

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Токарева Маргарита Алексеевна

**Разработка, валидация и апробация методики
определения инновационного лекарственного средства пептидной структуры
в биологических образцах**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Белова Мария Владимировна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТРИЦАХ (обзор литературы).....	15
1.1. Определение, классификация и общая характеристика пептидных терапевтических средств	16
1.1.1. Классификация и физико-химические свойства пептидов	16
1.1.2. Особенности фармакокинетики пептидов	19
1.1.3. Проблемы стабильности пептидов в биообразцах	23
1.2. Современные методы пробоподготовки биологических образцов для анализа пептидов	26
1.2.1. Преодоление недостатков пептидных препаратов при помощи модификации и дериватизации	28
1.3. Определение распределения вещества в цельной крови	32
1.4. Определение связывания с белками плазмы	33
1.5. Хроматографические методы разделения пептидов	34
1.6. Масс-спектрометрическое детектирование в анализе пептидов.....	37
1.7. Выбор внутреннего стандарта	40
1.8. Треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил- глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат. Структура, описание физических и химических свойств. Особенности определения.....	42
1.9. Выводы к главе 1	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	46
2.1. Оборудование	46
2.2. Стандартные образцы, реактивы и расходные материалы	47
2.3. Приготовление растворов.....	49
2.3.1. Исходные стандартные растворы	49
2.3.2. Рабочие стандартные растворы	50

2.3.3. Дериватирующие агенты, элюенты и буферы.....	52
2.4. Методика проведения анализа	53
2.4.1. Методика количественного определения исследуемого тетрадекапептида в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией.....	53
2.4.2. Условия хроматографического разделения и детектирования	54
2.4.3. Разработка методики оценки распределения модельного вещества – индапамида – в цельной крови человека	55
2.4.4. Определения распределения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил- аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в цельной крови человека.....	59
2.4.5. Методика определения связывания исследуемого тетрадекапептида с белками плазмы крови человека.....	60
2.4.6. Апробация методики.....	61
2.4.7. Расчёт фармакокинетических данных	62
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИССЛЕДУЕМОГО ТЕТРАДЕКАПЕПТИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС- СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ	65
3.1. Первичные результаты изучения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил- аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил- глутамата при анализе высокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемной масс-спектрометрией.....	65
3.2. Дериватизация исследуемого тетрадекапептида	70
3.3. Оптимизация пробоподготовки исследуемого тетрадекапептида для плазмы крови человека	80
3.4. Сравнение с другими методиками определения терапевтических пептидов в биологических образцах	85
3.5. Выводы к главе 3	86

ГЛАВА 4. ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИССЛЕДУЕМОГО ТЕТРАДЕКАПЕПТИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС- СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ	88
4.1. Селективность и специфичность	89
4.2. Эффект матрицы.....	92
4.3. Градуировочная кривая	94
4.4. Правильность и прецизионность	95
4.5. Степень извлечения.....	97
4.6. Нижний предел количественного определения	98
4.7. Перенос пробы.....	99
4.8. Стабильность	100
4.9. Выводы к главе 4	105
ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И СВЯЗЫВАНИЯ С БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ ИССЛЕДУЕМОГО ТЕТРАДЕКАПЕПТИДА В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ.....	107
5.1. Модификация и верификация протоколов на модельном веществе	107
5.2. Определение коэффициента распределения «кровь/плазма» для исследуемого тетрадекапептида	109
5.3. Оценка связывания исследуемого тетрадекапептида с белками плазмы крови	111
5.4. Выводы к главе 5	112
ГЛАВА 6. АПРОБАЦИЯ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ В КЛИНИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ.....	114
6.1. Дизайн исследования и отбор образцов.....	114
6.2. Применение методики для анализа образцов.....	114
6.3. Результаты апробации и фармакокинетические параметры	115
6.4. Обсуждение результатов	117
6.5. Выводы к главе 6	119

ОБЩИЕ ВЫВОодЫ	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	123
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	124
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	128
Приложение А. Акт внедрения в учебный процесс Института фармации им. А.П. Нелюбина.....	154
Приложение Б. Акт внедрения в ООО «Центр Фармацевтической Аналитики»	155
Приложение В. Акт внедрения в ООО «Лаборатория Фармацевтических Исследований».....	156
Приложение Г. Масс-спектры дериватизованных производных НЕР-1	157
Приложение Д. Расчет m/z заряженных дериватизованных производных НЕР-1	169
Приложение Е. Полученные концентрации после двукратного введения НЕР-1 здоровым добровольцам	172

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Пептидные лекарственные средства – класс фармацевтических соединений, состоящих из ряда ковалентно связанных аминокислот, обычно организованных в виде линейного полимера. В последние десятилетия наблюдается устойчивый рост интереса к лекарственным средствам пептидной природы, что обусловлено их высокой специфичностью, биосовместимостью и относительно низкой токсичностью по сравнению с низкомолекулярными синтетическими веществами. Достижения в области биотехнологии, производства рекомбинантных биологических препаратов и новых синтетических и аналитических технологий значительно ускорили процесс разработки пептидных препаратов.

Число одобренных к применению пептидных препаратов растет во всём мире. С 2016 по 2025 год в управлении по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (англ. Food and Drug Administration, FDA) было одобрено 466 лекарственных средств, среди них 34 пептидных препарата. В мире 150 пептидов в данный момент проходит различные клинические исследования, и еще 400-600 – доклинические. В Российской Федерации на данный момент зарегистрировано более 50 лекарственных средств пептидной природы синтетического или природного происхождения с известной первичной структурой. Для проведения доклинических и клинических исследований требуется разработка высокочувствительных методик определения пептидов в биологических образцах.

Степень разработанности темы исследования

Теоретические и практические основы анализа пептидных соединений заложены в трудах ученых в области биоаналитической химии и хроматографии. В настоящее время общепризнанным подходом к решению задач фармакокинетики

является использование высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Однако исследования касались пептидных структур, отличающихся от объекта настоящего исследования. Инновационное лекарственное средство пептидной природы, аналог фрагмента белка эзрина человека-1 (англ. Human Ezrin Peptide-1, НЕР-1), зарегистрированное в РФ под торговым наименованием ГЕПОН® обладает уникальными аминокислотной последовательностью и физико-химическими свойствами, что не позволяет экстраполировать на него существующие методики без дополнительной экспериментальной проработки. Выраженная гидрофильность НЕР-1 накладывает существенные ограничения на пробоподготовку образцов, в частности, использование классической экстракции для НЕР-1 невозможно, а осаждение белков не позволяет достигнуть достаточного извлечения из биологической матрицы, если не будут применяться различные модификации. Для разделения гидрофильных соединений хроматографическими методами используются два основных режима: режим гидрофильной хроматографии (англ. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC), режим обращённо-фазовой (ОФ) ВЭЖХ с предварительной дериватизацией. В доступной литературе не описаны методики определения НЕР-1 в биологических образцах для целей проведения клинических исследований.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования является разработка методики количественного определения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в биологических образцах.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ литературных данных о физико-химических свойствах пептида НЕР-1, теоретически обосновать и экспериментально подобрать

оптимальные условия пробоподготовки, обеспечивающие эффективное извлечение вещества из биологических матриц.

2. Разработать методику количественного определения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС, включая выбор внутреннего стандарта и параметров масс-спектрометрического детектирования.

3. Провести валидацию разработанной методики в соответствии с современными требованиями, оценив ее по следующим параметрам: селективность, специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, эффект матрицы, степень извлечения и стабильность аналита в условиях хранения и анализа.

4. Выбрать биологическую матрицу для последующей апробации методики на основании оценки распределения пептида НЕР-1 между плазмой и форменными элементами крови человека.

5. Апробировать разработанную и валидированную методику в ходе экспериментального фармакокинетического (ФК) исследования при введении препарата здоровым добровольцам.

Научная новизна

Количественного определен терапевтический пептид треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат в плазме крови человека. В отличие от типичного для пептидов использования твёрдофазной экстракции (ТФЭ) при пробоподготовке, были экспериментально обоснованы условия последовательных этапов осаждения белков раствором пропионовой кислоты в метаноле, жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), дериватизации, упаривания и перерастворения, обеспечивающих высокую чувствительность и селективность определения НЕР-1 и демонстрирующих экономическую целесообразность. В данной методике

расширена область применения пропионового ангидрида в качестве дериватирующего агента для терапевтических пептидов, который ранее использовался для дериватизации гистонов в протеомике с целью улучшения удерживания в ОФ-ВЭЖХ и детектирования МС/МС.

С помощью разработанной методики изучены особенности распределения пептида НЕР-1 в цельной крови человека и связывание с белками плазмы крови; определена концентрация пептида НЕР-1 в плазме крови в рамках пилотного исследования фармакокинетики при подкожном и внутримышечном введении здоровым добровольцам.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационной работы определяется вкладом в развитие методологии анализа пептидных соединений в биообразцах. В ходе исследования выявлены и систематизированы факторы, влияющие на улучшение аналитических характеристик пептида НЕР-1 при определении в биологических матрицах, что расширяет теоретические представления о хроматографическом разделении пептидов в градиентном режиме элюирования и роли дериватирующего агента в эффективности фрагментации после ионизации целевого соединения. Выявленная взаимосвязь между структурой пептида и его хроматографическими параметрами может служить основой для прогнозирования условий анализа других соединений данной группы.

Практическая значимость работы заключается в создании и валидации методики количественного определения пептида НЕР-1 в биологических образцах, пригодной для использования в лабораториях, осуществляющих доклинические и клинические исследования фармакокинетики. Разработанная методика обеспечивает чувствительность на уровне 5 нг/мл, точность и воспроизводимость результатов. На её основе составлены методические рекомендации по анализу и правила обращения с пробами, что позволяет непосредственно применять её в

практике научно-исследовательских институтов и центров доклинических исследований.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили принципы системного анализа, современные подходы к разработке и валидации биоаналитических методов, регулируемые «Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС)» (утверждены решением Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) № 85 от 03.11.2016 г) и гармонизированным руководством ICH M10 «Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis» (от 25.07.2022 г.).

После изучения научной литературы, ориентированной на количественное определение терапевтических пептидных препаратов в биообразцах, для исследования в качестве базового был выбран метод ВЭЖХ-МС/МС.

Положения, выносимые на защиту

1. Протокол пробоподготовки методики количественного определения инновационного пептида НЕР-1 в плазме крови человека.

2. Результаты разработки условий хроматографического разделения и детектирования тетрапропионилированного пептида НЕР-1 для анализа методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией.

3. Результаты валидации методики количественного определения инновационного пептида НЕР-1 в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС по параметрам: селективность, специфичность, правильность и прецизионность, эффект матрицы, линейность, степень извлечения, нижний предел количественного определения (НПКО, англ. Lower Limit of Quantification, LLOQ), стабильность.

4. Результаты апробации разработанной методики в исследованиях по определению распределения НЕР-1 в цельной крови человека и связывания НЕР-1 с белками плазмы крови.

5. Результаты апробации методики в рамках пилотного исследования фармакокинетики НЕР-1 при подкожном и внутримышечном введении здоровым добровольцам.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют пункту 4 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Степень достоверности и апробация результатов

Объективность полученных результатов подтверждается проведением исследований на современном сертифицированном поверенном оборудовании с использованием аттестованных стандартных образцов. Экспериментальные данные получены в достаточном объеме, обработаны с применением методов статистического анализа. Достоверность разработанной методики подтверждена валидацией, регулируемой «Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» и гармонизированным руководством ICH M10, что гарантирует надежность и воспроизводимость результатов.

Материалы проведенных исследований по теме диссертации были представлены и обсуждены на VIII Международной научной конференции, организованной Советом по науке при Фонде Нурсултана Назарбаева и Южно-Казахстанской медицинской академией (Республика Казахстан, 9-10 декабря 2021 года); II Международной Российско-Сербской Конференции молодых ученых (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, 26 апреля 2024 года).

Апробация диссертационной работы состоялась 29 мая 2026 г. на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Протокол № 10 от 29 мая 2026 года.

Личный вклад автора

Автор внёс основной вклад при разработке концепции определения НЕР-1 методом ВЭЖХ-МС/МС. Лично автором обоснованы подходы к выбору внутреннего стандарта – структурного аналога исследуемого пептида – и параметров хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования для инновационного пептида НЕР-1 и внутреннего стандарта. Экспериментальные исследования по разработке и оптимизации методики, включая многостадийный этап пробоподготовки с использованием осаждения образца плазмы крови раствором пропионовой кислоты в метаноле, с последующей ЖЖЭ, упариванием в токе азота, и дериватизацией пропионовым ангидридом, выполнены автором самостоятельно. Автор лично провел валидацию методики, соответствующей «Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» и гармонизированному руководству ICH M10, обработал и интерпретировал полученные результаты. Автор лично спланировал и провёл эксперимент по определению распределения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в цельной крови человека, а также определил связывание с белками плазмы крови. Подготовка основных публикаций и апробация результатов на научных мероприятиях проведены автором лично.

Внедрение результатов диссертационного исследования в практику

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации внедрены в учебный процесс Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Методы фармакопейного анализа», читаемой студентам по направлениям подготовки 33.05.01 Фармация (акт № 927 от 23.04.2026, Приложение А), и внедрены в научно-практическую деятельность ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (акт б/н от 15.04.2026, Приложение Б) и ООО «Лаборатория Фармацевтических Исследований» (акт б/н от 21.04.2026, Приложение В).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и является фрагментом исследований по теме «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (№ государственной регистрации: 01.2.011.68237).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 5 научных работ, в том числе 3 научные статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, Chemical Abstracts, 2 публикации в сборниках материалов международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа структурно включает введение, обзор литературы, четыре главы экспериментальной части, общие выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы и шесть приложений. В списке литературы перечислены 214 источников, 203 из которых – зарубежные. Текст диссертации изложен на 173 страницах компьютерного текста, содержит 46 рисунков (из них 26 в приложении), 38 таблиц (из них 9 в приложениях). В приложениях вынесены акты внедрения научных результатов в учебный процесс и в работу предприятий, а также масс-спектры дериватизованных производных НЕР-1, расчёты для них, полученные концентрации после многократного введения здоровым добровольцам НЕР-1.

ГЛАВА 1. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТРИЦАХ (обзор литературы)

Пептидные лекарственные средства в последние десятилетия заняли значимое место в современной терапии, демонстрируя высокую эффективность при лечении широкого спектра социально значимых заболеваний, включая сахарный диабет, рассеянный склероз, некоторые аутоиммунные, вирусные и онкологические заболевания [1, 2]. Уникальность пептидов как терапевтических агентов обусловлена их высокой специфичностью, биологической активностью, и низкой токсичностью [3]. Начиная с открытия инсулина в 1921 году, область пептидной терапии прошла долгий путь развития, и к настоящему моменту на мировом рынке зарегистрировано более 100 пептидных препаратов, и ещё 150 находятся на стадии клинические исследования [4]. В Российской Федерации на данный момент зарегистрировано около 60 терапевтических пептидов с известной первичной структурой синтетического или природного происхождения, из них 13 отечественной разработки [5].

Процесс стремительного развития биотехнологии и появление инновационных пептидных соединений, в том числе с модифицированными структурами, предъявляют качественно новые требования к методам их анализа [6, 7, 8]. Понимание механизмов действия, оценка безопасности и эффективности новых препаратов невозможны без детального изучения их фармакокинетики и метаболизма, что, в свою очередь, требует наличия точных и воспроизводимых методов определения пептидных лекарственных средств в различных биологических тканях [6].

Традиционно для биоанализа исследуемых пептидов и белков использовали иммунные методы, такие как иммуноферментный анализ (ELISA), благодаря их высокой чувствительности и производительности [9]. Данные методы обладают рядом существенных ограничений, включая перекрестную реактивность, длительную и трудоемкую разработку антител, высокую вариабельность

результатов и невозможность одновременного детектирования структурно близких метаболитов или продуктов деградации [10, 11].

В последние годы наблюдается возрастающая тенденция использования метода ВЭЖХ-МС/МС [12, 13]. Благодаря высокой селективности, чувствительности и способности предоставлять структурную информацию, ВЭЖХ-МС/МС стала «золотым стандартом» для количественного анализа пептидов в биологических образцах [14, 15]. Этот метод позволяет как определять концентрацию исходного пептида, так и идентифицировать его метаболиты и продукты распада. Получаемая информация полезна для фармакокинетических исследований [16, 17].

Тем не менее, анализ пептидов методом ВЭЖХ-МС/МС сопряжен с рядом особенностей, обусловленных их физико-химическими свойствами. К ним относятся: низкая стабильность *in vivo* и в биологических образцах, адсорбция на лабораторной посуде; высокая гидрофильность, выраженные матричные эффекты, а также способность образовывать множественные зарядовые состояния, усложняющие интерпретацию масс-спектров в режиме мониторинга множественных реакций (англ. Multiple reaction monitoring, MRM) [18, 19]. Преодоление этих трудностей требует тщательной оптимизации всех этапов анализа от пробоподготовки, до хроматографического разделения и выбора условий масс-спектрометрического (МС) детектирования, обеспечивающих максимальную чувствительность и селективность [20].

1.1. Определение, классификация и общая характеристика пептидных терапевтических средств

1.1.1. Классификация и физико-химические свойства пептидов

Пептиды представляют собой уникальный класс терапевтических молекул, занимающих промежуточное положение между малыми молекулами и высокомолекулярными белками [21, 22]. Отсутствие единого общепринятого

определения приводит к разночтениям в нормативных документах. Согласно руководству FDA пептиды – любой α -аминокислотный полимер, состоящий из 40 или менее аминокислот [23], а согласно рекомендациям Международного союза теоретической и прикладной химии и Международного союза биохимии (IUPAC-IUB), пептид как химическое соединение состоит из 2-50 остатков аминокислот [24]. Европейское агентство по лекарственным средствам вместо того, чтобы приводить размер пептидов, предлагает классифицировать пептиды как малые молекулы, если они синтезированы химическим путем, и как биологические объекты, если они извлекаются из природных источников или производятся рекомбинантным методом [25].

По строению пептиды достаточно условно подразделяют на олигопептиды и полипептиды. Границы этого деления также вариабельны: олигопептидами могут считаться молекулы, содержащие до 10 [26], 2-20 [27] или даже до 50 [28] аминокислотных остатков. Полипептидной чаще всего называют последовательность, состоящую более чем из 20 аминокислотных остатков [29].

Также трудно провести четкую границу между понятиями «полипептид» и «белок»; в качестве ориентира обычно используется молекулярная масса – около 5000 Да [30] или 10000 Да [31]. Также учитывается структурно-функциональный критерий, согласно которому белки характеризуются наличием устойчивой трехмерной структуры, стабилизированной множеством нековалентных взаимодействий и часто ковалентными дисульфидными связями, что и обуславливает сродство к мишеням, в то время как полипептиды обладают возможностью образовывать неустойчивые двумерные структуры [32, 33].

Большой по сравнению с малыми молекулами размер и конформационная гибкость позволяют пептидам эффективно модулировать белок-белковые взаимодействия, которые занимают обширные поверхности контакта (1500–3000 Å), недоступные для низкомолекулярных соединений [34, 35]. Благодаря этому пептиды способны с высокой аффинностью и селективностью связываться как с мембранными, так и с внутриклеточными мишенями, превосходя малые молекулы по специфичности, а антитела – по способности проникать через клеточную

мембрану [36, 37]. При этом пептидные лекарственные средства обладают более низкой иммуногенностью и меньшей стоимостью производства по сравнению с белковыми препаратами, что обуславливает их высокую терапевтическую ценность [38, 39, 40, 41].

Многообразие пептидных соединений, используемых в медицине, требует их систематизации по ряду признаков, имеющих значение для понимания фармакокинетики и выбора стратегии биоаналитического исследования. Наиболее значимыми критериями классификации являются происхождение [42, 43], характер структурных модификаций [3, 4, 19, 44], длина пептидной цепи и фармакологическое действие [45, 46, 47].

По происхождению пептидные лекарственные средства подразделяют на:

- природные пептиды – соединения, идентичные или близкие по структуре к веществам, продуцируемым организмом человека;
- синтетические пептиды – соединения, созданные путем химического синтеза и не имеющие прямых природных аналогов.

По наличию модификаций пептидной цепи выделяют:

- немодифицированные пептиды;
- модифицированные пептиды.

К числу наиболее распространенных модификаций относятся:

6. введение D-аминокислот вместо L-форм;
7. циклизация пептидной цепи;
8. пегилирование;
9. галогенирование боковых цепей;
10. защита концевых групп (N-ацетилирование, C-амидирование);
11. слияние с Fc-фрагментом иммуноглобулина или альбумином;
12. добавление остатка жирных кислот.

По фармакологическому действию пептидные препараты охватывают широкий спектр терапевтических областей. Среди наиболее значимых групп следует отметить:

- противоопухолевые пептиды (ингибиторы ангиогенеза, пептидные аналоги соматостатина);
- пептиды, регулирующие метаболизм (аналоги глюкагоноподобного пептида-1 для терапии сахарного диабета 2 типа);
- офтальмологические пептиды;
- противовирусные пептиды (ингибиторы слияния, аналоги энфувиртида);
- пептиды, регулирующие функцию сердечно-сосудистой системы (натрийуретические пептиды, брадикинин);
- нейротропные пептиды для терапии нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, Паркинсона);
- пептиды для гормональной терапии (аналоги гонадотропин-рилизинг-гормона, окситоцин, вазопрессин).

Таким образом, пептиды представляют собой гетерогенный класс соединений, чьи уникальные физико-химические свойства, такие как молекулярная масса, размер, заряд, гидрофобность, стабильность *in vivo* и в биологических образцах, наличие модификаций напрямую влияют на подход к их определению. Классификация пептида является основой для разработки эффективной и надежной методики его количественного анализа в биологических образцах.

1.1.2. Особенности фармакокинетики пептидов

Понимание фармакокинетических свойств пептидных терапевтических препаратов определяет направление разработки биоаналитических методик, поскольку они влияют на диапазон ожидаемых концентраций, параметры отбора проб и требования к чувствительности методики. Фармакокинетика пептидов отличается как от низкомолекулярных соединений, так и от крупных белковых терапевтических препаратов [48].

Вследствие высокой гидрофильности и большой молекулярной массы, обычно пептиды обладают низкой способностью к пассивной диффузии через

липидные мембраны [49]. Из-за этих особенностей пероральная биодоступность большинства немодифицированных пептидов составляет менее 1% [49, 50].

Тем не менее, существуют проникающие в клетку пептиды (англ. Cell-Penetrating Peptides, CPP), способные пересекать фосфолипидный слой мембраны что стало основой для значительных разработок в области биотерапевтических пептидов. Например, гидрофильные и катионные характеристики антимикробных пептидов позволили им проникать через клеточные мембраны для уничтожения микробов и инфекций путем модуляции иммунного ответа [51]. CPP также используют для доставки непроницаемых для мембран грузов – малых молекул, пептидов, белков или антител путем конъюгации [52]

Другая важная особенность – малые периоды полувыведения природных пептидов. Эндогенные пептиды характеризуются чрезвычайно короткими периодами полувыведения, что ограничивает их терапевтическое применение [44]. Как отмечают исследователи, природные нейропептиды (холецистокинин, тиреотропин-рилизинг-гормон, фрагмент нейротензина 8-13) имеют период полувыведения ($t_{1/2}$) всего 0,5–5,3 минут, что затрудняет эффективность при применении в клинической практике без специальных модификаций [53]. Однако, благодаря различным модификациям удаётся создавать синтетические терапевтические пептидные препараты с периодом полувыведения, достаточным для введения один раз в неделю, например, семаглутид и тирзепатид [54, 55].

Немодифицированные пептидные препараты обычно демонстрируют низкую или умеренную связываемость с белками плазмы [56]. Для пролонгирования действия терапевтических пептидов часто применяют модификации, способствующие удержанию в кровотоке за счет связывания с белками плазмы крови. Лиганды альбумина, такие как жирные кислоты – модификаторы, которые могут быть использованы для улучшения фармакокинетических профилей и усиления нековалентного связывания пептидов с альбумином [56].

Для большинства пептидных препаратов основным способом введения остается парентеральный. Внутривенное, подкожное, внутримышечное введение

препарата обеспечивает большую по сравнению с пероральным приёмом биодоступность и быструю скорость поступления препарата в системный кровоток [57].

Как альтернативные пути введения изучаются пероральный, интраназальный, трансдермальный и ингаляционный, однако их эффективность существенно варьирует в зависимости от индивидуальных свойств молекулы [58].

Объем распределения пептидов обычно не превышает объема внеклеточной жидкости, что связано с их ограниченной способностью проникать через клеточные мембраны [49].

Распределение определяется физическими и химическими характеристиками пептида, такими как молекулярная масса, состав и конформация молекулы [59, 60]. Основные свойства пептида, влияющие на распределение: липофильность, заряд пептида и его аффинность к мембранам, а также связывание с эндогенными белками. [61]. Липофильность способствует проникновению через клеточные мембраны [62]. Пептиды с большим числом кислотных центров демонстрируют более сильное связывание с положительно заряженными участками молекулы альбумина [63]. Сродство пептидов к мембране, выявленное с помощью хроматографии на иммобилизованной искусственной мембране, сильнее для положительно заряженных пептидов, например, содержащих аргинин [61]. Связывание с липопротеинами или белками плазмы крови снижает концентрацию активного вещества [57].

В отличие от низкомолекулярных лекарственных средств, метаболизм которых преимущественно осуществляется ферментами цитохрома P450, пептиды подвергаются протеолитическому расщеплению под действием многочисленных протеаз и пептидаз, которые присутствуют во всех биологических жидкостях и тканях: в просвете кишечника, в стенке кишечника, в печени, в крови и в тканях-мишенях [16, 64]. В то же время модифицированные пептиды могут иметь сложные пути метаболизма и выведения, которые могут соответствовать путям метаболизма как природных пептидов, так и малых молекул [16].

Основными путями элиминации пептидов являются протеолитическая деградация и почечная экскреция [57, 65]. Протеолитическая деградация может происходить в плазме крови, печени, почках и других тканях. Расщепление часто идет по множественным и трудно предсказуемым путям, что создает сложности при идентификации метаболитов. Почечная экскреция характерна для пептидов с молекулярной массой менее 10 кДа, которые эффективно фильтруются в почечных клубочках. После фильтрации они могут подвергаться гидролизу в щеточной кайме проксимальных канальцев с последующей реабсорбцией аминокислот, что делает почки ключевым органом элиминации для многих пептидных терапевтических средств [57].

Значимость почечного пути элиминации также можно заметить из клинической информации включенных в список одобренных препаратов FDA, согласно которой данные о влиянии почечной недостаточности на фармакокинетику пептидов присутствует в 57% случаев, тогда как данные о печеночной недостаточности приведены в 38% [66].

Одним из аспектов доклинических исследований пептидов являются межвидовые различия в фармакокинетике. Активность протеолитических ферментов, экспрессия транспортеров и связывание с белками плазмы значительно варьируют между видами животных и человеком [48]. Исследования показывают, что фармакокинетические параметры пептидов хорошо описываются аллометрическими соотношениями между видами: для клиренса находятся в диапазоне 0,58–0,88 (среднее геометрическое: 0,72), для объема распределения – в диапазоне 0,89–1,1 (среднее геометрическое: 0,98) [48]. Соответственно период полувыведения пептидов может различаться для крыс, кроликов и людей, что необходимо учитывать при экстраполяции данных доклинических исследований.

Несмотря на то, что в отличие от низкомолекулярных препаратов пептиды редко являются субстратами или ингибиторами ферментов цитохрома P450, что снижает риск фармакокинетических лекарственных взаимодействий на уровне метаболизма [16], возможны фармакодинамические взаимодействия, опосредованные механизмом действия.

Замедление перистальтики желудка под действием аналогов глюкагоноподобного пептида-1 может влиять на абсорбцию одновременно принимаемых пероральных препаратов [67]. При приеме тирзепатида и семаглутида описаны клинически значимые изменения экспозиции для различных лекарственных препаратов, включая оральные контрацептивы, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, статины, варфарин, ацетаминофен и дигоксин [67]. Согласно анализу инструкций по применению одобренных FDA пептидных препаратов, информация о лекарственных взаимодействиях присутствует для 49% позиций [66].

Таким образом, фармакокинетика пептидных лекарственных средств характеризуется низкой пероральной биодоступностью, ограниченным объемом распределения, быстрым метаболизмом и преимущественно почечной элиминацией. Модификации пептидной структуры позволяют существенно улучшить фармакокинетические свойства, пролонгируя период полувыведения. Межвидовые различия в активности протеаз и связывании с белками плазмы требуют внимательности при экстраполяции доклинических данных на человека. Понимание фармакокинетических особенностей определяет требования к разрабатываемой методике количественного определения, для которой необходимо использовать селективный и высокочувствительный метод.

1.1.3. Проблемы стабильности пептидов в биообразцах

Как было показано в разделе 1.1.2, протеолитическая деградация является ключевым фактором, ограничивающим время жизни пептидов *in vivo*. Однако не менее значимой проблемой является продолжающаяся активность протеаз после отбора биологического образца. Стабильность после отбора проб и пробоподготовка существенно влияют на точность количественного определения пептидов [20].

После отбора биологического образца, такого как кровь, моча или ткань, протеазы и пептидазы, присутствующие в биологических жидкостях, продолжают

расщеплять пептиды [68]. Более того, разрушение клеточных мембран при заборе крови или гомогенизации тканей высвобождает дополнительные внутриклеточные протеазы, усиливая протеолитическую активность [69]. Скорость образования пептидных фрагментов в биологических образцах существенно зависит от обработки образца [68]. Особенно чувствительны к протеолизу короткие линейные пептиды [70]. Так же, как *in vivo*, протеолиз в биологических образцах многовариантен и трудно предсказуем, что создает дополнительные сложности при идентификации образующихся фрагментов молекулы [71].

Ещё одним фактором, приводящим к потере пептидов, является их адсорбция на поверхностях лабораторной посуды – пробирок, наконечников для пипеток, виал для хроматографа. Исследования показывают, что при типичных экспериментальных концентрациях до 90% пептидов может теряться из раствора вследствие быстрой адсорбции на стенках стеклянных и пластиковых контейнеров [72]. Наиболее выражена эта проблема для катионных пептидов, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными участками на поверхностях стекла и некоторых видов пластика [72].

Адсорбция зависит от ряда факторов: материала пробирки, заряда пептида, гидрофобности пептида, концентрации пептида. Известно, что полипропилен обычно характеризуется менее выраженной адсорбцией, чем стекло или полистирол, катионные пептиды адсорбируются сильнее, чем анионные [72]. Гидрофобные участки могут взаимодействовать с гидрофобными поверхностями [73]. При низких концентрациях относительные потери вещества будут выше [74].

Помимо ферментативной деградации и адсорбции, пептиды подвержены различным типам химической деградации, таким как окисление, дезаминирование, гидролиз пептидных связей и изомеризация, скорость которых может возрасти в условиях хранения и обработки образцов [75, 76].

Окисление наиболее характерно для пептидов, содержащих остатки метионина, цистеина, триптофана, тирозина и гистидина [77]. Остатки аспарагина и глутамина могут дезамидироваться до аспарагиновой и глутаминовой кислот

[77]. Эти же остатки подвержены гидролизу, а аспарагиновая кислота способна к изомеризации с образованием β -аспартильных связей [77].

Из-за многообразия вариантов деградации пептидов следует уделять особенное внимание условиям хранения биологических образцов. Для определения температуры и длительности хранения необходимо проводить исследования стабильности в различных условиях, согласно рекомендациям для регулирующих органов, таких как Европейское агентство лекарственных средств (англ. European Medicines Agency, EMA), FDA, и ЕАЭС [78, 79, 80].

Выбор консервантов и антикоагулянтов при заборе крови также влияет на стабильность пептидов. Добавление этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) может улучшать стабильность пептидов за счет способности ЭДТА образовывать комплексы с ионами металлов, необходимых для активности металлопротеаз [81, 82]. Цитрат натрия оказывает частичное ингибирующее действие через обратимое хелатирование кальция [83, 84]. Гепарин, в свою очередь, связывается с плазменным белком антитромбином и усиливает его ингибирующую активность в отношении нескольких сериновых протеаз системы свертывания крови [85]. Однако ни один из антикоагулянтов не обеспечивает полной защиты от протеолиза; наиболее эффективным решением является индивидуальный подбор более подходящего антикоагулянта [83].

При хранении в растворе следует учитывать pH. Щелочные условия способствуют дезамидированию и гидролизу [77]. Для аспарагин-, глутамин-, цистеин-, метионин-, триптофан-содержащих кислот производитель Sigma-Aldrich рекомендует слабокислый диапазон для повышения стабильности [86].

Следовательно, преаналитический этап представляет собой стадию, на которой пептиды подвергаются воздействиям, способным исказить результаты количественного определения. Дегградация, адсорбция на поверхностях и химическая нестабильность – главные факторы снижения концентрации исследуемого вещества при анализе. Использование низкоадсорбирующих поверхностей, подбор пробирок и антикоагулянтов, при необходимости использование ингибиторов протеаз и рациональный температурный режим

способствуют улучшению качества анализа. Оценка стабильности в различных условиях является обязательным требованием валидации, согласно различным руководствам, она должна предшествовать основным фармакокинетическим исследованиям.

1.2. Современные методы пробоподготовки биологических образцов для анализа пептидов

Подбор оптимальных условий пробоподготовки способствует увеличению достоверности и воспроизводимости результатов количественного определения пептидов. Оптимизация и упрощение методов обработки проб играют такую же важную роль в прогрессе аналитических технологий, как и совершенствование масс-спектрометрического оборудования [87]. Учитывая характерные особенности пептидов, выбор подходящего метода пробоподготовки позволяет избежать множества сложностей для последующего анализа.

Пробоподготовка биологических образцов для определения пептидов проводится для удаления белков и других молекул, которые могут интерферировать с аналитом. Эта процедура повышает чувствительность, селективность и специфичность, и, кроме того, способствует сохранению эксплуатационных свойств оборудования ВЭЖХ-МС/МС [88, 89, 90]. При необходимости пробоподготовка позволяет концентрировать целевой аналит, а также перевести его в подходящую для анализа форму [91, 92].

