в России пока заключается в регистрации воспроизведенного ЛП в дополнение к исследованию БЭ для основной дозировки или без проведения исследования БЭ для ЛП с широким терапевтическим индексом, относящимся к I, II или III классу по БКС, СТКР может служить также в качестве замены исследования БЭ для дополнительных дозировок воспроизведенного ЛП или замены исследования БЭ при изменении состава вспомогательных веществ. Тем не менее, разработка стандартных методик и изучение биофармацевтических свойств наиболее актуальных препаратов из I класса БКС является важной научно-практической задачей для фармации.

1.5.2. Исследования биоэквивалентности как один из основных видов контроля воспроизведенных лекарственных препаратов

Одним из критериев взаимозаменяемости ЛП является БЭ воспроизведенного препарата референтному. Несмотря на то, что в большинстве случаев исследование БЭ является рутинным, тем не менее, при правильном планировании оно позволяет получить валидные данные и снизить расходы на разработку воспроизведенного препарата. Предварительное генотипирование добровольцев является одним из инструментов, позволяющих это осуществить.

Очевидно, что безопасность ЛС зависит от индивидуальных особенностей организма, что требует персонализированного подхода. Подобный адресный подход, лежащий в основе персонализированной медицины, позволит не только повысить безопасность медикаментозного лечения, но и сократить расходы на

коррекцию нежелательных реакций. Персональный подбор ЛС и выбор дозы достигается методами генотипирования и фенотипирования, с помощью которых становится возможным определить индивидуальные особенности пациента.

Для предварительной оценки эффективности включения добровольцев/пациентов в исследования биоэквивалентности и возможности снизить размер выборки крайне необходимо проведение исследований, которые могут предопределить активность метаболизма ЛС каждого конкретного здорового добровольца/пациента.

Несмотря на то, что направление по изучению метаболизма считают зрелым, достижения науки и техники двигают вперед исследования по данной тематике. Фармацевтическая индустрия стимулирует к развитию большинство направлений современных технологических разработок, в т.ч. высокоразвитые аналитические инструменты.

Определение биоэквивалентности может быть затруднительным для некоторых препаратов, таких как лекарственные формы с замедленным высвобождением, и требует высокой точности для других, таких как антикоагулянты и противосудорожные препараты, которые характеризуются высоким углом наклона кривой зависимости эффекта от дозы и/или низким терапевтическим индексом.

При оценке биоэквивалентности специалисты по оценке должны учитывать вероятность того, что биодоступность существующего препарата (сравнения) может быть недостаточной. Если у нового препарата площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени больше, чем у препарата сравнения, это может быть обусловлено использованием в новом препарате других технологий (например, стимуляторов всасывания) или низким качеством препарата сравнения. Для достижения взаимозаменяемости в последнем случае НРО может либо аннулировать регистрационное удостоверение препарата сравнения, либо потребовать, чтобы кривая зависимости концентрации в плазме от времени для воспроизведенного препарата была идентична кривой препарата сравнения. Как

правило, решение принимается в пользу препарата сравнения, если он не является препаратом явно низкого качества.

Следует отметить, что более быстрое всасывание при сохранении одинаковой площади под кривой не обязательно означает более высокое качество препарата. Например, было продемонстрировано, что быстрое всасывание карбамазепина и нифедипина приводит к нежелательным явлениям, по меньшей мере, у некоторых пациентов [215,271].

Эти рекомендации не заменяют тщательного и основанного на имеющейся информации рассмотрения каждого случая с предварительным полноценным обзором литературы и консультациями соответствующих специалистов [76].

Если при оценке заявки для нового препарата НРО намерен полагаться на отчет или решение, принятое другим агентством, следует рассмотреть вопрос о взаимозаменяемости с подходящим препаратом сравнения на местном рынке. Таким образом, даже если взаимозаменяемость может быть подтверждена на основании предоставленного другим агентством отчета или сертификата установленного ВОЗ образца, местный (для каждого рынка) НРО должен выполнить повторное рассмотрение, поскольку препарат сравнения может отличаться. Если заявитель может убедительно продемонстрировать НРО, что препарат сравнения является идентичным в обеих странах, это может служить достаточной гарантией биоэквивалентности. Если препараты похожи, но не идентичны, заявитель должен предоставить аргументы и/или данные, подтверждающие взаимозаменяемость с местным препаратом сравнения.

В настоящее время оценка биоэквивалентности лекарственных средств, считается основным видом медико-биологического контроля качества препаратов, принятого для стран европейского сообщества, США и др. [82].

Однако данные биоэквивалентности существуют (как оказалось) не для всех генериков, а если они и существуют, то не являются доступными. Кроме того, понятие биоэквивалентности - достаточно условное, ее критерии нередко меняются, в настоящее время они отличаются в разных странах. Но даже при

доказанной биоэквивалентности, как упоминалось выше, если значения биоэквивалентности смещены к крайним значениям, существует реальная возможность различий в содержании препарата при использовании генерика, а значит и различий в эффективности [105]. Отсутствие достаточного количества сотрудников, обладающих необходимой квалификацией для выполнения функций, которые были установлены правительством.

Вследствие названных выше причин можно утверждать, что далеко не все присутствующие на рынке генерики обладают терапевтической эквивалентностью с оригинальными препаратами. Ситуация утяжеляется дефицитом высококвалифицированных кадров в отечественной фармацевтической отрасли. Публикуемые в последнее время данные исследований биоэквивалентности нередко вызывают целый ряд вопросов относительно достоверности представляемых в них результатов, причем это относится практически к препаратам всех фармакологических групп.

Современное состояние уровня фармакокинетических исследований во многом основывается на применении самых совершенных методов определения концентраций лекарственных препаратов в биологических объектах. Правильный выбор метода определения концентрации во многом определяет успешное решение всей задачи исследования. Для определения концентрации действующего вещества в плазме, сыворотке или цельной крови могут быть использованы различные микробиологические, спектрофотометрические, поляриметрические, иммунологические (радиоиммунные, иммуноэнзимные и др.), радиоизотопные, хроматографические и др. методы, отвечающие современным требованиям: избирательность, высокая чувствительность, точность, воспроизводимость. Все названные методы достаточно хорошо описаны в мировой литературе и широко применяются при проведении фармакокинетических исследований. Безусловно, каждый метод определения концентрации обладает определенными достоинствами и недостатками.

Целесообразно использовать те методы определения концентрации лекарственных средств, которые были применены создателями при описании кинетических параметров референтного ЛС и опубликованы в соответствующей литературе. Если предлагается другая методика, необходимо обосновать ее применение и представить метрологические характеристики.

Очень часто выбор метода анализа ЛП зависит от наличия той или иной аппаратуры в распоряжении исследователя. Требования, предъявляемые к выбираемому методу анализа можно сформулировать следующим образом: метод анализа должен быть чувствительным для получения надежных результатов, воспроизводимым, дешевым и достаточно экспрессным. Процесс подготовки проб для анализа не должен занимать много времени и должен быть относительно простым и воспроизводимым. Метод анализа должен обладать большой производительностью, так как в большинстве случаев идет речь о проведении сотен единичных анализов за короткое время. Определившись с вышеназванными требованиями, исследователь, исходя из химической структуры, выбирает оптимальный вариант из уже имеющихся, либо разрабатывает и валидирует свою методику.

Развитие новых доступных и точных аналитических методик, применяемых в исследованиях биоэквивалентности, является важной задачей в аспекте контроля качества воспроизведенных ЛП. Так, например, в настоящее время имеется потребность в разработке новых аналитических методик количественного определения действующих веществ комбинированных оральных контрацептивов (КОК), обладающих высокой селективностью и дающих возможность одновременного определения эстрогенного и гестагенного компонентов, поскольку используемые методы не отвечают требованиям специфичности и не позволяют с необходимой точностью контролировать содержание эстрогена и гестагена в подобных лекарственных средствах [184].

1.5.3. Влияние фармакогенетики и фармакогеномики на безопасность и эффективность воспроизведенных лекарственных препаратов

Завершение первого проекта, посвященного геному человека, подняло огромную волну ожиданий, связанных не только с определением генетической предрасположенности к заболеваниям, но и с усовершенствованием лекарственной терапии путем разработки и применения индивидуализированных препаратов. Это направление, называемое фармакогенетикой (или фармакогеномикой), модное сейчас, обещает принести пользу как фармацевтической промышленности, так и больным. Есть, однако, множество препятствий (в регулировании, технологических, социальных и этических), которые нужно преодолеть, чтобы достичь этого (если это вообще удастся) [325]. Целью данной главы является критический обзор этой области и возможной пользы от нее.

Фармакогенетику можно определить как исследование изменчивости реакций на ЛП благодаря наследственности. Этот термин не нов, его придумал Фогель в 1957 г [373]. Позднее был введен также термин фармакогеномика. Поскольку стандартного определения нет, часто используются оба слова. Однако в этой главе используется термин фармакогеномика более широко, понимая под этим:

- все гены организма и вариации в них, которые могут определять чувствительность к лекарственным средствам;
- дифференцированное влияние различных соединений на экспрессию генов.

Следовательно, фармакогеномика путем изучения индивидуальных профилей отклика и поиска различий во влиянии разных веществ на экспрессию генов может в конце концов привести к идентификации мишени, открытию лекарственного средства и выбору подходящего вещества. В работе Lindpaintner выдвинуто предположение, что термин «фармакогенетика» следует использовать, говоря о

различиях между больными, а «фармакогеномика» - о различиях между веществами [293].

Роль фармакогеномики в разработке лекарственных средств

Весь процесс разработки ЛС чрезвычайно дорог. Промышленные источники дают цифры затрат в ряде случаев до 500 млн. евро на каждый выпущенный на рынок препарат [206,207,362], хотя другие полагают, что цифра намного ниже [265,340]. На это уходит много времени, каждому препарату нужно примерно 10-15 лет после открытия соединения, чтобы попасть на рынок [362].

Кроме того, очень велик отсев: лишь одно из каждых 5000 химических соединений, у которых предполагается наличие лекарственных свойств, в итоге достигает клиники. В последние пять лет число новых заявок, поданных на регистрацию, почти ежегодно снижается. Например, Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств в США зарегистрировало в 2002 г. лишь 15 новых лекарственных средств, в то время как средняя цифра за пять лет составляет 31. В Европе это не так выражено - Европейское агентство по оценке продуктов медицинского назначения в 2002 г. зарегистрировало 13 новых продуктов, а в 2001 г. - 14 (средняя цифра за 5 лет составляет 15,4) [240]. Тем не менее, данные, представленные Центром по исследованиям в области лекарственных средств, который финансируется промышленностью [180], предполагают, что с 1997 по 2001 г. число активных веществ, представленных на регистрацию, неуклонно снижалось, так же как и число зарегистрированных между 1999 и 2001 гг. Использование фармакогеномики при разработке лекарственных средств может улучшить процесс поиска лекарственных мишеней, ускорить процесс разработки и снизить процент отсева.

И для фармацевтической промышленности, и для здравоохранения трудности не заканчиваются с выпуском препарата на рынок. Становится все яснее, что отдельные люди очень по-разному реагируют на лекарственные средства - и в том, что касается их действенности, и в том, что касается токсичности [230]. Например, доза варфарина, дающая оптимальный антикоагулянтный эффект, у разных

больных различается в 20 раз. Явная изменчивость в действенности найдена почти для всех классов соединений. Большую проблему представляют также побочные реакции [324]: почти 4% соединений, получивших вначале лицензию Агентства по контролю за лекарственными средствами в Великобритании, позднее были ее лишены из-за своей недостаточной безопасности [308], что имеет огромные финансовые последствия для промышленности и подрывает доверие общества к лекарственным средствам. Сходную картину дают цифры Европейского агентства по оценке продуктов медицинского назначения - 16 отзывов регистраций из общего числа 241 регистрация с 1995 г. (ЕМЕА, 2003). Побочные реакции являются причиной 5% госпитализаций и на два дня увеличивают среднюю продолжительность пребывания в больнице, что означает примерно на 2500 долл. США дополнительных затрат на одного больного [176]. Проведенный в США метаанализ предполагает, что побочные реакции ЛС в 1994 г. стали причиной смерти свыше 100 000 больных, что делает их четвертой по распространенности причиной смерти [288]. В недавнем систематическом обзоре сделана попытка количественно оценить роль полиморфизма в генах, кодирующих ферменты, ответственные за метаболизм лекарственных веществ, в предрасположенности к побочным реакциям на эти вещества [326]. Из 27 препаратов, чаще всего упоминаемых в связи с побочными реакциями, у 59% по крайней мере один фермент, участвовавший в метаболизме, мог кодироваться вариантной аллелью, связанной со сниженной активностью; для случайно выбранных лекарственных веществ это составляло 7-22%. Это косвенно свидетельствует, что изменение дозы в зависимости от генотипа больного может предотвратить часть таких побочных реакций. Однако важно заметить, что модель данного исследования (связывающая опубликованные исследования по побочным реакциям лекарственных веществ с обзорами, посвященными полиморфизму генов, кодирующих ферменты, превращающие лекарственные вещества) не является независимой и необязательно устанавливает причинно-следственные связи. Более того, исследование не

учитывает, что побочные реакции на лекарственные средства скорее всего имеют причиной более одного генетического предрасполагающего фактора.

Трудно оценить предположительную экономию от снижения токсичности или увеличения действенности ЛС, поскольку практических примеров сравнительно мало, и данные редко основаны на клинической практике. Вдобавок побочные реакции и действенность ЛС всегда определяются как генетическими, так и не связанными с генетикой факторами. Тем не менее польза и для здоровья, и экономическая может быть немалой. Однако лечебное вмешательство, основанное на генетических особенностях конкретного больного, будет применимо не ко всем препаратам, и в каждом отдельном случае потребуются тщательная оценка экономической эффективности [326, 371].

Таким образом, внедрение фармакогенетики в клиническую практику способно увеличить действенность и снизить токсичность, дав возможность выбирать нужный препарат в нужной дозе для нужного больного при лечении нужного заболевания. Это означает также изменение стиля действий в клинической практике: в настоящее время научно обоснованная медицина опирается на данные контролируемых испытаний и метаанализа, и выбор подходящего лечения диктуется анализом всего населения. Следовательно, успешное внедрение фармакогенетики приведет к тому, что при выборе препарата больше будет учитываться отдельный человек, а не все население.

Из трех миллиардов пар оснований человеческого генома 99,9% у всех людей одинаковы. Причиной изменчивости в реакциях на лекарственные вещества, как полагают, является изменчивость 0,1% генома. 90% этой изменчивости составляют точечные нуклеотидные замены, которые встречаются с частотой одна на каждые 500-1000 пар оснований. Фармакогенетика в значительной степени сосредоточена на точечных заменах, не только потому, что это самый распространенный случай, но и потому, что с технической точки зрения это самый доступный класс генетических вариаций [339]. По определению, данную точечную замену можно обнаружить по крайней мере у 1% населения, и те из них, которые картированы,

свободно доступны в интернете. Сочетания точечных замен на одной цепи ДНК могут наследоваться вместе, образуя гаплотип. Высказывались предположения, что в определении реакции на лекарственные средства и предрасположенности к заболеваниям важнее гаплотип, чем отдельные замены. Поэтому в настоящее время прилагаются усилия картировать гаплотипы человеческого генома, результаты должны будут находиться во всеобщем доступе на специализированных ресурсах. Глядя дальше в будущее, используя полное сканирование генома, можно будет объективно коррелировать профили точечных замен и гаплотипов с реакцией на лекарственные вещества, но для этого нужно разработать эффективные и недорогие технологии.

В технологиях фармакогеномики также есть существенные успехи, к примеру микрочипы (генные чипы) и протеомика (систематическое изучение экспрессии белков во всем организме). ЛВ могут сильно влиять на гены и на экспрессию белка, что в конечном счете может определять чувствительность к ЛС. Способность анализировать изменения в экспрессии гена и белковом профиле в ответ на воздействие ЛВ в различных тканях и у различных больных, так же как анализ и выявление категорий заболевания в сочетании с успехами биоинформатики, даст нам не имеющие себе равных возможности идентифицировать новые лекарственные мишени, новые гены, возможно, определяющие реакцию на лекарственные средства, и позволит разрабатывать препараты, нацеленные на лечение индивидуальных разновидностей заболевания. Поэтому такие технологии и разработки предвещают важные изменения в будущем для фармацевтических компаний, организаций здравоохранения и больных.

Фармакогеномика и фармакогенетика могли бы оказать благотворное воздействие на все аспекты процесса разработки ЛС (рис. 1.4). Они подробно рассмотрены ниже.

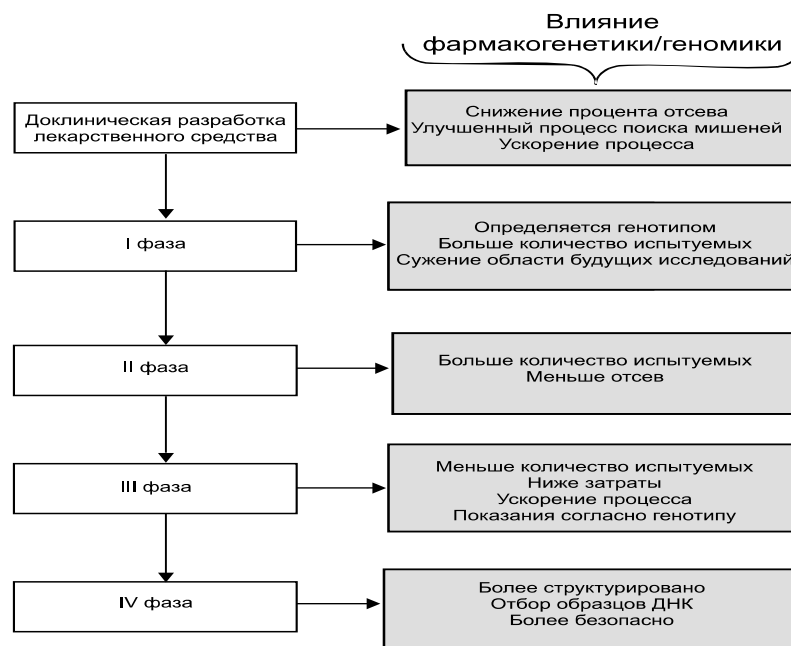


Рис. 1.4 - Возможное влияние фармакогенетики на разработку лекарственных средств

Фармакогенетика уже повлияла на доклиническую стадию разработки ЛС; можно утверждать, что пока это главная польза от нее. Уже много лет известно, что люди отличаются по своей способности метаболизировать определенные ЛВ. Установление молекулярных дефектов, лежащих в основе фенотипической изменчивости, привело к развитию методов диагностики *in vitro*. Например, значительным успехом стало создание клеточных линий, экспрессирующих ферменты, ответственные за метаболизм ЛС, такие как цитохромы Р450 [291,313,321]. Среди десятков изоферментов цитохрома Р450, которые участвуют в биотрансформации ксенобиотиков, изофермент СУР2D6 является одним из наиболее важных ферментов, осуществляющих метаболизм ЛС [257,260,266,273,282]. По данным различных исследований СУР2D6 участвует в метаболизме от 15 до 25 % лекарств. Так, например, скорость метаболизма небиволола путем ароматического гидроксирования генетически определена окислительным полиморфизмом и зависит от СУР2D6. У лиц с быстрым метаболизмом $T_{1/2}$ небиволола из плазмы составляет в среднем 10 ч, у лиц с медленным метаболизмом - в 3-5 раз выше.

Цитохромы P450 - самая изменчивая группа биологических катализаторов из существующих в природе; цитохромы P450 участвуют в метаболизме многих применяемых сейчас ЛС [10,81,123,169,197,205]. Мы имеем возможность оценивать взаимодействие ЛВ с одним из цитохромов P450 на ранней стадии разработки, и затем предсказывать полиморфические различия в метаболизме человека и возможности взаимодействия между разными препаратами [224]. Если обнаруживается, что вещество является субстратом подверженного полиморфизму фермента, то часто его разработка прекращается. Однако если она продолжается, есть также возможность привлечь внимание врачей к соответствующим противопоказаниям в сводной характеристике лекарственного продукта. С ростом наших знаний подобная диагностика может распространиться на мишени для действия ЛС, такие как ионные каналы и рецепторы [212,217,224,231,235,248].

Еще одно достижение фармакогеномики - использование профиля экспрессии генов для предсказания токсичности; немало денег уходит на создание баз данных по экспрессии генов в случае известных токсических веществ; это может помочь в будущем подобрать подходящие соединения и уменьшить процент отсева на более поздней стадии процесса разработки. В некоторых ситуациях это может помочь - если осложнения являются результатом идиосинкразии, которая встречается лишь у малой части больных; однако профили экспрессии генов, полученные при исследованиях на животных, вряд ли будут пригодны для человека. Важно отметить также, что такие анализы не будут в точном смысле предсказательными, а потому не заместят эксперименты на животных [293]. Однако возможно, что из-за своей высокой производительности они позволят ставить эксперименты на животных более прицельно, что снизит общее количество используемых животных, экономя таким образом время и деньги.

Эти клинические испытания, на основе которых производится регистрация препарата, начинаются с «первых исследований у человека» фармакокинетики и переносимости (I фаза) на малом числе здоровых добровольцев до крупных рандомизированных клинических испытаний, предназначенных оценить

эффективность соединения (III фаза). Обычная стоимость исследований I фазы за рубежом - 7 млн. долл. США, но к III фазе она увеличивается до 43 млн. долл. Фармакогенетика может усовершенствовать исследования I фазы, сосредоточившись на тех, чьи генотипы определены доклиническими исследованиями [194]. Если осложнения будут распознаваться раньше, соединение может быть отвергнуто во время I фазы, а не III, что значительно сэкономит средства. Во II фазе возможно дальше уточнить фармакогенетические факторы, определяющие реакцию на препарат, а это может дать информацию, необходимую для планирования испытаний в III фазе.

В целом, возможно, удастся снизить количество испытуемых в III фазе, а это, в свою очередь, может способствовать более эффективной и быстрой разработке препарата и общему уменьшению расходов [194]. Надо особо подчеркнуть, что хотя в III фазе понадобится меньшее число больных, больше человек может потребоваться для испытаний в I и II фазах, чтобы обеспечить достаточную выборку для установления фармакогенетических факторов, определяющих реакцию на препарат. В целом процесс разработки ЛС может упроститься, причем потенциально токсичные или неэффективные соединения при этом будут выявляться и отсеиваться на более ранней стадии, а соединения, достигшие III стадии, скорее всего будут применяться для лечения. Однако пока неясно, как откликнутся лицензирующие агентства на клинические испытания, основанные на фармакогенетике, хотя они все более поддерживают концепцию персонализированной медицины.

Возможное экономическое воздействие фармакогенетики на разработку новых лекарственных средств будет зависеть от заболевания, о котором идет речь, и от того, есть ли уже другие методы лечения этой болезни. Далее, экономическое воздействие данного лекарственного средства будут также определять характеристики разрабатываемого ЛВ, его терапевтический индекс и характеристики фармакогенетического анализа (чувствительность, специфичность и точность). Плюсом является то, что фармакогенетика, возможно, позволит

разрабатывать ЛС эффективнее и быстрее, уменьшая число больных, которым дают препарат во время III фазы клинических испытаний. Поскольку значительная часть затрат на разработку нового лекарственного средства приходится на клинические испытания, особенно на III фазу, уменьшение числа испытуемых в III фазе должно привести к соответствующему уменьшению затрат на разработку препарата. Более того, демонстрация однородного лечебного ответа с отсутствием (или малым числом) побочных реакций может повысить вероятность того, что ЛП будет зарегистрирован. Это уменьшит также вероятность отзыва ЛС с рынка, поскольку те, кто подвержен развитию побочных реакций - и являются главной причиной отзыва ЛП - не будут получать препарат.

Минусом, однако, является то, что фармакогенетические анализы почти наверняка снизят число больных, которые получают препарат, поскольку больные с иным фармакогенетическим профилем будут рассматриваться как «нечувствительные к препарату». Другими словами, лечение, основанное на фармакогенетике, характеризуется дроблением больных на группы. Важно также отметить, что при уменьшении числа больных в III фазе клинических испытаний станет нужным пристальное наблюдение за препаратом после его выпуска на рынок, чтобы удостовериться, что связанные с его применением серьезные идиосинкразии распознаются как можно раньше, как обсуждалось выше.

1.6. Преквалификация зарегистрированных лекарственных препаратов

Программа преквалификации (предварительной квалификации) была создана ВОЗ в 2001 г. для облегчения доступа к лекарственным средствам, применяемым в лечении ВИЧ/СПИД, малярии и туберкулеза, которые отвечают единым стандартам качества, безопасности и эффективности [378]. С самого начала работы программа была поддержана организациями ЮНЭЙДС (UNAIDS), ЮНИСЕФ (UNICEF), ЮНФПА (UNFPA) и Всемирным банком в качестве конкретного вклада в решение приоритетной для Организации Объединенных

Наций проблемы широко распространенных заболеваний в странах с ограниченным доступом к лекарственным средствам высокого качества.

Преквалификация первоначально предназначалась для предоставления организациям по снабжению в рамках ООН, таким как ЮНИСЕФ, возможности выбора из ассортимента высококачественных ЛС. Со временем растущий список ЛП, которые были признаны отвечающими установленным требованиям, стал рассматриваться как полезный инструмент для всех органов, проводящих оптовые закупки ЛС, включая как непосредственно страны, так и другие организации. Например, Глобальный фонд по борьбе со СПИДом, туберкулезом и малярией оплачивает ЛП, которые прошли предварительную квалификацию в рамках установленного ВОЗ процесса.

Любой производитель, желающий включить свои ЛП в список прошедших предварительную квалификацию, может обратиться с письменным заявлением в форме выражения заинтересованности (Expression of Interest - EOI), включающим требуемые препараты. Каждый производитель должен предоставить подробную информацию о препарате (или препаратах), позволяющую квалифицированной группе экспертов оценить безопасность, эффективность и качество препарата.

Производитель должен также предоставить доступ к производственным площадкам инспекционной группе, которая оценивает технологические процессы на предмет соответствия требованиям ВОЗ по надлежащей производственной практике. Кроме того, признаются также результаты проверок, осуществляемых другими регуляторными органами, и выполненная ими работа не дублируется ВОЗ. Производитель предоставляет исчерпывающий набор данных в отношении качества, безопасности и эффективности своего лекарственного препарата, включая информацию о степени очистки всех ингредиентов, используемых в производстве, данные о готовом препарате (например, информация о стабильности), а также результаты изучения биоэквивалентности *in vivo* (клинические исследования на здоровых добровольцах).

Группа экспертов изучает все предоставленные данные и в случае положительной оценки отправляет лекарственный препарат в профессиональные лаборатории по контролю качества, расположенные во Франции, Южной Африке и Швейцарии, которые в рамках соглашения с ВОЗ выполняют аналитическую проверку качества препарата.

Если лекарственный препарат будет признан соответствующим указанным требованиям, а производственная площадка – стандартам GMP, то в этом случае как препарат, изготавливаемый на данном производственном участке, так и компания-производитель будут добавлены в список ВОЗ, размещенный на общедоступном веб-сайте.

28 августа 2014 года постановлением правительства РФ №871 были утверждены Правила формирования перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи, определяющие преквалификационные требования в отношении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП), перечня ЛС для обеспечения отдельных категорий граждан (ОНЛС), перечня для программы «7 нозологий».

В целом, преквалификационные процедуры соответствуют заявленным ВОЗ, основаниями для внесения лекарственного препарата в перечни лекарственных препаратов являются:

- научно-обоснованные данные о необходимости и обоснованности применения лекарственного препарата для диагностики, профилактики или лечения заболеваний, синдромов или состояний, преобладающих в структуре заболеваемости и смертности граждан Российской Федерации на основании данных государственного статистического наблюдения (при наличии таких статистических данных);
- наличие научно-обоснованных данных о клинических и фармако-экономических преимуществах применения лекарственного препарата для лечения лиц, больных гемофилией, муковисцидозом, гипофизарным нанизмом,

болезнью Гоше, злокачественными новообразованиями лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей, рассеянным склерозом, лиц после трансплантации органов и (или) тканей, по сравнению с препаратами, уже включенными в перечни лекарственных препаратов;

- наличие лекарственного препарата в стандартах медицинской помощи с частотой предоставления не ниже 0,8 для диагностики, профилактики или лечения заболеваний, синдромов или состояний согласно показаний инструкции по медицинскому применению;

- наличие лекарственного препарата по предлагаемым показаниям по медицинскому применению в клинических рекомендациях (протоколах) ведения больных, включая международные;

- наличие научно-обоснованной информации о преимуществах и (или) особенностях механизма действия лекарственного препарата по сравнению с аналогами, в том числе входящими перечни лекарственных препаратов, при диагностике, профилактике или лечении заболеваний, синдромов и состояний с учетом статистических данных о структуре заболеваемости и смертности в Российской Федерации (при наличии);

- востребованность (социальная значимость) лекарственного препарата практическим здравоохранением и населением с учетом предложений органов управления здравоохранением субъектов Российской Федерации, а также наличия лекарственного препарата в перечнях лекарственных средств, финансируемых за счет средств бюджетов субъектов Российской Федерации;

- наличие лекарственного препарата в перечне стратегически значимых лекарственных препаратов;

- наличие (локализация) производства лекарственного препарата на территории Российской Федерации;

Для подтверждения оснований для внесения лекарственного препарата в перечни лекарственных препаратов заявитель должен представить следующие данные:

- Эпидемиологические данные (при наличии);
- Клинические данные;
- Данные о терапевтической эквивалентности (при необходимости);
- Данные о клинико-экономических (фармакоэкономических)

характеристиках лекарственного препарата;

- Данные о цене на лекарственный препарат;
- Данные о фактических объемах продаж лекарственного препарата в Российской Федерации за год, предшествующий подаче предложения в натуральных показателях по регистрируемым лекарственным формам;
- Данные отчетов о результатах мониторинга эффективности и безопасности лекарственного препарата (в Российской Федерации и за рубежом);

Все представленные данные оцениваются экспертной комиссией при Министерстве Здравоохранения. Если оказывается, что лекарственный препарат отвечает установленным требованиям, он вносится в соответствующий перечень лекарственных препаратов, прошедших преквалификацию.

Таким образом, спектр вопросов, рассматриваемых в рамках преквалификационной экспертизы, носит комплексный, междисциплинарный характер. Преквалификационную экспертизу уже прошли сотни лекарственных препаратов российских и зарубежных производителей. Действующие списки были закреплены распоряжением Правительства Российской Федерации от 26 декабря 2015 г. №2724-р. В список ЖНВЛП дополнительно включено 43 лекарственных препарата. Всего количество международных непатентованных наименований лекарств в списке увеличено с 604 до 646.

В перечень лекарственных препаратов для обеспечения отдельных категорий граждан добавлено 15 позиций. В минимальный ассортимент — две. Списки увеличились соответственно: с 320 до 335 и с 68 до 70 наименований. Перечень для программы «Семь нозологий» стал больше на одно лекарство. Теперь количество препаратов в нем составляет 24.

По официальным данным Министерства здравоохранения России, перестройка в фармацевтической отрасли привела к тому, что нередко качество продукции, производимой предприятиями медицинской промышленности, не соответствует установленным стандартам, при этом доля такого брака достаточно высока [128,141,145,317,342,348].

Одним из методов контроля на пострегистрационном этапе жизненного цикла ЛС может являться проведение СТКР, например сравнительный анализ профилей растворимости разных серий препарата, в отношении которого имеются замечания со стороны Росздравнадзора с целью выяснения однородности промышленных серий, выявления фальсификата. Использование данного метода не требует больших финансовых и временных затрат, а результаты в достаточной мере биорелевантны условиям *in vivo*.

Другим способом контроля ЛП, включенных в различные перечни являются процедуры, связанные с фармаконадзором, в частности, анализ спонтанных сообщений о нежелательных явлениях, а также периодических отчетов о безопасности лекарственных препаратов (ПОБЛП). Система сбора информации о побочном действии лекарственных средств в рамках фармаконадзора направлена на минимизацию рисков, связанных с фармакотерапией. Не всегда при клиническом исследовании удается выявить все побочные реакции, связанные с лечением определенным препаратом. Это связано с ограниченностью численности и разнородности группы пациентов, охваченных клиническим исследованием. Именно поэтому уже после выхода препарата на рынок и включения его в какой-либо перечень, когда он начинает применяться широким кругом пациентов, отличающихся по возрасту, состоянию здоровья и другим критериям, сбор информации о побочном действии лекарств очень важен. По результатам такого мониторинга могут вноситься изменения в инструкцию по применению в части противопоказаний и побочных действий, препарат также может быть переведен из категории безрецептурных в категорию рецептурных или даже изъят с рынка. Кроме того, в системе фармаконадзора большое

внимание уделяется борьбе с фальсифицированными ЛС. Это направление является приоритетным в деятельности фармаконадзора по всему миру, практически в каждой фармацевтической компании есть сотрудник — координатор по борьбе с фальсифицированной продукцией. Такие меры позволяют эффективно противодействовать браку, оперативно выявлять и своевременно принимать меры по изъятию из оборота. Главными приоритетами в работе является постоянный мониторинг рынка, сбор информации от врачей, пациентов, подразделений фармконтроля, правоохранительных органов, частных детективных агентств, общественных организаций, других производителей и дистрибуторов, а также проведение контрольных закупок, анализ подозрительных образцов и проведение расследований по каждому случаю, выявления недоброкачественного ЛП.

Таким образом, оценка кумулятивных данных по безопасности и анализ соотношения польза-риск при использовании ЛП имеет важное значение в рамках контроля его качества. В ряде случаев, данные, полученные системой фармаконадзора могут являться основанием для исключения ЛП из различных перечней.

1.7. Научно-теоретическая концепция исследования обращения лекарственных средств

1.7.1. Междисциплинарные подходы в науке

Требования "эффективность" и "безопасность" относятся к медико-биологическим вопросам, ими занимаются клиницисты, биологи, токсикологи. Категория "качество" является чисто фармацевтической проблемой и отражает соответствие лекарственного препарата требованиям нормативной документации по показателям подлинности (содержанию действующего вещества), вспомогательным веществам, нормам примесей, воспроизводимости

обозначенных контрольных методик. Данной проблемой занимаются химики-аналитики, технологи, специалисты в области фармацевтической химии.

Важно выделить взаимосвязь фармакологической и фармацевтической составляющих. Теоретическое обоснование разработки методов получения ЛС, экспериментальное подтверждение правильности выбранного направления исследований залог успешного применения этих средств в клинике.

В целом, изучением ЛП занимаются более десятка наук, задействованы специалисты в области медицины, фармации, химии, физики, молекулярной биологии, математического анализа, экономики, юриспруденции. За годы самостоятельного развития клиническая фармакология достигла значительных успехов. Рост количества ЛС и клинических исследований привёл к появлению новых направлений: фармакогенетики, фармакоэпидемиологии, фармакоэкономики, клинических исследований, доказательной медицины, помимо основных разделов клинической фармакологии — фармакокинетики и фармакодинамики. Клиническая фармакология также изучает неблагоприятные побочные реакции ЛС (фармаконадзор); взаимодействие ЛС друг с другом, с пищей, алкоголем; особенности применения ЛС у пожилых, детей, беременных. Фармакогенетика изучает влияние генетических особенностей человека на развитие фармакологических эффектов, а следовательно, на эффективность и безопасность ЛС. Фармакоэпидемиология изучает терапевтические и побочные эффекты ЛС, возникающие у большого количества людей, в целях обеспечения рационального и экономически эффективного использования препаратов.

Фармакоэкономика анализирует затраты на лекарственную терапию и последствия для системы здравоохранения (или для общества) в сопоставлении с альтернативными вмешательствами. Фармакоэкономика помогает определить, на что должны расходоваться ресурсы здравоохранения. Существует четыре основных вида фармакоэкономического анализа: (1) анализ «минимизация затрат» — сравнение стоимости исследуемых методов лечения с целью определения наименее дорогого; (2) анализ «затраты (стоимость) —

эффективность» — сравнение стоимости и результатов использования сравниваемых ЛС; (3) анализ «затраты – выгода» — сравнение стоимости исследуемой лекарственной терапии, которая складывается из затрат на лечение, и преимуществ, которые несёт исследуемое лечение; (4) анализ «затраты – полезность» — при оценке результатов используют показатели качества жизни.

Выявление неблагоприятных (нежелательных) побочных реакций (фармаконадзор) подразумевает мониторинг безопасности ЛС, например с помощью спонтанных сообщений о побочных эффектах, исследований «случай-контроль» и когортных исследований.

Таким образом, современная клиническая фармакология как наука имеет мультидисциплинарный характер, и является связующим звеном между фундаментальными и практическими клиническими дисциплинами, а также имеет тесную связь с развитием системы здравоохранения.

Участие таких разноплановых специалистов требует наличия междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю параметров безопасности, эффективности и качества ВЛП на всех этапах его жизненного цикла. Наряду социальной ответственностью, с этическим подходом к исследованиям, принцип междисциплинарности является основополагающим в отечественной стандартизации лекарственных средств. Без использования междисциплинарного подхода невозможно достоверно изучить и эффективно провести комплексную оценку лекарственного препарата.

Междисциплинарность - достаточно сложное для определения понятие, которое может толковаться по-разному – от механического объединения дисциплин до формирования общего понимания, взаимообогащения различных наук, их соединения в одной форме, интеграции их постулатов. Междисциплинарность означает выход за рамки конкретных научных дисциплин и выявление связей между ними, что, в свою очередь, влияет на развитие самих этих дисциплин [31]. Она может появляться в различных формах, например, в постановке проблемы или определении путей их решения. Важность ее

осмысления применительно к здравоохранению особенно велика. Ведь эффективность и безопасность лекарственной терапии определяется множеством факторов, влияние которых необходимо учитывать, если есть потребность сохранить здоровье пациента. Иная особенность здравоохранения состоит в том, что само это понятие является по сути активным, действенным. Это область деятельности, притом не просто отдельных индивидов, но общества и государства. Охрана здоровья путем обеспечения пациентов качественными ЛС – это не просто собственно оказание медицинской помощи, она подразумевает самый широкий спектр деятельности, для организации которой необходимо знание множества дисциплин.

Все этапы создания, разработки, исследования и применения лекарственного препарата не могут быть реализованы в рамках одной компании, одного коллектива. Междисциплинарность на практике — это «бригадный» подход, который предполагает использование двух и более лиц, имеющих подготовку в различных профессиональных дисциплинах с целью повышение качества экспертизы путем интеграции различных сведений, почерпнутых из разных источников. Только их совместный вклад может решить проблему оценки эффективности и безопасности конкретного ЛС на всех этапах его существования.

Фармакология, клиническая фармакология, являясь наукой как о лекарственных средствах в своих теоретическом и экспериментальном разделах, так и о пациентах в той же экспериментальной и клинической частях является уже сама по себе междисциплинарной и предполагает тесное сотрудничество специалистов разных научных направлений.

1.7.2. Евразийский экономический союз как единое пространство для лекарственного обращения

С 1 января 2016 г. начал функционировать общий рынок ЛС и медицинских изделий для стран Евразийского экономического союза. Соглашение о единых

принципах и правилах обращения ЛС и медицинских изделий (далее - Соглашение) было подписано 23 декабря 2014 г. в Москве [9]. Настоящее Соглашение является международным договором, который устанавливает единые принципы и правила обращения ЛС и медицинских изделий в рамках ЕАЭС в целях формирования общего рынка ЛС. С 1 января 2016 г. ЛС и медицинские изделия находятся в свободном обращении на территории ЕАЭС после прохождения процедуры регистрации и экспертизы ЛС по единым правилам. При этом соблюдаются национальные требования по применению государственного языка при маркировке препаратов и инструкций по медицинскому применению. На территории ЕАЭС будут реализовываться исключительно медицинские препараты, произведенные по стандарту GMP, который подтверждает эффективность, безопасность и качество ЛС. При осуществлении процедуры регистрации и экспертизы ЛС государства-члены взаимно признают результаты исследований и испытаний ЛС и систем фармаконадзора. Также будет осуществляться государственный контроль и надзор за обращением ЛС и медицинских изделий в соответствии с Соглашением. В рамках Союза регистрации не подлежат лекарственные средства изготовленные в аптеках, фармацевтические субстанции, ЛС, предназначенные для использования в качестве выставочных образцов, лекарственные средства, предназначенные для проведения доклинических и клинических исследований, ЛС, ввезенные физическим лицом для личного применения, радиофармацевтические ЛП, изготовленные непосредственно в медицинских организациях по правилам государств-членов, ЛС, не предназначенные для реализации на таможенной территории Союза, а также образцы ЛС, предназначенные для регистрации и стандартные образцы.

Выбор референтной страны при регистрации ЛП или медицинского изделия для обращения на территории Союза остается за заявителем и будет осуществляться в соответствии с правилами регистрации и экспертизы, принятыми Решением Евразийской экономической комиссии (ЕЭК). Становление

общего рынка создаст конкурентную борьбу между странами - участницами за выбор одной из них в качестве базовой, при регистрации препарата - так называемой референтной страны. Именно такая страна получит все регистрационные платежи, которые будут весьма значительными для бюджета и повышения уровня развития материальной и интеллектуальной базы системы здравоохранения. В целях обеспечения условий для обращения в рамках ЕАЭС безопасных, качественных и эффективных медицинских изделий и ЛС ЕЭК был сформирован целый ряд информационных систем и баз, одни из которых содержат данные о неэффективных, отозванных и запрещенных к применению лекарствах. Другие хранят сведения о контрафактных и фальсифицированных препаратах. Таким образом, к 2026 году многие граждане стран - участниц ЕАЭС ощутят все положительные стороны данного процесса, к которым можно отнести увеличение объема рынка, беспрепятственный приток инвестиций, совместное использование ресурсов, объединение капитала и снятие взаимных барьеров.

Общий рынок создает определенный стимул для развития науки в области фармацевтики, высокоэффективных производств в каждом государстве - члене ЕАЭС, разработке собственных узнаваемых брендов и их продвижению на внешние рынки.

1.8. Выводы по главе

В результате критического анализа литературных данных установлено, что современные подходы к стандартизации и контролю безопасности, эффективности и качества ВЛП в России не совершенны и требуют дальнейшей оптимизации и гармонизации с другими странами с учетом положительного мирового опыта.

Рассмотрены основные требования к безопасности, эффективности и качеству ВЛП, на основании которых делается заключение о их

взаимозаменяемости, намечены основные пути оптимизации контроля данных параметров.

Определена актуальность исследования полиморфизма в рамках анализа фармакологической активности фармацевтических субстанций.

Проанализированы ключевые методы предварительной оценки эффективности и безопасности воспроизведенных ЛП на доклиническом этапе их жизненного цикла, сделано заключение о необходимости внедрения альтернативных методов исследований с акцентом на методы *ex vivo*.

На основании современного зарубежного опыта сделано заключение о перспективности внедрения процедуры «биоверификация» в качестве основного метода подтверждения эквивалентности ВЛП и референтных ЛП для лекарственных препаратов 1 класса по БКС.

Анализ современных методов фармакогенетики показал необходимость их применения в рамках планирования исследований биоэквивалентности ВЛП.

Обзор основных фармакологических методов выявил необходимость дальнейшей разработки междисциплинарного подхода, позволяющего достоверно изучить и эффективно провести комплексную оценку лекарственного препарата на всех этапах его жизненного цикла.

ГЛАВА 2. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СУБСТАНЦИИ КАК ПРЕДИКТОР БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБАТЫВАЕМЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

В рамках контроля безопасности, эффективности и качества ЛС имеется четкое представление, что одним из основных факторов, определяющих фармакологическую активность лекарственных веществ является полиморфизм. Полиморфизм (кристаллов) - способность вещества существовать в различных кристаллических структурах, называемых полиморфными модификациями. Полиморфизм и псевдополиморфизм широко распространены среди лекарственных веществ и являются причиной различия их модификации по многим свойствам [29,97]. Актуальность рассмотрения биофармацевтических свойств полиморфных модификаций лекарственных веществ определяет тот факт, что доля пероральных ЛС на рынке составляет около 75%, из которых большая часть – ЛП в твердой форме [290], при этом треть ЛС содержат ЛВ в виде гидратов и сольватов [372]. В контексте данной работы наибольшее значение имеют растворимость, кинетика растворения и биодоступность ПМ ЛВ.

Очевидно, полиморфизм может критически влиять на свойства ЛВ и, таким образом, на безопасность и эффективность ЛП. Поэтому для оценки свойств ЛС необходима серьезная экспертиза уже на этапе контроля качества исходных субстанций, основанная на клинико-фармакологических подходах, использующих широкий спектр аналитических, физико-химических и физических методов анализа. Вопросы контроля качества кристаллических модификаций ЛВ явились объектами собственных исследований.

2.1. Материалы и методы

Субстанции: амлодипина бесилат (образцы производителей 1 и 2); верапамила гидрохлорид (образцы производителей 1 и 2); верапамила гидрохлорид (6 образцов разных серий одного производителя).

Оборудование и методы:

Дифракция рентгеновских лучей на порошке

Рентгеновские дифрактограммы получали на порошковом рентгеновском дифрактометре STOE STADI X-Ray 3070E с комплектом программного обеспечения The STOE Powder Diffraction Software Package WinX.

Дифференциальная сканирующая калориметрия

Для анализа образцов методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) предварительно на термогравиметрическом анализаторе «TGA Q500» фирмы «TA Instruments» регистрировали кривую зависимости потери массы вещества от температуры.

По кривой определяли диапазон температур, в котором целесообразно проводить анализ методом ДСК, т.е. от комнатной температуры до момента начала термического разложения образца. Анализ методом ДСК проводили на приборе «DSC Q100» фирмы «TA Instruments » при непрерывном продуве калориметрической ячейки воздухом с расходом 50 мл/мин в герметично закрытых чашечках из алюминия (с инвертированной крышкой для сокращения объема воздуха, запечатываемого вместе с образцом). Регистрацию кривых проводили со скоростью нагревания $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в режиме непрерывного линейного нагревания и по стандартной процедуре нагрев/охлаждение/нагрев по следующей программе: 1) линейный нагрев от комнатной конечной температуры со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; 2) линейное охлаждение до 0°C со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; 3) линейный нагрев от 0°C до конечной температуры со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Для образцов верапамила № 1 и № 2 конечная температура составляла 170°C . Для анализа использовали образцы массой от 2 до 8 мг. Регистрацию

данных и обработку кривых проводили с помощью пакета программного обеспечения прибора «DSC Q100 TA Instruments Thermal Advantage» (версия 4.3).

Инфракрасная спектроскопия

Спектры регистрировали на инфракрасном Фурье-спектрометре «Nicolet 380», снабженном приставкой однократного нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) «Smart Performer». Спектральное разрешение 4 см^{-1} , диапазон $4000\text{--}500 \text{ см}^{-1}$, общее время регистрации каждого спектра 1 мин. Управление спектрометром осуществлялось с помощью программы OMNIC 7.3, установленной на компьютере, подключенном к спектрометру.

Оптическая микроскопия

Оптическую микроскопию проводили с использованием лабораторного микроскопа Nikon Eclipse E200 F.

2.2. Сравнение различных серий субстанции одного производителя

В ходе исследования были проанализированы 6 серий субстанции верапамила гидрохлорида одного производителя на предмет выявления различий методами: порошковой рентгеновской дифракции, дифференциальной сканирующей калориметрии, оптической микроскопии, ИК спектроскопии.

Известно, что данные методы можно использовать для установления подлинности субстанций. Эти методы также позволяют косвенно оценить чистоту лекарственных веществ, а также данные методы позволяют выявить наличие ПМ [70,74,106,121].

2.2.1. Порошковая рентгеновская дифракция

Критериями идентичности тестируемого вещества и референтного соединения являются углы рассеивания основных линий (в пределах ± 0.20 градуса) и их относительные интенсивности.

Шесть серий субстанции верапамила гидрохлорида одного производителя были исследованы методом порошковой рентгеновской дифракции. Для сравнения дифрактограмм, полученных от разных серий, мы наложили дифракционные максимумы на одном рисунке (рис. 2.1).

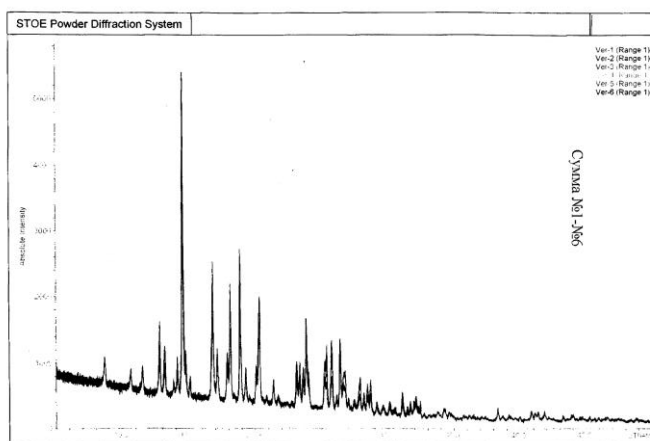


Рисунок 2.1 - Наложение рентгеновских дифрактограмм субстанции верапамила гидрохлорида шести серий

Из представленных данных видно, что все дифракционные максимумы, полученные для разных серий, совпадают. Это говорит о том, что содержание отдельных кристаллических фаз в разных сериях субстанции одинаково. Следовательно, это может свидетельствовать о воспроизводимости процесса получения фармацевтической субстанции данного производителя и/или о том, что полиморфные модификации не характерны для верапамила гидрохлорида.

2.2.2. ИК-спектроскопия

Поскольку положение и относительная интенсивность полос поглощения в ИК-спектрах зависят от чистоты исследуемого вещества и от присутствия различных полиморфных модификаций вещества, нами были проведены испытания 6 серий субстанции верапамила гидрохлорида одного производителя методом ИК-спектроскопии (рис. 2.2, 2.3). Для сравнения спектров испытуемых образцов со стандартными спектрами на рис. 2.4-2.6 приведены ИК-спектры субстанции верапамила гидрохлорида из JP 15, ВР 2007 и ГФ XII [76].

Для определения зависимости ИК-спектра от серии субстанции верапамила гидрохлорида мы наложили полосы поглощения, полученные для разных серий. Видно, что все основные полосы совпадают по положению и относительной интенсивности. Отличия испытываемых спектров касаются только относительной интенсивности полос 2360 см^{-1} и 2342 см^{-1} . Самая высокая интенсивность этих полос наблюдается для образцов серий 5 и 6, наименьшая – у серий 1 и 2. Эти полосы можно было бы отнести к валентным колебаниям циано-группы и протонированной третичной аминогруппы (рис. 2.4). Однако сравнение с фармакопейными спектрами (рис. 2.5, 2.6) показывает, что на стандартных ИК-спектрах верапамила гидрохлорида такие полосы вообще отсутствуют.

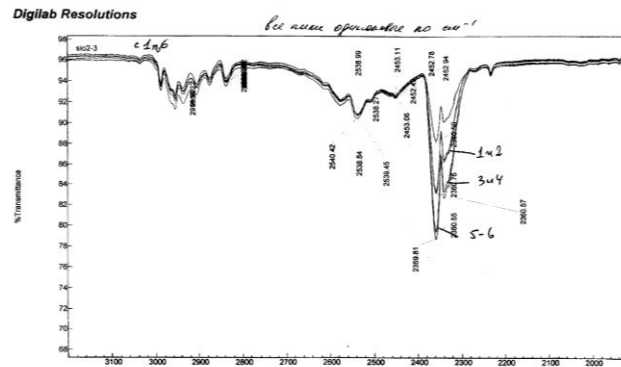


Рисунок 2.2 - Наложение ИК-спектров субстанции верапамила гидрохлорида шести серий ($3200 - 1920\text{ см}^{-1}$)

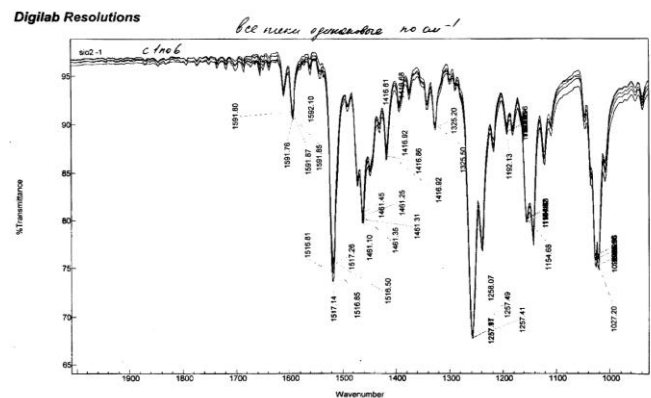
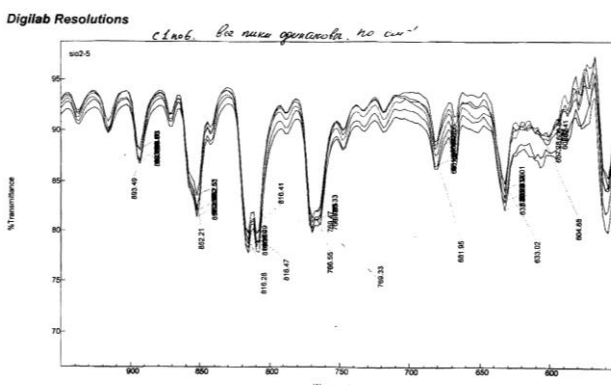


Рисунок 2.3 - Наложение ИК-спектров субстанции верапамила гидрохлорида шести серий ($2000 - 920\text{ см}^{-1}$, $950 - 550\text{ см}^{-1}$)

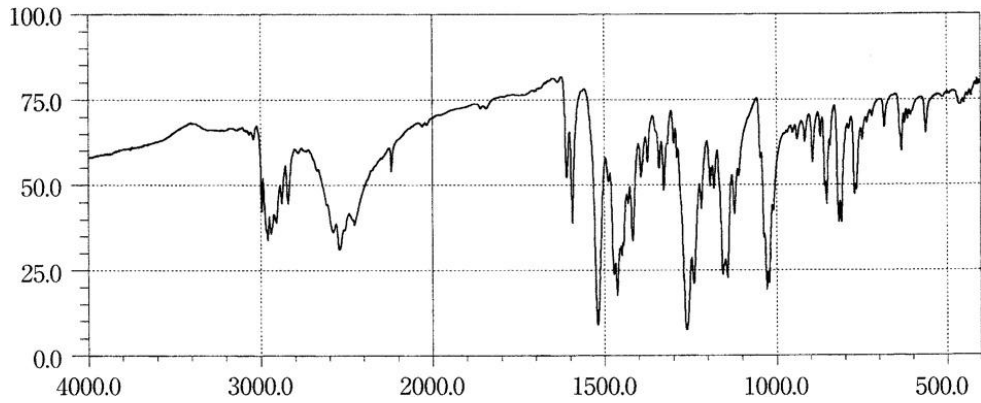


Рисунок 2.4 - ИК-спектр субстанции верапамила гидрохлорида поJP15

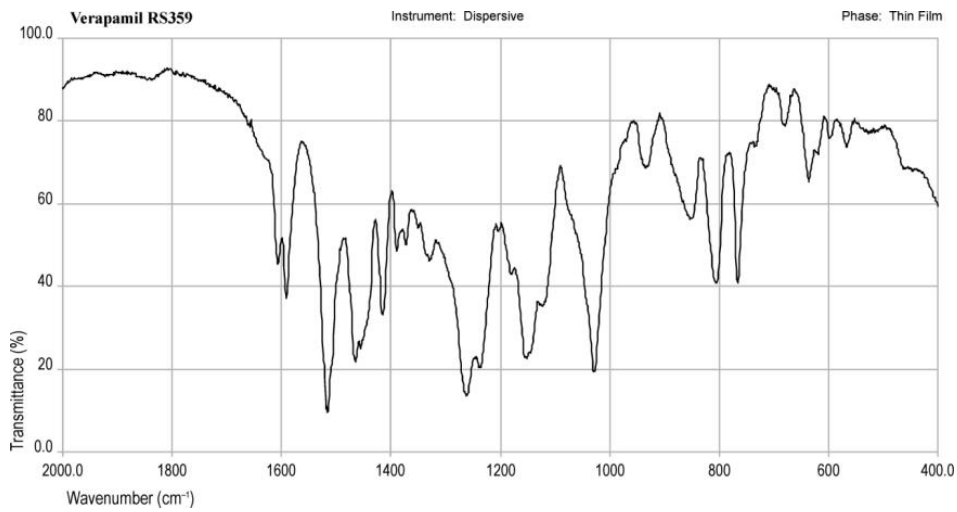


Рисунок 2.5 - ИК-спектр субстанции верапамила по ВР 2007

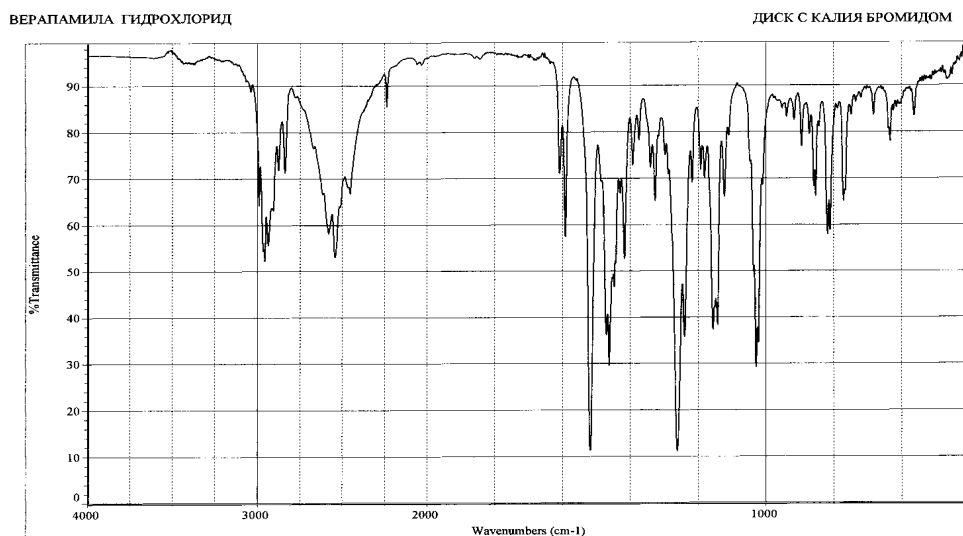


Рис. 2.6 - ИК-спектр субстанции верапамила гидрохлорида по ГФ XII

Поскольку порошковая рентгеновская дифрактография не подтвердила разный поликристаллический состав исследованных серий субстанции верапамила гидрохлорида, данные ИК-спектроскопического анализа говорят о том, что полосы 2360 см^{-1} и 2342 см^{-1} скорее всего соответствуют примеси (примесям), содержащимся в разном количестве в испытуемых сериях субстанции.