Основными методами пробоподготовки традиционно считаются осаждение белков, ЖЖЭ, ТФЭ [93]. Для пептидов также применимы методы дериватизации для улучшения аналитических свойств, таких как повышение липофильности для хроматографического разделения в ОФ режиме и улучшение ионизационной эффективности при анализе МС [91, 92]

Наиболее простым и быстрым методом пробоподготовки считается осаждение белков. Принцип метода заключается в добавлении к биологическому образцу органического растворителя или водного раствора кислоты, что приводит

к денатурации и осаждению белков плазмы, которые затем удаляются центрифугированием [94].

ЖЖЭ основана на распределении пептида между двумя несмешивающимися фазами – водной и органической. Обычно предполагается переход исследуемого вещества из водной в органическую фазу, однако также ЖЖЭ может быть использована для очистки водного слоя от липофильных составляющих биологической матрицы [93, 95]

ТФЭ является одним из распространенных методов пробоподготовки для анализа пептидов в биологических образцах [94]. Метод основан на селективном удерживании пептидов на сорбенте с последующим элюированием подходящим растворителем [96].

Для большинства рутинных биоаналитических задач оптимальным выбором является осаждение белков либо ТФЭ [97].

Соответственно, выбор метода пробоподготовки должен быть подобран согласно физико-химическим свойствам целевого пептида, ожидаемому диапазону концентраций и требованиям к чувствительности анализа. В Таблице 1.1 сравнение преимуществ и недостатков различных методов пробоподготовки для терапевтических пептидов:

Таблица 1.1 – Характеристики методов пробоподготовки терапевтических пептидов

Метод	Преимущества	Недостатки	Ссылки
Осаждение белков органическим растворителем	Легкость использования, экономическая целесообразность	Сниженная селективность очистки, более выраженный эффект матрицы, возможность низкой растворимости аналита, возможность соосаждения	[98, 99]
ЖЖЭ	Переход в липофильную фазу модифицированных гидрофильных пептидов	Низкая растворимость немодифицированных пептидов в липофильной фазе	[98, 100]

Продолжение Таблицы 1.1

ТФЭ	Умеренная и оптимизированная очистка, широкий выбор различных сорбентов, возможность использования автоматизированной ТФЭ, меньшее влияние эффекта матрицы	Меньшее разнообразие для гидрофильных соединений, требуются дополнительные материалы и оборудование, значительная стоимость расходных материалов, сильная вариация извлечения из биообразцов в зависимости от структуры пептида, особенно для выражено липофильных или гидрофильных	[97, 98, 99]
-----	--	---	--------------

Также возможно комбинировать различные способы пробоподготовки, сочетая преимущества и уменьшая недостатки отдельных способов. Например, совместное применение осаждения белков и ТФЭ позволяет минимизировать матричный эффект и повысить чувствительность, правильность и прецизионность методики, а в случае использования автоматизированной ТФЭ предварительная очистка биообразца осаждением белков предотвращает насыщение катриджа ТФЭ в системе [101, 102].

1.2.1. Преодоление недостатков пептидных препаратов при помощи модификации и дериватизации

Существуют различные подходы и стратегии для преодоления недостатков пептидов и расширения области их применения [37]. Прежде всего, возможно использовать структурные модификации для улучшения физико-химических и фармакологических свойств. Простые модификации приводят к стабилизации пептидов в их биоактивной конформации, увеличению эффективности, гидродинамического радиуса, снижению клиренса, а также позволяют добиться большей проницаемости через клеточные мембраны и селективности к мишени [21,

30, 103, 104, 105]. Примеры некоторых модификаций для улучшения фармакокинетических свойств приведены в Таблица 1.2 – Виды модификаций пептидных молекул представлены в Таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Виды модификаций пептидных молекул

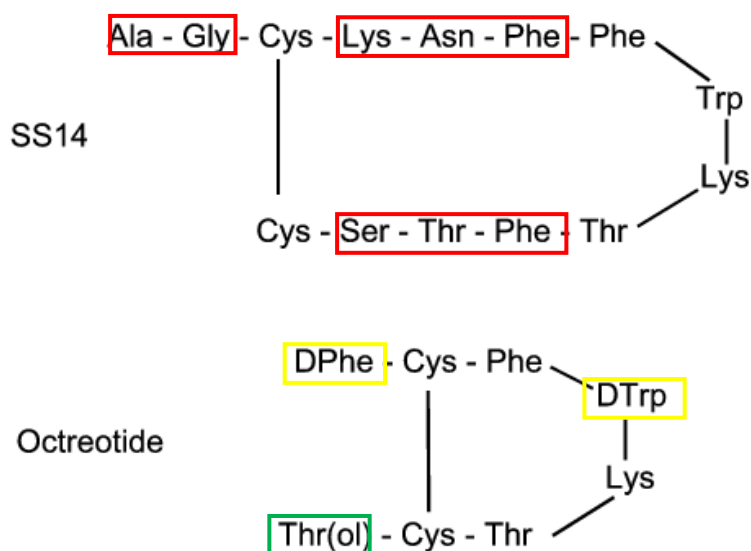
Вид модификации	Получаемый эффект	Примеры	Ссылки
Замена элементов пептидной последовательности	↑*растворимости, ↓*склонности к агрегации	Прамлинтид	[106]
Сокращение пептидной последовательности	↑стабильности <i>in vivo</i>	Терипаратид	[107]
Использование энантиомеров природных аминокислот	↑стабильности <i>in vivo</i> , селективности; ↓эффективности	Октреотид	[30, 37]
Циклизация через дисульфидный мостик S-S	↑селективности, ↓гибкости основы, иммуногенности	C-optP7	[37, 103, 108]
Стабилизация дисульфидного мостика различными вставками	↑стабильности <i>in vivo</i> , ↓гибкости основы	Взаимодействие ACX7CG с 3,30-бис(сульфонато)-4,40-бис(хлороацетамидо)азобенzenом	[30, 109]
C-концевое амидирование	↑стабильности <i>in vivo</i>	Энфувиртид, октреотид	[37, 103]
N-концевое ацетилирование	↑стабильности <i>in vivo</i>	Энфувиртид	[37, 103]
Конъюгация с крупными биосовместимыми полимерами	↑ растворимости в воде, ↑стабильности <i>in vivo</i>	Интерферон-α 2а	[103]
Конъюгация с жирными кислотами	↑стабильности <i>in vivo</i> , ↓иммуногенности	Лираглутид, семаглутид	[110]
Конъюгация с CPP	↑селективности, проницаемости, стабильности <i>in vivo</i>	Ac-LTFDHYWKQLTS-miniPEG-K(CPP9)	[111]

Продолжение Таблицы 1.2

Конъюгация пептидов дендримерами	с ↑ растворимости в воде, абсорбционных свойств, стабильности <i>in vivo</i> , специфичности	RGD–PAMAM	[113, 114]
Примечание: *↑ – повышение; ↓ – понижение			

Влияние структурных модификаций на стабильность *in vivo* можно рассмотреть на примере пептидных гормонов.

Соматостатин – это гормон, оказывающий нейроэндокринное ингибирующее действие в различных системах, который существует в двух биологически активных формах: преобладающая, но функционально менее активная форма, состоит из 14 аминокислот, а более крупная и активная молекулярная форма – из 28 аминокислот. Клиническое применение гормона ограничено очень коротким периодом полувыведения, составляющим 1,5-3 минуты, что затрудняет анализ его физиологической активности. Аналог соматостатина, октреотид, представляет собой укороченную пептидную последовательность соматостатина с С-концевым амидированием и заменой на два D-энантиомера природных аминокислот: D-Phe на N-конце и D-Thr в положении 8. Этот пептид более устойчив к деградации, его $t_{1/2}$ составляет приблизительно от 1 до 5 часов, что в 30 раз больше, чем у соматостатина [114, 115]. Первичные структуры соматостатина и его аналога октреотида представлены на Рисунке 1.1.



Примечание: красным цветом обозначены удаленные из пептидной последовательности аминокислотные остатки; зеленым цветом выделен модифицированный участок с С-концевым амидированием; жёлтым – модификация с D-энантиомерами природных аминокислот

Рисунок 1.1 – Структурные формулы соматостатина и его аналога октреотида

В работе Yuan et al [92] предложена и экспериментально обоснована стратегия селективной дериватизации пептидов для повышения чувствительности количественного анализа терапевтических белков методом ВЭЖХ-МС/МС в сыворотке крови. Суть подхода заключается в избирательной модификации аминокислотных остатков в целевом суррогатном пептиде моноклонального антитела BMS-986012 с помощью малонового диальдегида. Дериватизация приводит к снижению гидрофильности и основности пептидов – фрагментов целевого белка – что позволяет значительно эффективнее отделить его от фоновых компонентов на стадии твердофазной экстракции и ОФ хроматографии. В результате было достигнуто примерно 5-кратное увеличение чувствительности анализа и снижения фонового шума. Метод продемонстрировал высокую точность и воспроизводимость и может быть адаптирован для других пептидов, содержащих аргинин, в случае применения соответствующих дериватизирующих реагентов.

Таким образом модификация и дериватизация – значимые инструменты, которые могут быть использованы для улучшения как фармакологических, так и аналитических характеристик.

1.3. Определение распределения вещества в цельной крови

Понимание распределения лекарственного вещества между плазмой и форменными элементами крови позволяет выбрать оптимальную матрицу для последующих исследований фармакокинетики. Обычно фармакокинетические исследования основываются на измерении концентраций в плазме, что предполагает равномерное распределение вещества между плазмой и эритроцитарной массой. Однако для многих соединений, включая пептиды, что способны связываться или даже проникать в эритроциты, такие как СРР, это допущение не выполняется, что впоследствии может существенно влиять на прогнозирование дозировок исследуемого препарата [116, 117].

Для оценки распределения вещества в крови используют коэффициент распределения «кровь/плазма» (англ. blood-to-plasma ratio, R_b), который рассчитывается как отношение равновесной концентрации вещества в цельной крови к его концентрации в плазме [117].

Для пептидов, как правило, характерны значения R_b менее 1, что связано с их ограниченной способностью проникать через клеточные мембраны [49]. Однако существуют исключения – некоторые СРР или пептиды, взаимодействующие со специфическими компонентами эритроцитов, могут демонстрировать более высокие значения R_b [116, 117].

Знание R_b необходимо для корректной интерпретации фармакокинетических параметров, рассчитываемых для цельной крови и при определении концентрации в плазме крови [118].

Для определения R_b в биологических образцах используют различные методы. Один из основных подходов заключается в инкубации цельной крови с известной концентрацией вещества при 37 °C с последующим разделением фракций и определением концентраций в плазме и эритроцитарной массе. Альтернативные методы включают косвенный расчёт R_b на основе концентраций в плазме после инкубации цельной крови с номинальной концентрацией вещества [119].

Таким образом, оценка распределения пептида между плазмой и форменными элементами крови позволяет обосновать выбор матрицы для анализа и корректно интерпретировать полученные фармакокинетические параметры.

1.4. Определение связывания с белками плазмы

Связывание терапевтических пептидов с белками плазмы является фактором, определяющим фармакокинетику и фармакодинамику. Только несвязанные с белками пептиды способны проникать через биологические мембраны, взаимодействовать с рецепторами и подвергаться элиминации, тогда как связанные пептиды выступают в роли депо, пролонгирующего действие препарата [57].

Основными белками-носителями пептидов в плазме являются альбумин и α_1 -кислый гликопротеин [120]. Для определения связи пептидов с белками плазмы (англ. plasma-protein binding, PPB) наиболее распространены методы ультрацентрифугирования, равновесного диализа и ультрафильтрации с центрифужным концентратором [121].

Равновесный диализ основан на диффузии свободного пептида через полупроницаемую мембрану до достижения равновесия. Данный метод высокоточен и может быть применим к широкому диапазону веществ, в том числе липофильных [122, 123]. При этом метод имеет недостатки в виде большой длительности пробоподготовки и анализа, а также сложности автоматизации [124].

Ультрафильтрация с центрифужным концентратором используется для разделения пептидов и высокомолекулярных белков при помощи мембраны с определенным порогом отсека по молекулярной массе (англ. molecular weight cut-off, MWCO). Несмотря на высокую скорость и простоту проведения анализа, следует учитывать и определять возможное занижение значений свободной фракции вещества за счёт адсорбции пептида на мембране [125].

Ультрацентрифугирование – метод, основанный на седиментации белков под действием высоких центробежных сил – 200000–300000 g – в течение примерно 6 часов [123]. В процессе ультрацентрифугирования белки и связанная с ними

фракция пептида осаждаются, тогда как свободный пептид остаётся в супернатанте [123]. Это высокоточный метод с низкой степенью неспецифичного связывания, однако обладает относительно низкой производительностью, риском седиментации свободного пептида и завышением свободной фракции для липофильных веществ [122, 123].

Таким образом, каждый из рассмотренных методов определения связывания пептидов с белками плазмы обладает своими преимуществами и ограничениями, ассоциированными с точностью, длительностью анализа, производительностью и риском артефактов, что требует обоснованного выбора подхода с учётом физико-химических свойств исследуемого соединения и целей конкретного исследования.

1.5. Хроматографические методы разделения пептидов

Хроматографическое разделение является одним из основных этапов биоаналитической методики. Оптимизированное хроматографическое разделение позволяет значительно повысить селективность и чувствительность детектора. Терапевтические пептиды как аналиты требуют комплексного подхода к хроматографии вследствие разнообразия физико-химических свойств – размера, гидрофобности, заряда и конформационной подвижности [126]. Выбор оптимального хроматографического режима определяется структурой целевого пептида, характером примесей и требованиями к чувствительности [126].

ВЭЖХ является одним из основных методов анализа терапевтических пептидов, который часто используется для идентификации, разделения и количественного определения [127]. В данном разделе рассмотрены основные хроматографические режимы, применяемые в современном анализе терапевтических пептидов, их преимущества, ограничения и области применения.

ОФ-ВЭЖХ представляет собой наиболее распространённую аналитическую технику для анализа терапевтических пептидов благодаря своей высокой разрешающей способности, воспроизводимости и возможности использовать различные детекторы [128]. Метод основан на гидрофобных взаимодействиях

между неполярными участками пептида и углеводородными цепями, привитыми к поверхности силикагеля [129, 130]. Удерживание пептидов в ОФ-ВЭЖХ определяется их гидрофобностью, которая зависит от аминокислотного состава и пространственной структуры [131].

ОФ хроматография обладает рядом достоинств, которые обеспечили ей статус основного метода в анализе пептидов. К числу таких преимуществ относятся высокая эффективность и разрешающая способность, позволяющие разделять сложные смеси пептидов, различающихся по гидрофобности даже с минимальными отличиями в структуре [126]. Метод характеризуется широким диапазоном применимости – от коротких до длинных, от гидрофильных до гидрофобных пептидов, а также хорошей воспроизводимостью и робастностью, что критически важно для валидированных биоаналитических методик. Важным преимуществом является совместимость ОФ-ВЭЖХ с градиентным элюированием, что позволяет эффективно разделять компоненты с широким диапазоном полярностей за один анализ [126].

Наряду с очевидными достоинствами, ОФ-ВЭЖХ имеет и определенные ограничения. Наиболее существенным из них является недостаточное удерживание очень гидрофильных и коротких пептидов, которые могут элюироваться в мертвом объеме колонки или близко к нему, что затрудняет их количественное определение [132]. Для некоторых пептидов существует риск необратимой адсорбции на неподвижной фазе, что приводит к потере аналита и ухудшению формы пиков [133]. При работе со сложными биологическими матрицами образец может быть подвержен матричным эффектам, когда эндогенные компоненты образца влияют на удерживание или ионизацию целевого пептида [134].

НІІС является вариацией ВЭЖХ и часто используется для анализа гидрофильных пептидов, которые слабо удерживаются в ОФ режиме [135]. В НІІС применяют полярную неподвижную фазу и подвижную фазу с высоким содержанием органического растворителя. Удерживание обусловлено распределением пептида между гидрофильным слоем воды, адсорбированным на поверхности фазы и менее полярной подвижной фазой с содержанием

органического растворителя около 60-95% [136]. HILIC позволяет разделять пептиды, которые характеризуются крайне низким удерживанием в ОФ режиме, а использование подвижных фаз с высоким содержанием органического растворителя улучшает десольватацию и эффективность ионизации электрораспылением, повышая тем самым чувствительность анализа [135, 137].

Вместе с тем HILIC имеет ряд ограничений, которые необходимо учитывать при разработке методики. HILIC также чувствительна к составу пробы – для достижения воспроизводимого удерживания необходимо минимизировать содержание воды в системе, иначе имеются риски искажения формы пика при анализе [138]. HILIC обладает меньшей робастностью по сравнению с ОФ-ВЭЖХ для рутинных анализов, что проявляется в большей вариабельности времен удерживания и чувствительности к незначительным изменениям состава подвижной фазы [139, 140].

Ионообменная хроматография разделяет пептиды на основе различий в их суммарном заряде, который определяется аминокислотным составом и значением рН подвижной фазы [141]. Метод считается одним из лучших для разделения и очистки пептидов в сложных смесях [142]. Главным его преимуществом является высокая разделяющая способность для близких по структуре пептидов, а также для анализа зарядовых вариантов, образующихся в результате дезамидирования, окисления или других посттрансляционных модификаций [141]. Лимитирующие факторы ионообменной хроматографии связаны прежде всего с необходимостью применения солевых градиентов для элюирования. При использовании нелетучих солей МС детектирование невозможно, что является одним из основных ограничений современной аналитической химии [143]. Кроме того, метод чувствителен к составу подвижной фазы, особенно к значению рН, который определяет заряд пептида и, следовательно, характер удерживания вещества [144].

Также существуют тенденции разработки методов, объединяющих несколько механизмов разделения. Например, HILIC и ионнообменная хроматография, основанная на разделении по гидрофильности и по заряду, обеспечивает синергию двух режимов [145]. Метод успешно применён для анализа

циклических пептидов, α -спиральных пептидов, пептидов со случайной конформацией, а также модифицированных продуктов синтеза [145]. Для сложных смесей пептидов, включая продукты деградации и примеси, часто применяют двумерную жидкостную хроматографию [146]. Однако, такие методики часто направлены на параллельное определение большого количества сопутствующих веществ, таких как примеси и продукты деградации.

Таким образом, ОФ-ВЭЖХ остается универсальным и наиболее широко применяемым методом благодаря высокой эффективности, воспроизводимости и совместимости с МС. Однако для гидрофильных пептидов и сложных задач разделения возможно применение альтернативных подходов, таких как HPLC, ионообменная хроматография и смешанно-режимные методы, каждый из которых имеет свои преимущества и ограничения. Современные тенденции включают использование сочетаний вариантов хроматографии для улучшения качества разделения сложных смесей. Для рутинного биоанализа терапевтических пептидов оптимальным выбором является ОФ-ВЭЖХ, обеспечивающая баланс эффективности и воспроизводимости.

1.6. Масс-спектрометрическое детектирование в анализе пептидов

Сочетание ВЭЖХ с МС/МС считается «золотым стандартом» для количественного определения пептидов в биологических матрицах [147]. В данном разделе рассмотрены основные принципы ионизации пептидов, типы масс-анализаторов, стратегии фрагментации, а также ключевые проблемы и пути их решения при масс-спектрометрическом детектировании.

Два основных метода, применяемых в современной практике – электрораспыление (англ. electrospray ionization, ESI) и матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (англ. matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) [147, 148].

ESI является предпочтительным методом для количественного анализа пептидов в сочетании с ВЭЖХ благодаря возможности прямого соединения с

хроматографической системой и способности образовывать многозарядные ионы [149]. Принцип метода заключается в распылении жидкой пробы при атмосферном давлении в сильном электрическом поле, при котором образуются высокозаряженные капли. По мере испарения растворителя плотность заряда на поверхности каплей возрастает, и когда кулоновское отталкивание превышает силы поверхностного натяжения, происходит выброс ионов в газовую фазу [149].

Ключевой особенностью ESI для пептидов является образование ионов с множественными зарядами, что позволяет анализировать соединения с молекулярной массой, превышающей рабочий диапазон масс-анализатора [149].

MALDI основана на облучении импульсным лазером пробы, смешанной с избытком матрицы, где энергия лазера поглощается матрицей, что приводит к ее быстрому нагреву и десорбции вместе с аналитом в газовую фазу, где происходит ионизация преимущественно протонированием [150, 151].

MALDI образует по большей мере однозарядные ионы, что упрощает интерпретацию спектров, но ограничивает диапазон анализируемых масс [152]. Метод отличается высокой чувствительностью, устойчивостью к примесям и высокой скоростью анализа [153]. Хотя сложность прямого соединения с ВЭЖХ ограничивает применение MALDI для рутинного количественного анализа, методы MALDI-визуализации активно развиваются в области пептидомики [154].

Выбор масс-анализатора определяется задачами исследования. В случае количественного анализа определяющими параметрами выступают чувствительность и динамический диапазон метода, в то время как для идентификации и характеристики соединений приоритетное значение приобретают высокое разрешение и точность измерения массы [155, 156].

Тройной квадруполь является распространенным методом количественного биоанализа благодаря высокой селективности в режиме MRM [157]. В этом режиме первый квадруполь селективно пропускает ион-предшественник целевого пептида, затем ион-предшественник попадает в ячейку соударений для фрагментации, а после фрагментные ионы попадают во второй квадруполь, который селективно пропускает характерный фрагментный ион [158]. Такое двойное отсеивание

обеспечивает высокую специфичность и чувствительность, а также снижение шумового сигнала [159, 160]. Динамический диапазон вплоть до 5 порядков позволяет охватывать необходимые для фармакокинетических исследований концентрации в биообразцах [159, 161].

Квадруполь-времяпролетные масс-анализаторы (Q-TOF) сочетают эффективность фрагментации технологии квадруполь с высоким разрешением времяпролетного анализатора [162]. Q-TOF широко применяются в пептидомике и протеомике для идентификации новых пептидов и анализа посттрансляционных модификаций [163]. Для количественного анализа Q-TOF уступают тройным квадрупольям в чувствительности и динамическом диапазоне, но обеспечивают возможность ретроспективного анализа данных и идентификации неожиданных метаболитов [164, 165].

Орбитальная ловушка (Orbitrap) обладает сверхвысоким разрешением и высокой точностью определения массы. Это высокоэффективный метод для анализа сложных смесей пептидов, включая протеоформы, варианты с посттрансляционными модификациями и продукты деградации [163]. В сочетании с квадруполем (Q-Exactive, Orbitrap Fusion) эти приборы обеспечивают гибкие возможности тандемной масс-спектрометрии и их широко применяют в фундаментальных исследованиях. Однако высокая стоимость, сложность эксплуатации и более узкий динамический диапазон ограничивают использование Orbitrap для рутинного количественного анализа в биоаналитических лабораториях [165].

В современных приборах для идентификации пептидов и обеспечения селективности количественного анализа методом МС/МС применяют различные методы фрагментации: активацию соударением (англ. collision-induced dissociation, CID), высокоэнергетическую активацию соударением (англ. higher-energy collisional dissociation, HCD), активацию электронным захватом (англ. Electron Capture Dissociation, ECD), активацию электронным переносом (англ. electron-transfer dissociation, ETD) [166, 167].

CID наиболее распространенный метод фрагментации, реализованный в тройных квадрупольях и многих гибридных приборах. Ионы-предшественники ускоряются в ячейке соударений, заполненной инертным газом, и при столкновениях накапливают внутреннюю энергию, достаточную для разрыва пептидных связей [168]. HCD – вариант CID с более высокой энергией соударений, реализованный в орбитальных ловушках, который обеспечивает богатые фрагментные спектры с сохранением низкомолекулярных ионов, что улучшает качество идентификации [169]. ECD и ETD относятся к радикальным способам фрагментации и основаны на взаимодействии многозарядных катионов пептидов с электронами (ECD) или анион-радикалами (ETD). В ECD используют свободные электроны низкой энергии, а в ETD используют анион-радикалы для переноса электрона на многозарядный катион пептида. Несмотря на различие в способе доставки электрона, оба метода вызывают разрыв связей с образованием с- и z-ионов [170]. Важным преимуществом ECD и ETD является сохранение лабильных модификаций в процессе фрагментации [171]. Выбор метода фрагментации определяется задачами исследования: CID и HCD оптимальны для рутинного количественного анализа, тогда как ECD/ETD незаменимы при работе с пептидами с лабильной модификаций и изучении посттрансляционных модификаций.

Таким образом, ESI с использованием CID обеспечивает совместимость с ВЭЖХ и возможность анализа пептидов в широком диапазоне масс. Для рутинного количественного анализа оптимальным выбором является тройной квадруполь в режиме MRM, обеспечивающий высокую чувствительность, широкий динамический диапазон и специфичность. Для идентификации и характеристики модификаций возможно использование приборов высокого разрешения, таких как Q-TOF и Orbitrap.

1.7. Выбор внутреннего стандарта

Внутренний стандарт (ВС) – это соединение, добавляемое в постоянной концентрации ко всем пробам, градуировочным образцам (ГО) и образцам для

контроля качества (КК, англ. quality control, QC), служит для облегчения количественной оценки целевого аналита [79]. ВС играет ключевую роль в обеспечении правильности и прецизионности результатов биоаналитических исследований, компенсируя влияние матрицы, колебания показателей приборов и неточностей при пробоподготовке [172].

Согласно гармонизированному руководству ICH M10, в качестве ВС для валидации биоаналитической методики можно использовать два основных типа внутренних стандартов: стабильные изотопно-меченные аналоги и структурные аналоги [79].

Наиболее предпочтительным типом внутреннего стандарта для МС является стабильный изотопно-меченный аналог аналита, в котором один или несколько атомов заменены на стабильные изотопы с большими атомными массами [173]. Изотопно-меченные ВС обладают почти идентичными химическими и физическими свойствами с целевым аналитом, что обеспечивает максимально близкую эффективность экстракции при пробоподготовке [174]. При МС детектировании степень ионной супрессии или усиления, вызванная ко-элюирующими компонентами матрицы, одинакова для изотопно-меченного ВС и аналита, даже при выраженных матричных эффектах при условии одинакового времени удерживания аналита и ВС [175]. Однако, некоторые отличия в поведении веществ возможны. Например, некоторые соединения, меченные дейтерием (^2H), могут проявлять различия во времени удерживания или степени извлечения по сравнению с аналитом [176]. Также при выборе изотопно-меченного ВС следует учитывать вероятность перекрёстных помех, что может привести к нелинейности градуировочных кривых и, в конечном итоге, увеличить систематическую погрешность анализа [177].

В случаях, когда синтез изотопно-меченного аналога невозможен или экономически нецелесообразен, в качестве внутреннего стандарта могут использоваться структурные аналоги, при этом следует учитывать потенциальные сложности, которые обычно проявляются в процессе валидации методики [176]. ВС-пептиды с одной консервативной аминокислотной заменой – экономически

целесообразная и простая альтернатива затратным изотопно-меченым аналогам [178].

Использование ВС является приоритетным выбором при валидации биоаналитических методик в соответствии с гармонизированным руководством ICH M10, в то время как отсутствие ВС следует обосновывать [79].

1.8. Треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат. Структура, описание физических и химических свойств. Особенности определения

Треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат (торговое наименование «Гепон[®]», – терапевтический тетрадекапептид, аналог фрагмента белка эзрина человека-1 HER-1, зарегистрированный в РФ 30.07.2007 [179] в форме раствора для местного, наружного применения и приема внутрь, а в 01.09.2011 в форме лиофилизата для приготовления раствора для местного и наружного применения и лиофилизата для приготовления раствора для приема внутрь; [180]. Данный пептид представляет собой последовательность, синтезированную из 14 немодифицированных аминокислот, гомологичную структуре центрального α -домена белка эзрина человека. Структурная формула пептида представлена на Рисунке 1.2.

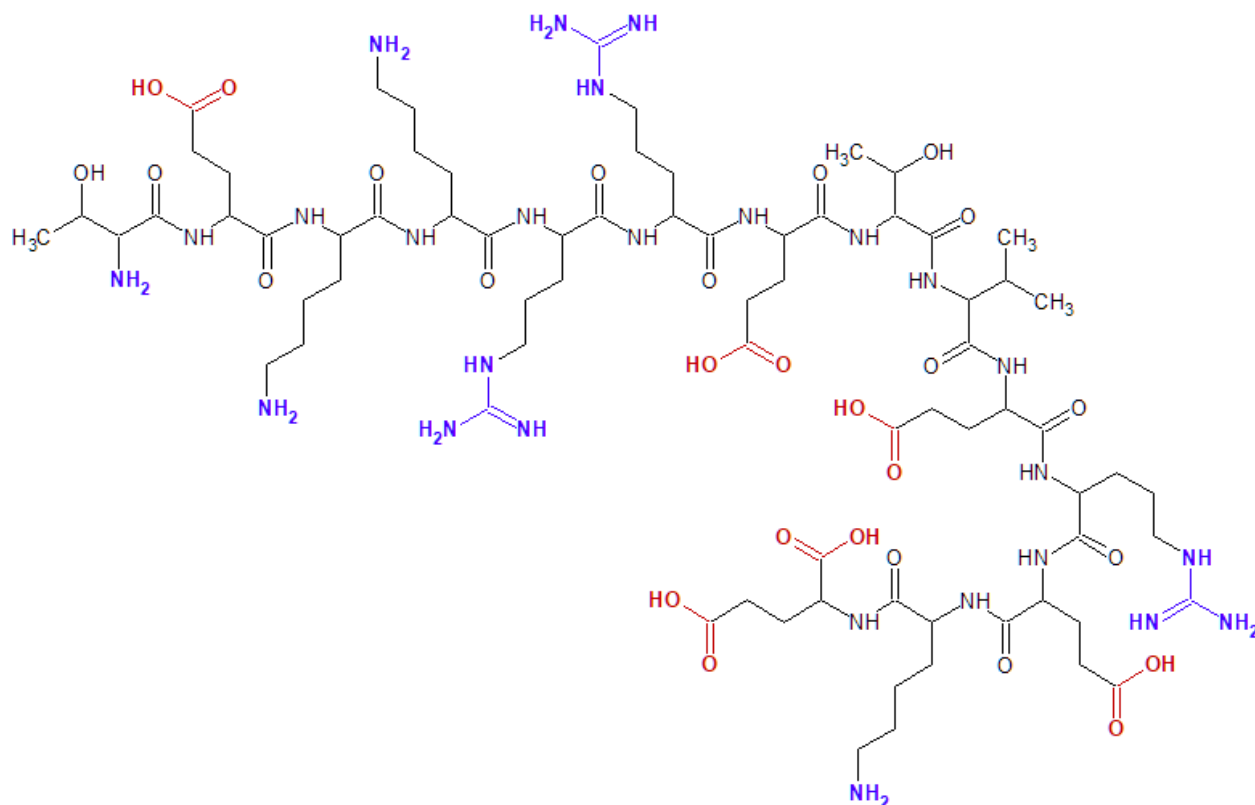


Рисунок 1.2 – Молекула NEP-1 с выделенными кислотными и основными центрами, где красным цветом выделены кислотные центры, а синим – основные

Моноизотопная молекулярная масса составляет 1817,0 Да [181]. Молекула содержит немодифицированный N-конец треонила, по три остатка лизина и аргинина, обуславливающие основные свойства, и пять остатков глутаминовой кислоты, обуславливающие кислотные. Молекула обладает амфолитными свойствами, рассчитанная изоэлектрическая точка $pI = 9,5$ [182], рассчитанный логарифм отношения концентраций вещества в октаноле и в воде (XLogP): -10.7 [183]. Отсутствие модификаций способствует быстрому времени полувыведения и потенциально быстрой протеолитической деградации, особенно при пероральном приёме. Высокая гидрофильность пептида определяет потенциальные сложности при ОФ-ВЭЖХ разделении, а наличие большого количества основных и кислотных центров способствует образованию многозарядных ионов при ионизации молекулы методом ESI.

На данный момент отсутствует разработанная методика количественного определения NEP-1 в биологических образцах. Для проведения последующих доклинических и клинических исследований, необходима возможность получения

данных о фармакокинетике пептида. Кроме того, отсутствует информация о распределении препарата в цельной крови человека, что возможно определить при наличии разработанной методики.

1.9. Выводы к главе 1

Определены фармакокинетические свойства терапевтических пептидов, которые, в целом, характеризуются низкой пероральной биодоступностью, коротким периодом полувыведения, ограниченным объемом распределения и преимущественно почечной элиминацией.

Выявлены особые требования к преаналитическому этапу биоаналитической методики, а именно: выбор антикоагулянтов, стабилизаторов и условий хранения, которые должны быть оптимизированы индивидуально с учетом структуры пептида.

Установлен один из наиболее перспективных методов анализа – ОФ-ВЭЖХ-МС/МС – с возможным применением дериватизации в рамках пробоподготовки. Дериватизация представляет собой перспективный подход для повышения чувствительности анализа, позволяет улучшить хроматографическое разделение и ионизацию целевых пептидов.

Охарактеризован объект настоящего исследования – треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата, зарегистрированный под торговым наименованием Гепон[®]. Молекула представляет собой тетрадекапептид с молекулярной массой 1817,0 Да, содержащий множественные основные и кислотные центры. Анализ литературных данных свидетельствует об отсутствии валидированных методик количественного определения НЕР-1 в биологических образцах, что обосновывает актуальность разработки соответствующего биоаналитического метода для фармакокинетических исследований.

Подтверждена актуальность разработки методики количественного определения пептида НЕР-1 в биологических образцах. Требуется комплексный

подход, учитывающий физико-химические свойства аналита, особенности его поведения на преаналитическом этапе, а также современные достижения в области пробоподготовки, хроматографического разделения и МС детектирования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Оборудование

Нижеперечисленное лабораторное оборудование использовалось на всех этапах работы: при разработке, валидации и апробации методики количественного определения НЕР-1 в плазме крови человека, а также при изучении его распределения в цельной крови:

1. высокоэффективный жидкостной хроматограф Nexera с tandemным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (тройной квадруполь), Shimadzu, Япония;
2. весы аналитические AUW120D, Shimadzu, Япония;
3. система водоподготовки Simplicity UV, Millipore, Франция;
4. система воздухоподготовки (генератор азота Parker LCMS), Parker domnick hunter, Великобритания;
5. вортекс-шейкер, Elmi, Латвия;
6. дозатор переменного объема одноканальный Eppendorf Research Plus 20-200 мкл, Eppendorf, Германия;
7. дозатор переменного объема одноканальный Eppendorf Research Plus 10-100 мкл, Eppendorf, Германия;
8. дозатор переменного объема одноканальный Eppendorf Research Plus 100-1000 мкл, Eppendorf, Германия;
9. дозатор механический одноканальный BIONIT с варьируемым объёмом дозирования 100-1000 мкл, Sartorius Biohit, Финляндия;
10. дозатор механический одноканальный BIONIT с варьируемым объёмом дозирования 10-100 мкл, Sartorius Biohit, Финляндия;
11. дозатор механический одноканальный BIONIT с варьируемым объёмом дозирования 0,5-10 мкл, Sartorius Biohit, Финляндия;
12. центрифуга лабораторная Eppendorf 5418, Eppendorf, Германия;

13. морозильная камера Liebherr GSN 2923 Index 26A/001, Liebherr, Германия;
14. холодильник Atlant КШ-216, Минск, Белоруссия;
15. морозильник низкотемпературный, DW-HL100, Hefei Meiling, Китай;
16. испаритель под током азота NDK200-2, Hangzhou Miu Instruments Co., Китай;
17. термошейкер для пробирок TS-100 (Biosan, Латвия);
18. ультразвуковая (УЗ) ванна 1,3л "Сапфир" (ООО "Сапфир", Россия)

2.2. Стандартные образцы, реактивы и расходные материалы

Перечень материалов и реагентов, применявшихся для разработки методики, получения ГО и образцов КК для анализа НЕР-1, а также для оценки его распределения в цельной крови и связывания с белками плазмы.

Стандартные образцы:

- ГЕПОН[®], лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения (ООО «Иммафарма», Россия, количественное содержание 100,50%);
- треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-лейцил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата – внутренний стандарт (ВС) (ООО «Пептидные технологии», Россия, количественное содержание 98,10%).
- индапамид (Edmond Pharma S.r.l., Италия, количественное содержание 98,3%);
- долутегравир натрия (Micromol, Германия, количественное содержание 99,39%).

Реактивы:

- ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Biosolve, Франция/Нидерланды/Израиль);
- метанол (класс х.ч., Химмед, Россия);
- муравьиная кислота (класс «98% pure», PanReac, Испания);

- хлороформ (класс 99,9%, Honeywell, Германия);
- пропионовая кислота (класс 99,84%, BASF, Германия);
- вода деминерализованная, (очищенная, тип I, Система водоподготовки Simplisity UV, Millipore, Франция);
- аммиак водный 25% (класс «Ph. Eur.», PanReac, Испания);
- натрия гидрокарбонат (класс ч.д.а., Химмед, Россия);
- натрия карбонат (класс ч.д.а., Химмед, Россия);
- диметиламинонафтален-5-сульфонилхлорид (дансилхлорид) (класс >98%, Sigma-Aldrich, США);
- 4-толуолсульфонилхлорид (тозилхлорид) (класс >98%, Merck KGaA, Германия);
- фенилизотиоцианат (ФИТЦ) (класс >98%, Sigma-Aldrich, США);
- N-(9H-флуорен-2-илметокси)сукцинимид (Fmoc-OSu) (класс >98%, TCI, Япония);
- ди-трет-бутилдикарбонат (Вос-ангидрид) (класс >95%, TCI, Япония);
- N-(бензилоксикарбонилокси)сукцинимид (Cbz-OSu) (класс >98%, TCI, Япония);
- бензойный ангидрид (98%, Acros Organics, Бельгия),
- пропионовый ангидрид (класс >99,8%, Sigma-Aldrich, США)
- триэтиламин (класс >99%, TCI, Япония).

При разработке, валидации и апробации методики были использованы следующие расходные материалы:

- пробирки центрифужные типа «эппендорф» полипропиленовые, 2 мл Servicebio, Китай;
- виалы хроматографические, объемом 2 мл из бесцветного стекла, под резьбовую крышку, Isolab, Германия
- вставки для виал полипропиленовые 6x29 мм, 350 мкм, Zhejiang ALWSCI Technologies Co., Ltd, Китай;

- крышка для виал синяя винтовая с прорезанной септой политетрафторэтилен /силикон, Membrane Solutions LLC, Китай.

- Spin-X® UF 500 концентратор (предел отсечения по молекулярной массе 5000 дальтон), CORNING, Великобритания.

2.3. Приготовление растворов

2.3.1. Исходные стандартные растворы

Приготовление исходных растворов веществ, используемых для приготовления рабочих растворов представлено в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Приготовление исходных растворов

Название раствора	Навеска / Аликвота	Растворитель / Объем	Итоговый объем / Посуда	Концентрация, нг/мл
Исходный раствор НЕР-1	2 мг	Ацетонитрил -вода (1:1) 2000 мкл	2,0 мл (центрифужная микропробирка)	1 000 000
НЕР-1 II	10 мкл раствора НЕР-1 I	Ацетонитрил -вода (1:1) 990 мкл	1,0 мл (центрифужная микропробирка)	10 000
Исходный раствор ВС	10,0 мг ВС (с учетом чистоты)	Ацетонитрил -вода (1:1) до метки	100 мл (мерная колба)	100 000
Исходный раствор индапамида	10,2 мг вещества (с учетом чистоты)	Ацетонитрил до метки	10 мл (мерная колба)	1 000 000
Исходный раствор долутегравира	10,6 мг вещества (10,0 мг при пересчёте на кислоту)	Ацетонитрил до метки	10 мл (мерная колба)	1 000 000
Раствор II индапамида	100 мкл исходного раствора	Ацетонитрил до метки	10 мл (мерная колба)	10 000
Раствор II долутегравира	100 мкл исходного раствора	Ацетонитрил до метки	10 мл (мерная колба)	10 000

2.3.2. Рабочие стандартные растворы

В рамках разработки и валидации рабочие стандартные растворы готовили путём разведения исходных стандартных растворов смесью ацетонитрил-вода (1:1). Аликвоты стандартных растворов НЕР-1 и НЕР-1 II помещали в центрифужные микропробирки объемом 2 мл, объём растворов доводили до 1 мл смесью ацетонитрил-вода (1:1) и перемешивали. Концентрации растворов для ГО составили 100, 200, 400, 1000, 2000, 4000, 10000, 20000 нг/мл (уровни 1-8), и 300, 600, 6000, 15000 нг/мл – растворов для КК (уровни L, LM, M, H, соответственно). Подробные данные по приготовлению представлены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Схема приготовления растворов для градуировочных образцов и образцов контроля качества НЕР-1

№ ГО, КК	Концентрация рабочего раствора НЕР-1, нг/мл	Объём аликвоты раствора НЕР-1, мл	Концентрация раствора НЕР-1, нг/мл
1	100	0,010	10000
2	200	0,020	10000
3	400	0,040	10000
4	1000	0,100	10000
5	2000	0,200	10000
6	4000	0,400	10000
7	10000	0,010	1000000
8	20000	0,020	1000000
L	300	0,030	10000
LM	600	0,060	10000
M	6000	0,600	10000
H	15000	0,015	1000000

Полученные рабочие стандартные растворы сразу после приготовления аликвотировали по 10 мкл в центрифужные микропробирки и сразу же замораживали при температуре -30 °С.

Для приготовления рабочего раствора внутреннего стандарта ВС к 25 мкл исходного раствора ВС в центрифужной микропробирке объемом 2 мл, прибавляли

975 мкл смеси ацетонитрил-вода (1:1) и перемешивали. Полученная концентрация ВС в растворе – 2500,00 нг/мл.

С целью оценки распределения НЕР-1 в цельной крови человека, помимо приготовления рабочих растворов 1:20 для приготовления ГО и КК, готовили раствор с разведением 1:1000. Для определения распределения НЕР-1 в цельной крови 100 либо 500 мкл исходного стандартного раствора НЕР-1 I переносили в центрифужную микропробирку объемом 2 мл и прибавляли 900 либо 500 мкл смеси ацетонитрил-вода (1:1) и перемешивали. Полученная концентрация НЕР-1 составила 100 000,00 и 500 000,00 нг/мл

Схема приготовления рабочих растворов индапамида описана в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Приготовление рабочих растворов индапамида

№	Концентрация индапамида в биологической матрице, нг/мл	Концентрация индапамида в растворе, нг/мл	Объем колбы, мл	Аликвота, мкл	Концентрация исходного раствора, нг/мл
Для градуировочных растворов (×40)					
1	0,50	20	20	0,040	10000
2	1,00	40	10	0,040	10000
3	2,50	100	10	0,100	10000
4	5,00	200	10	0,200	10000
5	10,00	400	10	0,400	10000
6	20,00	800	5	0,400	10000
7	40,00	1600	5	0,800	10000
8	80,00	3200	5	1,600	10000
L	1,50	60	10	0,060	10000
M	24,00	960	10	0,960	10000
H	60,00	2400	5	1,200	10000
Для экспериментальных растворов (×1000)					
Э1	1,50	1500	10	0,015	1000000
Э2	60,00	60000	10	0,600	1000000

Рабочий раствор ВС для определения индапамида – долутегравира – готовили путем растворения 200 мкл исходного стандартного раствора долутегравира II в мерной колбе объемом 10 мл с последующим доведением до

метки и перемешиванием. Концентрация в рабочем растворе долутегравира составила 200 нг/мл.

2.3.3. Дериватизирующие агенты, элюенты и буферы

Рабочие растворы дериватизирующих агентов (дансилхлорид, тозилхлорид, ФИТЦ, Fmoc-OSu, Boc-ангидрид, Cbz-OSu, бензойный ангидрид, пропионовый ангидрид) были приготовлены путём растворения точной навески реагента в ацетонитриле до получения концентрации 1 мг/мл (1% раствор).

Для приготовления карбонатно-бикарбонатного буферного раствора навески карбоната натрия массой 850 мг и гидрокарбоната натрия массой 840 мг количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде типа I, доводили объем раствора до метки и тщательно перемешивали. Полученный раствор содержал 0,08 М карбоната натрия и 0,1 М гидрокарбоната натрия.

Рабочий раствор триэтиламина был приготовлен путём растворения точной навески триэтиламина в ацетонитриле до получения концентрации 1 мг/мл.

Для приготовления элюентов А и В (0,1% растворы муравьиной кислоты в воде типа I и ацетонитриле соответственно) в мерные колбы вместимостью 1000 мл, наполовину заполненные соответствующим растворителем, вносили по 1,00 мл муравьиной кислоты. Растворы перемешивали, доводили объемы до метки водой типа I (для элюента А) или ацетонитрилом (для элюента В) и повторно перемешивали.

Раствор пропионовой кислоты в метаноле (1:20; 4,76% об.) готовили аналогично: 4,76 мл пропионовой кислоты вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержащую около 50 мл метанола, перемешивали, затем доводили объем до метки тем же спиртом и тщательно перемешивали.

2.4. Методика проведения анализа

2.4.1. Методика количественного определения исследуемого тетрадекапептида в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией

В основе разработанной методики количественного определения НЕР-1 в плазме крови человека лежит использование метода ВЭЖХ-МС/МС. Анализ включал в себя следующие этапы:

1. предварительная подготовка плазмы крови добровольца – разморозка образцов, перемешивание.

2. аликвотирование плазмы крови добровольца – отбирали 200 мкл плазмы и переносили в центрифужную микропробирку объемом 2 мл.

3. добавление ВС, осаждение белков и центрифугирование – прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС, 420 мкл 4,76% раствора пропионовой кислоты в метаноле, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд. Спустя 20 минут отстаивания при комнатной температуре образец помещали в высокоскоростную центрифугу и центрифугировали в течение 15 мин с относительным центробежным ускорением 15294 g

4. ЖЖЭ с последующим центрифугированием – супернатант переносили в центрифужные микропробирки вместимостью 2 мл, прибавляли 800 мкл хлороформа, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин с относительным центробежным ускорением 15294 g

5. упаривание в токе азота – отбирали около 200-250 мкл верхнего (водного) слоя жидкости и переносили в центрифужные микропробирки вместимостью 2 мл с последующим упариванием в токе азота досуха при комнатной температуре.

6. дериватизация – к сухому остатку после упаривания добавляли 10 мкл пропионовой кислоты, 5 мкл пропионового ангидрида и 100 мкл смеси ацетонитрил/вода 1:1, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10

секунд, помещали центрифужные микропробирки на УЗ-баню при температуре 60 °С на 5 минут.

7. повторное упаривание в токе азота – упаривали в токе азота при температуре 60 °С досуха.

8. перерастворение и последующий ВЭЖХ-МС/МС анализ – к полученному сухому остатку прибавляли 100 мкл воды I типа, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд и переносили в полипропиленовые вставки в хроматографические вials и помещали в автосамплер хроматографа.

2.4.2. Условия хроматографического разделения и детектирования

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera и tandemном масс-спектрометрическом детекторе LCMS-8040 (тройной квадруполь). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения Lab Solutions (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation, Япония. Условия представлены в Таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Условия хроматографического разделения НЕР-1

Колонка	XBridge C18 4,6 мм*50 мм, с размером частиц 5 мкм		
Предколонка	Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges C18 4x3,0 мм; 5 мкм		
Температура термостата	40 °С		
Подвижная фаза	Элюент А: 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде (по объёму)		
	Элюент В: 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объёму)		
Градиент подвижной фазы	Время, мин	Содержание элюента В, %	Скорость потока ПФ, мл/мин
	от 0,00 до 2,00	от 10 до 22, линейный градиент	1,00

Продолжение Таблицы 2.4

	от 2,00 до 2,40	от 22 до 100, линейный градиент	1,00
	от 2,40 до 3,60	100, изократический режим	1,00
	от 3,60 до 4,10	от 100 до 10, линейный градиент	1,00
	от 4,10 до 5,50	10, изократический режим	1,00
Объем вводимой пробы	7 мкл		
Время удерживания НЕР-1	около 1,72 мин		
Время удерживания ВС	около 1,93 мин		
Время регистрации Хроматограммы	от 0,00 до 5,50 мин, все события		

Масс-спектрометрическое детектирование анализов выполняли в режиме ионизации ESI⁺ для НЕР-1 и ВС. Параметры источника ионизации: скорость потока распыляющего газа — 3 л/мин, осушающего газа — 20 л/мин; температура блока нагрева составляла 400 °С, температура линии десольватации — 250 °С. Напряжение на капилляре составляло +5 кВ. Детектирование целевых соединений осуществляли по m/z . Для НЕР-1: 681,30 → 73,95; 681,30 → 84,00; 681,30 → 101,90; 681,30 → 140,10. Для ВС: 686,00 → 74,10; 686,00 → 84,05; 686,00 → 102,00; 686,00 → 140,00.

2.4.3. Разработка методики оценки распределения модельного вещества – индапамида – в цельной крови человека

Для разработки методики распределения вещества в цельной крови использовались протоколы Kalamaridis et al [184] и Dash et al [119]. Верификацию методики провели с использованием вещества, для которого известен R_b .

Итоговая методика состояла из следующих этапов:

1. инкубация цельной крови – две пробирки с 6 мл (для проведения экспериментальной части), одна – с 11 мл (для ГО) цельной крови предварительно инкубировали при 37 °С в течение 30 минут;

2. добавление раствора индапамида – в каждый образец вносили по 6 мкл экспериментальных растворов индапамида (Э1 и Э2) в ацетонитриле (концентрация в цельной крови составила 1,5 и 60 нг/мл). Содержимое пробирок аккуратно перемешивали;

3. отбор аликвоты в различные временные точки – отбирали 1000 мкл нулевой временной точки непосредственно после перемешивания, затем через 10, 20, 30, 45 и 60 минут. Между отборами кровь возвращали в термошейкер;

4. разделение на фракции – все отобранные аликвоты цельной крови после отбора разделяли на образец цельной крови, плазмы и эритроцитарной массы по 200 мкл. Первоначально из аликвоты отбирали 200 мкл цельной крови, оставшиеся 800 мкл центрифугировали при 7000 об/мин в течение 3 минут. После центрифугирования аккуратно отбирали по 200 мкл плазмы и эритроцитарной массы в отдельные центрифужные микропробирки. Образцы цельной крови и эритроцитарной массы замораживали в течение не менее 2 часов для лизиса эритроцитов;

5. пробоподготовка – к 200 мкл матрицы (плазма, лизированная цельная кровь, эритроцитарная масса) добавляли 10 мкл долутегравира с концентрацией 200 нг/мл и 600 мкл ацетонитрила, перемешивали на вортексе. Осаждение проводили методом центрифугирования в течение 15 минут при 15294 g. Надосадочную жидкость переносили в хроматографическую вialsу вместимостью 2 мл.

Пробоподготовку трех калибровочных последовательностей выполняли параллельно на образцах интактной цельной крови, плазмы либо эритроцитарной массы. В пробирки, содержащие по 195 мкл соответствующей матрицы, вносили 5 мкл калибровочного раствора индапамида, 10 мкл раствора долутегравира с концентрацией 200 нг/мл и 600 мкл ацетонитрила. Смесь интенсивно встряхивали на вортексе, после чего центрифугировали в течение 15 минут при 15294 g.

Расчёты проводили четырьмя различными способами [117].

Прямой способ (способ 1):

$$R_b = \frac{C_b}{C_p},$$

где R_b – коэффициент распределения "кровь/плазма", C_b – концентрация исследуемого вещества в цельной крови, C_p – концентрация исследуемого вещества в плазме крови.

Косвенный способ с выражением концентрации в цельной крови через концентрацию в эритроцитах (способ 2):

$$R_b = \frac{C_{rbc} \cdot Ht + C_p \cdot (1 - Ht)}{C_p},$$

где R_b – коэффициент распределения "кровь/плазма", C_{rbc} – концентрация исследуемого вещества в эритроцитарной массе, Ht – гематокрит, C_p – концентрация исследуемого вещества в плазме крови.

Косвенный способ с выражением концентрации в плазме крови через концентрацию в цельной крови (способ 3):

$$R_b = \frac{C_b}{C_b - C_{rbc} \cdot Ht} \cdot (1 - Ht),$$

где R_b – коэффициент распределения "кровь/плазма", C_b – концентрация исследуемого вещества в цельной крови, Ht – гематокрит, C_{rbc} – концентрация исследуемого вещества в эритроцитарной массе.

Косвенный способ с выражением концентрации в плазме крови через номинальную концентрацию в цельной крови [119] (способ 4):

$$R_b = \frac{C_0}{C_p},$$

где R_b – коэффициент распределения "кровь/плазма", C_0 – номинальная концентрация исследуемого вещества в цельной крови, C_p – концентрация исследуемого вещества в плазме крови.

Количественное определение индапамида осуществляли с помощью разработанной валидированной методики количественного определения индапамида в плазме крови, которая прошла частичную валидацию при смене

матрицы на лизированную цельную кровь и эритроцитарную массу. Условия анализа индапамида представлены в Таблице 2.5.

Таблица 2.5 – Условия анализа индапамида

Колонка	Zorbax SB-C18 150 мм × 2,1 мм, с размером частиц 5 мкм		
Предколонка	Phenomenex SecurityGuard™. Cartridges C18 4x3,0 мм; 5 мкм.		
Температура термостата	40 °С		
Подвижная фаза	Элюент А: 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде (по объёму)		
	Элюент В: 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объёму).		
Градиент подвижной фазы	Время, мин	Содержание элюента В, %	Скорость потока ПФ, мл/мин
	от 0,00 до 1,00	от 20 до 100, линейный градиент	0,75
	от 1,00 до 2,00	100, изократический режим	0,75
	от 2,00 до 2,20	от 100 до 20, линейный градиент	0,75
	от 2,20 до 2,70	20, изократический режим	0,75
Объем вводимой пробы	5 мкл		
Время удерживания индапамида	примерно 1,30 мин		
Время удерживания долутегравира	примерно 1,30 мин		
Время регистрации Хроматограммы	0,00–2,70 мин		

Масс-спектрометрическое детектирование анализов выполняли в режиме ионизации ESI+ как для индапамида, так и для долутегравира. Параметры источника ионизации: скорость потока распыляющего газа — 3 л/мин, осушающего газа — 20 л/мин; температура блока нагрева составляла 400 °С, температура линии десольватации — 250 °С. Напряжение на капилляре составляло

+5 кВ. Детектирование соединений осуществляли m/z . Для индапамида: 366,00 → 132,10; 368,05 → 132,10. Для долутегавира: 420,00 → 277,10; 420,00 → 127,00.

2.4.4. Определения распределения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в цельной крови человека

Методика определения распределения НЕР-1 в цельной крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС заключалась в косвенном определении распределения на основе протокола Dash et al [119], и состояла из следующих этапов:

1. инкубация цельной крови – две пробирки с 4 мл цельной крови предварительно инкубировали при 37 °С в течение 30 минут;

2. добавление раствора НЕР-1 – в каждый образец вносили по 4 мкл экспериментальных растворов НЕР-1 в смеси ацетонитрил-вода (1:1) (концентрация в цельной крови составила 100 и 500 нг/мл). Содержимое пробирок аккуратно перемешивали;

3. Отбор аликвот в заданных временных точках – непосредственно после перемешивания отбирали аликвоту объемом 660 мкл (нулевая временная точка), последующий отбор проб проводили через 10, 20, 30, 45 и 60 минут. В интервалах между отборами образцы крови инкубировали в термошейкере;

4. Фракционирование цельной крови – центрифугировали отобранные аликвоты цельной крови 3 минуты при 7000 об/мин. После разделения фаз аккуратно перенести по 200 мкл верхнего слоя (плазмы) в отдельные центрифужные микропробирки.

5. дальнейшую пробоподготовку проводили аналогично методике количественного определения НЕР-1 в плазме крови.

Для приготовления 8 ГО, нулевого образца с добавлением ВС и интактного образца без добавления НЕР-1 и ВС использовали плазму, полученную после центрифугирования 8 мл цельной крови добровольца.

Расчёт проводили по формуле [119] (способ 4):

$$R_b = \frac{C_0}{C_p},$$

где R_b – коэффициент распределения "кровь/плазма", C_0 – номинальная концентрация исследуемого вещества в цельной крови, C_p – концентрация исследуемого вещества в плазме крови

2.4.5. Методика определения связывания исследуемого тетрадекапептида с белками плазмы крови человека

Связь НЕР-1 с белками плазмы крови была измерена методом ультрафильтрации с центрифужным концентратором с MWCO 5000 дальтон [19]. Сущность метода заключается в разделении молекул НЕР-1, связанных с белками плазмы, которые не проходят через мембрану центрифужного концентратора, от несвязанных с белками молекул НЕР-1, которые проходят в фильтрат. Концентрацию НЕР-1 в фильтрате и исходном образце плазмы крови определяли методом ВЭЖХ-МС/МС. Эксперимент проводили в 3 повторностях. Все расчёты были приведены для средних значений площадей пика НЕР-1.

Расчёт связывания с белками проводили по формуле [19]:

$$PPB = \frac{S_s - S_{free}}{S_s} \cdot 100\%,$$

где PPB – связь НЕР-1 с белками плазмы, S_s – площадь пика НЕР-1 для образцов без ультрафильтрации, S_{free} – площадь пика НЕР-1 для образцов свободной профильтрованной фракции (фильтрат).

Для проверки достоверности результатов оценивали процент неспецифического связывания с мембраной фильтра по формуле [20]:

$$NSB[\%] = \frac{S_{total} - S_f}{S_{total}} \cdot 100\%,$$

где NSB [%] – процент неспецифического связывания НЕР-1 с мембраной, S_{total} – площадь пика НЕР-1 для образцов фильтрованной фракции без влияния потерь на фильтре, S_f – площадь пика НЕР-1 для образцов фильтрованной фракции.

Для определения интенсивности сигнала НЕР-1 в образце без ультрафильтрации (S_s) готовили образец КК Н с последующей пробоподготовкой, описанной в разделе 2.4.1

Для определения интенсивности сигнала НЕР-1 в образце свободной фракции НЕР-1 (S_{free}) 190 мкл интактной плазмы крови и 10 мкл стандартного раствора НЕР-1 интенсивно перемешивали и помещали в Spin-X[®] UF 500 концентратор, затем центрифугировали с центробежным ускорением 12000 g в течение 30 минут. 200 мкл фильтрата переносили в центрифужную микропробирку и проводили пробоподготовку аналогично образцу плазмы.

Для определения интенсивности сигнала НЕР-1 фильтрованной фракции без влияния потерь на фильтре (S_{total}) интактную плазму крови помещали в Spin-X[®] UF 500 концентратор, затем центрифугировали с центробежным ускорением 12000 g в течение 30 минут. 190 мкл фильтрата переносили в центрифужную микропробирку, добавляли 10 мкл стандартного раствора НЕР-1, интенсивно перемешивали, затем проводили пробоподготовку аналогично образцу плазмы.

Для определения интенсивности сигнала НЕР-1 в фильтрованной фракции (S_f) интактную плазму крови помещали в Spin-X[®] UF 500 концентратор, затем центрифугировали с центробежным ускорением 12000 g в течение 30 минут. 190 мкл фильтрата отбирали и переносили в центрифужную микропробирку, добавляли 10 мкл стандартного раствора НЕР-1, затем интенсивно перемешивали, переносили в новый концентратор и центрифугировали с центробежным ускорением 12000 g в течение 30 минут. 200 мкл фильтрата переносили в центрифужную микропробирку и проводили пробоподготовку аналогично образцу плазмы.

2.4.6. Апробация методики

Проведена апробация методики при проведении исследования согласно Протоколу клинического исследования Ид. № Нерон-19-Р-I-2021 версия 1.1 от

27.05.2022 г., в рамках которого проводилось пилотное исследование фармакокинетики НЕР-1.

Добровольцам, разделенным на две группы по 5 человек, вводили 4 мг исследуемого препарата подкожно или внутримышечно, двукратно в сутки (утром и вечером, с интервалом в 12 часов) в течение 10 дней (20 введений).

Данные литературы о фармакокинетике НЕР-1 отсутствуют, в связи с чем фармакокинетическое исследование производилось с научной целью. Предложенная схема отбора проб составлена с учётом неопределённости и поискового характера фармакокинетического исследования:

- День 1 – 7 проб: 0 (до введения препарата натошак), 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч;
- День 8 – 2 пробы: 0 (до введения препарата натошак), 12 ч
- День 9 – 2 пробы: 0 (до введения препарата натошак), 12 ч
- День 10 – 7 проб: 0 (до введения препарата натошак), 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч.

Таким образом, всего отбирается по 18 проб крови по 6 мл для каждого добровольца.

2.4.7. Расчёт фармакокинетических данных

Расчёт фармакокинетических данных осуществляли с использованием программного обеспечения MS Excel в варианте PKSolver (разработано Yong Zhanga, Meirong Huoa, Jianping Zhouaa, Shaofei Xieb; a - Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, No.24, Tongjiqiang, 210009, Nanjing, China; b - Center for Instrumental Analysis, China Pharmaceutical University [Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education], No.24, Tongjiqiang, 210009, Nanjing, China) [185]. Были определены следующие параметры:

1. AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой (англ. area under the curve, AUC) «концентрация-время» от момента введения препарата до времени

последнего отбора крови, при котором концентрация препарата равна или выше нижнего предела количественного определения. Площадь рассчитывается с помощью линейно-логарифмического метода трапеций по следующим формулам: фаза абсорбции (1), фаза элиминации (2) [185];

2. $AUC_{0-\infty}$ площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время», рассчитанная в интервале времени от 0 до бесконечности (3) [185];

3. $AUC_{\text{resid}\%}$ –остаточная (экстраполируемая) площадь (в процентах) (4) [185];

4. λ_z – константа скорости терминальной элиминации лекарственного вещества (λ_z), оцениваемая для каждого добровольца по наклону прямой линейной регрессии, построенной по нескольким последним (ненулевым) лог-преобразованным значениям концентраций до ее максимального значения (λ_z) [185];

5. $t_{1/2}$ – период полувыведения (5) [185];

6. Cl – кажущийся общий клиренс (Cl) (6) [185];

7. V_d – кажущийся объём распределения в терминальной фазе (V_d) (7) [185].

Расчёт проводился по следующим формулам [185]:

$$AUC_{0-t} = \sum_{p=1}^t \frac{(C_{p-1} + C_p)}{2} \cdot (t_p - t_{p-1}) \quad (1)$$

Где C_p – концентрация вещества в крови в момент времени t_p

$$AUC_{0-t} = \sum_{p=1}^t \frac{(C_{p-1} - C_p)}{\ln(C_{p-1}) - \ln(C_p)} \cdot (t_p - t_{p-1}) \quad (2)$$

Где C_p – концентрация вещества в крови в момент времени t_p

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + \frac{C_t}{\lambda_z} \quad (3)$$

Где C_t – расчетное (моделируемое) значение концентрации действующего вещества в последней пробе

$$AUC_{\text{resid}\%} = \frac{AUC_{0-\infty} - AUC_{0-t}}{AUC_{0-\infty}} \cdot 100\% \quad (4)$$

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda_z} \quad (5)$$

$$Cl = \frac{m}{AUC_{0-\infty}} \quad (6)$$

Где m – доза препарата

$$V_d = \frac{m}{AUC_{0-\infty}} \cdot \lambda_z^{-1} \quad (7)$$

Где m – доза препарата

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИССЛЕДУЕМОГО ТЕТРАДЕКАПЕПТИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС- СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

3.1. Первичные результаты изучения треонил-глутамил-лизил-лизил- аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил- лизил-глутамата при анализе высокоэффективной жидкостной хроматографией с tandemной масс-спектрометрией

НЕР-1 обладает как кислотными, так и основными свойствами. Основные свойства выражены сильнее за счет наличия первичных аминогрупп (N-конец и остатки лизина), а также остатков гуанидина в составе аргинина, поэтому был выбран режим положительной ESI, как более предпочтительный.

Для получения масс-спектра нативного вещества был проанализирован 0,1 мкл раствора НЕР-1 10000 нг/мл без использования хроматографической колонки. Элюент А: 0,1% муравьиной кислоты в воде, элюент В: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле, скорость потока подвижной фазы 0,5 мл/мин. Масс-спектр нативного пептида НЕР-1 представлен на Рисунке 3.1

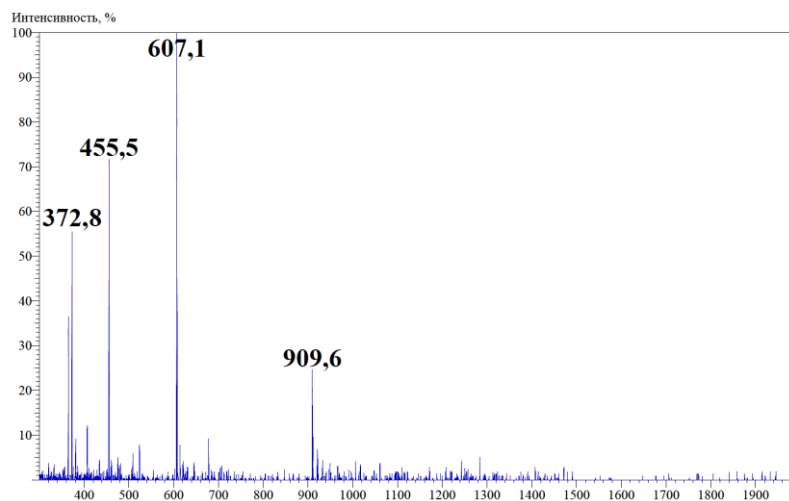


Рисунок 3.1 – Масс-спектр нативного пептида при положительной ионизации электрораспылением

Для веществ, обладающих большой молекулярной массой и содержащих несколько основных центров в структуре молекулы, особенно для пептидов, при ионизации электрораспылением характерно образование многозарядных ионов [149]. Значение отношения массы к заряду (m/z) рассчитывается по формуле:

$$R_z = (M + zH^+)/z,$$

где R_z – отношение массы к заряду иона, M – молекулярная масса моноизотопа исследуемого вещества, z – заряд иона, H^+ – молярная масса моноизотопного протона [186]. Наблюдаемые многозарядные ионы в масс-спектре нативного НЕР-1 полностью согласуются с теоретически рассчитанными значениями m/z (Таблица 3.1). Наблюдаемые отклонения в десятичных значениях являются следствием ограниченного разрешения системы. Также не было обнаружено заряженного иона НЕР-1 с единичным зарядом, что объяснимо увеличением зарядовых состояний ионизированных пептидов в зависимости от количества дополнительных основных аминокислот, независимо от типа основного остатка [148]. Семь основных центров молекулы НЕР-1 придают ярко выраженные основные свойства, поэтому она преимущественно существует в многозарядных формах.

Таблица 3.1 – Расчётные значения m/z для нативного НЕР-1 при положительной ионизации электрораспылением

$n(H^+)$	m/z
1	1818,0
2	909,5
3	606,7
4	455,2
5	364,4

Для последующей работы были выбраны три наиболее интенсивных иона с m/z : 607,1; 455,5; 909,6.

Далее проводилась оптимизация условий ионизации: подбиралось напряжение на капилляре электрораспыления, напряжение на линзах DL bias и Qarray bias в режиме мониторинга одного иона (англ. Single ion monitoring, SIM) с

целью увеличить интенсивность сигнала выбранных ионов (m/z). Максимальная интенсивность наблюдалась при напряжении на капилляре 5 кВ, изменение напряжения на линзах не оказывало значительного влияния на результат.