2.3. Сравнение субстанций разных производителей

В ходе работы были проанализированы субстанции верапамила гидрохлорида разных производителей на предмет выявления различий методами ДСК, ИК-спектроскопии и оптической микроскопии. Также методом ИК-спектроскопии анализировали субстанции амлодипина бесилата.

2.3.1. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Для субстанций верапамила гидрохлорида производителей №1 и №2 кривые первого нагрева (рис. 2.7, 2.8, 2.9) показали существенные различия пика плавления (отличались и температура, и теплота плавления вещества), при последующем охлаждении образцов со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ кристаллизации вещества не происходит, о чем говорит отсутствие пика кристаллизации на кривой охлаждения и ярко выраженный переход стеклования на кривой повторного нагревания (рис. 2.10).

Отсутствие пика плавления на кривой повторного нагревания говорит о том, что при застывании верапамил не кристаллизуется, а образует чистую аморфную фазу.

Отличие ДСК кривых первого нагревания субстанций верапамила гидрохлорида производителей 1 и 2 отражает различия в методике синтеза или очистки вещества (по-видимому перекристаллизации) и, возможно, в чистоте получаемых субстанций.

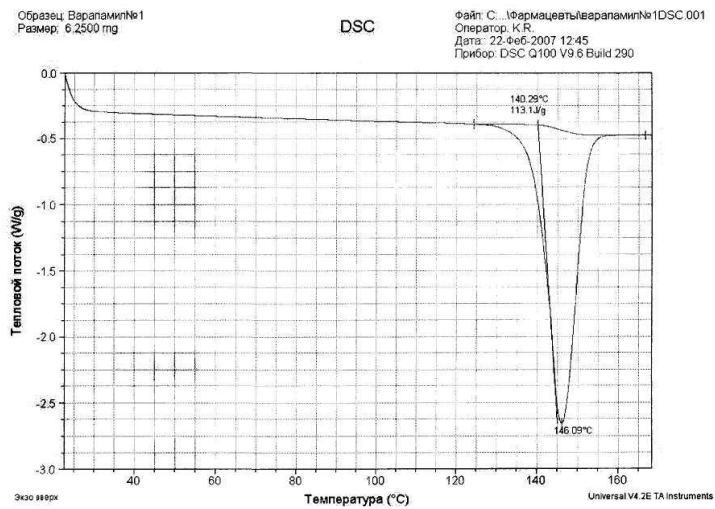


рис. 3. Образец верапамил №1 – первое нагревание

INTERTECH Corporation

Рис. 2.7 - ДСК кривая субстанции верапамил гидрохлорида производителя №1 (первое нагревание)

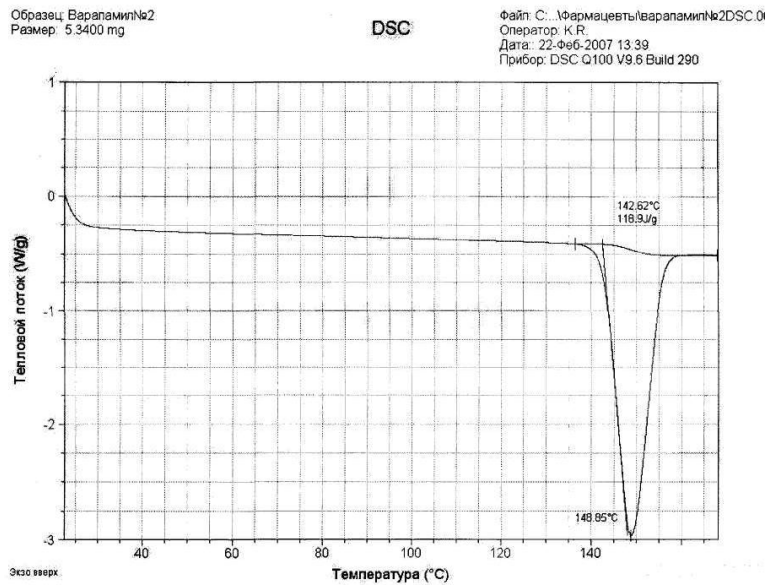


Рис. 2.8 - ДСК кривая субстанции верапамил гидрохлорида производителя №2 (первое нагревание)

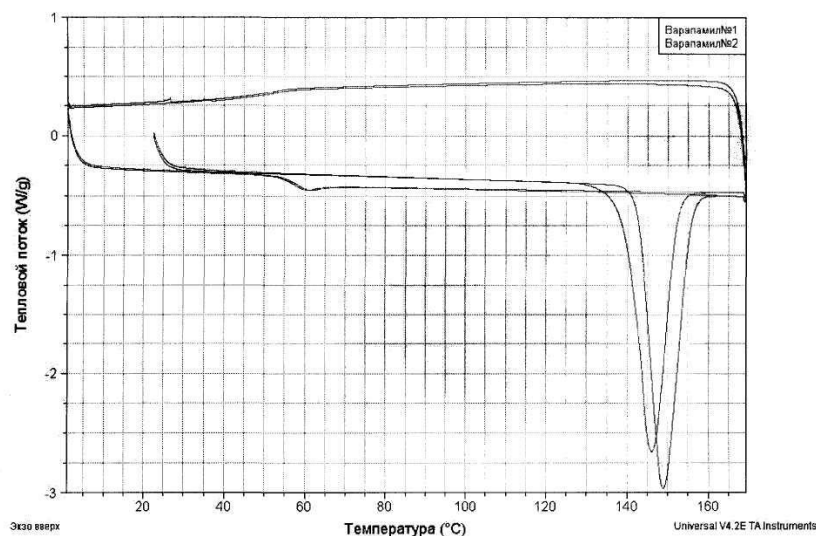


Рис. 2.9 - Наложение ДСК кривых субстанций верапамила гидрохлорида производителей 1 и 2 (первое нагревание)

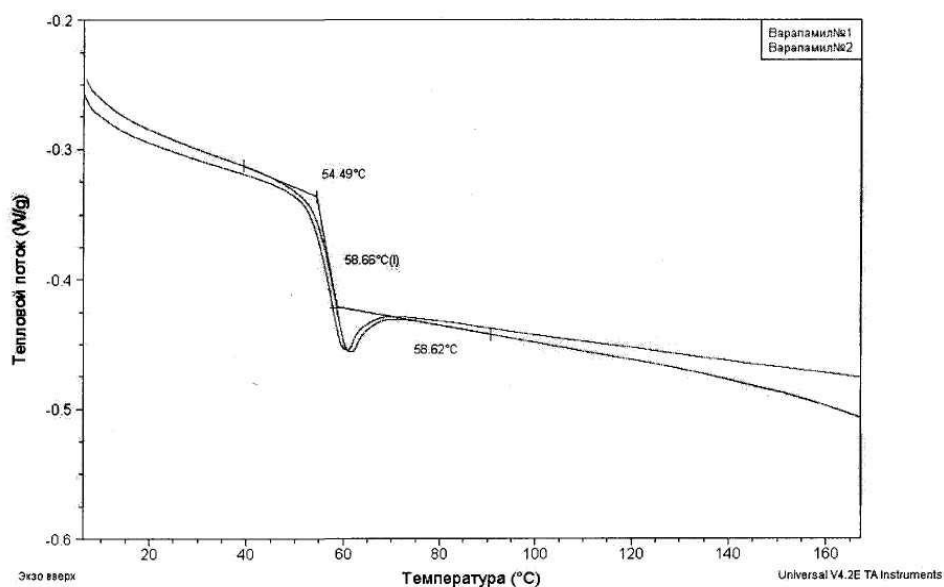


Рис. 2.10 - ДСК кривые субстанций верапамила гидрохлорида производителей №1 и №2 (второе нагревание)

2.3.2. ИК-спектроскопия

Сравнение ИК-спектров амлодипина бесилата не показало каких-либо значимых различий (рис. 2.11). Все полосы поглощения совпадают по положению и относительной интенсивности как в области валентных, так и в области

деформационных колебаний. Некоторые различия в относительной интенсивности спектров в диапазоне $1000 - 400 \text{ см}^{-1}$ в расчет можно не принимать.

Эти данные могут косвенно свидетельствовать о том, что эти две субстанции амлодипина бесилата не отличаются по кристаллической структуре, и содержание примесей (которые можно увидеть в ИК-спектре) у них также примерно одинаково. Естественно, что вопрос анализа примесей в тех количествах, которые могут присутствовать в лекарственных средствах, в общем случае не решается методом ИК-спектроскопии. Для этого применяются хроматографические методы, УФ-спектрофотометрия (реже).

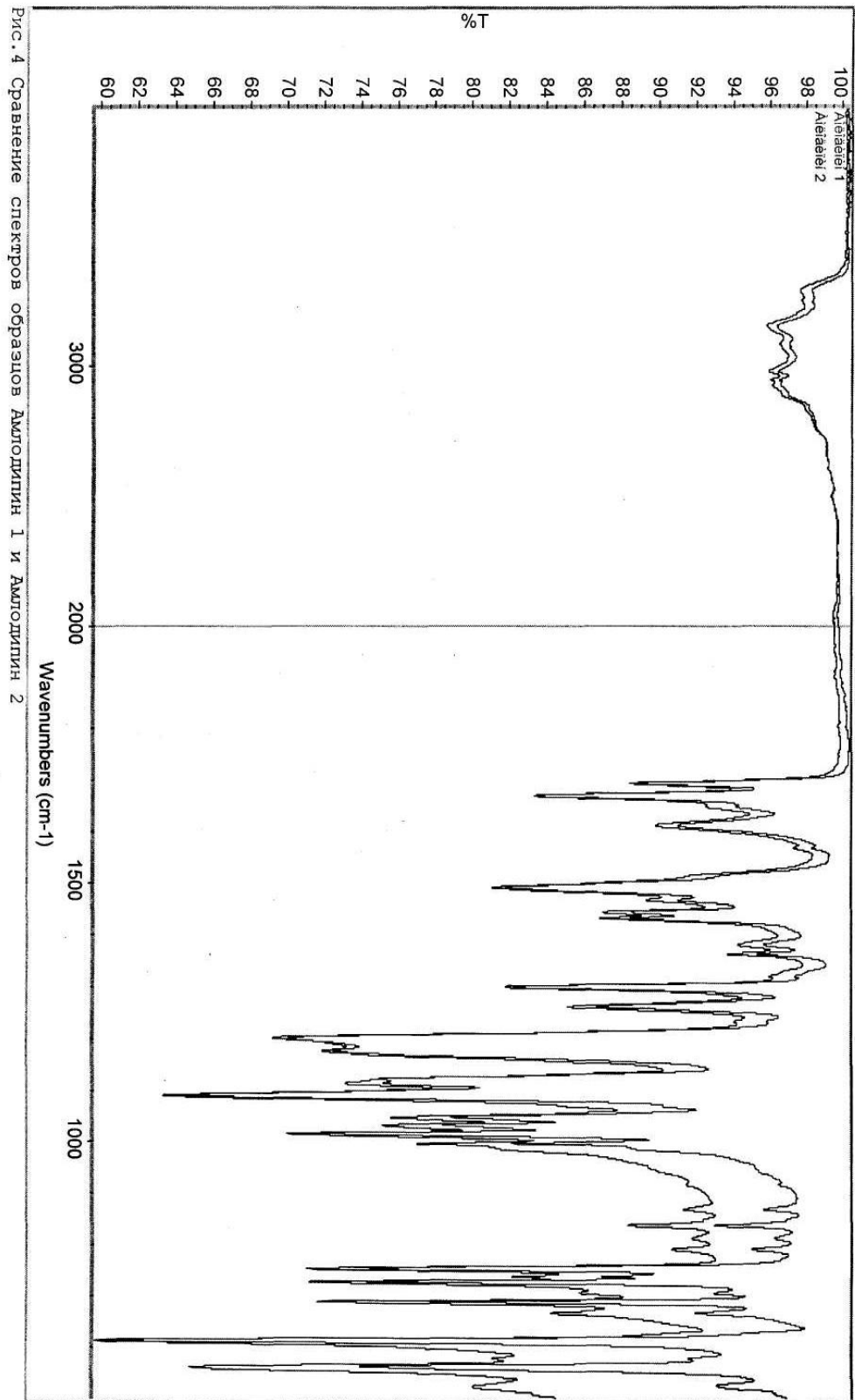


Рис. 4 Сравнение спектров образцов Амлодипин 1 и Амлодипин 2

Рис. 2.11 - Наложение ИК-спектров субстанций амлодипина бесилата производителей 1 и 2

В отношении ценности ИК-спектроскопического анализа для установления разницы кристаллической структуры субстанций и косвенной оценки чистоты интересен также анализ ИК-спектров субстанций верапамила гидрохлорида двух разных производителей (рис. 2.12), для которых выше были рассмотрены ДСК-кривые (рис. 2.7-2.10).

Если ДСК-анализ показал достоверную разницу, то интерпретация соответствующих ИК-спектров не демонстрирует никаких существенных отличий. Все полосы для этих двух субстанций верапамила гидрохлорида совпадают по положению и относительной интенсивности. Наблюдается также и полное совпадение всех основных полос со стандартными спектрами по ГФ XII, ВР и JP, рассмотренными выше.

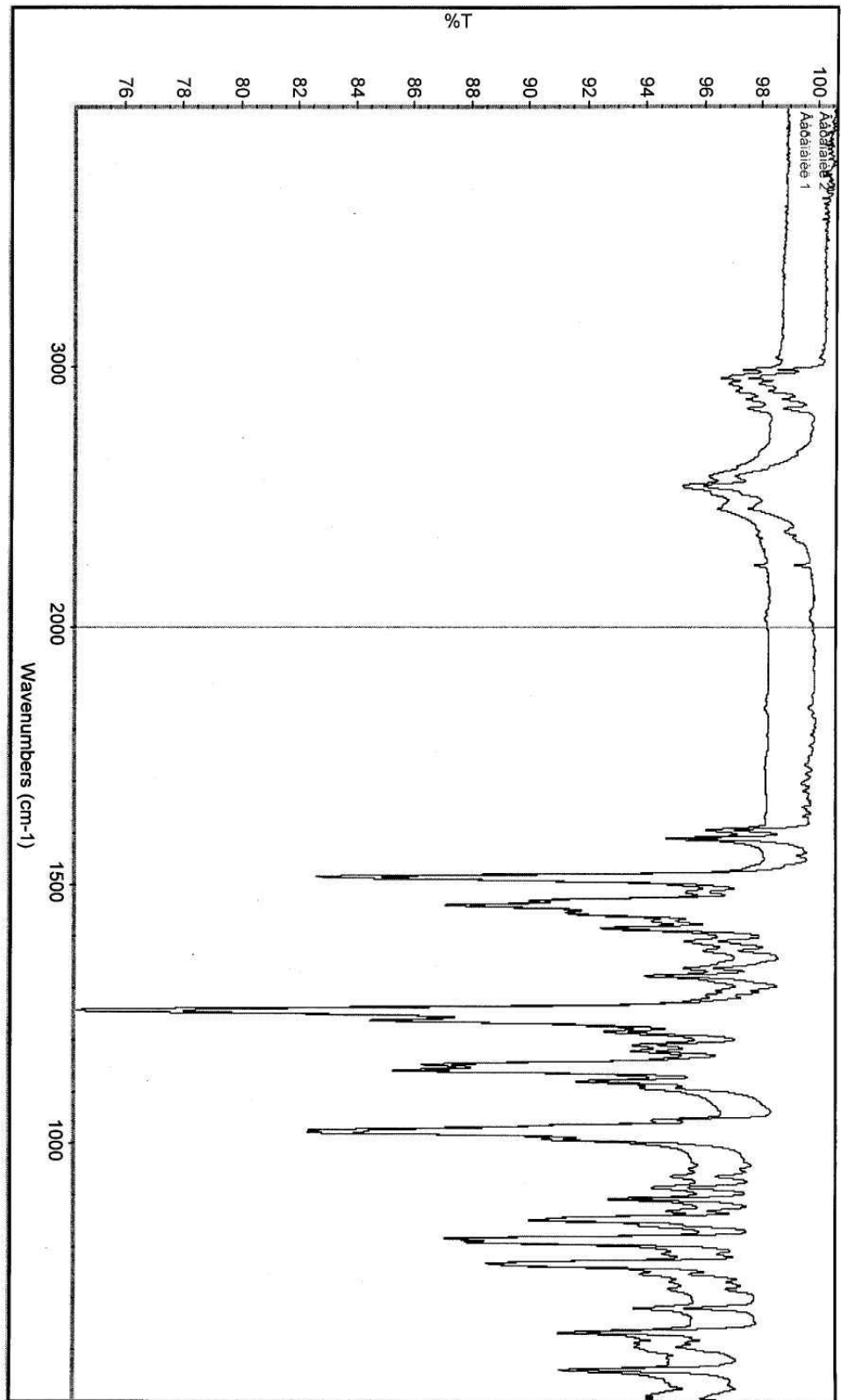


Рис. 2 Сравнение спектров образцов Верапамила 1 и Верапамила 2

INTERTECH Corporation ОТЧЕТ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА на приборе Nicolet 380

Рис. 2.12 - Наложение ИК-спектров субстанций верапамила гидрохлорида производителей 1 и 2

2.3.3. Оптическая микроскопия

Анализ кристаллов субстанций верапамила гидрохлорида производителей №1 и №2 методом оптической микроскопии (рис. 2.13, 2.14.) при 400 кратном увеличении показал достоверные различия между этими субстанциями.

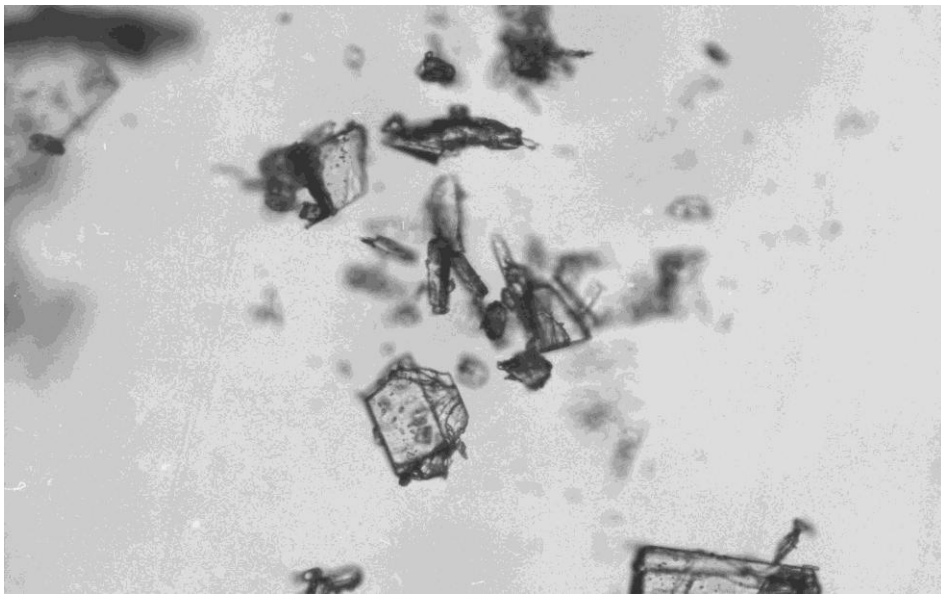


Рис. 2.13 - Фотография образца субстанций верапамила производителя №1 при 400-кратном увеличении

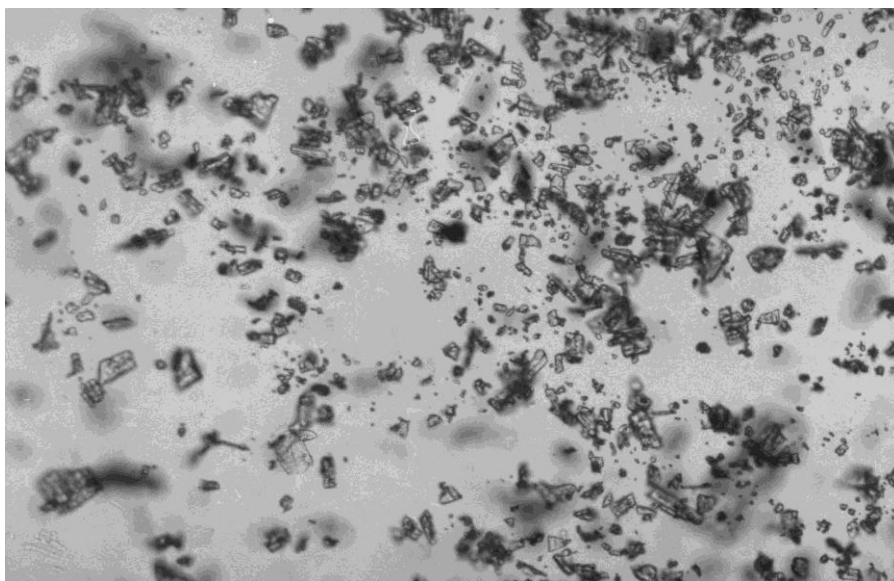


Рис. 2.14 - Фотография образца субстанций верапамила производителя №2 при 400-кратном увеличении

Видно, что сравниваемые субстанции различаются по размеру кристаллов. У производителя № 1 кристаллы субстанции верапамила гидрохлорида существенно более крупные, что должно сказываться на скорости (а возможно, и степени) растворения данного вещества и, следовательно, на биодоступности лекарственного средства при пероральном использовании.

Таким образом, разница между субстанциями верапамила гидрохлорида производителей 1 и 2 подтверждается методами ДСК и оптической микроскопии.

Следует отметить, что в настоящее время раздел «Размер частиц» в НД на фармацевтические субстанции не является обязательным. Тем не менее, ведущие фирмы-разработчики часто включают данный раздел в НД, демонстрируя таким образом преимущества своей продукции. Такой подход соответствует концепции повышения качества лекарственных средств (то есть когда вводятся дополнительные разделы в НД).

2.4. Алгоритмы изучения полиморфных и сольватных модификаций фармацевтических субстанций

Ранее нами была предложена схема изучения полиморфных превращений фармацевтических субстанций, позволяющая на этапе предрегистрационного изучения зафиксировать кристаллическое состояние вещества, для которого изучены безопасность и эффективность (рис. 2.15).

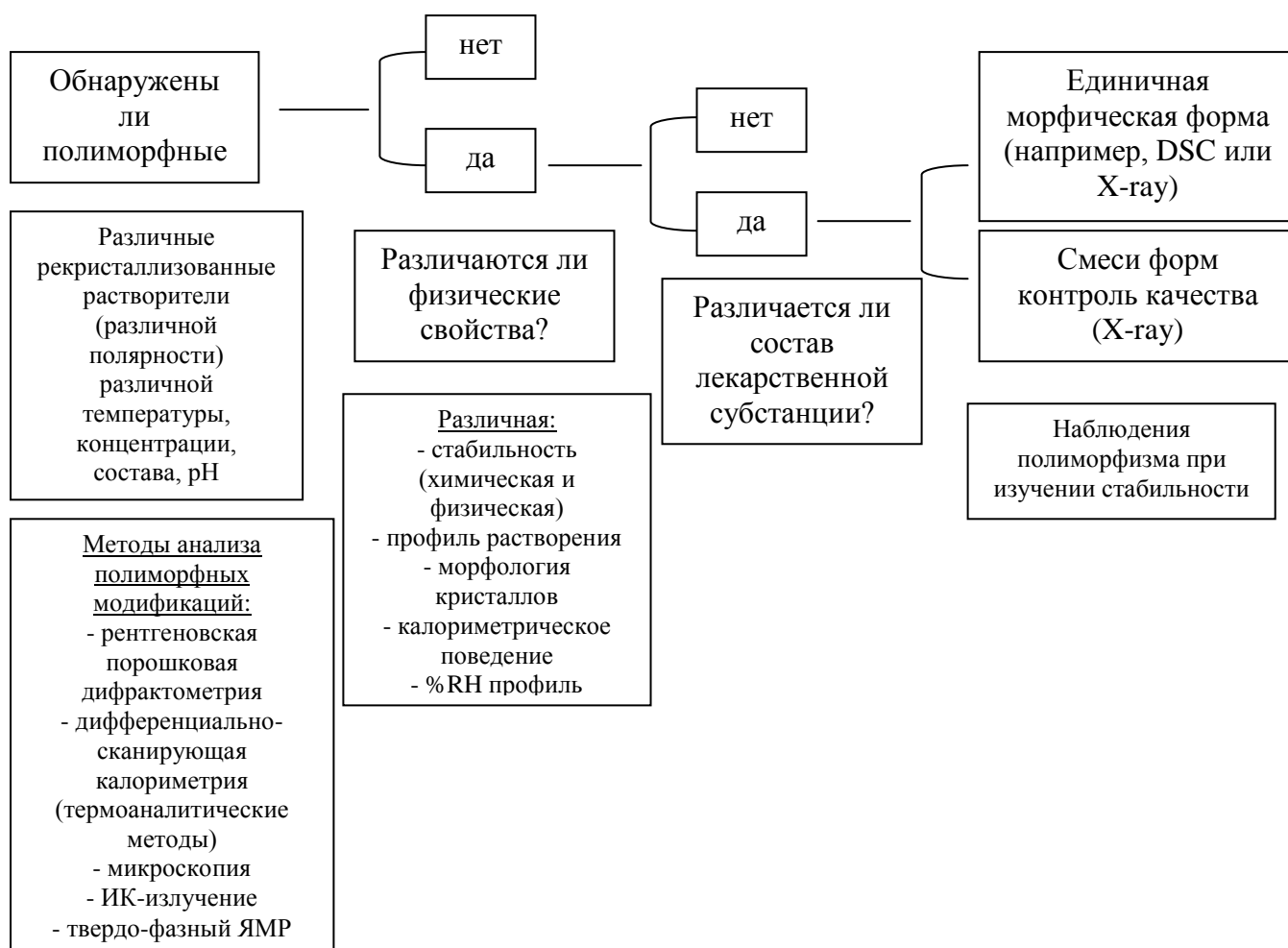


Рис. 2.15 - Схема изучения полиморфных превращений фармацевтических субстанций

Первый этап в исследовании полиморфизма заключается в изучении возможности образования полиморфных форм [133]. Для этого проводят кристаллизацию фармацевтической субстанции из различных растворителей с целью ответа на вопрос: «Возможно ли образование полиморфных форм?». Используемые растворители: вода, метанол, этанол, пропанол, изопропиловый спирт, ацетон, ацетонитрил, этилацетат, гексан и их смеси. Новые кристаллические формы часто могут быть получены путём охлаждения горячего насыщенного раствора или его частичным выпариванием. Выделенные таким образом кристаллические модификации анализируют с помощью метода рентгеновской порошковой дифракции или другими методами. В этих экспериментах может быть показано, что метод получения не влияет на тип

кристаллической формы [134,139,143]. Если анализы показали, что выделенные твёрдые формы идентичны (имеют одинаковые характеристики, например по методу рентгеновской порошковой дифракции и по ИК спектрам), то на вопрос: «Возможно ли образование полиморфных форм?» отвечаем «НЕТ» и в дальнейших исследованиях нет необходимости.

Также нами предложен алгоритм изучения гидратов (сольватов) лекарственных субстанций (рис. 2.16).

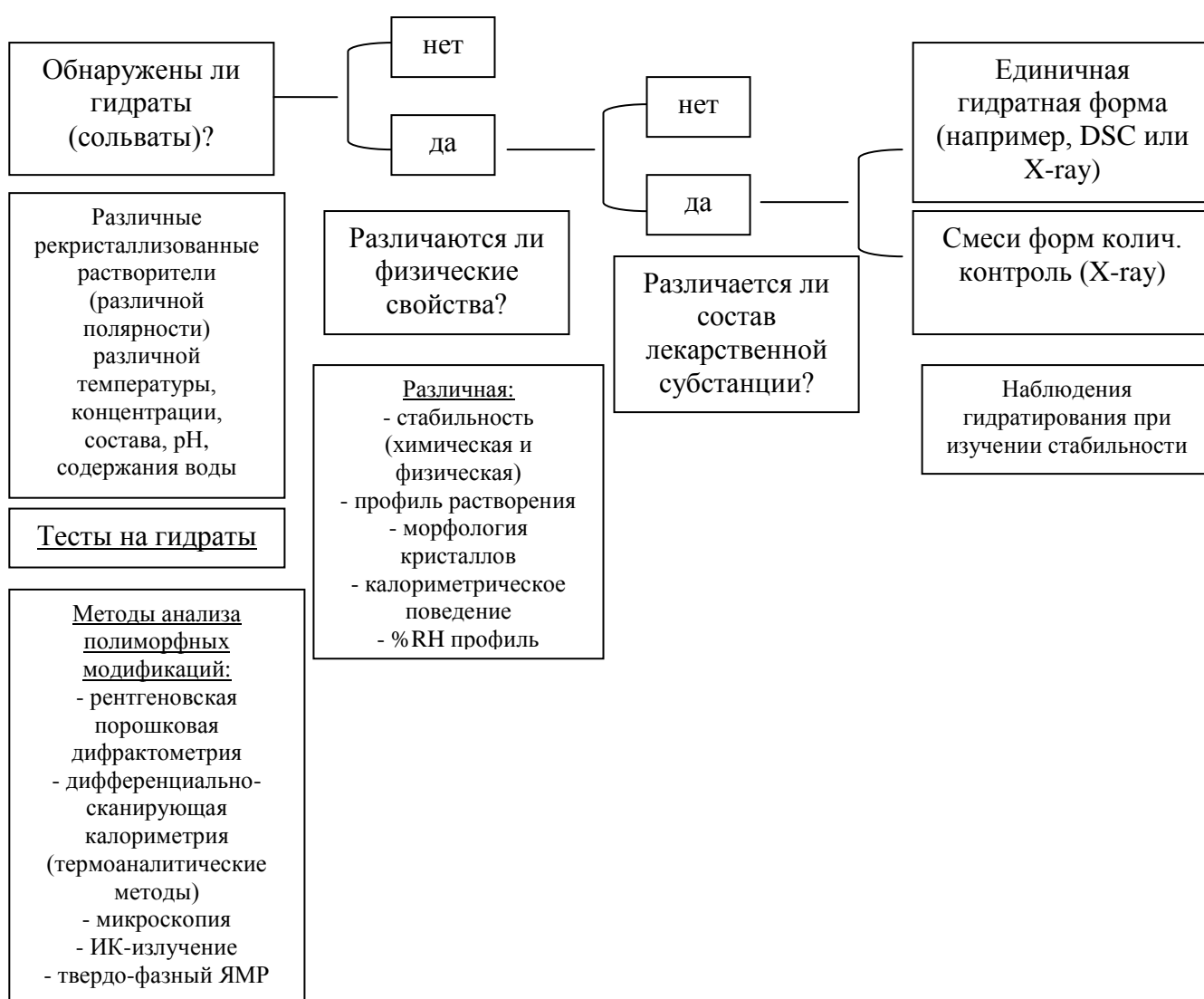


Рис. 2.16 - Схема изучения сольватов фармацевтических субстанций

Гидраты существуют, когда вещество препарата включает воду в кристаллическую решетку в стехиометрическом или в нестехиометрическом количестве. Сольваты – продукты присоединения растворителя к растворенным

веществам. Частный случай сольватов – гидраты (когда растворитель-вода). Обычно сольваты образуются в растворе, но нередко (при охлаждении раствора, испарении растворителя и др.) могут быть получены в виде кристаллических фаз – кристаллосольватов. Образование сольватов (в частном случае - гидратов) имеет существенное значение во многих промышленных процессах и может существенно влиять на растворение и фармакокинетику лекарственных препаратов.

Методология исследований сольватов (гидратов) аналогична изучению полиморфных форм. В данном случае делают упор на использование методов дифференциальной сканирующей калориметрии и термогравиметрии (ТГА).

Термогравиметрический анализ позволяет определять изменение массы образца в процессе его нагрева. ТГА широко и с успехом используется в научных исследованиях, при отработке технологии и для контроля качества продукции. В ходе одного анализа можно отдельно измерить содержание влаги и кристаллизационной воды, определить количественный состав и термостойкость образца.

Проведенные нами исследования свидетельствуют о различном качестве сравниваемых субстанций, что подтверждает возможность использования вышеуказанных алгоритмов в стандартизации и контроле качества воспроизведенных лекарственных средств.

2.5. Методы анализа в нормативной документации при регистрации фармацевтических субстанций как лекарственных средств

В настоящее время для контроля качества ЛС применяют достаточно большое количество методов. Соответствующие методики включают в нормативную документацию: фармакопейную статью предприятия (ФСП) на отечественные лекарственные средства и НД – на зарубежные.

Как показывают наши исследования и данные других авторов, для оценки качества и выявления фальсификатов лекарственных средств, особенно

фармацевтических субстанций, уже недостаточно применения стандартных аналитических методов. И, в частности, лишнее тому подтверждение – явление полиморфизма.

Действительно, можно провести установление подлинности стандартными фармакопейными методами – ИК, УФ, хроматография, химические реакции. Это позволит, например, отбраковать поддельные субстанции. Можно провести анализ чистоты теми же стандартными подходами (хроматография, УФ-спектрофотометрия, анализ примесей). Это тоже важно, в том числе и с точки зрения выявления фальсификатов. Можно провести количественное определение, и это также позволит отбраковать ряд лекарственных средств.

Но остаются, например, две субстанции разных производителей, полностью удовлетворяющие всем требованиям нормативной документации по разделам «подлинность», «чистота» и «количественное определение». Однако изготовленные из этих субстанций препараты (по абсолютно одинаковой и валидированной технологической схеме) показывают различную биодоступность и стабильность.

К этому стоит добавить и тот факт, что фальсифицированные субстанции также часто не удается выявить по стандартной фармакопейной схеме – они удовлетворяют всем испытаниям, из-за чего ряд специалистов высказывает определенный скептицизм по отношению к сложившейся системе фармакопейного анализа.

Следовательно, возникает вопрос: какие методы анализа и какие указания следует включать дополнительно в современную НД и какие данные необходимо приводить в соответствующем регистрационном досье? Что это означает на практике, например, с точки зрения оценки полиморфизма субстанций?

Наибольшую ценность с точки зрения оценки полиморфных модификаций субстанций представляют собой рентгеновская дифракция и термоаналитические методы – ДСК и ТГА.

Ценность ИК-спектроскопии для этих целей, меньше, поскольку изменения в ПМ не всегда могут приводить к регулярным изменениям в соответствующих ИК-спектрах. Этот метод стоит продолжать рассматривать как основной для установления подлинности.

Также важную информацию может дать оценка морфологии частиц субстанции методами оптической или электронной микроскопии.

Если с методами анализа всё более-менее ясно, то есть ещё и вторая сторона вопроса – экономическая. Современный аналитический арсенал позволяет провести практически любые испытания любой степени сложности. Но стоимость соответствующего оборудования может оказаться достаточно высокой, чтобы иметь его в стандартном центре контроля качества лекарственных средств.

Руководители Центра Контроля Качества Лекарственных Средств (ЦККЛС) часто говорят о существенных финансовых затратах на оснащение лабораторий. Очевидно, что каждый ЦККЛС в РФ невозможно оснастить по полной схеме всем парком современных приборов. И, естественно, мы тоже делим оборудование на первостепенное, которое обязательно необходимо иметь в ЦККЛС (в соответствии с частотой использования тех или иных методов в НД), и то, которое стоит приобретать по мере необходимости. Возможно даже использовать схему специализации, когда отдельные ЦККЛС выполняют определенные высокотехнологичные испытания, например, с использованием тех же приборов, необходимых для оценки полиморфизма продукции, поставляемой на фармацевтический рынок. Существенную роль в этом должна сыграть государственная поддержка, особенно в части создания лабораторий (ЦККЛС), которые могли бы работать в соответствии с требованиями ОМСЛ.

Исходя из вышесказанного, можно сделать следующие предложения:

1. В фармакопейные статьи ГФ РФ следует включать информацию о возможности существования лекарственного вещества в виде различных ПМ.

2. Если лекарственное вещество может демонстрировать полиморфизм, производитель лекарственного средства в регистрационном досье (в какой бы

форме оно не подавалось – Common Technical Documentation или какая-либо другая) должен представить информацию о ПМ и методах их оценки, которые данный производитель применяет в своих, «домашних» условиях.

3. Постепенно в ФС ГФ, в НД и ФСП должны включаться методы оценки ПМ – в первую очередь, термоаналитические. Тем более, что стоимость дифференциального сканирующего калориметра или термогравиметрического анализатора не является такой высокой, как, например, ЯМР-спектрометра, и в общем случае сопоставима со стоимостью стандартного жидкостного хроматографа.

2.6. Выводы по главе

1. Предложена схема изучения полиморфных превращений фармацевтических субстанций, позволяющая на этапе предрегистрационного изучения зафиксировать кристаллическое состояние вещества, для которого изучены безопасность и эффективность.

2. Предложен алгоритм изучения гидратов (сольватов) лекарственных субстанций.

3. Проведенные исследования показывают, что наибольшую ценность с точки зрения оценки полиморфных модификаций субстанций представляют собой методы рентгеновской дифракции и ДСК. Соответствующие методики анализа следует включать в НД на фармацевтические субстанции. Ценность ИК-спектроскопии для этих целей, на наш взгляд, меньше, поскольку изменения в ПМ не всегда могут приводить к регулярным изменениям в соответствующих ИК-спектрах. Этот метод стоит продолжать рассматривать как основной для установления подлинности.

4. Для оценки морфологии и размера частиц субстанций в НД следует уже сейчас в обязательном порядке включать метод оптической микроскопии, в перспективе – метод электронной микроскопии.

ГЛАВА 3. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ПРОВЕДЕНИЮ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Помимо физико-химических исследований структуры ЛП, другим важным этапом в оценке воспроизведенных препаратов является изучение биологической активности в сравнении с референтным лекарственным средством, для чего необходимо провести ряд биологических исследований *in vitro* с использованием тех же партий препарата, которые впоследствии будут использованы при проведении клинического исследования. Исследования фармакодинамики должны носить сравнительный характер и быть достаточно чувствительными для выявления различий биологической активности между сравниваемыми препаратами, а не просто оценить реакцию по существу. Эти исследования должны широко освещать функциональные аспекты активности ЛП, в особенности это касается биоаналогов (например, моноклональные антитела), хотя они могут и не иметь важного значения для оценки терапевтического действия препаратов. Исследования *in vitro* более специфичны и чувствительны, чем исследования на животных, поэтому они имеют первостепенное значение в доклиническом изучении сопоставимости.

В рамках комплекса доклинических исследований разработана программа, а также выполнена часть сравнительных фармакодинамических исследований *in vitro* воспроизведенного биологического аналога зарегистрированного в России препарата Мабтера[®] (ритуксимаб). Ритуксимаб - химерические моноклональные антитела мыши/человека, которые специфически связываются с трансмембранным антигеном CD20. Этот антиген расположен на пре-B-лимфоцитах и зрелых B-лимфоцитах, но отсутствует на стволовых гемопоэтических клетках, про-B-клетках, здоровых плазматических клетках и здоровых клетках других тканей. Этот антиген экспрессируется более чем в 95% B-клеточных неходжкинских лимфом. Ритуксимаб связывается с антигеном CD20

на В-лимфоцитах и инициирует иммунологические реакции, опосредующие лизис клеток. Возможные механизмы клеточного лизиса включают комплемент-зависимую цитотоксичность и антителозависимую клеточную цитотоксичность.

В отношении химически синтезированных воспроизведенных препаратов переход доклинических исследований с *in vivo* на *in vitro* также является актуальной проблемой. В рамках диссертационной работы было проведено изучение цитостатических эффектов оригинального препарата Гемзара (I; Эли Лилли Франс С.а. С., Франция) и воспроизведенного препарата Гемцитера (II; Лаборатория ТЮТОРС. А. С. И. Ф. И. А., Аргентина произведено Лаборатория ИМА С. А. И. С., Аргентина), содержащих в качестве активной субстанции гемцитабин, с использованием альтернативных моделей — клеточных культур нормальных фибробластов крысы, клеток рака молочной железы человека MCF-7 и рака шейки матки HeLa. Гемцитабин — один из широко применяемых современных противоопухолевых препаратов, вошедших в клиническую практику за последнее десятилетие. Поэтому создание новых лекарственных форм гемцитабина будет способствовать повышению доступности этого препарата для больных с различными опухолевыми заболеваниями, такими как немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы, мочевого пузыря, молочной железы, яичников, шейки матки и др. [27].

3.1. Материалы и методы

Комплемент-зависимая цитотоксичность

Определение биологической активности образцов проводилось методом комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦТ), с использованием комплемента человека. К клеткам WIL2-S (В-лимфобласты), культивируемым в лунках 96-луночного планшета, добавляли один из трех образцов (контрольный - Mabthera[®], стандартный – «Ритуксимаб»; отрицательный контроль - препарат Avastin[®], серия В6014В10, годен до 04 2013) в диапазоне концентраций от 100 до 0,001 мкг/мл

(каждая концентрация вносится в трех повторностях). Затем к образцам добавляли 20% раствор комплемента человека и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин, после чего добавляли краситель – аламар голубой, который метаболизируется и меняет свою окраску в зависимости от количества живых клеток и уровня их биохимической активности. Через 16-18 часов анализировали флуоресценцию на планшетном спектрофотометре (длина волны возбуждения - 560 нм, длина волны испускания - 590 нм).

Антитело-зависимая цитотоксичность

Антитело ритуксимаб стимулирует антителозависимую клеточную цитотоксичность посредством связывания с FcγRIII на поверхности цитотоксических иммунных клеток, что приводит к ускорению деградации CD20 рецепторов.

Сравнительные испытания активности проводили с использованием трех серий оригинального и трех серий тестового препаратов.

Для определения антителозависимой клеточной цитотоксичности использовались клетки Raji с высоким уровнем экспрессии CD20 рецептора (АТСС ССL-86). В случае проявления цитотоксичности, Fc фрагмент специфического антитела связывается с эффекторной клеткой, а Fab фрагмент с рецептором на поверхности мембраны клетки-мишени (Raji). «Киллеры» синтезируют и выделяют, наряду с другими, белки перфорины (подобен протеину C9 системы комплемента) и сериновые протеазы, повреждающие клеточную мембрану, в результате чего происходит лизис клеток. По уровню флуоресценции оценивали уровень цитотоксичности.

Связывание с Fc-рецепторами (поверхностный плазмонный резонанс)

Сравнительные испытания активности проводили с использованием трех серий оригинального и трех серий тестового препаратов.

Эффекторную функцию полноразмерного моноклонального антитела определяет связывание его Fc-части с рецепторами: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb,

FcγRIIb, FcγRIIIb и FcRn. Активность связывания антитела с соответствующими рецепторами является ключевой характеристикой препаратов антител.

С целью точного определения аффинности связывания 2-х белков, нативной конформации и не подверженных каким-либо модификациям, использовали высокочувствительный метод плазмонного резонанса. Поверхностный плазмонный резонанс – эффект, при котором скорость световой волны совпадает со скоростью поверхностного плазмона на металле, с иммобилизованным на его поверхности анализируемым белком 1. Скорость плазмона металла с белком 1 зависит от толщины слоя, который меняется в зависимости от количества связавшегося анализируемого белка 2 в подвижной фазе. Использовалась высокочувствительная полуавтоматическая система BiaCore (GE HealthCare, США) с программой получения и обслуживания прибора «BIAcore X Control Software», программой обработки результатов «BIAevaluation Software».

Цитотоксические эффекты препаратов гемцитабина

Культура клеток MCF-7 (рак молочной железы человека) и HeLa (рак шейки матки) были получены из банка клеток НИИ вирусологии им. Ивановского. Их культивирование осуществляли на среде DMEM, содержащей 40 мкг/мл гентамицина и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, при 37 °С и 100 % влажности. После образования клеточного монослоя проводилась трипсинизация и в 96 луночные планшеты (Co-star) вносили в виде суспензии половину от количества культивируемых в 50 см² флаконе клеток по 200 мкл/лунка.

Исследовано 2 фармакопейных образца I и II. Образцы вносили в лунки планшетов до конечных концентраций 0,01 - 4 мг/мл на питательной среде DMEM. Инкубировали планшеты в течение 48 ч. По окончании инкубации воздействие препаратов на клеточный рост определяли микроколориметрическим методом — МТТ-тестом. Метод основан на восстановлении тетраолевого кольца 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (IV) дегидрогеназами митохондрий живых пролиферирующих клеток с образованием нерастворимых фиолетовых кристаллов формазана и является стандартным для

оценки токсичности соединений в культуре. Раствор IV 10 мг/мл на питательной среде вносили по 10 мкл в лунки планшета с клетками. Среду удаляли через 4 ч инкубации, фиолетовые кристаллы формазана, выпавшие на дне лунок, растворяли в лунках планшета диметилсульфоксидом и измеряли оптическую плотность на планшетном фотометре “Униплан” (Россия, “Пикон”) при 530 нм. Полученные результаты представляли в виде средних значений 4 измерений оптической плотности (в условных единицах), с помощью стандартного математического обеспечения EXEL. Также вычисляли % жизнеспособности культур от соответствующего контроля (интактные клетки с питательной средой), принимаемого за 100 %.

Фибробласты получали из биоптатов кожи новорожденных крысят. Ткань измельчали ножницами в среде 199, содержащей 80 мкг/мл гентамицина, на фрагменты 0,5 - 1 мм³, которые помещали в культуральные флаконы. Их культивирование осуществляли на среде 199, содержащей 40 мкг/мл гентамицина и 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, при 37 °С и 100 % влажности. После образования клеточного монослоя проводилась трипсинизация и в 96 луночные планшеты (Costar) вносили в виде суспензии половину от количества культивируемых в 50 см² флаконе клеток по 200 мкл/лунка.

Исследовано 2 образца (растворы I и II на питательной среде ДМЕМ). Образцы вносили в лунки до конечных концентраций 0,01-4 мг/мл и от 0,1 до 8 мг/мл. Учет результатов осуществлялся при помощи МТТ- теста.

3.2. Программа фармакодинамических исследований ритуксимаба *in vitro*

Предлагаемая программа исследований, целью которых является подтверждение фармакологического профиля воспроизведенного препарата ритуксимаба (Деплера, производитель ЗАО «Генериум», Россия) представлена в таблице 3.1.

Таблица 3.1 - Программа исследований *in vitro* фармакодинамики (специфической активности)

Обусловленная Fc-рецептором
Сравнительное связывание с Fc γ -рецепторами: Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb и FcRn — с помощью поверхностного плазмонного резонанса (константа диссоциации)
Сравнительное связывание с Fc γ -рецепторами: Fc γ RIIIa и Fc γ RIIIb — с помощью поверхностного плазмонного резонанса (константа диссоциации)
Обусловленная Fab-фрагментом
Сравнительное связывание с поверхностным CD20 (например, клетки Wil2-s) с использованием проточной цитометрии
Сравнительное связывание с поверхностным CD20 (например, клетки Wil2-s) с использованием поверхностного плазмонного резонанса (константы ассоциации и диссоциации)
Сравнительное изучение связывающей способности с суррогатными свободными рецепторами CD20 (например, крысиные антитела к ритуксимабу)
Перекрестная тканевая реактивность с использованием иммуногистохимии
Сравнительная индукция апоптоза (клетки Raji)
Анализ высвобождения цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- γ , ФНО- α) в цельной крови человека
Обусловленная Fc-Fab-ассоциацией
Сравнительная аффинность связывания с C1q-компонентом комплемента (ИФА)
Сравнительная комплемент-зависимая цитотоксичность на клеточной линии Wil2-S
Сравнительная антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность с использованием клеток Raji в качестве мишени и мононуклеаров периферической крови здоровых доноров в качестве эффекторов

3.3. Собственные доклинические исследования фармакодинамики

В рамках представленной программы нами были разработаны ряд методов доклинического *in vitro* исследования фармакодинамики ритуксимаба и

гемцитабина. Развитие современных методов исследований *in vitro* позволит по крайней мере частично заменить доклинические исследования на животных, которые являются трудоемкими и дорогостоящими, а также травмируют подопытных животных и приводят к их гибели. Такие методы помогают помимо решения этических проблем, связанных с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных, значительно удешевить и сократить сроки предварительного исследования новых лекарственных препаратов.

3.3.1. Комплемент-зависимая цитотоксичность

Результаты теста КЗЦТ представлены в виде графиков зависимости интенсивности флюоресценции, выраженной в относительных единицах (RFU) от логарифма концентрации каждого из образцов (рис. 3.1).

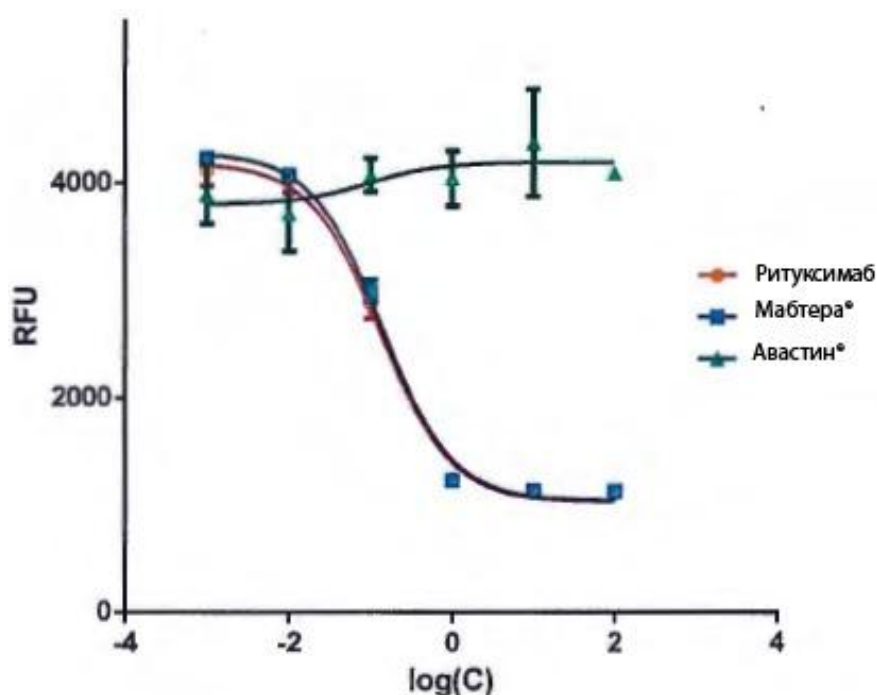


Рисунок 3.1 - Зависимость интенсивности флюоресценции красителя аламара голубого (RFU) от логарифма концентрации образцов (log(C)) в КЗЦТ тесте на культуре клеток линии WIL2-S

Зависимость аппроксимируется 4-параметрической логистической функцией, на основании которой вычислялся параметр IC50, соответствующий логарифму той концентрации образца, которая вызывает флуоресценцию, по интенсивности равную половине максимальной, а также доверительный интервал IC50 (при $p = 0,95$). Для контрольного (Мабтера[®]) и стандартного (Деплера) образцов были получены близкие значения IC50 и схожие доверительные интервалы (табл. 3.2). Для отрицательного контроля (Avastin[®]) значение IC50 не может быть корректно вычислено в связи с отсутствием тенденции к увеличению интенсивности флуоресценции при уменьшении концентрации образца.

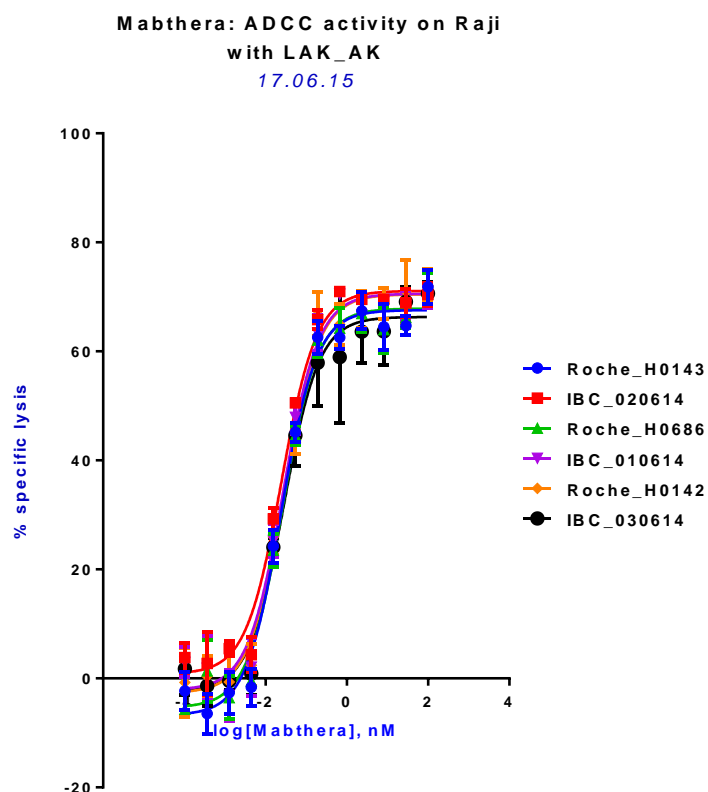
Таблица 3.2 - Значения IC50 и доверительного интервала IC50 для стандартного и контрольного образцов

Параметр	Контрольный (Мабтера[®])	Стандартный (Деплера)	Отношение стандарт/контроль, %
IC50	0,1358	0,1316	97%
Доверительный интервал IC50	0,1093-0,1687	0,0988 - 0,1754	-

Полученный результат свидетельствует о том, что стандартный образец (Деплера) в тесте КЗЦТ безусловно отличается от отрицательного контроля (Авастин[®]) и проявляет ту же активность, что и контрольный образец (Мабтера[®]).

3.3.2. Антителозависимая клеточная цитотоксичность

На рисунке 3.2 представлены кривые, полученные при измерении флуоресценции, по которым оценивали уровень цитотоксичности.



	Roche_H0143	IBC_020614	Roche_H0686	IBC_010614	Roche_H0142	IBC_030614
EC50	0.02413	0.02440	0.02604	0.02714	0.02807	0.02821
	Roche_H0143	IBC_020614	Roche_H0686	IBC_010614	Roche_H0142	IBC_030614
R square	0.9834	0.9870	0.9830	0.9826	0.9798	0.9643
	Roche_H0143	IBC_020614	Roche_H0686	IBC_010614	Roche_H0142	IBC_030614
Top	65.37 to 69.76	69.26 to 72.92	65.65 to 70.06	68.35 to 72.79	68.04 to 72.90	63.26 to 69.37

Рис. 3.2 - Результат измерения антителозависимой клеточной цитотоксичности препаратов Мабтера[®], серии Н0143, Н0686 и Н0142 и Делпера серии 010614, 020614 и 030614

Статистическая обработка результатов: среднее значение \pm стандартная ошибка.

Испытания показали, что исследуемые антитела препаратов Мабтера[®], серии Н0143, Н0686 и Н0142 и Делпера серии 010614, 020614 и 030614

проявляют антителозависимую клеточную цитотоксичность таргетных клеток линии Raji, гиперэкспрессирующих CD20 рецептор.

Специфический лизис таргетных клеток проявляемый препаратом Деллера серий (010614, 020614 и 030614) в расчете от полумаксимальной эффективной концентрации препаратов Мабтера® (серии H0143, H0686 и H0142) составляет **98,11%** (при среднем значении EC50 0,026±0,001 нМ).

Данные значения входят в рекомендуемый диапазон 80-125% от среднего значения активности оригинального препарата (для рекомендуемого диапазона EC50 составляет 0,021 – 0,032 нМ) (табл. 3.3).