На следующем этапе оценивали влияние состава подвижной фазы на интенсивность ионизации молекулы НЕР-1. Были изучены следующие системы элюентов: 1% водный раствор муравьиной кислоты (МК) – 1% раствор МК в ацетонитриле; вода – ацетонитрил; водный раствор, содержащий 0,1% МК и 0,08% концентрированного раствора аммиака – ацетонитрил; 10 мкМ водный раствор ацетата аммония – 10 мкМ раствор ацетата аммония в ацетонитриле; 20 мкМ водный раствор ацетата аммония – 20 мкМ раствор ацетата аммония в ацетонитриле. Поскольку ни одна из испытанных ПФ не привела к увеличению интенсивности аналитического сигнала, для дальнейшей работы были выбраны исходные условия элюирования.

Затем оценили влияние на ионизацию молекулы НЕР-1 элюентов следующего состава: 1% муравьиной кислоты (МК) в воде/1% МК в ацетонитриле; вода/ацетонитрил; 0,1% МК, 0,08% концентрированного раствора аммиака в воде/ацетонитрил; 10 мкМ раствор ацетата аммония в воде/10 мкМ раствор ацетата аммония в ацетонитриле; 20 мкМ раствор ацетата аммония в воде/20 мкМ раствор ацетата аммония в ацетонитриле. Ни один из испытанных элюентов не обеспечил повышение интенсивности сигнала рассматриваемых ионов. В связи с этим, было принято решение использовать начальный режим элюирования.

Наибольшая селективность масс-спектрометрического детектирования при использовании трехквadrupольного масс-анализатора достижима при работе в режиме MRM. Для разработки условий детектирования НЕР-1 в MRM-режиме исследовали масс-спектры фрагментации выбранных ранее ионов-предшественников (m/z : 607,1; 455,5; 909,6). Для данных ионов не удалось обнаружить информативных масс-спектров, независимо от прилагаемой энергии соударения и давления инертного газа в ячейке. Полученные данные согласуются с научными сведениями, что пептиды с большим числом основных центров при заданной энергии столкновения фрагментируются тяжелее, чем аналогичные

протонированные пептиды без основного остатка [187]. НЕР-1 обладает 3 остатками лизина и 3 остатками аргинина, а также немодифицированным N-концом, за счёт чего фрагментация нативной молекулы является затруднительной. В связи с этим для нативной молекулы не удалось подобрать условия масс-спектрометрического детектирования в MRM-режиме.

Далее в качестве альтернативы рассмотрели возможность детектирования в SIM-режиме, а также изучили поведение НЕР-1 при анализе методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Для хроматографического разделения использовали колонку Jupiter 5 мкм C18 300 Å 50x4,6 мм, которая за счёт увеличенного среднего размера пор, согласно указанию производителей, способна разделять даже полипептиды и белки с молекулярной массой более 10000 Да [188]. Разделение проходило при следующих условиях элюирования:

Элюент А: 0,1% МК в воде

Элюент В: 0,1% МК в ацетонитриле

Градиент элюирования представлен в Таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Режим градиентного элюирования на колонке

Содержание элюента В, %	Время, мин
5, изократический режим	от 0 до 1
от 5 до 100, линейный градиент	от 1 до 4
100, изократический режим	от 4 до 5
от 100 до 5, линейный градиент	от 5 до 6
5, изократический режим	от 6 до 7

В результате было обнаружено, что НЕР-1 не удерживается на колонке и элюируется с мертвым объемом, также была отмечена низкая селективность детектирования в SIM-режиме ввиду обнаружения на хроматограмме пиков посторонних веществ, детектируемых по m/z 607,1; 455,5; 909,6. Хроматограмма представлена на Рисунке 3.2.

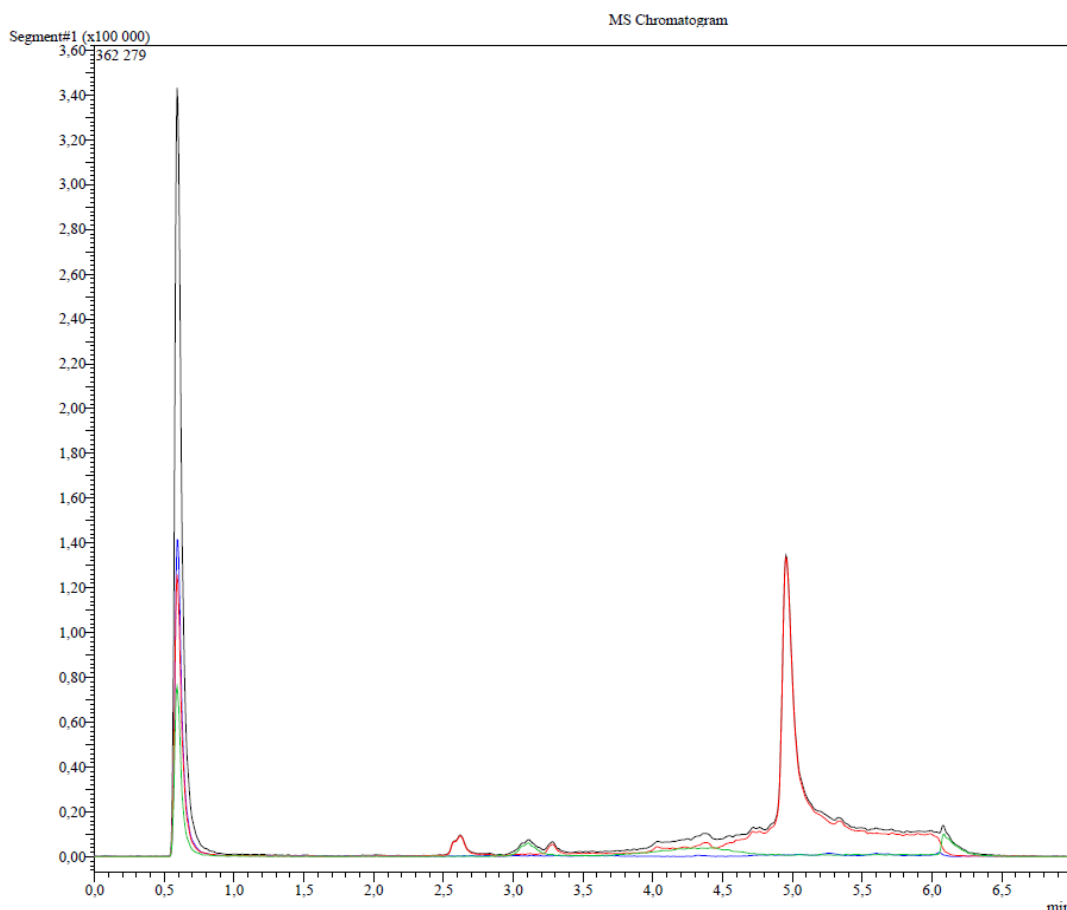


Рисунок 3.2 – Хроматограмма раствора нативного НЕР-1 при анализе на колонке Jupiter 5 мкм C18 300 Å 50x4,6 мм и детектировании в SIM-режиме, где чёрным цветом обозначен суммарный сигнал всех сигналов в режиме SIM, синим цветом – 607,1; красным – 455,5; зеленым – 909,6

Снижение начальной объемной доли элюента В с 5% до 2% позволило добиться незначительного удерживания НЕР-1 на колонке, однако наблюдался широкий несимметричный пик. Замена элюента А на формиатный буфер не произвела положительного эффекта.

Таким образом, в связи с доказанным слабым удерживанием нативного НЕР-1 на колонке при анализе методом ОФ-ВЭЖХ и низкой селективностью детектирования в SIM-режиме было принято решение о необходимости прибегнуть к дериватизации молекулы НЕР-1. Данные коррелируют с потенциальными сложностями при работе с гидрофильными пептидами в ОФ-ВЭЖХ [132], а также демонстрируют, что высокоселективный и чувствительный метод MRM необходим для создания методики количественного определения НЕР-1 [159, 160].

3.2. Дериватизация исследуемого тетрадекапептида

После изучения научной литературы, были выбраны восемь дериватирующих агентов. Они широко доступны и используются для дериватизации аминов, аминокислот и пептидов, а также для защиты аминокрупп в органическом синтезе.

В качестве дериватирующих агентов были опробованы:

- диметиламинонафтален-5-сульфонилхлорид (дансилхлорид) (моноизотопная масса реагирующей группы 234,05887 Да) [85];
- 4-толуолсульфонилхлорид (тозилхлорид) (моноизотопная масса реагирующей группы 155,01668 Да) [189];
- фенилизотиоцианат (ФИТЦ) (моноизотопная масса реагирующей группы 135,01427 Да) [190, 191];
- *N*-(9Н-флуорен-2-илметокси)сукцинимид (Fmoc-OSu) (моноизотопная масса реагирующей группы 223,07590 Да);
- ди-трет-бутилдикарбонат (Вос-ангидрид) (моноизотопная масса реагирующей группы 101,06025 Да);
- *N*-(бензилоксикарбонилокси)сукцинимид (Cbz-OSu) (моноизотопная масса реагирующей группы 135,04460 Да);
- бензойный ангидрид (моноизотопная масса реагирующей группы 105,03404 Да);
- пропионовый ангидрид (моноизотопная масса реагирующей группы 57,03404 Да) [192, 193, 194].

Все рассматриваемые вещества в определенных условиях способны взаимодействовать с аминокруппами НЕР-1. Наиболее вероятны реакции с *N*-концевой аминокруппой и аминокруппой боковой цепи лизина, в то время как взаимодействие остатков аргинина с дериватирующими реагентами высокой основности фрагментов гуанидина при значении рН менее 10 нехарактерно [194]. Для всех дериватизованных продуктов данные предположения подтвердились на

практике, и ни в одном случае нами не наблюдались более чем четырежды замещенные производные – три с остатками лизина, и одно на N-конце.

Взаимодействие НЕР-1 с дансилхлоридом, тозилхлоридом и ФИТЦ-реагентом осуществляли в среде карбонатного буфера с значением $\text{pH} = 9$ в смешанном водно-органическом растворителе (вода-ацетонитрил 1:1) с последующим нагреванием на водяной бане до $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 30 минут. Хроматографическое разделение для всех производных проводилось на колонке Jupiter 5 мкм C18 300 Å 50x4,6 мм, с условиями элюирования, аналогичными как для SIM-режима. Детектирование проводилось в режиме полного ионного тока при положительной ESI и напряжении на капилляре 5 кВ. При наличии информативного масс-спектра квазимолекулярных ионов-предшественников использовали режим сканирования ионов-продуктов для полученных m/z .

В реакции с дансилхлоридом в смеси продуктов обнаружены три- и тетразамещённые производные НЕР-1. Тетрадансилированное производное НЕР-1 представлено на Рисунке 3.3. Наблюдаемые масс-спектры совпадали с теоретически рассчитанными (См. приложение Г, Рисунок Г.1, Рисунок Г.2; См. приложение Д, Таблица Д.1).

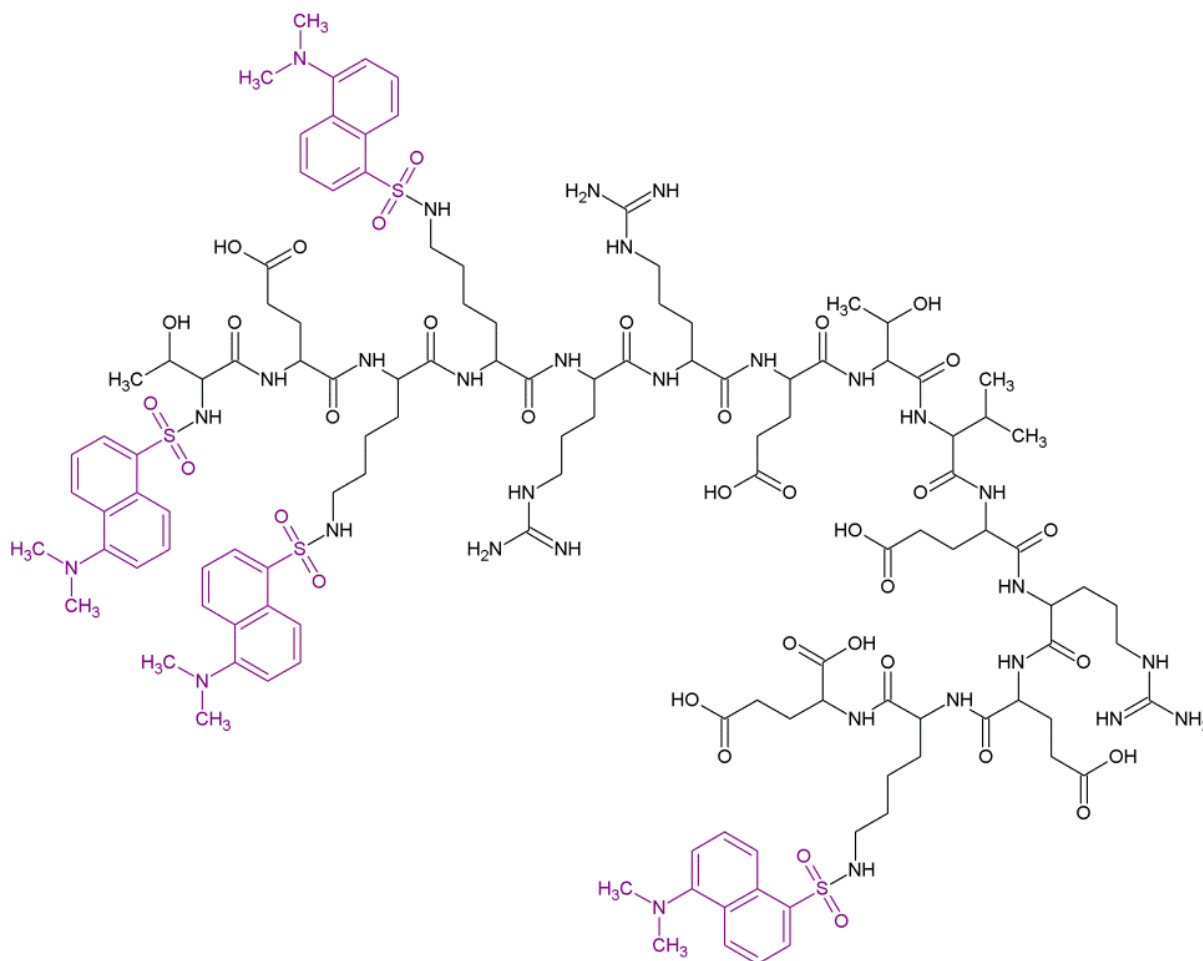


Рисунок 3.3 – 1,3,4,13-тетрадансилированное производное NEP-1

Как и в случае нативного NEP-1, для многозарядных ионов дансилированных производных не удалось подобрать условия фрагментации и получить MRM-переходы, в связи с чем данный дериватизатор не был выбран итоговым.

Для тетратозилированных производных (Рисунок 3.4) наблюдалась незначительная фрагментация и удалось подобрать MRM-переходы соединения (См. приложение Г, Рисунки Г.3, Г.4; См. приложение Д, Таблица Д.2). Вместе с тем, было отмечено, что соотношение три- и тетратозилированных производных в реакционной смеси трудно контролируется, а при попытках проведения дериватизации NEP-1 тозилхлоридом в модельных образцах плазмы крови человека с прибавлением стандартного раствора NEP-1 не удалось обнаружить целевые производные. Таким образом, реакция NEP-1 с тозилхлоридом представляется трудноуправляемой, а её проведение в присутствии биологической

матрицы затруднено, в связи с чем было продолжено рассмотрение реакций дериватизации НЕР-1 иными реагентами.

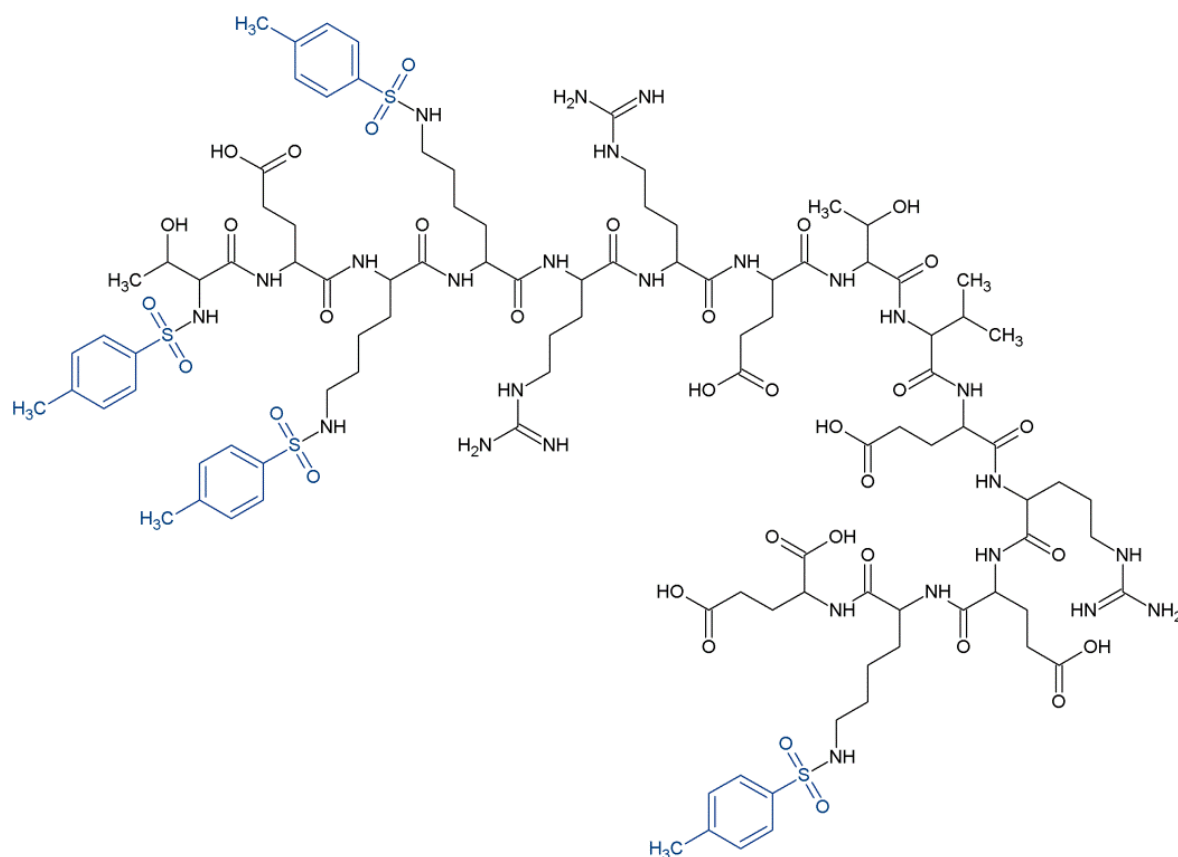


Рисунок 3.4 – 1,3,4,13-тетратозилированное производное НЕР-1

При взаимодействии НЕР-1 с ФИТЦ-реагентом (Рисунок 3.5) наблюдались те же особенности и проблемы, что и в случае тозилхлорида, в связи с чем дальнейшая работа с ФИТЦ-производными была признана нецелесообразной (См. приложение Г, Рисунки Г.5 – Г.7; См. приложение Д, Таблица Д.3).

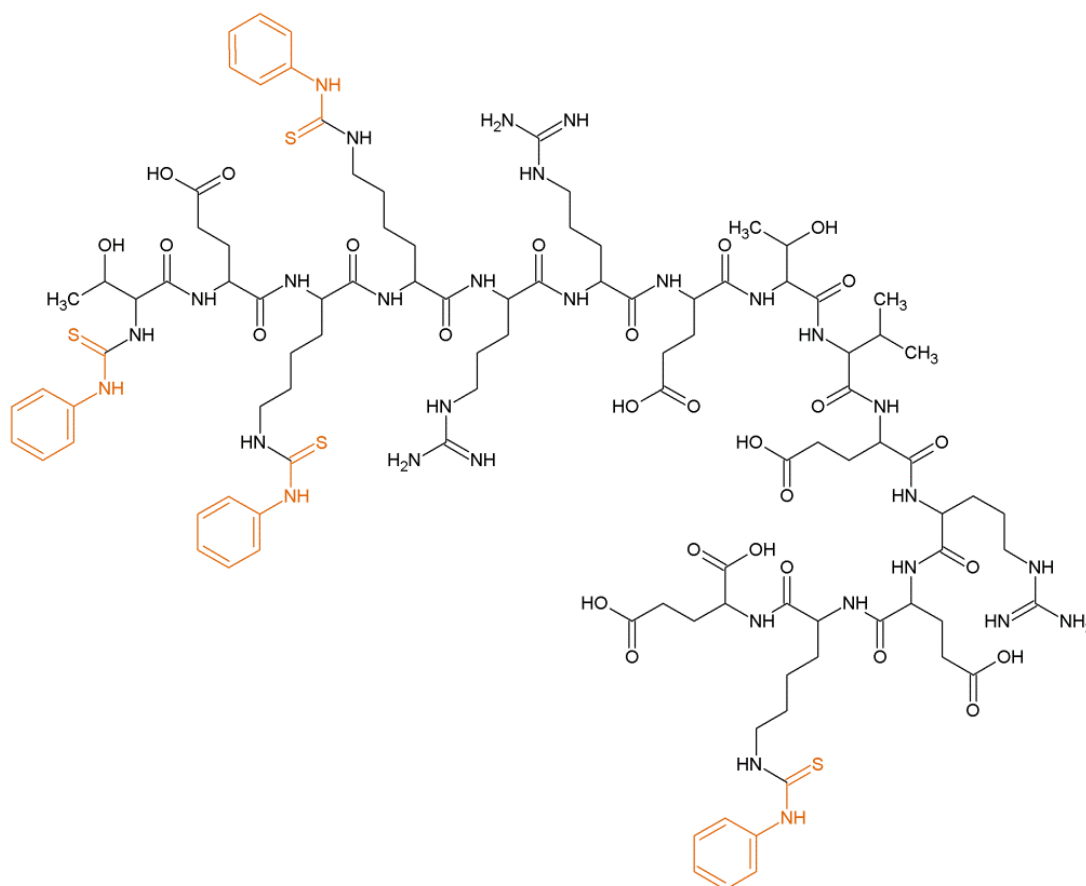


Рисунок 3.5 – 1,3,4,13-тетра-ФИТЦ производное NEP-1

Взаимодействие NEP-1 с Fmoc-OSu, Вос-ангидридом и Cbz-OSu проводили в среде триэтиламина ($\text{pH} = 9$) в темноте в течение 30 мин. Мы идентифицировали производные Fmoc-OSu, Вос-ангидрида и Cbz-OSu как моно-, ди-, три- и тетразамещенные соединения (Рисунки 3.6-3.8; См. приложение Г, Рисунки Г.8 – Г.19, См. приложение Д, Таблицы Д.4 – Д.6). Четырехзарядные ионы тетразамещённых производных фрагментировались наиболее эффективно, и для двух из них мы разработали MRM (Вос-ангидрид: $740,30 \rightarrow 57,05$; $740,30 \rightarrow 84,05$; $740,30 \rightarrow 129,00$; $740,30 \rightarrow 606,90$; Cbz-OSu: $785,40 \rightarrow 91,05$; $1178,00 \rightarrow 1504,40$). Однако интенсивность сигнала детектора была приемлемой только при относительно высоких концентрациях NEP-1. Как и в случае с ранее обсуждавшимися реагентами, мы не достигли оптимальных условий реакции для получения стабильного выхода целевых тетразамещённых производных.

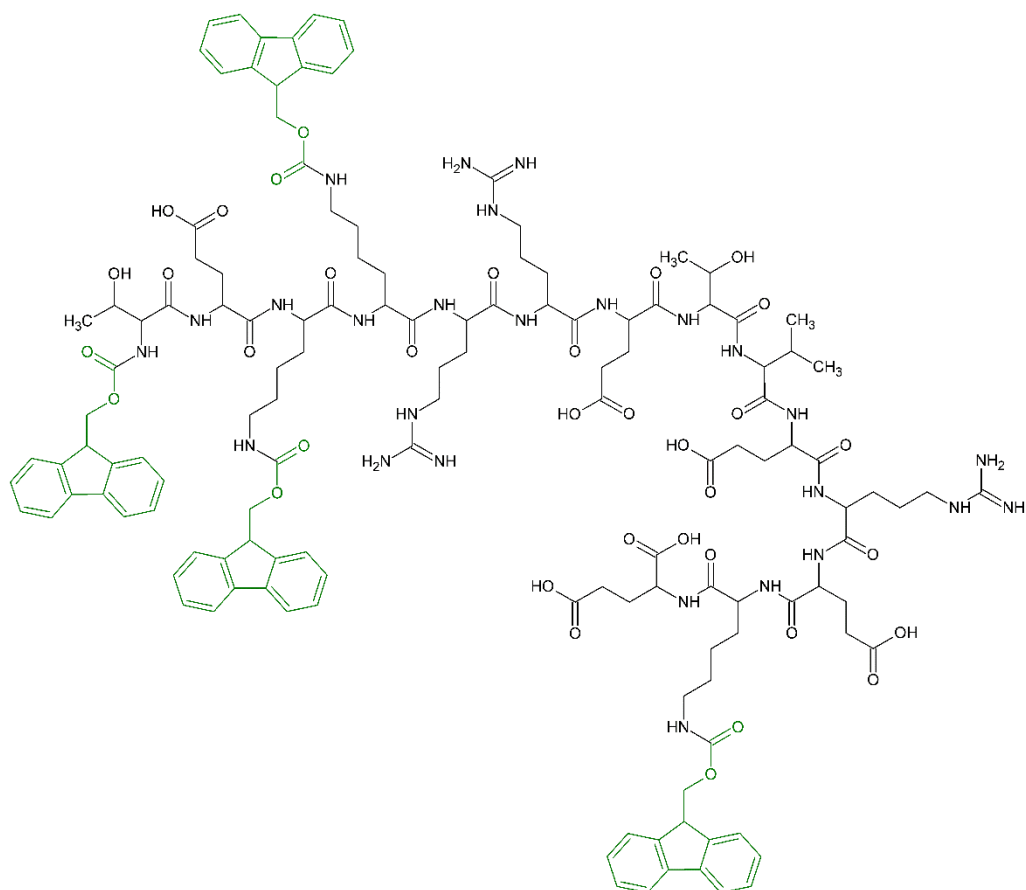


Рисунок 3.6 – 1,3,4,13-тетра-Фмос производное НЕР-1

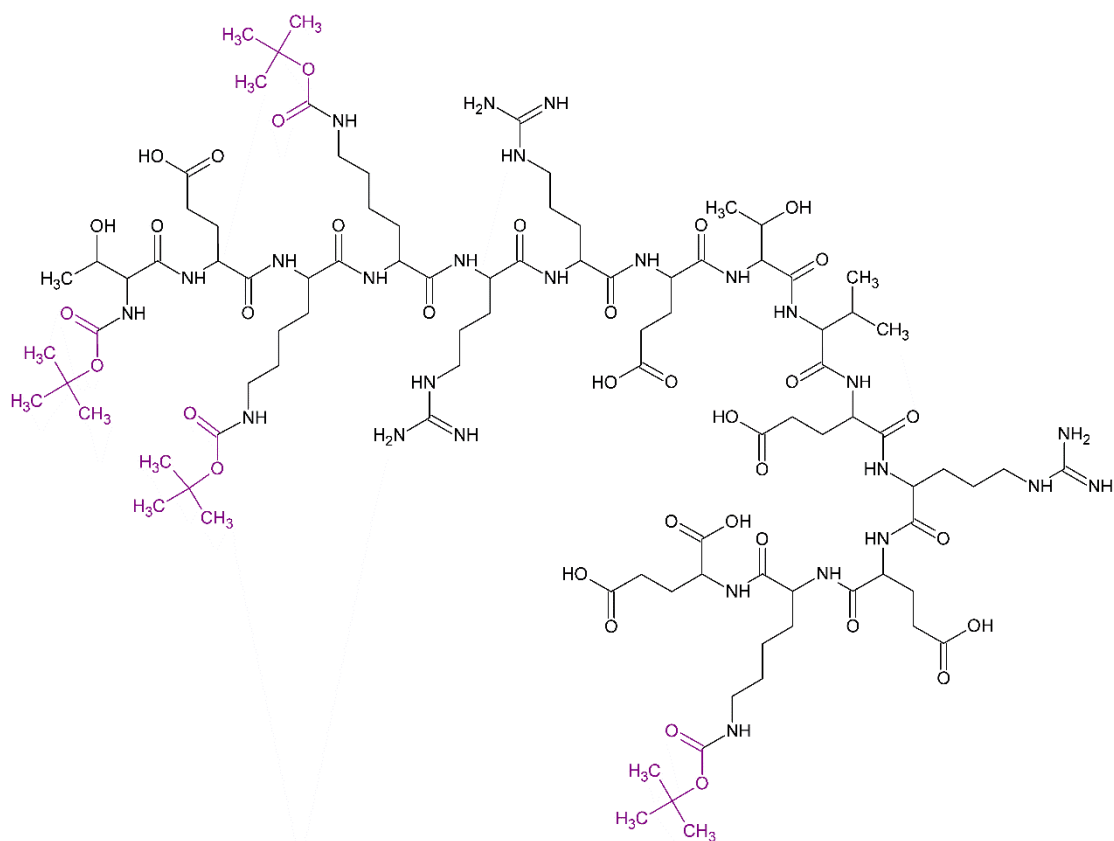


Рисунок 3.7 – 1,3,4,13-тетра-Вос производное НЕР-1

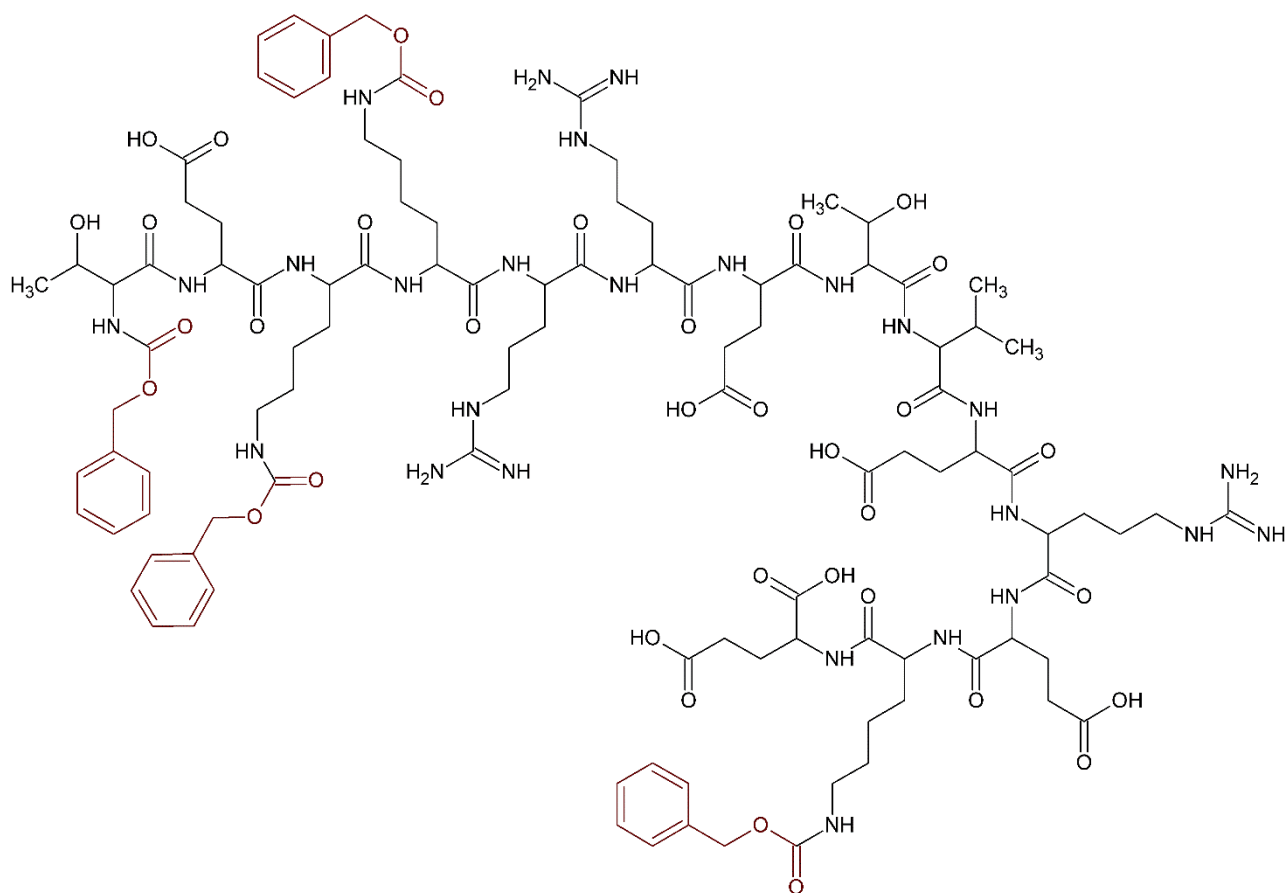


Рисунок 3.8 – 1,3,4,13-тетра-Cbz производное NEP-1

Дериватизацию бензойным ангидридом проводили при комнатной температуре в течение ночи (12-16 часов). Среди продуктов реакции обнаружили моно-, ди-, три- и тетразамещенные производные пептидов (Рисунок 3.9), но их квазимолекулярные ионы, по-видимому, не подвергались фрагментации в ячейке столкновений (См. приложение Г, Рисунки Г.20 – Г.23; См. приложение Д, Таблица Д.7).