Таблица 3.3 - Сравнительные значения уровня активности для серий оригинального и испытываемого препаратов в тесте АЗКЦ

Показатель	Препарат					
	Мабтера, серия H0143	Мабтера, серия H0686	Мабтера, серия H0142	Деллера, серия 020614	Деллера серия 010614	Деллера, серия 030614
EC50, нМ	0,02413	0,02604	0,02807	0,02440	0,02714	0,02821
Среднее значение, нМ	0,027±0,001			0,026±0,001		
Специфический лизис клеток ST/T*, %	98,11±1,90			100,57±11,76		
Соответствие препарата рекомендуемому диапазону 80-125% для среднего значения EC50 оригинального препарата, нМ	0,021 – 0,032			Входит в диапазон		

Примечание: * для расчета уровня специфического лизиса использовали формулу: $\frac{S}{T} \times 100\%$, где (S) – среднее значение EC₅₀ для различных серий

оригинального препарата Мабтера[®], а (Т) – среднее значение EC₅₀ для серий препарата Деплера.

3.3.3. Связывание с Fc-рецепторами (поверхностный плазмонный резонанс)

Средние значения данных активности связывания препаратов GNR-006 и Мабтера с рецепторами FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb и FcRn в сравнении со стандартом, измеренные с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 - Средние значения данных активности связывания препаратов GNR-006 и Мабтера с рецепторами FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb и FcRn в сравнении со стандартом

Препарат	Fc-Рецептор					
	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIIa	FcγRIIb	FcγRIIIb	FcRn
Мабтера [®] , серия Н0142 годен до: 01.2016, серия Н0143 годен до: 01.2016, серия Н0686 годен до: 01.2016	98.3% – 110.1% (KD = 1.465– 1.640 μM)	92.8% – 93.6% (KD = 1.884 – 1.900 μM)	94.7% – 106.0% (KD = 0.396 – 0.443 μM)	102.6% – 107.1% (KD = 12.507 – 13.055 μM)	98.8% – 100.9% (KD = 9.742 – 9.949 μM)	100.3% – 108.5% (KD = 0.622 – 0.673 μM)
Деплера, серия 010614 годен до: 07.2017, серия 020614 годен до: 07.2017, серия 030614 годен до: 07.2017	82.6% – 88.4% (KD = 1.231– 1.317 μM)	96.2% – 103.1% (KD = 1.953 – 2.093 μM)	101.5% – 103.8% (KD = 0.424 – 0.434 μM)	95.3% – 97.0% (KD = 11.617 – 11.824 μM)	102.9% – 106.2% (KD = 10.146 – 10.471 μM)	83.5% – 92.7% (KD = 0.518 – 0.575 μM)

Полученные значения относительной активности связывания препаратов Деплера, (серия 010614, серия 020614, серия 030614) входят в рекомендуемый диапазон 80-125% значений относительной активности препаратов Мабтера® (серия Н0142, Н0143 и серия Н0686).

3.3.4. Цитотоксическое действие препаратов гемцитабина

Влияние Гемзара и Гемцитеры на клетки MCF-7

Так как гемцитабин показан для лечения рака молочной железы, целесообразно использовать культуру клеток этого опухолевого заболевания — МСБ-7 — для оценки сравнительной цитостатической активности I и II. Полученные данные представлены в табл. 3.5 как в единицах оптической плотности, так и в процентах от соответствующего контроля.

Таблица 3.5 - Жизнеспособность клеток MCF-7 в присутствии Гемзара и Гемцитеры (в % от контроля)

Образец	Концентрация исследуемого образца					
	0,01 мг/мл	0,1 мг/мл	0,5 мг/мл	1,0 мг/мл	2,0 мг/мл	4,0 мг/мл
Гемзар	(0,57 ± 0,04) 92,3	(0,47 ± 0,03) 88,6	(0,535 ± 0,07) 100,9	(0,91 ± 0,06) 74,0*	(0,74 ± 0,18) 60,1*	(0,64 ± 0,08) 52,0*
Гемцитера	(0,63 ± 0,13) 118,8*	(0,56 ± 0,03) 105,6	(0,51 ± 0,03) 96,2	(0,88 ± 0,1) 71,5*	(0,61 ± 0,2) 49,6*	(0,63 ± 0,05) 51,2*

Установлено, что при 48-часовой инкубации Гемзар и Гемцитера достоверно снижают жизнеспособность клеток MCF-7 в концентрациях 1-4 мг/мл до 51,2 - 52,0 % соответственно и не влияют на их жизнеспособность в концентрациях менее 1 мг/мл.

Достоверных различий в цитостатической активности препаратов при $p = 0,05$ не обнаружено. Концентрация 4,0 мг/мл вероятно близка к предельной для данных экспериментов, так как концентрация 40 мг/мл (предельная растворимость для I и II согласно инструкции к препаратам), из которой путем разведения получали концентрацию 4 мг/мл в культуре клеток, вызывает

изменения кислотности среды инкубации, которая может влиять на жизнеспособность культуры.

Влияние Гемзара и Гемцитеры на клетки HeLa

Учитывая широкое использование противоопухолевых средств, в частности III, для терапии рака шейки матки, в качестве объекта дальнейших исследований была выбрана культура клеток HeLa, которую применяют для оценки эффективности противоопухолевых средств.

Инкубация клеток с исследуемыми препаратами проводилась в течение 48 ч. Результаты представлены в табл. 3.6 как в единицах оптической плотности, так и в процентах от соответствующего контроля.

Таблица 3.6 - Жизнеспособность клеток культуры HeLa в присутствии Гемзара и Гемцитеры (в % от контроля)

Образец	Концентрация исследуемого образца					
	0,1 мг/мл	0,5 мг/мл	1,0 мг/мл	2,0 мг/мл	4,0 мг/мл	8,0 мг/мл
Гемзар	(0,59 ± 0,16) 105,3	(1,45 ± 0,21) 109,8	(1,21 ± 0,09) 91,6	(1,02 ± 0,08) 77,2*	(0,95 ± 0,17) 71,9*	(0,49 ± 0,03) 37,1*
Гемцитера	(0,55 ± 0,11) 98,2	(1,37 ± 0,36) 103,7	(1,19 ± 0,22) 90,1	(0,97 ± 0,08) 73,4*	(0,93 ± 0,13) 70,4*	(0,53 ± 0,10) 40,1*

Установлено, что жизнеспособность клеток HeLa достоверно снижается под действием исследуемых средств, начиная с концентрации 2 мг/мл (на 27 %). Максимальный ингибирующий эффект наблюдается при концентрации I и II 8 мг/мл — снижение жизнеспособности составляет в среднем 60 %. В концентрации 4 мг/мл препараты снижают жизнеспособность клеток на 30 % (жизнеспособность клеток MCF-7 снижалась в данной концентрации на 50 %). Можно полагать, что IC₅₀ для клеток HeLa близка к 8 мг/мл. Таким образом, клетки HeLa менее чувствительны к действию исследуемых соединений, чем клетки MCF-7. Достоверных различий в действии Гемзара и Гемцитабина на данную клеточную культуру также не выявлено.

Жизнеспособность нормальных фибробластов кожи крыс в присутствии Гемзара и Гемцитеры

При лучевой терапии опухолевых заболеваний, например рака легкого, побочным эффектом является развитие пневмосклероза, разрастание соединительной ткани является нежелательным эффектом и при лечении многих других новообразований. Результаты исследования представлены в табл. 3.7 как в единицах оптической плотности, так и в процентах от соответствующего контроля.

Таблица 3.7 - Жизнеспособность клеток кожных фибробластов в присутствии Гемзара и Гемцитеры

Образец	Концентрация исследуемого образца					
	0,1 мг/мл	0,5 мг/мл	1,0 мг/мл	2,0 мг/мл	4,0 мг/мл	8,0 мг/мл
Гемзар	(0,54 ± 0,07) 94,7	(0,48 ± 0,09) 84,2	(0,49 ± 0,07) 85,9	(0,41 ± 0,08) 71,9*	(0,25 ± 0,03) 43,8*	(0,06 ± 0,05) 9,0*
Гемцитера	(0,58 ± 0,13) 101,7	(0,55 ± 0,19) 96,4	(0,61 ± 0,05) 107,0	(0,33 ± 0,08) 57,8*	(0,23 ± 0,03) 40,3*	(0,05 ± 0,01) 7,5*

Установлено, что Гемзар и Гемцитера в равной степени оказывают выраженное ингибирующее действие на фибробласты кожи крыс. Достоверное цитостатическое действие проявляется в концентрациях, сходных с таковыми для культуры рака молочной железы MCF-7. Жизнеспособность фибробластов снижается в среднем на 30 % в дозе 2 мг/мл. Снижение жизнеспособности при концентрации I и II 4 мг/мл достигает 60 %, а при концентрации 8 мг/мл наблюдается 90 % ингибирование жизнеспособности фибробластов.

Таким образом, на основании проведенного исследования влияния Гемзара и Гемцитеры на жизнеспособность 3 клеточных культур: 2 опухолевых — рака молочной железы и шейки матки — и нормальных фибробластов, установлено, что данные препараты обладают одинаковой цитостатической активностью. По чувствительности к ним исследуемые культуры можно расположить в следующем ряду: HeLa < MCF-7- < фибробласты [27].

3.4. Выводы по главе

В настоящей работе с помощью методов *in vitro* показано функциональное сходство лекарственного препарата Деплера и зарегистрированного в РФ лекарственного препарата Мабтера[®], а также лекарственного препарата Гемцитера и зарегистрированного в РФ лекарственного препарата Гемзар[®], что позволяет сделать предварительное заключение об их сопоставимой эффективности. Разработанные методики целесообразно применять в предрегистрационных исследованиях воспроизводимых ЛС. Методы актуальны и соответствуют основным требованиям альтернативной концепции Replacement (замена) – замены исследований *in vivo* на *in vitro*. Использование культур клеток позволяет установить характер биологической активности изучаемых соединений непосредственно на клеточном уровне.

Полученные результаты будут использованы для разработки регламентов пилотного и промышленного производства лекарственных препаратов Деплера и Гемцитера, а также для проведения доклинических и последующих клинических исследований препарата. Экономическая и социальная значимость внедрения более доступных, но не уступающих по безопасности, переносимости и эффективности препаратов ритуксимаба и гемцитабина в настоящее время не вызывает сомнений.

ГЛАВА 4. «БИОВЕЙВЕР» КАК АЛЬТЕРНАТИВА ИССЛЕДОВАНИЯМ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Обеспечение надежного контроля качества генериков является одной из первостепенных задач фармацевтической промышленности РФ. Согласно законодательству РФ, следующим (после доклинических исследований *in vitro* или *in vivo*) этапом подтверждения эффективности и безопасности воспроизведенного ЛП оригинальному или другому препарату сравнения являются проводимые на здоровых добровольцах или пациентах сравнительные клинические исследования или исследования биоэквивалентности. Такие исследования достаточно длительны, трудоемки и дорогостоящи, требуют решения ряда этических вопросов. В связи с этим, многими ведущими регуляторными агентствами мира по здравоохранению как альтернатива исследованиям биоэквивалентности *in vivo*, утверждена процедура биовейвер. В соответствие с последней, определение взаимозаменяемости и регистрация воспроизведенных ЛП проводятся на основании биофармацевтических свойств АФС (по БКС) и эквивалентности *in vitro*.

Классическим тестом, используемым в рамках процедуры «биовейвер» и определяющим качество генериков, подтверждающим фармацевтическую эквивалентность и позволяющим в определенных условиях предсказать эффективность *in vivo*, является тест «Растворение», характеризующий скорость и степень высвобождения АФС из ЛП в стандартных условиях.

Внедрение расширенной процедуры биовейвер, имеющей большое научно-практическое значение, способствует решению одной из важнейших задач стратегии развития фармацевтической промышленности РФ на период до 2020 г. – обеспечению импортозамещения ЛП.

4.1. Материалы и методы

Изучение сравнительной кинетики растворения проводили в соответствии с требованиями Методических Указаний МЗиСР РФ «Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств», ОФС 42-0003-04 [111].

Препараты леветирацетама

Исследуемый препарат: Леветирацетам таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг (производитель: Ривофарм СА, Швейцария).

Референтный препарат (препарат сравнения): Кеппра® таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг (производитель: ЮСБ Фарма СА, Бельгия).

Условия растворения

Прибор:	Тестер для определения растворимости таблеток PTWS 100D, Зав.№ 18129, Инв.№ 000000059
Перемешивание:	с помощью лопастной мешалки.
Скорость вращения:	50 об/мин
Среды растворения:	1. Солянокислый буфер, pH 1.2
	2. Ацетатный буфер, pH 4.5
	3. Фосфатный буфер, pH 6.8
	4. Вода
Объем:	900 мл
Температура:	37°C ± 0.5°C
Время отбора проб:	через 5, 10, 15, 20 и 30 минут

Для получения статистически достоверных результатов исследование проводили 12 раз для каждого препарата в каждой среде растворения.

Количественное определение содержания леветирацетама, перешедшее в раствор провели методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Хроматографические условия

Прибор:	Жидкостной хроматограф Shimadzu LC 20 ADXR с диодно-матричным детектором, зав.№ L20214974686, идент.№ СИ-28-06/02-01-2012
Колонка:	Eclipse XDB-C18 4.6x150мм, 5µm
Температура колонки:	25 °С
Температура автодозатора	комнатная
Детектор:	210 нм
Скорость потока:	1,0 мл/мин
Объем пробы:	10 мкл
Время хроматографирования:	5 мин
Подвижная фаза:	Буферный раствор: ацетонитрил в соотношении 90:10

Приготовление растворов

Реактивы

Аммония ацетат, ч.д.а. (Россия); динатрия гидрофосфат, ч.д.а. (Россия); лимонная кислота, Fluka; натрия хлорид, ч.д.а. (Россия); натрия гидроксид, Sigma Aldrich; уксусная кислота ледяная, осч. (Россия); хлористоводородная кислота, концентрированная, ч.д.а. (Россия); орто-фосфорная кислота, осч.12-3 (Россия); ацетонитрил, HPLC far UV/Gradient grade (J.T.Baker); вода для ВЭЖХ, gradient HPLC grade (Scharlau); рабочий стандартный образец леветирацетама; вода очищенная.

Приготовление сред растворения

Солянокислый буфер, pH 1.2

Приготовление раствора А (0.2М раствор хлористоводородной кислоты): 17.2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной поместили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, осторожно довели объем раствора до метки и перемешали.

Приготовление раствора В (0.2М раствор натрия хлорида): 11.7 г натрия хлорида поместили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, перемешали и довели

объем раствора до метки. 250 мл раствора В поместили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавили 425 мл раствора А, довели объем раствора до метки и перемешали.

Ацетатный буфер, рН 4.5

77.1 г аммония ацетата и 70 мл ледяной уксусной кислоты поместили в мерную колбу вместимостью 1 л и довели объем раствора до метки дистиллированной водой.

Фосфатный буфер, рН 6.8

Приготовление раствора А: 71.5 г динатрия гидрофосфата поместили в мерную колбу вместимостью 1 л и довели объем раствора до метки дистиллированной водой. Приготовление раствора В: 21 г лимонной кислоты поместили в мерную колбу вместимостью 1 л и довели объем раствора до метки дистиллированной водой. 773 мл раствора А (71,5 г/л раствор динатрия гидрофосфата) смешали с 227 мл раствора В (21 г/л раствор лимонной кислоты).

Приготовление стандартного раствора

Стандартный раствор для таблеток 250 мг

Около 27,7 мг (точная навеска) рабочего стандартного образца леветирацетама поместили в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворили средой растворения, довели объем раствора тем же растворителем до метки и перемешали (концентрация 0,277 мг/мл).

Стандартный раствор для таблеток 500 мг

Около 55,6 мг (точная навеска) рабочего стандартного образца леветирацетама поместили в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворили средой растворения, довели объем раствора тем же растворителем до метки и перемешали (концентрация 0,556 мг/мл).

Приготовление подвижной фазы

Приготовление буферного раствора

1 мл ортофосфорной кислоты (H_3PO_4) поместили в мерную колбу вместимостью 2000 мл, довели до метки водой для ВЭЖХ и профильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Смешали ацетонитрил с буферным раствором в объемном соотношении 10:90 и перед использованием продегазировали.

Приготовление испытуемого раствора

В каждый сосуд для растворения поместили по 900 мл среды растворения, и нагрели до $37 \pm 0,5^{\circ}C$. После достижения соответствующей температуры, в каждый сосуд поместили по одной таблетке препарата. Через указанные временные интервалы отобрали 10 мл раствора из каждого сосуда для растворения и профильтровали через фильтр ПВДФ с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

Препараты изотретиноина

СТКР проводили в трех средах со значениями pH 1.2, 4.5, 6.8 и в среде, прописанной в НД. Для каждого препарата для получения статистически достоверных результатов проводили 12 параллельных определений. Содержание высвободившегося активного ингредиента в отобранной пробе определяли методом, указанным в НД. Эквивалентность кинетики растворения оценивали исходя из фактора сходимости f_2 , который рассчитывают по уравнению:

$$f_2 = 50 * \log \left[\left(1 + (1/n \sum_{i=1}^{i=n} (R_t - T_t)^2) \right)^{-0,5} * 100 \right]$$

где:

n- число временных точек;

R_t – среднее значение высвободившегося активного ингредиента из препарата сравнения на момент времени t, %;

T_t – среднее значение высвободившегося активного ингредиента из исследуемого препарата на момент времени t, %;

Кинетика растворения лекарственного средства считается эквивалентной в случае выполнения следующих условий: значение фактора сходимости f_2 находится в интервале от 50 до 100; величина коэффициента вариации (CV) для среднего значения для первой временной точки должна быть не более 20 %, для остальных точек не более 10 %; в том случае, когда более 85 % активного ингредиента переходит в раствор из обоих препаратов в течение 15 минут, кинетика растворения считается эквивалентной без математической оценки.

Условия растворения

Прибор:	Тестер для определения растворимости таблеток PTWS 100D, Зав.№ 18129, Инв.№ 000000059
Среды растворения:	1. Солянокислый буфер, pH 1.2
	2. Ацетатный буфер, pH 4.5
	3. Фосфатный буфер, pH 6.8
	4. 0.1M NaOH
Объем:	900 мл
Температура:	37°C ± 0.5°C
Время отбора проб:	через 15, 20 и 30 минут

Условия анализа

Количественное определение содержания изотретиноина, перешедшее в раствор провели методом УФ-спектрофотометрии. Измеряли оптическую плотность испытуемых растворов на спектрофотометре SPECORD 210 PLUS (серийный номер 223F1066) в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см в максимуме поглощения при длине волны 343 нм. Содержание изотретиноина, перешедшего в раствор, в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$\% \text{ изотретиноина} = \frac{\text{Abs}_{900}}{1490} \times \frac{50}{10} \times \frac{1000}{2} \times \frac{100}{100} = \text{Abs} \times 251.68$$

Капсулы 20 мг

$$\% \text{ изотретиноина} = \frac{\text{Abs}}{1490} \times \frac{900}{20} \times \frac{100}{2} \times \frac{1000}{100} \times 100 = \text{Abs} \times 251.68$$

Где

Abs – величина оптической плотности образца

1490 – специфическая оптическая плотность А 1 % w/v раствора изотретиноина.

Приготовление растворов

Реактивы

Аммония ацетат, ч.д.а. (Россия); динатрия гидрофосфат, ч.д.а. (Россия); лимонная кислота, Fluka; натрия хлорид, ч.д.а. (Россия); натрия гидроксид, Sigma Aldrich; уксусная кислота ледяная, осч. (Россия); хлористоводородная кислота, концентрированная, ч.д.а. (Россия); орто-фосфорная кислота, осч.12-3 (Россия); ацетонитрил, HPLC far UV/Gradient grade (J.T.Baker); вода для ВЭЖХ, gradient HPLC grade (Scharlau); вода очищенная.

Приготовление сред растворения

Солянокислый буфер, рН 1.2

Приготовление раствора А (0.2М раствор хлористоводородной кислоты): 17.2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной поместили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, осторожно довели объем раствора до метки и перемешали.

Приготовление раствора В (0.2М раствор натрия хлорида): 11.7 г натрия хлорида поместили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, перемешали и довели объем раствора до метки. 10 мл раствора В поместили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавили 425 мл раствора А, довели объем раствора до метки и перемешали.

Ацетатный буфер, рН 4.5

77.1 г аммония ацетата и 70 мл ледяной уксусной кислоты поместили в мерную колбу вместимостью 1 л и довели объем раствора до метки дистиллированной водой.

Фосфатный буфер, рН 6.8

Приготовление раствора А: 71.5 г динатрия гидрофосфата поместили в мерную колбу вместимостью 1 л и довели объем раствора до метки дистиллированной водой. Приготовление раствора В: 21 г лимонной кислоты поместили в мерную колбу вместимостью 1 л и довели объем раствора до метки дистиллированной водой. 773 мл раствора А (71,5 г/л раствор динатрия гидрофосфата) смешали с 227 мл раствора В (21 г/л раствор лимонной кислоты).

0.1M NaOH

4 г гидроксида натрия поместили в мерную колбу вместимостью 1 л и довели объем раствора до метки дистиллированной водой.

Приготовление испытуемого раствора

В каждый сосуд для растворения поместили по 900 мл среды растворения, и нагрели до $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. После достижения соответствующей температуры, в каждый сосуд поместили по одной капсуле препарата. Через указанные временные интервалы отобрали 20 мл раствора из каждого сосуда для растворения и профильтровали через фильтр на поливинилидендифториде (ПВДФ) с размером пор 0,45мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

Препараты этилметилгидроксипиридина сукцината

Условия растворения

Прибор:	Тестер для определения растворимости таблеток PTWS 100D, Зав.№ 18129, Инв.№ 000000059
Перемешивание:	с помощью вращающейся корзинки.
Скорость вращения:	100 об/мин
Среды растворения:	1. Солянокислый буфер, рН 1.2
	2. Ацетатный буфер, рН 4.5

	3. Фосфатный буфер, рН 6.8
Объем:	500 мл
Температура:	37 ± 0.5 °С
Время отбора проб:	через 5, 10, 15, 30 и 45 минут

Для получения статистически достоверных результатов исследование проводили 12 раз для каждого препарата в каждой среде растворения.

Условия анализа

Измеряли оптическую плотность испытуемых и стандартных растворов на спектрофотометре SPECORD 210 PLUS (серийный номер 223F1066) в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 мм в максимуме поглощения при длине волны 272 нм, используя в качестве раствора сравнения среду растворения.

Реактивы

Аммония ацетат, ч.д.а. (Россия); динатрия гидрофосфат, ч.д.а. (Россия); лимонная кислота, Fluka; натрия хлорид, ч.д.а. (Россия); натрия гидроксид, Sigma Aldrich; уксусная кислота ледяная, осч. (Россия); хлористоводородная кислота, концентрированная, ч.д.а. (Россия); этилметилгидроксипиридина сукцинат (СО, ООО «БИОН»); вода очищенная.

Приготовление сред растворения

Солянокислый буфер, рН 1.2

Приготовление раствора А (0.2М раствор хлористоводородной кислоты): 17.2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, осторожно доводят объем раствора до метки и перемешивают. Приготовление раствора В (0.2М раствор натрия хлорида): 11.7 г натрия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, перемешивают и доводят объем раствора до метки. 250 мл раствора В помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 425 мл раствора А, доводят объем раствора до метки и перемешивают.

Ацетатный буфер, рН 4.5

77.1 г аммония ацетата и 70 мл ледяной уксусной кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 1 л и доводили объем раствора до метки дистиллированной водой.

Фосфатный буфер, рН 6.8

Приготовление раствора А: 71.5 г динатрия гидрофосфата помещали в мерную колбу вместимостью 1 л и доводили объем раствора до метки дистиллированной водой. Приготовление раствора В: 21 г лимонной кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 1 л и доводили объем раствора до метки дистиллированной водой. 773 мл раствора А (71,5 г/л раствор динатрия гидрофосфата) смешали с 227 мл раствора В (21 г/л раствор лимонной кислоты).

Приготовление стандартного образца (СО) этилметилгидроксипиридина сукцината

125 мг (точная навеска) этилметилгидроксипиридина сукцината поместили в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавили 60 мл среды растворения, перемешали до полного растворения навески, довели объем раствора средой растворения до метки и перемешали. 1,0 мл полученного раствора перенесли в мерную колбу вместимостью 100 мл, довели объем раствора средой растворения до метки и перемешали. Использовали свежеприготовленный раствор.

Приготовление испытуемых растворов

В каждый стакан для растворения помещали по 500 мл среды растворения и нагревали до 37 ± 0.5 °С. В каждый стакан для растворения помещали по одной таблетке. Отбирали пробы по 10.0 мл из каждого сосуда через 5, 10, 15, 30 и 45 минут, добавляя после каждого отбора пробы среду растворения в объеме, равном объему отобранной пробы. Отобранные пробы фильтровали через фильтр ПВДФ с размером пор 0.45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

4.2. Результаты собственных сравнительных тестов кинетики растворения применительно к различным регистрационным задачам

4.2.1. Препараты изотретиноина

СТКР в качестве дополнения к исследованию биоэквивалентности

При выполнении СТКР, проведенного в дополнение к исследованию биоэквивалентности для основной дозировки воспроизведенного лекарственного препарата, исследуемым препаратом служила та же серия той же дозировки исследуемого лекарственного препарата (Изотретиноин, капсулы 20 мг), для которого проводилось исследование биоэквивалентности. Референтным лекарственным препаратом являлась та же серия той же дозировки референтного лекарственного препарата (Роаккутан[®] капсулы, 20 мг), для которого проводилось исследование биоэквивалентности.

СТКР в качестве замены исследования биоэквивалентности (меньшая дозировка)

Данный СТКР проводился с целью подтверждения эквивалентности профилей растворения как замена исследования биоэквивалентности для дополнительной дозировки исследуемого препарата (Изотретиноин, капсулы 10 мг). В качестве референтного препарата использовалась основная дозировка того же препарата, для которой проводилось исследование БЭ (Изотретиноин, капсулы 20 мг).

Результаты

На рисунках 4.1-4.2 представлены сравнительные профили растворения изучаемых препаратов.

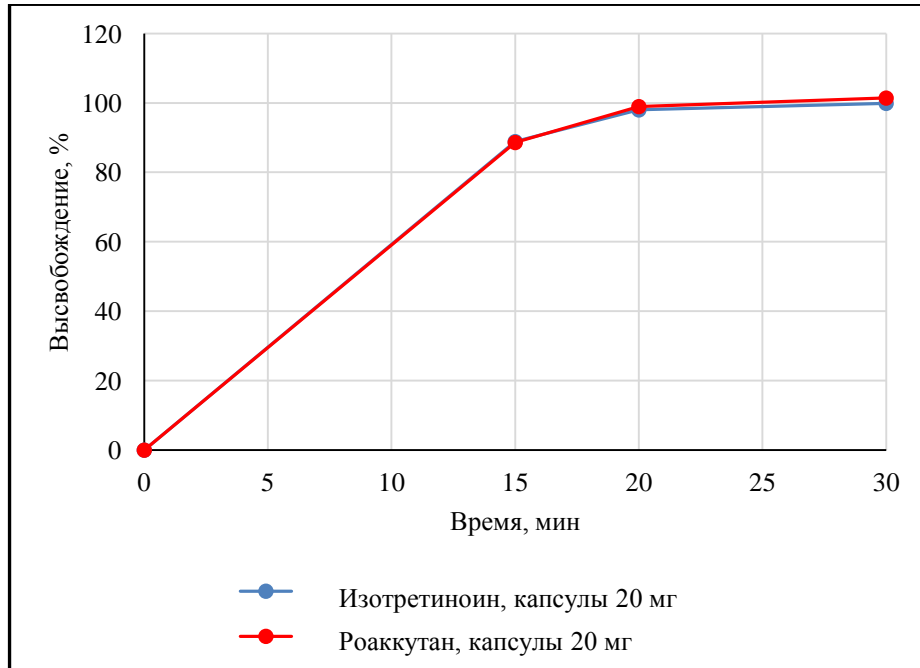


Рис. 4.1 - Сравнительный профиль растворения препаратов Изотретиноин капсулы, 20 мг и Роаккутан[®] капсулы, 20 мг в 0.1М NaOH

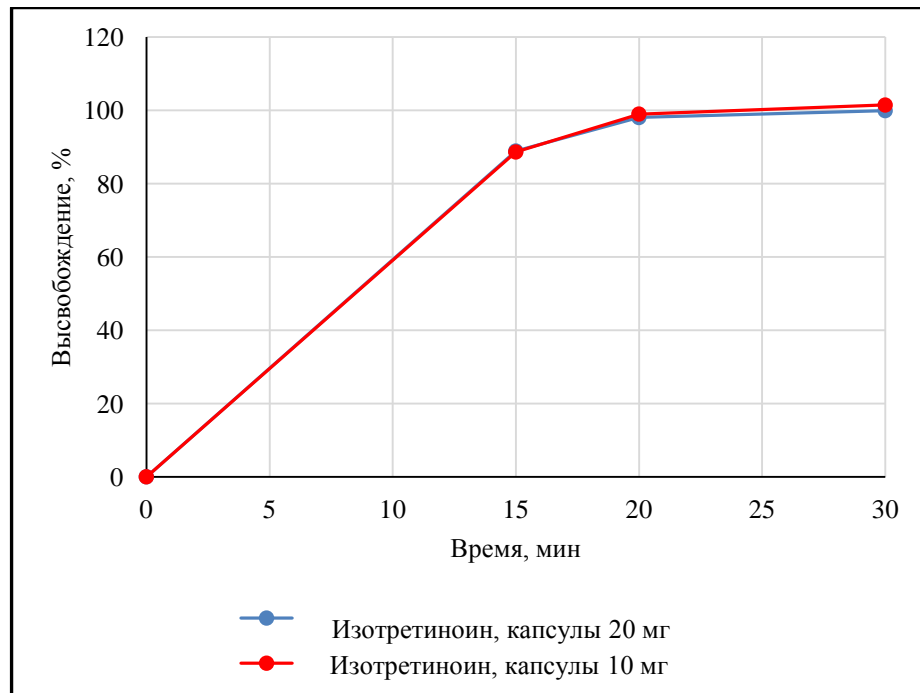


Рис. 4.2 - Сравнительный профиль растворения препаратов Изотретиноин капсулы, 10 мг и Изотретиноин капсулы, 20 мг в 0.1М NaOH

Выводы

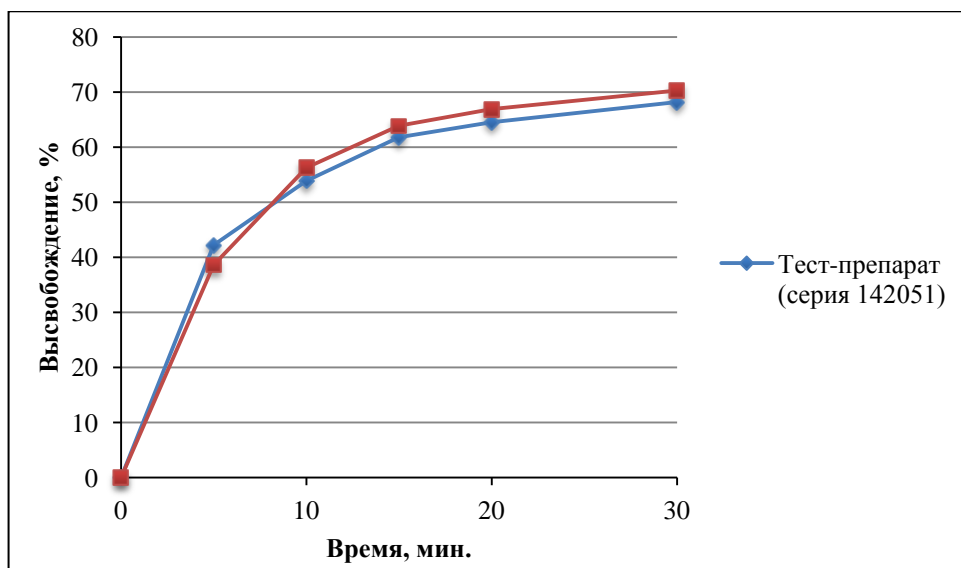
Поскольку более чем 85% изотретиноина растворяется через 15 минут в 0.1М NaOH, профили растворения в этих буферных средах считаются идентичными без дополнительного расчета фактора подобия f_2 . Поскольку изотретиноин не растворяется в средах с рН 1.2, 4.5 и 6.8 проведение сравнительной кинетики растворения в данных средах не представляется возможным.

4.2.2. Препараты леветирацетама

СТКР в качестве дополнения к исследованию биоэквивалентности

При выполнении СТКР, проведенного в дополнение к исследованию биоэквивалентности для основной дозировки воспроизведенного лекарственного препарата, исследуемым препаратом служила та же серия той же дозировки исследуемого лекарственного препарата (Леветирацетам таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг), для которого проводилось исследование биоэквивалентности. Референтным лекарственным препаратом являлась та же серия той же дозировки референтного лекарственного препарата (Кеппра[®] таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг), для которого проводилось исследование биоэквивалентности.

На рисунках 4.3-4.5 представлены сравнительные профили растворения изучаемых препаратов.



Фактор подобия $f_2 = 79.57$

Рис. 4.3 - Сравнительный профиль растворения препаратов Леветирацетам таблетки, покрытые пленочной оболочкой 500 мг и Кеппра® таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг в солянокислом буфере рН 1.2

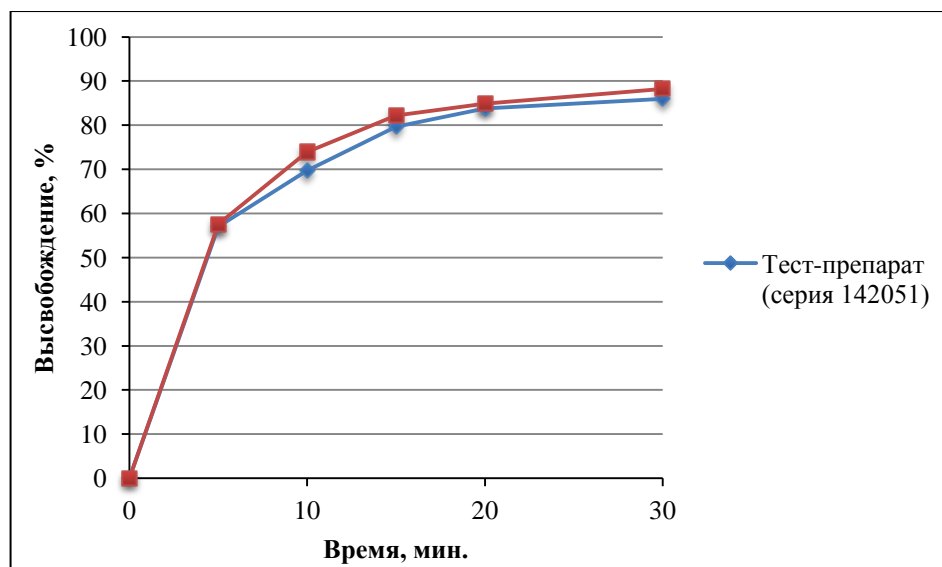


Рис. 4.4 - Сравнительный профиль растворения препаратов Леветирацетам таблетки, покрытые пленочной оболочкой 500 мг и Кеппра® таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг в ацетатном буфере рН 4.5

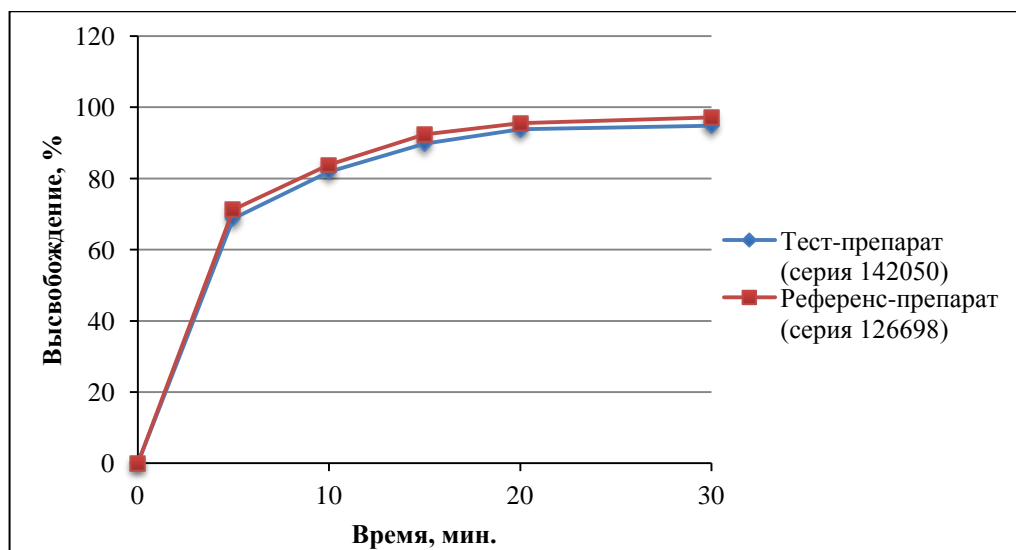


Рис. 4.5 - Сравнительный профиль растворения препаратов Леветирацетам таблетки, покрытые пленочной оболочкой 500 мг и Кешпра® таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг в фосфатном буфере pH 6.8

Поскольку более чем 80% леветирацетама растворяется через 15 минут профили растворения считаются идентичными без дополнительного расчета фактора подобия f_2 .

4.2.3. Препараты этилметилгидроксипиридина сукцината

СТКР в качестве замены исследования биоэквивалентности (изменение состава вспомогательных веществ)

Данный СТКР проводился с целью подтверждения эквивалентности профилей растворения как замена исследования биоэквивалентности при изменении состава вспомогательных веществ исследуемого препарата (этилметилгидроксипиридина сукцинат), таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 125 мг). В качестве препарата сравнения использовалась основная дозировка того же препарата со старым составом вспомогательных веществ, для которой проводилось исследование БЭ (Этилметилгидроксипиридина сукцинат – 125,0 мг).

На рисунках 4.6-4.8 представлены сравнительные профили растворения изучаемых препаратов.

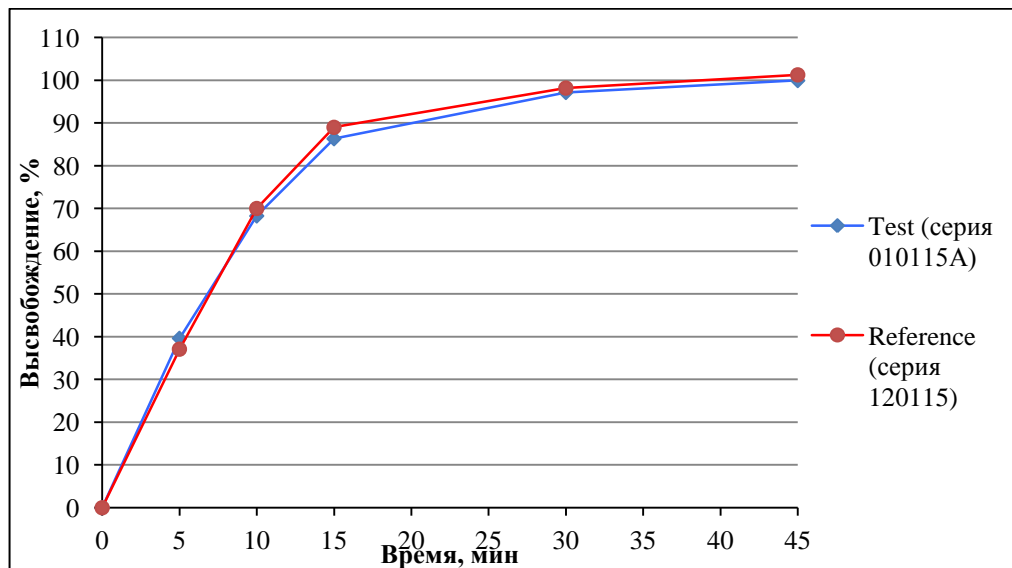
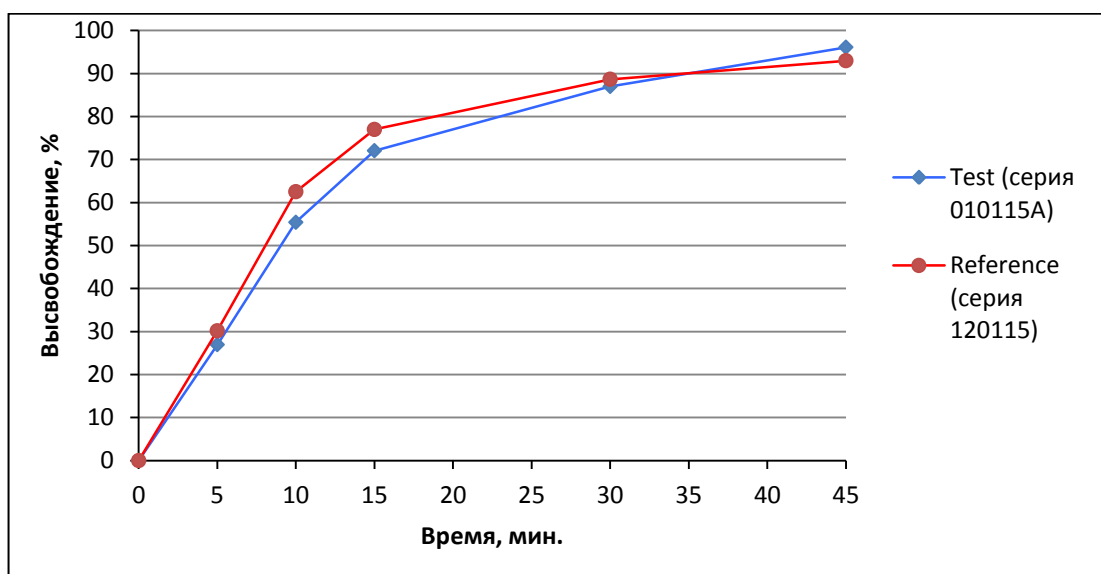
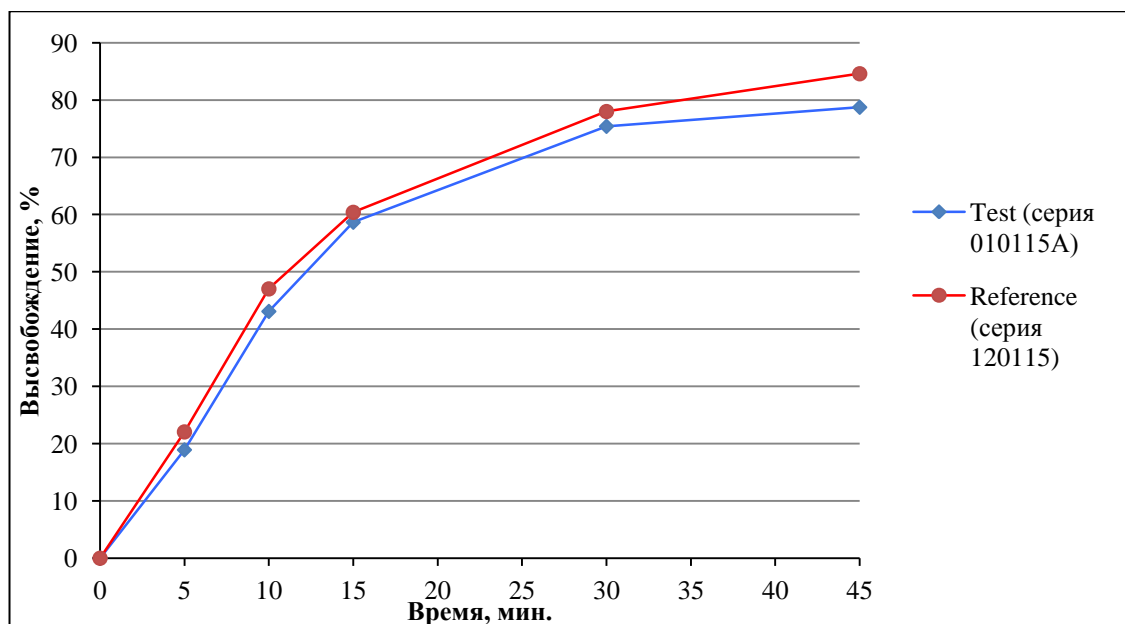


Рис. 4.6 - Сравнительный профиль растворения двух серий препарата Этилметилгидроксипиридина сукцинат таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 125 мг в солянокислом буфере



Фактор подобия $f_2 = 69.04$

Рис. 4.7 - Сравнительный профиль растворения двух серий препарата Этилметилгидроксипиридина сукцинат таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 125 мг в ацетатном буфере



Фактор подобия $f_2 = 72.53$

Рис. 4.8 - Сравнительный профиль растворения двух серий препарата Этилметилгидроксипиридина сукцинат таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 125 мг в фосфатном буфере

Выводы

Полученные значения факторов подобия f_2 для этилметилгидроксипиридина сукцината ($f_2 = 69.04$ и $f_2 = 72.53$) при растворении в ацетатном буфере и фосфатном буфере соответственно превышают критическое значение 50, что подтверждает сопоставимость кинетики растворения изучаемых серий препарата.

Поскольку более чем 85% этилметилгидроксипиридина сукцината растворяется через 15 минут в солянокислом буфере, профили растворения в этой буферной среде считаются идентичными без дополнительного расчета фактора подобия f_2 .

На основании оценки фактора подобия f_2 можно сделать вывод, что кинетика перехода активного вещества в раствор из тест-препарата (содержит вспомогательное вещество Повидон) эквивалентна кинетике перехода активного вещества из референс-препарата (содержит вспомогательное вещество Натрия карбоксиметилцеллюлозу).

4.3. Алгоритм применения сравнительного теста кинетики растворения в зависимости от регистрационных целей

В рамках проведенных исследований продемонстрированы примеры использования СТКР в зависимости от регистрационных целей:

- а) регистрация ВЛП в дополнение к исследованию БЭ для основной дозировки;
- б) замена исследования БЭ для дополнительных дозировок воспроизведенного ЛП;
- в) замена исследования БЭ при изменении состава вспомогательных веществ.

Схематично условия применения СТКР в качестве регистрационных исследований представлены на рис. 4.9.



Рис. 4.9 - Условия применения СТКР в зависимости от регистрационных целей

В России в настоящее время испытания СТКР *in vitro* применяются в регистрационных целях, ограниченных тремя вышеперечисленными примерами. Вместе с тем, с повсеместным введением в России правил GMP необходимость подтверждения эффективности воспроизведенных ЛС теряет актуальность. Подготовлены методические рекомендации, регламентирующие расширение применения процедуры «биовейвер», проводится работа по их внедрению [71].

4.4. Выводы по главе

В последние годы большое внимание уделяется производству ВЛП и замене оригинальных ЛП генериками при проведении фармакотерапии. Использование качественных генериков существенно сокращает затраты правительства на охрану здоровья и одновременно обеспечивает хорошее качество лечения.

Использованию БКС и процедуры «биовейвер» в настоящее время препятствует отсутствие перечня с однозначным распределением АФС по классам БКС [21].

Целесообразно разработать такой перечень, взяв за основу европейские данные и экстраполировать с учетом имеющихся МНН в реестре, перечне ЖНВЛП и в программе ЦФП «ФАРМА 2020» (табл. 4.1).

Таблица 4.1 - Выборочный список ЛП, зарегистрированных в РФ и относящихся к I и III классам по БКС

Класс по БКС	МНН	Лек. форма	ЖНВЛП	ОНЛС	Ассортиментн. минимум аптек	к-во действующих РУ (лекформы для приема внутрь)	к-во КИ с 2010
I	Диазепам	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		5	
I	Дигоксин	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		9	2
I	Доксициклин	капсулы	ЖНВЛП	ОНЛС	да	6	1
I	Доксициклин	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС	да	1	
I	Зидовудин	капсулы	ЖНВЛП			6	6

I	Зидовудин	таблетки	ЖНВЛП			4	
I	Леводопа+Карбидопа	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		5	3
I	Метронидазол	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		24	5
I	Пиразинамид	таблетки	ЖНВЛП			13	5
I	Преднизолон	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		13	
I	Пропранолол	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		10	2
I	Сальбутамол	таблетки пролонгир. действия	ЖНВЛП	ОНЛС	да	1	
I	Ставудин	капсулы	ЖНВЛП			7	2
I	Фенобарбитал	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		7	
I	Флуконазол	капсулы	ЖНВЛП	ОНЛС		34	10
I	Циклофосфамид	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		1	
III	Абакавир	таблетки	ЖНВЛП			6	8
III	Аллопуринол	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		4	2
III	Аскорбиновая кислота	драже	ЖНВЛП	ОНЛС	да	7	
III	Атенолол	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС	да	28	4
III	Ацетилсалициловая кислота	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС	да	18	5
III	Ацикловир	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС	да	22	1
III	Гидрохлоротиазид	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС	да	5	4
III	Каптоприл	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС	да	26	6
III	Левотироксин натрия	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		10	5
III	Метформин	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		24	20
III	Парацетамол	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС	да	20	12
III	Метформин	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		24	20
III	Парацетамол	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС	да	20	12
III	Пеницилламин	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		1	1
III	Пиридостигмина бромид	таблетки	ЖНВЛП	ОНЛС		1	1

Поэтому, представляется жизненно важной дальнейшая работа по гармонизации отечественного законодательства с западным в части замены

исследований биоэквивалентности исследованиями *in vitro*, в частности, внедрение процедуры «биовейвер» как единственного регистрационного исследования генериков на основании их биофармацевтических свойств и эквивалентности *in vitro* при соблюдении требований, предъявляемых к такой процедуре в США и ЕС (например, генерик должен содержать ФС только I класса; быть «быстрорастворимым», не абсорбироваться в ротовой полости). Так, процедура «биовейвер» может быть применена в отношении рассматриваемого выше воспроизведенного препарата леветирацетама, относящегося к I классу по БКС.

Ограничение дорогостоящих испытаний *in vivo* делает вопрос широкого применения БКС на отечественном фармацевтическом рынке чрезвычайно актуальным. Оценка биоэквивалентности методом *in vitro* вместо *in vivo* позволит производителям сэкономить значительные средства, что будет способствовать большей доступности ЛП для конечных потребителей.

Кроме того, проведение СТКР может являться полезным инструментом для пострегистрационной оценки ЛП. Так, например, при получении Росздравнадзором претензий к качеству ЛП данный метод позволит быстро и экономично провести проверку подлинности и выявить возможный фальсификат, что имеет особое значение при планировании и осуществлении госзакупок, которые должны быть максимально эффективны **при соблюдении установленного уровня бюджетных расходов.**

ГЛАВА 5. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

В тех случаях, когда процедура биоэвивер к воспроизведенным препаратам неприменима, для обоснованного заключения об эффективности и безопасности воспроизведенных ЛП проводятся исследования биоэквивалентности. В ходе таких исследований определяется концентрация действующих веществ сравниваемых препаратов с помощью различных аналитических методик, совершенствование которых, наряду с фармакогенетическими методами, является одним из актуальных способов оптимизации процедуры подтверждения аналогичности воспроизведенных ЛП.

Оральные контрацептивы, в том числе комбинированные (КОК), зарегистрированные на территории РФ, представляют собой преимущественно генерики. Они могут отличаться между собой и от референтного препарата своими эффективностью и безопасностью. Это обусловлено различиями технологии производства, вспомогательными веществами, упаковкой и хранением. Под влиянием этих факторов эффективностью таких препаратов может значительно варьироваться.

В литературе описаны различные методы количественного определения действующих веществ оральных контрацептивов. Большинство из них – колориметрия, УФ-спектрофотометрия и флуориметрия – не отвечают требованиям специфичности и не позволяют с необходимой точностью контролировать содержание эстрогена и гестагена в подобных лекарственных средствах [184].

На сегодняшний день, метод ВЭЖХ является универсальным, он позволяет оценить количественное содержание действующих веществ в оральных контрацептивах в широком диапазоне дозировок с приемлемой правильностью и воспроизводимостью. Вместе с тем, условия анализа требуют ряда уточнений и

модификаций, а стандартизация метода количественного определения эстрогенного и прогестогенного компонентов является насущной проблемой [37].

Другой проблемой, связанной с внедрением новых аналитических методик, является проведение фармакокинетических исследований орфанных препаратов, таких как митотан, который используется для лечения аденокарциномы надпочечников [216,330].

В повседневной медицинской практике концентрацию митотана в плазме крови измеряют методом ВЭЖХ-УФ [174]. Данная методика позволяет определять терапевтический уровень митотана в плазме в диапазоне между 14 и 20 мкг/мл, субтоксический уровень митотана между 20 и 30 мкг/мл, а также токсичный уровень при концентрации более 30 мкг/мл.

Однако в целях регистрации генерических препаратов митотана необходима разработка более чувствительного метода, с нижним пределом количественного определения (НПКО) около 0.1 мкг/мл. Для решения этой задачи необходимо отказаться от метода ВЭЖХ с УФ-детектированием в пользу более селективного и чувствительного метода.

5.1. Материалы и методы

Препараты дезогестрела

Дезогестрел принадлежит к семейству прогестинов класса стероидных гормонов и входит в состав оральных контрацептивов третьего поколения. Этоногестрел (3-кето-дезогестрел) – активный метаболит дезогестрела [261].

Для анализа пикограммовых уровней этоногестрела в плазме крови человека применяют экстракцию из плазмы крови, т.к. стероидные гормоны обладают большой липофильностью, а затем концентрирование образца. Используют как жидкость-жидкостную [347, 336], так и твердофазную экстракцию [172,346]. В ходе работы были опробованы методики экстракции из работ [336,346,347], однако они демонстрировали низкую селективность и

большой уровень шума. Следует отметить, что в этих методиках нижний предел количественного обнаружения (НПКО) этоногестрела не менее 100 пг/мл, тогда как нужен был НКПО не выше 40 пг/мл. Близкий НПКО (50 пг/мл) описан в работе [172], где проводили жидкость-жидкостную экстракцию дихлорметаном. А в работе [195], в которой использовали жидкостную экстракцию диэтиловым эфиром из щелочной среды, этоногестрел использовали в качестве внутреннего стандарта в концентрации 500 пг/мл. Диэтиловый эфир менее токсичен, чем дихлорметан, поэтому была разработана методика экстракции этоногестрела из плазмы крови с использованием эфира, на основе методики из работы [195]. Хроматографические условия были подобраны таким образом, чтобы добиться хорошего разделения пиков этоногестрела и мешающих компонентов матрицы. Масс-спектрометрические условия подбирались самостоятельно, т.к. литературные данные по ионизации этоногестрела в режиме электрораспыления не воспроизводились, а выбранный метод химической ионизации при атмосферном давлении оказался в 20000 раз более чувствительным. Детектирование происходило в режиме MRM, согласно литературным данным. Таким образом, на основе имеющихся в литературе данных был разработан метод определения этоногестрела в плазме крови добровольцев, удовлетворяющий требованиям протокола исследования и валидированный в соответствии с руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation» (Май 2001 г.) и руководством EMEA «Guideline on bioanalytical method validation» (Июль 2011 г.).

Стандарты

В данной методике для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества была использована субстанция этоногестрела (3-кетодезогестрела) («USP Rockville, MD», США, серия G0J223).

Биологическая матрица

Матрицей для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества служила плазма крови человека, полученная от здоровых добровольцев.

Химические реактивы

Метанол для ВЭЖХ, 99,99%, ацетонитрил для ВЭЖХ, >99.9%, вода для ВЭЖХ, муравьиная кислота, >88%, аммиак водный, ос.ч., диэтиловый эфир, ч.д.а., фенацетин, >98%, пробирки стеклянные ёмкостью 15 мл, флаконы стеклянные ёмкостью 5 мл, виалы для автосэмплера, 1,8 мл, вставки стеклянные для виал на 1,8 мл, Agilent, США.

Оборудование

1. Жидкостной хроматограф Shimadzu в составе: дегазатор DGU-20A5R; градиентные насосы LC-30AD; автосемплер SIL-30AC; термостатируемый колоночный блок CTO-20AC; 2. Масс-спектрометр с источником химической ионизации при атмосферном давлении и тройным квадрупольным масс-анализатором AB Sciex QTrap 4500; 3. Весы лабораторные электронные OHAUS Explorer EX324; 4. Автоматические дозаторы BiohitProline; 5. Смеситель лабораторный Vortex V-3; 6. Центрифуга Eppendorf 5415D. 7. Центрифуга ELMi CM-6MT.

Приготовление раствора разбавителя

Для приготовления раствора разбавителя в конической колбе смешивали 50 мл воды и 50 мл ацетонитрила. Хранили при +4°C в течение недели.

Приготовление стандартного раствора вещества и внутреннего стандарта

Для приготовления стандартного раствора этоногестрела с концентрацией 1,00 мг/мл взвесили 10,1 мг стандартного образца этоногестрела (точная навеска, содержание основного компонента 99%), поместили в мерную колбу вместимостью 10 мл и довели до метки раствором разбавителя. Стандартный раствор хранили в холодильнике при +4°C в течение месяца.

Для приготовления стандартного раствора внутреннего стандарта фенацетина (IS) взвесили 10 мг фенацетина (точная навеска), поместили в мерную колбу вместимостью 10 мл и довели до метки метанолом (концентрация 1 мг/мл). 100 мкл полученного раствора стандартного образца фенацетина поместили в мерную колбу вместимостью 10 мл и довели до метки метанолом. 1 мл полученного раствора поместили в мерную колбу вместимостью 10 мл и довели до метки метанолом. Полученная концентрация стандартного раствора фенацетина составила 1,0 мкг/мл. Стандартный раствор внутреннего стандарта хранили в холодильнике при +4°C в течение двух недель.

Приготовление сток-растворов стандартов

Для каждой аналитической серии готовили свежие сток-растворы стандартов. Конечная концентрация сток-растворов стандартов этоногестрела составила: 10,0 мкг/мл, 100 нг/мл, 40,0 нг/мл, 20,0 нг/мл, 10,0 нг/мл, 5,00 нг/мл, 2,00 нг/мл, 1,00 нг/мл, 500 пг/мл, 400 пг/мл.

Приготовление калибровочных стандартов

Для приготовления калибровочных стандартов для валидации по 50 мкл сток-раствора, содержащего известное количество стандарта этоногестрела, добавляли к 500 мкл бланковой плазмы: 40 пг/мл; 50 пг/мл; 100 пг/мл; 200 пг/мл; 500 пг/мл; 1000 пг/мл; 2000 пг/мл; 4000 пг/мл.

Приготовление образцов контроля качества

Для приготовления образцов контроля качества для валидации, 50 мкл сток-раствора, содержащего известное количество стандарта этоногестрела, добавляли к 500 мкл бланковой плазмы: 40 пг/мл; 100 пг/мл; 1000 нг/мл; 2000 нг/мл; 4000 нг/мл.

Пробоподготовка анализируемых проб

Экстракцию этоногестрела из плазмы крови проводили следующим образом: 500 мкл плазмы крови размораживали при комнатной температуре, центрифугировали в течение 10 минут при 3200 об/мин, переносили в стеклянные пробирки, добавляли 10 мкл внутреннего стандарта (фенацетин, 1,0 мкг/мл), 100

мкл аммиака водного, перемешивали на вортексе в течение нескольких секунд, далее прибавляли 2 мл диэтилового эфира, перемешивали на вортексе в течение 3 минут. Пробирки охлаждали при -80°C в течение часа, затем эфирный слой переносили в стеклянные флаконы и упаривали эфир досуха в токе азота при комнатной температуре. Сухой остаток растворяли в 300 мкл раствора разбавителя (50%-ный водный раствор ацетонитрила) перемешиванием на вортексе в течение 1 минуты, центрифугировали в течение 15 минут при 13200 об/мин, затем отбирали слой надосадочной жидкости объемом 250 мкл и переносили в виалы для автосемплера со стеклянными вставками. Виалы ставили в трэй автосемплера на 105 образцов. Объем вводимой в хроматограф пробы составлял 50 мкл.

Условия хроматографического разделения

Параметр	Значение
Хроматограф:	Высокоэффективный жидкостный хроматограф Shimadzu, снабженный двумя насосами высокого давления, онлайн дегазатором подвижной фазы, термостатом колонок, автосемплером с треем на 105 проб и масс детектором с тройным квадруполем
Колонка:	Zorbax Eclipse XDB-C18, 75x2,1 мм, размер зерна 3,5 мкм, SN USUS001272, lot B12155, Agilent, США
Предколонка	Zorbax XDB-C8, 12,5x2,1 мм, размер зерна 5 мкм, SN USHJ011089, lot B13039, Agilent, США
Температура термостата:	40°C
Режим:	Градиент: А – 0,1 водный раствор муравьиной кислоты; В – ацетонитрил
Состав подвижной фазы:	0 мин – 50% В 0,5 мин – 50% В 5 мин – 100% В 7 мин – 100% В 7,3 мин – 50% В
Скорость потока элюента:	0,4 мл/мин

Объем вводимой пробы:	50 мкл
Температура автосемплера	4°C
Раствор для промывки иглы и магистралей автосемплера:	30% вода/35% ацетонитрил/35% метанол
Параметры масс-детектора:	Химическая ионизация при атмосферном давлении <u>Этоногестрел:</u> Позитивная ионизация(MRM (E+)), m/z 325,00->109,00, энергия столкновений 40 В, время 150 мс <u>Фенацетин:</u> Позитивная ионизация(MRM (E+)), m/z 180,00->138,00, энергия столкновений 20 В, время 150 мс
Время регистрации хроматограммы:	10,0 минут

Количественное определение концентрации определяемого вещества

Использовалось автоматическое интегрирование хроматограмм с помощью программного обеспечения фирмы AB Sciex Analyst 1.6.1 build 5341. Для количественного определения использовался метод градуировочного графика с весовым коэффициентом 1/x. В качестве параметра бралось соотношение площадей пика аналита и внутреннего стандарта.

Препараты, содержащие фиксированную комбинацию дезогестрел + этинилэстрадиол

Концентрация активного метаболита дезогестрела - этоногестрела и этинилэстрадиола определялась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) в образцах плазмы крови здоровых добровольцев. Разработка метода определения этоногестрела описана в предыдущем подразделе.

Анализ пикограммовых концентраций этинилэстрадиола является нетривиальной задачей, особенно в комбинации с другими гормонами. Наиболее эффективным методом является жидкость-жидкостная или твердофазная

экстракция для селективного выделения гормонов [193,204]. Контроль pH при экстракции позволяет повысить степень извлечения и понизить концентрацию мешающих эндогенных гормонов и их метаболитов. Для увеличения чувствительности по этинилэстрадиолу было решено проводить его дериватизацию дансилхлоридом [204], что резко повышает эффективность ионизации, однако при этом нужен дополнительный этап повторной экстракции для удаления мешающего фона из дериватирующего реагента. Перепробовав несколько различных комбинаций растворителей для экстракции, было решено остановиться на комбинации 50% диэтиловый эфир/ 50% гексан. Этот экстрагент использовали и на первом этапе экстракции (для увеличения степени извлечения этинилэстрадиола плазму крови подкисляли соляной кислотой), и на втором (мешающие продукты гидролиза дериватирующего реагента на данном этапе удерживались в водной фазе благодаря использованию карбонатного буфера). В основу методики совместного анализа 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола легли разработанные ранее методики анализа 3-кетодезогестрела, совместного определения хлормадинона ацетата и этинилэстрадиола, а также статьи [172,193,195,204,261,336,346,347].

Таким образом, на основе имеющихся в литературе данных, разработан и валидирован биоаналитический метод совместного определения 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола в плазме крови человека на LiHeparine с применением ВЭЖХ-МС/МС системы, удовлетворяющий требованиям протокола исследования и валидированный в соответствии с руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation» (Май 2001 г.) и руководством ЕМЕА «Guideline on bioanalytical method validation» (Июль 2011 г.). Все указанные характеристики метода, за исключением стабильности при хранении при комнатной температуре, а также после 3-х циклов заморозки/разморозки, соответствуют критериям приемлемости, и, таким образом, делают его пригодным для совместного количественного определения 3-кетодезогестрела и

этинилэстрадиола в плазме крови человека на LiHeparine при исследовании фармакокинетики и биоэквивалентности.

Реагенты

Ацетонитрил, HPLC Far UV/Gradient Grade; ацетонитрил, gradient HPLC; муравьиная кислота, 88; муравьиная кислота, Optima LC/MS; метанол, Multisolvent HPLC grade; диэтиловый эфир, «чда»; ацетон; Н-Гексан, UV-IR-HPLC; дансилхлорид; деионизованная вода, сопротивление 18 МОм*см; натрий углекислый (карбонат натрия б/в, «хч»).

Оборудование

ВЭЖХ система LC-30-Nexera (Shimadzu); Гибридный масс-спектрометр с тройным квадруполом и ионизацией электроспреем LC-MS 8060, (Shimadzu); Программное обеспечение LabSolutions 5.80 (Shimadzu);

Газовый генератор Genius 1051 (Peak Scientific); Весы аналитические (OHAUS); Шейкер ELMi S-3.10T; Центрифуга ELMi CM-6MT; Морозильник Forma 8600 Sreies (Thermo Scientific); Водяная баня WNB10 (Memert).

Одноканальные дозаторы переменного объема (Biohit-Sartorius).

Приготовление растворов. Условия хранения

H₂O +0.1%CH₃COOH (1): 500 мкл CH₃COOH растворяли в 100 мл воды, затем доводили объем водой до 500 мл. Хранение при комнатной температуре.

70/30 (v/v) – MeOH/H₂O (2): к 140мл MeOH добавляли 60 мл H₂O дис. Хранение при комнатной температуре.

50/50 (v/v) – ACN/H₂O (3): к 100мл ACN добавляли 100 мл H₂O дис. Хранение при комнатной температуре.

Карбонатный буфер 0,1 М, рН 11,07 (4): 2,65 г безводного карбоната натрия растворяли в 250 мл H₂O дис. Хранили при комнатной температуре.

Раствор дансилхлорида в ацетоне 1,0 мг/мл (5): 50,0 мг дансилхлорида растворяли в 10,0 мл ацетона, затем доводили ацетоном до 50,0 мл. Хранили при -20°C.

Матрикс: пулированная LiHeparine плазма человека, полученная от мужчин. Хранили при -80°C .

Основные растворы соединений:

Навеска 3-кетодезогестрела 10,0 мг была растворена в 10,0 мл метанола, концентрация полученного основного раствора 3-кетодезогестрела с учетом чистоты составила 1,00 мг/мл. Навеска этинилэстрадиола 10,0 мг была растворена в 10,0 мл метанола, концентрация полученного основного раствора этинилэстрадиола с учетом чистоты составила 1,00 мг/мл. Навеска хлормадинона ацетата 10,0 мг была растворена в 10,0 мл метанола, концентрация полученного основного раствора хлормадинона ацетата с учетом чистоты составила 1,00 мг/мл. Основные растворы хранились при -20°C .

Приготовление калибровочных и КК стандартов

Калибровочные стандарты (спайки) и КК образцы были приготовлены в пулированной плазме человека с концентрациями 3-кетодезогестрела в диапазоне 50,0-10000 пг/мл, этинилэстрадиола 2,00-500 пг/мл. Пулированная интактная плазма, используемая для приготовления образцов-спайков, была разморожена при комнатной температуре, перемешана и отцентрифугирована при 2300g в течение 5 минут.

Пулированную плазму разливали по 1000 мкл в стеклянные флаконы на 10 мл. Затем готовили калибровочные образцы и образцы КК. Дозатором вносили 10 мкл ВС (500 нг/мл) во все пробы, кроме d-bl. Затем вносили по 10 мкл 100-кратных рабочих растворов 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола для калибровочной кривой и набора КК. Дозатором вносили 50 мкл муравьиной кислоты LC/MS, 2,00 мл диэтилового эфира и 2,00 мл н-гексана, перемешивали на шейкере при 500 об/мин 10 мин. Далее ставили образцы в морозильную камеру при температуре -80°C на 15-20 мин. Затем количественно переливали экстракт в чистые стеклянные флаконы на 10 мл и выпаривали досуха в токе воздуха при комнатной температуре. После этого добавляли по 100 мкл карбонатного буфера (4) и по 100 мл раствора дансилхлорида (5), перемешивали на шейкере при 500

об/мин 5 мин. Затем образцы ставили на водяную баню при 60°C на 30 мин, после чего добавляли по 1,00 мл диэтилового эфира и 1,00 мл н-гексана, перемешивали на шейкере при 500 об/мин 5 мин. Далее ставили образцы в морозильную камеру при T = -800C на 15-20 мин. Затем количественно переливали экстракт в чистые стеклянные флаконы на 10 мл и выпаривали досуха в токе воздуха при комнатной температуре. После выпаривания добавляли по 300 мкл раствора (3) и перемешивали на шейкере при 500 об/мин 10 мин, после чего переносили по 270 мкл образцов в вials со стеклянными вставками. По 50 мкл образца инжесктировались в ВЭЖХ-МС/МС систему.

Параметры ВЭЖХ

Растворитель А	H ₂ O+0.1%CH ₃ COOH			
Растворитель В	ACN			
Прелколонка	Agilent XDB-C8 5µm, 2.1mm x 12,5mm (ID: 3K-007)			
Хроматографическая колонка	Supelco Discovery C18 5µm, 2.1mm x 150mm (ID:ХК-007)			
Градиент	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	%А	%В
	0,0	0,3	40	60
	6,0	0,3	0	100
	7,5	0,3	0	100
	7,51	0,3	40	60
Температура колонки	40°C			
Температура образцов в автосэмплере	4°C			
Объем инъекции	50 мкл			
Общее время анализа	9 мин			
Время удерживания	3-кетодезогестрел			2,76 мин
	дансил-этинилэстрадиол			5,17 мин
	хлормадинона ацетат (BC)			3,22 мин

Параметры МС/МС

Тип источника ионов					ESI
Режим ионизации					Положительный
Газ – распылитель (Nebulizing Gas)					3
Газ – осушитель (Drying Gas)					10
Газ-нагреватель (Heating Gas)					10
Газ для соударений (CID Gas)					270 kPa
Температура источника, °C					400
Напряжение в источнике (IS), В					4000
Аналит	Q1→Q3 переход	Dwell, мсек	Q1 Pre-Bias, В	Энергия соударений (CE), В	Q3 Pre-Bias, В
3-кетодезогестрел	325.10→109.10*	100	-15	-29	-10
	325.10→147.20		-30	-24	-29
дансил-этинилэстрадиол	530.10→171.25	100	-24	-39	-17
	530.10→156.25		-26	-55	-15
	530.10→451.20*		-24	-32	-21
хлормадинона ацетат (BC)	405.05→345.05	100	-11	-15	-16
	405.05→301.05*		-19	-22	-20

Препараты, содержащие фиксированную комбинацию хлормадинон + этинилэстрадиол

Концентрация хлормадинона и этинилэстрадиола определялась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) в образцах плазмы крови здоровых добровольцев. Разработка метода определения этинилэстрадиола описана в предыдущем подразделе.

В основу методики совместного анализа хлормадинона ацетата и этинилэстрадиола легла разработанная ранее методика анализа 3-кето-дезогестрела, а также статей:

1) A Sensitive LC-MS/MS method for the Quantification of Ethinyl Estradiol and Drospirenone in Human Plasma.

2) Reza et al. Derivatisation of Ethinyl estradiol with Dansyl Chloride To Enhance Electrospray Ionization: Application in Trace Analysis of Ethinyl estradiol in Rhesus Monkey Plasma. *Analytical Chemistry*. 2002 74 (16), 4136

3) Borges et al. A novel and sensitive method for ethinylestradiol quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure photoionization (APPI) tandem mass spectrometry: application to a comparative pharmacokinetics study. *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 3601–3609

Для увеличения чувствительности по этинилэстрадиолу было решено проводить его дериватизацию дансилхлоридом, что резко повышает эффективность ионизации, однако при этом нужен дополнительный этап повторной экстракции для удаления мешающего фона из дериватирующего реагента. Кроме того, важное влияние на степень извлечения гормонов и внутреннего стандарта и селективность по анализам имеет состав растворителя для экстракции, а также рН матрицы, из которой экстрагируют гормоны. Оптимальным состав для экстракции этинилэстрадиола – смесь 75% гексан/ 25%

этилацетат, однако он дает не очень высокую степень извлечения хлормадинона ацетата и достаточно высокий фон в области выхода пика хлормадинона. Перепробовав несколько различных комбинаций растворителей для экстракции было решено остановиться на комбинации 50% диэтиловый эфир/ 50% гексан. Этот экстрагент использовали и на первом этапе экстракции (для увеличения степени извлечения этинилэстрадиола плазму крови подкисляли соляной кислотой), и на втором (мешающие продукты гидролиза дериватизирующего реагента на данном этапе удерживались в водной фазе благодаря использованию карбонатного буфера). Таким образом, на основе имеющихся в литературе данных, был разработан метод определения хлормадинона ацетата и этинилэстрадиола в плазме крови добровольцев, удовлетворяющий требованиям протокола исследования и валидированный в соответствии с руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation» (Май 2001 г.) и руководством ЕМЕА «Guideline on bioanalytical method validation» (Июль 2011 г.).

Стандарты

В данной методике для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества была использована субстанции хлормадинона ацетата ("СНЕМО", Code: 101187) и этинилэстрадиола ("СНЕМО", Code: 100697), полученные от Спонсора исследования.

Биологическая матрица

Матрицей для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества служила плазма крови человека, полученная от здоровых добровольцев мужского пола (бланковая плазма), чтобы исключить возможное влияние эндогенных женских половых гормонов близкой структуры.

Химические реактивы

1. Ацетонитрил для ВЭЖХ, >99.9, вода для ВЭЖХ, муравьиная кислота, >88%, метанол для ВЭЖХ, >99.9%, фенацетин, >98%, ацетон «ОСЧ 9-5», гексан «ХЧ», диэтиловый эфир «ЧДА», дансилхлорид, кислота соляная «ОСЧ».

Оборудование

1. Жидкостной хроматограф Shimadzu в составе: дегазатор DGU-20A5R; градиентные насосы LC-30AD; автосемплер SIL-30AC; термостатируемый колоночный блок CTO-20AC;

2. Масс-спектрометр с источником химической ионизации при атмосферном давлении и тройным квадрупольным масс-анализатором AB Sciex QTrap 4500;

3. Весы лабораторные электронные OHAUS Explorer EX324;

4. Автоматические дозаторы BiohitProline;

5. Смеситель лабораторный ELMi Vortex V-3;

6. Центрифуга Eppendorf 5415D;

7. Центрифуга ELMi CM-6MT.8. Водяная баня

8. Центрифужный испаритель Eppendorf 5301 Concentrator.

Приготовление раствора разбавителя, экстрагента и дериватизирующего реагента

Для приготовления раствора разбавителя в конической колбе смешивали 50 мл воды и 50 мл ацетонитрила. Хранили при +4°C в течение недели. Экстрагент готовили смешением одинаковых объёмов гексана и диэтилового эфира непосредственно перед проведением процедуры экстракции. Дериватизирующий реагент готовили следующим образом: взвешивали 50 мг дансилхлорида, переносили в мерную колбу на 50 мл и добавляли ацетон до метки. Тщательно перемешивали и получали раствор дансилхлорида с концентрацией 1 мг/мл.

Приготовление стандартных растворов вещества и внутреннего стандарта

Для приготовления стандартного раствора хлормадинона ацетата с концентрацией 1,00 мг/мл взвесили 25,0 мг стандартного образца хлормадинона ацетата (точная навеска), поместили в мерную колбу вместимостью 25 мл и довели до метки ацетонитрилом. Полученный стандартный раствор хранили в течение месяца в холодильнике при +4°C.

Для приготовления стандартного раствора этинилэстрадиола с концентрацией 1,00 мг/мл взвесили 10,0 мг стандартного образца хлормадинона ацетата (точная навеска), поместили в мерную колбу вместимостью 10 мл и довели до метки ацетонитрилом. Полученный стандартный раствор хранили в течение месяца в холодильнике при +4°C.

Для приготовления стандартного раствора внутреннего стандарта фенацетина (IS) взвесили 10 мг фенацетина (точная навеска), поместили в мерную колбу вместимостью 10 мл и довели до метки метанолом (концентрация 1 мг/мл). 100 мкл полученного раствора стандартного образца фенацетина поместили в мерную колбу вместимостью 10 мл и довели до метки метанолом. Полученная концентрация промежуточного стандартного раствора фенацетина составила 10,0 мкг/мл. Затем 1,00 мл полученного промежуточного раствора поместили в мерную колбу вместимостью 10 мл и довели до метки метанолом, финальная концентрация промежуточного стандартного раствора фенацетина составила 1,00 мкг/мл. Стандартный раствор внутреннего стандарта хранили в холодильнике при +4°C в течение двух недель.

Приготовление сток-растворов стандартов

Для каждой аналитической серии готовили свежие сток-растворы стандартов. Конечная концентрация сток-растворов стандартов хлормадинона ацетата составила: 10,0 мкг/мл, 1,00 мкг/мл, 500 нг/мл, 200 нг/мл, 100 нг/мл, 50,0 нг/мл, 20,0 нг/мл, 10,0 нг/мл, 5,00 нг/мл, 2,00 нг/мл. Конечная концентрация сток-растворов стандартов этинилэстрадиола составила: 10,0 мкг/мл, 100 нг/мл, 50,0 нг/мл, 20,0 нг/мл, 5,00 нг/мл, 2,00 нг/мл, 1,00 нг/мл, 500 пг/мл, 200 пг/мл, 100 пг/мл.

Приготовление калибровочных стандартов

Для приготовления калибровочных стандартов для валидации к 1,00 мл бланковой плазмы добавляли по 10 мкл сток-растворов с известной концентрацией хлормадинона ацетата: 50 пг/мл; 100 пг/мл; 200 пг/мл 500 пг/мл,

1000 пг/мл; 2000 пг/мл; 5000 пг/мл; 10000 пг/мл; и этинилэстрадиола: 2 пг/мл; 5 пг/мл; 10 пг/мл; 20 пг/мл; 50 пг/мл; 100 пг/мл; 200 пг/мл; 500 пг/мл.

Приготовление подвижной фазы (элюент А)

0,1% раствор муравьиной кислоты (pH=4,0): в мерную колбу на 1 литр помещали 1 мл муравьиной кислоты, доводили водой для ВЭЖХ до метки и перемешивали.

Приготовление образцов контроля качества

Для приготовления образцов контроля качества для валидации, валидации к 1,00 мл бланковой плазмы добавляли по 10 мкл сток-растворов с известной концентрацией хлормадинона ацетата: 200 пг/мл; 5000 пг/мл; 10000 пг/мл; этинилэстрадиола: 2 пг/мл; 200 пг/мл; 500 пг/мл.

Пробоподготовка

Для повышения чувствительности определения этинилэстрадиола использовали его дериватизацию дансилхлоридом для введения легкоионизирующегося фрагмента третичного амина. При этом этинилэстрадиол переходит в дансилэтинилэстрадиол, а хлормадинона ацетат остается в неизменном виде. Совместную экстракцию хлормадинона ацетата и этинилэстрадиола из плазмы крови проводили следующим образом: плазму крови размораживали при комнатной температуре, центрифугировали в течение 5 минут при 3200 об/мин, 1000 мкл плазмы крови переносили в чистые стеклянные пробирки объёмом 15 мл, добавляли по 10 мкл раствора внутреннего стандарта в метаноле (концентрация 1,00 мкг/мл) и 100 мкл 1М соляной кислоты, встряхивали на вортексе, далее добавляли по 4 мл экстрагента (50/50 гексан/диэтиловый эфир), перемешивали на вортексе в течение 3 минут. Затем пробы замораживали в холодильнике при -80°C, органический слой переносили в стеклянные виалы объёмом 5 мл и выпаривали растворитель досуха в токе азота при комнатной температуре. После этого в виалы добавляли по 100 мкл раствора карбоната натрия (4,0 г/л) и 100 мкл раствора дансилхлорида в ацетоне (1 мг/мл), ставили в водяную баню при 60°C на полчаса, затем прибавляли по 2 мл экстрагента (50/50

гексан/диэтиловый эфир), перемешивали на вортексе в течение 2 минут. Пробы замораживали в холодильнике при -80°C , органический слой переносили в стеклянные виалы объемом 2 мл и выпаривали растворитель досуха в центрифужном испарителе при 30°C . После этого в виалы добавляли по 300 мкл разбавителя (50%-ный водный ацетонитрил), встряхивали на вортексе в течение 1 минуты, переносили в микропробирки Eppendorf и центрифугировали в течение 10 минут при 13200 rpm. По 250 мкл упернатанта переносили в стеклянные виалы со стеклянными вставками.

Хроматографический анализ

Условия хроматографического разделения

Параметр	Значение
Хроматограф:	Высокоэффективный жидкостный хроматограф Shimadzu, снабженный двумя насосами высокого давления, онлайн дегазатором подвижной фазы, термостатом колонок, автосемплером с треем для плашек и масс детектором с тройным квадруполем
Предколонка	Zorbax XDB-C8, 12,5x2,1 мм, размер зерна 5 мкм, SN USHJ011089, lot B13039, Agilent, США
Колонка:	Zorbax Eclipse XDB-C18, 75x2,1 мм, размер зерна 3,5 мкм, SN USUS001272, lot B12155, Agilent, США
Температура термостата:	40°C
Режим:	Градиент: А – 0,1 водный раствор муравьиной кислоты; В – ацетонитрил
Состав подвижной фазы:	0 мин – 50% В 0,5 мин – 50% В 5 мин – 100% В 6 мин – 100% В 6,3 мин – 50% В
Скорость потока элюента:	0,4 мл/мин
Объем вводимой пробы:	50 мкл

Раствор для промывки иглы:	30% вода/35% ацетонитрил/35% метанол
Параметры масс-детектора:	<u>Хлормадинона ацетат:</u> Позитивная ионизация(MRM (E+)), m/z 405,2->345,0 <u>Дансилэтинилэстрадиол:</u> Позитивная ионизация(MRM (E+)), m/z 530,2->171,1 <u>Фенацетин:</u> Позитивная ионизация(MRM (E+)), m/z 180,0->138,0
Время регистрации хроматограммы:	7 минут

Количественное определение концентрации определяемого вещества

Использовалось автоматическое интегрирование хроматограмм с помощью программного обеспечения фирмы AB Sciex Analyst 1.6.1 build 5341. Для количественного определения использовался метод градуировочного графика с весовым коэффициентом 1/x. В качестве параметра бралось соотношение площадей пика аналита и внутреннего стандарта.

Препараты митотана

На основе имеющихся в литературе данных впервые был разработан новый чувствительный и селективный метод определения митотана в плазме крови добровольцев методом ГХ-МС, валидированный в соответствии с руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation» (Май 2001 г.) и руководством ЕМЕА «Guideline on bioanalytical method validation» (Июль 2011 г.).

Стандарты

В данной методике для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества была использована субстанция митотана (ЗАО «ОХФК», Россия, серия 160).

Биологическая матрица

Матрицей для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества служила плазма крови человека (антикоагулянт Li-Heparine), полученная от здоровых добровольцев.

Химические реактивы

Метанол для ВЭЖХ, J.T. Baker, Нидерланды; ацетон, Химмед, Россия; гексан для ВЭЖХ, J.T. Baker, Нидерланды.

Оборудование

1. Газовый хроматограф Shimadzu QP-2010Plus с масс-спектрометрическим детектором Shimadzu GCMS-2010Ultra;
2. Весы лабораторные электронные OHAUS Explorer EX324;
3. Автоматические дозаторы: Sartorius ИН-019, 10-50 мкл; Sartorius ИН-021, 100-1000 мкл; Sartorius ИН-024, 1000-5000 мкл.
4. Смеситель лабораторный Vortex V-3;
5. Орбитальный шейкер ELMi S-3.10M

Приготовление стандартного раствора вещества и внутреннего стандарта

Для приготовления стандартного раствора митотана с концентрацией 1 мг/мл взвесили 10 мг стандартного образца митотана (точная навеска), поместили во флакон и добавили 10 мл метанола (конечная концентрация 10 мг/мл). Для приготовления стандартного раствора внутреннего стандарта 4-4-ДДТ (IS) взвесили 10 мг 4-4-ДДТ (точная навеска), поместили в мерную колбу вместимостью 100 мл и довели до метки метанолом. Полученная концентрация стандартного раствора 4-4-ДДТ составила 100 мкг/мл.

Приготовление калибровочных растворов

Сток-растворы готовили методом последовательного разбавления согласно схеме:

Митотан				
	Конечная концентрация сток-раствора, мкг/мл	Концентрация используемого для приготовления раствора, мкг/мл	Объём добавляемого раствора, мл	Объём добавляемого метанола, мл
A	2	6	1	2
B	6	10	3	2
C	10	20	2	2
D	20	30	2	1
E	30	40	3	1
F	40	50	4	1
G	50	55	5	0.5
H	55	60	5.5	0.5
I	60	70	6	1
J	70	80	7	1
K	80	100	8	2.0
L	100	120	7.5	1.5
M	120	200	6	4
N	200	1000(исходный)	2	8

Приготовление калибровочных стандартов

Для проведения валидации методики использовались следующие калибровочные образцы:

№	НАЗВАНИЕ	КОНЦЕНТРАЦИЯ митотана, мкг/мл
1	Cal1	0,1
2	Cal2	0,5
3	Cal3	1
4	Cal4	1,5
5	Cal5	2
6	Cal6	2,5
7	Cal7	3
8	Cal8	3,5
9	Cal9	4
10	Cal10	6

Для приготовления калибровочных образцов по 10 мкл калибровочного раствора, содержащего известное количество аналитов добавляли к 190 мкл бланковой плазмы:

Cal1 (10 мкл сток-раствора А); Cal2 (10 мкл сток-раствора С); Cal3 (10 мкл сток-раствора D); Cal4 (10 мкл сток-раствора E); Cal5 (10 мкл сток-раствора F); Cal6 (10 мкл сток-раствора G); Cal7 (10 мкл сток-раствора I); Cal8 (10 мкл сток-раствора J); Cal9 (10 мкл сток-раствора K); Cal10 (10 мкл сток-раствора M).

Калибровочные стандарты готовились в день анализа аналитической серии.

Приготовление образцов контроля качества.

Для проведения валидации методики использовались следующие образцы контроля качества:

№	НАЗВАНИЕ	КОНЦЕНТРАЦИЯ митотана, мкг/мл
1	QC0	0,1
2	QCL	0,3
3	QCM	2,75
4	QCH	5

Для приготовления образцов контроля качества 10 мкл калибровочного раствора, содержащего известное количество аналитов, добавляли к 190 мкл бланковой плазмы:

QC0 (10 мкл сток-раствора А); QCL (10 мкл сток-раствора В); QCM (10 мкл сток-раствора H); QCH (10 мкл сток-раствора L).

Образцы контроля качества готовились в день анализа аналитической серии.

Пробоподготовка анализируемых проб

Пробоподготовку интактной матрицы без внутреннего стандарта проводили следующим образом: 200 мкл плазмы крови переносили в виалу, добавляли 100 мкл ацетона и перемешивали на шейкере 10 мин при 350 об/мин. Далее добавляли

400 мкл гексана и проводили жидкостно-жидкостную экстракцию на шейкере в течении 30 минут при 350 об/мин. Затем 150 мкл верхней органической фазы (гексан) переносили во вставку, а вставку помещали в виалу. В хроматографическую систему вводили 2,5 мкл образца.

Пробоподготовку интактной матрицы с внутренним стандартом проводили следующим образом: к 200 мкл плазмы крови добавляли 10 мкл внутреннего стандарта в виале, добавляли 100 мкл ацетона и перемешивали на шейкере 10 мин при 350 об/мин. Далее добавляли 400 мкл гексана и проводили жидкостно-жидкостную экстракцию на шейкере в течении 30 минут при 350 об/мин. Затем 150 мкл верхней органической фазы (гексан) переносили во вставку, а вставку помещали в виалу. В хроматографическую систему вводили 2,5 мкл образца.

Пробоподготовку образцов контроля качества и калибровочных образцов проводили следующим образом: 190 мкл плазмы крови переносили в виалу, добавляли 10 мкл калибровочного раствора и 10 мкл внутреннего стандарта. Затем 100 мкл осаждающего реагента (ацетон), перемешивали на шейкере 10 мин при 350 об/мин. Далее добавляли 400 мкл гексана и проводили жидкостно-жидкостную экстракцию на шейкере в течении 30 минут при 350 об/мин. Затем 150 мкл верхней органической фазы (гексан) переносили во вставку, а вставку помещали в виалу. В хроматографическую систему вводили 2,5 мкл образца.

Условия хроматографического разделения

Параметр	Значение
Хроматограф:	Газовый хроматограф Shimadzu GC-2010 Plus, снабженный автосемплером на 150 проб и масс детектором с одинарным квадруполем
Колонка:	HP5-MS длина – 30м, диаметр – 0,25 мм, зерно – 0,25 мкм
Температура термостата:	Комнатная
Режим:	Температура испарителя - 280 ⁰ С Режим работы испарителя – Splitless Контроль расхода – по давлению Поток через колонку 0,9 мл/мин

	Давление – 57кПа Температура интерфейса - 300 ⁰ С Газ носитель – Гелий марки «А»
Температурная программа:	Начальная температура колонки - 80 ⁰ С в течении 1 минуты Нагрев – со скоростью 20 ⁰ С/минуту до 280 ⁰ С Предочистка - 280 ⁰ С в течении 14 минут Общее время анализа 24 минуты
Объем вводимой пробы:	2,5 мкл
Раствор для промывки иглы:	Гексан 100%
Параметры масс-детектора:	<u>Митотан:</u> Позитивная ионизация (Ei+), m/z 235 <u>4-4-ДДТ</u> Позитивная ионизация (Ei+), m/z 235
Время регистрации хроматограммы:	1.5 минуты

Количественное определение концентрации определяемого вещества

Использовалось автоматическое интегрирование хроматограмм с помощью программного обеспечения Shimadzu GCSolutions 4.30. Для количественного определения использовался метод градуировочного графика. В качестве параметра бралось соотношение площадей пика аналита и внутреннего стандарта.

5.2. Результаты исследований

5.2.1. Препараты дезогестрела

Результаты валидации аналитической методики

Валидация методики количественного определения этоногестрела в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием была проведена в соответствии с нормами GCP/CLP, руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation»

(Май 2001 г.), руководством ЕМЕА: Guideline on bioanalytical method validation, (Июль 2011 г.). Валидация методики включала следующие параметры: чувствительность, селективность, линейность, правильность, прецизионность, кросс-перенос, матричный эффект и стабильность.

Тест «Пригодность хроматографической системы»

Тестирование пригодности хроматографической системы включало оценку следующих параметров:

- число теоретических тарелок;
- фактор удерживания;
- коэффициент асимметрии пика;

Полученные значения вышеперечисленных параметров представлены в таблице ниже:

Параметр	Значение
Число теоретических тарелок (N):	6057
Фактор удерживания (коэффициент емкости) (k')	4,95
Коэффициент асимметрии пика (A_s)	1,63
Время удерживания этоногестрела	2,80±0,05 минут

Селективность

Для определения селективности были протестированы 6 образцов биологической матрицы, обработанной без стандарта этоногестрела, на возможность создания помех потенциально мешающими веществами (эндогенные компоненты матрицы, метаболиты, продукты разложения).

Для демонстрации отсутствия влияния потенциально мешающих веществ на рис. 5.1 приведена хроматограмма проанализированных образцов биологической матрицы, не содержащих этоногестрела.

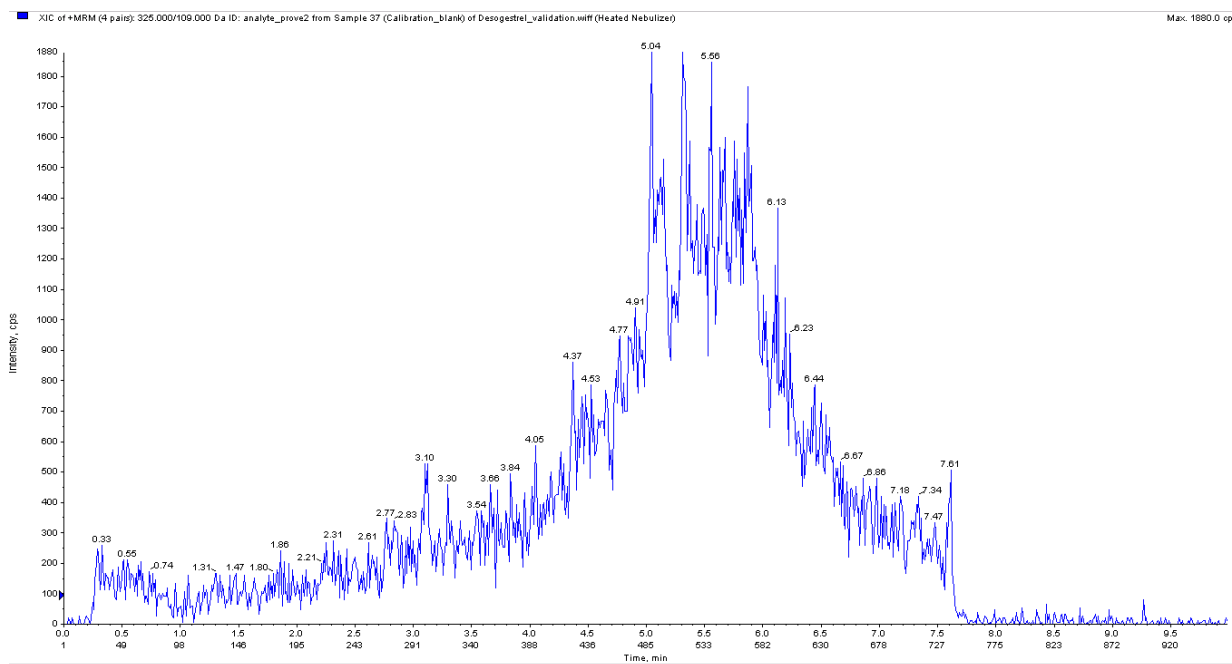
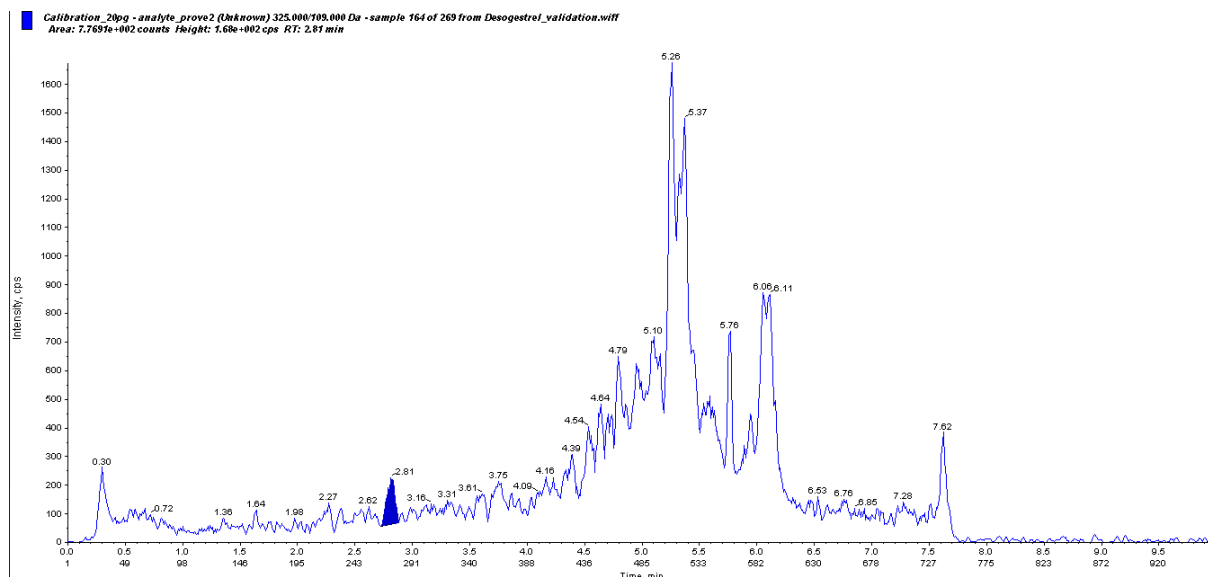


Рис. 5.1 - Хроматограмма плазмы крови без добавления этоногестрела

Линейность и чувствительность

Определение предела обнаружения этоногестрела.

Предел обнаружения этоногестрела был определен как сигнал, соответствующий утроенной величине уровня шума, наблюдаемого в хроматографической системе. При анализе шести образцов «холостой пробы» - бланковой плазмы - был установлен уровень сигнала в диапазоне 75-125 условных единиц, уровень шума равный 24 ± 3 условных единицы, а при анализе трех образцов с концентрацией 20 пг/мл уровень сигнала был в диапазоне 200-250 условных единиц, соотношение сигнал/шум 2,2-4,4. По полученным данным можно сделать вывод, что пределом обнаружения этоногестрела является концентрация 20 пг/мл. Хроматограмма одного из образцов плазмы с концентрацией этоногестрела 20 пг/мл приведена на рис. 5.2.



**Рис. 5.2 - Хроматограмма плазмы крови с концентрацией этоногестрела 20
пг/мл**

Линейность

Калибровочная кривая состояла из 8 ненулевых калибровочных стандартов, охватывающих диапазон концентраций 40-4000 пг/мл для этоногестрела.

Концентрация определяемого вещества 40 пг/мл была принята в качестве нижнего предела количественного определения, поскольку были выполнены следующие условия:

1. Показания стандарта на нижнем пределе количественного определения (НПКО) были как минимум в 5 раз больше соотношения сигнал/шум “холостой” пробы.
2. Показания стандарта на нижнем пределе количественного определения (НПКО) поддавались определению и были воспроизводимы с точностью 8,8%, не превышающей 20%, и достоверностью 99,80%, входящей в диапазон 80-120%.

Зависимость отношения величин площадей пиков аналита и внутреннего стандарта от концентраций калибровочных стандартов была линейной с весовым коэффициентом $1/x$ и описывалась уравнением типа $Y=4,37 \cdot 10^{-6}X + 8,78 \cdot 10^{-5}$ с коэффициентом корреляции R^2 не менее 0,99. Образец калибровочной кривой представлен на рисунке 5.3.

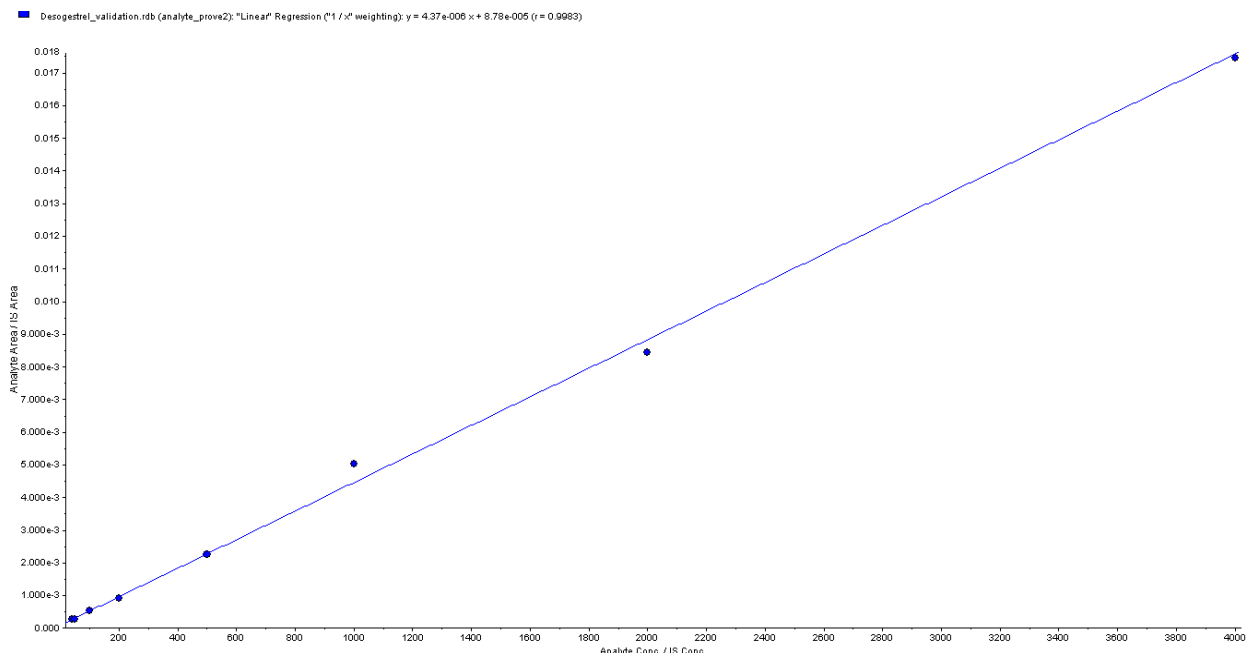


Рис. 5.3 - Калибровочная кривая этоногестрела в плазме крови в диапазоне концентраций 40-4000 пг/мл

Для оценки воспроизводимости результатов были получены 5 калибровочных кривых и проведен обратный расчет концентраций используемых стандартов по всем кривым и определены статистические данные. Воспроизводимость результатов с учетом критерия приемлемости достигается во всем интервале концентраций.

Прецизионность и правильность внутри одной аналитической серии

Прецизионность и правильность метода внутри одной серии оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD и QCE в составе одной аналитической серии. Каждый образец определялся в 6 повторах. Расчет концентраций образцов контроля качества проводился по калибровочной кривой, полученной в составе той же аналитической серии. Данные по прецизионности и правильности определения этоногестрела в плазме крови человека внутри одной серии удовлетворяют критериям приемлемости.

Прецизионность и правильность между аналитическими сериями

Прецизионность и правильность метода между аналитическими сериями оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества

QCA; QCB; QCC; QCD и QCE, выполненных в трех аналитических сериях. Каждый образец определялся в 6 повторах. Расчет концентраций образцов контроля качества проводился по калибровочной кривой, полученной в составе той же аналитической серии. Данные по прецизионности и правильности определения этоногестрела в плазме крови человека между аналитическими сериями удовлетворяют критериям приемлемости.

Степень извлечения

Степень извлечения этоногестрела из плазмы крови человека определяли путем сравнения площадей пиков образцов, экстрагированных из образцов контроля качества QCA (40 пг/мл), QCB (100 пг/мл), QCC (1000 пг/мл), QCD (2000 пг/мл) и QCE (4000 пг/мл) с площадями пиков растворов матрицы для определения матричного эффекта, представляющих 100% извлечение. Растворы для определения матричного эффекта готовили следующим образом: брали по 500 мкл «холостой» плазмы, такой же, что и для приготовления QCA-QCE, экстрагировали и растворяли в 240 мкл разбавителя и центрифугировали без добавления этоногестрела и внутреннего стандарта. Затем отбирали по 200 мкл надосадочной жидкости и добавляли по 42 мкл соответствующего сток-раствора стандарта (400 пг/мл для QCA, 1,00 нг/мл для QCB, 10,0 нг/мл для QCC, 20,0 нг/мл для QCD и 40,0 нг/мл для QCE) и по 8,3 мкл раствора внутреннего стандарта. Получали по 250 мкл растворов для определения матричного эффекта, которые затем количественно переносили в вials для автосемплера и анализировали вместе со свежеприготовленными образцами QCA-QCE. Измерение для каждой концентрации стандартов проводилось в шести повторах. Полученные значения удовлетворяют критериям приемлемости.

Стабильность

Для оценки стабильности этоногестрела в плазме крови человека использовали образцы контроля качества QCA (40 пг/мл), QCB (100 пг/мл), QCC (1000 пг/мл), QCD (2000 пг/мл) и QCE (4000 пг/мл), которые хранили в автосэмплере при +4°C в течение 24 часов, в течение 36 часов при комнатной

температуре, а также образцы контроля качества после трёх циклов заморозки и последующей разморозки. Далее проводился анализ образцов вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивались со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. На их основе рассчитывался модуль разницы по формуле:

$$\text{Разница, \%} = \frac{\text{Ср.концентрация образца при хранении} - \text{Ср.концентрация свежепригот. Образца}}{\text{Ср. концентрация свежепригот образца}} \cdot 100$$

Разница по полученным результатам не превышает 15%.

Кросс-перенос

Для оценки кросс-переноса были сделаны следующие инъекции в хроматографическую систему: пустая инъекция растворителя, затем 6 инъекций образца контроля качества QCE, затем снова пустая инъекция растворителя. Перенос пробы во второй инъекции растворителя не должен превышать 20% НПКО аналита и 5% внутреннего стандарта. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости.

Матричный эффект

Для оценки матричного эффекта получали хроматограммы образцов для определения матричного эффекта этоногестрела, соответствующей QCB (низкая концентрация не более трехкратного НПКО), QCD (средняя концентрация) и QCE (верхний предел количественного обнаружения) в 6 повторах. Матричный фактор аналита рассчитывали как отношение площади пика этоногестрела в образце с матрицей (плазмой крови здоровых добровольцев) к площади пика этоногестрела в чистом растворе вещества соответствующей концентрации. Аналогичную процедуру проводили для определения матричного фактора внутреннего стандарта. Далее для каждого образца получали соотношение матричного фактора этоногестрела к матричному фактору внутреннего стандарта. Коэффициент

вариации данного соотношения не должен превышать 15%. Полученные значения удовлетворяют критериям приемлемости.

Идентификация пика на хроматограмме

Идентификация пика этоногестрела происходила по его характеристичным ионам, родительскому и дочернему, (режим MRM).

Заключение по результатам валидации методики

Проведена валидация аналитической методики количественного определения этоногестрела в плазме крови человека методом высокоэффективной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Чувствительность метода составила 40 пг/мл. Воспроизводимость, прецизионность и правильность достигается во всем интервале концентраций. Степень извлечения из плазмы крови человека составила 76,7%, анализируемое вещество стабильно при хранении в автосэмплере при температуре +4°C в течение 24 часов после пробоподготовки, в течение 36 часов при комнатной температуре, а также после трех циклов заморозки и последующей разморозки.

Результаты исследования биоэквивалентности

Разработанная аналитическая методика применялась в рамках исследования биоэквивалентности препаратов дезогестрела. Дизайн исследования - одноцентровое, открытое, рандомизированное, по перекрестной схеме, включающее два периода с однократным приемом натошак двух препаратов дезогестрела (Диамилла и Чарозетта®). Исследование состояло из скрининга, 2 периодов исследования и периода «отмывки». Длительность скрининга – до 14 дней. Длительность каждого периода – до 96 ч. после приема препарата, период «отмывки» - 28 дней. В процессе исследования было скринировано 40 добровольцев. Всего в результате скрининга было рандомизировано 36 добровольцев женского пола. Препараты Диамилла и Чарозетта® назначались согласно предварительно сгенерированной (до начала исследования) рандомизационной схеме, все включенные в исследование добровольцы получали исследуемый препарат Диамилла в дозе 75 мкг (1 таблетка, покрытая пленочной

оболочкой) и препарат сравнения Чарозетта[®] в дозе 75 мкг (1 таблетка, покрытая пленочной оболочкой).

В течение каждого периода у добровольцев было отобрано по 16 образцов крови: до приема препарата и через 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 48.0, 72.0 и 96.0 часов после приема исследуемого лекарственного препарата или лекарственного препарата сравнения.

Вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов был сделан с использованием подхода, основанного на оценке 90%-ных доверительных интервалов для отношений средних значений логарифмически преобразованных фармакокинетических параметров AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} этоногестрела. Препараты считались биоэквивалентными, если границы оцененного 90% доверительного интервала для AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ находились в пределах 80.00-125.00%. Для показателей C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} , характеризующихся большей вариабельностью, эти пределы составляли 75.00-133.00 %.

Этоногестрел быстро абсорбировался в кровь со средним значением $T_{max} = 1.5 \pm 0.5$ часа для препарата Диамилла и $T_{max} = 1.4 \pm 0.4$ часа для препарата Чарозетта[®] и элиминировался из крови со средним значением $T_{1/2} = 27.5 \pm 14.6$ часа и 30.2 ± 13.0 часа для тестового и референтного препаратов соответственно. Максимальная концентрация этоногестрела после приема препарата Диамилла составила $C_{max} = 1776.6 \pm 867.0$ пг/мл и $C_{max} = 1679.3 \pm 635.3$ пг/мл после приема препарата Чарозетта[®]. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} этоногестрела после приема препарата Диамилла составили 15278.8 ± 6250.7 пг*ч/мл и 12677.4 ± 6058.4 пг*ч/мл соответственно. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} этоногестрела после приема препарата Чарозетта[®] составили 15491.7 ± 6065.4 пг*ч/мл и 12796.3 ± 5869.8 пг*ч/мл соответственно. По указанным параметрам наблюдалась значительная межсубъектная вариабельность, характеризуемая соответствующим коэффициентом (CV).

Доверительный интервал для отношения логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} этоногестрела составил 88.96-107.90% (среднее значение

98.02%). Для логарифмически преобразованных значений C_{\max} и C_{\max}/AUC_{0-t} этоноргестрела доверительные интервалы отношений составили 93.15-111.07% (среднее значение 101.71%) и 91.58-117.59% (среднее значение 103.77%) соответственно. Полученные доверительные интервалы лежат в пределах, установленных «Оценкой биоэквивалентности лекарственных средств (Методические рекомендации, 2008)», что говорит о биоэквивалентности исследуемых препаратов.

5.2.2. Препараты, содержащие фиксированную комбинацию дезогестрел+этинилэстрадиол

Результаты валидации аналитической методики

При разработке условий масс-спектрометрического детектирования раствор каждого тестируемого соединения (этинилэстрадиол был подвергнут дериватизации дансилхлоридом, анализировали дансил-этинилэстрадиол) в мобильной фазе (3) с концентрацией 50 нг/мл анализировали путем прямого ввода в масс-спектрометр при помощи программы автоматической оптимизации в режиме регистрации положительных ионов.

При сканировании в режиме (Q1) определяли молекулярный ион исследуемого соединения, основные ионы-продукты фиксировали в режиме Product Ion. Для количественного анализа была проведена оптимизация МС/МС метода в режиме MRM для достижения максимальной чувствительности. При анализе регистрировали по 2-3 MRM-перехода для каждого аналита, при количественной обработке хроматограмм использовали один из них, (наиболее интенсивный или наиболее селективный при введении вещества в матрице).

Масс-спектры 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола, ВС показаны на рисунках 5.4-5.5.

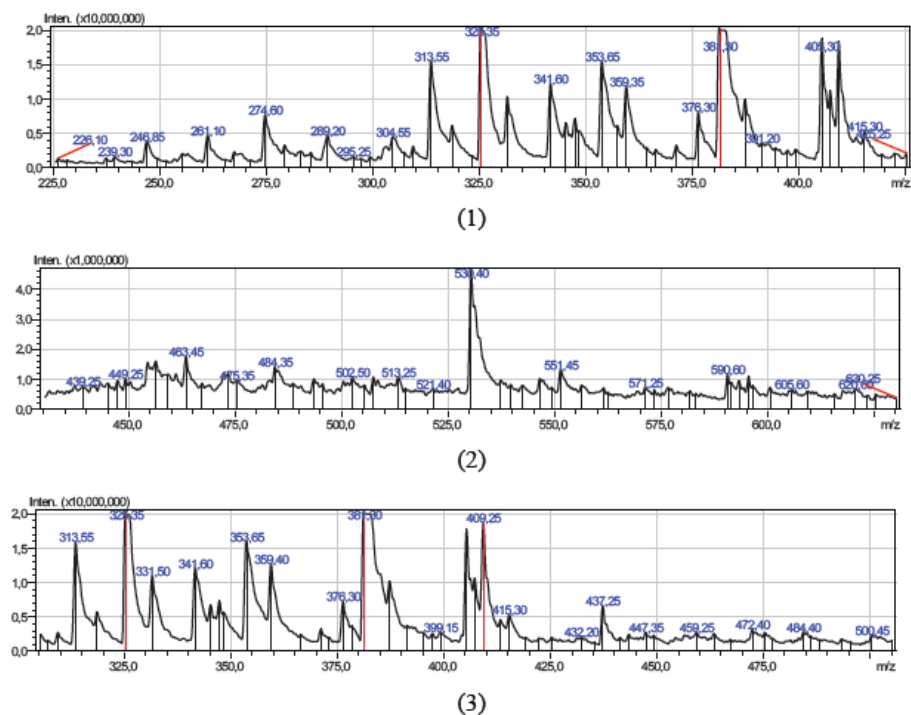


Рис. 5.4 - Масс-спектры 3-кетодезогестрела (1), ансил-этинилэстрадиола (2) и хлормадинона ацетата (3) при ионизации в электроспрее (режим -Q1)

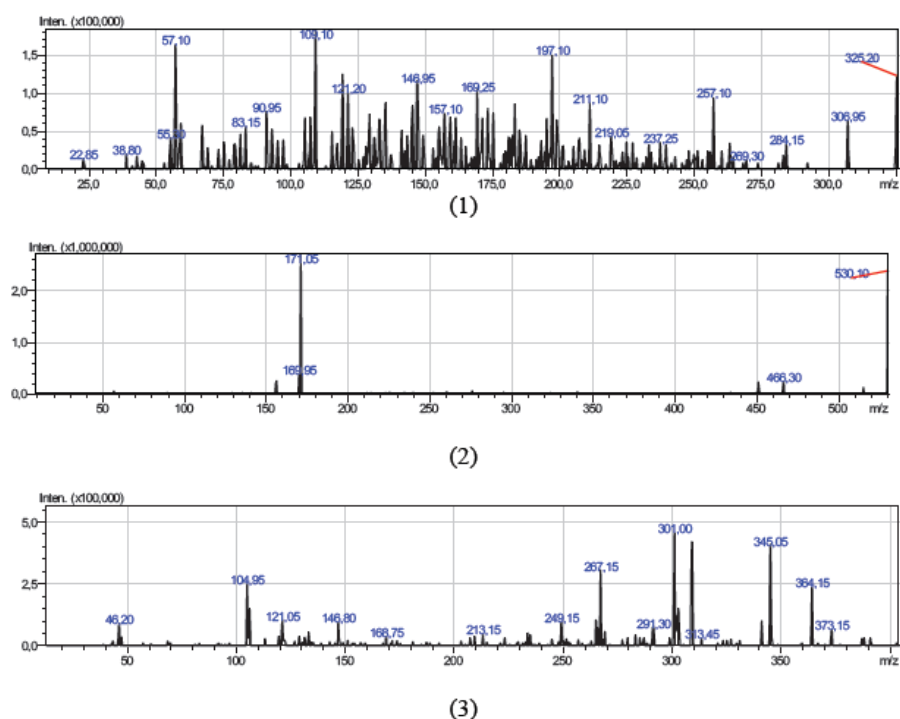


Рис. 5.5 - MS/MS масс-спектр 3-кетодезогестрела (1), дансил-этинилэстрадиола (2) и хлормадинона ацетата (3) при ионизации в режиме Product Ion

Выбор внутреннего стандарта

Для получения высокой точности количественных результатов при использовании масс-спектрометрического детектирования необходимо выбрать оптимальный ВС, близкий к анализируемым соединениям по хроматографическим и экстракционным свойствам. В данном исследовании для анализа 3-кетодезогестрела и дансил-этинилэстрадиола в качестве ВС был выбран хлормадинона ацетат, который обладает схожими физико-химическими свойствами.