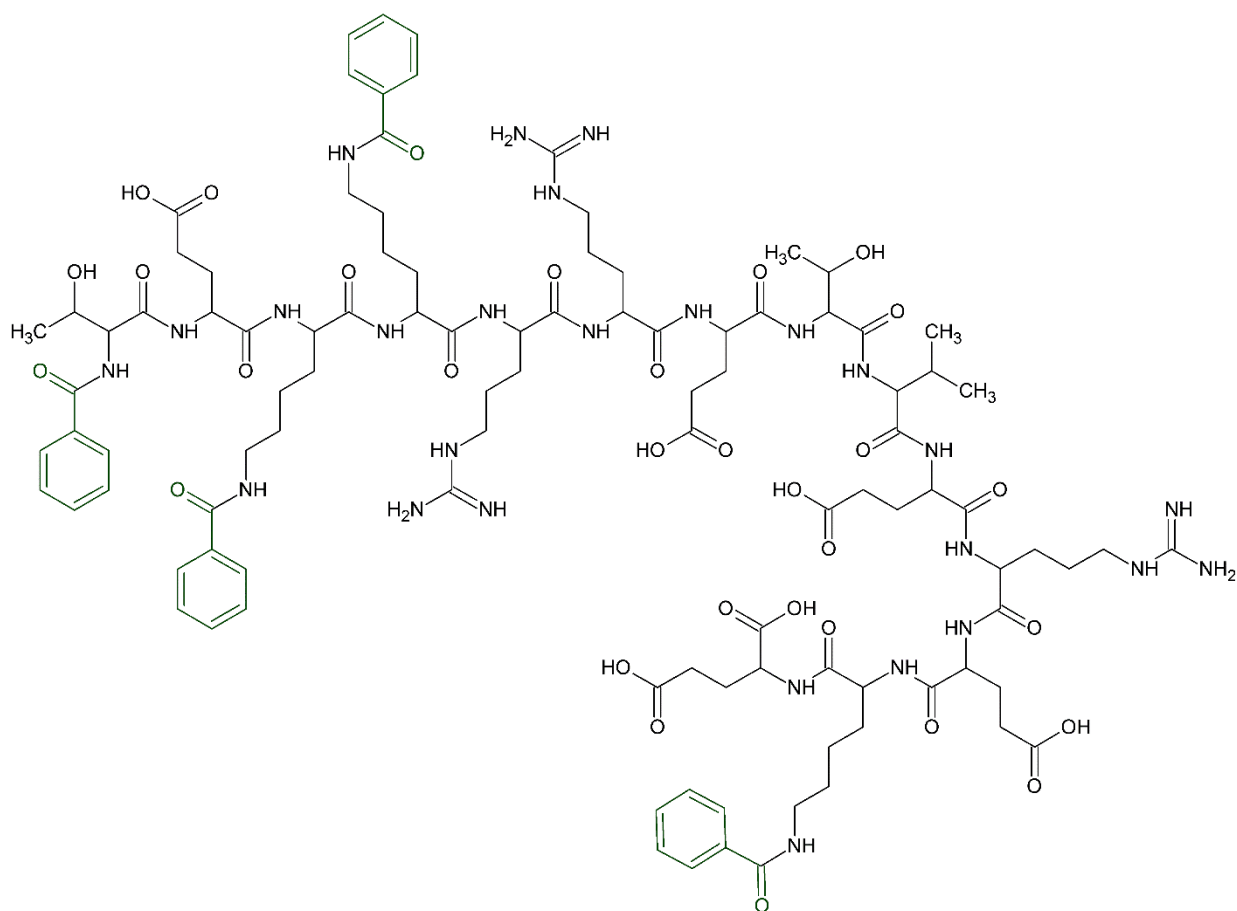


Рисунок 3.9 – 1,3,4,13-тетрабензоильное производное НЕР-1

При взаимодействии НЕР-1 с пропионовым ангидридом было преимущественно получено три- и тетразамещённое производное (Рисунок 3.10 – 3.12). Для данного вещества удалось получить масс-спектр, совпадающий с расчётным (Таблица 3.3), к тому же для многозарядных ионов тетрапропионилированного производного наблюдалась устойчивая фрагментация (Рисунок 3.13), что позволило подобрать и оптимизировать условия детектирования в MRM-режиме.

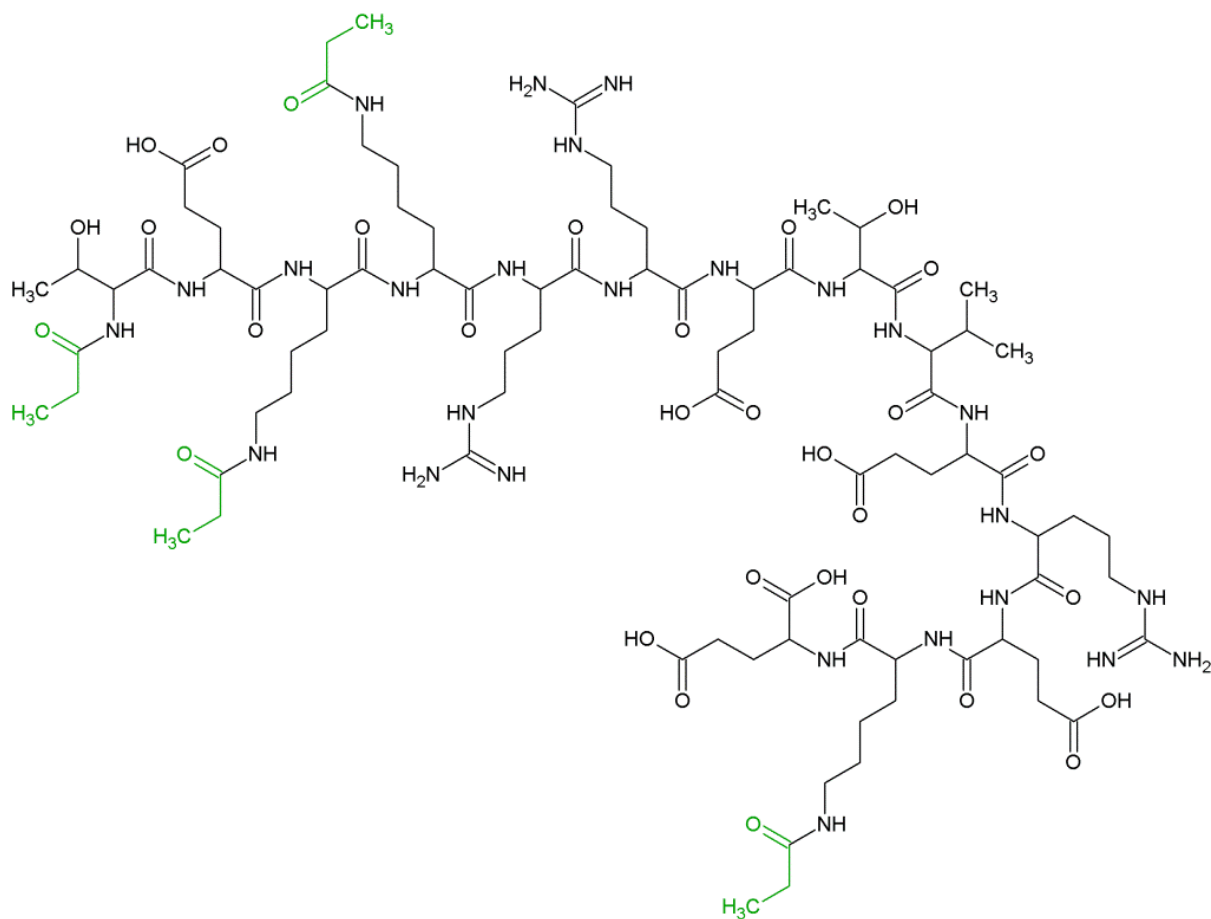


Рисунок 3.10 – 1,3,4,13-тетрапропионилированное производное НЕР-1

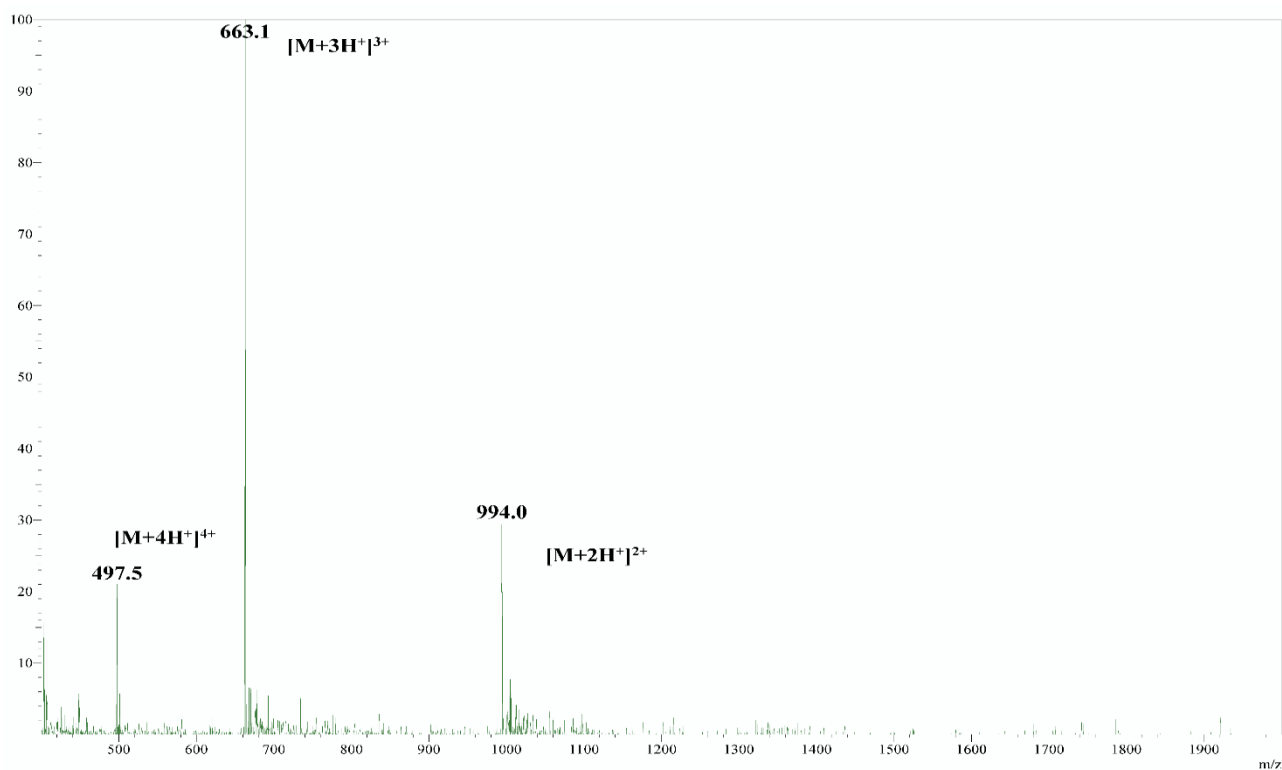


Рисунок 3.11 – Масс-спектр трипропионилированного производного НЕР-1

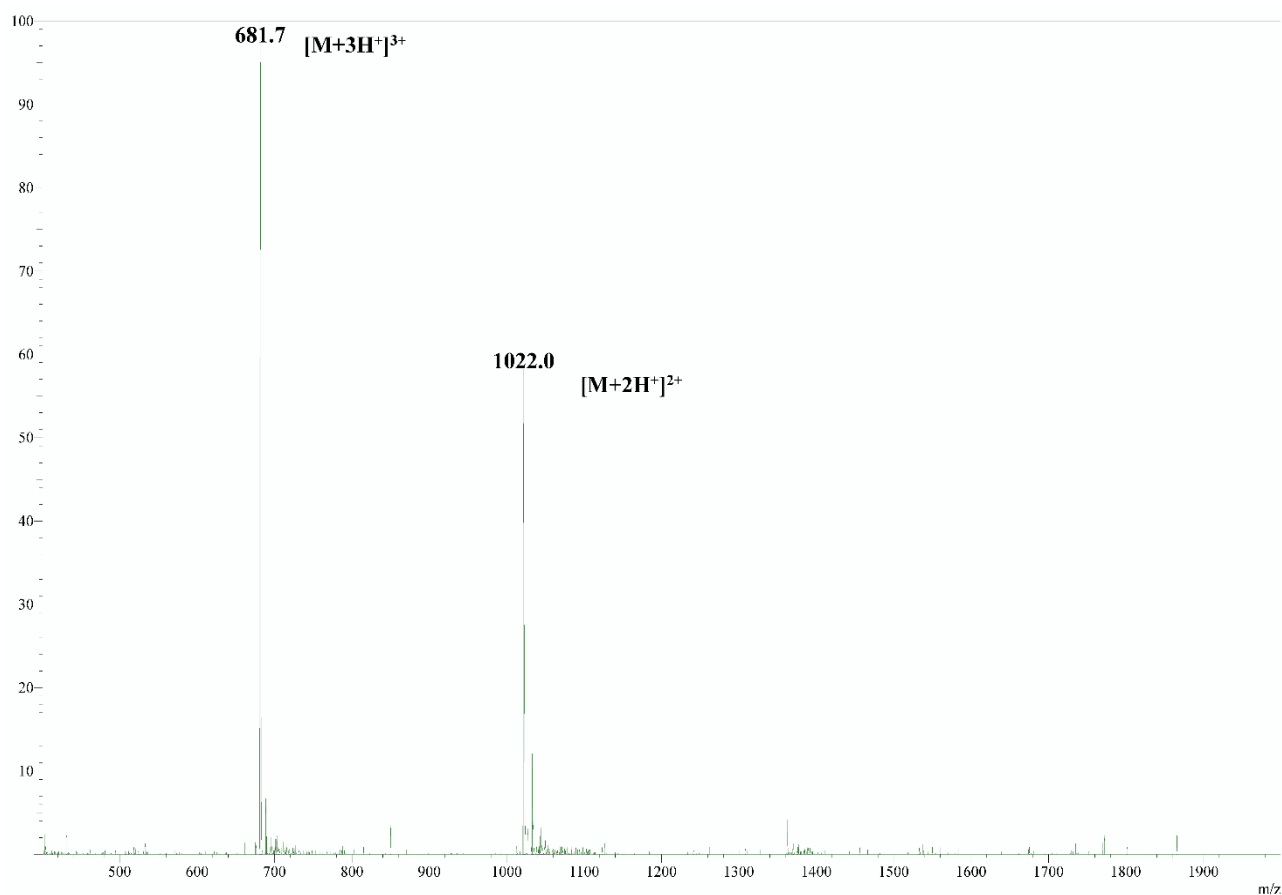


Рисунок 3.12 – Масс-спектр тетрапропионилированного производного НЕР-1

Таблица 3.3 – Расчет m/z пропионилированных производных НЕР-1

Пропионилированное производное, m/z						
Заряд молекулы	1	2	3	4	5	6
Дериватизованные группы						
1	1874,0	937,5	625,3	469,3	375,6	313,2
2	1930,0	965,5	644,0	483,3	386,8	322,5
3	1986,1	993,5	662,7	497,3	398,0	331,8
4	2042,1	1021,5	681,4	511,3	409,2	341,2
5	2098,1	1049,6	700,0	525,3	420,4	350,5
6	2154,1	1077,6	718,7	539,3	431,6	359,9
7	2210,2	1105,6	737,4	553,3	442,8	369,2

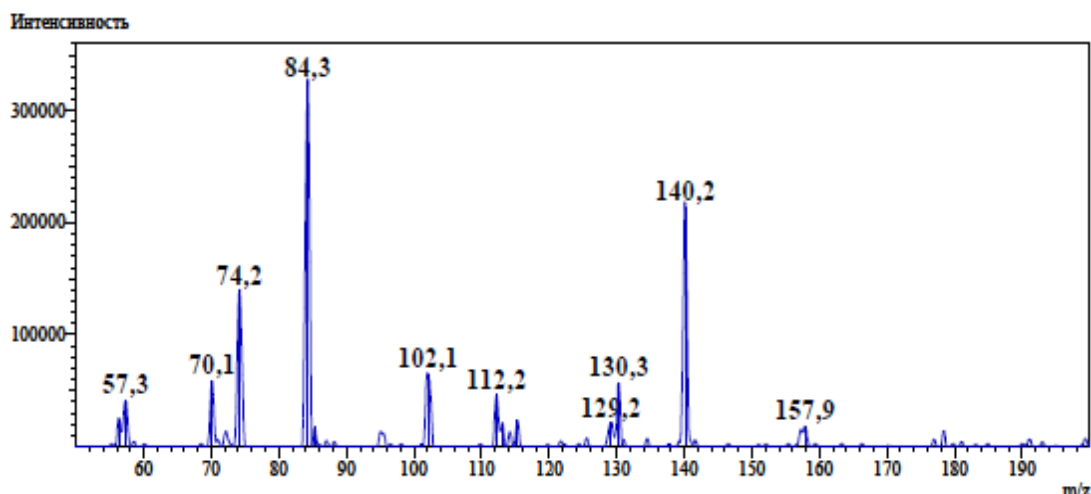


Рисунок 3.13 – Масс-спектр фрагментации иона m/z 681,6 тетрапропионилированного производного НЕР-1

Таким образом, благодаря дериватизации удалось разработать MRM-переход для высокочувствительного количественного определения. Далее оптимизировали условия хроматографического разделения и пробоподготовки биообразца для ОФ ВЭЖХ.

3.3. Оптимизация пробоподготовки исследуемого тетрадекапептида для плазмы крови человека

С целью оптимизации хроматографического разделения дериватизованного НЕР-1 были использованы колонки с октадецильной фазой разных производителей: Jupiter C18 4,6*50 мм, 5 мкм (Phenomenex, США), выбранная изначально из-за большего среднего размера пор, Zorbax SB-C18 150 мм (Agilent Technologies, США) $\times$ 2,1 мм, с размером частиц 5 мкм и XBridge C18 4,6*50 mm, 5 μ m (Waters, США). При одинаковом режиме элюирования все три колонки показали удовлетворительное хроматографическое удерживание дериватизованного НЕР-1, однако XBridge обеспечивала лучшее хроматографическое разрешение, разделение от интерферирующих пиков и селективность. В результате колонка XBridge C18 была выбрана для последующей разработки методики.

Параметры градиентного элюирования подбирали экспериментальным путём. Целью подбора было максимальное разделение исследуемого вещества от компонентов матрицы. Начальная концентрация элюента В 10% обеспечивала первичное удерживание веществ в хроматографической системе и быстрое элюирование более гидрофильных соединений. При постепенном увеличении градиента элюента В в течение первых 2 минут анализа до 22% достигалось элюирование НЕР-1 и ВС с наибольшей интенсивностью и симметрией пиков обоих веществ, а также их разделение с липофильными соединениями в образце. За счёт медленного подъема градиента также обеспечивалось наибольшее хроматографическое разделение от интерферирующих пиков, при этом целевые соединения выходили с близким временем удерживания 1,72 для НЕР-1 и 1,93 для ВС. В течение следующих 4 минут происходило элюирование липофильных соединений при подъеме концентрации элюента В до 100% с возвращением до начального значения 10% и уравниванием системы.

На основании анализа литературных данных в качестве первичной пробоподготовки был выбран метод осаждения белков. Сравнивали три наиболее часто используемые варианта осадителей: ацетонитрил, метанол, водный раствор трифторуксусной кислоты.

Процедуру осуществляли следующим образом:

К 200 мкл исследуемого образца с концентрацией в плазме 500 нг/мл добавляли 600 мкл ацетонитрила, либо 600 мкл метанола, либо 200 мкл 50% водного раствора трифторуксусной кислоты. Дериватизацию проводили путем добавления 50 мкл пропионового ангидрида либо в плазме, либо в супернатанте в течение 30 минут. Было обнаружено, что при использовании трифторуксусной кислоты образцы нуждались в повторном центрифугировании из-за образования опалесцирующего раствора супернатанта.

При дериватизации в супернатанте для всех образцов не удалось обнаружить аналитический сигнал пропионилированного НЕР-1.

В случае проведения дериватизации до осаждения белков в плазме, и последующим осаждением метанолом был получен лучший аналитический сигнал.

Проведение реакции при нагревании до 50 °С способствовало более полной дериватизации, что отражалось в значительном возрастании аналитического сигнала. Тем не менее, для дальнейшего повышения степени очистки и чувствительности сигнала было решено дополнительно провести ЖЖЭ хлороформом и сконцентрировать водную фазу путем ее упаривания в токе азота после проведения реакции дериватизации. Разработанная схема пробоподготовки позволила полнее контролировать реакцию дериватизации и получать тетрапропионилированные продукты НЕР-1, без трипропионилированных.

При дальнейшем анализе с использованием осаждения метанолом, ЖЖЭ хлороформом, последующей дериватизацией, упариванием в токе азота и перерастворением был получен многократно возросший аналитический сигнал. Однако, при попытке разработки количественной методики определения НЕР-1 была обнаружена нелинейность сигнала относительно количественного содержания в образце. В то же время, на хроматограмме ВС был обнаружен второй пик со временем удерживания около 2,0 мин.

При изучении сигнала образцов в режиме полного ионного тока на хроматограмме был выявлен побочный продукт с молекулярной массой и фрагментацией, характерной для ВС (2056 Да, m/z 514.9, 686.4, 1029.0). Мы предположили, что повышенные температуры в кислом водно-метанольном растворе вызывают побочную реакцию с карбоксильными группами НЕР-1, и в результате образуется метиловый эфир. Можно предложить два механизма побочной реакции: образование смешанных ангидридов [195, 196] и трансэтерификация [197]. В первом случае пропионовый ангидрид первоначально взаимодействует с карбоксильными группами пептида, и получается смешанный ангидрид, который затем разрушается метанолом с образованием метиловых эфиров [198]. Эта гипотеза подкрепляется наблюдением, что масс-спектр показал соответствие с расчетным масс-спектром метилированного производного тетрапропионилированного НЕР-1, а также идентичной фрагментацией с тетрапропионилированным производным ВС, отличающимся по молекулярной

массе на 14 Да от тетрапропионилированной молекулы НЕР-1, что соответствует по массе добавлению фрагмента CH_2 в структуру.

Для того, чтобы исключить образование побочного продукта, было решено удалить метанол из пробы до момента проведения дериватизации. Для этого было проведено дополнительное упаривание в токе азота при комнатной температуре после ЖЖЭ. Данный этап позволил достигнуть линейности сигнала.

В рамках улучшения селективности методики были оценено влияние значения pH на разных этапах пробоподготовки. Более полное извлечение НЕР-1 из плазмы крови удалось достичь в среде метанола, подкисленного 20 мкл раствора пропионовой кислоты, кроме того, реакция дериватизации при нагревании в кислой среде протекала стабильно. В результате были установлены следующие условия пробоподготовки, хроматографического разделения и детектирования:

К 200 мкл образца прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС, 420 мкл 4,76% раствора пропионовой кислоты в метаноле, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин с относительным центробежным ускорением 15294 g. Далее супернатант переносили в центрифужные микропробирки вместимостью 2 мл, прибавляли 800 мкл хлороформа, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин с относительным центробежным ускорением 15294 g. После центрифугирования отбирали около 200-250 мкл верхнего (водного) слоя жидкости и переносили в центрифужные микропробирки вместимостью 2 мл с последующим упариванием в токе азота при комнатной температуре досуха. К сухому остатку после упаривания добавляли 10 мкл пропионовой кислоты, 5 мкл пропионового ангидрида и 100 мкл смеси ацетонитрил/вода 1:1, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, помещали центрифужную микропробирку на УЗ-баню при температуре 60 °C на 5 минут. Далее образец упаривали в токе азота при температуре 60 °C досуха. К полученному сухому остатку прибавляли 100 мкл воды I типа, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд и переносили

в полипропиленовые вставки в хроматографические вials и помещали в автосамплер хроматографа.

Хроматографическое разделение проводили на колонке XBridge C18 (4,6×50 мм, размер частиц 5 мкм) с предколонкой Phenomenex SecurityGuard™ C18 (4×3,0 мм, 5 мкм) при температуре термостата 40 °С. Подвижная фаза состояла из элюента А (0,1% раствор муравьиной кислоты в воде) и элюента В (0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле). Градиентное элюирование осуществляли при скорости потока 1,0 мл/мин по следующей программе: от 0 до 2 минут содержание элюента В возрастает с 10% до 22%; с 2 до 2,4 минут – с 22% до 100%; с 2,4 до 3,6 минут – изократически 100% В; с 3,6 до 4,1 минут – опускается со 100% до 10% В; с 4,1 до 5,5 минут происходит уравнивание колонки при 10% В. Объём вводимой пробы составляет 7 мкл. Время удерживания дериватизованного НЕР-1 составляет около 1,72 минуты, ВС – около 1,93 минуты.

Детектирование проводили на tandemном масс-спектрометре с тройным квадруполем в режиме положительной ESI. Оптимизированные параметры источника ионизации: распыляющий газ – 3 л/мин, осушающий газ – 20 л/мин, температура блока нагрева – 400 °С, температура линии десольватации – 250 °С, напряжение на капилляре – +5 кВ.

MRM осуществляли для четырёхзарядного иона тетрапропионилированного производного НЕР-1 (m/z 681,30) с регистрацией четырёх ионов-продуктов: 73,95; 84,00; 101,90 и 140,10 m/z .

Аналогичные исследования проводились для ВС. Использовали аналог НЕР-1 с заменой аминокислотного остатка валина на лейцин. Полученные результаты экспериментов были сопоставимы с аналитом, что свидетельствует о близости физико-химических свойств ВС и НЕР-1. В итоге, для ВС также были получены тетрапропионилированные производные, для четырёхзарядных ионов которых (686,00 m/z) были успешно подобраны ионы-продукты 74,10; 84,05; 102,00 и 140,00 m/z .

3.4. Сравнение с другими методиками определения терапевтических пептидов в биологических образцах

Разработка биоаналитических методик для количественного определения пептидных лекарственных средств в биологических образцах определяется характеристикой липофильности пептида и низкой концентрацией *in vivo*. В настоящее время, преимущественно приведены методики для относительно липофильных веществ, для которых применимы отработанные подходы к пробоподготовке и количественному определению.

В работе Е.Н. Фишер и др. приведена разработка и валидация методики для количественного определения бусерилина [199]. При определении бусерилина в плазме крови животных путём экстракции метанолом 1:2 была отмечена сниженная экстракция аналита ацетонитрилом и раствором трихлоруксусной кислоты. Хроматографическое разделение и элюирование проводили с использованием элюентов в виде модифицированного раствора 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле и воды на колонке Jupiter 5 мкм C18, 50 x 4,6 мм 300 Å, а детектирование проводилось в режиме MRM. Линейность градуировочной кривой соблюдается в диапазоне концентраций от 0,5 до 20 нг/мл. Чувствительность была достаточна для фармакокинетических исследований бусерилина без ТФЭ. В качестве ВС был выбран другой терапевтический пептид даларгин [199]. В данной методике был определен пептид со значительно более высоким XLogP (-0,1) [200]. Несмотря на схожий подход на начальном этапе, после пробоподготовки не было сложностей, связанных с удерживанием вещества на колонке Jupiter, также экстракция была достаточной для анализа без дополнительной модификации осадителя. По структуре молекула бусерилина обладает слабовыраженными кислотными и выраженными основными свойствами, представленными гуанидиновой группой аргинина и имидазольным кольцом гистидина. В связи с меньшим числом основных центров немодифицированная молекула бусерилина легче поддаётся фрагментации, что позволило разработать условия MRM режима без дополнительной модификации молекулы.

Таким образом, несмотря на частичную схожесть условий определения, в данной методике не было двух первичных ограничений определения пептида в биологической матрице в низких концентрациях, как для НЕР-1, поскольку для бусерелина для той же колонки и элюентов с начальной концентрацией 5% элюента В обеспечивалось хроматографическое удерживание в ОФ системе, в то время как для НЕР-1 – нет. Также не возникало сложностей в определении MRM-переходов из-за меньшего числа выраженных основных центров, которые повышали бы необходимую для фрагментации энергию соударения.

3.5. Выводы к главе 3

1. Установлено, что нативный пептид НЕР-1 в условиях положительной ESI образует преимущественно многозарядные ионы (m/z 607,1; 455,5; 909,6), однако не дает воспроизводимой фрагментации в режиме MRM и практически не удерживается на ОФ колонках в стандартных условиях градиентного элюирования, что делает определение нативного НЕР-1 методом ВЭЖХ-МС/МС нецелесообразным.

2. Показано, что химическая дериватизация НЕР-1 является необходимым этапом для улучшения хроматографического поведения и масс-спектрометрического детектирования. При сравнении продуктов реакции НЕР-1 с 8 различными дериватирующими агентами (дансилхлоридом, тозилхлоридом, ФИТЦ, Fmoc-OSu, Вос-ангидридом, Cbz-OSu, бензойным ангидридом, пропионовым ангидридом) установлено, что взаимодействие с пропионовым ангидридом происходит максимально полно, контролируемо, и образующиеся тетрапропионилированные производные позволяют наблюдать фрагментацию, демонстрирующую воспроизводимые MRM-переходы.

3. Подобраны первичные условия пробоподготовки для дериватизованных продуктов с пропионовым ангидридом в биообразце плазмы крови человека, обеспечивающие образование легко поддающегося фрагментации тетрапропионилированного производного НЕР-1, включающие этапы осаждения

метанолом, ЖЖЭ хлороформом, упаривания в токе азота с последующей дериватизацией супернатанта и перерастворением.

4. Разработана методика определения НЕР-1 в плазме крови человека методом ОФ-ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором с тройным квадруполом.

ГЛАВА 4. ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИССЛЕДУЕМОГО ТЕТРАДЕКАПЕПТИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС- СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Проведена разработка и валидация методики количественного определения НЕР-1 в плазме крови человека. Для пробоподготовки использовалось сочетание методов осаждения белков плазмы крови раствором пропионовой кислоты в метаноле, ЖЖЭ хлороформом с последующим упариванием и дериватизацией пропионовым ангидридом. Количественное определение проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 5,00 – 1000,00 нг/мл в плазме крови, что позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов НЕР-1.

Валидацию биоаналитической методики проводили в рамках «Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках ЕАЭС» (утверждены решением Совета ЕЭК № 85 от 03.11.2016 г.) [78] и гармонизированного руководства ICH M10 «Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis» (от 25.07.2022 г.) [79].

Методика была валидирована по следующим параметрам:

1. селективность и специфичность;
2. эффект матрицы;
3. градуировочная кривая (линейность);
4. правильность (на уровнях внутри цикла, между циклов);
5. прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклов);
6. степень извлечения;
7. нижний предел количественного определения и предел обнаружения;
8. перенос пробы;

9. стабильность (стабильность исходных стандартных растворов аналита; краткосрочная стабильность («настолярная» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналита; долгосрочная стабильность аналита в матрице.

4.1. Селективность и специфичность

Определение селективности (англ. *S*, selectivity) и специфичности проводили с целью подтверждения отсутствия влияния эндогенных компонентов биологической матрицы и других компонентов образца на определение аналита и внутреннего стандарта. «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках ЕАЭС» определяют селективность как «способность биоаналитической методики определять и различать исследуемое анализируемое вещество и внутренний стандарт в присутствии компонентов, которые могут содержаться в образце», а специфичность как «способность биоаналитической методики однозначно определять анализируемое вещество в присутствии других соединений (эндогенных или экзогенных) в биологическом образце» [78]. Следует отметить, что согласно данным «Правил», специфичность определяется только в случае валидации методов связывания лиганда. В то же время ICH M10 расширяет определение специфичности, раскрывая понятие «другие соединения» как «родственные аналиту вещества (например, вещества, структурно сходные с аналитом, метаболиты, изомеры, примеси, продукты распада, образующиеся в процессе пробоподготовки, или сопутствующие лекарственные препараты, которые, как ожидается, будут применяться при лечении пациентов с предполагаемым показанием)». Согласно гармонизируемому руководству, специфичность следует определять в каждой методике, а для ВЭЖХ-МС также есть уточнение, что для оценки влияния таких веществ оценка может включать сравнение молекулярной массы потенциально мешающего родственного вещества с анализируемым веществом и хроматографическое разделение родственного вещества от анализируемого вещества. Согласно критериям приемлемости (КП)

для обоих источников, сигнал в холостом образце (англ. Blank) на времени удерживания аналита не должен превышать 20% от сигнала аналита в образце НПКО, а сигнал на времени удерживания внутреннего стандарта не должен превышать 5% от сигнала внутреннего стандарта в соответствующих образцах [78, 79]. Анализируют не менее шести индивидуальных источников матрицы. А согласно ICH M10, дополнительно также анализируют не менее 1 хилезного и гемолизного источника матрицы [79]. Сравнивают хроматограммы холостых образцов, представляющих собой матрицу без исследуемого вещества и ВС, «нулевого» образца (англ. Cal_0), где в матрицу добавляют только внутренний стандарт, и образцов КК, содержащих аналит на уровне НПКО с добавлением внутреннего стандарта [78]. Результаты анализа восьми индивидуальных источников матрицы, включая 1 хилезный и 1 гемолизный, представлены в Таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Оценка селективности методики определения НЕР-1

Код пробы	Значение Площади		Отношение площадей, %		Соответствие КП
	НЕР-1	ВС	НЕР-1	ВС	
Cal_0	0	28687	0,00	-	Да
S_LLOQ_01	537	32071	-	-	-
S_LLOQ_02	682	42397	-	-	-
S_LLOQ_03	287	17670	-	-	-
S_LLOQ_04	725	42228	-	-	-
S_LLOQ_05	715	44480	-	-	-
S_LLOQ_06	726	43062	-	-	-
S_LLOQ_hem	776	46235	-	-	-
S_LLOQ_lip	712	37327	-	-	-
Blank_01	0	1146	0,00	3,57	Да
Blank_02	77	727	11,29	1,71	Да
Blank_03	0	677	0,00	3,83	Да
Blank_04	65	520	8,97	1,23	Да
Blank_05	0	441	0,00	0,99	Да
Blank_06	0	756	0,00	1,76	Да
Blank_hem*	0	823	0,00	1,78	Да

Продолжение Таблицы 4.1

Blank_lip*	26	532	3,65	1,43	Да
Примечение: * – образцы гемолизной (hem) и хилезной (lip) интактной плазмы из индивидуальных источников матрицы					

Определяли параметры пригодности хроматографической системы для расчёта параметров специфичности. Для расчёта использовали площади образцов градуировочной кривой и образцов КК. Результаты представлены в Таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Оценка специфичности методики определения НЕР-1

Код пробы	N*		TF*		R _s *	
	НЕР-1	BC	НЕР-1	BC	НЕР-1	BC
Cal_4_1	5001	6928	1,11	1,22	-	-
Cal_4_2	5211	6584	1,09	1,21	-	-
Cal_4_3	4902	6716	1,21	1,20	-	-
Cal_4_4	4480	6996	1,28	1,21	-	-
Cal_4_5	4793	7227	1,27	1,24	-	-
Cal_4_6	4920	6785	1,14	1,18	-	-
Cal_4_7	4715	6924	1,25	1,25	-	-
Cal_4_8	5026	7319	1,12	1,17	-	-
QC_4_RE_L_hem	4452	6983	1,11	1,29	-	-
QC_4_RE_M_hem	4921	6598	1,09	1,24	-	-
QC_4_RE_H_hem	4667	6559	1,13	1,24	-	-
QC_4_RE_L_lip	4435	6653	1,23	1,26	-	-
QC_4_RE_M_lip	4954	6922	1,06	1,21	-	-
QC_4_RE_H_lip	4783	7200	1,22	1,15	-	-
Среднее	4804	6885	1,17	1,22	-	-
Норма	±10%				Не менее 2	
Нижняя граница	4324	6197	1,05	1,10	2	2
Верхняя граница	5285	7574	1,28	1,34	-	-
Примечение: *N – число теоретических тарелок, TF – фактор асимметрии пика, R _s – разрешение между пиками. В случае появления посторонних пиков на хроматограммах образцов плазмы крови добровольцев R _s должен составлять не менее 2. (Cal_x_y – ГО, приготовленный на смешанной матрице, где x – номер валидационного цикла, а y – номер уровня ГО; QC_x_RE y_hem(lip) – образцы КК, приготовленные из гемолизной (hem) или хилезной матрицы (lip), а y – номер уровня КК)						

Полученные результаты соответствовали критериям приемлемости.