Селективность

Исследование селективности проводилось путем анализа 6 образцов интактной плазмы, включая гемолизированный образец и липемический образец спайков с аналитами в данных образцах плазмы с концентрациями этинилэстрадиола/3-кетодезогестрела на уровнях (2,00/50,0; 60,0/1500 и 500/8000 нг/мл). Селективность в отношении анализируемых веществ подтверждалась тем, что сигнал пика на уровне НПКО более чем в 5 раз превышает сигнал пика в интактной пробе.

Степень экстракции и матричный эффект

Определение извлечения проводили для 3-х концентраций этинилэстрадиола и 3-кетодезогестрела – 6,00/150; 60,0/1500; 400/8000 пг/мл соответственно. Были приготовлены два комплекта образцов для введения в систему ВЭЖХ / МС / МС :

1. Набор пустых образцов плазмы (свободные от гормонов-аналитов и ВС) – postspike.

После пробоподготовки образцов плазмы к супернатанту прибавляли по 10 мкл аналитов (дансил-этинилэстрадиола, приготовленного дериватизацией этинилэстрадиола, и 3-кетодезогестрела на трех уровнях концентраций) и ВС.

2. Набор образцов плазмы с соответствующим количеством анализируемого вещества (этинилэстрадиол и 3-кетодезогестрел в трех концентрационных уровнях) - pre-spike.

Для 3-кетодезогестрела средняя степень экстракции составила 89,3%, КВ при экстракции 3-кетодезогестрела в исследуемом диапазоне концентраций составляет 9,14%. Для этинилэстрадиола средняя степень экстракции составила 84,9%, КВ при экстракции этинилэстрадиола в исследуемом диапазоне концентраций составляет 15,5%. Средняя степень извлечения ВС хлормадинона ацетата составила 60,9%.

Согласно рекомендациям [346], степень экстракции строго не регламентируется, однако КВ для рекавери для трех уровнях концентраций должен быть меньше 20%. Полученные результаты демонстрируют, что при используемом способе пробоподготовки достигается приемлемая и стабильная степень извлечения исследуемых соединений на всем ожидаемом диапазоне концентраций.

Определение матричного эффекта на исследуемое соединение проводили для 3-х концентраций этинилэстрадиола и 3-кетодезогестрела – 6,00/150; 60,0/1500; 400/8000 пг/мл соответственно, в 6-и пробах плазмы post-spike, включая гемолизованную и липемическую пробы. В качестве референсных использовали 6 репликаторов стандартных растворов дансил-этинилэстрадиола, приготовленного дериватизацией этинилэстрадиола, и 3-кетодезогестрела в смеси АСН:Н₂О (50:50(v/v)).

Перенос пробы

Перенос вещества из пробы в пробу (carry-over) оценивали путем сравнения площадей пиков образца растворителя (3), анализируемого после 6 инъекций высокой концентрации аналитов (400 пг/мл для этинилэстрадиола и 8000 пг/мл для 3-кетодезогестрела), и образца НПКО.

Критерий приемлемости для аналитов составляет менее 20%, для ВС – менее 5%. Для 3-кетодезогестрела перенос составил 0,00%, 0,00% для этинилэстрадиола, для ВС - 0,000%, что является приемлемой величиной. Отклик детектора на терифлуномид был на уровне шума, что свидетельствует об

отсутствии переноса данных веществ при переходе от большей концентрации к меньшей.

Нижний предел количественного определения (НПКО)

При 5-кратном определении НПКО было установлено, что 3-кетодезогестрел может быть определен в плазме человека на уровне 50,0 пг/мл с точностью 96,6% и прецизионностью 16,9%; этинилэстрадиол – на уровне 2,00 пг/мл с точностью 98,6% и прецизионностью 13,3%.

Калибровочная кривая

8 стандартных калибровочных образцов с концентрациями 3-кетодезогестрела от 50,0 до 10000 пг/мл и этинилэстрадиола – от 2,00 до 500 пг/мл, образец с нулевой концентрацией, а также КК образцы были приготовлены в плазме и проанализированы в течение 3-х независимых аналитических серий. В результате анализа выявлена линейная зависимость отклика детектора от концентрации анализируемых веществ.

Для построения калибровочных кривых использовали линейную регрессию с нормированием $1/x \cdot x$. Коэффициент корреляции составил не менее 0.99. Нулевые образцы не учитывались при построении калибровок. Отклик детектора в этих образцах был на уровне шума. Отклонения от номинальной концентрации для всех калибровочных стандартов не превышали допустимые значения (20% для НПКО и 15% для остальных стандартов). Демонстрационные калибровочные анализируемых веществ представлены на рис. 5.6-5.7.

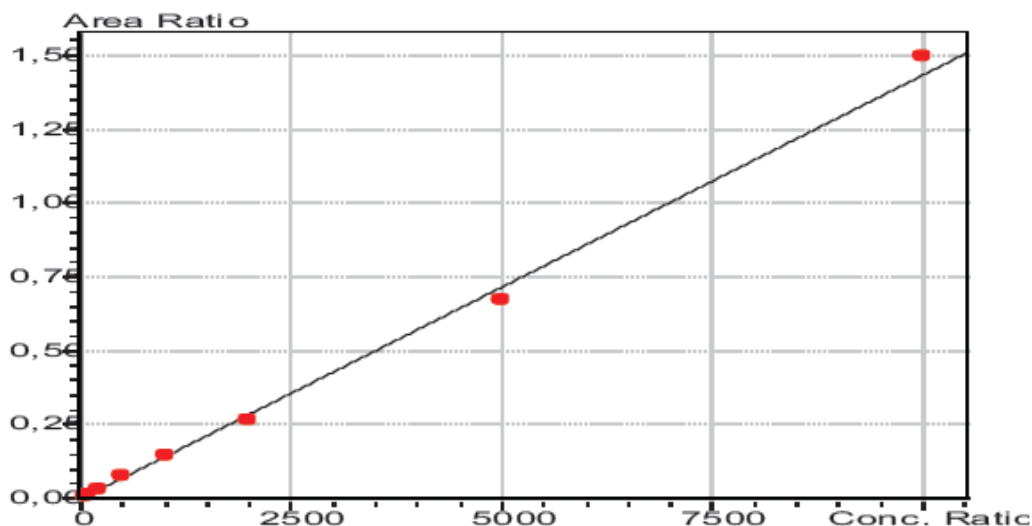


Рис. 5.6 - Калибровочная кривая 3-кетодезогестрела в плазме крови человека

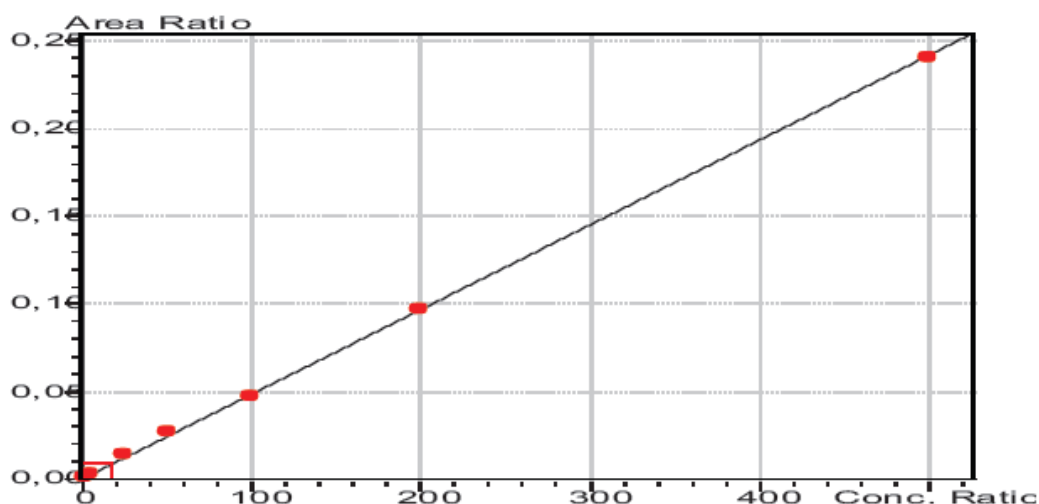


Рис. 5.7 - Калибровочная кривая этинилэстрадиола в плазме крови человека

Точность и прецизионность

Определение точности и прецизионности метода проводили при 6-кратном анализе контрольных образцов (по 4 образца в каждой), содержащих этинилэстрадиол/3-кетодезогестрел в концентрациях НПКК (2,00/50,0 пг/мл), НКК (6,00/150 пг/мл), СКК (60,0/1500 пг/мл) и ВКК (400/8000 пг/мл) в области ожидаемого концентрационного диапазона. Каждая серия образцов 3 раза готовилась из отдельных стандартных растворов и анализировалась в течение 3-х независимых серий анализов.

Полученные результаты демонстрируют, что значения точности и прецизионности анализа соответствуют всем критериям.

Стабильность

Определение стабильности 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола проводилось в соответствии с учетом рекомендаций [346], согласно которым необходимо изучение стабильности вещества в течение всего процесса – от получения анализируемых образцов и сухой навески вещества до количественной обработки полученных данных, с учетом срока и условий хранения вещества и опытных образцов в течение этого периода. Критерием приемлемости в данном эксперименте является отклонение отклика на определяемое соединение по отношению к номинальному значению не более чем на 15%.

В частности, были определены следующие виды стабильности:

- стабильность после 3-х циклов заморозки/разморозки;
- краткосрочная стабильность;
- пост-препаративная стабильность;
- долгосрочная стабильность.

Стабильность основных растворов после хранения при -20°C

Для определения стабильности основных растворов аналитов и ВС при -20°C были приготовлены 2 серии растворов 3-кетодезогестрела, этинилэстрадиола и хлормадинона ацетата в метаноле с концентрацией 1,00 мг/мл. Полученные растворы хранили при -20°C один месяц (одна серия), либо использовали свежеприготовленными (вторая серия). Из них были приготовлены тестовые растворы в АСН:Н₂О (50/50(v/v)) с концентрацией аналитов 10000 пг/мл (3-кетодезогестрел), 500 пг/мл (этинилэстрадиол после дериватизации дансилхлоридом) и 5000 пг/мл хлормадинона ацетата. Данные образцы были проанализированы на ВЭЖХ-МС/МС.

Стабильность основных и растворов 3-кетодезогестрела, этинилэстрадиола и хлормадинона ацетата при хранении в течение месяца была выражена в процентном отношении площади пика в тестовых растворах к свежеприготовленным.

Основные растворы 3-кетодезогестрела, этинилэстрадиола и хлормадинона ацетата являются стабильными при указанных условиях. Основные растворы 3-кетодезогестрела, этинилэстрадиола и хлормадинона ацетата готовились раз в месяц, рабочие растворы готовили из основных ежедневно и использовали свежеприготовленными.

Стабильность в плазме после заморозки /разморозки

Стабильность 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола в плазме крови при заморозке/разморозке была определена для высокой (ВКК) и низкой (НКК) концентрации вещества в плазме крови человека на LiNeparine. Для этого были приготовлены спайки вещества в плазме крови с концентрациями 6,00/150 и 400/8000 пг/мл для 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола соответственно, в 6 повторах каждая (каждая аликвота по 1000 мкл). После третьего цикла для них была проведена пробоподготовка. Полученные образцы, а также свежеприготовленные калибровочные спайки указанных веществ в плазме были проанализированы на ВЭЖХ-МС/МС вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии.

Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивались со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. Полученные данные показывают, что 3-кетодезогестрел стабилен после 3-х циклов заморозки/разморозки, а этинилэстрадиол нестабилен.

Краткосрочная стабильность в плазме крови человека

Краткосрочную стабильность 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола в плазме крови человека на LiNeparine определяли для высокой (ВКК), и низкой (НКК) концентраций аналитов. Опытные образцы выдерживали на рабочем столе при комнатной температуре +21- +23°C в течение 24 ч и далее анализировали на ВЭЖХ-МС/МС. Показано, что этинилэстрадиол нестабилен в данных условиях.

Пост-препаративная стабильность

Пост-препаративную стабильность 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола определяли для высокой и низкой концентрации (в 6 репликатах каждая

концентрация вещества) в плазме крови человека на LiHeparine, прошедшей процедуру пробоподготовки. Опытные образцы выдерживали в автосэмплере при температуре +4°C в течение 24 часов, далее анализировали на ВЭЖХ-МС/МС и сравнивали с данными, соответствующими свежеприготовленным образцам.

Показано, что образцы вещества в плазме, прошедшие процедуру пробоподготовки, стабильны в автосэмплере при +4°C в течение 24 часов.

Долгосрочная стабильность в плазме человека

При получении экспериментальных образцов 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола в плазме крови человека на LiHeparine были приготовлены спайки с концентрациями 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола 6,00/150 и 400/8000 пг/мл соответственно, в 6 повторах. Данные образцы были помещены в морозильную камеру, <-65°C.

Полученные спайки веществ будут храниться вместе с экспериментальными образцами и проходить все возможные процедуры перемещения данных образцов. По окончании анализа всех экспериментальных образцов данные спайки будут выдержаны при температуре <-65°C таким образом, чтобы общее время хранения спайков превышало время нахождения реальных образцов при данных условиях, начиная от замораживания первого образца в клиническом центре до пробоподготовки последнего образца в аналитической лаборатории. После хранения спайки будут проанализированы на ВЭЖХ-МС/МС для определения стабильности 3-кетодезогестрела и этинилэстрадиола по отношению к свежеприготовленным спайкам с аналогичными концентрациями веществ.

Заключение по результатам валидации методики

Нижний предел количественного определения в плазме крови человека составил для 3-кетодезогестрела 5,0 пг/мл, для этинилэстрадиола 2,00 пг/мл при соотношении сигнал/шум более 5. Калибровочная кривая представляла собой линейную зависимость с коэффициентом корреляции не менее 0.99 в диапазоне концентраций 50,0-10000 пг/мл для 3-кетодезогестрела и 2,00-500 пг/мл для этинилэстрадиола.

Валидация методики включала в себя определение точности и прецизионности в течение 3-х независимых серий анализа. Для всех калибровочных стандартов и контрольных образцов отклонения от номинальной концентрации (точность) не превышали 10%. Значения прецизионности составляли не более 15% (кроме НПКО), что демонстрирует высокую воспроизводимость метода.

Исследование 3-кетодезогестрела показало его стабильность в плазме, рабочих растворах и основных растворах при 3-кратном размораживании/замораживании. Аналит также стабилен в плазме при краткосрочном хранении при комнатной температуре. Пост-препаративное и долгосрочное хранение растворов 3-кетодезогестрела в течение суток при +4°C и +20°C также не выявило существенной деградации соединения. В тоже время этинилэстрадиол стабилен только при хранении готовых проб при +4°C в течение суток и нестабилен при хранении при комнатной температуре и после 3-циклов заморозки/разморозки

Таким образом, вышеперечисленные характеристики разработанного метода делают его пригодным для совместного количественного определения кетодезогестрела и этинилэстрадиола в плазме крови человека на LiHeparine при исследовании фармакокинетики и биоэквивалентности.

Результаты исследования биоэквивалентности

Исследование биоэквивалентности препаратов, содержащих фиксированную комбинацию дезогестрел+этинилэстрадиол проводилось как одноцентровое, открытое, рандомизированное, по перекрестной схеме, включающее два периода с однократным приемом натошак двух препаратов (Бенидетта и Марвелон®). Исследование состояло из скрининга, 2 периодов исследования и периода «отмывки». Длительность скрининга – до 14 дней. Длительность каждого периода – до 96 ч. после приема препарата, период «отмывки» - 28 дней. В процессе исследования было рандомизировано 24 добровольца женского пола. Препараты Бенидетта и Марвелон® назначались согласно предварительно сгенерированной

рандомизационной схеме, все включенные в исследование добровольцы получали исследуемый препарат Бенидетта в дозе 150 мкг + 30 мкг (1 таблетка, покрытая пленочной оболочкой) и препарат сравнения Марвелон® в дозе 150 мкг + 30 мкг (1 таблетка, покрытая пленочной оболочкой).

В течение каждого периода у добровольцев было отобрано по 16 образцов крови: до приема препарата и через 0.25, 0.5, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 36.0, 48.0, 72.0 и 96.0 часов после приема исследуемого лекарственного препарата или лекарственного препарата сравнения.

Вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов был сделан аналогично подходу, используемому в предыдущем исследовании.

Этинилэстрадиол быстро абсорбировался в кровь со средним значением $T_{max} = 1.36 \pm 0.45$ часа для препарата Бенидетта и $T_{max} = 1.41 \pm 0.65$ часа для препарата Марвелон® и элиминировался из крови со средним значением $T_{1/2} = 18.82 \pm 3.65$ часа и 17.92 ± 3.63 часа для тестового и референтного препаратов соответственно. Максимальная концентрация этинилэстрадиола после приема препарата Бенидетта составила $C_{max} = 74.81 \pm 26.32$ пг/мл и $C_{max} = 76.19 \pm 26.94$ пг/мл после приема препарата Марвелон®. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} этинилэстрадиола после приема препарата Бенидетта составили 653.4 ± 221.7 пг*ч/мл и 573.1 ± 212.2 пг*ч/мл соответственно. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} этинилэстрадиола после приема препарата Марвелон® составили 637.6 ± 216.2 пг*ч/мл и 568.5 ± 205.7 пг*ч/мл соответственно.

Доверительный интервал для отношения логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ этоногестрела составил 91.03 – 113.77% (среднее значение 101.82%) и 92.96 – 110.52% (среднее значение 101.41%) соответственно. Для логарифмически преобразованных значений C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} этоногестрела доверительные интервалы отношений составили 95.60 – 110.85% (среднее значение 102.94%) и 88.69 – 115.14% (среднее значение 101.11%) соответственно.

Доверительный интервал для отношения логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ этинилэстрадиола составил 91.12 – 110.74% (среднее

значение 100.5%) и 93.71 – 112.08% (среднее значение 102.43%) соответственно. Для логарифмически преобразованных значений C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} этинилэстрадиола доверительные интервалы отношений составили 91.12 – 105.97% (среднее значение 98.22%) и 88.87 – 107.68% (среднее значение 97.82%) соответственно.

Полученные доверительные интервалы лежат в пределах, установленных «Оценкой биоэквивалентности лекарственных средств (Методические рекомендации, 2008)», что говорит о биоэквивалентности исследуемых препаратов.

5.2.3. Препараты, содержащие фиксированную комбинацию хлормадион+этинилэстрадиол

Результаты валидации аналитической методики

Тест «Пригодность хроматографической системы»

Тестирование пригодности хроматографической системы включало оценку следующих параметров:

- число теоретических тарелок;
- фактор удерживания;
- коэффициент асимметрии пика;

Полученные значения вышеперечисленных параметров представлены в таблице ниже:

Параметр	Значение (хлормадинона ацетат/этинилэстрадиол)
Число теоретических тарелок (N):	10590/38403
Фактор удерживания (коэффициент емкости) (k')	5,50/8,92
Коэффициент асимметрии пика (A_s)	1,37/1,15

Время удерживания хлормадинона ацетата	3,25±0,05 минуты
Время удерживания дансилэтинилэстрадиола	4,96±0,05 минуты

Селективность

Для определения селективности были протестированы 6 образцов биологической матрицы, обработанной без стандартов хлормадинона ацетата и этинилэстрадиола, на возможность создания помех потенциально мешающими веществами (эндогенные компоненты матрицы, метаболиты, продукты разложения).

Для демонстрации отсутствия влияния потенциально мешающих веществ на рис. 5.8-5.9 приведены хроматограммы проанализированных образцов биологической матрицы, не содержащих аналитов, а также содержащих 10000 (500) пг/мл хлормадинона ацетата (этинилэстрадиола).

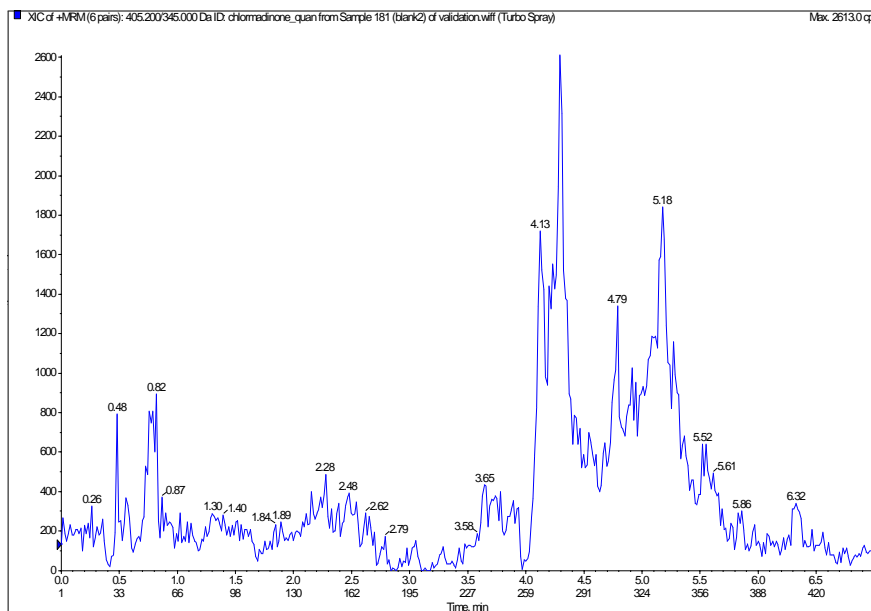


Рис. 5.8 - Хроматограмма бланкового образца плазмы крови, не содержащего хлормадинона ацетат

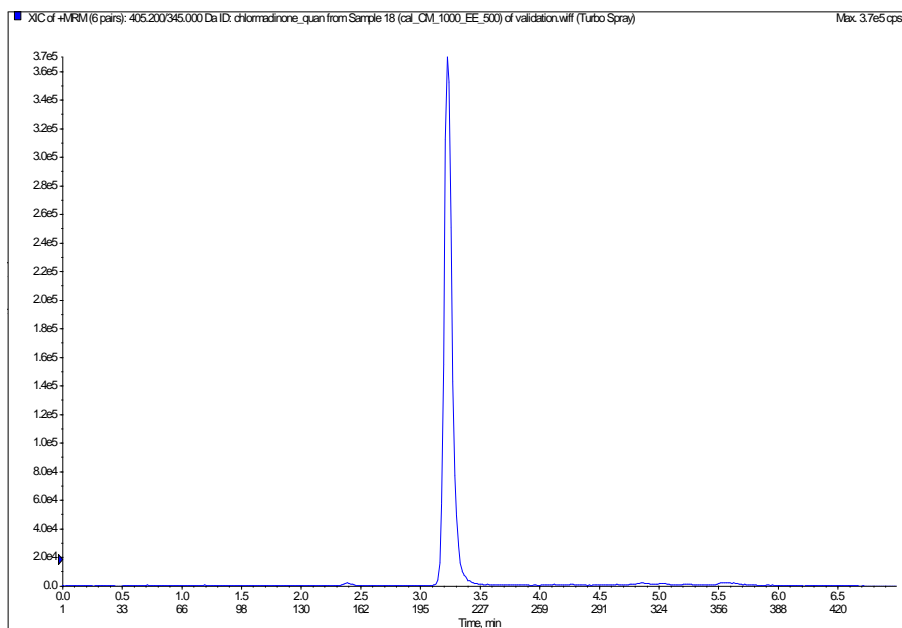


Рис. 5.9 - Хроматограмма бланкового образца плазмы крови, содержащего 10000 пг/мл хлормадинона ацетата

Линейность и чувствительность

Определение предела обнаружения хлормадинона ацетата.

Предел обнаружения хлормадинона ацетата был определен как сигнал, соответствующий утроенной величине уровня шума, наблюдаемого в хроматографической системе. При анализе трех образцов «холостой пробы» - бланковой плазмы - был установлен уровень сигнала в диапазоне 200-300 условных единиц, а при анализе трех образцов с концентрацией 20 пг/мл уровень сигнала был в диапазоне 1300-2000 условных единиц. По полученным данным можно сделать вывод, что пределом обнаружения хлормадинона ацетата является концентрация 20 пг/мл.

Определение предела обнаружения этинилэстрадиола

Предел обнаружения этинилэстрадиола был определен как сигнал, соответствующий утроенной величине уровня шума, наблюдаемого в хроматографической системе. При анализе трех образцов «холостой пробы» - бланковой плазмы - был установлен уровень сигнала в диапазоне 2000-2500 условных единиц, а при анализе трех образцов с концентрацией 1 пг/мл уровень сигнала был в диапазоне 6000-8000 условных единиц. По полученным данным

можно сделать вывод, что пределом обнаружения хлормадинона ацетата является концентрация 1 пг/мл.

Линейность

Калибровочная кривая состояла из 8 ненулевых калибровочных стандартов, охватывающих диапазон концентраций 50-10000 пг/мл для хлормадинона ацетата и 2-500 пг/мл для этинилэстрадиола. Концентрации определяемых вещества хлормадинона ацетата 100 пг/мл и этинилэстрадиола 2 пг/мл были приняты в качестве нижнего предела количественного определения, поскольку были выполнены следующие условия:

Показания стандарта на НПКО были как минимум в 5 раз больше показаний «холостой пробы». Показания стандарта на НПКО поддавались определению и были воспроизводимы с точностью 6,55 % (для хлормадинона ацетата) и 9,50 % (для этинилэстрадиола), не превышающей 20%, и достоверностью 88,80 % (для хлормадинона ацетата) и 107,40 % (для этинилэстрадиола), входящей в диапазон 80-120%.

Зависимость величины площади пика от концентраций калибровочных стандартов была линейной и описывалась уравнением типа $Y=4,51e-5X + 0,000972$ с коэффициентом корреляции R^2 не менее 0,99 (для хлормадинона ацетата) и $Y=0.000792X + 0.0188$ с коэффициентом корреляции R^2 не менее 0,99 (для этинилэстрадиола). Образцы калибровочных кривых представлены на рис. 5.10-5.11.

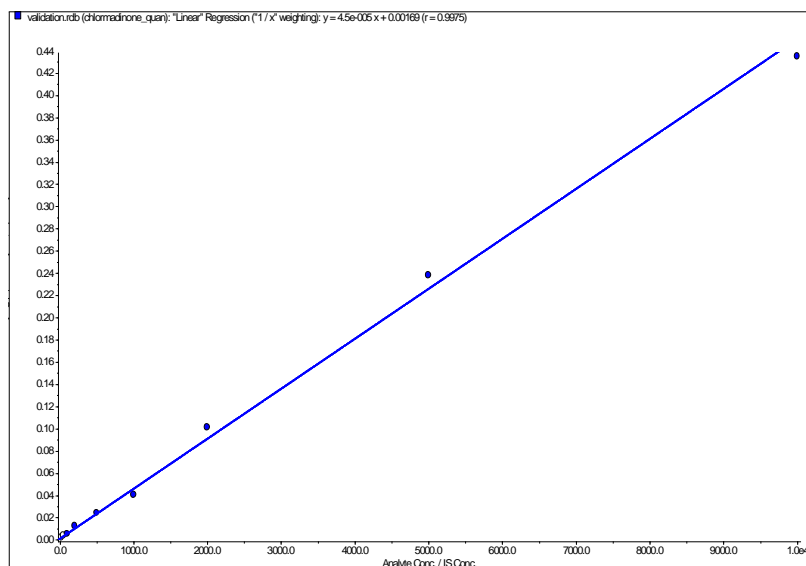


Рис. 5.10 - Калибровочная кривая хлормадинона ацетата в плазме крови в диапазоне концентраций 100-10000 пг/мл

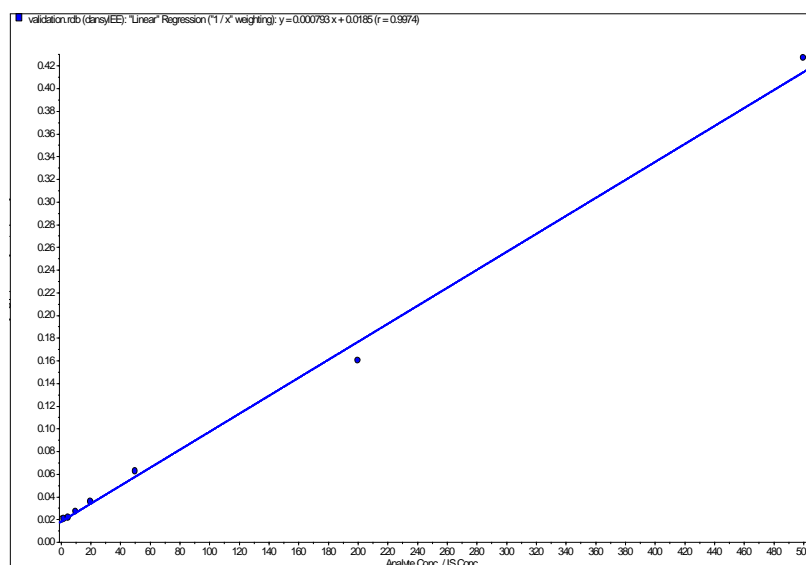


Рис. 5.11 - Калибровочная кривая этинилэстрадиола в плазме крови в диапазоне концентраций 2-500 пг/мл

Для оценки воспроизводимости результатов были получены 5 калибровочных кривых и проведен обратный расчет концентраций используемых стандартов по всем кривым и определены статистические данные.

Прецизионность и правильность внутри одной аналитической серии

Прецизионность и правильность метода внутри одной серии оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества QCA; QCB; QCC в составе одной аналитической серии. Каждый образец готовился в 6 повторах.

Расчет концентраций образцов контроля качества проводился по калибровочной кривой, полученной в составе той же аналитической серии. Данные по прецизионности и правильности определения хлормадинона ацетата и этинилэстрадиола в плазме крови человека внутри одной серии удовлетворяют критериям приемлемости.

Прецизионность и правильность между аналитическими сериями

Прецизионность и правильность метода между аналитическими сериями оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества QCA; QCB; QCC, выполненных в трех аналитических сериях. Каждый образец готовился в 6 повторах. Расчет концентраций образцов контроля качества проводился по калибровочной кривой, полученной в составе той же аналитической серии. Данные по прецизионности и правильности определения хлормадинона ацетата и этинилэстрадиола в плазме крови человека между аналитическими сериями удовлетворяют критериям приемлемости.

Степень извлечения

Степень извлечения хлормадинона ацетата и этинилэстрадиола из плазмы крови человека определяли путем сравнения площадей пиков образцов, экстрагированных из образцов контроля качества QCA (200/5 пг/мл), QCB (5000/200 пг/мл), QCC (10000/500 пг/мл), с площадями пиков матрицы, в которые добавили аналиты перед проведением дериватизации и второй экстракцией. Растворы для определения степени извлечения готовили следующим образом: брали по 1000 мкл «холостой» плазмы, такой же, что и для приготовления QCA-QCC, проводили первую экстракцию без добавления хлормадинона ацетата, этинилэстрадиола и внутреннего стандарта, разделяли слои замораживанием, выпаривали органическую фазу досуха. Затем добавляли по 10 мкл соответствующего сток-раствора стандарта (как для приготовления QCA-QCC) и по 10 мкл раствора внутреннего стандарта, после чего проводили дериватизацию и дальнейшую пробоподготовку. Измерение для каждой концентрации стандартов проводилось в шести повторах.

Стабильность

Для оценки стабильности хлормадинона ацетата и этинилэстрадиола в плазме крови человека использовали образцы контроля качества QCA (5,65 нг/мл), QCB (565 нг/мл) и QCC (1130 нг/мл), которые хранили в автосэмплере при +10°C в течение 24 часов, в течение 24 часов при комнатной температуре, а также образцы контроля качества после трёх циклов заморозки и последующей разморозки. Далее проводился анализ образцов вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивались со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. На их основе рассчитывался модуль разницы.

Разница по полученным результатам не превышает 15% для хранения образцов в автосэмплере в течение 24 часов, но превышает 15% после трехкратной заморозки-разморозки и для хранения образцов при комнатной температуре в течение 24 часов.

Кросс-перенос

Для оценки кросс-переноса были сделаны следующие инъекции в хроматографическую систему: пустая инъекция растворителя, затем 6 инъекций образца контроля качества QCC, затем снова пустая инъекция растворителя. Перенос пробы во второй инъекции растворителя не должен превышать 20% НПКО аналита и 5% внутреннего стандарта. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости.

Идентификация пика на хроматограмме

Идентификация пика хлормадинона ацетата происходила по его характеристичным ионам, родительскому и дочернему (режим MRM m/z 405,2>345,0), аналогично и дансилэтинилэстрадиола (режим MRM m/z 530,2>171,1). Пик фенаcetина идентифицировали по MRM-переходу 180,0>138,0.

Заключение по результатам валидации аналитической методики

Проведена валидация аналитической методики совместного количественного определения хлормадинона ацетата и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Чувствительность метода составила 2 пг/мл для этинилэстрадиола и 100 пг/мл для хлормадинона ацетата. Воспроизводимость, прецизионность и правильность достигается во всем интервале концентраций. Степень извлечения из плазмы крови человека составила 91,4% (хлормадинона ацетат) и 85,6% (этинилэстрадиол), анализируемое вещество стабильно при хранении в автосэмплере при температуре +10°C в течение 24 часов после пробоподготовки, но нестабильно при хранении в течение 24 часов при комнатной температуре, а также после трёх циклов заморозки и последующей разморозки.

Результаты исследования биоэквивалентности

Было проведено рандомизированное, открытое, сравнительное, перекрестное исследование биоэквивалентности лекарственных препаратов Ангелетта, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 2 мг+0,03 мг («Лабораториос Леон Фарма С.А.» Испания) и Белара[®], таблетки, покрытые пленочной оболочкой 2 мг+0,03 мг («Грюненталь ГмбХ», Германия) с участием 24 здоровых добровольцев женского пола.

Исследование состояло из скрининга (до 14 суток), двух равнозначных периодов исследования (по 4 суток) и периода «отмывки» (28 суток). График отбора образцов крови для фармакокинетического анализа: 0 (за 10-15 минут до приема препарата) и затем через 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72 и 96 часов после приема исследуемого лекарственного препарата или лекарственного препарата сравнения.

Хлормадинон быстро абсорбировался в кровь со средним значением $T_{max} = 1.0 \pm 0.4$ часа для препарата Ангелетта и $T_{max} = 1.0 \pm 0.4$ часа для препарата Белара[®] и элиминировался из крови со средним значением $T_{1/2} = 36.10 \pm 8.15$ часа и 37.45 ± 7.98 часа для тестового и референтного препаратов соответственно.

Максимальная концентрация хлормадинона после приема препарата Ангелетта составила $C_{\max} = 6280.4 \pm 2245.8$ пг/мл и $C_{\max} = 6283.9 \pm 3050.6$ пг/мл после приема препарата Белара®. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} хлормадинона после приема препарата Ангелетта составили 56580.0 ± 15319.4 пг*ч/мл и 46954.4 ± 13367.2 пг*ч/мл соответственно. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} хлормадинона после приема препарата Белара® составили 56838.1 ± 17765.3 пг*ч/мл и 45843.3 ± 14206.4 пг*ч/мл соответственно.

Этинилэстрадиол быстро абсорбировался в кровь со средним значением $T_{\max} = 1.8 \pm 1.1$ часа для препарата Ангелетта и $T_{\max} = 1.9 \pm 1.4$ часа для препарата Белара® и элиминировался из крови со средним значением $T_{1/2} = 18.34 \pm 9.13$ часа и 17.08 ± 9.63 часа для тестового и референтного препаратов соответственно. Максимальная концентрация этинилэстрадиола после приема препарата Ангелетта составила $C_{\max} = 131.9 \pm 70.6$ пг/мл и $C_{\max} = 136.4 \pm 73.7$ пг/мл после приема препарата Белара®. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} этинилэстрадиола после приема препарата Ангелетта составили 1859.9 ± 1917.6 пг*ч/мл и 1628.1 ± 1651.9 пг*ч/мл соответственно. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} этинилэстрадиола после приема препарата Белара® составили 1800.4 ± 1864.1 пг*ч/мл и 1568.7 ± 1524.8 пг*ч/мл соответственно.

Доверительный интервал для отношения логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} хлормадинона составил 97.24 – 110.74% (среднее значение 103.77%). Для логарифмически преобразованных значений C_{\max} и C_{\max}/AUC_{0-t} хлормадинона доверительные интервалы отношений составили 92.77 – 118.06% (среднее значение 104.71%) и 86.50 – 117.59% (среднее значение 100.80%) соответственно.

Доверительный интервал для отношения логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} этинилэстрадиола составил 92.04 – 113.77% (среднее значение 102.33%). Для логарифмически преобразованных значений C_{\max} и C_{\max}/AUC_{0-t} этинилэстрадиола доверительные интервалы отношений составили 87.72 -

113.66% (среднее значение 99.90%) и 85.38 – 111.52% (среднее значение 97.63%) соответственно.

Полученные доверительные интервалы лежат в пределах, установленных «Оценкой биоэквивалентности лекарственных средств (Методические рекомендации, 2008)», что говорит о биоэквивалентности исследуемых препаратов.

5.2.4. Препараты митотана

Валидация аналитической методики

Тест «Пригодность хроматографической системы»

Тестирование пригодности хроматографической системы включало оценку следующих параметров:

- число теоретических тарелок;
- фактор удерживания;
- коэффициент асимметрии пика;

Полученные значения вышеперечисленных параметров представлены в таблице ниже:

Параметр	Значение
Число теоретических тарелок (N):	>5500 для Митотана
Фактор удерживания (коэффициент емкости) (k')	3,79 для Митотана
Коэффициент асимметрии пика (A _s)	1,7 для Митотана
Время удерживания	11.372±0,05 минут для Митотана

Селективность

Для определения селективности были протестированы 6 образцов биологической матрицы, обработанной без стандарта митотана (double blank), на возможность создания помех потенциально мешающими веществами (эндогенные

компоненты матрицы, метаболиты, продукты разложения). В том числе образец гемолизированной и липемической плазмы.

Полученные результаты (таблица 5.1) удовлетворяют критериям приемлемости ($\text{Area d-bl/QC0} \leq 20\%$ для аналита и $\leq 5\%$ для внутреннего стандарта).

Таблица 5.1 - Определение селективности

Образец	QC0		d-bl		Area d-bl/QC0	
	Area	IS Area	Area	IS Area	Area	IS Area
Реплика №						
1	6182	141064	0	0	0,00	0,00
2	6082	133080	0	0	0,00	0,00
3	6207	135755	0	0	0,00	0,00
4	6270	131374	0	0	0,00	0,00
5*	6214	132425	0	0	0,00	0,00
6*	6154	141186	0	0	0,00	0,00

5*, 6* - липемическая и гемолизная плазма соответственно

Линейность и чувствительность

Определение предела обнаружения

Критерием нижнего предела количественного определения (НПКО) являлось превышение отношения сигнал/шум в нижних калибровочных точках значения 5. Нижний предел количественного определения проверялся по результатам анализа 6 повторностей нижних калибровочных точек (таблица 5.2).

Таблица 5.2 - Определение НПКО

Повторность	Соотношение сигнал/шум для митотана, 0,1 мкг/мл
1	10,37
2	9,63
3	9,79
4	10,47
5	10,33
6	14,29
Среднее	10,81

Линейность

Калибровочная кривая состояла из 10 ненулевых калибровочных стандартов, охватывающих диапазон концентраций 0,1 - 6 мкг/мл для митотана.

Зависимость отношения величин площадей пиков аналита от концентраций калибровочных стандартов была линейной и описывалась уравнением типа $Y=aX+b$ с коэффициентом корреляции R^2 не менее 0,99. Образцы калибровочных кривых представлены на рис. 6.12 – 6.14.

Для оценки воспроизводимости результатов были получены 3 калибровочные кривые и проведен обратный расчет концентраций используемых стандартов по всем кривым и определены статистические данные. В таблицах 5.3-5.4 представлен обратный расчет концентраций используемых стандартов по всем кривым и определены статистические данные. Воспроизводимость результатов с учетом критерия приемлемости достигается во всем интервале концентраций.

Таблица 5.3 - Параметры калибровочных кривых митотана в плазме крови человека

Номер калибровочной кривой	Наклон (коэффициент а)	Отсекаемый участок (коэффициент b)	Коэффициент корреляции
1	0.4323137	+2.51644e-003	0.996
2	0.4214404	- 3.618251e-003	0.994
3	0.4461452	- 9.561317e-005	0.998

Таблица 5.4 - Концентрации стандартов, рассчитанные по уравнениям калибровочных кривых для митотана

Номер калиб. Кривой	Cal1 0,1 мкг/мл	Cal2 0,5 мкг/мл	Cal3 1 мкг/мл	Cal4 1,5 мкг/мл	Cal5 2 мкг/мл	Cal6 2,5 мкг/мл	Cal7 3 мкг/мл	Cal8 3,5 мкг/мл	Cal9 4 мкг/мл	Cal10 6 мкг/мл
1	0,101	0,528	0,993	1,472	1,827	2,502	3,036	3,887	4,033	5,584
2	0,1	0,503	0,953	1,518	1,952	2,404	3,148	3,264	4,266	6,403
3	0,105	0,515	1,001	1,604	1,911	2,6	2,831	3,376	3,922	5,98
Mean	0,10	0,52	0,98	1,53	1,90	2,50	3,01	3,51	4,07	5,99
SD	0,00	0,01	0,03	0,07	0,06	0,10	0,16	0,33	0,18	0,41
CV, %	2,59	2,43	2,62	4,38	3,36	3,92	5,35	9,46	4,31	6,84
% от теор	102,00	103,07	98,23	102,09	94,83	100,08	100,17	100,26	101,84	99,82

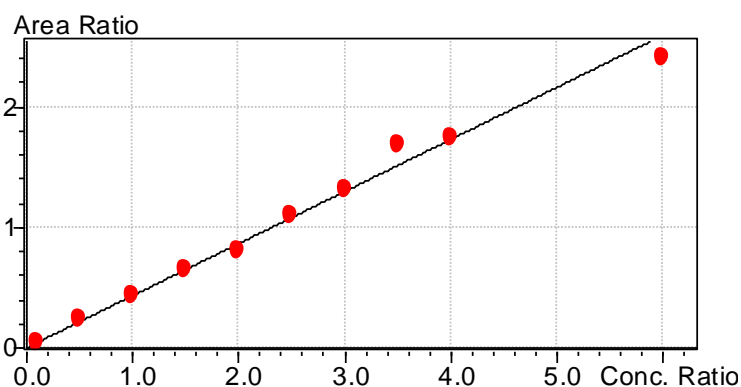


Рис 5.12 - Калибровочная прямая в диапазоне концентраций 0,1-6 мкг/мл для митотана. Первый аналитический цикл

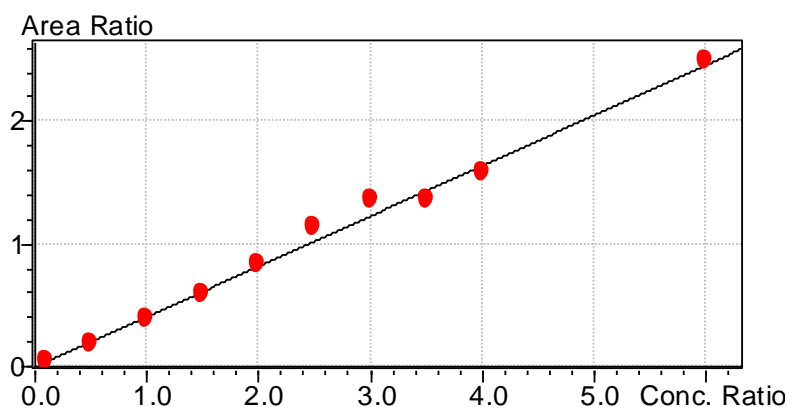


Рис. 5.13 - Калибровочная прямая в диапазоне концентраций 0,1-6 мкг/мл для митотана. Второй аналитический цикл

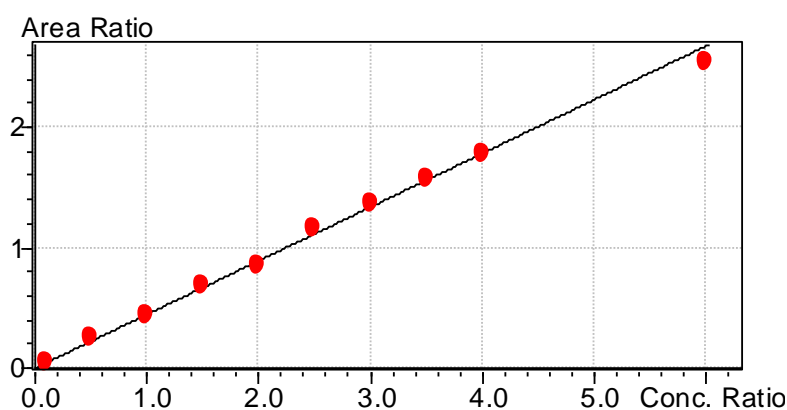


Рис. 5.14 - Калибровочная прямая в диапазоне концентраций 0,1-6 мкг/мл для митотана. Третий аналитический цикл

Прецизионность и правильность внутри одной аналитической серии

Прецизионность и правильность метода внутри одной серии оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества QC0; QCL; QCM; QCN в составе одной аналитической серии. Каждый образец готовился в 6 повторах. Расчет концентраций образцов контроля качества проводился по калибровочной кривой, полученной в составе той же аналитической серии. Данные по прецизионности и правильности определения митотана в плазме крови человека внутри одной серии представлены в таблице 5.5 и удовлетворяют критериям приемлемости.

Таблица 5.5 - Данные по прецизионности и правильности определения митотана в плазме крови человека внутри одной аналитической серии

Калибровочная кривая	QC0 0,1 мкг/мл	QCL 0,3 мкг/мл	QCM 2,75 мкг/мл	QCN 5 мкг/мл
1	0,103	0,284	2,424	-
	0,102	0,303	2,814	3,831
	0,105	0,279	2,594	3,945
	0,107	0,281	2,656	4,239
	0,105	0,305	2,572	3,761
	0,102	0,31	2,771	4,026
Mean	0,10	0,29	2,64	3,96
SD	0,00	0,01	0,14	0,19
CV,%	1,92	4,70	5,39	4,70
% от теоретического	104,00	97,89	95,95	99,01

Прецизионность и правильность между аналитическими сериями

Прецизионность и правильность метода между аналитическими сериями оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества QC0; QCL; QCM; QCN, выполненных в трех аналитических сериях. Каждый образец готовился в 6 повторах. Расчет концентраций образцов контроля качества проводился по калибровочной кривой, полученной в составе той же аналитической серии. Данные по прецизионности и правильности определения митотана в плазме крови человека между аналитическими сериями представлены в таблице 5.6 и удовлетворяют критериям приемлемости.

Таблица 5.6 - Данные прецизионности и правильности определения Митотана в плазме крови человека между аналитическими сериями

Калибровочная кривая	QC0 0,1 мкг/мл	QCL 0,3 мкг/мл	QCM 2,75 мкг/мл	QCH 5 мкг/мл
1	0,103	0,284	2,424	-
	0,102	0,303	2,814	3,831
	0,105	0,279	2,594	3,945
	0,107	0,281	2,656	4,239
	0,105	0,305	2,572	3,761
	0,102	0,31	2,771	4,026
2	0,104	0,309	2,905	3,812
	0,103	0,301	2,816	3,78
	0,095	0,297	2,768	4,15
	0,102	0,32	2,666	4,083
	0,102	0,317	2,65	3,986
	0,098	0,28	2,809	3,822
3	0,1	0,32	2,703	3,947
	0,104	0,279	2,618	3,881
	0,093	0,298	2,893	4,249
	0,095	0,283	2,735	4,187
	0,095	0,317	2,703	4,104
	0,093	0,315	2,703	3,975
Mean	0,10	0,30	2,71	3,99
SD	0,00	0,02	0,12	0,16
CV,%	4,44	5,13	4,40	4,03
% от теоретического	100,44	99,96	98,59	99,67

Стабильность

Для оценки стабильности митотана в плазме крови человека использовали образцы контроля качества QCL и QCH, которые хранили в автосэмплере в течение 72 часов, в течение 6 часов при комнатной температуре, и образцы контроля качества после трёх циклов заморозки и последующей разморозки. Также перед постановкой аналитических серий оценивалась стабильность сток

растворов. Далее проводился анализ образцов вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивались со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. Результаты представлены в таблицах 5.7-5.9. На их основе рассчитывался модуль разницы по формуле:

$$\text{Разница, \%} = \frac{\text{Ср.концентрация образца при хранении} - \text{Ср.концентрация свежепригот. Образца}}{\text{Ср. концентрация свежепригот образца}} \times 100$$

Разница по полученным результатам не превышает 15%.

Таблица 5.7 - Данные по стабильности митотана после пробоподготовки в автосэмплере в течение 72 часов

	Образцы после пробоподготовки (в автосэмплере)		Свежеприготовленные образцы	
	QCL 0,3 мкг/мл	QCN 5 мкг/мл	QCL 0,3 мкг/мл	QCN 5 мкг/мл
1	0,258	3,801	0,32	3,947
2	0,264	3,778	0,279	3,881
3	0,292	3,776	0,298	4,249
4	0,285	3,709	0,283	4,187
5	0,281	3,62	0,317	4,104
6	0,279	3,626	0,315	3,975
Mean	0,28	3,72	0,30	4,06
SD	0,01	0,08	0,02	0,15
CV,%	4,68	2,15	5,97	3,58
Разница, %	8,44	8,35		

Таблица 5.8 - Данные по стабильности митотана в плазме крови при хранении при комнатной температуре в течение 6 часов

	Образцы после хранения (комнатная температура)		Свежеприготовленные образцы	
	QCL 0,3 мкг/мл	QCH 5 мкг/мл	QCL 0,3 мкг/мл	QCH 5 мкг/мл
1	0,274	3,891	0,284	-
2	0,271	3,784	0,303	3,831
3	0,283	3,624	0,279	3,945
4	0,285	3,621	0,281	4,239
5	0,282	3,881	0,305	3,761
6	0,282	3,688	0,31	4,026
Mean	0,28	3,75	0,29	3,96
SD	0,01	0,12	0,01	0,19
CV,%	2,01	3,26	4,70	4,70
Разница, %	4,82	5,36		

Таблица 5.9 - Данные по стабильности митотана плазме крови после трёх циклов заморозки и последующей разморозки

	Образцы после трёх циклов заморозки и разморозки		Свежеприготовленные образцы	
	QCL 0,3 мкг/мл	QCH 5 мкг/мл	QCL 0,3 мкг/мл	QCH 5 мкг/мл
1	0,267	3,637	0,32	3,947
2	0,294	3,554	0,279	3,881
3	0,267	3,796	0,298	4,249
4	0,291	3,493	0,283	4,187
5	0,257	3,498	0,317	4,104
6	0,269	3,87	0,315	3,975
Mean	0,27	3,64	0,30	4,06
SD	0,01	0,16	0,02	0,15
CV,%	5,41	4,37	5,97	3,58
Разница, %	9,22	10,25		

В начале разработки аналитического метода были приготовлены сток-растворы стандартов и калибровочные растворы Митотана. Далее в начале валидации методики был приготовлены новые сток растворы и калибровочные растворы и сравнены с ранее приготовленными. Было показано, что калибровочные растворы стабильны в течение 7 дней (таблица 5.10).

Таблица 5.10 -Данные по стабильности калибровочных растворов Митотана в течение семи дней при -80°C.

	Калибровочные растворы после 7 дней хранения при -80 °C		Свежеприготовленные растворы	
	QC0, Area	QCH, Area	QC0, Area	QCH, Area
1	6395	317933	6769	337975
2	5995	302244	6685	310217
3	5878	319997	6287	333053
Mean	6089	313391	6580	327082
SD	271	9709	257	14811
CV, %	4,45	3,10	3,91	4,53
Разница, %	7,46	4,19		

Кросс-перенос

Перенос – это появление сигнала аналита в холостом (нулевом) образце после проведения анализа образца с высокой концентрацией аналита [119]. Перенос вещества из пробы в пробу (carry-over) оценивали путем сравнения площадей пиков образца-бланка d-bl, анализируемого после образца с высокими концентрациями аналитов (QCH) и образца QC0. Расчет проводили по формулам:

$$Carry\ over\ (analyte),\ \% = \frac{Area(Blank)}{Area(LLQC)} * 100\%$$

$$Carry\ over\ (BC),\ \% = \frac{Area(Blank)}{Area(IS)} * 100\%$$

Критерий приемлемости для аналитов составляет менее 20%, для BC – менее 5%.

Для оценки кросс-переноса были сделаны следующие инъекции в хроматографическую систему: 6 повторений последовательности QCN => double_blank => QC0. Перенос пробы в double_blank не должен превышать 20% НПКО аналита и 5% внутреннего стандарта. На хроматограммах растворителя после инъекций высоких пробы с высокой концентрацией аналита отсутствуют пики аналита и внутреннего стандарта. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости (таблицы 5.11- 5.12).

Отклик детектора на аналиты был на уровне шума, что свидетельствует об отсутствии переноса данных веществ при переходе от большей концентрации к меньшей.

Таблица 5.11 - Оценка кросс-переноса митотана

Название пробы	Area аналита Alq #1	Area аналита Alq #2	Area аналита Alq #3	Area аналита Alq #4	Area аналита Alq #5	Area аналита Alq #6
d-bl	0	0	0	0	0	0
Среднее	0					
QC0	6407	6508	6322	6241	6352	6262
Aread-bl/ AreaНПКО,%	0	0	0	0	0	0

Таблица 5.12 - Оценка кросс-переноса 4-4-ДДТ (IS)

Название пробы	Area аналита Alq #1	Area аналита Alq #2	Area аналита Alq #3	Area аналита Alq #4	Area аналита Alq #5	Area аналита Alq #6
d-bl	0	0	0	0	0	0
Среднее	0					
QC0	177140	177803	163574	170289	176035	174896
Aread-bl/ AreaНПКО,%	0	0	0	0	0	0

Тест на разбавление

Возможность разбавления образцов, содержащих митотан в концентрациях, превышающих верхний предел калибровочной кривой, изучалась на модельном образце с концентрацией митотана 8 мкг/мл. После разбавления образца плазмой человека в 2 раза проводилась пробоподготовка и анализ образца. Для

определения точности и достоверности концентрации аналитов в образце определялись в шести повторах. Результаты представлены в таблице 5.13. Полученные значения удовлетворяют критериям приемлемости.

Таблица 5.13 - Результаты теста на разбавление для митотана

	Полученные значения концентраций	Концентрация после пересчета
1	3,981	7,962
2	4,06	8,12
3	3,933	7,866
4	3,926	7,852
5	3,579	7,158
6	3,827	7,654
Mean		7,77
SD		0,34
CV, %		4,32
Разница, %		97,11

Матричный эффект

Обычно матричный эффект оценивают при сравнении пост-спайков (аналит добавляется после процедуры экстракции) с растворами аналита в чистых растворителях. Однако в данном случае не имелось возможности добавить раствор аналита в экстракт плазмы (газовая хроматография предполагает полное отсутствие следов воды в пробе, а растворить аналит в гексане было невозможно). В данном исследовании матричный эффект оценивали по анализу 6 повторов QCL и QCN, приготовленных на плазме из 6 разных источников (таблица 5.14).

Таблица 5.14 - Матричный эффект

	QCL 0,3 мкг/мл	QCN 5 мкг/мл
1	0,269	3,49
2	0,261	3,663
3	0,279	3,724
4	0,264	3,711
5	0,293	3,532

б	0,291	3,474
Mean	0,28	3,60
SD	0,01	0,11
CV,%	4,97	3,15
Разница, %	92,06	89,98

5.3. Выводы по главе

Разработаны и валидированы новые методики количественного определения воспроизведенных гормональных оральных контрацептивных средств, содержащих в качестве фармацевтической субстанции хлормадион+этинилэстрадиол, дезогестрел и дезогестрел+этинилэстрадиол. Методики информативны, воспроизводимы и достаточны для установления фармакокинетических параметров в клинических исследованиях биоэквивалентности.

В Министерство здравоохранения Российской Федерации в установленном порядке были поданы документы с целью получения разрешения на проведение клинических исследований и, после успешного их завершения, оценки результатов на основании подготовленных в соответствии с международными требованиями отчетов. Препараты Ангелетта таблетки, покрытые пленочной оболочкой 2 мг+0,03 мг, Диамилла, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 75 мкг и Бенидетта, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мкг+30 мкг, прошли установленную законом процедуру регистрации в РФ с принятием положительного решения о возможности их медицинского применения.

В рамках диссертационной работы была разработана новая методика количественного определения фармакологически активного вещества митотан в плазме крови человека для установления фармакокинетических параметров с целью сравнительного изучения фармакокинетических параметров в составе готовой лекарственной формы.