4.2. Эффект матрицы

Эффект матрицы оценивают для выявления возможного влияния компонентов биологической матрицы на ионизацию аналита в масс-спектрометре, которое может проявляться в виде ионной супрессии или ионного усиления. Рассчитывают нормализованный фактор матрицы (Mf) исследованного вещества по внутреннему стандарту (Mf^H). Согласно правилам ЕАЭС относительное стандартное отклонение (RSD) Mf^H из разных источников не должно превышать 15%. Влияние матрицы ВС определяли для концентрации 125,00 нг/мл в плазме крови. ICH M10 допускает упрощенную оценку эффекта матрицы через анализ образцов КК без обязательного расчета числового фактора матрицы, где для шести различных источников точность и прецизионность должны не превышать 15%.

В рамках валидации мы определили эффект матрицы для 8 источников, включая гемолизную и хилёзную матрицы (Таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Влияния биологической матрицы – плазмы крови – при определении НЕР-1 на уровнях L и H и ВС

Название образца	Интенсивность сигнала		Название образца	Интенсивность сигнала		Mf НЕР-1	Mf ВС
	НЕР-1	ВС		НЕР-1	ВС		
W_L_01	1349	28281	SA_L_01	4336	80742	3,21	2,85
W_L_02	1477	28548	SA_L_02	3933	80858	2,66	2,83
W_L_03	1295	27410	SA_L_03	4108	83000	3,17	3,03
W_L_04	1322	27873	SA_L_04	3591	79454	2,72	2,85
W_L_05	1397	29685	SA_L_05	4534	87608	3,25	2,95
W_L_06	1457	28145	SA_L_06	4513	84561	3,10	3,00
W_L_07	1426	28238	SA_L_hem	4175	85358	2,93	3,02
W_L_08	1471	29443	SA_L_lip	3685	77306	2,51	2,63
W_H_01	67067	28426	SA_H_01	210098	76897	3,13	2,71
W_H_02	65351	27794	SA_H_02	207390	77205	3,17	2,78
W_H_03	66236	28267	SA_H_03	194945	77967	2,94	2,76
W_H_04	67989	28611	SA_H_04	209810	79465	3,09	2,78
W_H_05	66816	28927	SA_H_05	211268	79210	3,16	2,74

Продолжение Таблицы 4.3

W_H_06	67195	29872	SA_H_06	204992	83985	3,05	2,81
W_H_07	67755	28007	SA_H_hem	205719	80155	3,04	2,86
W_H_08	68833	29334	SA_H_lip	196511	76768	2,85	2,62
Примечение: W_L(H)_xx – образцы контроля качества на уровнях L или H без влияния биологической матрицы, xx – индивидуальный номер образца; SA_L(H)_xx – образцы контроля качества, приготовленный из интактной плазмы крови человека, на на уровнях L или H без влияния степени извлечения, где xx – индивидуальный номер образца							

В данной методике эффект матрицы обеспечивает усиление ионизации примерно в 3 раза как для НЕР-1, так и для ВС. Исходя из полученных значений Mf был рассчитан Mf^H . Данные расчетов представлены в Таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Нормализованное по ВС влияние биологической матрицы – плазмы крови – при определении НЕР-1 на уровнях L и H

№	Mf НЕР-1 (L)	Mf ВС (L)	Mf НЕР- 1 (H)	Mf ВС (H)	Mf^H (L)	Mf^H (H)
1.	3,21	2,85	3,13	2,71	1,13	1,16
2.	2,66	2,83	3,17	2,78	0,94	1,14
3.	3,17	3,03	2,94	2,76	1,05	1,07
4.	2,72	2,85	3,09	2,78	0,95	1,11
5.	3,25	2,95	3,16	2,74	1,10	1,15
6.	3,10	3,00	3,05	2,81	1,03	1,09
7.	2,93	3,02	3,04	2,86	0,97	1,06
8.	2,51	2,63	2,85	2,62	0,95	1,09
Среднее					1,01	1,11
RSD, %					7,08	3,51

Ионное усиление за счёт эффекта матрицы позволяет получить более четкий аналитический сигнал при одинаковой концентрации НЕР-1. А ВС позволяет уравновесить сигнал, и рассчитанный Mf^H приближается к 1, RSD соответствует норме.

4.3. Градуировочная кривая

Критерии приемлемости и математические требования к калибровке в гармонизированном руководстве, и в правилах ЕАЭС совпадают. Анализ градуировочной кривой, соответствующей уровням, указанным в разделе 2.3.2. «Рабочие стандартные растворы» проводили в течение 10 циклов. По полученным значениям были построены градуировочные графики в координатах отношение площади пика НЕР-1 к площади пика ВС от отношения концентрации НЕР-1 к концентрации ВС в плазме крови. Расчет параметров линейной градуировочной зависимости проводили с введением весового коэффициента $1/C^2$. Отклонения концентраций градуировочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений соответствуют критериям приемлемости [78]. Градуировочная кривая и отклонения концентраций НЕР-1 в градуировочных образцах от их номинальных значений (Е) для валидационного цикла 1 представлены на Рисунке 4.1. и в Таблице 4.5.

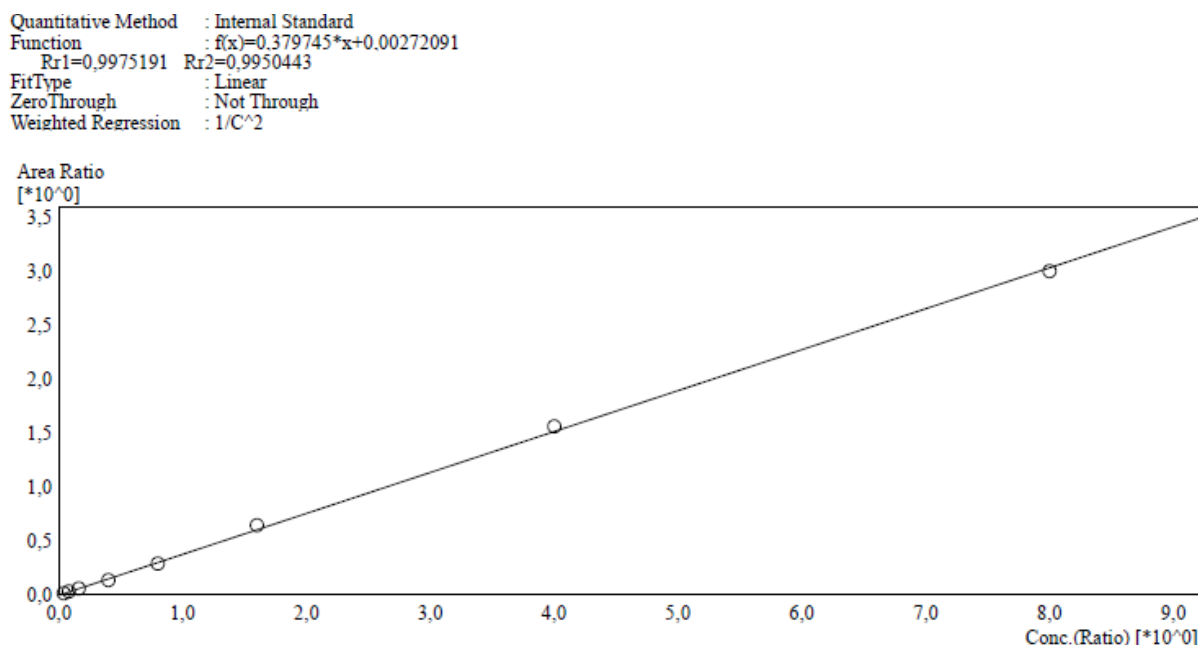


Рисунок 4.1 – Градуировочный график первого валидационного цикла

Таблица 4.5 – Оценка линейности определения концентраций НЕР-1 в градуировочных образцах в первом цикле

Название образца	Концентрация фактическая, нг/мл	Концентрация измеренная, нг/мл	Е, %	КП Е, %
Cal_1	5,00	4,82	-3,60	от -20 до 20
Cal_2	10,00	10,90	9,01	от -15 до 15
Cal_3	20,00	20,08	0,39	
Cal_4	50,00	45,15	-9,69	
Cal_5	100,00	95,71	-4,29	
Cal_6	200,00	212,69	6,35	
Cal_7	500,00	514,83	2,97	
Cal_8	1000,00	988,77	-1,12	

4.4. Правильность и прецизионность

Оценку внутрицикловой и межцикловой прецизионности проводили на основе анализа четырех последовательностей, каждая из которых включала по 5 образцов КК НЕР-1 каждого уровня концентрации. Испытания выполняли в ходе 1, 2, 3 и 5 аналитических последовательностей (Таблица 4.6).

Таблица 4.6 – Показатели внутрицикловой и межцикловой правильности, а также прецизионности методики, рассчитанные по результатам 1, 2, 3 и 5-го аналитических циклов

Валидационный цикл	Порядковый номер индивидуального образца	Теоритическое значение, нг/мл				
		5,00	15,00	30,00	300,00	750,00
		Фактическое значение, нг/мл				
1	1	5,55	16,30	31,56	315,27	790,58
	2	4,89	13,66	30,47	301,63	806,33
	3	4,37	17,19	26,15	309,59	776,13
	4	5,54	12,77	27,15	333,45	793,97
	5	4,42	15,95	28,09	332,21	789,39
	Среднее, нг/мл (n=5)	4,95	15,17	28,68	318,43	791,28
	RSD, % (n=5)	11,67	12,33	7,91	4,40	1,37
	Е, % (n=5)	-0,96	1,16	-4,40	6,14	5,50

Продолжение Таблицы 4.6

2	1	4,25	16,33	32,01	320,39	759,84
	2	5,79	16,21	33,13	323,91	812,53
	3	5,01	16,16	30,23	306,12	739,85
	4	4,80	14,59	28,70	314,43	785,31
	5	4,82	14,15	28,71	320,12	716,65
	Среднее, нг/мл (n=5)	4,94	15,49	30,55	317,00	762,84
	RSD, % (n=5)	11,24	6,67	6,48	2,20	4,92
	E, % (n=5)	-1,28	3,24	1,85	5,67	1,71
4	1	5,32	13,98	33,47	301,71	774,94
	2	5,31	13,92	32,69	305,24	759,90
	3	4,85	16,17	33,57	293,38	783,99
	4	4,47	16,54	32,85	296,53	791,10
	5	5,11	16,12	32,79	282,63	758,78
	Среднее, нг/мл (n=5)	5,01	15,35	33,07	295,90	773,74
	RSD, % (n=5)	7,16	8,39	1,24	2,95	1,85
	E, % (n=5)	0,24	2,30	10,24	-1,37	3,17
5	1	5,54	13,79	26,66	292,93	746,05
	2	5,13	16,64	32,74	267,16	810,59
	3	5,29	14,97	32,91	280,04	778,96
	4	5,78	13,19	31,65	327,14	824,76
	5	4,95	13,03	28,19	327,12	799,80
	Среднее, нг/мл (n=5)	5,34	14,32	30,43	298,88	792,03
	RSD, % (n=5)	6,22	10,48	9,32	9,15	3,87
	E, % (n=5)	6,74	-4,51	1,44	-0,37	5,60
Среднее, нг/мл (n=20)		5,06	15,08	30,68	307,55	779,97
RSD, % (n=20)		9,13	9,38	8,13	5,95	3,45
E, % (n=20)		1,19	0,55	2,28	2,52	4,00

По основным числовым критериям правильности и прецизионности гармонизированное руководство и правила ЕАЭС полностью совпадают. Однако ИСН М10 вводит несколько рекомендаций и требований, о которых в правилах

ЕАЭС не упоминается. Рекомендуется дополнительно определить точность и прецизионность метода на протяжении цикла, соответствующего предполагаемому аналитическому циклу. Для этого как минимум в одной из валидационных серий количество образцов КК должно быть равно или превышать размер планируемой серии реальных образцов исследования. Запрещается исключать отдельные точки КК из расчета правильности и прецизионности, если для этого нет зафиксированной технической ошибки, что увеличивает прозрачность обработанных статистических данных. В нашем случае аналитический цикл был коротким и не должен был превышать длину валидационных циклов с оцененной точностью и прецизионностью, в связи с чем не проводили расширенный цикл оценки точности и прецизионности. Полученные результаты соответствовали критериям приемлемости.

4.5. Степень извлечения

ICH M10 исключило степень извлечения (СИ) из списка обязательных параметров валидации, тогда как правила ЕАЭС требуют ее количественного расчета на нескольких уровнях концентрации. В рамках валидации анализировали по восемь образцов из различных источников, включая гемолизный и хилёзный. Была найдена степень извлечения для НЕР-1 и ВС, а также нормализованная степень извлечения НЕР-1 относительно степени извлечения ВС (Таблица 4.7). Относительное стандартное отклонение рассчитанных значений степени извлечения аналита из биологических матриц не должно превышать 15%.

Таблица 4.7 – Относительное стандартное отклонение степени извлечения НЕР-1 из плазмы крови различных интактных источников

Уровень	Источник биологической матрицы	Площадь пика				СИ		
		Образцы SA		Образцы RE		АН	ВС	Норм.
		НЕР-1	ВС	НЕР-1	ВС			
L	1	4336	80742	2418	45398	0,56	0,56	0,99
	2	3933	80858	2036	43652	0,52	0,54	0,96
	3	4108	83000	1950	44345	0,47	0,53	0,89

Продолжение Таблицы 4.7

L	4	3591	79454	1828	41423	0,51	0,52	0,98
	5	4534	87608	2273	48167	0,50	0,55	0,91
	6	4513	84561	2027	43553	0,45	0,52	0,87
	7 (hem)	4175	85358	2313	49900	0,55	0,58	0,95
	8 (lip)	3685	77306	1986	40389	0,54	0,52	1,03
	Среднее	4109	82361	2104	44603	0,51	0,54	0,95
	RSD, %	8,62	4,12	9,76	7,16	7,40	4,35	5,70
M	1	90824	87054	43279	48026	0,48	0,55	0,86
	2	78797	92323	42708	48720	0,54	0,53	1,03
	3	83777	89017	40829	49135	0,49	0,55	0,88
	4	86707	86051	43796	48472	0,51	0,56	0,90
	5	89639	89627	48842	48960	0,54	0,55	1,00
	6	90098	87970	45059	49124	0,50	0,56	0,90
	7 (hem)	93801	89808	46324	50545	0,49	0,56	0,88
	8 (lip)	87149	82989	42442	42381	0,49	0,51	0,95
	Среднее	87599	88105	44160	48170	0,50	0,55	0,92
	RSD, %	5,33	3,19	5,71	5,09	5,05	3,38	6,58
H	1	210098	76897	111700	47319	0,53	0,62	0,86
	2	207390	77205	121554	50901	0,59	0,66	0,89
	3	194945	77967	132924	58007	0,68	0,74	0,92
	4	209810	79465	123195	55918	0,59	0,70	0,83
	5	211268	79210	153865	61917	0,73	0,78	0,93
	6	204992	83985	120624	53991	0,59	0,64	0,92
	7 (hem)	205719	80155	137568	65436	0,67	0,82	0,82
	8 (lip)	196511	76768	111961	40966	0,57	0,53	1,07
	Среднее	205092	78957	126674	54307	0,62	0,69	0,90
	RSD, %	3,02	3,03	11,21	14,54	10,8 5	13,54	8,53

Несмотря на многостадийность пробоподготовки, степень извлечения (СИ) достигает 50% и более, RSD укладывается в критерии приемлемости, а нормализованное значение составляет 8,53%, доказывая сглаживание накапливаемых отклонений во время пробоподготовки за счёт использования ВС.

4.6. Нижний предел количественного определения

Согласно Правилам ЕАЭС, НПКО, помимо соответствия критериям приемлемости селективности, правильности и прецизионности, должен не менее

чем в 5 раз превосходить величину сигнала холостого образца. В ICH M10 отдельного определения параметра нет, подразумевается соблюдение условий при соответствии НПКО по тем же самым параметрам, что и в правилах ЕАЭС. Более того, в руководстве отсутствует требование НПКО быть ниже, чем 5% от минимальной величины максимальной концентрации ($C_{\max}$) исследуемого вещества в биообразце из всей выборки субъектов.

НПКО методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За НПКО методики принимали минимальную концентрацию НЕР-1 в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которой возможно количественное определение НЕР-1 со значениями RSD и E не более 20%. Нижний предел количественного определения методики составил 5,00 нг/мл.

4.7. Перенос пробы

По параметру переноса критерии приемлемости в руководстве ICH M10 и правил ЕАЭС идентичны. Оценку переноса пробы проводили для контроля влияния образцов с высокой концентрацией на результаты последующего анализа. В аналитическую серию включали градуировочный образец с верхним пределом количественного определения, сразу после которого анализировали бланковый образец чистой матрицы. Сигнал в бланковом образце на времени удерживания аналита не должен превышать 20% от сигнала аналита в образце на уровне НПКО, а сигнал на времени удерживания ВС не должен превышать 5% [78,79]. Данные представлены в Таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Оценка переноса пробы

Название пробы	Интенсивность сигнала		Отношение интенсивностей сигналов, %		Соответствие КП
	НЕР-1	ВС	НЕР-1	ВС	
Cal_1	649	37388	-	-	-
Cal_8	137520	45740			
Blank_07	0	372	0,00	0,99	да

Продолжение Таблицы 4.8

LLOQ_01	768	39220	-	-	-
H_05	111132	46289	-	-	-
Blank_09	105	1080	13,67	2,75	да

Полученные результаты соответствовали критериям приемлемости.

4.8. Стабильность

Подходы к валидации стабильности в правилах ЕАЭС и гармонизированном руководстве ICH M10 схожи. Были подтверждены следующие виды стабильности: стабильность исходных и рабочих растворов, краткосрочная – настольная и постпрепаративная стабильность, стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, долгосрочная.

Настольная и постпрепаративная стабильность была подтверждена на временном интервале в течение 24 часов. Данные приведены в Таблице 4.9 и Таблице 4.10.

Таблица 4.9 – Оценка настольной стабильности НЕР-1 на уровнях L и H

Уровень	L	H	E, % (L)	E, % (H)	Норма не более, %
Введено, нг/мл	15,00	750,00			
Найдено, нг/мл	13,17	715,53	-12,23	-4,60	±15
	13,76	695,00	-8,24	-7,33	
	13,58	718,32	-9,48	-4,22	
Среднее	13,50	709,62	-9,98	-5,38	

Таблица 4.10 – Оценка постпрепаративной стабильности НЕР-1 на уровнях L и H

Уровень	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл			Среднее, нг/мл
L	15	13,44	15,84	16,17	15,15
LM	30	30,51	27,30	33,28	30,36
M	300	327,88	318,73	325,18	323,93
H	750	754,04	759,91	786,52	766,82
E, % (L)		-10,37	5,57	7,82	1,01

Продолжение Таблицы 4.10

Е, % (LM)	1,68	-9,01	10,93	1,20
Е, % (М)	9,29	6,24	8,39	7,98
Е, % (Н)	0,54	1,32	4,87	2,24
Норма не более, %	±15			

Стабильность при трехкратной заморозке-разморозке оценивалась отдельно после каждого цикла разморозки в связи с отсутствием подобных данных, результаты представлены в Таблице 4.11.

Таблица 4.11 – Оценка стабильности при трехкратной заморозке-разморозке НЕР-1 на уровнях L и Н

Уровень	L	H	Е, % (L)	Е, % (H)	Норма, не более, %
Введено, нг/мл	15,00	750,00			
1 цикл, найдено, нг/мл	16,57	732,52	10,45	-2,33	±15
	14,12	756,80	-5,85	0,91	
	16,37	782,04	9,16	4,27	
Среднее	15,69	757,12	4,59	0,95	
2 цикл, найдено, нг/мл	13,47	693,86	-10,21	-7,49	
	15,03	680,50	0,23	-9,27	
	15,76	676,17	5,08	-9,84	
Среднее	14,75	683,51	-1,64	-8,87	
3 цикл, найдено, нг/мл	11,65	673,28	-22,35	-10,23	
	13,26	692,31	-11,63	-7,69	
	13,70	705,23	-8,64	-5,97	
Среднее	12,87	690,27	-14,20	-7,96	

В рамках проверки долгосрочной стабильности для малых молекул руководство разрешает определять только наивысшую температуру хранения, а в правилах и для малых молекул, и для биологических препаратов необходимо использовать метод брекетинга. В связи с тем, что НЕР-1 занимает промежуточное положение между малыми молекулами и белками, а также ориентируясь на официально утвержденный документ на территории РФ, определяли долгосрочную стабильность согласно более жестким критериям методом брекетинга. Также оценка проводилась многократно через короткие промежутки времени в связи с

пептидной структурой исследуемого вещества и вероятностью быстрой деградации в биологических образцах.

Долгосрочная стабильность при температурах -30 и -80 была оценена через 5, 12, 19, 26, 35 и 67 дней для -30 С°, через 5 и 19 дней для -80 С°. Данные представлены в Таблице 4.12. Точечные графики RSD при оценке долгосрочной стабильности при температурах -30 для уровней L и H представлены на Рисунках 4.2 и 4.3.

Таблица 4.12 – Оценка долгосрочной стабильности НЕР-1 в плазме крови на уровнях L и H

Уровень	L	H	E, % (L)	E, % (H)	Норма не более, %
введено, нг/мл	15,00	750,00			
LT30* - 5 дней – найдено, нг/мл	13,05	688,34	-13,01	-8,22	±15
	16,15	680,38	7,64	-9,28	
	13,34	714,33	-11,05	-4,76	
Среднее	14,18	694,35	-5,47	-7,42	
LT30- 12 дней – найдено, нг/мл	14,12	648,33	-5,86	-13,56	
	14,23	661,00	-5,11	-11,87	
	13,66	695,82	-8,97	-7,22	
Среднее	14,00	668,38	-6,65	-10,88	
LT30 - 19 дней – найдено, нг/мл	13,97	693,23	-6,84	-7,57	
	13,70	776,53	-8,65	3,54	
	13,79	758,00	-8,09	1,07	
Среднее	13,82	742,58	-7,86	-0,99	
LT30 - 26 дней – найдено, нг/мл	12,80	670,40	-14,67	-10,61	
	14,87	676,40	-0,87	-9,81	
	13,21	678,35	-11,97	-9,55	
Среднее	13,63	675,05	-9,17	-9,99	
LT30 - 35 дней – найдено, нг/мл	12,84	685,21	-14,41	-8,64	
	13,41	687,45	-10,59	-8,34	
	14,19	671,69	-5,42	-10,44	
Среднее	13,48	681,45	-10,14	-9,14	
LT30 - 67 дней – найдено, нг/мл	15,58	685,92	3,89	-8,54	
	13,59	691,12	-9,38	-7,85	
	12,99	718,82	-13,43	-4,16	
Среднее	14,05	698,62	-6,31	-6,85	

Продолжение Таблицы 4.12

Продолжение таблицы №12					
LT80* - 5 дней – найдено, нг/мл	15,04	664,52	0,25	-11,40	±15
	15,68	688,75	4,55	-8,17	
	13,28	702,01	-11,48	-6,40	
Среднее	14,67	685,09	-2,23	-8,65	
LT80 - 19 дней – найдено, нг/мл	12,97	773,67	-13,54	3,16	
	15,15	765,97	1,03	2,13	
	13,68	742,02	-8,82	-1,06	
Среднее	13,93	760,55	-7,11	1,41	
Примечание: *LT30 – долгосрочная стабильность при -30 С°; LT80 – долгосрочная стабильность при -80 С°					

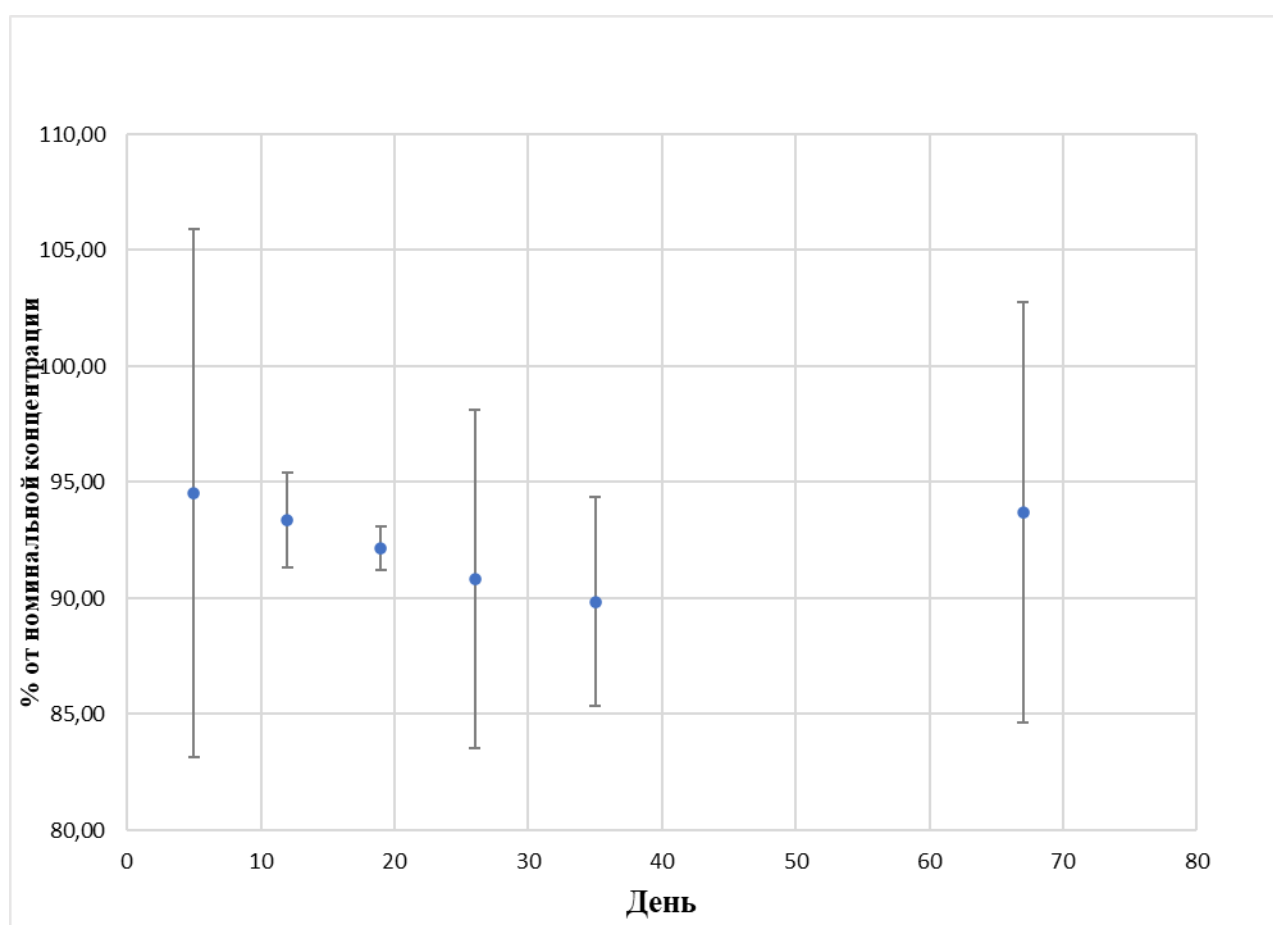


Рисунок 4.2 – Стабильность тетрадекапептида в плазме крови на уровне L при температуре -30 °C

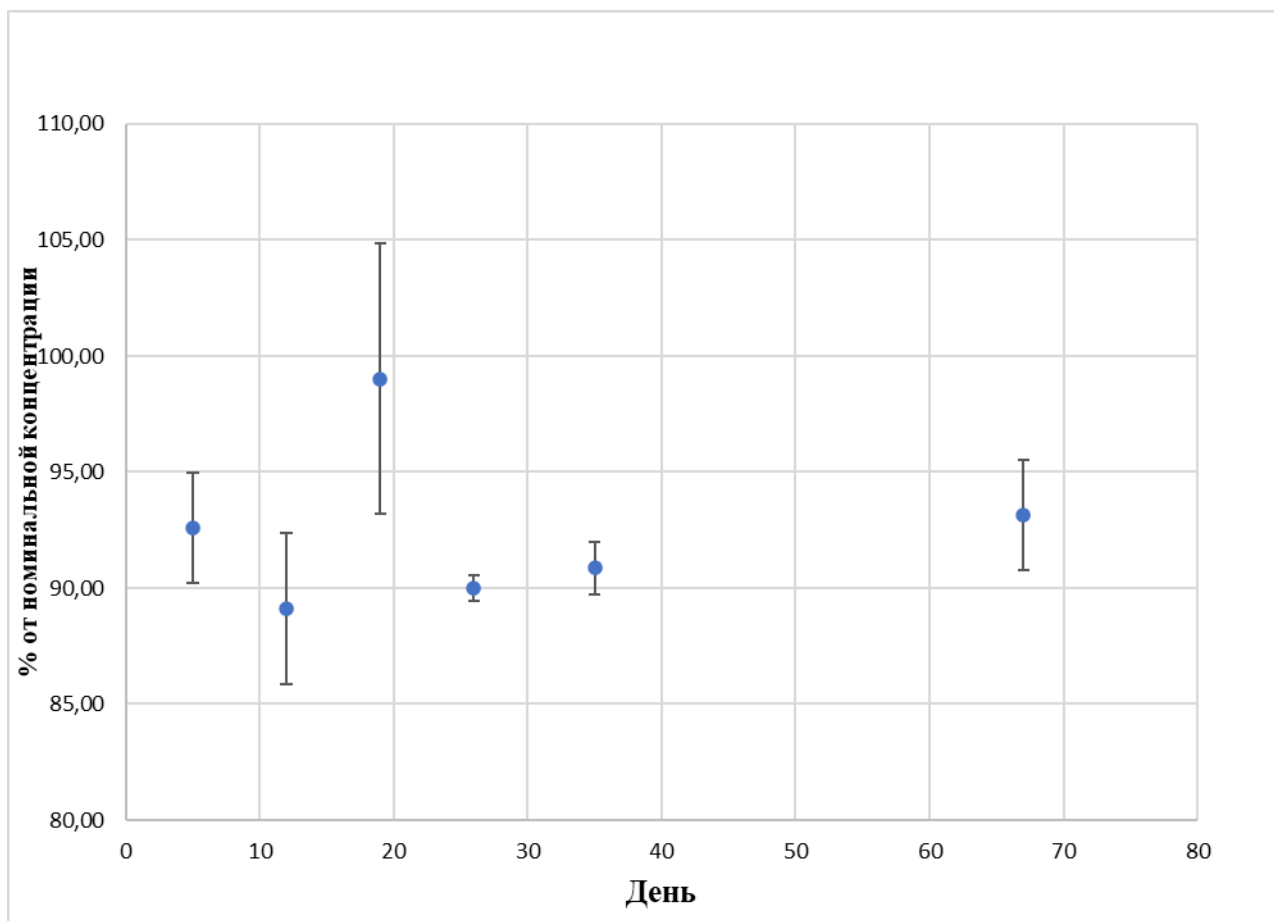


Рисунок 4.3 – Стабильность тетрадекапептида в плазме крови на уровне Н при температуре $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

Стабильность исходных и рабочих растворов была оценена в течение 56 дней. Данные приведены в Таблице 4.13 и Таблице 4.14.

Таблица 4.13 – Оценка стабильности исходного и рабочих стандартных растворов НЕР-1 на уровнях L и H

Уровень	L	H	Е, % (L)	Е, % (H)	Норма не более, %
введено, нг/мл	15,00	750,00			
WSS найдено, нг/мл	14,74	852,33	-1,71	13,64	±15
	13,27	801,56	-11,53	6,88	
	12,94	809,35	-13,71	7,91	
Среднее	13,65	821,08	-8,98	9,48	
SSS найдено, нг/мл	13,14	748,27	-12,39	-0,23	
	13,15	741,48	-12,33	-1,14	
	13,54	706,15	-9,71	-5,85	
Среднее	13,28	731,97	-11,48	-2,40	

Таблица 4.14 – Оценка стабильности исходного и рабочего стандартных растворов ВС

Образец	Площадь ь пика	Образец	Площадь ь пика	Образец	Площадь ь пика
Cal_4_0_0_1	37678	Cal_4_WSS_0_0_1	38823	Cal_4_SSS_0_0_1	44929
Cal_4_0_0_2	38134	Cal_4_WSS_0_0_2	40301	Cal_4_SSS_0_0_2	40974
Cal_4_0_0_3	40878	Cal_4_WSS_0_0_3	41398	Cal_4_SSS_0_0_3	43812
Среднее	38897	40174		43238	
Е, %	-	3,28		11,16	
Норма не более, %	±15				

Все полученные результаты стабильности соответствовали критериям приемлемости. Разработанная и валидированная методика обладает высокой селективностью, а комплексная пробоподготовка, включающая в себя осаждение белков, жидкость-жидкостную экстракцию, дериватизацию и упаривание в токе азота с перерастворением, позволяет достигнуть достаточной чувствительности составляет, правильности и прецизионности, несмотря на многостадийность. Соответствие всех валидационных параметров установленным нормам позволяет признать данную методику пригодной для последующего анализа образцов плазмы крови, полученных от добровольцев. Кроме того, параметры будут подвергаться проверке в каждом аналитическом этапе путем включения в каждый цикл образцов КК.

4.9. Выводы к главе 4

1. Проведена валидация разработанной методики количественного определения НЕР-1 в плазме крови человека в соответствии с требованиями Правил ЕАЭС и гармонизированного руководства ICH M10 по следующим параметрам: селективность, специфичность, эффект матрицы, градуировочная кривая (линейность), точность, прецизионность, степень извлечения, нижний

предел количественного определения, предел обнаружения, перенос пробы, стабильность.

2. Выявлена возможность использования разработанной методики для количественного определения НЕР-1 в рамках фармакокинетических исследований.

ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И СВЯЗЫВАНИЯ С БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ ИССЛЕДУЕМОГО ТЕТРАДЕКАПЕПТИДА В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

С целью подбора рациональной матрицы для определения НЕР-1 в биологических образцах при дальнейших биоаналитических фармакологических исследованиях по разработанной методике было изучено распределение пептида НЕР-1 между плазмой и эритроцитами. Структура исследуемого пептида НЕР-1 содержит по три остатка лизина и аргинина, что делает возможным его связывание с эритроцитами, аналогично некоторым катионным гидрофильным соединениям [51]. Также была оценена связь с белками плазмы методом ультрафильтрации с центрифужным концентратором с MWCO 5000 Да.

5.1. Модификация и верификация протоколов на модельном веществе

Для определения коэффициента распределения «цельная кровь-плазма» R_b за основу были взяты протоколы Kalamaridis et al [184] и Dash et al [119]. Данный протокол впоследствии дополнили определением концентрации анализируемого вещества в лизированной цельной крови и получили результаты для каждой матрицы и последующего применения нескольких способов расчёта. В качестве модельного вещества для оценки корректности различных способов расчета был выбран индапамид с известным $R_b \sim 5,7$ [201]. Эксперимент проводили согласно модифицированному протоколу, описанному в разделе 2.4.4. Цельную кровь здорового добровольца с гематокритом 42% инкубировали при 37 °C с добавлением индапамида до концентрации 60 нг/мл. В заданные временные точки (0, 10, 20, 30, 45, 60 мин) отбирали аликвоты, из них 200 мкл цельной крови, остаток делили на плазму и эритроцитарную массу центрифугированием. Концентрации индапамида в цельной крови, плазме и лизированной эритроцитарной массе определяли методом ВЭЖХ-МС/МС после осаждения белков 600 мкл ацетонитрила. Полученные концентрации представлены в Таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Концентрации индапамида (нг/мл) в различных матрицах после инкубации в цельной крови

Матрица	Концентрация	60 нг/мл				
	Время отбора, мин	повт. 1	повт. 2	повт. 3	среднее	RSD, %
Плазма	0	11,22	9,96	10,84	10,67	6,06
	10	10,71	10,34	9,89	10,31	3,98
	20	10,33	9,25	10,01	9,86	5,62
	30	9,62	9,46	9,83	9,64	1,93
	45	10,78	10,20	10,40	10,46	2,82
	60	9,55	9,36	9,20	9,37	1,87
Цельная кровь	0	54,97	56,88	57,80	56,55	2,55
	10	54,20	56,06	55,48	55,25	1,72
	20	58,65	60,99	57,94	59,19	2,70
	30	53,87	55,98	56,77	55,54	2,70
	45	56,10	58,94	58,92	57,99	2,82
	60	53,93	58,09	56,20	56,07	3,71
Эритроцитарная масса	0	99,90	107,26	106,32	104,49	3,83
	10	104,79	115,95	107,15	109,30	5,38
	20	120,78	127,49	129,11	125,79	3,51
	30	127,49	122,54	130,49	126,84	3,17
	45	129,71	135,52	127,10	130,78	3,30
	60	124,45	134,33	137,23	132,00	5,08

На основе полученных данных были рассчитаны значения R_b четырьмя способами Результаты представлены в Таблице 5.2.

Таблица 5.2 – R_b индапамида, рассчитанное четырьмя разными способами

Концентрация	60 нг/мл			
Время отбора	R_b способ1	R_b способ2	R_b способ3	R_b способ4
0	5,30	4,69	2,59	5,62
10	5,36	5,03	3,43	5,82
20	6,00	5,94	5,40	6,08
30	5,76	6,11	14,21	6,23
45	5,54	5,83	10,99	5,74
60	5,98	6,50	51,47	6,40
Среднее	5,66	5,68	14,68	5,97

Продолжение Таблицы 5.2

RSD, %	5,41	12,03	126,56	5,11
--------	------	-------	--------	------

Как видно из Таблицы 5.2, способ 1, способ 2 и способ 4 представляют собой близкие значения, хорошо согласующиеся с литературными данными [201].

Способ 1 является эталонным и позволяет определять R_b с использованием прямых значений концентрации в цельной крови и плазме, однако для него требуется использовать методику, с помощью которой определяется вещество в разных матрицах. Способ 2 позволяет без значительной погрешности провести пересчёт при первичном определении в эритроцитах и плазме. Эти данные также можно использовать для определения коэффициента распределения эритроциты-плазма, но из-за того, что способ косвенный, полученные расчётные данные менее точные и могут обладать большей вариабельностью. К тому же методика также должна быть адаптирована для двух матриц. Способ 3 оказался крайне чувствительным к вариациям измеренных концентраций и не может быть рекомендован для использования. Способ 4 можно использовать при измерении только в плазме крови. Благодаря дизайну эксперимента, несмотря на измерение концентрации только в плазме крови, вследствие сравнения с номинальным добавленным значением удастся достигнуть достоверных результатов с низким относительным стандартным отклонением. Полученные результаты подтверждают корректность выбранного экспериментального подхода и его пригодность для изучения распределения НЕР-1.

5.2. Определение коэффициента распределения «кровь/плазма» для исследуемого тетрадекапептида

Для определения R_b для НЕР-1 использовали адаптированный косвенный метод – способ 4, основанный на сравнении концентрации пептида в плазме после инкубации в цельной крови с номинальной концентрацией. Выбор данного способа обусловлен трудностями прямого измерения НЕР-1 в цельной крови и эритроцитарной массе из-за низкой степени извлечения и высокой вариабельности,

связанной с особенностями пробоподготовки, а именно на этапах ЖЖЭ и дериватизации. Благодаря способу 4 определение R_b для НЕР-1 стало возможным, ведь все этапы пробоподготовки проводили исключительно для плазмы крови [202].

Эксперимент осуществляли для двух уровней концентраций – 100 и 500 нг/мл. Цельную кровь инкубировали с НЕР-1 при 37 °С, отбирая пробы в те же временные точки. Плазму отделяли центрифугированием и анализировали по методике, описанной в разделе 2.4.1. Результаты представлены в Таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Концентрации НЕР-1 в плазме и расчетные коэффициенты R_b после инкубации в цельной крови человека

Время отбора	Концентрации		R_b 100	R_b 500
	100 нг/мл	500 нг/мл		
0	157,36	732,32	0,64	0,68
10	149,57	748,32	0,67	0,67
20	157,81	794,39	0,63	0,63
30	145,76	811,38	0,69	0,62
45	163,32	826,60	0,61	0,60
60	163,32	818,44	0,61	0,61
Среднее	156,19	788,58	0,64	0,64
RSD, %	4,60	4,97	4,69	5,10

Из полученных данных видно, что концентрация НЕР-1 в плазме остаётся стабильной на протяжении всего времени инкубации, что свидетельствует о быстром установлении равновесия распределения и отсутствии деградации пептида в условиях эксперимента. Среднее значение R_b составило $0,64 \pm 0,03$ и не зависело от концентрации в исследованном диапазоне. Поскольку $R_b < 1$, можно заключить, что НЕР-1 преимущественно находится в плазме и не накапливается в эритроцитах. Это согласуется с типичными свойствами пептидов, не обладающих выраженной мембранной проницаемостью [49]. Присутствие в структуре НЕР-1 остатков лизина и аргинина не приводит к значимому связыванию с эритроцитами, вероятно, из-за компенсации положительного заряда пятью остатками глутаминовой кислоты, что в итоге не создаёт поликатионного характера пептида при физиологическом значении pH, необходимого для взаимодействия с мембранами [116].

5.3. Оценка связывания исследуемого тетрадекапептида с белками плазмы крови

Терапевтические пептиды могут связываться с эндогенными белками или антителами в образце, что снижает извлечение во время таких методов подготовки образцов, как осаждение белков [203].

Согласно «гипотезе свободного лекарства» (англ. Free Drug Hypothesis), фармакологическую активность проявляет лишь несвязанная фракция вещества, которая способна проникать через биологические мембраны, взаимодействовать с рецепторами и подвергаться элиминации [204]. При этом связывание с белками плазмы может существенно влиять на объём распределения и клиренс: высокая степень связывания ограничивает распределение в ткани и снижает скорость почечной экскреции свободной фракции [205, 206].

Поэтому данные о связывании с белками плазмы являются обязательным компонентом регистрационного досье и используются при прогнозировании лекарственных взаимодействий, а также при интерпретации результатов исследований безопасности [207, 208]. Создание биоаналитической методики, правильно отражающей токсикокинетику и токсикодинамику изучаемого вещества, невозможно без оценки его связывания с белками плазмы крови.

Связывание с белками плазмы определяли методом ультрафильтрации с использованием центрифужных концентраторов с MWCO 5000 Да [121]. Эксперимент проводили согласно протоколу, описанному в разделе 2.4.5. Предварительно оценили неспецифическое связывание НЕР-1 с мембраной фильтра; оно составило 1,55%, что находится в пределах погрешности измерений и не требует коррекции. Результаты определения связывания представлены в Таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Площадь пика НЕР-1 во время проведения эксперимента связи с белками плазмы

Образец	Площадь пика	Среднее	RSD, %
S_1	332152	316809,00	9,85

Продолжение Таблицы 5.4

S 2	337369	316809,00	9,85
S 3	280906		
Sfree 1	31893	32995,33	6,22
Sfree 2	31728		
Sfree 3	35365		
Sf 1	432975	465109,00	7,20
Sf 2	462579		
Sf 3	499773		
Stotal 1	444583	472432,33	6,50
Stotal 2	505351		
Stotal 3	467363		

Примечание: S – образец без ультрафильтрации, Sfree – образец свободной фракции НЕР-1, Stotal – образец фильтрованной фракции без влияния потерь на фильтре, Sf – образец фильтрованной фракции

Таким образом, НЕР-1 связывается с белками плазмы крови человека на 89,6%. Следует отметить, что значение связи с белками может варьироваться в зависимости от гематокрита [119]. Высокая степень связывания объясняет преимущественное нахождение пептида в плазме ($R_b < 1$) и будет влиять на его фармакокинетические параметры, в частности, ограничивать объём распределения и снижать почечный клиренс свободной фракции [209].

При создании методики, в частности на этапе пробоподготовки, следует учитывать выявленный феномен высокого связывания НЕР-1 с белками плазмы крови. В связи с этим, использование кислоты, как модификатора осадителя, способствует устранению связывания с белками [203], обеспечивая в итоге увеличение аналитического сигнала.

5.4. Выводы к главе 5

1. Проведена модификация протоколов определения R_b и последующая верификация методики на модельном веществе – индапамиде, с целью выбора оптимальной методики определения R_b для терапевтического пептида НЕР-1 и доказательства валидности адаптированного метода.

2. Обоснован выбор плазмы в качестве оптимальной матрицы для фармакокинетических исследований на основании определения коэффициента распределения «кровь/плазма» для НЕР-1, равного $0,64 \pm 0,03$, сопоставимого на уровнях концентрации 100 и 500 нг/мл. Значение $R_b < 1$ указывает на преимущественное нахождение пептида в плазме крови и отсутствие его значимого накопления в эритроцитах.

3. Подтверждено преимущественное (89,6 %) нахождение пептида НЕР-1 в плазме крови в связанном с белками виде, что обеспечивает правильность проводимой пробоподготовки при определении пептида НЕР-1 в плазме крови для наиболее полной экстракции из матрицы при проведении последующих фармакокинетических исследований.

ГЛАВА 6. АПРОБАЦИЯ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ В КЛИНИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ

6.1. Дизайн исследования и отбор образцов

Апробация методики количественного определения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в плазме крови человека была проведена соответствии с Протоколом клинического исследования № Heron-19-P-I-2021 версия 1.1 от 27.05.2022 г.

Группе из здоровых 10 добровольцев вводили 4 мг препарата двукратно в сутки в течение 10 дней. Группа была разделена на две подгруппы по 5 человек, отличавшиеся путём введения препарата. Первой подгруппе исследуемый препарат вводился подкожно, второй – внутримышечно. Обе подгруппы были госпитализированы одновременно. Полученную кровь центрифугировали, плазму отделяли и хранили при температуре не выше -30 °C до момента анализа. Срок хранения образцов при валидации долгосрочной стабильности составил 67 суток, что перекрывало долгосрочную стабильность активных образцов.

6.2. Применение методики для анализа образцов

Всего было проанализировано 180 образцов плазмы крови человека. Пробоподготовку и ВЭЖХ-МС/МС анализ проводили в соответствии с валидированной методикой, описанной в разделе 2.4.1. Концентрации НЕР-1 рассчитывали по градуировочной кривой, построенной в день анализа.

В процессе работы контролировали пригодность аналитических циклов путём анализа образцов КК на низком, средне-низком, среднем и высоком уровнях концентраций (уровни L, LM, M, H, соответственно), которые помещали в аналитическую серию дважды. Все значения КК соответствовали критериям приемлемости (E не более $\pm 15\%$ для не менее, чем 75% КК в цикле и более 50% для

каждого уровня КК), что подтверждает надёжность полученных данных на протяжении всего периода анализа.

6.3. Результаты апробации и фармакокинетические параметры

На основании полученных результатов измерения концентрации НЕР-1 в плазме крови 10 добровольцев, в рамках клинического исследования с помощью пакета программного обеспечения MS Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа PKSolver были определены и/или вычислены фармакокинетические параметры. Способ расчета приведен в главе 2.4.7. На основе этих данных с использованием некомпартментного анализа рассчитывали основные фармакокинетические параметры НЕР-1:

1. AUC_{0-t} , нг·ч/мл;
2. $AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл;
3. $AUC_{resid\%}$, %;
4. λ_z , ч⁻¹;
5. $t_{1/2}$, ч;
6. V_d , л;
7. Cl , л/ч.

Полученные результаты измерения концентраций НЕР-1 представлены в Таблице Е.1 и Е.2 (приложение Е), а усреднённые фармакокинетические профили НЕР-1 и усредненные фармакокинетические параметры на Рисунках 6.1, 6.2 и Таблице 6.1.

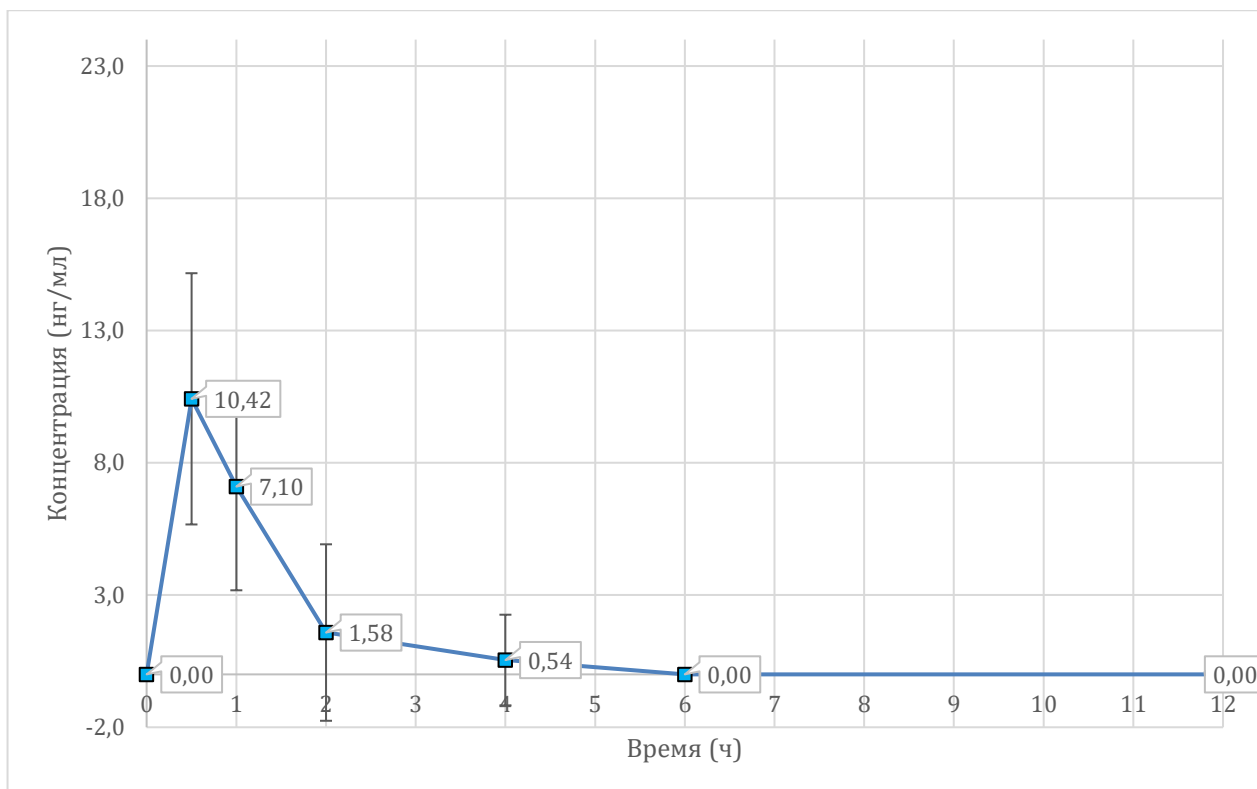


Рисунок 6.1 – Усреднённая фармакокинетическая кривая НЕР-1 в плазме крови здоровых добровольцев при подкожном введении пациентам в дозе 4 мг два раза в день на протяжении 10 дней; для каждой точки $n = 10$, для точки «0» – 14

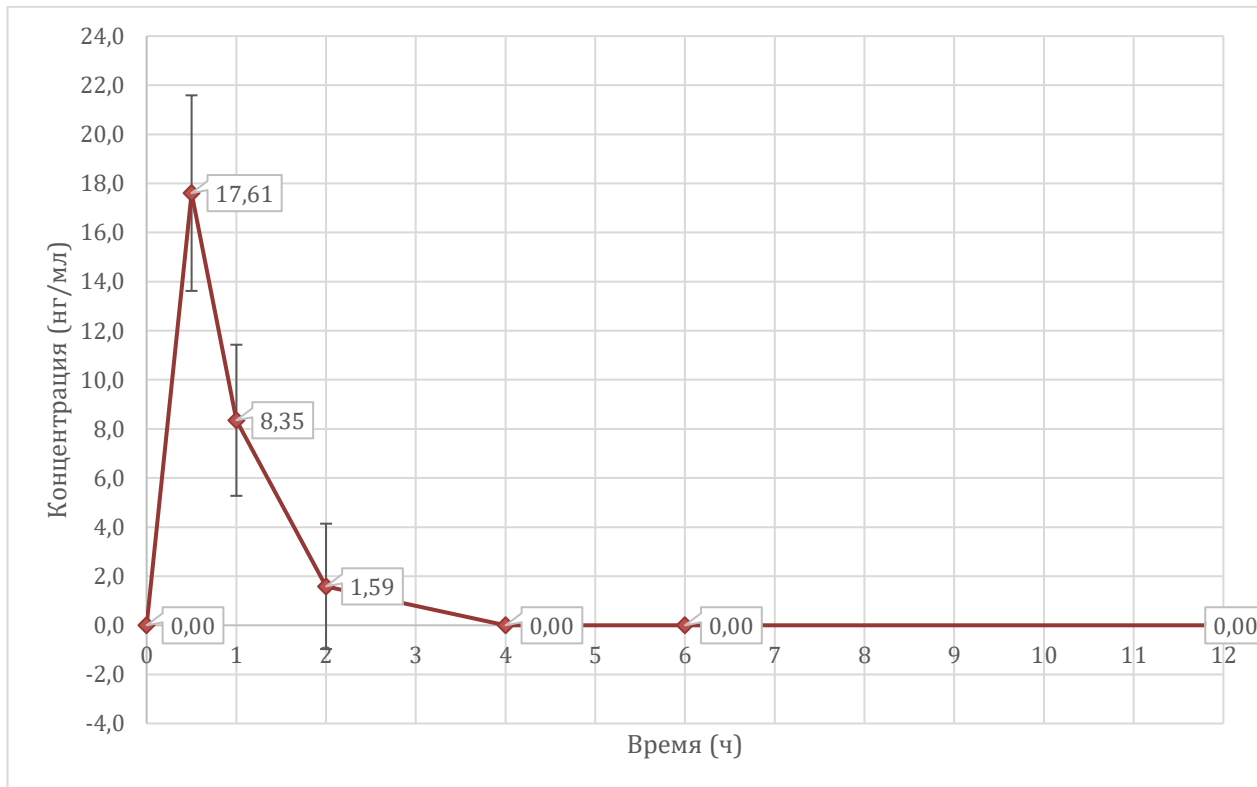


Рисунок 6.2 – Усреднённая фармакокинетическая кривая НЕР-1 в плазме крови здоровых добровольцев при внутримышечном введении пациентам в дозе 4 мг два раза в день на протяжении 10 дней, для каждой точки $n = 10$, для точки «0» – 14

Таблица 6.1 – Усредненные фармакокинетические параметры НЕР-1 при подкожном и внутримышечном введении пациентам в дозе 4 мг два раза в день на протяжении 10 дней

ФК-параметр	Тип введения	
	подкожный	внутримышечный
$C_{\max}$, нг/мл	10,42	17,61
AUC_{0-t} , нг·ч/мл	13,45	15,86
AUC_{0-inf} , нг·ч/мл	14,08	16,84
λ_z , ч ⁻¹	0,86	1,61
$t_{1/2}$, ч	0,81	0,43
$T_{\max}$, ч	0,50	0,50
$AUC_{\text{resid}\%}$, %	4%	6%
V_d , л	332,74	147,15
Cl, л/ч	286,18	237,32

6.4. Обсуждение результатов

Разработанная и валидированная методика была успешно апробирована в рамках пилотного исследования фармакокинетики. Полученные данные позволяют предварительно охарактеризовать фармакокинетику НЕР-1 у человека. Ввиду больших промежутков между отборами крови и малым количеством образцов от каждого добровольца, корректный расчет фармакокинетических параметров для большей части субъектов оказался невозможен. Отсутствие необходимого количества отличных от нуля значений концентраций НЕР-1 на стадии элиминации затрудняет оценку периода полувыведения, поэтому оценку параметров проводили по усредненному ФК профилю для обоих путей введения. Также следует отметить, что оценку фармакокинетических параметров в рамках пилотного исследования проводили на малой выборке добровольцев и полученные данные должны быть уточнены в рамках последующих исследований на большей выборке субъектов, а также с измененной схемой отбора образцов крови для анализа.

Достижение $C_{\max}$ происходило чаще всего на первой точке, отобранной после введения препарата, и составляло 30 минут, что свидетельствует о быстром распределении препарата. Более высокое значение $C_{\max}$ при внутримышечном

введении обусловливается более быстрым и полным всасыванием за счёт лучшей васкуляризации мышечной ткани [210].

Рассчитанное среднее значение $t_{1/2}$ для усредненного ФК профиля составило 0,81 ч. для подкожного и 0,43 ч. для внутримышечного. Это соответствует типичным значениям для немодифицированных пептидов, характеризующиеся быстрой элиминацией [57]. Для подкожного введения следует отметить возможность влияния флип-флоп механизма [211]. Элиминация может быть ограничена всасыванием из подкожной клетчатки, в этом случае $t_{1/2}$ определяется замедленной скоростью абсорбции [212].

Средний V_d составил 332,74 л для подкожного и 147,15 л для внутримышечного путей введения. С учётом выраженной гидрофильности пептида и неизвестной абсолютной биодоступности некомпартментный анализ может выдавать завышенные данные объема распределения. Для пептидов при подкожном введении характерно более медленное всасывание, а также меньшая биодоступность из-за возможной деградации протеазами в подкожном слое или влияния лимфатического потока [213]. Данные Cl также высоки и составляют 286,18 л/ч для подкожного и 237,32 л/ч для внутримышечного введения. В рамках современного некомпартментного анализа клиренса расчет исключительно по системным концентрациям в плазме может приводить к ложным выводам, если игнорируются локальные процессы депонирования и распределения вещества в тканях [214]. В рамках дальнейших исследований следует уточнить абсолютную биодоступность, а также данные по объему распределения и клиренсу.

AUC_{0-t} при подкожном введении показывает в среднем меньшие значения, что также может быть следствием ограниченной биодоступности [213].

Таким образом, разработанная методика позволила впервые получить количественные данные о фармакокинетике НЕР-1 у человека, что является значимым вкладом в понимание поведения данного пептидного препарата *in vivo*.

6.5. Выводы к главе 6

1. Применена разработанная и валидированная методика количественного определения НЕР-1 в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС при проведении пилотного исследования фармакокинетики с участием здоровых добровольцев. Проанализированы 180 образцов плазмы крови человека. Все аналитические серии соответствовали установленным критериям приемлемости (отклонение КК не более $\pm 15\%$).

2. Получены экспериментальные данные о фармакокинетики НЕР-1 у человека после подкожного и внутримышечного введения с использованием разработанной методики. Для усредненного фармакокинетического профиля обоих путей введения рассчитаны предварительные фармакокинетические параметры: AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, $AUC_{resid}\%$, λ_z , $t_{1/2}$, V_d , Cl , которые могут быть использованы для планирования дальнейших клинических исследований и оптимизации режима дозирования препарата

3. Подтверждена пригодность апробированной методики для решения практических задач биоаналитического сопровождения фармакокинетических исследований пептидных лекарственных средств, что позволяет рекомендовать её к внедрению в работу лабораторий, осуществляющих количественный анализ НЕР-1 в биологических образцах.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведён анализ литературных данных о физико-химических свойствах пептида НЕР-1 и современных подходах к количественному определению терапевтических пептидов, теоретически обоснован и экспериментально подобран метод количественного определения – ВЭЖХ-МС/МС, возможные условия пробоподготовки, включающие осаждение белков, ЖЖЭ и применение дериватизации. Дериватизация позволяет увеличить время удерживания в ОФ режиме, а также достичь стабильных MRM, что для многих немодифицированных терапевтических пептидов может представлять значительные сложности.

2. Разработана оригинальная методика ВЭЖХ-МС/МС для количественного определения пептида НЕР-1 в плазме крови человека. Применена впервые для НЕР-1 дериватизация пропионовым ангидридом, позволившая получить тетрапропионилированное производное с высокоэффективными MRM-переходами (m/z 681,30 $\rightarrow$ 73,95 m/z , 681,30 $\rightarrow$ 84,00 m/z , 681,30 $\rightarrow$ 101,90 m/z , 681,30 $\rightarrow$ 140,10 m/z). Оптимизирована многоступенчатая пробоподготовка, включающая осаждение белков, ЖЖЭ хлороформом, упаривание, дериватизацию и перерастворение, что обеспечило высокую чистоту экстрактов, стабильность анализа и последующее эффективное определение методом ОФ ВЭЖХ-МС/МС.

3. Проведена полная валидация разработанной методики в соответствии с требованиями Правил ЕАЭС и руководства ICH M10. Было подтверждено соответствие методики установленным критериям приемлемости по следующим параметрам: селективность, градуировочная кривая (5,00–1000,00 нг/мл, коэффициент детерминации $R^2 > 0,99$), правильность и прецизионность, эффект матрицы, степень извлечения и НПКО. Также было доказано отсутствие переноса пробы. Установлена стабильность НЕР-1 в плазме крови при различных условиях хранения (в течение 24 ч при комнатной температуре, после 3 циклов замораживания-размораживания, до 67 суток при температуре $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), а также стабильность стандартных растворов в течение 56 суток.

4. Обоснован выбор плазмы в качестве оптимальной матрицы для фармакокинетических исследований на основании определения коэффициента распределения «кровь/плазма» НЕР-1 и преимущественного его связывания с белками плазмы с использованием разработанной и верифицированной методики. Впервые установлено, что R_b для НЕР-1 составляет 0,64 и не зависит от концентрации НЕР-1 в плазме крови. Обосновано использование пропионовой кислоты, как модификатора осадителя, на этапе подготовки биообразца к анализу.

5. Проведена апробация разработанной и валидированной методики в клиническом исследовании для 3 группы, включавшей 10 здоровых добровольцев. Подтверждена пригодность методики для решения практических задач фармакокинетики и оптимизации режима дозирования препарата Гепон®.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы разработана и валидирована методика количественного определения НЕР-1 в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Оптимизирована пробоподготовка плазмы крови, способствующая чувствительному и селективному анализу благодаря ступенчатой очистке образца с последующей дериватизацией, упариванием и перерастворением. Разработанная методика полностью соответствует современным регуляторным требованиям и может быть рекомендована для применения в лабораториях, осуществляющих фармакокинетические исследования препарата Гепон[®]. Полученные данные о распределении пептида в крови и его связывании с белками плазмы служат научной основой для доказательства рационализации выбора биологической матрицы и способа пробоподготовки исследуемого вещества.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанная и валидированная методика количественного определения пептида треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС рекомендуется для внедрения в практику лабораторий, осуществляющих биоаналитические и фармакокинетические исследования, поскольку она обеспечивает высокую чувствительность, селективность и воспроизводимость, полностью соответствует современным регуляторным требованиям и может быть легко масштабирована для рутинного клинического применения. Предложенный подход, включающий использование дериватизации для улучшения хроматографических и масс-спектрометрических характеристик аналита, а также оптимизированную многоступенчатую пробоподготовку, может служить основой для разработки аналогичных методик для других терапевтических пептидов, особенно тех, которые обладают высокой гидрофильностью, слабым удерживанием в ОФ хроматографической системе или низкой эффективностью фрагментации при ионизации ESI. Адаптация разработанных принципов позволит существенно сократить время и ресурсы при создании новых биоаналитических методов для широкого спектра пептидных лекарственных средств.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанная и валидированная методика количественного определения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в плазме крови человека пригодна для рутинного применения в рамках дальнейших фармакокинетических исследований данного препарата. Полученные данные о фармакокинетике НЕР-1 подтверждают пригодность разработанной методики и представляют собой основу для её использования в последующих исследованиях. Перспективным направлением дальнейшего изучения является ВЭЖХ-МС/МС-анализ профиля метаболизма НЕР-1 в биоматрицах для раскрытия механизмов его биотрансформации.

Разработанный методологический подход обладает возможностью применения к иным биологическим тканям и органам, что позволит масштабировать исследования кинетики распределения и элиминации пептида на системном уровне.