Проведена валидация аналитической методики количественного определения митотана в плазме крови человека методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Нижний предел количественного определения составил 0,1 мкг/мл для митотана. Воспроизводимость, прецизионность и правильность достигается во всем интервале концентраций. Анализируемое вещество стабильно при хранении в автосэмплере в течение 72 часов после пробоподготовки, в течение 6 часов при комнатной температуре, а также после заморозки и последующей разморозки.

ГЛАВА 6. ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ПРИ ПЛАНИРОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Одним из механизмов, способным оптимизировать процедуру оценки эффективности и безопасности воспроизведенных ЛП в рамках исследований биоэквивалентности, являются фармакогенетические методы. Несмотря на то, что в большинстве случаев исследование биоэквивалентности является рутинным, тем не менее, правильно спланированное исследование позволяет получить валидные данные и снизить расходы на разработку воспроизведенного препарата.

Межиндивидуальная вариабельность является основным фактором, влияющим на размер выборки в исследовании биоэквивалентности. К высоковариабельным ЛС относят некоторые ЛС из группы ингибиторов АПФ, ингибиторов протеазы ВИЧ-1, ингибиторов обратной транскриптазы, ингибиторов ГМГ-КоА-редуктазы, бисфосфонаты, агонисты дофаминовых рецепторов, антиагреганты, синтетические андрогены, синтетические аналоги витамина D, аналоги простагландина E, агонисты гидрокситриптаминовых рецепторов, антиаритмики [267].

Различная скорость метаболизма ЛС, связанная с полиморфизмом генов, вносит большой вклад в их вариабельность. Генотипирование и фенотипирование добровольцев до начала исследования позволяет выявить различия в системе метаболизма каждого индивида и предсказать возможную реакцию организма на вводимое ЛС. Однородность исследуемой группы позволяет снизить размер выборки и получить достоверные результаты в исследовании биоэквивалентности.

Нами проведено генотипирование и фенотипирование 20 здоровых добровольцев, которые могли быть включены в исследование биоэквивалентности. В качестве воспроизведенного препарата, метаболизм

которого в значительной мере зависит от индивидуальных особенностей ферментативной системы организма, был выбран небиволол.

Небиволол активно метаболизируется, частично с образованием активных гидроксиметаболитов. Метаболизм небиволола происходит путем алициклического и ароматического гидроксирования, N-деалкилирования и глюкуронирования, кроме того, образуются глюкурониды гидроксиметаболитов. Скорость метаболизма небиволола путем ароматического гидроксирования генетически определена окислительным полиморфизмом и зависит от CYP2D6. У лиц с быстрым метаболизмом $T_{1/2}$ небиволола из плазмы составляет в среднем 10 ч, у лиц с медленным метаболизмом - в 3-5 раз выше.

У лиц с быстрым метаболизмом значения $T_{1/2}$ гидроксиметаболитов из плазмы составляют в среднем 24 ч, у лиц с медленным метаболизмом - в 2 раза выше. Литературные данные [322] однозначно указывают на значительные различия в фармакокинетических параметрах «медленных» и «быстрых» метаболизаторов при проведении исследования биоэквивалентности, что может приводить к получению невалидных данных в случае, если перед началом исследования не было проведено предварительное фармакогенетическое тестирование, или если размер выборки был спланирован без учета высокой межиндивидуальной вариабельности небиволола.

6.1. Материалы и методы

Генетическое исследование проводилось по специально подобранным панелям - наборам полиморфизмов, ассоциированных с определенным влиянием на метаболизм ЛС. Детекция генетических полиморфизмов проводилась с помощью методики пиросеквенирования. Исследовался полиморфизм генов двух изоферментов CYP2C19 и CYP2D6, участвующих в метаболизме 80% ЛС.

Для исследования применялся прибор для пиросеквенирования PyroMarkQ24, набор реагентов «АмплиСенс® Пироскрин», профиль «ФАРМА-

скрин-1б» – профиль генетического исследования «I фаза биотрансформации, профиль 1», предназначена для выявления генетических полиморфизмов в генах, влияющих на индивидуальные особенности фармакологического ответа на применение антиагрегантных лекарственных, антигипертензивных, психотропных, антиаритмических и противоязвенных ЛС.

В качестве биологического материала использовалась цельная кровь (ЭДТА). Порядок проведения исследования:

1. Нарботка ампликона (выделение ДНК (1 ч), постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР) (2 ч));
2. Пробоподготовка (иммобилизация ПЦР-продукта в шейкере (0.5 ч), получение одноцепочечной ДНК в станции для пробоподготовки (10 мин), отжиг секвенирующего праймера в термостате (7 мин));
3. Детекция нуклеотидной последовательности (секвенирование (15 мин), анализ результатов).

Оценку активности изофермента CYP2D6 в ходе фенотипирования проводили с помощью определения в плазме крови здоровых добровольцев (предполагаемых участников исследования биоэквивалентности препаратов небиволола) эндогенного пинолина и его метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-бета-карболина. Методика определения в плазме крови пинолина и его метаболита была разработана в ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России в лаборатории клинической фармакологии [10].

Хроматограф: Agilent 1290 Infinity; Предколонка: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5 x 2,1 мм, 5 мкм (кат. № 821125-936); Колонка: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 100 x 2,1 мм, 1,8 мкм (кат. № 959758-902K); Температура колонки: (50 ± 1) °C; Скорость потока: 0,4 мл/мин; Детектирование: МС/МС, MRM-переходы для пинолина 203,2 m/z → 174,0 m/z, для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина 189,2 m/z → 160,0 m/z, для галантамина 288,3 m/z → 213,0 m/z; Метод ионизации: электроспрей (ESI) в положительной полярности; Объем пробы: 5 мкл. Ориентировочные времена удерживания в плазме крови: 6-гидрокси-1,2,3,4-

тетрагидро-β-карболин – около 1,1 мин; пинолин – около 5,0 мин; галантамин – около 2,4 мин. Ориентировочные времена удерживания в моче: 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – около 1,1 мин; пинолин – около 5,0 мин; галантамин – около 2,4 мин. Время хроматографирования: 14 мин. Подвижная фаза: Элюент А: 5 мМ аммония формиата и 0,01 % муравьиной кислоты в воде. Элюент В: 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Методика

Систему ВЭЖХ стабилизировали в условиях начального градиента (элюент А : элюент В = 95 % : 5 %) в течение 15 мин.

Градиентная программа:

Время, мин	Элюент А, % (об/об)	Элюент В, % (об/об)
0	95	5
1,5	95	5
2	70	30
8,5	40	60
12	95	5
14	95	5

В качестве метода количественного определения был выбран метод калибровки с внутренним стандартом. Для построения калибровочного графика были приготовлены растворы в плазме с добавлением известного количества стандартных образцов пинолина, его метаболита и внутреннего стандарта галантамина. Сначала готовили стандартные растворы пинолина, его метаболита и галантамина в метаноле. Затем, путем разведения этих растворов в плазме, получали серию калибровочных растворов. Концентрации калибровочных растворов были следующие – 250 пг/мл, 375 пг/мл, 500 пг/мл, 750 пг/мл, 1000 пг/мл, 1250 пг/мл и 1500 пг/мл. Концентрация внутреннего стандарта галантамина составила 20 нг/мл. После хроматографирования полученных растворов строили калибровочные графики зависимости отношения площадей исследуемого

вещества к внутреннему стандарту (ось X) от известных концентраций (ось Y), по которым определяли концентрации пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина.

Методика была валидирована на основе «Руководства по экспертизе лекарственных средств» под редакцией проф. А.Н. Миронова [119], а также Руководств FDA [251] и ЕМА [253] по показателям линейности, селективности, правильности, прецизионности и пределу количественного определения. Далее рассчитывался метаболический индекс путем деления концентрации метаболита на концентрацию пинолина.

6.2. Результаты собственных исследований

6.2.1. Генотипирование

Ген CYP2C19 (CYTOCHROME P450, SUBFAMILY 11C, POLYPEPTIDE 19)
(MIM 124020)

Название: цитохром P450 2C19. Расположение гена: Хромосома 10 locus 10q23.33. Исследование данного полиморфизма показано перед применением НПВП, ингибиторов протонной помпы, пролекарств, активирующихся с участием изофермента CYP2C19.

Характеристика гена и возможное влияние на метаболизм и эффективность ЛС

Ген кодирует цитохром P450 2C19, монооксигеназу печени, который является ферментом первой фазы детоксикации ксенобиотиков и отвечает за метаболизм некоторых ЛС (в т.ч. нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) и ингибиторов протонной помпы) и активацию пролекарств (клопидогрел).

При аллелях *2 и *3 активность фермента снижена, что приводит к замедлению метаболизма вышеуказанных ЛС. Наличие этих аллелей повышает

риск развития нежелательных лекарственных реакций (НЛР) при приеме стандартных доз вышеуказанных ЛС, что может потребовать снижения дозы. В случае применения пролекарств, которые активируются посредством изофермента CYP2C19, при аллелях *2 и *3 может потребоваться увеличение дозы для достижения терапевтического эффекта.

Частота встречаемости мутантного варианта гена: 20% (аллель *2) и 2% (аллель *3)

Исследованные полиморфизмы

1. 681 G>A (CYP2C19*2) (rs4244285). Аллель риска А, защитный аллель G. Генотипы AA и AG снижают метаболизм некоторых лекарств. Пациенты с таким генотипом, принимающие клопидогрел, имеют меньший эффект и повышенный риск развития сердечно-сосудистых осложнений. Генотип GG – норма.

2. 636 G>A(CYP2C19*3)(rs4986893). Аллель риска А, защитный аллель G. При генотипах AA и AG в данном полиморфизме нарушен метаболизм таких ЛС как клопидогрел, мефенитоин, прогунил, омепразол, эзомепразол и лансопризол. Генотип GG – норма.

3. 806 C>T(CYP2C19*17) (rs12248560). Аллель риска Т, защитный аллель С. У носителей генотипа СТ и ТТ отмечается ультрабыстрый метаболизм ЛС. У них отмечается сниженный эффект ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов.

CYP2D6 (CYTOCHROME P450, SUBFAMILY II, POLYPEPTIDE 6) (MIM 124030)

Название: цитохром P450D6. Расположение гена: хромосома 22 locus 22q13.2. Исследование данного полиморфизма показано перед применением антигипертензивных, психотропных и антиаритмических ЛС.

Характеристика гена и возможное влияние на метаболизм и эффективность ЛС

Ген кодирует цитохром P450D6, монооксигеназу печени, который является ферментом первой фазы детоксикации ксенобиотиков и отвечает за метаболизм

20% лекарств, в т.ч. антиаритмиков, антигипертензивных и психотропных ЛС, а также участвует в синтезе холестерина и других липидов.

При аллелях *3, *4 и *6 активность фермента снижена, а при делеции гена (аллель *5) вообще не продуцируется, что приводит к замедлению метаболизма вышеуказанных ЛС. При дупликации гена (аллель *1xN) продукция фермента повышена, и скорость метаболизма ЛС увеличивается.

Наличие аллелей *3, *4, *5 и *6 повышает риск развития НЛР при приеме стандартных доз некоторых антигипертензивных (альфа- и бета-адреноблокаторы, блокаторы «медленных» кальциевых каналов и ингибиторы АПФ), психотропных (антидепрессанты, нейролептики, противосудорожные ЛС) и антиаритмиков, что может потребовать снижения дозы вышеуказанных ЛС.

При аллеле *1xN может наблюдаться низкая эффективность вышеуказанных ЛС, что зачастую требует увеличение дозы для достижения терапевтического эффекта. Частота встречаемости мутантного варианта гена: 1-21%.

Распределение аллелей CYP2D6 в российской популяции таково, что 5,9% населения имеют медленно функционирующий фермент (т.е. являются медленными метаболиторами), 3,4% являются обладателями избыточно функционирующего фермента (быстрые метаболиторы). Именно поэтому можно наблюдать пациентов, у которых наблюдается выраженный клинический эффект на малые дозы ЛС, метаболизирующегося посредством CYP2D6, или, напротив, тех, у кого сложно достичь желаемого эффекта, применяя большие дозы.

Исследованные полиморфизмы

1. 2549 delA (CYP2D6*3) (rs35742686). Аллель риска del, защитный аллель A. Генотипы с мутациями в данном полиморфизме: A/del, del/del демонстрируют снижение активности фермента, и, соответственно, повышение частоты побочных эффектов ЛС.

2. G>A (CYP2D6*4) (rs3892097). Аллель риска А, защитный аллель G. Генотипа АА приводит к снижению метаболизма таких ЛС, как некоторые антидепрессанты и кодеина, усиливая побочные эффекты. Прием тамоксифена при данном генотипе показывает меньшую эффективность.

Генотипы АG и GG обычно демонстрируют нормальную скорость метаболизма вышеуказанных ЛС.

Аллели *1, *3, *4, *5, *6, *1xN (мутации, приводящие к изменению активности фермента). Аллель *1 считается нормой.

Результаты генотипирования по каждому добровольцу представлены в таблице 6.1.

Таблица 6.1 - Сводная таблица данных генотипирования

№	Выявленные аллели риска/мутации в полиморфизме гена	Выявленный генотип	Влияние генотипа на метаболизм	Возможное влияние на эффективность ЛС
1	Аллель риска/мутации в полиморфизме гена CYP2C19*2 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип демонстрирует замедление метаболизма некоторых ЛС (в т.ч. НПВП и ингибиторов протонной помпы) и активацию пролекарств (в т.ч. клопидогрел)	Повышение риска развития НЛР при приеме стандартных доз ЛС, что может потребовать снижение дозы. В случае применения пролекарств, которые активируются через CYP2C19 может потребоваться увеличение дозы для достижения терапевтического эффекта.
	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гетерозиготном состоянии	C/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов
2	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гомозиготном состоянии	T/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов

			антидепрессантов	
	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2D6*4 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип обычно демонстрирует нормальную скорость метаболизма ЛС (антидепрессантов, кодеина, тамоксифена)	Не снижает метаболизм ЛС
3	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гетерозиготном состоянии	C/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов
4	Аллель риска/мутация в гене CYP2C19*17 в гетерозиготном состоянии	C/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов
5	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гетерозиготном состоянии	C/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов
6	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*2 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип демонстрирует замедление метаболизма некоторых ЛС (в т.ч. НПВП и ингибиторов протонной помпы) и активацию пролекарств (в т.ч. клопидогрел)	Повышение риска развития НЛР при приеме стандартных доз ЛС, что может потребовать снижение дозы. В случае применения пролекарств, которые активируются через CYP2C19, может потребоваться увеличение дозы для достижения терапевтического эффекта.
	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2D6*4 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип обычно демонстрирует нормальную скорость метаболизма ЛС (антидепрессантов, кодеина, тамоксифена)	Не снижает метаболизм ЛС
7	Аллель риска/мутация в гене CYP2C19*17 в	C/T	Генотип демонстрирует	Снижение эффекта ингибиторов протонной

	гетерозиготном состоянии		ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов
8	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гетерозиготном состоянии	C/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов
	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*2 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип демонстрирует замедление метаболизма некоторых ЛС (в т.ч. НПВП и ингибиторов протонной помпы) и активацию пролекарств (в т.ч. клопидогрел)	Повышение риска развития НЛР при приеме стандартных доз ЛС, что может потребовать снижение дозы. В случае применения пролекарств, которые активируются через CYP2C19, может потребоваться увеличение дозы для достижения терапевтического эффекта.
9	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*2 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип демонстрирует замедление метаболизма некоторых ЛС (в т.ч. НПВП и ингибиторов протонной помпы) и активацию пролекарств (в т.ч. клопидогрел)	Повышение риска развития НЛР при приеме стандартных доз ЛС, что может потребовать снижение дозы. В случае применения пролекарств, которые активируются через CYP2C19, может потребоваться увеличение дозы для достижения терапевтического эффекта.
	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2D6*4 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип обычно демонстрирует нормальную скорость метаболизма ЛС (антидепрессантов, кодеина, тамоксифена)	Не снижает метаболизм ЛС
10	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2D6*4 в	A/A	Генотип демонстрирует снижение	Усиление побочных эффектов некоторых антидепрессантов и

	ГОМОЗИГОТНОМ состоянии		метаболизма некоторых антидепрессантов и кодеина.	кодеина. Прием тамоксифена при данном генотипе демонстрирует меньшую эффективность
11	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гетерозиготном состоянии	C/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов
12	аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гетерозиготном состоянии	C/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов
13	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гетерозиготном состоянии	C/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов
	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2D6*4 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип обычно демонстрирует нормальную скорость метаболизма ЛС (антидепрессантов, кодеина, тамоксифена)	Не снижает метаболизм ЛС
14	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гетерозиготном состоянии	C/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов
	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2D6*4 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип обычно демонстрирует нормальную скорость метаболизма ЛС (антидепрессантов, кодеина, тамоксифена)	Не снижает метаболизм ЛС
15	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гетерозиготном состоянии	C/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов

16	Не выявлено	-	Не влияет	Не влияет
17	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2D6*4 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип обычно демонстрирует нормальную скорость метаболизма ЛС (антидепрессантов, кодеина, тамоксифена)	Не снижает метаболизм ЛС
18	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гомозиготном состоянии	T/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов
19	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*2 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип демонстрирует замедление метаболизма некоторых ЛС (в т.ч. НПВП и ингибиторов протонной помпы) и активацию пролекарств (в т.ч. клопидогрел)	Повышение риска развития НЛР при приеме стандартных доз ЛС, что может потребовать снижение дозы. В случае применения пролекарств, которые активируются через CYP2C19, может потребоваться увеличение дозы для достижения терапевтического эффекта.
	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2D6*4 в гетерозиготном состоянии	G/A	Генотип обычно демонстрирует нормальную скорость метаболизма ЛС (антидепрессантов, кодеина, тамоксифена)	Не снижает метаболизм ЛС
20	Аллель риска/мутация в полиморфизме гена CYP2C19*17 в гетерозиготном состоянии	C/T	Генотип демонстрирует ультрабыстрый метаболизм ЛС (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов	Снижение эффекта ингибиторов протонной помпы (в т.ч. омепразол) и антидепрессантов

У 20 добровольцев всего было выявлено 30 аллелей риска/мутаций в полиморфизме гена CYP2C19 или CYP2D6. Из 20 добровольцев у 19 была выявлена аллель риска/мутация: у 5 в гене CYP2C19*2 (все в гетерозиготном состоянии), у 7 в гене CYP2C19*17 (6 – в гетерозиготном и 1 – в гомозиготном

состоянии), у 8 в гене CYP2D6*4 (7 – в гетерозиготном и 1 – в гомозиготном состоянии). У 8 из 20 добровольцев было выявлено по 2 аллели риска/мутации в полиморфизме гена CYP2C19 или CYP2D6. Только у 1 добровольца не было выявлено аллели риска/мутации в полиморфизме исследованных генов.

6.2.2. Фенотипирование

Субстратная специфичность определенных ферментов метаболизма ЛС позволила разработать методы их фенотипирования. Активность того или иного фермента метаболизма определяется по фармакокинетике его специфического субстрата, называемого «маркерным» субстратом, путем измерения его концентрации и концентрации его метаболита в плазме крови или в моче [55]. На основании этих данных рассчитывается так называемый «метаболический» индекс, равный отношению концентрации ЛС к концентрации его метаболита.

В данном исследовании в качестве «маркерного» субстрата использовался пинолин - эндогенное вещество, являющееся специфическим субстратом для CYP2D6. Специфичность пинолина по отношению к CYP2D6 составляет около 99% относительно других изоферментов цитохрома P450. Пинолин подвергается O-деметилированию с образованием метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина.

Полученные в ходе исследования результаты приведены в таблице 6.2.

Таблица 6.2 - Концентрация пинолина и его метаболита в плазме крови здоровых добровольцев и метаболическое отношение

	Пинолин (пг/мл)	Метаболит (пг/мл)	Отношение
1	1221,29	899,01	0,73611509
2	519,46	2047,89	3,94234397
3	2686,51	2744,61	1,02162657
4	2259,56	2851,38	1,26191825
5	1341,14	2391,94	1,78351253
6	1028,69	2472,76	2,40379512
7	3079,82	913,91	0,29674137
8	2503,91	1126,99	0,45009206
9	2875,48	430,31	0,14964806
10	1295,15	1774,87	1,37039725
11	2185,37	1011,87	0,46301999
12	3069,42	2645,85	0,86200324
13	1080,92	2558,58	2,36703919
14	2442,35	522,18	0,21380228
15	2710,36	1535,07	0,56637126
16	1513,65	2600,36	1,71794008
17	1268,46	1584,08	1,24882141
18	1520,63	1403,56	0,92301217
19	808,59	1946,05	2,40672034
20	518,04	2338,11	4,51337735

Из полученных данных видно, что у всех пациентов метаболический индекс лежит в пределах нормы (от 0,1 – 5,0), что свидетельствует о сопоставимой активности изофермента CYP2D6.

6.3. Результаты исследования биоэквивалентности препаратов небиволола

Исследование биоэквивалентности препаратов небиволола проводилось как одноцентровое, открытое, рандомизированное, по перекрестной схеме, включающее два периода с однократным приемом натошак двух лекарственных средств небиволола (Небиволол и Небилет[®]). Исследование состояло из скрининга, 2 периодов исследования и периода «отмывки». Длительность скрининга – до 14 дней. Длительность каждого периода – до 96 ч. после приема препарата, период «отмывки» - 14 дней.

Всего в результате скрининга было рандомизировано 20 добровольцев мужского и женского пола, которым предварительно было проведено гено- и фенотипирование.

Препараты Небиволол и Небилет[®] назначались согласно предварительно сгенерированной рандомизационной схеме, все включенные в исследование добровольцы получали исследуемый препарат Небиволол в дозе 5 мг (1 таблетка) и препарат сравнения Небилет[®] в дозе 5 мг (1 таблетка).

В течение каждого периода у добровольцев было отобрано по 16 образцов крови: до приема препарата и через 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 и 96 ч. после приема исследуемого лекарственного препарата или лекарственного препарата сравнения.

Исследование биоэквивалентности было проведено путем определения концентрации небиволола в плазме крови здоровых добровольцев методом ВЭЖХ/МС. Исходя из данных о концентрации небиволола в плазме крови, были рассчитаны фармакокинетические параметры.

Проведенный фармакокинетический анализ показал, что Небиволол быстро абсорбировался в кровь со средним значением $T_{\max} = 1.14 \pm 0.45$ ч. для препарата Небиволол и $T_{\max} = 1.20 \pm 0.46$ ч. для препарата Небилет[®] и элиминировался из крови со средним значением $T_{1/2} = 41.34 \pm 6.30$ ч. и 41.54 ± 10.60 ч. для тестового и референтного препаратов соответственно. Средняя максимальная концентрация

небиволола после приема препарата Невиволол составила $C_{\max} = 1166.18 \pm 746.80$ пг/мл и $C_{\max} = 1124.70 \pm 710.25$ пг/мл после приема препарата Небилет[®]. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} небиволола после приема препарата Невиволол составили 23877.9 ± 20157.6 пг*ч/мл и 19065.8 ± 15774.6 пг*ч/мл соответственно. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} небиволола после приема препарата Небилет[®] составили 20832.8 ± 13964.4 пг*ч/мл и 17548.8 ± 12461.6 пг*ч/мл соответственно.

Доверительный интервал для отношения логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} небиволола составил 89.85 - 112.30% (среднее значение 100.50%). Для логарифмически преобразованных значений C_{\max} и C_{\max}/AUC_{0-t} небиволола доверительные интервалы отношений составили 93.89 - 112.3% (среднее значение 102.63%) и 90.85 - 115.03% (среднее значение 102.22%) соответственно. Полученные доверительные интервалы лежат в пределах, установленных «Оценкой биоэквивалентности лекарственных средств (Методические указания, 2008)», что говорит о биоэквивалентности исследуемых препаратов.

6.4. Выводы по главе

Все добровольцы продемонстрировали примерно одинаковый генный полиморфизм, который не повлиял бы на метаболизм небиволола, что говорит о хорошо подобранной выборке добровольцев. В то время как если бы в выборке оказались медленные метаболизаторы, это бы привело к повышению вариабельности полученных фармакокинетических параметров в исследовании биоэквивалентности небиволола и к необходимости увеличения выборки здоровых добровольцев или к невалидности полученных результатов.

В целом, все 20 добровольцев были валидны для участия в исследовании биоэквивалентности небиволола, метаболизм которого протекает с участием изофермента CYP2D6, проведенное исследование подтвердило достаточность выборки и низкую вариабельность фармакокинетических параметров. Тем не

менее, при создании базы данных добровольцев для возможного участия в исследованиях биоэквивалентности воспроизведенных ЛП из группы антидепрессантов, ингибиторов протонной помпы, некоторых ЛС, являющихся пролекарствами (в т.ч. клопридогрел), тамоксифена, кодеина следует принимать во внимание, что эти добровольцы не должны рассматриваться в качестве потенциальных кандидатов для участия в исследовании, вследствие возможного влияния выявленных мутаций в полиморфизме генов на метаболизм указанных ЛС, и как следствие, повышения риска получения невалидных результатов исследования.

На сегодняшний день, генетические исследования в рамках исследований биоэквивалентности проводятся в единичных случаях. Их повсеместное внедрение и использование данных по генному полиморфизму позволит сократить размер выборки участников-добровольцев, тем самым сократив расходы на выведение воспроизведенных препаратов на рынок и их конечную стоимость для потребителей.

ГЛАВА 7. ФАРМАКОЭКОНОМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ТЕСТ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ КАК ЭЛЕМЕНТЫ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

По ряду МНН в России зарегистрировано десятки и более генериков. Есть основания полагать, что многие из них были допущены в обращение без должного изучения и оценки. Соответственно, не все обращающиеся на отечественном лекарственном рынке генерики можно считать взаимозаменяемыми с соответствующими инновационным (референтным) препаратами.

Изыскания, проведенные ведущими компаниями на высоком научном и методическом уровне, периодически приводят к созданию трудно воспроизводимых процессов и, соответственно, продуктов. В одних случаях это особые свойства кристаллов фармацевтической субстанции, в других - специфический состав вспомогательных веществ или специальные технологические приемы в изготовлении лекарственной формы. Высокая эффективность некоторых оригинальных препаратов может быть связана именно с этими особенностями. Как правило, такие тонкости не отражаются в патентной литературе и составляют «know how» фирмы. В связи с этим генериковые компании могут потратить много времени и сил на копирование таких препаратов после истечения срока их патентной защиты, но, при этом, так и не получают терапевтически эквивалентного ЛС.

Относительно низкая стоимость генериков - их единственное преимущество перед оригинальными средствами, - рассматриваемая в отрыве от их качества в широком смысле (включая эффективность и безопасность), может обернуться на практике более высокой стоимостью лечения. Примерами причин такого явления могут быть: недостаточная биодоступность, низкая стабильность, наличие примесей (механических, химических или биологических), ведущих к

непредвиденным побочным действиям и т.п.

Пострегистрационная комплексная оценка основных показателей качества, безопасности и эффективности представляет собой актуальное направление научных исследований в рамках, в частности, преквалификационной экспертизы. Одним из перспективных методов такой оценки может являться СТКР, который позволяет быстро и с небольшими затратами спрогнозировать фармакокинетику ЛП в организме человека, а соответственно и его клиническую эффективность, выявить возможный фальсификат, доля которого на отечественном рынке достаточно высока. С целью демонстрации эффективности данного метода в рамках пострегистрационной комплексной оценки нами проведено изучение сопоставимости показателей теста растворимости оригинального левофлоксацина (Таваник, производства Санофи, Франция) и его генерических аналогов (Г1 и Г2).

Помимо показателей эффективности и безопасности, комплексная оценка ЛП включает оценку экономических последствий его применения, изучение дополнительных последствий применения лекарственного препарата в целях принятия решений о возможности включения лекарственного препарата в перечень ЖНВЛП, нормативные правовые акты и иные документы, определяющие порядок оказания медицинской помощи.

Таким образом, полноценный пострегистрационный фармакоэкономический анализ как референтных препаратов, так и множества их генериков, входящих в различные списки (например, ЖНВЛП), находящихся в обращении на территории России, должен играть важную роль в процессе госзакупок, когда из множества вариантов выбирается оптимальный по таким параметрам как эффективность, безопасность и цена. Также очень важна доступность препарата в аптечной сети и приобретают особое значение стабильность терапевтического ответа и безопасность длительной терапии. Один из наиболее важных аспектов длительного лечения — взаимозаменяемость референтных препаратов и их воспроизведенных копий.

Так, например, воспроизведенные копии оригинальных антиэпилептических препаратов (АЭП) нашли широкое применение в большинстве стран мира, и в последние годы на фармацевтическом рынке появляется все больше генериков. Основная причина широкого распространения генериков, как уже говорилось выше — их более низкая стоимость по сравнению с оригинальными АЭП. При переходе с оригинального АЭП на более дешевый генерик с целью снижения стоимости лечения эпилепсии следует соблюдать особую осторожность [243]. Это связано с тем, что большинство АЭП имеют узкий терапевтический коридор (разница между средней терапевтической и токсической дозами), что, в свою очередь, диктует необходимость тщательного титрования дозы у каждого конкретного пациента. Кроме того, замены оригинальных препаратов на генерик могут повышать риск ухудшения эффективности (учащение или возобновление эпилептических приступов) или переносимости терапии (появление побочных эффектов), что приводит к снижению приверженности к лечению. Поэтому, по мнению специалистов в области эпилепсии, окончательное решение по выбору АЭП должно оставаться именно за врачом. Кроме того, не следует проводить замены различных торговых наименований АЭП у пациентов, находящихся в ремиссии [227]. При любых заменах АЭП (с оригинального препарата на генерик, с генерика на оригинальный препарат и с генерика на генерик) рекомендуется контролировать концентрации АЭП в крови [185]. В рамках диссертационной работы было проведено фармако-экономическое исследование целесообразности смены терапии эпилепсии оригинальным АЭП Топамакс (МНН: топирамат) на генерик [50]. Целью исследования явилось определение фармакоэкономической целесообразности смены терапии эпилепсии оригинальным препаратом на воспроизведенный в рамках экономии бюджетных средств при проведении госзакупок.

7.1. Материалы и методы

1) Сбор материала осуществлялся в доступных электронных медицинских базах данных: PubMed, регистрах контролируемых испытаний и систематических обзорах Кокрановской библиотеки. В ходе работы были проанализированы исследования и результаты клинического опыта антиэпилептической терапии оригинальными препаратами и генериками. Был проведен расчет прямых затрат на лечение пациентов с эпилепсией при замене терапии оригинальным топираматом на его генерик. В качестве генерического аналога топирамата был выбран препарат с наиболее низкой ценой — Тореал (100 мг, № 28).

Данные о цене оригинального топирамата, его генериков и других АЭП были взяты с портала Государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС) по состоянию на 12.08.11. Стоимость вызовов скорой помощи и госпитализации оценивалась согласно тарифам программы государственных гарантий на 2011 г. [107]. В работе было принято допущение, что при развитии эпилептического статуса в 100% случаев к пациенту приезжает скорая помощь и в обязательном порядке больной госпитализируется, поскольку развитие эпилептического статуса является ургентным состоянием, угрожающим жизни больного.

2) Исследование кинетики растворения трех препаратов левофлоксацина проводили при различных значениях pH среды [166]. Выбор значений pH среды основывался на рекомендациях Американской фармакопеи. Согласно этим рекомендациям, используемые в таких исследованиях значения pH сред составляют 1,2 и 6,8 для моделирования условий среды кишечного и желудочного соков и 4,5 как промежуточное. Исследования проводились на тестере биодоступности «Biodis» фирмы «Varian», модель VK750D. В емкости тестера биодоступности заливали соответствующую среду с выбранным значением pH и термостатировали при 37 °С. В 7 корзинок тестера помещали по одной таблетке, содержащей 500 мг каждого препарата и начинали растворение. При этом каждая

корзинка совершала возвратно-поступательное движения (т.н. циклы). Через заданные моменты времени (5, 10, 20, 30 мин) отбирали пипеткой по 1 мл пробы. Отобранные пробы центрифугировали при 5 000 об/мин, затем пробу разбавляли в 200 раз и определяли оптическую плотность на спектрофотометре «Cary 100» в 10 мм кварцевой кювете в максимуме поглощения. Предварительно, для каждого значения рН среды определяли максимум поглощения левофлоксацина. Для рН 1,2 максимум составил 293,0 нм, для рН 4,5 – 290,7 нм, для рН 6,8 – 288,0 нм. Продолжительность проведения теста кинетики растворения составила 30 мин.

7.2. Результаты исследования

7.2.1. Результаты фармакоэкономического исследования

Согласно данным врачебной практики (ЦКБ РАН, ГКБ № 63), длительность госпитализации больного с эпилепсией составляет в среднем 21 день. В этой связи в работе было принято допущение, что при развитии эпилептического статуса, а также при необходимости госпитализации больного из-за смены терапии, больной проводит в стационаре 21 день. В соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения средняя дневная доза Топамакса составляет 300 мг. Поэтому при расчете мы сделали допущение, что больные в среднем до смены терапии оригинальным препаратом на генерик получали Топамакс в дозе 300 мг в сутки.

Для адекватной оценки дополнительных затрат, связанных с переходом от монотерапии к политерапии после вынужденного возврата к лечению оригинальным топираматом, был проведен опрос мнения ведущих эпилептологов о частоте назначения топирамата при политерапии эпилепсии. Согласно результатам этого опроса Топамакс назначается в следующих комбинациях:

1. 65 % случаев: топирамат + вальпроевая кислота (Депакин, 1750 мг);
2. 20 % случаев: топирамат + карбамазепин (Финлепсин, 800 мг);

3. 10 % случаев: топирамат + левитирацетам (Кеппра, 2500 мг).

В таблице 7.1 приведены все данные по стоимости различных АЭП.

Таблица 7.1 - Данные по стоимости различных АЭП

Наименование препарата	Стоимость упаковки, руб	Стоимость средней суточной дозы, руб	Стоимость годовой терапии, руб
Топамакс (капсулы 50 мг, №60)	2182,85	218,30	79679,50
Тореал (таблетки 100 мг, №28)	533,18	57,20	20878,00
Левитирацетам (Кеппра 500 мг, №60)	2774,55	231,20	84388,00
Вальпроевая кислота (Депакин 500 мг, №30)	551,16	64,30	23469,50
Карбамазепин (Финлепсин 400 мг, №50)	221,05	8,84	3226,60

В таблице 7.2 приведены данные по длительности и стоимости госпитализации больных с эпилепсией при использовании различных схем терапии. Данные из таблиц 1-2 будут использоваться при проведении фармакоэкономических расчетов.

Таблица 7.2 - Частота, длительность и стоимость госпитализации больных с эпилепсией

Исследуемый показатель	Величина
Стоимость одного койко-дня в стационаре	1380,60
Средняя продолжительность госпитализации больных с	15

эпилепсии, дни	
Максимальная продолжительность госпитализации при переводе на генерик, дни	21
Число больных с необходимостью госпитализации при переключении с Топамакса на генерик	63
Число больных с необходимостью госпитализации при терапии Топамаксом	38

Фармакоэкономические расчеты произведены с использованием метода анализа влияния на бюджет, который предусматривает оценку всех видов затрат, связанных с внедрением в реальную практику нового ЛП с учетом эффективности. Итоговый результат при данном виде фармакоэкономического анализа выражается в виде денежной суммы, которую можно либо сэкономить, либо, наоборот, дополнительно потратить на использование оцениваемой медицинской технологии по сравнению с применяемой медицинской технологией или по сравнению с отсутствием какого-либо медицинского вмешательства.

Затраты на оказание медицинской помощи в связи с развитием эпилептического статуса рассчитывались по следующей формуле:

$$(A \times B + A \times C \times D)/160,$$

где: А — число пациентов с эпилептическим статусом; В — стоимость вызова скорой помощи; С — средняя продолжительность госпитализации больного с эпилепсией; D — стоимость 1 койко-дня в стационаре. Таким образом, дополнительные затраты, связанные с развитием эпилептического статуса, составляют 870,42 руб. в расчете на 1 больного (в ценах 2011 года).

Затраты, связанные с увеличением частоты и длительности госпитализаций после перевода пациента с оригинального топирамата на его генерик рассчитывались по формуле:

$$(A \times B \times C - D \times E \times C)/160,$$

где: А — число больных с необходимостью госпитализации при переключении с Топамакса на генерик; В — продолжительность госпитализации при переводе на генерик; С — стоимость 1 койко-дня в стационаре; D — число больных с необходимостью госпитализации при терапии Топамаксом; Е — средняя продолжительность госпитализации больных с эпилепсией. Таким образом, дополнительные затраты, связанные с увеличением частоты и продолжительности госпитализации больных с эпилепсией при смене терапии с оригинального топирамата на его генерик, в расчете на одного больного составили 6520,49 руб.

Затраты, связанные с возвратом к исходной терапии после срыва ремиссии рассчитывались по формуле:

$$(A \times B \times 365 + C \times B \times 365 \times 1,4 + D \times E \times 365 + F \times G + H \times I + J \times K)/160,$$

где: А — число больных, которым потребовался возврат терапии Топамаксом после срыва ремиссии; В — стоимость средней суточной дозы Топамакса; С — число больных, которым потребовался возврат терапии Топамаксом с увеличением дозы в 1,4 раза после срыва ремиссии; D — число больных в ремиссии без возврата терапии Топамаксом; Е — стоимость средней суточной дозы воспроизведенного препарата; F — число больных, которым при переходе к политерапии была добавлена вальпроевая кислота; G — годовая стоимость терапии вальпроевой кислотой; H — число больных, которым при переходе к политерапии был добавлен карбамазепин; I — годовая стоимость терапии карбамазепином; J — число больных, которым при переходе к политерапии был добавлен левитирацетам; K — годовая стоимость терапии левитирацетамом. Таким образом, затраты, связанные с возвратом к исходной терапии, составляют 1081,27 руб. в расчете на одного пациента.

Общие затраты, которые сопровождают замену терапии Топамаксом на его генерические аналоги

В таблице 7.3 приведены общие затраты, связанные с последствиями замены терапии Топамаксом на генерик.

Таблица 7.3. Суммарные затраты при смене терапии на генерик, руб

Виды затрат	Сумма, руб.
Затраты на оказание медицинской помощи в связи с развитием эпилептического статуса	870,2
Затраты, связанные с увеличением частоты и длительности госпитализаций после перевода пациента с Топамакса на его генерик	6520,49
Затраты, связанные с возвратом к исходной терапии Топамаксом после срыва ремиссии	1081,27
Итого на одного пациента	8472,18

Результаты проведенных расчетов показали, что помимо развития клинических осложнений, смена терапии оригинальным топираматом на генерик влечет за собой дополнительные затраты в размере 8472,18 рублей на одного пациента. Таким образом, переключение с Топамакса на его воспроизведенный аналог фармакоэкономически не целесообразно.

7.2.2. Результаты сравнительного теста кинетики растворения препаратов левофлоксацина

Результаты проведенных исследований представлены в табл. 7.4-7.7.

Таблица 7.4 - Кинетика растворения препаратов левофлоксацина при pH 1,2

Препарат	Степень высвобождения, %			
	время отбора пробы, мин			
	5	10	20	30
Г1	98,3	99,2	99,2	99,3
Г2	78,4	99,3	99,5	99,5
Таваник	11,3	44,7	98,4	99,8

Таблица 7.5 - Кинетика растворения препаратов левофлоксацина при pH 4,5

Препарат	Степень высвобождения, %			
	время отбора пробы, мин			
	5	10	20	30
Г1	59,4	78,8	86,3	89,2
Г2	54,0	64,5	70,3	73,3
Таваник	5,1	30,5	72,8	98,2

Таблица 7.6 - Кинетика растворения препаратов левофлоксацина при pH 6,8

Препарат	Степень высвобождения, %			
	время отбора пробы, мин			
	5	10	20	30
Г1	76,8	79,4	90,8	93,9
Г2	70,1	77,0	80,5	80,5
Таваник	8,3	34,2	77,8	94,4

В результате проведенного исследования установлено, что оригинальный левофлоксацин обладает стабильными параметрами биодоступности, существенно не меняющимися при различных условиях pH среды. В то же время параметры биодоступности изученных генерических аналогов левофлоксацина существенно зависели от кислотности среды высвобождения, что свидетельствует о возможной вариабельности фармакокинетических параметров данных препаратов в организме человека. При pH 1,2 генерические аналоги по параметрам биодоступности *in vitro* были сходны с оригинальным препаратом. Однако при pH 4,5 Г1 высвободил к 30 мин теста только 446 мг левофлоксацина, а Г2 при тех же условиях и вовсе только 367 мг. Похожие результаты были получены и при pH 6,8. Очевидно, что создание субтерапевтических концентраций антибактериального препарата в организме человека вследствие низкой биодоступности используемого воспроизведенного аналога в конечном итоге приведет к необходимости смены препарата из-за его неэффективности, а также к риску селекции резистентных штаммов микроорганизмов.

При тех же условиях растворения из лекарственной формы оригинального препарата к окончанию теста высвободилось 491 мг и 474 мг соответственно. Следовательно, использование клиницистом оригинального препарата позволяет быть ему уверенным в предсказуемости фармакокинетических и фармакодинамических свойств назначенного лекарственного средства.

7.3. Выводы по главе

1) От воспроизведенных ЛП требуется не только подтверждение клинической эффективности и безопасности, востребованности и т.д., но и фармакоэкономической целесообразности их применения. Рациональная и фармакоэкономически эффективная лекарственная терапия позволит не только снизить прямые затраты на лечение конкретного заболевания, но и улучшить значения индикаторных социальных показателей и показателей здравоохранения.

Сегодня все чаще государственные регуляторные учреждения в сфере здравоохранения предъявляют к фармацевтическим компаниям требования о необходимости предоставления оценок методов лечения, показывающих не только соотношение затраты и эффективности, затраты и полезности от его внедрения, но и степени влияния на статьи национального, регионального и местного бюджетов. Фармакоэкономический анализ является неотъемлемой частью преквалификационных процедур, а наличие научно-обоснованных данных об экономических преимуществах того или иного генерика необходимо при включении его в программу госзакупок.

2) Результаты СТКР препаратов левофлоксацина свидетельствуют о низкой биодоступности воспроизведенных препаратов по сравнению с оригинальным. Данные современной литературы свидетельствуют о том, что чрезвычайно важным фактором, влияющим на эффективность применения фторхинолонов, является показатель их биодоступности. Установлено, что для данного класса антимикробных препаратов отношение площади под

фармакокинетической кривой к максимальной подавляющей концентрации (МПК) (AUC/МПК) при тяжелых инфекциях должно превышать 125. Соответственно, даже незначительное снижение дозы активного вещества, попадающей в системный кровоток, неминуемо скажется на клинической эффективности применяемого препарата. Кроме того, снижение дозы антибиотика, попадающей в системный кровоток, способствует селекции устойчивости среди микроорганизмов.

Таким образом, полученные в рамках пострегистрационной комплексной оценки данные позволяют предположить, что применение изученных воспроизведенных аналогов левофлоксацина может сопровождаться повышением риска клинических неудач и ростом резистентности микроорганизмов к данному препарату, т.о. в данном случае замена оригинального препарата генериками нецелесообразна.

ГЛАВА 8. РАЗРАБОТКА МЕЖДИСЦИПЛИНАРНОГО ПОДХОДА К ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ, ЭФФЕКТИВНОСТИ И КАЧЕСТВА ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

8.1. Материалы и методы

Сбор материала осуществлялся в доступных электронных базах данных, были применены методы изучения научной литературы в области обращения, стандартизации и контроля воспроизведенных лекарственных препаратов, нормативно-правовой базы, аналитический и сравнительный методы.

8.2. Научное консультирование в основе междисциплинарного алгоритма принятия решения по оценке безопасности, эффективности и качества воспроизведенных лекарственных средств

С 1 июля 2015 года вступили поправки в ФЗ-61 [2]. Среди ряда изменений, впервые прописана процедура научного консультирования по вопросам, связанным с проведением доклинических, клинических исследований, экспертизы качества ЛС и возможности государственной регистрации. Консультирование осуществляется с привлечением федеральных государственных бюджетных учреждений (ФГБУ), подведомственных данному федеральному органу исполнительной власти и не участвующих в организации проведения экспертизы качества ЛС в целях осуществления их государственной регистрации. Тем самым заявитель получает возможность воспользоваться научной базой ведущих исследовательских учреждений России, что в теории способно облегчить и ускорить разработку нормативной документации, проведение доклинического и клинического этапов жизненного цикла ЛС и его вывод на рынок.

До принятия поправок к закону производители получали необходимые научные сведения либо своими силами, либо привлекали организации, которые

как им понималось могут быть экспертами в данных вопросах. Сейчас Минздрав России проводит консультации с привлечением экспертных организаций. Однако не определены вопросы, по которым разработчики могут обращаться за научным консультированием, не указаны принимающие участие в процедуре организации и главное, не закреплён статус выдаваемых заключений. Тем самым ни Минздрав России, ни Научный центр экспертизы средств медицинского применения, который непосредственно проводит экспертную оценку общего технического документа, не несут ответственности за экспертное заключение в рамках научного консультирования и не обязаны принимать его во внимание при принятии решения о допуске ЛП в свободное обращение на территории России. Это вызывает большую озабоченность со стороны производителей и разработчиков ЛС.

В Евросоюзе для консультации перед любой регистрационной процедурой по национальной или централизованной схеме компания-заявитель обращается непосредственно в регулирующий орган, который будет осуществлять экспертизу регистрационного досье. Совет, данный в ответ на запрос, в обязательном порядке вкладывается в досье при его подаче. Представитель регуляторных властей несёт непосредственную ответственность за оказанную услугу, что в свою очередь даёт заявителю гарантии в том, что полученный и должным образом реализованный совет является залогом успеха, т.е. одобрения поданного досье.

Развитие процедуры научного консультирования (НК) является несомненно положительным моментом. Тем не менее, нельзя не отметить наличие ряда сложностей, связанных с недостаточной проработанностью данного вопроса. В частности, отсутствует административный регламент применения НК. Кроме того, не понятны формы и типы НК, недостаточно проработаны критерии отбора организаций, осуществляющих функции НК.

В рамках диссертационной работы (рис. 8.1) предложена схема, регламентирующая порядок осуществления НК, основанная на междисциплинарном алгоритме принятия решения (рис. 8.2).

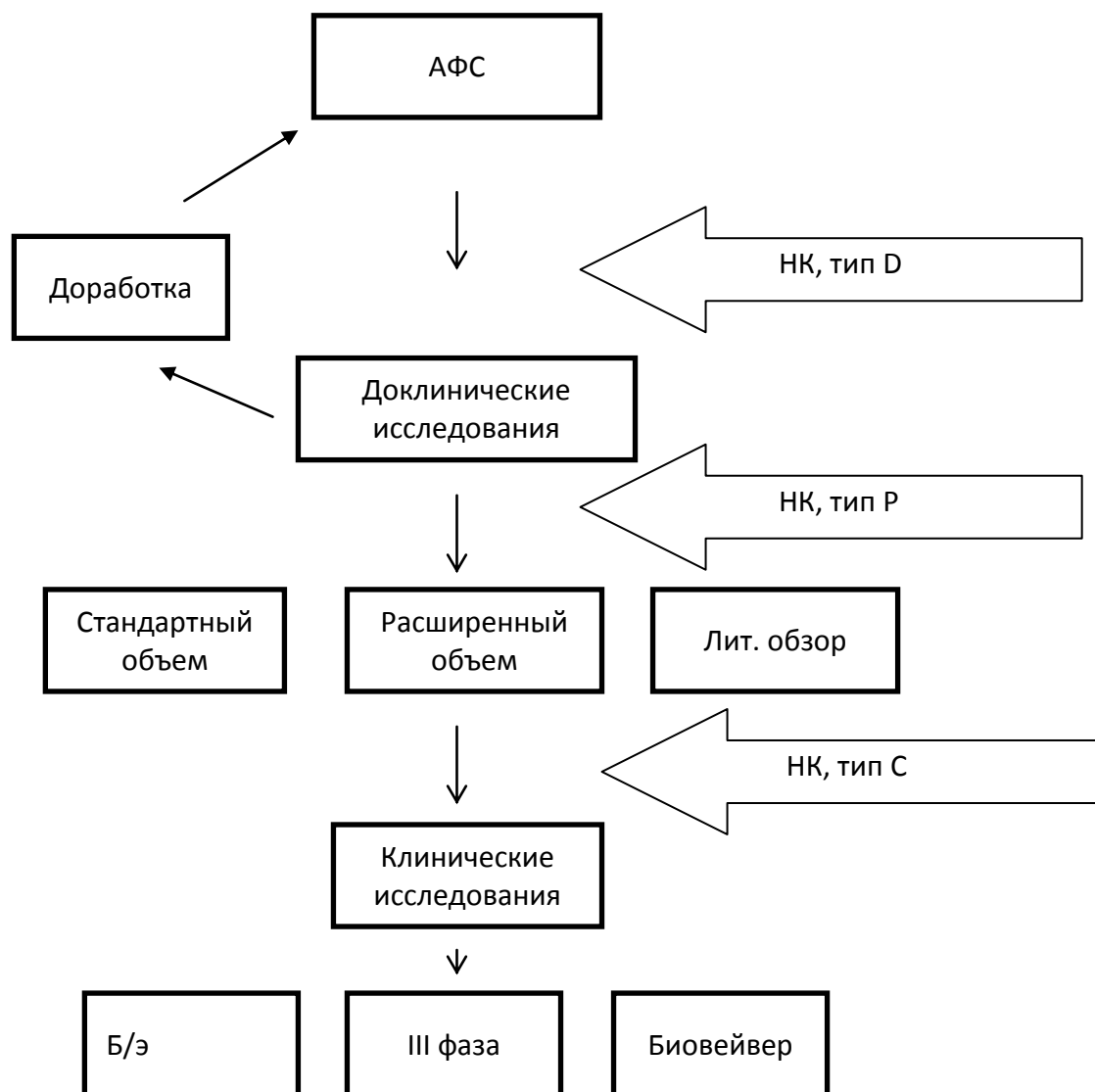


Рис. 8.1 - Регламент осуществления научного консультирования на разных предрегистрационных этапах

Согласно данной схеме заявитель может обратиться в Минздрав еще на этапе разработки препарата (этап D – development). В свою очередь Минздрав перенаправляет запрос о НК в одно из своих подведомственных учреждений, не участвующих непосредственно в экспертизе, но обладающих нужной компетенцией в данной сфере. На данном этапе разработчик может проконсультироваться относительно необходимого объема физико-химических исследований АФС, при наличии уже проведенных исследований – получить заключение об их достаточности (или недостаточности) в плане предварительной

оценки качества. В зависимости от результатов, разработчик может либо переходить к доклиническим исследованиям своего препарата, либо, при наличии существенных замечаний – вернуться к доработке (изменение состава вспомогательных в-в, способов синтеза АФК и т.д.) состава препарата.

На этапе Р (preclinical) заявитель по той же схеме может обратиться за консультацией, касающейся объема необходимых доклинических исследований. В зависимости от полученных рекомендаций, заявитель в дальнейшем может провести либо стандартный объем доклинических исследований безопасности (общетоксическое и местнораздражающее действие), либо более расширенный объем (например, для биоаналогичных препаратов), либо и вовсе ограничиться литературным обзором проведенных исследований на основании открытых данных (если препарат хорошо изучен).

На этапе С (clinical), научное консультирование касается завершающей стадии разработки ЛП, а именно подтверждения эффективности и безопасности ЛП в ходе клинических исследований с участием здоровых добровольцев или пациентов. Так, в зависимости от имеющихся данных, касающихся физико-химических и иных свойств ЛП (полученных либо в рамках НК на этапах D и Р, либо самостоятельно), проводящее консультирование научное учреждение может рекомендовать заявителю провести исследование БЭ, а при невозможности (например, для парентеральных лекарственных форм) – клиническое исследование III фазы (например, для парентеральных лекарственных форм). В случае соблюдения ряда требований по растворимости и проницаемости АФС (I класс по БКС), результатом НК может являться рекомендация к применению процедуры «биовейвер» и замене исследования *in vivo* на проведение СТКР. Таким образом, мы рекомендуем введение как минимум трех типов НК (D, P, C), связанных с основными этапами жизненного цикла ЛС.

Все типы НК являются взаимосвязанными, каждая следующая стадия основывается на результатах, полученных на основании предыдущего консультирования. Компетенции организаций, выдающих заключения, имеют

различные научные направления и специализируются во многих областях экспериментального исследования ЛС. Тем самым можно говорить о междисциплинарном подходе к оценке эффективности, безопасности и качества ВЛП, что в свою очередь может быть принято за основу алгоритма принятия решения федеральным органом об обращении ЛС.

Научные центры, проводящие процедуру НК, должны соответствовать ряду критериев, определяющих их способность осуществлять данную услугу:

- Наличие материально-технической базы, соответствующей профилю консультирования в зависимости от этапа обращения заявителя. Центр должен использовать передовые научные технологии и обладать современными приборами и оборудованием, отработанными методологиями проведения экспертизы и анализа.
- Наличие научного и технического персонала, обладающего высоким уровнем квалификации и опытом проведения работ в конкретной научно-исследовательской области.

Учитывая данные критерии, Минздрав России определяет ответственные учреждения, осуществляющих НК по каждому типу обращений. Для расширения возможностей получения заявителем качественного консультирования, к данной процедуре возможно подключить не только подведомственные МЗ РФ учреждения, но и, например, учреждения Министерства образования и науки РФ, обладающие соответствующей компетенцией.

8.3. Выводы по главе

Полученный в рамках предрегистрационного НК ответ должен признаваться Минздравом России, важно легитимизировать статус заключения по результатам НК и в зависимости от его типа применяться при последующих этапах взаимодействия заявителя и регулятора. В дальнейшем, при непосредственном осуществлении регистрационной деятельности, Минздраву

России необходимо рассматривать поданные материалы и оценивать их, исходя из сделанных рекомендаций. В случае если заявитель учел их, то полученный в рамках НК официальный ответ, должен быть гарантией того, что полученное заключение является залогом успеха регуляторного проекта компании.

Компаниям-производителям ЛС необходимо иметь возможность структурированного, открытого диалога между экспертом-регулятором и разработчиком, являющегося общепризнанной международной практикой. Совершенствование процедуры НК позволит внедрить полноценный инструмент стандартизации контроля качества, эффективности и безопасности ВЛП, снизить расходы на разработку и ускорить их вывод на рынок, что в конечном счете благоприятно отразится на обеспечении российских потребителей качественными и доступными ЛП.

С 1 января 2016 года начал функционировать единый рынок лекарств и медицинских изделий стран ЕАЭС. В разработанных на сегодняшний день «Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения», процедура НК прописана, но также требует уточнений: «... До подачи заявления на регистрацию лекарственного препарата уполномоченные органы или экспертные организации государств-членов вправе по запросу заявителя проводить научные и предрегистрационные консультации в соответствии с законодательством государств-членов, по вопросам, связанным с проведением аналитических испытаний, доклинических и клинических исследований (испытаний), аспектам процедуры регистрации, в том числе по вопросам, касающимся квалификации, разновидности заявления на регистрацию лекарственного препарата с целью определения объема документов и данных регистрационного досье, в отношении комплектности регистрационного досье, определения аффилированных лиц в государствах признания, формата подачи заявления и регистрационного досье...».

Учитывая активно продолжающийся процесс разработки нормативно-правовой базы, важно внести необходимые корректировки в схеме осуществления НК, которая будет имплементирована в рамках регуляций внутри ЕАЭС.

Таким образом, определив три типа НК, ряд критериев, определяющих компетенцию организаций, проводящих НК, обязательность при предрегистрационной экспертизе ЛС принятия за основу, выданного ранее заключения НК, мы можем говорить о возможности формирования междисциплинарного алгоритма принятия решения по оценке безопасности, эффективности и качества ВЛП.

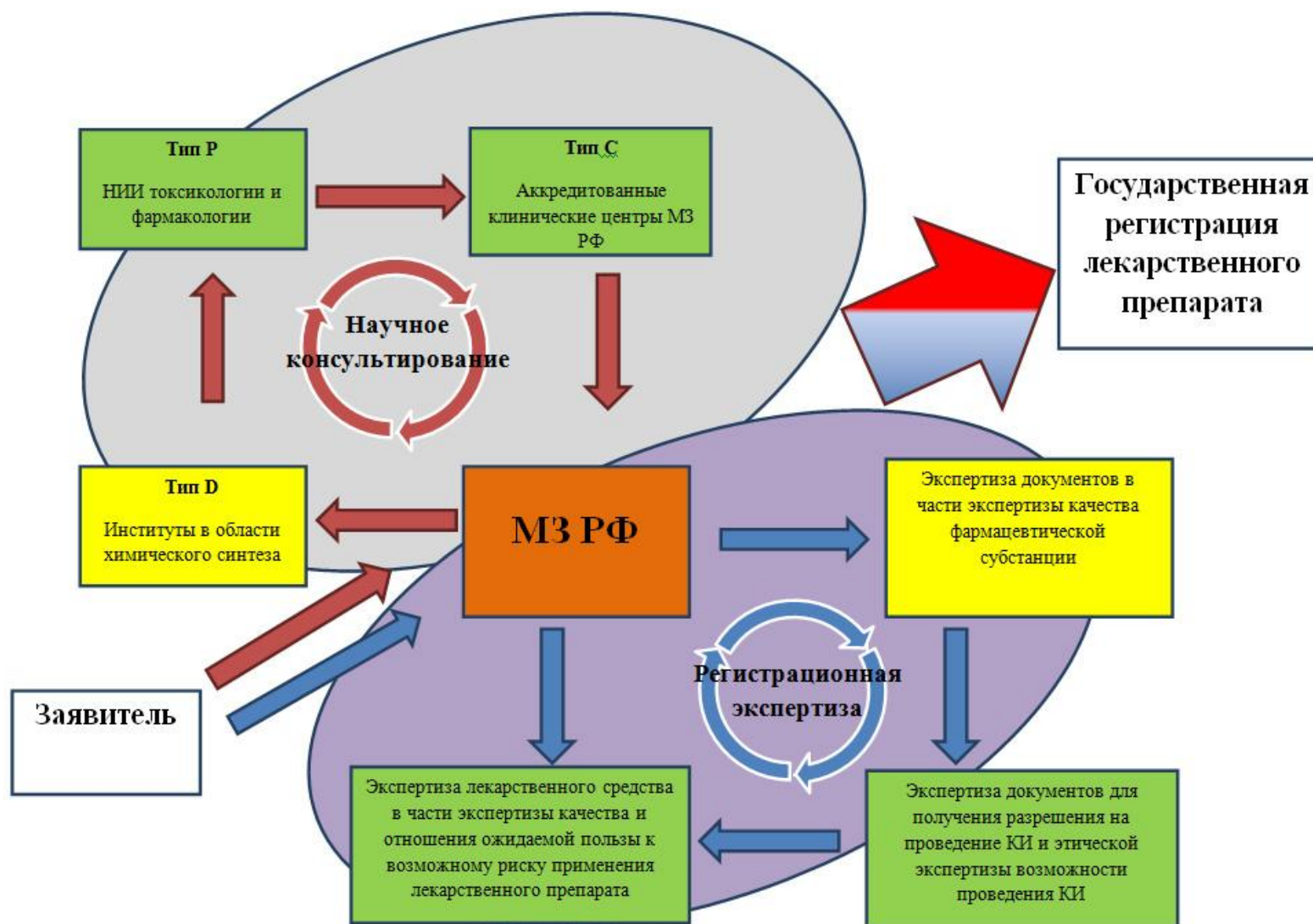


Рис. 8.2 - Общая схема взаимодействия заявителя и регулятора в ходе научного консультирования

ОБСУЖДЕНИЕ

Вопросы импортозамещения с целью обеспечения граждан РФ безопасными, эффективными и качественными ЛП в настоящее время рассматриваются на государственном уровне [7]. Однако, комплексные регуляторные подходы, позволяющие обеспечить стабильность основных параметров качества с экстраполяцией на показатели безопасности и эффективности на всех этапах жизненного цикла (например, производство, доклиническое изучение, клиническое изучение, регистрационные процедуры, пострегистрационный мониторинг и план управления рисками, обращение на рынке) препарата до настоящего времени разработаны не в полной мере и в любом случае требуют современного переосмысления.

Таким образом, разработка и формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных ЛС и преквалификационной экспертизе ЛП представляет собой актуальное направление научных исследований и является весьма своевременной задачей.

С использованием методов порошковой рентгеновской дифракции, дифференциальной сканирующей калориметрии, инфракрасной спектроскопии и оптической микроскопии нами проведен анализ качества субстанций амлодипина и верапамила гидрохлорида. Обоснована необходимость и достаточность предложенных методик. Методические приемы апробированы в реальном эксперименте при испытаниях физико-химических свойств выбранных тестовых субстанций и вспомогательных веществ. Кроме того, разработаны методы анализа полиморфизма субстанций, обоснована необходимость включения контроля наличия полиморфных форм в составе субстанций в рутинный контроль качества АФС.

С использованием современных, высокочувствительных методов оценены фармакодинамические свойства биологически аналогичных лекарственных

препаратов, на примере ритуксимаба. Разработанные методики *in vitro* для доказательства сопоставимости фармакодинамических параметров биоаналогов целесообразно применять в предрегистрационных исследованиях, в качестве замены (по крайней мере частичной) исследований *in vivo*.

Были проведены экспериментальные исследования *in vitro* профилей растворения выбранных воспроизведенных препаратов. На основе БКС предложено расширить применение процедуры «биоверификация» в качестве альтернативного регуляторного инструмента для замены исследований биоэквивалентности отдельных групп (I класс по БКС) воспроизведенных лекарственных препаратов *in vivo* на *in vitro* при регистрации в России.

В рамках диссертационного исследования были разработаны и валидированы новые методики количественного определения отдельных фармакологически активных веществ в плазме крови человека (хлормадион, этинилэстрадиол, этоногестрел, дезогестрел, митотан) с целью сравнительного изучения их фармакокинетических параметров в составе готовых лекарственных форм.

При подготовке к исследованию биоэквивалентности препаратов небиволола проведено фенотипирование и генотипирование здоровых добровольцев с целью оценки влияния активности метаболизма на изменения индивидуальных фармакокинетических параметров участников исследования.

С использованием разработанных и валидированных методик стандартизации и контроля качества АФС, произведена субстанция воспроизведенного, но не зарегистрированного и нового для России, орфанного, позволяющего значительно повысить качество жизни больных со злокачественными новообразованиями надпочечника, лекарственного препарата митотан. Митотан включен в проект Российских клинических рекомендаций по диагностике и лечению аденокортикального рака как единственный эффективный, не имеющий альтернативы препарат для лечения пациентов с АКР.

Таким образом, мы располагаем значительным опытом изучения качества, проведения доклинических и клинических исследований воспроизведенных лекарственных препаратов и входящих в их состав компонентов. В этой связи с учетом накопленного нами экспериментального опыта была сформулирована основная идея диссертационного исследования: формирование на базе научного консультирования современного междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества ВЛП и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов, и восприятие его как основу алгоритма принятия решения об их эффективности и безопасности.

В результате проделанной работы был выработан междисциплинарный подход (рис. 9.1) к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов, который включает:

- контроль качества субстанций по параметрам, обеспечивающим стабильность показателей безопасности и эффективности изготовленных из них готовых лекарственных форм;

- контроль фармакокинетических параметров воспроизведенных лекарственных препаратов в исследованиях *in vitro* и *in vivo* с конкретными рекомендациями и классификационными признаками для возможной замены фармакокинетических исследований *in vivo* на *in vitro*;

- контроль фармакодинамических параметров биологически аналогичных лекарственных препаратов в исследованиях *in vitro* с конкретными рекомендациями для возможной замены фармакодинамических исследований *in vivo* на *in vitro*;

- процедуру пострегистрационной преквалификационной экспертизы лекарственных препаратов с использованием методов фармаконадзора, фармакоэкономики и процедуры биовейвер.

Подход апробирован на уровне дорегистрационной экспертизы новых ВЛП. Гарантированы высокие качественные характеристики регистрируемых продуктов с целью поддержания клинико-экономических преимуществ воспроизведенного препарата перед оригинальным при соблюдении всех законодательно закрепленных параметров взаимозаменяемости.

Предложенные методы стандартизации и контроля эффективности, безопасности и качества ВЛП на всех этапах его жизненного цикла, достаточно актуализируют междисциплинарные процессы разработки и оптимизируют существующую систему допуска препаратов к свободному обращению.

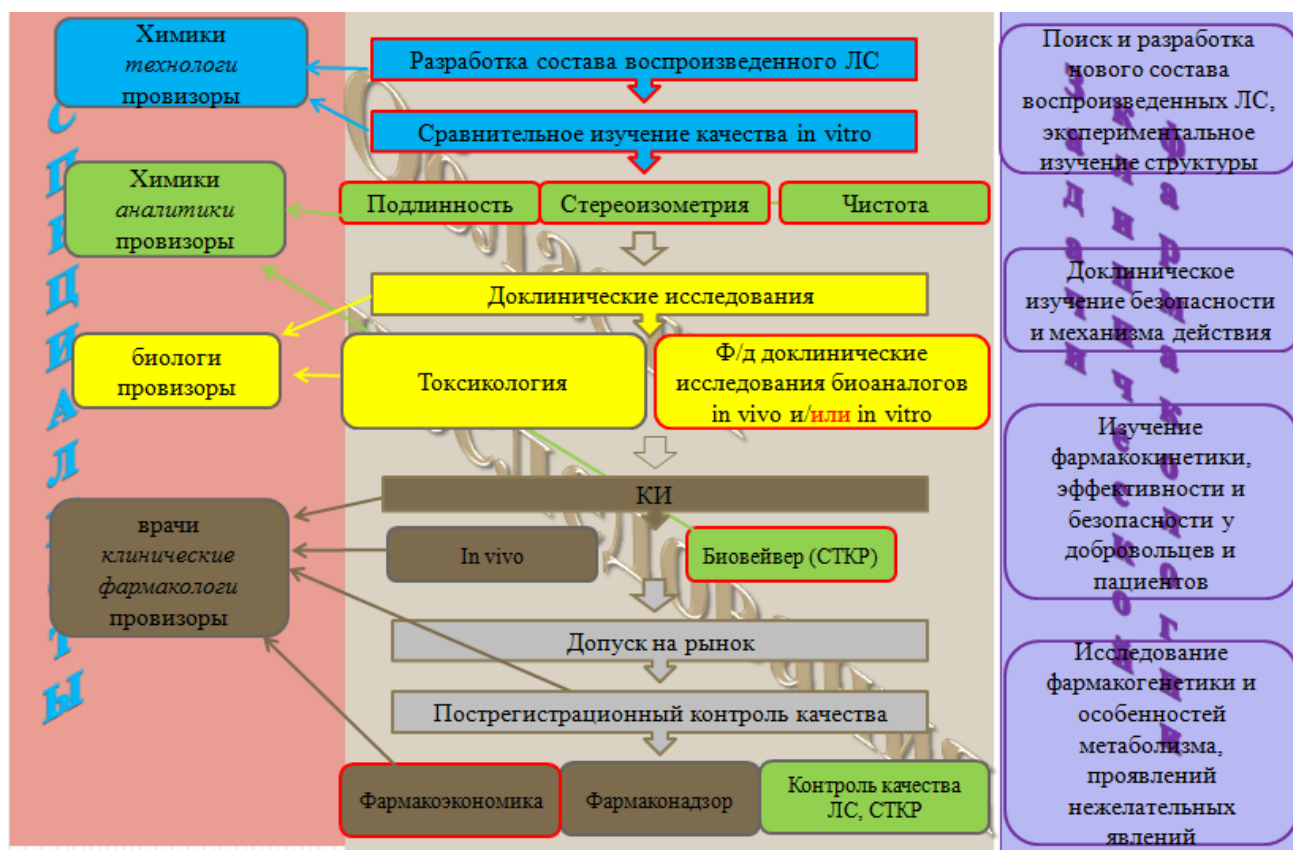


Рис. 9.1 - Междисциплинарный подход к оценке эффективности, безопасности и качества лекарственных препаратов

ВЫВОДЫ

1. Обоснована необходимость включения контроля наличия полиморфных форм в составе субстанций в рутинный контроль качества активных фармацевтических ингредиентов, который гарантирует стабильность их физико-химических свойств и позволяет прогнозировать эквивалентность параметров безопасности и эффективности произведенных готовых лекарственных форм. Разработаны методы анализа полиморфизма субстанций.

2. Обоснована возможность замены в доклинических исследованиях моделей *in vivo* на *ex vivo*. Разработана качественная программа фармакодинамического доклинического исследования биоаналогового препарата ритуксимаб. По результатам, полученным на уровне доклинического изучения, спланировано и проведено клиническое исследование I фазы.

3. Стандартизованы производственный цикл и контроль фармакокинетических параметров готовой лекарственной формы препарата митотан, таблетки. Показана социальная значимость разработки орфанных препаратов.

4. Доказана целесообразность использования процедуры «биоверификация», для замены фармакокинетических исследований отдельных групп ВЛП. Предложено создание официального перечня АФС по классам БКС и использование «биоверификация» для комплексной оценки лекарственных средств, закупаемых с целью обеспечения приоритетных потребностей здравоохранения.

5. Разработаны и валидированы методики количественного определения актуальных воспроизведенных гормональных лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции хлормадион+этинилэстрадиол, дезогестрел и дезогестрел+этинилэстрадиол. На основании внедренных методик, препараты прошли установленную законом

процедуру регистрации в РФ с принятием положительного решения о возможности их медицинского применения.

6. Подтверждено влияние активности метаболизма добровольцев, принимавших участие в исследовании биоэквивалентности препаратов небиволола. Доказана возможность снижения выборки участников исследования на основании данных по генному полиморфизму. Обоснована рациональность применения гено- и фенотипирования в исследованиях биоэквивалентности.

7. Показана нецелесообразность замены оригинального препарата Топирамат генерическими аналогами по результатам фармакоэкономического анализа в рамках процедуры пострегистрационной преквалификационной экспертизы.

8. Разработан регламент междисциплинарного подхода к комплексной оценке лекарственных препаратов на всех этапах его жизненного цикла.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оптимизации доклинических фармакодинамических и клинических фармакокинетических исследований ВЛП рекомендуется замена методов *in vivo* на модели *in vitro*.

2. Для повышения конкурентных преимуществ отечественных ЛП и возможности получения авторизации их за рубежом рекомендуется использовать разработанные методики количественного определения хлормадинона, этинилэстрадиола, этоногестрела, дезогестрела.

3. В целях дальнейшего совершенствования системы фармаконадзора представляется необходимым утверждение разработанного профессионального стандарта для специалистов по фармаконадзору, регламентирующего основные трудовые функции и требования к навыкам таких специалистов, а также внедрение учебного модуля в медицинских ВУЗах страны для подготовки компетентных кадров в этой области фармакологии.

4. Проведение СТКР удобно и информативно для экспресс-тестирования ВЛП при преквалификационной экспертизе в рамках планирования государственных закупок.

5. Применение междисциплинарного алгоритма принятия решения по оценке безопасности, эффективности и качества воспроизведенных лекарственных средств, основанного на научном консультировании, целесообразно при проведении предрегистрационной экспертизы на всех ее этапах.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AUC	Площадь под кривой “концентрация-время”
C_{\max}	Максимальная концентрация лекарственного препарата в крови
CTD	Common Technical Documentation, Общий технический документ
EMA	European Medicines Agency, Европейское медицинское агенство
FDA	Food and Drug Administration, Агенство по пищевым продуктам и лекарственным средствам
GCP	Good Clinical Practice, Надлежащая клиническая практика
GLP	Надлежащая доклиническая практика
GMP	Good Manufacturing Practice, Надлежащая производственная практика
GPP	Надлежащая фармацевтическая практика
GSP	Надлежащая практика хранения
GVP	Good Vigilance Practice, Фармаконадзор
ICH	International Conference of Harmonisation, Международная конференция по гармонизации
MHLW	Министерство здравоохранения, труда и социального благополучия Японии
QbD	Quality by Design, Качество через дизайн
T_{\max}	Время достижения максимальной концентрации лекарственного препарата в крови
$T_{1/2}$	Период полувыведения лекарственного препарата
АД	Артериальное давление
АЗКЦ	Антителозависимая цитотоксичность
АКР	Адренкортикальный рак
АПФ	Ангиотензинпревращающий фермент
АФС	Активная фармацевтическая субстанция

АЭП	Антиэпилептические препараты
БД	Биодоступность
БКС	Биофармацевтическая классификационная система
БЭ	Биоэквивалентность
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
ВК	Вращающаяся корзина
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ВЛП	Воспроизведенный лекарственный препарат
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГИТС	Гастроинтестинальная терапевтическая система
ГФ	Государственная фармакопея
ГХ-МС	Газовая хроматография с тандемной масс-спектрометрией
ДИ	Доверительный интервал
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСК	Дифференциальная сканирующая калориметрия
ЕАЭС	Евразийский экономический союз
ЕС	Европейский союз
ЕЭК	Евразийская экономическая комиссия
ЖНВЛП	Жизненно необходимые и важные лекарственные препараты
ЖКТ	Желудочно-кишечный тракт
ИБС	Ишемическая болезнь сердца
ИК	Инфракрасный
КЗЦ	Комплемент-зависимая цитотоксичность
КОК	Комбинированные оральные контрацептивы
ЛМ	Лопастная мешалка
ЛП	Лекарственный препарат
ЛС	Лекарственное средство

ЛФ	Лекарственная форма
НД	Нормативный документ
НК	Научное консультирование
НЛР	Нежелательная лекарственная реакция
НПКО	Нижний предел количественного определения
НРО	Национальный регуляторный орган
НХЛ	Неходжкинская лимфома
ОНЛС	Обеспечение необходимыми лекарственными средствами
ПМ	Полиморфная модификация
ПОБЛП	Периодический отчет по безопасности лекарственного препарата
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
СПИД	Синдром приобретенного иммунодефицита
СТКР	Сравнительный тест кинетики растворения
ТГА	Термогравиметрический анализ
ФСП	Фармакопейная статья предприятия
ХЛЛ	Хронический лимфоидный лейкоз
ЦККЛС	Центр контроля качества лекарственных средств

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Об обращении лекарственных средств с поправками и изменениями : Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. N 61–ФЗ. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/101658>.
2. О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» : Федеральный закон Российской Федерации от 22.12.2014 г. № 429–ФЗ. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://kremlin.ru/acts/bank/39223>.
3. О стандартизации : Закон Российской Федерации от 10 июня 1993 г. N 5154–1 // Ведомости СНД и ВС РФ. –1993. – N 25. – С. 917.
4. Об установлении ограничения допуска отдельных видов медицинских изделий, происходящих из иностранных государств, для целей осуществления закупок для обеспечения государственных и муниципальных нужд [Электронный ресурс] : Постановление Правительства РФ от 5 февраля 2015 г. № 102. – Режим доступа: <http://government.ru/docs/16776/>.
5. Об утверждении государственной программы Российской Федерации "Развитие здравоохранения" [Электронный ресурс] : Постановление правительства РФ от 15 апреля 2014 г. N 294. – Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/91295/>.
6. Об ограничениях и условиях допуска происходящих из иностранных государств лекарственных препаратов, включенных в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, для целей осуществления закупок для обеспечения государственных и муниципальных нужд: Постановление Правительства Российской Федерации от 30 ноября 2015 г. № 1289 г. Москва.

7. Развитие фармацевтической и медицинской промышленности" на 2013 – 2020 годы : Постановление Правительства РФ от 15 апреля 2014 г. № 305 “Об утверждении государственной программы Российской Федерации.
8. Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года : Приказ Минпромторга РФ от 23.10.2009 № 965.
9. Соглашение о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза. [Электронный ресурс]. – Режим доступа : [http:// www.pravo.gov.ru](http://www.pravo.gov.ru).
10. Абдрашитов, Р.Х. Обзор существующих методик оценки активности СУР2D6 с применением экзогенных и эндогенных маркеров / Р.Х. Абдрашитов, Г.Н. Гильдеева, Г.В. Раменская, В.В. Смирнов // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2015. – №1. – с. 4–11.
11. Алгоритмы построения градуировочных характеристик средств измерений состава веществ и материалов и оценивание их погрешностей (неопределенностей) : Рекомендации по метрологии Р 50.2.028–2003 ГСИ / ИПК. – М.: Издательство стандартов, 2003.
12. Алеева, Г.Н. Роль вспомогательных веществ в обеспечении фармацевтических и терапевтических свойств лекарственных препаратов : (обзор) / Г.Н. Алеева, М.В. Журавлева, Р.Х. Хафизьянова // ХФЖ. – 2009. – Т. 43., № 4, – С. 51–56.
13. Анализ и стандартизация лекарственных препаратов, полученных методом полиморфного модифицирования / С.И. Успенская [и др.] // Российский химич. журн. – 1997. – № 5. – С. 130–135.

14. Арзамасцев, А. П. Ультрафиолетовые и инфракрасные спектры лекарственных веществ : Вып. II / А.П. Арзамасцев // – М.: Медицина, 1981. – 176 с.
15. Арзамасцев, А.П. Эквивалентность воспроизведенных лекарственных средств: фармацевтические аспекты / А.П. Арзамасцев, В.Л. Дорофеев. // Ведомости НЦЭСМП. – 2007. – № 1. – С. 6–12.
16. Арсеньева, К.Е. Применение амлодипина в кардиологической практике / К.Е. Арсеньева // РМЖ. –2009. –№17(8). – С. 610–613.
17. Барышникова, Г. А. Возможности изомера амлодипина в лечении артериальной гипертензии / Г.А. Барышникова // РМЖ. – 2009. – № 7. – С. 431.
18. Баула, О. Ю. Современные регуляторные требования к исследованиям и регистрации генерических лекарственных средств / О.Ю. Баула – М., Фармсодружество, 2007.
19. Белоусов, Д.Ю. Биоаналоги — насколько они подобны? / Д.Ю. Белоусов // Качественная клиническая практика. – 2006. – №2. – с. 80–83.
20. Белоусов, Ю. Б. Дженерики – мифы и реалии / Ю.Б. Белоусов // Ремедиум. – 2003. – № 7/8. – С. 4–9.
21. Биофармацевтическая классификация жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств / Г.В. Раменская [и др.] // Фармация. – 2011. – № 5. – С. 3–11.
22. Бредер, В.В. Биоаналоги: копии или похожие, но иные лекарства? / В.В. Бредер // Медицинский вестник. – 2007. – №26–27. – с. 411–412.
23. Ватанская, О. А. Критерии оптимальности тестов "Растворение" дженериков антигипертензивных, антимикробных и нестероидных

противовоспалительных средств : дисс. ... канд. фарм. наук / О.А. Ватанская. – Санкт–Петербург, 2005. – 169 с.

24. Воронков, Л. Г. Клиническое использование хиральных молекул как новое направление в кардиоваскулярной медицине / Л.Г. Воронков // Здоровая Украина. – 2007. – № 21/1. – С. 31–32.

25. Выдача регистрационных удостоверений лекарственных препаратов с акцентом на многоисточниковые (генерические) препараты [Электронный ресурс] : Руководство для национальных регуляторных органов по обращению лекарственных средств.– 2011г. – (Синяя книга. 2 издание). – Режим доступа : http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/regulation_legislation/blue_book/en.

26. Выявление фальсифицированных лекарственных препаратов, содержащих фторхинолоны, с использованием метода ИК–спектроскопии / В.Л. Дорофеев [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2004. – № 2. – С. 183–187.

27. Гильдеева, Г.Н. Сравнительное изучение цитостатического эффекта препаратов гемцитабина: Гемцитары и Гемзара / Г.Н. Гильдеева, А.В. Семейкин // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – №2. – С. 11-14.

28. Гильдеева Г. Н. Полиморфизм лекарственных веществ / Г.Н. Гильдеева, Д.Ф. Гуранда // – М.: Медицина, 2009. – 72 с.

29. Гильдеева, Г.Н. Структурные аспекты полиморфизма лекарственных веществ / Г. Н. Гильдеева, Д. Ф. Гуранда // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2009. – № 6. – С. 74–79.

30. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.

31. Григорьева, Н.С. Современное здравоохранение: политика, экономика, управление / Н.С. Григорьева, Т.В. Чубарова. – М.: Авторская академия, 2013. – 334 с.
32. Гуськова, Т.А. Изучение токсичности лекарственных средств *in vitro* при оценке их токсикологического взаимодействия / Т.А. Гуськова, Р.Д. Сюбаев, И.Н. Немкова, Г.Н. Енгальчева // Биомедицина. – 2010. – №5. – С. 74–76.
33. Давыдова, К. С. Оценка эквивалентности воспроизведенных лекарственных средств / К.С. Давыдова // Фармация. – 2011. – № 3. – С. 51–54.
34. Демин А. М. Амиды (S)–напроксена и других хиральных кислот. Синтез, разделение стереоизомеров и биологическая активность : дисс... канд. хим. Наук : спец. 02.00.03. / Демин А. М. – Екатеринбург, 2005. – 161 с.
35. Денисова, Т. Необходима программа действий по борьбе с фальсификатами / Т. Денисова // Фармацевтический вестник. – 2002. – № 4. – С. 21.
36. Денисова, Т.А. Исследование высвобождения и однородности дозирования этинилэстрадиола и левоноргестрела из таблетированных форм гормональных контрацептивных средств / Т.А. Денисова, Садчикова Н.П. // Пробл. репродукции. – 2010. – №3. – Р. 117–24.
37. Денисова, Т.А. Количественное определение комбинированных гормональных контрацептивных средств методом ВЭЖХ. / Т.А. Денисова, В.В. Чистяков, Н.П. Садчикова // Химико–фармацевтический журнал. – Т. 42, №5. – 2008.
38. Дмитриев, А. В. Рацемизация бактериального калиевого канала и хиральная безопасность биосферы / А.В. Дмитриев, И.В. Марков, В.А. Твердислов // Технологии живых систем. – 2006. – Т. 3, № 1. – С. 5–8.

39. Дорофеев, В. Л. Обзор стандартов качества лекарственных средств / В.Л. Дорофеев // Ремедиум. – 2011. – № 3. – С. 48–54.
40. Дорофеев, В.Л. Подходы к оценке взаимозаменяемости ЛС / В.Л. Дорофеев // Ремедиум. – 2011. – № 12. – С. 52.
41. Емшанова, С. В. Обеспечение качества отечественных лекарственных средств (оптимизация технологии и совершенствование стандартизации таблетированных лекарственных форм) : дисс. ... докт. фарм. наук / С.В. Емшанова – Москва, 2007. – 308 с.
42. Зак, А. Ф. Биодоступность препаратов ампициллина для внутреннего применения / А.Ф. Зак, Т.А. Батуашвили, В.И. Щедрин // Антибиотики. – 1980. – Т. 25 № 1. – С. 24–28.
43. Зырянов, С. К. Организация и развитие службы фармаконадзора / С.К. Зырянов, Ю.Б. Белоусов // Фарматека. – 2005. – № 16. – С.13.
44. Зырянов, С. К. Проблема качества генериков и оценка их соответствия оригинальным препаратам / С.К. Зырянов, Ю.Б. Белоусов // Клин. микробиол. Антимикроб. Химиотер.– 2010.– Т. 12, № 4. – С. 314–320.
45. Зырянов, С. К. Дженерики антибактериальных препаратов: за и против / С.К. Зырянов, Ю.Б. Белоусов // Справочник поликлинического врача. – 2012.– № 5. – С. 13.
46. Зырянов, С. К. Качественные генерики для лечения бронхообструктивных заболеваний: свет в конце тоннеля есть! / С.К. Зырянов, Ж.А. Галеева, Ю.Б. Белоусов // Лечащий врач. – 2014. – № 11. – С. 72–74.

47. Измерения однократные прямые. Оценивание погрешностей и неопределенности результата измерений : Рекомендации по метрологии Р 50.2.038–2004 / ИПК. – М.: Издательство стандартов, 2004.
48. Использование теста «растворение» для изучения воспроизведенных лекарственных средств на примере препаратов офлоксацина / В.Л. Дорофеев [и др.] // Химико–фармацевтический журнал. – 2004. – № 5. – С. 35–37.
49. Кизель В. А. Практическая молекулярная спектроскопия / В.А. Кизель // – М.: МФТИ, 1998. – 276 с.
50. Клинико–экономическая оценка замены оригинального топирамата в противоэпилептической терапии на его генерические аналоги / С.К. Зырянов [и др.] // Медицинские технологии. Оценка и выбор. – 2011. – №4. – С. 24–30.
51. Ковалева Е. Л. Совершенствование методологических подходов к обеспечению качества и стандартизации фармацевтических субстанций и препаратов в лекарственной форме «Таблетки» : дисс... докт. фарм. наук : спец. 14.04.02 / Ковалева Е. Л. – М., 2010. – 465 с.
52. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях: руководство ЕВРАХИМ/СИТАК / пер. с англ. Р. Л. Кадиса Г. Р. Нежиховского В. Б. Симины ; под ред. Л. А. Конопелько. – 2–е изд. – Санкт–Петербург, 2002 . – 141 с.
53. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года / утв. Председателем Правительства Российской Федерации 24 апреля 2012 г., № 1853 п–П8.
54. Коршун, М.Н. Принцип Трех R и пути его реализации в токсиколого–гигиенических исследованиях / М.Н. Коршун, Л.М. Краснокутская // Український журнал з проблем медицини праці. – 2005. – № 3–4. – С. 66–74.

55. Кукес, В. Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты / В.Г. Кукес // – М.: Реафарм, 2004. – 144 с. 300
56. Кукес, В. Г. Изучение биотрансформации лекарственных средств – путь к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии / В.Г. Кукес, Д.А. Сычев, Е.В. Ших // Врач. – 2007. – № 1. – С. 6–8.
57. Леонидов, Н. Б. История развития полиморфизма химических веществ : краткий очерк / Н.Б. Леонидов // Рос. хим. журн. – 1997. – Т. 16, № 5. – С. 10–22.
58. Леонидов, Н. Б. Исследование диффузионных свойств растворов полиморфных модификаций 6-метилурацила / Н.Б. Леонидов, Н.Г. Селезнев, С.И. Успенская // РХЖ. – 1997.– Т. 16, № 5. – С. 49–50.
59. Леонидов, Н. Б. Исследование строения полиморфных форм 6-метилурацила методами квантовой химии и молекулярной механики / Н.Б. Леонидов, И.В. Галахов, П.Ф. Поташников // РХЖ. – 1997. – Т. 16, № 5. – С. 23–36.
60. Леонидов, Н. Б. Стабилизация неравновесных конформеров органического вещества в растворе за счет их ассоциации и последующей сольватации / Н.Б. Леонидов // РХЖ. – 1997. – Т. 16, № 5. – С. 22.
61. Леонидов, Н. Б. Физико-химические свойства леокаина и особенности его биологической активности в сравнительном аспекте с дикаином / Н.Б. Леонидов, С.И. Успенская, В.В. Гацура // РХЖ. – 1997. –Т. 16, № 5. – С. 53–60.
62. Лурье, Ю. Ю. Справочник по аналитической химии : справ. изд. / Ю.Ю. Лурье – 6-е изд., перераб. и доп. – М.: Химия, 1989. – 448 с.
63. Лутай, М.И. Использование оптических изомеров известных сердечно-сосудистых средств — путь к повышению их эффективности и переносимости /

М.И. Лутай, А.Ф. Лысенко, О.И. Моисеенко // Укр. кардіол. журн. – 2009. – №4. – С. 13–20.

64. Ляпунов, Н.А. Требования к регистрации препаратов–дженериков в Европейском союзе и государствах СНГ / Н.А. Ляпунов, В.Л. Багирова, В.В. Береговых // Фармация. – 2004. – № 5. – С. 6–11.

65. Майчук, Ю. Ф. Фармакодинамические характеристики тетракаина и его метастабильной модификации — леокаина как средств местной анестезии в офтальмологии / Ю.Ф. Майчук, А.И. Щипанова // Росс. Хим. Журн. – 1997. – Т. 16, № 5. – С. 61–63.

66. Максимова, М. А. Роль S–амлодипина в комбинированной терапии артериальной гипертензии антагонистами кальция и бета–адреноблокаторами / М.А. Максимова, Ю.В. Лукина, С.Ю. Марцевич // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2013. – Т 9, № 3 – С. 236–240.

67. Марцевич, С. Ю. Особенности лечения нифедипином больных с сердечно–сосудистыми заболеваниями / С.Ю. Марцевич // Кардиология. – 1999. – № 9. – С. 91–96.

68. Марцевич, С. Ю. Лечение артериальной гипертензии дигидропиридиновыми антагонистами кальция в виде монотерапии и в комбинации с бета–блокаторами / С.Ю. Марцевич // Росс. кардиол. журн. – 2002 – № 3 (35) – С.72–75.

69. Машковский, М. Д. Лекарственные средства : в 2–х т. Т. 2 / М.Д. Машковский – 14–е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая Волна, 2000. – 608 с.

70. Мередит, П. А. Замена оригинальных медикаментозных препаратов на генерики: биоэквивалентность и терапевтическая эквивалентность различных солей амлодипина / П.А. Мередит // РМЖ. – 2009. – Т. 17, № 18 – С. 1150–1157.

71. Методические рекомендации для разработчиков и производителей лекарственных средств по оценке эквивалентности *in vitro* дженерических лекарственных средств согласно процедуре «биоверификация» : (утв. Росздравнадзором, 2010). – М.: Ремедиум. – 2010. – С. 16.
72. Методические указания «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств». – М.: МЗиСР РФ, 2008.
73. Методы спектрального анализа / А.А. Бабушкин, П.А. Бажулин, Ф.А. Королев [и др.]. – М.: Изд. Моск. универс., 1962. – 510 с.
74. Мешковский, А. П. Дженерики: что мы о них знаем? / А.П. Мешковский // Фарматека. – 2000. – № 5. – С. 8–13.
75. Миронов В.А. Спектроскопия в органической химии / В.А. Миронов, С.А. Янковский – М.: Химия, 1985. – 232 с.
76. Мирошниченко, И. И. Основы фармакокинетики / И.И. Мирошниченко – М.: ГЭОТАР–МЕД, 2002. – 192 с.
77. Михайлов, И.Б. Настольная книга врача по клинической фармакологии : руководство для врачей / И.Б. Михайлов – СПб: Фолиант, 2001. – 736 с.
78. Морозов, А. А. Хроматография в неорганическом анализе / А.А. Морозов – М.: Высш. шк., 1972. – 233 с.
79. Мурашева, У.А. Получение, оценка качества и стандартизация субстанций фентанила, фентанила цитрата и их инъекционных лекарственных форм : дисс. ... канд. фарм. наук / У.А. Мурашева – Москва, 2009. – 172 с.
80. Новикова, Н. Н. Оригинальные и воспроизведенные лекарственные средства – реалии современного фармацевтического рынка / Н.Н. Новикова // Фармацевтический Вестник. – 2008. – № 4. – С. 4.

81. Обзор существующих методик оценки активности СУР2D6 с применением экзогенных и эндогенных маркеров / Р.Х. Абдрашитов [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2015. – № 1. – С. 4–11.
82. Обзор требований к исследованиям биоэквивалентности генерических лекарственных средств. Требования FDA / А.Н. Конюшкова [и др.] // Ремедиум. – 2011. – № 5. – С. 54–56.
83. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий : ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025–2009. – Введен 2012–01–01. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.megavan.ru/certification/GOST_R_ISOMEK_17025–2006.pdf.
84. Орлов, В. И. Жидкостная хроматография: теоретические основы / В.И. Орлов, А.А. Аратсков – Дзержинск: НТК Синтеко, 1997. – 41 с.
85. Основы жидкостной хроматографии / Н. Хадден, Ф. Бауманн, Д. Гере [и др.] – М. Мир, 1973. – 264 с.
86. Особенности структуры, физико–химических свойств биологической активности бетамецила в сравнительном плане с метилурацилом / Н.Б. Леонидов [и др.]// РХЖ. – 1997. – Т. 16, № 5. – С. 82–86.
87. Оценка и описание результатов РА/РН/ОМСL (99) 38 (текущее издание).
88. Оценка фармацевтической эквивалентности лекарственных препаратов на этапе их регистрации / А.В. Королев [и др.] // Химико–фармацевтический журнал. – 2009. – № 3. – С. 49–52.
89. Панюшин, Р. Оригинальные и дженериковые препараты: единство или борьба противоположностей? / Р. Панюшин // Фармацевтический вестник. 2003. – № 16. – С. 23.

90. Перечень редких заболеваний, опубликованный Минздравом России 19.02.2016г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://www.rosminzdrav.ru/documents/8048-perechen-redkih-orfannyh-zabolevaniy>.
91. Пери, С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии : пер. с англ. / С. Пери, Р. Амос, П. Брюер – М.: Мир, 1974. – 260 с.
92. Пиккеринг, У. Ф. Современная аналитическая химия : пер. с англ. / У.Ф. Пиккеринг – М.: Химия, 1977. – 560 с.
93. Пилипенко, А. Т. Аналитическая химия : в 2 кн. / А.Т. Пилипенко, И.В. Пятницкий – М.: Химия, 1990. – 480 с.
94. Пиотровский, В. К. Модельные и модельно-независимые методы описания фармакокинетики: преимущества, недостатки и взаимосвязь / В.К. Пиотровский // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1987. – Т. 32, № 7. – С. 492–497.
95. Пиотровский, В. К. Математическое моделирование в фармакокинетики: экспериментальная и клиническая фармакокинетика / В.К. Пиотровский, М. Вайс // Сб. тр. АМН СССР, НИИ фармакологии. – 1988. – С. 16–28.
96. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки : МИ 2336–2002. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: w.google.ru/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0ahUKEwiP-L7qzpPNAhVMJpoKHf5MDZAQFggnMAI&url=http%3A%2F%2Flibinfo.org%2Fnsi%2Fm%2F03%2Fm0300066.doc&usg=AFQjCNFjSLMgyH8apGeMmQ5kyfQ6rTS67Q&sig2=XzXKMLrM4RTyMU7NPAJSkA&bvm=bv.123664746,d.bGs.
97. Полиморфизм лекарственных веществ / А.И. Тенцова [и др.] // Фармация. – 1978. – №3. С. 70–75.

98. Политика OMCL по выявлению и учету погрешностей в аналитических измерениях РА/РН/OMCL (2001) 7. [Электронный ресурс].– Режим доступа https://www.edqm.eu/sites/default/files/terms_of_reference_annex_1_omcl_07_89_14r_september_2015.pdf.
99. Положения ЕА по оценке погрешностей в количественных методах испытания ЕА–4/16, 2003.
100. Правила надлежащего производства лекарственных средств для медицинского применения и для ветеринарного применения Таможенного союза (правила надлежащей производственной практики – Good Manufacturing Practice – GMP): руководство : Проект (по состоянию на 01 февраля 2013 г.) – М.: Ремедиум, 2012. – 264 с.
101. Правила надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза : (Проект) GOOD PHARMACOVIGILANCE PRACTICE (GVP). [Электронный ресурс]: – Режим доступа: https://docs.eaeunion.org/ria/ru-ru/012133/ria_20042015_att.pdf.
102. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств : (утв. приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 14 июня 2013 г. № 916).
103. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза : Версия 2.0 от 20.02.2015 г.
104. Препаративная жидкостная хроматография / Б. Бидлингмейер, Б. Фрайд, Г. Хегнауер [и др.] : пер. с англ. – М. Мир, 1990. – 360 с.
105. Проблема выбора лекарственного препарата в кардиологии: значение биоэквивалентности для доказательства идентичности оригинального препарата и

препарата–генерика / С.Ю. Марцевич [и др.] // Артериальная гипертензия. – 2005. – № 3. – С. 164–166.

106. Прогноз погоды на российском фармрынке / Г. Иноземцев [и др.] // Фармацевтический вестник. Аналитика. Годовой отчет: «Российский фармацевтический рынок: итоги 2014 г.» – С. 7–13.

107. Программа государственных гарантий оказания гражданам Российской Федерации бесплатной медицинской помощи на 2011 год : постановление Правительства Российской Федерации от 4.10.10 № 782.

108. Пэрис, Н. Э. Инструментальная жидкостная хроматография. Практическое руководство по методам высокоэффективной жидкостной хроматографии : пер. с англ. / Н.Э. Пэрис – М.: [б. и.] 1978. – 647 с.

109. Раменская, Г.В. Важнейшие биофармацевтические свойства лекарственных веществ на стадии абсорбции в желудочно–кишечном тракте / Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, В.Г. Кукес // Химико–фармацевтический журнал. – 2011. – № 45(7). – С. 37–40.

110. Распоряжение коллегии Евразийской экономической комиссии № 187 от 29.12.2015г. об утверждении требований к инструкции по медицинскому применению лекарственных препаратов и общей характеристике лекарственных препаратов для медицинского применения / Евразийская экономическая комиссия.

111. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм : Общая фармакопейная статья ОФС 1.4.2.0014.15 / Министерство Здравоохранения РФ. – Введен взамен ОФС 42–0003–04.

112. Результаты исследования. Тенденции и практические аспекты развития российского фармацевтического рынка — 2015. Результаты исследования // Deloitte.
113. Рекомендации по рациональной фармакотерапии больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. – М.: [б.и.], 2009.
114. Решетова Е. Н. Закономерности удерживания и разделения энантиомеров профенов на хиральных неподвижных фазах : автореферат на соискание ученой степени к.х.н. / Решетова Е. Н. – Пермь, 2011. – С.24.
115. Решетова, Е. Н. Препаративное хроматографическое разделение энантиомеров ибупрофена на хиральной неподвижной фазе Whelk 01 / Е.Н. Решетова, А.А. Горбунов, Л.Д. Аснин // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – № 9. – С. 47–51.
116. Рудакова, А. В. Основы доказательной фармакотерапии / А.В. Рудакова, П.Ф. Хвещук – СПб.: [б.и.], 2000. – 235 с.
117. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
118. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 244 с.
119. Руководство по экспертизе лекарственных средств : Т. 1 / под. ред. проф. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К., 2013. – 328 с.
120. Саушкина С. В. Сравнительная оценка клинической эффективности различных изомеров амлодипина у больных артериальной гипертензией 1–2 степени : дисс... канд. мед. наук : спец.14.01.05 / Саушкина С. В.. – Пенза, 2014. – 151 с.

121. Селезнева, Т. Фармацевтический рынок России и санкции. / Т. Селезнева // Aviconn.
122. Сливкин, А. И. Физико–химические и биологические методы оценки качества лекарственных средств / А.И. Сливкин, В.Ф. Селеменев, Е.А. Суховерхова // – Воронеж: ВГУ, 1999. – 368 с.
123. Смирнов, В.В. Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6-β-гидрокортизола в моче с целью определения активности изофермента СУР 3А4 / В.В. Смирнов, А.Ю. Савченко, Г.В. Раменская // Биомедицина. – 2010. – № 4. – С. 56 – 60.
124. Современное состояние жидкостной хроматографии : пер. с англ. / под ред. Дж. Киркланда. – М.: Мир, 1974. – 328 с.
125. Соколов, А.В. Правила исследования биоэквивалентности лекарств / А.В. Соколов // Клиническая фармакокинетика. – 2004. – №1. – С. 5–13.
126. Справочник практического врача : в 2-х т. Т. 2 / Ю. Е. Вельтищев, Ф. И. Комаров, С. М. Навашин [и др.] ; под. ред. А.И. Воробьева. – 4-е изд., стереотипное. – М. Медицина, 1992. – 336 с.
127. Сравнительное изучение леокаина и тетракаина как средств спинальной анестезии / А.А. Зайцев [и др.] // РХЖ. – 1997. – Т. 16 № 5.– С. 64–66.
128. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения : ОСТ 91500.05.001.00 : утвержден приказом Минздрава РФ от 1 ноября 2001 г. № 388.
129. Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года // Утверждена приказом Минпромторга России от «23» октября 2009 г. №956. — 70 с.

130. Стыскин, Е. Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде. – М.: Химия, 1986. – 288 с.
131. Схунмакерс, П. Оптимизация селективности в хроматографии : пер. с англ. / П. Схунмакерс – М.: Мир, 1989. – 399 с.
132. Талибов, О. Б. Генерики и эквивалентность лекарственных препаратов / О.Б. Талибов // Медицинская газета «Здоровье Украины». – Киев, 2008. – № 5. – С. 12–16.
133. Твердислов, В. А. Хиральность как проблема биохимической физики / В.А. Твердислов, Л.В. Яковенко, А.А. Жаворонков // Рос. хим. ж. (Журнал рос. хим. общества им. Д.И. Менделеева). – 2007. – Т. 51, № 1 – С.13–23.
134. Твердислов, В.А. От симметрий – к законам эволюции. Хиральность как инструмент стратификации активных сред / В.А. Твердислов, А.Э. Сидорова, Л.В. Яковенко // Биофизика. – 2012. – Т. 57, вып. 1 – С. 146 – 154.
135. Тенцова, А. И. Лекарственная форма и терапевтическая эффективность лекарств / А.И. Тенцова, И.С. Ажгихин // – М.: Медицина, 1974. – 336 с.
136. Титов И. В. Биофармацевтический анализ лекарственных средств группы фторхинолонов с использованием теста «растворение» / И.В. Титов, А.П. Арзамасцев, В.Л. Дорофеев [и др.] // Человек и лекарство : тез. докл. X Росс. нац. конгр. – М.: [б.и.], 2003. – С. 758.
137. Титов, И. В. Использование теста «растворение» для оценки препаратов-дженериков ципрофлоксацина / И.В. Титов, В.Л. Дорофеев, А.П. Арзамасцев // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2004. – № 2. – С. 270–275.

138. Уразовский, С. С. Молекулярный полиморфизм / С.С. Уразовский – Киев: АН УССР, 1956. – 336 с.
139. Урусов В.С. Теоретическая кристаллохимия / Урусов В.С. – М.: МГУ, 1987.
140. Установление взаимозаменяемости воспроизведенных лекарственных средств / К.С. Давыдова [и др.] // Ремедиум. 2010. – № 7. – С. 16–38.
141. Фальсифицированные лекарственные средства: угроза безопасности России // Московские новости (06.10.2008г).
142. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения. – Режим доступа: www.roszdravnadzor.ru.
143. Федоров, Н. Ф. Полиморфизм в кристаллах / Н.Ф. Федоров, Т.Ф. Тупик // – Л.: ЛТИ им. Ленсовета, 1991. – 69 с.
144. Физико–химическое применение газовой хроматографии / К. И. Сакодынский, А. В. Киселев, А. В. Иогансен [и др.] – М.: Химия, 1973. – 254 с.
145. Фисюн, В. В. Противодействие незаконному обороту лекарственных средств и фармацевтических препаратов : уголовно–правовой и криминологический аспекты : дисс. ... канд. юрид. наук / В.В. Фисюн – Москва, 2011. – 210 с.
146. Фритц, Дж. Количественный анализ : пер. с англ. / Дж. Фритц, Г. Шенк – М.: Мир, 1978. – 560 с.
147. Фундаментальные проблемы полиморфизма органических лекарственных средств. Специальный выпуск. // Росс. Хим. Ж. – 1997. – Т. 16, № 5.
148. Харитонов, Ю. Я. Аналитическая химия (аналитика) : в 2 кн. / Ю.Я. Харитонов – М.: Высшая школа, 2001. – 615 с.

149. Хасабов, Н.Н. Биологические лекарственные средства и их биоаналоги: определение, вопросы качества, идентичности и безопасности / Н.Н. Хасабов, Н.А. Земскова // Вестник Росздравнадзора. — 2008. — № 6. — С. 34–38.
150. Химическая энциклопедия: В 5 т. — М.: Сов. энцикл., Большая Российская энцикл., 1988 – 1998.
151. Чен, М. Прекратить доступ опасных лекарств в торговлю [Электронный ресурс] : Вступительное слово на совещании Рабочей группы государств–членов по некондиционной/поддельной/ложно маркированной/фальсифицированной/контрафактной медицинской продукции. ВОЗ. Женева, Швейцария. 28 февраля 2011 г. / М. Чен – Режим доступа: http://www.who.int/dg/speeches/2011/ncds_20110228/ru/.
152. Чеча О. А. Исследование стереоизомеров амлодипина хроматографическими методами и изучение их фармакокинетики : дисс... канд. биол. наук : спец. 14.03.06, 14.03.02 / Чеча О. А.– Старая Купавна, 2011. – 123 с.
153. Чижова, Д. А. Фармакокинетическая и биофармацевтическая оценка качества твердых лекарственных форм методами *in vitro* и *in vivo* : дисс. ... канд. биол. наук / Д.А. Чижова – Москва, 2009. – 139 с.
154. Чистяков, В.В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях / В.В. Чистяков, Д.В. Рейхарт // Казанский медицинский журнал. – 2010. – № 4. – С. 532–36.
155. Чугаев Д. В. Влияние оптической изометрии на фармакокинетику препаратов атенолола : дисс... канд. фарм. наук : спец. 15.00.02 / Чугаев Д.В. – Москва, 2009. – 114 с.
156. Шаевич, А. Б. Стандартные образцы для аналитических целей / А.Б. Шаевич – М.: Химия, 1987. – 184 с.

157. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии : пер. со словацкого / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец – М.: Мир, 1980.
158. Шатц, В.Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии / В.Д. Шатц, О.В. Сахартова – Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.
159. Шеллард, Э. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое: пер. с англ. / Э. Шеллард – М.: Мир, 1971. – 192 с.
160. Шило, В.Ю. Биоаналоги в лечении анемии при хронической болезни почек: потенциальная польза или неоправданный риск? / В.Ю. Шило // Лечащий врач. — 2007.— № 9–10. — С. 56–64.
161. Шохин, И.Е. Изучение сравнительной кинетики растворения генерических лекарственных средств: дис... канд. фарм. наук. – М., 2009. – 235 с.
162. Шохин, И.Е. Оценка возможности замены исследований биоэквивалентности *in vivo* на изучение сравнительной кинетики растворения *in vitro* / И.Е. Шохин, Г.В. Раменская // Химико–фармацевтический журнал. – 2011. –№ 45(2). – С. 46–48.
163. Шрайнер Р. Идентификация органических соединений / Шрайнер Р., Фьюзон Р., Кёртин Д. [и др.]. – М.: Мир, 1983. – 704 с.
164. Шталь, Э. Хроматография в тонких слоях : пер. с нем. / Э. Шталь – М.: Мир, 1965. – 508 с.
165. Экспертные подходы к разработке и анализу результатов сравнительного теста кинетики растворения воспроизведенных лекарственных препаратов в твердых лекарственных формах с немедленным высвобождением / А.Н. Миронов

[и др.] // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2014. – № 2. – С. 3–9.

166. Эффективность применения левофлоксацина – слагаемые успеха / С.К. Зырянов [и др.] // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – №1. – С. 34–37.

167. Юинг, Г. Инструментальные методы химического анализа : пер. с англ. / Г. Юинг – М.: Мир, 1989. – 608 с.

168. Яшин, Я. И. Физико–химические основы хроматографического разделения / Я.И. Яшин – М.: Химия, 1976. – 216 с.

169. 4–Hydroxylation of debrisoquine by human CYP1A1 and its inhibition by quinidine and quinin / С.P. Granvil [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2002. – 301. – P. 1025–1032.

170. A Review of Methods Used to Compare Dissolution Profile Data / Т. О’Hara [et al.] // Pharmaceutical Science & Technology Today. – 1998. – № 5. – P. 214–223.

171. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability / G.L. Amidon [et al.] // J. Pharm. Res. – 1995. – № 12. – P. 413–420.

172. A UPLC–MS/MS method for therapeutic drug monitoring of etonogestrel / Т. Thomas [et al.] // Ther. Drug Monit. – 2013. – № 35(6). – P. 844–848.

173. Acquired immunodeficiency syndrome–associated lymphomas are efficiently lysed through complement–dependent cytotoxicity and antibody–dependent cellular cytotoxicity by rituximab / J. Golay [et al.] // British Journal of Haematology. – 2002. – № 119(4). – P. 923–929.

174. Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / A. Berruti [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2012. – № 7. – P. 131–138.
175. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update / M. Fassnacht [et al.] // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2011. – №7. – P. 323.
176. Adverse drug reactions / M. Pirmohamed [et al.] // *British Medical Journal*. – 1998. – 316. – P. 1295–1298.
177. Ahr, G. Guidances related to bioavailability and bioequivalence: European industry perspective / G. Ahr, B. Voith, J. Kuhlmann // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2000. – Vol. 25. – P. 25–27.
178. Ali, A. A. Comparative studies on the bioavailability of ampicillin an–hydrate and trihydrate / A.A. Ali, A. Farouk // *Int. J. Pharm.* – 1981.– Vol. 9, № 3. – P. 239–243.
179. An anti–C3b(i) mAb enhances complement activation, C3b(i) deposition, and killing of CD20+ cells by Rituximab / D. Kennedy [et al.] // *Blood*. – 2003. – № 101(3). – P. 1071–1079.
180. Anderson, C. The impact of the changing regulatory environment on review times / C. Anderson, N. McAuslane, S. Walker // *R & D Briefing*. – 2002. – № 35. – P. 35–38.
181. Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations, 33rd (2013) [Orange Book]. United States Food and Drug Administration. [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/UCM071436.pdf>.
182. Arzamastsev, A. Comparison of Generic Drugs Using Dissolution Test / A. Arzamastsev, V. Dorofeyev // *World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2004: 64th International Congress of FIP*. New Orleans. – 2004. 9.

183. Association of Southeast Asian Nations [Electronic resource]. – Access mode : <http://www.asean.org/>.
184. Basic Tests for Pharmaceutical Substances / World Health Organization, Geneva. – 1986. – P. 75 – 76.
185. Bazil, C. W. Epilepsy: Generic substitution: are antiepileptic drugs different? / C.W. Bazil // Nature Reviews Neurology. – 2009. – V. 5. – P. 587—588.
186. Beta-Blocker use and clinical outcomes in stable outpatients with and without coronary artery diseases / S. Bangalore [et al.] // JAMA. – 2012. – Vol. 308. – P. 1340–9.
187. Beum, P.V. Within peripheral blood mononuclear cells, antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-opsonized Daudi cells is promoted by NK cells and inhibited by monocytes due to shaving / P.V. Beum, M.A. Lindorfer, P.R. Taylor // Journal of Immunology. – 2008. – № 181(4). – P. 2916–2924.
188. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations (03/01/03). United States Food and Drug Administration. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070124.pdf>.
189. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis / J. Golay [et al.] // Blood. – 2000. – № 95(12). – P. 3900–3908.
190. Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009. United States Food and Drug Administration. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/UCM216146.pdf>.

191. Biopharmaceutics classification system: The scientific basis for biowaiver extension / L.X. Yu [et al.] // *Pharm. Res.* – 2002. – Vol. 19. – P. 921–925.
192. Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility–low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate–release tablet / C.L. Cheng [et al.] // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2004. – Vol. 4, № 22. – P. 297–304.
193. Borges, NC. A novel and sensitive method for ethinylestradiol quantification in human plasma by high–performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure photoionization (APPI) tandem mass spectrometry: application to a comparative pharmacokinetics study / N.C. Borges // *Journal of Chromatography B.* – 2009. – № 877. – P. 3601–3609.
194. Brazell, C. Maximizing the value of medicines by including pharmacogenetic research in drug development and surveillance / C. Brazell, A. Freeman, M. Mosteller // *British Journal of Clinical Pharmacology.* – 2002. – №53. – P. 224–31.
195. Budesonide quantification by HPLC coupled to atmospheric pressure photoionization (APPI) tandem mass spectrometry. Application to a comparative systemic bioavailability of two budesonide formulations in healthy volunteers / N.C. Borges [et al.] // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2011. – №1. – P. 236–242.
196. Burke, D. Chirality: a blueprint for the future / D. Burke, D.J. Henderson // *Br. J. Anaesth.* – 2002. – №88. – P. 563–576.
197. Caldwell, J. Drug metabolism and pharmacogenetics: the British contribution to fields of international significance / J. Caldwell // *Br. J. Pharmacol.* – 2006. – №147. – P. 89 – 99.
198. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. FIRM–ACT Study GroupN / M. Fassnacht [et al.] // *Engl. J. Med.* – 2012. – № 366(23). – P.

2189.

199. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial / P.A. Poole–Wilson [et al.] // *Lancet*. – 2003. – № 362 (9377). – P. 7–13.

200. Comparison of quantitative methods for analysis of polyphasic pharmaceuticals / D. Giron [et al.] // *J. Therm.Anal.Cal.* – 2007. – Vol. 89. – P. 729–743.

201. Complement–induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody– dependent cellular cytotoxicity / T. van Meerten [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – №12(13). P. 4027–4035.

202. Dash, V. Role of Biopharmaceutical Classification System In Drug Development Program / V. Dash, A. Kesari // *Current Pharm. Res.* – 2011. – Vol. 5, № 1. – P. 28–31.

203. Delimmunized chimeric anti–C3b/iC3b monoclonal antibody enhances rituximab–mediated killing in NHL and CLL cells via complement activation / W. Peng [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2005. – № 54(12). – P. 1172–1179.

204. Derivatization of Ethinyl estradiol with Dansyl Chloride To Enhance Electrospray Ionization: Application in Trace Analysis of Ethinyl estradiol in Rhesus Monkey Plasma / M. R. Anari [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2002. – № 74 (16). – P. 4136.

205. Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision – cut liver slices incubated in dynamic organ culture / A.T. Drahusuk [et al.] // *Carcinogenesis*. – 1998. – № 19. – P. 1361–1368.

206. DiMasi, J. A. The value of improving the productivity of the drug development process: faster times and better decision / J.A. DiMasi // *Pharmacoeconomics*. – 2002. – № 20 (suppl. 3). – P. 1–10.

207. DiMasi, J. A. The price of innovation: new estimates of drug development costs / J.A. DiMasi, R.W. Hansen, H.G. Grabowski // *Journal of Health Economics*. – 2003. – № 22. – P. 151–85.
208. 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 (Consolidated version: 20/01/2011). OJ L 311, 28.11.2001, P. 67.
209. Dissolution and bioavailability of the anhydrate and trihydrate forms of ampicillin / S.A. Hill [et al.] // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1975. – Vol. 27 (8). – P. 594–598.
210. Dissolution Studies of Generic Medications: New Evidence of Deviations from the Transitivity Principle / M.E. Ruiz [et al.] // *Dissolution Technologies*. – 2012. – №2. – P. 13–24.
211. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms (08/01/97). United States Food and Drug Administration. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070237.pdf>.
212. Distlerath, L.M. Characterization of a human liver cytochrome P-450 involved in the oxidation of debrisoquine and other drugs by using antibodies raised to the analogous rat enzyme / L.M. Distlerath, F.P. Guengerich // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1984. – №81. – P. 7348–7352.
213. Division of Drug Management and Policies : Summary of Counterfeit Drug Database as of April 1999 [unpublished manuscript], Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999.

214. Draft Guidance on Acarbose. United States Food and Drug Administration. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM170242.pdf>.
215. Eadie, M. Intermittent carbamazepine intoxication possibly related to altered absorption characteristics of the drug / M. Eadie, W. Hooper // *Medical Journal of Australia*. – 1987. – №146 (4). – P. 228–229.
216. Eastern Cooperative Oncology Group study 1879: mitotane and adriamycin in patients with advanced adrenocortical carcinoma / R.A. Decker // *Surgery*. – 1991. – №110. – P. 1006–1013.
217. Effect of gender, sex hormones, time variables and physiological urinary pH on apparent CYP2D6 activity as assessed by metabolic ratios of marker substrates / L. Labbe [et al.] // *Pharmacogenetics*. – 2000. – № 10. – P. 425–438.
218. Effect of long-acting and short-acting calcium antagonists on cardiovascular outcomes in hypertensive patients / M.H. Alderman [et al.] // *Lancet*. – 1997. – № 349. – P. 594–598.
219. Effect on survival and hospitalization of initiating treatment for chronic heart failure with bisoprolol followed by enalapril, as compared with the opposite sequence: results of the randomized Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS) III / R. Willenheimer [et al.] // *Circulation*. – 2005. – Vol. 112, № 16. – P. 2426–2435.
220. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients: The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators / S. Yusuf [et al.] // *N. Eng. J. Med.* – 2000. – №342. – P. 145–153.
221. Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized

Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group / A. Hjalmarson [et al.] // JAMA. – 2000. – №283. – P. 1295–1302.

222. Effects of metoprolol vs verapamil in patients with stable angina pectoris. The Angina Prognosis Study in Stockholm (APSIS) / N. Rehnqvist [et al.] // Eur. Heart. J. – 1996. – № 7. – P. 76–81.

223. Elliot, H. L. Clinical pharmacokinetics of nifedipine. Implications for the care of the elderly / H.L. Elliot, P.A. Meredith // Drugs Aging. – 1997. – №11 (6). – P. 470–479.

224. Empirical regioselectivity models for human cytochromes P450 3A4, 2D6, and 2C9 / R.P. Sheridan. [et al.] // J. Med. Chem. – 2007. – Vol. 50, № 14. – P. 3173 – 3184.

225. Endrenyi, L. Individual variation and the acceptance of average bioequivalence / L. Endrenyi, M. Schulz // Drug Information Journal. – 1993. – Vol. 27. – P. 195–201.

226. Ethical criteria for medicinal drug promotion, WHO Conference of experts on the rational use of drugs. – Geneva: World Health Organization, 1988.

227. European biosimilar market will be worth \$4bn a year by 2017 // The PMLiVE. [Electronic resource]. – Mode of access: [http://www.pmlive.com/pharma_news/european_biosimilar_market_worth_\\$4bn_2017_370868](http://www.pmlive.com/pharma_news/european_biosimilar_market_worth_$4bn_2017_370868).

228. European Commission–Enterprise and Industry–REACH – Overview–FAG. Novel advanced in vitro methods for long–term toxicity testing / W.Afaller [et al.] // ATLA. – 2001. – V.29, № 4. – P. 393–426.

229. European Pharmacopoeia 6.0. 01/2008:50 900. 5. General notices. 5.9 // Polymorphism. – P. 649.

230. Evans, W. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response / W. Evans, J.A. Johnson // *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. – 2001. – № 2. – P. 9–39.
231. Expression and functional analysis of CYP2D6.24, CYP2D6.26, CYP2D6.27 and CYP2D7 isozymes / W.Y. Zhang [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 2009. – № 37. – P. 1–4.
232. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers / L.J. Goldstein [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1989. – № 81. – P. 116–124.
233. Expression of P-glycoprotein in relation to clinical manifestation, treatment and prognosis of adrenocortical cancer / H.R. Haak [et al.] // *Eur. J. Cancer*. – 1993. – №29A. – P. 1036–1038.
234. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues / C. Cordon-Cardo [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 1990. – № 38. – P. 1277–1287.
235. Expression, purification, biochemical characterization, and comparative function of human cytochrome P450 2D6.1, 2D6.2, 2D6.10, and 2D6.17 allelic isoforms / A. Yu [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2002. – №303. – P. 1291–1300.
236. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, Part 320 – Bioavailability and Bioequivalence Requirements, Subpart A–General Provisions, Sec. 320.1 Definitions(e). United States Food and Drug Administration. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=320.1>.
237. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, Sec. 355 New Drugs, (j) Abbreviated new drug applications. United States Food and Drug Administration. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/USCODE-2010-title21/html/USCODE-2010-title21-chap9-subchapV-partA-sec355.htm>.

238. FIP Guidelines for Dissolution Testing of Solid Oral Products // *Dissolution Technol.* – 1997. – № 4. – P. 5–14.
239. Fox, K. M. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebocontrolled, multicentre trial (the EUROPA study) / K.M. Fox // *Lancet.* – 2003. – №362. – P. 782–788.
240. Frantz, S. New drug approvals for 2002 / S. Frantz, A. Smith // *Nature Reviews Drug Discovery.* – 2003. – № 2. – P. 95–96.
241. Genazzani, A. A. Difficulties in the production of identical drug products from a pharmaceutical technology viewpoint / A.A.Genazzani, F. Pattarino // *Drugs R. D.* – 2008. – №9. – P. 65–72.
242. General notes on Biopharmaceutics Classification System (BCS)–based biowaiver applications / WHO Prequalification of Medicines Programme. Guidance Document, October 2012.
243. Generic substitution in the treatment of epilepsy: case evidence of breakthrough seizures / M.J. Berg [et al.] // *Neurology.* – 2008. – V. 71 (7). – P. 525–53.
244. Glass, B. D. The thermal and photostability of solid pharmaceuticals : A review / B.D. Glass, Cs. Novak, M.E. Brown // *J. Therm. Anal. Cal.* – 2004. – Vol. II. – P. 1013–1036.
245. Gong, L. Shanghai trial of nifedipine in the elderly / L. Gong, W. Zhang, Y. Zhu // *J. Hypertens.* – 1996. – Vol. 14. – P. 1237–1245.

246. Grossblatt, N. Toxicity Testing in the 21th Century: A vision and a Strategy / N. Grossblatt, M. Karalic–Loncarevic // Washington: National Academy Press. – 2007. – P. 196.
247. Gu, C. H. Polymorph screening: Influence of solvents on the rate of solvent-mediated polymorphic transformation / C.H. Gu, V. Young, D.J.W. Grant // J. Pharm. Sci. – 2001. – Vol. 90. – P. 1878–1890.
248. Guengerich, F. P. Cytochromes P450, drugs, and diseases / F. P. Guengerich // Mol. Interv. – 2003. – № 3. – P. 194– 204.
249. Guidance for Industry Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation. September 1997.
250. Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products : General Considerations / U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), March 2003. [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3995B1_07_GFI-BioAvail-BioEquiv.pdf.
251. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001.
252. Guidance for industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products : general considerations, March 2003 / U.S. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
253. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft).European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.

254. Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products (SBPs) (WHO/BS/09.2110). World Health Organization. – [Electronic resource]. – Mode of access:
http://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010.pdf.
255. Guidelines on registration requirements to establish interchangeability. – Geneva: WHO, 2006.
256. Gurjar, M. The future lies in chiral purity: A perspective / M. Gurjar // J. Indian Med. Assoc. – 2007. – № 105 (4). – P. 177–178.
257. Gurwitz, D. Education: teaching pharmacogenomics to prepare future physicians and researchers for personalized medicine / D. Gurwitz, A. Weizman, M. Rehavi // Trends in Pharmacological Sciences. – 2003. – № 24 (3). – P. 122–125.
258. Gustafsson LL. Der Hauptverband der österreichischen Sozialversicherungsträger. – [Electronic resource]. – Mode of access:
http://www.hauptverband.at/mediaDB/777660_Generics_in_Sweden.pdf.
259. Hague, RV. Hepatic microsomal enzyme induction and adrenal crisis due to o,p-DDD therapy for metastatic adrenocortical carcinoma / R.V. Hague, W. May, D.R. Cullen // Clin. Endocrinol. (Oxf). – 1989. – № 31. – P. 51–57.
260. Hall, A. G. Molecular diagnostics: a healthcare perspective / A.G. Hall, S.A. Coulthard, J.A.E. Irving // Expert Review of Molecular Diagnostics. – 2003. – № 3 (1). – P. 13–16.
261. Hasenack, H.G. Serum levels of 3-keto-desogestrel after oral administration of desogestrel and 3-keto-desogestrel / H.G. Hasenack, A.M. Bosch, K. Käär // Contraception. – 1986. – № 33(6). – P. 591–596.

262. Hauck, W. W. Types of bioequivalence and related statistical considerations / W.W. Hauck, S. Anderson // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* – 1992. – Vol. 30, № 5 (May). – P. 181–187.
263. He, J. Selection of initial antihypertensive drug therapy / J. He, P.K. Whelton // *Lancet.* – 2000. – Vol. 356 (9264). – P. 1942–1943.
264. Heilshree Saksena. Doctrine of sweat of the Brow // *Legislation & Statutory Interpretation eJournal.* – 2009. – № 5. [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.researchgate.net/publication/228206893_Doctrine_of_Sweat_of_the_Brow.
265. Henry, D. The pharmaceutical industry as a medicines provider / D.Henry, J. Lexchin // *Lancet.* – 2002. – № 360. – P. 1590–1595.
266. Hetherington, S. Genetic variations in HLAB region and hypersensitivity reactions to abacavir / S. Hetherington, A.R. Hughes, M. Mosteller // *Lancet.* – 2002. – №359. – P. 1121–1122.
267. Highly Variable Drugs: Observations from Bioequivalence Data Submitted to the FDA for New Generic Drug Applications / B. M. Davit [et al.] // *The AAPS Journal.* – 2008. – Vol. 10, № 1. P 114–122.
268. Holme, J.A. The use of in vitro methods for hazard characterisation of chemicals. / J.A.Holme, E.Dybing // *Toxicology Letter.* – 2002. – V. 127, № 1–3. – P. 136–141.
269. Huang, R. Characterization of diversity in toxicity mechanism using in vitro cytotoxicity assays in quantitative high throughput screening. / R. Huang // *Chem. Res. Toxicol.* – 2008. – №21. – P. 659–667.
270. Human flavin – containing monooxygenase form 2 S – oxygenation: sulfenic acid formation from thioureas and oxidation of glutathione / M.C. Henderson [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 2004. – № 17. – P. 633 – 640.
271. Hunyor, S. N. New formulation of Adalat (nifedipine) tablets / S.N. Hunyor // *Medical Journal of Australia.* – 1987. – № 146 (2). – P. 228–229.

272. ICH Topic Q8 (R2). – Part I. – Pharmaceutical Development (EMA/CHMP/167068/2004 Note for Guidance on Pharmaceutical Development).
273. Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes / V. Subrahmanyam [et al.] // Drug Metab. Dispos. – 2001. – № 29. – P. 1146–1155.
274. Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p_DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma / E. Baudin [et al.] // Cancer. – 2001. – № 92. – P. 1385–1392.
275. Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p_ddd) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma / E. Baudin [et al.] // Blood. – 2001. – № 98(9). – P. 2771–2777.
276. In vitro effects of rituximab on the proliferation, activation and differentiation of human B cells / E.G. Kamburova [et al.] // American Journal of Transplantation. – 2012. – № 12(2). – P. 341–350.
277. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas / O. Manches [et al.] // Blood. – 2003. – № 101(3),. – P. 949–954.
278. Influence of chronic renal failure on stereo selective metoprolol metabolism in hypertensive patients / P.M. Cerqueira [et al.] // J. Clin. Pharmacol. – 2005. – № 45. – P. 1422–1433.
279. Inhibition of the enantio selective oxidative metabolism of metoprolol by verapamil in human liver microsomes / M. Kim [et al.] // Drug. Metab. Dispos. – 1993. – № 21, – P. 309–317.
280. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets / R.A. Clynes [et al.] // Nature Medicine. – 2000. – № 6. – P. 443–446.

281. Interagency Research Animal Committee (US). U.S. Government Principles for Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research, and Training. Fed. Regist. – 1985. – 50 (97): ISO 10993.
282. Jiang, X. L. Pinoline May be Used as a Probe for CYP2D6 Activity / X.L. Jiang, H.W. Shen, A.M. Yu // Drug Metabolism and Disposition. – 2013. – № 37 (3). – P. 443–446.
283. Johnson, P. The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells / P. Johnson, M. Glennie // Seminars in Oncology. – 2003. – № 30(1). P. 3–8.
284. Keller, W. On the conversion of benzoic acid into hippuric acid / W. Keller // Ann. Chem. Pharm. – 1842. – № 43. – P. 108.
285. Kelly, G. Biowaiver in the United States, European Union, and Japan / G. Kelly // Am. Pharm. Rev. – 2009. – № 5. – P. 12–17.
286. Lack of pharmacokinetic interaction between nifedipine, sparteine and phenytoin in man / J.H. Schellens [et al.] // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1991. – 31. – P. 175–178.
287. Lawrence, X. Yu. Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control / X.Yu. Lawrence // Pharmaceutical Research. – 2008. – Vol. 25. №4. – P. 12–14.
288. Lazarou, J. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies / J. Lazarou, B.H. Pomeranz, P.N. Corey // Journal of the American Medical Association. – 1998. – № 279. – 1200–1205.
289. Lennard, M. S. Clinical pharmacology through the looking glass: reflections on the racemate vs enantiomer debate / M.S. Lennard // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1991. – № 31. – P. 623–625.

290. Lennarnas, H. The use of biopharmaceutical classification of drugs in drug discovery and development: Current status and future extensions / H. Lennarnas, B. Abrahamsson // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 57. – P. 273–285.
291. Lesko, L. J. Pharmacogenomic-guided drug development: regulatory perspective / L.G. Lesko, J. Woodcock // *The Pharmacogenomics Journal.* – 2002. – № 2(1). – P. 20–24.
292. Lien, A.N. Chiral Drugs : An Overview / A.N. Lien, H. He, C. Pham-Huy // *International Journal of Biomedical science.* – 2006. – Vol. 2, № 2. – P. 85–100.
293. Lindpaintner, K. Pharmacogenetics and the future of medical practice / K. Lindpaintner // *British Journal of Clinical Pharmacology.* – 2002. – № 54. – P. 221–230.
294. Management of adrenocortical carcinoma / B. Allolio [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 2004. – № 60. – P. 540–544.
295. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference / D.E. Schteingart [et al.] // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2005. – № 12. – P. 667.
296. Mareev, V. Possible mechanisms of positive beta blocker effects in the treatment of dilated cardiomyopathy / V. Mareev, Yu. Lopatin, Gh. Pervez // *Eur. Heart J.* – 1993. – №14. – P. 94.
297. Mattila, M. Responses to Rituximab vary among follicular lymphoma B cells of different maturation stages / M. Mattila, S. Meri // *Scandinavian Journal of Immunology.* – 2008. – № 68(2). – P. 159–168.

298. Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC–C2B8 in CD20–expressing lymphoma cell lines / D. Flieger [et al.] // *Cell Immunol.* – 2000. – № 204(1). – P. 55–63.
299. Mechanism of killing by anti–CD20 monoclonal antibodies / S. Hetherington [et al.] // *Molecular Immunology.* – 2007. – № 44. – P. 3823–3837.
300. Meredith, P. Bioequivalence and other unresolved issues in generic drug substitution / P. Meredith // *Clin. Ther.* – 2003. – № 25. – P. 2875–2890.
301. MERIT HF Study Group. Effects of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomized International Trial in Congestive Heart Failure (MERIT HF) // *Lancet.* – 1999. – 353 (9169). – P. 2001–2007.
302. Motl, S. Programs established by FDA to expedite patient access to medications / S. Motl, S.J. Miller, P. Burns // *American Journal of Health System Pharmacy.* – 2003. – № 60. – P. 339–345.
303. Multiple–dose studies can be a more sensitive assessment for bioequivalence than single–dose studies: The case with omeprazole / Z. Elkoshi [et al.] // *Clin. Drug. Invest.* – 2002. – № 22. – P. 585–592.
304. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability (Annex 7). World Health Organization. WHO Technical Report Series, No. 937, 2006. – [Electronic resource]. – Mode of access: http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS937/WHO_TRS_937__annex7_eng.pdf.
305. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability / Technical Report Series, No 937, 40th Report, Annex 7 of WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. WHO, 2006.

306. Nakai, K. International harmonization of bioequivalence studies and issues shared in common / K. Nakai, M. Fujita, H. Ogata // *Yakugaku Zasshi*. – 2000. – №120. – P. 1193–1200.
307. Neha, B. Good pharmacovigilance practice: Need of the hour from pharmaceutical companies / B. Neha, K. Sridharan, P.K. Prem // *Perspect. Clin. Res.* – 2015. – № 6 (3) Jul–Sep. – P. 171–172.
308. New active substances authorized in the United Kingdom between 1972 and 1994 / D.B. Jefferys [et al.] // *British Journal of Clinical Pharmacology*. – 1998. – № 45. – P. 151–156.
309. New Labelling Information for all Botulinum Toxin Products: Botox/Botox Cosmetic, Dysport, Xeomin/Xeomin Cosmetic and Myobloc. Health Canada. – [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/advisoriesavis/_2013/2013_07-eng.php.
310. Nightingale, C.H. A survey of the quality of generic claritromycin products from 13 countries / C.H. Nightingale // *Clin. Drug Investig.* – 2000. – №19. – P. 293–305.
311. Nightingale, C.H. A survey of the quality of generic claritromycin products from 18 countries / C.H. Nightingale // *Clin. Drug Investig.* – 2005. – №25. – P. 135–52.
312. NK cell-mediated lysis is essential to kill Epstein–Barr virus transformed lymphoblastoid B cells when using rituximab / L. Markasz [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2009. – № 63(6). – P. 413–420.
313. Norton, R. M. Clinical pharmacogenomics: applications in pharmaceutical R&D / R.M. Norton // *Drug Discovery Today*. – 2001. – № 6. – P. 180–185.

314. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence, CPMP/EWP/QWP/1401/98 / European Medicines Agency (EMA), Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). – July 2001.
315. Orange Book – Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations [Electronic resource] / U.S. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER)/ – 28th edn. – 2008. [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.fda.gov/cder/orange/obannual.pdf>.
316. Paradoxal release of nitric oxide by an L-type calcium channel antagonist, the R+ enantiomer of amlodipine / X.P. Zhang [et al.] // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2002. – № 39. – P. 208–214.
317. Parfitt, T. Russia Cracks Down on Counterfeit Drugs / T. Parfitt // The Lancet. – 2006. – №368 (9546). – P. 1481–1482.
318. Patil, P. A. Development of safer molecules through chirality / P.A. Patil, M.A. Kothekar // Indian J. Med. Sci. – 2006. – № 60. – P. 427–437.
319. P-glycoprotein expression and activity of resistance modifying agents in primary cultures of human renal and adrenocortical carcinoma cells / H. Fridborg [et al.] // Anticancer Res. – 1994. – №14. – P. 1009–1011.
320. P-glycoprotein expression and multidrug resistance in adrenocortical carcinoma / S.D. Flynn [et al.] // Surgery. – 1992. – №112. – P. 981–986.
321. Pharmacogenetics: ethical issues and policy options / A. Buchanan [et al.] // Kennedy Institute Ethics Journal. – 2002. – № 12. – P. 1–15.
322. Phenotypic differences in nebivolol metabolism and bioavailability in healthy volunteers / C. Briciu [et al.] // Clujul. Med. – 2015. – № 88(2). – P. 208–213.

323. Physiochemical factors influencing the absorption of the anhydrous and trihydrate forms of ampicillin / J.W. Poole [et al.] // *I. Curr. Ther. Res. Clin Exp.* – 1968. – Vol. 10, № 6. – P. 292–303.
324. Pirmohamed, M. Genetic susceptibility to adverse drug reactions / M. Pirmohamed, B.K. Park // *Trends in Pharmacological Sciences.* – 2001. – № 22. – P. 298–305.
325. Pirmohamed, M. The Implications of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics for Drug Development and Health Care. Regulating Pharmaceuticals in Europe: Striving For Efficiency, Equity and Quality / M. Pirmohamed, G. Lewis // *Open University Press.* – 2004. – P. 290–308.
326. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review / K.A. Phillips [et al.] // *Journal of the American Medical Association.* – 2001. – № 286 (18). – P. 2270–2279.
327. Preclinical study of apoptosis of B–NHL cell lines induced by anti–CD20 monoclonal antibody / H.Y. Zhang [et al.] // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2009. – № 17(4). – P. 883–887.
328. Presentation and content of the dossier: Common Technical Document (CTD). The rules governing medicinal products in the European Union (Eudralex). – [Electronic resource]. – Mode of access: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-2/b/update_200805/ctd_05-2008_en.pdf.
329. Primary B–CLL resistance to NK cell cytotoxicity can be overcome in vitro and in vivo by priming NK cells and monoclonal antibody therapy / C. Veuillen [et al.] // *Journal of Clinical Immunology.* 2012. – № 32(3). – P. 632–646.
330. Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma / G. Antoni [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2007. – № 92. – P. 148–

154.

331. Qinghua, Z. Institutional pressures, dynamic capabilities and environmental management systems: Investigating the ISO 9000 – Environmental management system implementation linkage / Z. Qinghua, C. James, S. Joseph // *Journal of Environmental Management*. – 2013. – № 114. – P. 232–242.

332. Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Protein Product (Draft Guidance). Food and Drug Administration. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291134.pdf>.

333. Rabinow, B. E. Nanosuspensions in drug delivery / B.E. Rabinow // *Nature Rev.* – 2004. – Vol. 3, № 9. – P. 785–796.

334. Randomised, placebo controlled trial of carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischaemic heart disease. Australia / New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group // *Lancet*. – 1997. – 349 (9049). – P. 375–380.

335. Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS) / M.D. Flather [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2005. – № 26. – P. 215–25.

336. Randomized, Crossover and Single-Dose Bioequivalence Study of Two Oral Desogestrel Formulations (Film-Coated Tablets of 75 Mg) in Healthy Female Volunteers / M.A. Pena [et al.] // *Scientia Pharmaceutica*. – 2012. – № 80(2). – P. 419–431.

337. Recommendations of the Italian League against Epilepsy working group on generic products of antiepileptic drugs / E. Perucca [et al.] // *Epilepsia*. – 2006. – V. 47 (Suppl. 5). – P. 16–20.

338. Reddy, B. B. K. Biopharmaceutics Classification System: A Regulatory Approach / B.B.K. Reddy, A. Karunakar // *Dissolution Technologies*. – 2011. –February. – P. 31–37.
339. Roses, A. D. Pharmacogenetics and the practice of medicine / A.D. Roses // *Nature*. – 2000. – № 405. – P. 857–65.
340. Rx R&D Myths: The Case Against the Drugs Industry 'Scare Card' / Public Citizen. – 2001. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.citizen.org/publications/release.cfm?ID=7065>).
341. Schellekens, H. Biosimilar epoetin: how similar are they? / H. Schellekens. // *Eur. J. Hosp. Pharm.* – 2004. – № 3. – P. 43–47.
342. Schofield, J. Counterfeit pharmaceuticals flood Russian market / J. Schofield // *BMJ*. – 2001. – № 322 (7302). – P. 1564. 1
343. Schteingart, D.E. Conventional and novel strategies in the treatment of adrenocortical cancer / D.E. Schteingart // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2000. – № 33. – P. 1197–1200.
344. Schuppli, C.A. The interpretation and application of the three Rs by animal ethics committee members / C.A. Schuppli, D. Fraser // *ATLA*. – 2005. –V.33, № 5. –P.487–500.
345. Similar biological medicinal products (CHMP/437/04). European Medicines Agency. – [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003517.pdf.
346. Simultaneous determination of gestodene, etonogestrel and ethinylestradiol in plasma by LC–MS/MS following derivatization / Liu X.F. [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica*. – 2010. – № 45(1). – P. 87–92.

347. Simultaneous online SPE–LC–MS/MS quantification of six widely used synthetic progestins in human plasma / C. Moser [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – № 403(4). P. 961–972.
348. Sliva, J. Counterfeit Drugs Deemed Threat In Europe / J. Sliva // *Lexis Nexis Academic.* – 2011. – Feb 11.
349. Solid–state fluorescence studies of some polymorphs of diflunisal / H.G. Brittain [et al.] // *J. I. Pharm. Res.* – 2005. – Vol. 22, № 6.– P. 999–1006.
350. Srinivas, N. Enantiomeric drug development: issues, considerations and regulatory requirements / N. Srinivas, R.H. Barbhaiya, K.K. Midha // *J. Pharmacol. Sci.* – 2000. – № 90. – P. 1205–1215.
351. Staschitzky K. Racemic beta–blockers – fixed combination of racemic drugs / Staschitzky K. // *J. Clin. Bas. Cardiol.* – 1998. – № 1. – 14–18.
352. Summary Workshop Report: Bioequivalence, Biopharmaceutics Classification System, and Beyond / J.E. Polli [et al.] // *The AAPS J.* – 2008. – Vol. 2, № 10. – P. 373–379.
353. Sustained remission of metastatic adrenal carcinoma during long–term administration of low–dose mitotane / I. Ilias [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 2001. – № 24. – P. 532–535.
354. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS–II): a randomised trial // *Lancet.* – 1999. – 353. – P. 9–13.
355. The dangers of counterfeit and substandard active pharmaceutical ingredients // *WHO Drug Information.* – 1997. – № 11 (3). – P. 123–7.

356. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure / M. Packer [et al] // *N. Engl. J. Med.* – 1996. – № 334(21). – P. 1349–1355.
357. The role of in vitro methods as alternatives to animals in toxicity testing. / A. Arturo [et. al.] // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* – 2014. – Vol. 10, N.1. – P. 67–79.
358. Therapy of the adrenocortical carcinoma with Lysodren (o,p'-DDD). Therapeutic management by monitoring o,p-DDD blood levels / P. Heilmann [et al.] // *Med. Klin.* – 2001. – № 96. – P. 371–377.
359. Tillement, J. P. Compared pharmacological characteristics in humans of racemic cetirizine and levocetirizine, two histamine H₁-receptor antagonists / J.P. Tillement, B. Testa, F. Bree // *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 66. – P. 1123–1126.
360. Title 21 Code of Federal Regulations, Sec. 314.126 Adequate and wellcontrolled studies. United States Food and Drug Administration. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=314.126>.
361. Truus Janse-de Hoog, European Medicines Agency. [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2011/06/WC500107873.
362. Tufts Centre for the Study of Drug Development pegs cost of a new prescription medicine at \$802 million [Electronic resource] : Press Release // Tufts Centre for the Study of Drug Development, Tufts University, 30 November. – Access mode : www.tufts.edu/med/csdd/ (accessed 12 December 2002).

363. Tumor cell expression of CD59 is associated with resistance to CD20 serotherapy in patients with B-cell malignancies / S.P. Treon, C. Mitsiades, N. Mitsiades [et al.] // *Journal of Immunotherapy*. – 2001. – № 24(3). – P. 263–271.
364. Type of serum influences the rituximab dependent cytotoxicity and apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells in vitro / E. Ziółkowska [et al.] // *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. – 2012. – № 66. – P. 730–738.
365. U. S. Food and Drug Administration (FDA) Guidance for Industry. 2005, Rockville. The Biopharmaceutical Classification System (BCS) Guidance (June 2005) [Electronic resource]. [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.fda.gov/cder/OPS/BCS_guidance.htm.
366. U.S. Food and Drug Administration. Bayer voluntarily withdraws Baycol®. Media Release, 8 Aug 2001 [Electronic resource]. – [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.fda.gov>.
367. Utbytbara läkemedel. Läkemedelsverket (Medical Products Agency). – [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.lakemedelsverket.se/upload/halso-och-sjukvard/forskrivning/utbytbarhet/gk_utbytbara%20grupper_121130.pdf.
368. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). – Brussels: ICH, 2005.
369. Vanparys, P. ECVAM and pharmaceuticals / P. Vanparys // *Altern. Lab. Anim.* – 2002. – №30 (2). – P. 221–223.
370. Varinder, A. K. Amidine-Promoted Addition of Chloroform to Carbonyl Compounds / A.K. Varinder, A. Mereu // *Journal of Organic Chemistry*. – 2000. – vol. 65, 21 P. 7211 – 7212.
371. Veenstra, D. L. Assessing the costeffectiveness of pharmacogenomics American Association of Pharmaceutical Scientists, 2(3): article 29 [Electronic

resource] / D.L. Veenstra, M.K. Higashi, K.A. Phillips // Access mode : (<http://www.pharmsci.org/>).

372. Vippagunta, S. R. Crystalline solids / S.R. Vippagunta, H.G. Brittain, D.J.V. Grant // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – Vol. 48. – P. 3–26.

373. Vogel, F. Moderne problem der humangenetik / F. Vogel // *Ergeb. Inn. Med. U. Kinderheilk.* – 1959. – № 12. – P. 52–125.

374. Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines. The rules governing medicinal products in the European Union (Eudralex). – [Electronic resource]. – Mode of access: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm 27. Kurt R. Karst, FDA: Law Blog.

375. Vugmeyster, Y. B-cell subsets in blood and lymphoid organs in *Macaca fascicularis*. *Cytometry* / Y. Vugmeyster, K. Howell // *International Immunopharmacology*. – 2004. – № 4(8). – P. 1117–1124.

376. WHO [Electronic resource]. – Access mode: <http://www.who.int/trade/glossary/story034-/en/index.html>.

377. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. – Geneva: World Health Organization, 2003. – (WHO Technical Report Series, 908).

378. WHO Prequalification Programme [Electronic resource]. – Access mode : <http://apps.who.int/prequal/>.

379. Yamashita, S. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain and Japan / S. Yamashita, L.X. Yu, G.L. Amidon // *Mol. Pharm.* – 2006. – Vol. 3. – P. 631–643.

380. Yusuf, S. Overview of results of randomized clinical trials in heart disease. Treatments following myocardial infarction / S. Yusuf, J. Wittes, L. Friedman // JAMA. – 1988. – № 260. – P. 2088–2093.
381. Zhang, X. Yu. Lawrence Dissolution testing for solid oral drug products: theoretical considerations / H.Y. Zhang // Amer. Pharm. Rev. – 2010. – № 6. – P. 1–4.
382. Zhou, X. The Role of Complement in the Mechanism of Action of Rituximab for B-Cell Lymphoma: Implications for Therapy / X. Zhou, W. Hub, X. Qin // The Oncologist. – 2008. – № 13(9). – P. 954–966.

ПРИЛОЖЕНИЯ

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1. АКТЫ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ
ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ**



**МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
(МИНЗДРАВ РОССИИ)

Рахмановский пер., д. 3/25, стр. 1, 2, 3, 4,
Москва, ГСП-4, 127994

тел.: (495) 628-44-53, факс: (495) 628-50-58

21.11.2015 № 20-3/1690

На № _____ от _____

Председателю диссертационного
совета Д 208.008.02
при ФГБОУ ВО ВолгГМУ
Минздрава России
академику РАН, доктору
медицинских наук, профессору
В.И. Петрову

площадь Павших борцов, д. 1,
г. Волгоград
Волгоградская область
ЮФО, 400131

Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук Гильдеевой Гэлии Нязыфовны "Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов" по специальности 14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология был рассмотрен в Департаменте государственного регулирования обращения лекарственных средств в пределах компетенции, в связи с чем сообщаем следующее.

Предложения по совершенствованию регистрации и экспертизы воспроизведенных лекарственных средств с точки зрения необходимого объема проводимых экспериментальных фармакологических исследований, а также вопросы определения терминологии, представленные в диссертационной работе Г.Н. Гильдеевой, были частично использованы при внесении дополнений в Федеральный закон от 12.04.2010 №61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств" и при подготовке проектов нормативно правового акта ЕАЭС "Правила проведения исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств в сфере обращения лекарственных средств на территории Евразийского экономического союза" для Коллегии Евразийской экономической комиссии, которые вошли в Распоряжение от 22.12.1025 № 170.

Заместитель директора Департамента
государственного регулирования
обращения лекарственных средств

А. Ю. Хубиева

Заместитель начальника отдела
регулирования обращения лекарственных
препаратов

Т.В. Картавцова



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «АКТАВИС»

Чудаков Г.И.

«42» июня 2015

АКТ О ВНЕДРЕНИИ результатов диссертационной работы

Предмет внедрения:

Общие принципы и методики проведения биоэквивалентных исследований параметров фармакодинамики, фармакокинетики генерических гормональных лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции хлормадинон+этинилэстрадиол (Ангелетта таблетки, покрытые пленочной оболочкой 2 мг+0,03 мг), дезогестрел (Диамилла, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 75 мкг), дезогестрел+этинилэстрадиол (Бенидетта, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мкг+30 мкг) и дезогестрел+этинилэстрадиол (таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мкг+20 мкг) с целью подтверждения их терапевтической эквивалентности препаратам Белара®, Чарозетта®, Марвелон® и Мерсилон®.

Кем предложен:

Гильдеевой Г.Н.

Диссертационная работа Гильдеевой Г.Н. «Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов» выполнена в ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России.

Источник информации:

Источник информации:

- 1) Отчет о результатах исследования биоэквивалентности по протоколу № BE-08-2013-ACT-CHLOR «Открытое, рандомизированное, перекрестное исследование по изучению сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Ангелетта, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 2 мг+0,03 мг, производитель «Лабораториос Леон Фарма С.А.» Испания и Белара®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 2 мг+0,03 мг, производитель «Грюненталь ГмбХ», Германия».
- 2) Отчет о валидации аналитической методики № V- CHLOR-EE -01/15 «Количественное определение концентрации хлормадинона и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».
- 3) Аналитический отчет №А- CHLOR-EE -01/15 «Количественное определение концентрации хлормадинона и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».
- 4) Отчет о результатах исследования биоэквивалентности по протоколу № BE-09-2013-ACT-DES «Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Диамилла, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 75 мкг, производитель «Лабораториос Леон Фарма С.А.» Испания и Чарозетта®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 75 мкг, производитель «Н.В. Органон», Нидерланды».
- 5) Отчет о валидации аналитической методики № V-Etonogestrel-01/14 «Количественное определение концентрации этоногестрела в крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием»

- 6) Аналитический отчёт "Определение концентрации этоноргестрела в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием"
- 7) Отчет о результатах исследования биоэквивалентности по протоколу № BE-05-2014-АСТ-DEE-30 «Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Бенидетта (дезогестрел + этинилэстрадиол), таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мкг + 30 мкг, «Лабораториос Леон Фарма А.С.», Испания и Марвелон® (дезогестрел + этинилэстрадиол), таблетки 150 мкг + 30 мкг, производитель «Н.В. Органон», Нидерланды»
- 8) Отчет о валидации аналитической методики «Количественное определение концентрации 3-кетодезогестрела (этоноргестрела) и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием»
- 9) Аналитический отчёт «Количественное определение концентрации 3-кетодезогестрела (этоноргестрела) и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием»
- 10) Отчет о результатах исследования биоэквивалентности по протоколу № BE-10-2014-АСТ-DEE-20 «Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Бенидетта мини (дезогестрел + этинилэстрадиол), таблетки, покрытые пленочной оболочкой 150 мкг + 20 мкг, производства «Лабораториос Леон Фарма А.С.», Испания и Мерсилон® (дезогестрел + этинилэстрадиол), таблетки 150 мкг + 20 мкг, производства «Н.В. Органон», Нидерланды»
- 11) Отчет о валидации аналитической методики «Количественное определение концентрации 3-кетодезогестрела (этоноргестрела) и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием»
- 1) Аналитический отчёт «Количественное определение концентрации 3-кетодезогестрела (этоноргестрела) и этинилэстрадиола в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием»

Где и кем внедрено:

ООО «АКТАВИС», Российская Федерация.

Цель внедрения:

Гармонизация методов планирования и проведения биоэквивалентных исследований лекарственных препаратов в соответствии с Российскими и Европейскими рекомендациями и нормативными требованиями, повышение конкурентных преимуществ отечественных разработок.

Ответственные за внедрение:

Медицинский директор ООО «АКТАВИС», к.м.н. Вильчинская М.Ю.

Результаты внедрения:

Практические рекомендации диссертационной работы Гильдеевой Г.Н. используются при планировании и проведении биоэквивалентных исследований безопасности, фармакодинамики и фармакокинетики генерических лекарственных препаратов, содержащих гормоны хлормадинон+этинилэстрадиол, дезогестрел, дезогестрел+этинилэстрадиол и дезогестрел+этинилэстрадиол.

Эффективность внедрения:

Определение необходимого и достаточного объема биоэквивалентных исследований, использование разработанных и отвалидированных методик, которые впервые разработаны для определения фармакокинетических параметров вышеперечисленных МНН, повышение качества экспериментальных исследований и оформления отчетов является важным результатом диссертационной работы Гильдеевой Г.Н.

Медицинский директор
к.м.н.

Вильчинская М.Ю.



«УТВЕРЖДАЮ»
 Генеральный директор
 ООО «МБЦ «Генериум»,
 д.м.н., профессор Р.А. Хамитов



« _____ 2016 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ
 результатов диссертационной работы

Предмет внедрения:

Рекомендации по проведению доклинических исследований с целью подтверждения биологической аналогичности новых биологически аналогичных препаратов моноклональных антител, в том числе содержащих в качестве активной субстанции ритуксимаб.

Кем предложен:

Соискателем ученой степени доктора фармацевтических наук Гильдеевой Г.Н. Диссертационная работа «Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов» выполнена в Первом Московском государственном медицинском университете имени И.М. Сеченова Минздрава России.

Источник информации:

Гильдеева Г.Н., Кудлай Д.А., Лукьянов С.В. Механизмы действия ритуксимаба. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, № 12. – С. 51-56.

Гильдеева Г.Н. Актуальные проблемы доклинических исследований: переход к альтернативной in-vitro-токсикологии. // Вестник Росздравнадзора. – 2015. – № 5. – С. 59-62.

Верстакова О.Л., Гильдеева Г.Н. Современные научные подходы к проведению доклинической экспертизы эффективности и безопасности лекарственных средств. // II Всероссийский съезд фармацевтических работников. – Сочи, 2005. – С. 61-62.

Где и кем внедрено:

ООО «Международный Биотехнологический Центр «Генериум».

Цель внедрения:

Унификация методологических подходов при планировании и проведении доклинических исследований биоаналогичных лекарственных препаратов в соответствии с российскими и европейскими рекомендациями и нормативными требованиями, повышение конкурентных преимуществ отечественных разработок.

Ответственные за внедрение:

Начальник отдела управления проектами, к.х.н. Е.Н. Сауткина, заместитель начальника отдела управления проектами по доклиническим исследованиям, д.б.н. Р.М. Салимов.

Результаты внедрения:

Практические рекомендации диссертационной работы Гильдеевой Г.Н. используются при планировании и проведении доклинических исследований специфической активности, безопасности и фармакокинетики оригинальных и воспроизведенных, моно- и поликомпонентных биоаналогичных лекарственных препаратов.

Эффективность внедрения:

Оптимизация бюджета, рациональное использование лабораторных животных, повышение качества вышеуказанных исследований и оформления их результатов свидетельствуют об эффективности внедрения результатов диссертационной работы Гильдеевой Г.Н.

Начальник отдела управления проектами,
к.х.н.

Е.Н. Сауткина

Зам. начальника отдела управления
проектами по доклиническим исследованиям,
д.б.н.

Р.М. Салимов

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

Федеральное
государственное учреждение
«Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»
(ФГУ НЦЭСМП Росздравнадзора)

Центр стандартизации лекарственных средств

Юридический адрес: Петровский бульвар д. 8, Москва, 127051,
факс 209-68-58, тел. 200-16-08, 200-27-91

Почтовый адрес: ул. Щукинская, д. 6, Москва, 123182
факс 190-33-20, тел. 234-61-04

19.11.10 № 336 15210

На № _____ от _____


В Диссертационный совет Московской
медицинской академии
им. И.М. Сеченова

В Центр стандартизации лекарственных средств ФГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» поступили на рассмотрение материалы по теме диссертационной работы Гильдеевой Гелии Назыфовны для возможности их использования при разработке общих фармакопейных и фармакопейных статей Государственной фармакопеи Российской Федерации XII издания.

Представленные материалы по определению подлинности лекарственных средств методом ТСХ могут быть использованы при разработке фармакопейных статей на лекарственные средства ибупрофена, пироксикама и лорноксикама.

Материалы по явлению полиморфизма фармацевтических субстанций будут использованы при составлении общей фармакопейной статьи «Полиморфизм», предназначенной для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации XII издания.

Заместитель руководителя

 Л.И. Митькина

«УТВЕРЖДАЮ»
 ЗАО "Обнинская химико-фармацевтическая компания"
 Пучнин В.С.
 «15» августа 2016 г.



АКТ О ВНЕДРЕНИИ
 результатов диссертационной работы

Предмет внедрения:

Разработка и оптимизация методов синтеза субстанции митотана для последующей промышленной технологии получения целевого продукта, гарантирующих высокие качественные характеристики готовой лекарственной формы лекарственного препарата Митотан, таблетки. Разработка и валидация метода количественного определения активного вещества в плазме крови человека.

Кем предложен:

Гильдеевой Г.Н.

Диссертационная работа Гильдеевой Г.Н. «Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов» выполнена в ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России.

Источник информации:

Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (Росздравнадзор, 2005), Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Минздравсоцразвития России, 2012) и вошедшие в него методические рекомендации.

Государственная программа Российской Федерации «Развитие здравоохранения». Распоряжение от 24 декабря 2012 г. №25-11-р.

Проект Российский клинических рекомендаций по диагностике и лечению аденокарциномы (2014 г.).

Где и кем внедрено:

ЗАО "Обнинская химико-фармацевтическая компания", Россия

Цель внедрения:

Промышленное производство, планирование и проведение фармакокинетических исследований лекарственных препаратов, содержащих митотан в соответствии с Российскими и Европейскими

рекомендациями и нормативными требованиями, повышение конкурентных преимуществ отечественных разработок.

Ответственный за внедрение:

Генеральный директор ЗАО "Обнинская химико-фармацевтическая компания", Россия, к.ф.н., Пучнин В.С.

Результаты внедрения:

Практические рекомендации диссертационной работы Гильдеевой Г.Н. используются при промышленном производстве субстанции митотана и готовой лекарственной формы, а также при планировании и проведении фармакокинетических исследований лекарственных препаратов, содержащих митотан в качестве активного фармацевтического ингредиента.

Эффективность внедрения:

Внедрение в производство воспроизведенного, но не зарегистрированного и нового для России, орфанного препарата Митотан, позволяющего значительно повысить качество жизни больных со злокачественными новообразованиями надпочечника является важным результатом диссертационной работы Гильдеевой Г.Н.

Генеральный директор, к.ф.н.



Пучнин В.С.



**МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНЗДРАВ РОССИИ)**

Рахмановский пер., д. 3/25, стр. 1, 2, 3, 4,
Москва, ГСП-4, 127994
тел.: (495) 628-44-53, факс: (495) 628-50-58

23.09.2016

№ 2201/25-1

На № _____ от _____

Председателю диссертационного
совета Д 208.008.02
при ФГБОУ ВО ВолгГМУ
Минздрава России

академику РАМН, доктору
медицинских наук, профессору
В.И. Петрову

400131, ЮФО, Волгоградская
область, город Волгоград,
площадь Павших борцов, дом 1

Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук Гильдеевой Гэлии Нязыфовны «Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов» по специальности 14.03.06 — Фармакология, клиническая фармакология был рассмотрен в Департаменте лекарственного обеспечения и государственного регулирования обращения медицинских изделий Минздрава России в пределах компетенции, в связи с чем сообщаем следующее.

Вопросы преквалификационной оценки лекарственных препаратов при составлении перечней лекарственных препаратов, в том числе внедрения различных методов оценки технологий здравоохранения, затронутые в диссертационной работе Г.Н. Гильдеевой, докладывались в рамках сессий международного форума «Европа и Россия: вектор развития. Гармонизация», включенного в план научно-практических мероприятий Министерства здравоохранения Российской Федерации, утвержденного приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 26.02.2013 № 93.

Результаты диссертационной работы Г.Н. Гильдеевой были частично использованы Департаментом лекарственного обеспечения и государственного регулирования обращения медицинских изделий Минздрава России при разработке постановления Правительства Российской Федерации от 28.08.2014 № 871 «Об утверждении Правил формирования перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи».

Заместитель Директора Департамента

О.А. Константинова

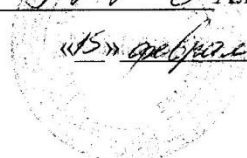
Начальник отдела нормативно-правового
регулирующего вопросов лекарственного
обеспечения и контроля качества
лекарственных средств

А.А. Гайдеров

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «НПК «ФАРМАСОФТ»

 Алхасов Т.Г.


«15» февраля 2016 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

результатов диссертационной работы

Предмет внедрения:

Разработка и оптимизация методов проведения сравнительного теста кинетики растворения лекарственных препаратов Мексидол (старый состав вспомогательных веществ) и Мексидол (новый состав вспомогательных веществ). Внедрение процедуры «биовейвер» как альтернативы исследованиям биоэквивалентности *in vivo*.

Кем предложен:

Гильдеевой Г.Н.

Диссертационная работа Гильдеевой Г.Н. «Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов» выполнена в ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России.

Источник информации:

Руководство по экспертизе лекарственных средств, т.1,3, 2013 г.

Методические указания «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств», приложение 4, 2008 г.

ОФС 42-0003-04.

Где и кем внедрено:

ООО «НПК «ФАРМАСОФТ», Россия

Цель внедрения:

Планирование и проведение сравнительного теста кинетики растворения воспроизведенных лекарственных препаратов в соответствии с Российскими и Европейскими рекомендациями и нормативными требованиями, внедрение процедуры «биоверификация», повышение конкурентных преимуществ отечественных разработок.

Ответственный за внедрение:

Генеральный директор ООО «НПК «ФАРМАСОФТ», Россия Алхасов Т.Г.

Результаты внедрения:

Практические рекомендации диссертационной работы Гильдеевой Г.Н. используются при определении профилей растворения препаратов этилметилгидроксипиридина сукцината, а также при разработке принципов проведения процедуры «биоверификация» для воспроизведенных лекарственных препаратов отдельных классов по биофармацевтической классификационной системе.

Эффективность внедрения:

Внедрение новых аналитических методик в рамках расширения процедуры «биоверификация» в отношении некоторых лекарственных препаратов способно улучшить финансовую доступность качественных лекарственных препаратов для населения, что является важным результатом диссертационной работы Гильдеевой Г.Н.

Генеральный директор
ООО «НПК «ФАРМАСОФТ»



Алхасов Т.Г.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2357781

**СПОСОБ РАЗДЕЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКИХ ИЗОМЕРОВ
АМЛОДИПИНА**

Патентообладатель(ли): *Гильдеева Гэлия Нязыфовна (RU),
Кукес Владимир Григорьевич (RU), Пахомов Виктор
Петрович (RU), Чеча Ольга Александровна (RU),
Раменская Галина Владиславовна (RU)*

Автор(ы): *с.м. на обороте*

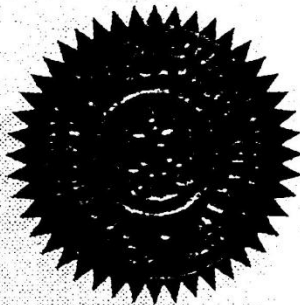
Заявка № 2008103748

Приоритет изобретения 06 февраля 2008 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации 10 июня 2009 г.

Срок действия патента истекает 06 февраля 2028 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной
собственности, патентам и товарным знакам



Б.И. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU**⁽¹¹⁾ **2 357 781**⁽¹³⁾ **C1**(51) МПК
B01D 15/38 (2006.01)**(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2008103748/15, 06.02.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.02.2008

(45) Опубликовано: 10.06.2009 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2132845 C1, 10.07.1999. US 6822099 A,
23.11.2004. US 6646131 A, 11.11.2003. RU
2105759 C1, 27.11.2004. EP 0331315 A1,
06.09.1989.Адрес для переписки:
115141, Москва, Коломенская наб., 14,
кв.296, В.П. Пахомову

(72) Автор(ы):

Гильдеева Гэлия Нязыфовна (RU),
Кукес Владимир Григорьевич (RU),
Пахомов Виктор Петрович (RU),
Чеча Ольга Александровна (RU),
Раменская Галина Владиславовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Гильдеева Гэлия Нязыфовна (RU),
Кукес Владимир Григорьевич (RU),
Пахомов Виктор Петрович (RU),
Чеча Ольга Александровна (RU),
Раменская Галина Владиславовна (RU)**(54) СПОСОБ РАЗДЕЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКИХ ИЗОМЕРОВ АМЛОДИПИНА****(57) Формула изобретения**

1. Способ разделения оптических изомеров амлодипина, включающий взаимодействие смеси изомеров с органическим растворителем, отличающийся тем, что разделению подвергают рацемат бензолсульфоната амлодипина, и разделение осуществляют методом тонкослойной хроматографии при использовании в качестве неподвижной фазы слоя силикагеля с привитой хиральной фазой, а в качестве подвижной фазы органического растворителя, содержащего: 4-6 об.ч. 12-20%-ного водного раствора формальдегида, 4-5 об.ч. этанола, 2-3 об.ч. ацетонитрила.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что разделение осуществляют с предварительным насыщением хроматографической камеры и слоя силикагеля органическим растворителем, используемым в качестве подвижной фазы.

RU 2 3 5 7 7 8 1 C 1

«УТВЕРЖДАЮ»

Представительство компании
Белупо, лекарства и косметика д.д.,
Республика Хорватия в России, Россия
Руководитель отдела регистрации



АКТ О ВНЕДРЕНИИ

результатов диссертационной работы

Предмет внедрения:

Научная разработка и оптимизация методов проведения сравнительного теста кинетики растворения лекарственных препаратов Конвилепт® (МНН: леветирацетам) и Нетакне® (МНН: изотретиноин). Внедрение процедуры «биовейвер» как альтернативы исследованиям биоэквивалентности in vivo.

Кем предложен:

Гильдеевой Г.Н.

Диссертационная работа Гильдеевой Г.Н. «Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов» выполнена в ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России.

Источник информации:

Методические указания «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств», приложение 4, 2008 г.

Руководство по экспертизе лекарственных средств, т.1,3, 2013 г.

ОФС 42-0003-04.

Где и кем внедрено:

Представительство компании Белупо, лекарства и косметика д.д., Республика Хорватия в России, Россия

Цель внедрения:

Планирование и проведение сравнительного теста кинетики растворения воспроизведенных лекарственных препаратов в соответствии с Российскими и Европейскими рекомендациями и нормативными требованиями, внедрение процедуры «биовейвер», повышение конкурентных преимуществ качественных воспроизведенных препаратов.

Ответственный за внедрение:

Руководитель отдела регистрации Представительства компании Белупо, лекарства и косметика д.д., Республика Хорватия в России, Шмелькова Наталья Викторовна.

Результаты внедрения:

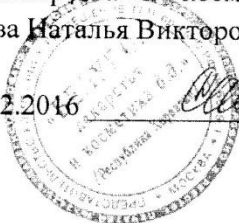
Практические рекомендации диссертационной работы Гильдеевой Г.Н. используются при определении профилей растворения препаратов леветирацетама и изотретиноина, а также при разработке принципов проведения процедуры «биовейвер» для воспроизведенных лекарственных препаратов отдельных классов по биофармацевтической классификационной системе.

Эффективность внедрения:

Внедрение новых аналитических методик в рамках расширения процедуры «биовейвер» в отношении ряда лекарственных препаратов способно улучшить финансовую доступность качественных воспроизведенных лекарственных препаратов для населения, что является важным результатом диссертационной работы Гильдеевой Г.Н.

Руководитель отдела регистрации Представительства компании Белупо, лекарства и косметика д.д., Республика Хорватия в России, Шмелькова Наталья Викторовна

01.02.2016



(Шмелькова Н.В.)

МИНИСТЕРСТВО
ПРОМЫШЛЕННОСТИ
И ТОРГОВЛИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ИНСТИТУТ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
И НАДЛЕЖАЩИХ ПРАКТИК»
(ФБУ «ГИЛС и НП» Минпромторга России)

Лавров пер., д. 6, Москва, 109044
Тел. (495) 676-43-60
E-mail: info@gilsinp.ru
http://www.gosgmp.ru

15.12.2016г. № 01-09/кчв

На № от

Председателю диссертационного совета
Д 208.008.02
при ФГБОУ ВО Волг ГМУ
Минздрава России
академику РАН, доктору медицинских
наук, профессору
В.И. Петрову

Уважаемый Владимир Иванович!

Материалы диссертационной работы на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук Гильдеевой Гэлии Нязыфовны "Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов" по специальности 14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология были рассмотрены в Федеральном бюджетном учреждении «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик», в связи с чем сообщаем следующее.

Предложения по правилам проведения исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств и порядку формирования регистрационного досье на лекарственный препарат, требований к документам в его составе, требований к объему информации, предоставляемой в составе регистрационного досье, представленные в диссертационной работе Г.Н. Гильдеевой, были частично использованы при разработке и подготовке проектов нормативно правового акта ЕАЭС "О правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения" для Коллегии Евразийской экономической комиссии, которые вошли в Распоряжение от 22.12.1025 № 170.

Директор



В.Н. Шестаков



Союз фармацевтических работников по содействию
развития профессии и фармацевтической отрасли
«Национальная Фармацевтическая Палата»

ОГРН 1147799018663 ИНН 7710481823 КПП 771001001
125009 г.Москва, ул. Большая Дмитровка, д.7/5, стр.5
Тел.: +7 (495) 692-54-06, +7 (985) 640-15-39
<http://nacpharmpalata.ru/>
nfppochta@gmail.com

Исх. № 224 от 09.12.2016 г.*

**Председателю диссертационного
Совета Д 208.008.02
При ФГБОУ ВО ВолГМУ
Минздрава России
Академику РАН, доктору
Медицинских наук, профессору
В.И. Петрову
Площадь Павших борцов, д.1,
Г. Волгоград
Волгоградская область
ЮФО, 400131**

Материалы диссертационной работы на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук Гильдеевой Гелии Нязыфовны "Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов" по специальности 14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология были использованы Союзом «Национальная Фармацевтическая Палата» для подготовки стандартов специалистов в области экспериментальных фармацевтических исследований и специалистов по фармаконадзору.

Данные стандарты являются востребованными для фармацевтической отрасли и в целом направлены на обеспечение удовлетворения потребителей в отношении безопасности применения лекарственных препаратов. Гильдеева Г.Н. внесла существенный вклад в подготовку вышеупомянутых стандартов.

Проекты профессиональных стандартов находятся на экспертном обсуждении в открытом доступе на официальном сайте Министерства труда и социальной защиты РФ (<http://profstandart.rosmintrud.ru/>).

Президент Союза



А.Д.Апазов



**МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
(МИНЗДРАВ РОССИИ)

Рахмановский пер., д. 3/25, стр. 1, 2, 3, 4,
Москва, ГСП-4, 127994
тел.: (495) 628-44-53, факс: (495) 628-50-58

23.09.2016

№ 2121/25-1

На № _____ от _____

Председателю диссертационного
совета Д 208.008.02
при ФГБОУ ВО ВолгГМУ
Минздрава России

академику РАМН, доктору
медицинских наук, профессору
В.И. Петрову

400131, ЮФО, Волгоградская
область, город Волгоград,
площадь Павших борцов, дом 1

Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук Гильдеевой Гэлии Нязыфовны «Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов» по специальности 14.03.06 — Фармакология, клиническая фармакология был рассмотрен в Департаменте лекарственного обеспечения и государственного регулирования обращения медицинских изделий Минздрава России в пределах компетенции, в связи с чем сообщаем следующее.

Вопросы преквалификационной оценки лекарственных препаратов при составлении перечней лекарственных препаратов, в том числе внедрения различных методов оценки технологий здравоохранения, затронутые в диссертационной работе Г.Н. Гильдеевой, докладывались в рамках сессий международного форума «Европа и Россия: вектор развития. Гармонизация», включенного в план научно-практических мероприятий Министерства здравоохранения Российской Федерации, утвержденного приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 26.02.2013 № 93.

Результаты диссертационной работы Г.Н. Гильдеевой были частично использованы Департаментом лекарственного обеспечения и государственного регулирования обращения медицинских изделий Минздрава России при разработке постановления Правительства Российской Федерации от 28.08.2014 № 871 «Об утверждении Правил формирования перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи».

Заместитель Директора Департамента

О.А. Константинова

Начальник отдела нормативно-правового
регулирующего вопросов лекарственного
обеспечения и контроля качества
лекарственных средств

А.А. Гайдаров