Успешная реализация подхода, основанного на дериватизации для улучшения хроматографических и масс-спектрометрических характеристик пептида, открывает перспективы для разработки аналогичных биоаналитических методик для других пептидных препаратов, особенно тех, которые обладают высокой гидрофильностью, слабым удерживанием в ОФ хроматографической системе или низкой эффективностью фрагментации. Создание библиотеки оптимизированных протоколов дериватизации для различных классов терапевтических пептидов может стать самостоятельным научным направлением.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВС – внутренний стандарт

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

ГО – градуировочный образец

ЕАЭС – Евразийский экономический союз

ЕЭК – Евразийская экономическая комиссия

ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция

КК – контроль качества

КП – критерий приемлемости

МК – муравьиная кислота

МС – масс-спектрометрия

МС/МС – tandemная масс-спектрометрия

НПКО – нижний предел количественного определения

ОФ – обращенно-фазовый

ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

СИ – степень извлечения

ТФЭ – твердофазная экстракция

УЗ – ультразвуковой

ФК – фармакокинетический

ФИТЦ – фенилизотиоцианат

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

AUC – площадь под фармакокинетической кривой (area under the curve)

Вос – трет-бутилоксикарбонил

Cbz – карбоксибензил

CID – диссоциация, активируемая соударениями (collision-induced dissociation)

Cl – кажущийся клиренс

C_{max} – максимальная концентрация исследуемого вещества в биообразце

CPP – проникающие в клетку пептиды (cell-penetrating peptides)

E – относительное отклонение полученного (измеренного) значения от номинального (теоретического) (error)

ECD – диссоциация, индуцированная захватом электрона (electron capture dissociation)

ELISA – иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay)

ЕМА – Европейское агентство лекарственных средств (European Medicines Agency)

ESI – ионизация электрораспылением (electrospray ionization)

ETD – диссоциация, индуцированная переносом электрона (electron transfer dissociation)

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration)

Fmoc – флуоренилметоксикарбонил (защитная группа)

HCD – высокоэнергетическая столкновительная диссоциация (higher-energy collisional dissociation)

HEP-1 – фрагмент пептида человека эзрина-1 (Human Ezrin Peptide 1)

HILIC – гидрофильная хроматография (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)

ICH – Международный совет по гармонизации (International Council for Harmonisation)

IUPAC-IUB – Международный союз теоретической и прикладной химии – Международный союз биохимии (International Union of Pure and Applied Chemistry – International Union of Biochemistry)

LLOQ – нижний предел количественного определения (lower limit of quantification)

MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (matrix-assisted laser desorption/ionization)

Mf – фактор матрицы (matrix factor)

Mf^H – нормализованный фактор матрицы исследованного вещества по внутреннему стандарту

MRM – мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring)

MWCO – порог отсечения по молекулярной массе (molecular weight cut-off)

m/z – отношение массы к заряду

N – число теоретических тарелок (эффективность хроматографической колонки)

PPB – связывание с белками плазмы (plasma protein binding)

QC – контроль качества (quality control)

Q-TOF – квадруполь-времяпролетный масс-анализатор (quadrupole time-of-flight)

R_b – коэффициент распределения «цельная кровь-плазма»

R_s – разрешение между пиками

RSD – относительное стандартное отклонение (relative standard deviation)

SA – образцы после экстракции (spiked after extraction)

SIM – мониторинг одного иона (single ion monitoring)

SSS – исходный стандартный раствор (stock standard solution)

$t_{1/2}$ – период полувыведения

TF – фактор асимметрии пика (tailing factor)

V_d – кажущийся объём распределения в терминальной фазе

WSS – рабочий стандартный раствор (working standard solution)

XLogP – рассчитанный логарифм отношения концентраций вещества в октаноле и в воде

λ_z (Kel) константа скорости элиминации (терминальной)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trends in peptide drug discovery / M. Muttenthaler, G. F. King, D. J. Adams, P. F. Alewood // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2021. – Vol. 20, № 4. – P. 309-325.
2. Peptide Drugs: Current Status and it's Applications in the Treatment of Various Diseases / C. Chandarana, I. Juwarwala, S. Shetty, A. Bose // *Current Drug Research Reviews*. – 2024. – Vol. 16, № 3. – P. 381-394.
3. Recent Advances in the Development of Therapeutic Peptides / J. Fetse, S. Kandel, U.-F. Mamani, K. Cheng // *Trends in pharmacological sciences*. – 2023. – Vol. 44, № 7. – P. 425-441.
4. Li, Q. Therapeutic peptides: chemical strategies fortify peptides for enhanced disease treatment efficacy / Q. Li, W. Chao, L. Qiu // *Amino Acids*. – 2025. – Vol. 57, № 1. – P. 25.
5. Государственный реестр лекарственных средств. – URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx> (дата обращения: 22.03.2026).
6. Characterization of Synthetic Peptide Therapeutics Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: Challenges, Solutions, Pitfalls, and Future Perspectives / Z. Lian, N. Wang, Y. Tian, L. Huang // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2021. – Vol. 32, № 8. – P. 1852-1860.
7. Подходы к фармацевтическому анализу современных пептидных и олигонуклеотидных препаратов на примере инновационного препарата на основе малой интерферирующей РНК для лечения бронхиальной астмы / Л. М. Красных, В. В. Смирнов, Г. В. Раменская [и др.] // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2018. – Т. 18, № 3. – С. 184-190.
8. Фармакокинетика даларгина / Е. И. Каленикова (Лебединова), О. Ф. Дмитриева, Н. В. Коробов [и др.] // *Вопросы Медицинской Химии*. – 1988. – Т. 34, № 1. – С. 75-83.
9. Rayev, M. B. Main stages of immunoassay methods evolutionary development / M. B. Rayev // *Современные направления в биомедицине*. – 2025. – Т. 1, № 2. –

Электрон. версия. – URL: <https://ojs.kantiana.ru/main/article/view/12> (дата обращения: 22.03.2026).

10. Bogen, S. A. A Root Cause Analysis Into the High Error Rate in Clinical Immunohistochemistry / S. A. Bogen // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2019. – Vol. 27, № 5. – P. 329.

11. Sturgeon, C. M. Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk / C. M. Sturgeon, A. Viljoen // *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. – 2011. – Vol. 48, № 5. – P. 418-432.

12. Application of peptide biomarkers in life analysis based on liquid chromatography–mass spectrometry technology / T. Han, H. Cong, B. Yu, Y. Shen // *BioFactors*. – 2022. – Vol. 48, № 4. – P. 725-743.

13. Kang, L. LC–MS bioanalysis of intact proteins and peptides / L. Kang, N. Weng, W. Jian // *Biomedical Chromatography*. – 2020. – Vol. 34, № 1. – P. e4633.

14. Recent Trends in Therapeutic Drug Monitoring of Peptide Antibiotics / Z. Kilianova, I. Cizmarova, M. Spaglova, J. Piestansky // *Journal of Separation Science*. – 2024. – Vol. 47, № 19. – P. e202400583.

15. Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм / Е. В. Иванникова, В. П. Жердев, С. С. Бойко [и др.] // *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. – 2013. – № 2. – С. 1-17.

16. Metabolism and Excretion of Therapeutic Peptides: Current Industry Practices, Perspectives, and Recommendations / M. M. He, S. X. Zhu, J. R. Cannon [et al.] // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2023. – Vol. 51, № 11. – P. 1436-1450.

17. An efficient liquid chromatography-high resolution mass spectrometry approach for the optimization of the metabolic stability of therapeutic peptides / S. Esposito, R. Mele, R. Ingenito [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 409, № 10. – P. 2685-2696.

18. Hanson, C. M. Navigating Challenges in Mass Spectrometry Analysis of Endogenous and Synthetic Protein Modifications / C. M. Hanson, D. L. Bai, J. A. Marto // *Biomolecules*. – 2026. – Vol. 16, № 3. – P. 367.

19. Therapeutic peptides: current applications and future directions / L. Wang, N. Wang, W. Zhang [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2022. – Vol. 7, № 1. – P. 1-27.
20. Decoding the Challenges: navigating Intact Peptide Mass Spectrometry-Based Analysis for Biological Applications / M. De Cristofaro, A. Lenzi, S. Ghimenti [et al.] // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2024. – P. 1-23.
21. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives / V. Apostolopoulos, J. Bojarska, T.-T. Chai [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 2. – P. 430.
22. Иванов, В. Т. Эволюция биофармацевтики пептидных препаратов / В. Т. Иванов, В. И. Дейгин // *Биоорганическая химия*. – 2023. – Т. 49, № 3. – С. 229-242.
23. Xu, J. *Peptides Chemistry, Manufacturing, and Controls* / J. Xu // *Peptide Science* / ed. F. Liu. – Hoboken, NJ : Wiley, 2025. – P. 471–508. – [Electronic resource]. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119824701.ch14> (date accessed: 04.03.2026).
24. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides: recommendations 1983 // *European Journal of Biochemistry*. – 1984. – Vol. 138. – P. 9-37.
25. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation / T. Uhlig, T. Kyprianou, F. G. Martinelli [et al.] // *EuPA Open Proteomics*. – 2014. – Vol. 4. – P. 58-69.
26. *Advances in Food Biochemistry* / ed. F. Yildiz. – Boca Raton : CRC Press, 2009. – 524 p.
27. Reddy, B. Bioactive oligopeptides in dermatology: Part I / B. Reddy, T. Jow, B. M. Hantash // *Experimental Dermatology*. – 2012. – Vol. 21, № 8. – P. 563-568.
28. Zamyatnin, A. A. Biochemical problems of regulation by oligopeptides / A. A. Zamyatnin // *Biochemistry. Biokhimiia*. – 2004. – Vol. 69, № 11. – P. 1276-1282.
29. Knapp, S. *Polypeptide – The Definitive Guide* / S. Knapp. – 2021. – URL: <https://biologydictionary.net/polypeptide/> (date accessed: 21.03.2023).

30. Henninot, A. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? / A. Henninot, J. C. Collins, J. M. Nuss // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 61, № 4. – P. 1382-1414.
31. Erickson, H. P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy / H. P. Erickson // *Biological Procedures Online*. – 2009. – Vol. 11. – P. 32-51.
32. Sanvictores, T. Biochemistry, Primary Protein Structure / T. Sanvictores, F. Farci // *StatPearls* [Internet]. – StatPearls Publishing, 2025. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564343/> (date accessed: 13.03.2026)
33. Merritt, H. I. Bent into shape: Folded peptides to mimic protein structure and modulate protein function / H. I. Merritt, N. Sawyer, P. S. Arora // *Peptide Science*. – 2020. – Vol. 112, № 1. – P. e24145.
34. Smith, M. C. Features of protein-protein interactions that translate into potent inhibitors: topology, surface area and affinity / M. C. Smith, J. E. Gestwicki // *Expert Reviews in Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 14. – P. e16.
35. Modulation of Protein-Protein Interactions for the Development of Novel Therapeutics / I. Petta, S. Lievens, C. Libert [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2016. – Vol. 24, № 4. – P. 707-718.
36. Cell permeability beyond the rule of 5: Understanding the challenges of beyond-rule-of-5 compounds / P. Matsson, B. C. Doak, B. Over, J. Kihlberg // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – Vol. 101. – P. 42-61.
37. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design / A. C.-L. Lee, J. L. Harris, K. K. Khanna, J.-H. Hong // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 10. – P. 2383.
38. Fosgerau, K. Peptide therapeutics: current status and future directions / K. Fosgerau, T. Hoffmann // *Drug Discovery Today*. – 2015. – Vol. 20, № 1. – P. 122-128.
39. Neuroactive peptides as putative mediators of antiepileptic ketogenic diets / C. Giordano, M. Marchiò, E. Timofeeva, G. Biagini // *Frontiers in Neurology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 63.

40. Immunogenicity of immunomodulatory, antibody-based, oncology therapeutics / J. Davda, P. Declerck, S. Hu-Lieskovan [et al.] // Journal for ImmunoTherapy of Cancer. – 2019. – Vol. 7, № 1. – P. 105.

41. Waldmann, H. Human monoclonal antibodies: the residual challenge of antibody immunogenicity / H. Waldmann // Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). – 2014. – Vol. 1060. – P. 1-8.

42. Manufacturing of peptides exhibiting biological activity / A. Zambrowicz, M. Timmer, A. Polanowski [et al.] // Amino Acids. – 2013. – Vol. 44, № 2. – P. 315-320.

43. Purohit, K. Exploring the Potential of Bioactive Peptides: From Natural Sources to Therapeutics / K. Purohit, N. Reddy, A. Sunna // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25, № 3. – P. 1391.

44. A Comprehensive Review on the Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions of Approved GLP-1 Receptor Agonists and a Dual GLP-1/GIP Receptor Agonist / J. S. Min, S. J. Jo, S. Lee [et al.] // Drug Design, Development and Therapy. – 2025. – Vol. 19. – P. 3509-3537.

45. Peptide-based drug discovery: Current status and recent advances / K. Sharma, K. K. Sharma, A. Sharma, R. Jain // Drug Discovery Today. – 2023. – Vol. 28, № 2. – P. 103464. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644622004573> (date accessed: 04.03.2026).

46. A Review of Bioactive Peptides: Chemical Modification, Structural Characterization and Therapeutic Applications / H. Hou, J. Wang, J. Wang [et al.] // Journal of Biomedical Nanotechnology. – 2020. – Vol. 16, № 12. – P. 1687-1718.

47. Torre, B. G. de la. Peptide Therapeutics 2.0 / B. G. de la Torre, F. Albericio // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 10. – P. 2293.

48. Nordell, P. Systemic Pharmacokinetic Principles of Therapeutic Peptides / P. Nordell, R. Jansson-Löfmark, P. Gennemark // Clinical Pharmacokinetics. – 2026. – [Electronic resource]. – URL: <https://doi.org/10.1007/s40262-025-01615-z> (date accessed: 23.03.2026).

49. Di, L. Strategic Approaches to Optimizing Peptide ADME Properties / L. Di // The AAPS Journal. – 2015. – Vol. 17, № 1. – P. 134-143.
50. Recent Progress in the Oral Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins: Overview of Pharmaceutical Strategies to Overcome Absorption Hurdles / S. Mehrotra, P. Kalyan BG, P. G. Nayak [et al.] // Advanced Pharmaceutical Bulletin. – 2024. – Vol. 14, № 1. – P. 11-33.
51. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents / M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad, C. Björn // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2016. – Vol. 6. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2016.00194> (дата обращения: 22.08.2022).
52. Early endosomal escape of a cyclic cell-penetrating peptide allows effective cytosolic cargo delivery / Z. Qian, J. R. LaRochelle, B. Jiang [et al.] // Biochemistry. – 2014. – Vol. 53, № 24. – P. 4034-4046.
53. Daniel, E. E. Neuropeptide Function in the Gastrointestinal Tract / E. E. Daniel. – Boca Raton : CRC Press, 1990. – 521 p.
54. Yang, X.-D. Clinical Pharmacokinetics of Semaglutide: A Systematic Review / X.-D. Yang, Y.-Y. Yang // Drug Design, Development and Therapy. – 2024. – Vol. 18. – P. 2555-2570.
55. Schneck, K. Population pharmacokinetics of the GIP/GLP receptor agonist tirzepatide / K. Schneck, S. Urva // CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology. – 2024. – Vol. 13, № 3. – P. 494-503.
56. Zaragoza, F. Non-Covalent Albumin Ligands in FDA-Approved Therapeutic Peptides and Proteins / F. Zaragoza // Journal of Medicinal Chemistry. – 2023. – Vol. 66, № 6. – P. 3656-3663.
57. Diao, L. Pharmacokinetics and Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Correlations of Therapeutic Peptides / L. Diao, B. Meibohm // Clinical Pharmacokinetics. – 2013. – Vol. 52, № 10. – P. 855-868.
58. Offman, E. Pharmacokinetic Time Course Scaling of a Subcutaneously Administered Pegylated Peptide Conjugate for a First-in-Human Investigation /

E. Offman, A. N. Edginton // *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2017. – Vol. 42, № 1. – P. 69-78.

59. Effects of molecular weight and structural conformation of multivalent-based elastin-like polypeptides on tumor accumulation and tissue biodistribution / V. Sarangthem, B.-Y. Seo, A. Yi [et al.] // *Nanotheranostics*. – 2020. – Vol. 4, № 2. – P. 57-70.

60. Swami, R. Impact of physiochemical properties on pharmacokinetics of protein therapeutics / R. Swami, A. Shahiwala // *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2013. – Vol. 38, № 4. – P. 231-239.

61. Application of biomimetic HPLC to estimate lipophilicity, protein and phospholipid binding of potential peptide therapeutics / K. Valko, G. Ivanova-Berndt, P. Beswick [et al.] // *ADMET and DMPK*. – 2018. – Vol. 6, № 2. – P. 162-175.

62. Chakrabarti, A. C. Influence of Charge, Charge Distribution, and Hydrophobicity on the Transport of Short Model Peptides into Liposomes in Response to Transmembrane pH Gradients / A. C. Chakrabarti, I. Clark-Lewis, P. R. Cullis // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33, № 28. – P. 8479-8485.

63. Albumin Binding as a General Strategy for Improving the Pharmacokinetics of Proteins* / M. S. Dennis, M. Zhang, Y. G. Meng [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277, № 38. – P. 35035-35043. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818367309> (date accessed: 05.03.2026).

64. Reviewing Mechanistic Peptidomics in Body Fluids Focusing on Proteases / B. Magalhães, F. Trindade, A. S. Barros [et al.] // *PROTEOMICS*. – 2018. – Vol. 18, № 18. – P. 1800187.

65. Elimination Pathways of Fusion Protein and Peptide Drugs / A. Khodadoust, H. Aghamollaei, A. M. Latifi [et al.] // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. – 2020. – Vol. 11, № 2. – P. 9139-9147.

66. Review of Clinical Pharmacology Information for Peptides Found in US FDA Drug Labeling / R. Naik, J. Wang, L. Zhou [et al.] // *Journal of Clinical Pharmacology*. – 2025. – Vol. 65, № 11. – P. 1370-1380.

67. Drug-Drug Interactions Between Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonists and Oral Medications: A Systematic Review / B. Calvarysky, I. Dotan, D. Shepshelovich [et al.] // *Drug Safety*. – 2024. – Vol. 47, № 5. – P. 439-451.

68. Uncovering Effects of Ex Vivo Protease Activity during Proteomics and Peptidomics Sample Extraction in Rat Brain Tissue by Oxygen-18 Labeling / C. Stingl, M. Söderquist, O. Karlsson [et al.] // *Journal of Proteome Research*. – 2014. – Vol. 13, № 6. – P. 2807-2817.

69. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers / A. L. Niles, R. A. Moravec, P. E. Hesselberth [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2007. – Vol. 366, № 2. – P. 197-206.

70. Antimicrobial Peptides with Stability toward Tryptic Degradation / J. Svenson, W. Stensen, B.-O. Brandsdal [et al.] // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47, № 12. – P. 3777-3788.

71. Investigation of Peptide Biomarker Stability in Plasma Samples Using Time-Course MS Analysis / J. Yi, Z. Liu, C. A. Gelfand, D. Craft // *Serum/Plasma Proteomics: Methods and Protocols* / eds. R. J. Simpson, D. W. Greening. – Totowa, NJ : Humana Press, 2011. – P. 161-175. – [Electronic resource]. – URL: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-068-3_10 (date accessed: 05.03.2026).

72. Kristensen, K. Adsorption of Cationic Peptides to Solid Surfaces of Glass and Plastic / K. Kristensen, J. R. Henriksen, T. L. Andresen // *PLOS ONE*. – 2015. – Vol. 10, № 5. – P. e0122419.

73. White, S. H. Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces / S. H. White, W. C. Wimley // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. – 1998. – Vol. 1376, № 3. – P. 339-352.

74. Bovine serum albumin as a universal suppressor of non-specific peptide binding in vials prior to nano-chromatography coupled mass-spectrometry analysis / S. I. Kovalchuk, N. A. Anikanov, O. M. Ivanova [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2015. – Vol. 893. – P. 57-64.

75. Storage and Handling Guidelines for Custom Peptides / A. Turner, K. Radburn - Smith, A. Mushtaq, L. Tan // *Current Protocols in Protein Science*. – 2011. –

Vol. 64, № 1. – [Electronic resource]. – URL: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps1812s64> (date accessed: 05.03.2026).

76. The stability of C-peptide and insulin in plasma and serum samples under different storage conditions / D. X. Nkuna, S. P. Khoza, J. A. George, M. R. Maphayi // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2023. – Vol. 61, № 12. – P. 2150-2158.

77. Patel, S. A Review on Forced Degradation Strategies to Establish the Stability of Therapeutic Peptide Formulations / S. Patel, V. K. Vyas, P. J. Mehta // *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. – 2023. – Vol. 29, № 2. – P. 22.

78. Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза от 03 ноября 2016. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026107> (дата обращения: 02.03.2026).

79. ICH M10 on bioanalytical method validation : Scientific guideline / European Medicines Agency. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline> (date accessed: 02.03.2026).

80. Bioanalytical Method Validation : Guidance for Industry / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. – Rockville, MD, 2018. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry> (дата обращения: 28.06.2023).

81. Bernkop-Schnürch, A. Novel Bioadhesive Chitosan-EDTA Conjugate Protects Leucine Enkephalin from Degradation by Aminopeptidase N / A. Bernkop-Schnürch, C. Paikl, C. Valenta // *Pharmaceutical Research*. – 1997. – Vol. 14, № 7. – P. 917-922.

82. Synthesis, Characterization and In Vitro Evaluation of a Novel Glycol Chitosan-EDTA Conjugate to Inhibit Aminopeptidase-Mediated Degradation of Thymopoietin Oligopeptides / J. Feng, Y. Chen, F. Li [et al.] // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, № 8. – P. 1253.

83. Böttger, R. Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum / R. Böttger, R. Hoffmann, D. Knappe // PLOS ONE. – 2017. – Vol. 12, № 6. – P. e0178943. – [Electronic resource]. – URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0178943> (дата обращения: 29.01.2025).

84. Citrate anticoagulation and the dynamics of thrombin generation / K. G. Mann, M. F. Whelihan, S. Butenas, T. Orfeo // Journal of thrombosis and haemostasis: JTH. – 2007. – Vol. 5, № 10. – P. 2055-2061.

85. Gray, E. The anticoagulant and antithrombotic mechanisms of heparin / E. Gray, J. Hogwood, B. Mulloy // Handbook of Experimental Pharmacology. – 2012. – Vol. 207. – P. 43-61.

86. Handling and Storage Guidelines for Peptides and Proteins. – URL: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/cell-and-developmental-biology-research/handling-and-storage?srsltid=AfmBOop4vvW-HBPL0LvSca4GIRYwxJalDjBm1re8URgGC9zGi-LyvW7o> (дата обращения: 05.03.2026).

87. Sample preparation methods in bottom-up proteomics / E. Giménez, L. Pont, F. Benavente // Comprehensive Sampling and Sample Preparation / ed. M. Soylak. – 2nd ed. – Amsterdam : Academic Press, 2025. – Vol. 2. – P. 838–850. – [Electronic resource]. – URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15978-7.00119-3> (date accessed: 02.03.2026).

88. Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry / G. Zhang, R. S. Annan, S. A. Carr, T. A. Neubert // Current Protocols in Protein Science. – 2010. – Vol. 62, № 1. – [Electronic resource]. – URL: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps1601s62> (date accessed: 06.03.2026).

89. Optimization for peptide sample preparation for urine peptidomics / T. K. Sigdel, C. D. Nicora, S.-C. Hsieh [et al.] // Clinical Proteomics. – 2014. – Vol. 11, № 1. – P. 7.

90. Rogers, J. C. Sample Preparation for Mass Spectrometry-Based Proteomics; from Proteomes to Peptides / J. C. Rogers, R. D. Bomgarden // *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications* / eds. H. Mirzaei, M. Carrasco. – Cham : Springer International Publishing, 2016. – Vol. 919. – P. 43-62. – [Electronic resource]. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-41448-5_3 (дата обращения: 06.03.2026).

91. Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry / K. D. W. Roth, Z.-H. Huang, N. Sadagopan, J. T. Watson // *Mass Spectrometry Reviews*. – 1998. – Vol. 17, № 4. – P. 255-274.

92. Feasibility assessment of a novel selective peptide derivatization strategy for sensitivity enhancement for the liquid chromatography/tandem mass spectrometry bioanalysis of protein therapeutics in serum / L. Yuan, A. Mai, A. Aubry [et al.] // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2014. – Vol. 28, № 7. – P. 705-712.

93. Li, W. Basic Sample Preparation Techniques in LC - MS Bioanalysis: Protein Precipitation, Liquid-Liquid Extraction, and Solid - Phase Extraction / W. Li, W. Jian, Y. Fu // *Sample Preparation in LC - MS Bioanalysis* / eds. W. Li [et al.]. – Hoboken, NJ : Wiley, 2019. – P. 1–30. – [Electronic resource]. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119274315.ch1> (date accessed: 06.03.2026).

94. Sample Preparation Techniques for the Untargeted LC-MS-Based Discovery of Peptides in Complex Biological Matrices / I. Finoulst, M. Pinkse, W. Van Dongen, P. Verhaert // *BioMed Research International*. – 2011. – Vol. 2011, № 1. – P. 245291.

95. Liquid-liquid extraction of biopharmaceuticals from fermented broth: trends and future prospects / N. V. Dos Santos, V. De Carvalho Santos-Ebinuma, A. Pessoa Junior, J. F. B. Pereira // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2018. – Vol. 93, № 7. – P. 1845-1863.

96. Poole C. F. Principles and practice of solid-phase extraction / C. F. Poole // *Comprehensive Analytical Chemistry*. – Amsterdam : Elsevier, 2002. – Vol. 37. – P. 341–387. – [Electronic resource]. – URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166526X02800496>
(date accessed: 06.03.2026).

97. Comparison of different protein precipitation and solid-phase extraction protocols for the study of the catabolism of peptide drugs by LC-HRMS / S. Esposito, D. Vanni, S. Menta [et al.] // *Journal of Peptide Science*. – 2020. – Vol. 26, № 9. – P. e3272.

98. Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography–mass spectrometry / H. John, M. Walden, S. Schäfer [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2004. – Vol. 378, № 4. – P. 883-897.

99. Li, H. LC - MS Bioanalysis of Peptides and Polypeptides / H. Li, C. A. James // *Handbook of LC - MS Bioanalysis* / eds. W. Li, J. Zhang, F. L. S. Tse. – Hoboken, NJ : Wiley, 2013. – P. 535 - 549. – [Electronic resource]. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118671276.ch42> (date accessed: 22.05.2026).

100. Yuan, L. Sample Preparation for LC - MS Bioanalysis of Peptides / L. Yuan // *Sample Preparation in LC - MS Bioanalysis* / eds. W. Li [et al.]. – Hoboken, NJ : Wiley, 2019. – P. 284 - 303. – [Electronic resource]. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119274315.ch23> (date accessed: 23.09.2024).

101. Hydrophilic interaction liquid chromatography-solid phase extraction directly combined with protein precipitation for the determination of triptorelin in plasma / J. Wang, S. Kong, J. Yan [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2014. – Vol. 960. – P. 214-221.

102. Investigation of commercial sorbents for the analysis of opioid peptides in human plasma by on-line SPE-CE / F. Benavente, S. Medina-Casanellas, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot // *Journal of Separation Science*. – 2010. – Vol. 33, № 9. – P. 1294-1304.

103. Haggag, Y. Peptides as Drug Candidates: Limitations and Recent Development Perspectives / Y. Haggag, S. El-Gizawy, M. Osman // *BioMed Research*

International. – 2018. – Vol. 2018. – [Electronic resource]. – URL: <http://dx.doi.org/10.26717/BJSTR.2018.08.001694> (date accessed: 03.10.2022).

104. Morimoto, B. H. Therapeutic peptides for CNS indications: Progress and challenges / B. H. Morimoto // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 26, № 10. – P. 2859-2862.

105. Efficient Delivery of Cyclic Peptides into Mammalian Cells with Short Sequence Motifs / Z. Qian, T. Liu, Y.-Y. Liu [et al.] // *ACS Chemical Biology*. – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. 423-431.

106. Singh-Franco, D. Pramlintide acetate injection for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus / D. Singh-Franco, G. Robles, D. Gazze // *Clinical Therapeutics*. – 2007. – Vol. 29, № 4. – P. 535-562.

107. Leder, B. Z. Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Protein Analogs in Osteoporosis Therapy / B. Z. Leder // *Current Osteoporosis Reports*. – 2017. – Vol. 15, № 2. – P. 110-119.

108. Comparison of a Short Linear Antimicrobial Peptide with Its Disulfide-Cyclized and Cyclotide-Grafted Variants against Clinically Relevant Pathogens / J. Koehbach, J. Gani, K. Hilpert, D. J. Craik // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9, № 6. – P. 1249. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/6/1249> (date accessed: 24.03.2023).

109. Heinis, C. Encoded libraries of chemically modified peptides / C. Heinis, G. Winter // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2015. – Vol. 26. – P. 89-98.

110. A Survey and Guide to the Development of Fatty Acid - derivatized Peptide Therapeutics / M. T. Jacobsen, C. Poulsen, K. L. Kopp [et al.] // *Peptide Science* / ed. F. Liu. - Hoboken, NJ : Wiley, 2025. – P. 203-268. – [Electronic resource]. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119824701.ch07> (date accessed: 22.04.2026.).

111. Enhancing the Cell Permeability of Stapled Peptides with a Cyclic Cell-Penetrating Peptide / P. G. Dougherty, J. Wen, X. Pan [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 62, № 22. – P. 10098-10107.

112. Synthesis and Biological Properties of Polyphenol-Containing Linear and Dendrimeric Cationic Peptides / A. Shatilov, S. Andreev, A. Shatilova [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2024. – Vol. 89. – P. 173-183.

113. Peptide- and saccharide-conjugated dendrimers for targeted drug delivery: a concise review / J. Liu, W. D. Gray, M. E. Davis, Y. Luo // *Interface Focus*. – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 307-324.

114. Harris, A. G. Somatostatin and somatostatin analogues: pharmacokinetics and pharmacodynamic effects / A. G. Harris // *Gut*. – 1994. – Vol. 35, № 3 Suppl. – P. S1-S4.
– [Electronic resource]. – URL: https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gut.35.3_Suppl.S1 (date accessed: 23.03.2023).

115. Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours / I. M. Modlin, M. Pavel, M. Kidd, B. I. Gustafsson // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. – 2010. – Vol. 31, № 2. – P. 169-188.

116. Kalafatovic, D. Cell-Penetrating Peptides: Design Strategies beyond Primary Structure and Amphipathicity / D. Kalafatovic, E. Giralt // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, № 11. – P. 1929. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/11/1929> (date accessed: 18.03.2026).

117. Prediction of human blood-to-plasma drug concentration ratio / T. Uchimura, M. Kato, T. Saito, H. Kinoshita // *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. – 2010. – Vol. 31, № 5-6. – P. 286-297.

118. Predicting blood-to-plasma concentration ratios of drugs from chemical structures and volumes of distribution in humans / H. Mamada, K. Iwamoto, Y. Nomura, Y. Uesawa // *Molecular Diversity*. – 2021. – Vol. 25, № 3. – P. 1261-1270.

119. Whole Blood Or Plasma: What is the Ideal Matrix for pharmacokinetic-driven Drug Candidate selection? / R. P. Dash, V. Veeravalli, J. A. Thomas [et al.] // *Future Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 157-171.

120. Bteich, M. An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions / M. Bteich // *Heliyon*. – 2019. – Vol. 5, № 11. – P. e02879. – [Electronic

resource]. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844019365387> (date accessed: 08.03.2026).

121. A Sequential Ultrafiltration Method to Enhance the Accuracy and Throughput in Plasma Protein Binding Tests / S. H. Jeon, M. C. Kim, H. Lee [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 17, № 2. – P. 273. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.mdpi.com/1999-4923/17/2/273> (date accessed: 24.02.2026).

122. Rapid equilibrium dialysis, ultrafiltration or ultracentrifugation? Evaluation of methods to quantify the unbound fraction of substances in plasma / D. Dimitrijevic, E. Fabian, D. Funk-Weyer, R. Landsiedel // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2023. – Vol. 651. – P. 114-120.

123. De Boer, T. Equilibrium Dialysis, Ultracentrifugation, and Ultrafiltration in LC - MS Bioanalysis / T. De Boer, H. Meijering // *Sample Preparation in LC - MS Bioanalysis* / eds. W. Li [et al.]. – Hoboken, NJ : Wiley, 2019. – P. 45-51. – [Electronic resource]. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119274315.ch3> (date accessed: 08.03.2026).

124. Validation of a Rapid Equilibrium Dialysis Approach for the Measurement of Plasma Protein Binding / N. J. Waters, R. Jones, G. Williams, B. Sohal // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2008. – Vol. 97, № 10. – P. 4586-4595.

125. Ultrafiltration Method for Plasma Protein Binding Studies and Its Limitations / C.-M. Toma, S. Imre, C.-E. Vari [et al.] // *Processes*. – 2021. – Vol. 9, № 2. – P. 382.

126. Abbood, A. Overview of the Role of Chromatographic Modes in Pharmaceutical Peptide Analysis / A. Abbood // *International Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2025. – Vol. 5, № 2. – P. 22-29.

127. Peptide-based therapeutics: quality specifications, regulatory considerations, and prospects / S. Rastogi, S. Shukla, M. Kalaivani, G. N. Singh // *Drug Discovery Today*. – 2019. – Vol. 24, № 1. – P. 148-162.

128. A strategy for assessing peak purity of pharmaceutical peptides in reversed-phase chromatography methods using two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Part I: Selection of columns and mobile phases / P. Petersson, S. Buckenmaier, M. R. Euerby, D. R. Stoll // *Journal of Chromatography A*. – 2023. – Vol.

1693. – P. 463874. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967323001024> (date accessed: 08.03.2026).

129. Hearn, M. T. W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins: LXVI. Investigations on the effects of chromatographic dwell in the reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of proteins / M. T. W. Hearn, A. N. Hodder, M.-I. Aguilar // *Journal of Chromatography A*. – 1985. – Vol. 327. – P. 47-66.

130. Aguilar, M. I. High-resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins / M. I. Aguilar, M. T. Hearn // *Methods in Enzymology*. – San Diego : Academic Press, 1996. – Vol. 270. – P. 3–26. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/chapter/bookseries/abs/pii/S0076687996700034> (date accessed: 09.03.2026).

131. Bączek, T. Predictions of peptides' retention times in reversed-phase liquid chromatography as a new supportive tool to improve protein identification in proteomics / T. Bączek, R. Kaliszan // *PROTEOMICS*. – 2009. – Vol. 9, № 4. – P. 835-847.

132. Analysis of short-chain bioactive peptides by unified chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Part II. Comparison to reversed-phase ultra-high performance liquid chromatography / J. Molineau, M. Hideux, P. Hennig [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2022. – Vol. 1663. – P. 462771. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967321008931> (date accessed: 09.03.2026).

133. Strategies to reduce aspecific adsorption of peptides and proteins in liquid chromatography–mass spectrometry based bioanalyses: An overview / K. Maes, I. Smolders, Y. Michotte, A. Van Eeckhaut // *Journal of Chromatography A*. – 2014. – Vol. 1358. – P. 1-13.

134. Systematic Assessment of Matrix Effect, Recovery, and Process Efficiency Using Three Complementary Approaches: Implications for LC-MS/MS Bioanalysis Applied to Glucosylceramides in Human Cerebrospinal Fluid / L. Castillo-Ribelles, J.-A. Arranz-Amo, J. Hernandez-Vara [et al.] // *ACS Omega*. – 2025. – Vol. 10, № 44. – P.

52449-52458. – [Electronic resource]. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.5c05399> (date accessed: 09.03.2026).

135. Yoshida, T. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review / T. Yoshida // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 2004. – Vol. 60, № 3. – P. 265-280.

136. Potential of hydrophilic interaction chromatography for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals / A. Periat, S. Fekete, A. Cusumano [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2016. – Vol. 1448. – P. 81-92.

137. Jandera, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review / P. Jandera // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – Vol. 692. – P. 1-25.

138. A systematic investigation of the effect of sample diluent on peak shape in hydrophilic interaction liquid chromatography / J. Ruta, S. Rudaz, D. V. McCalley [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – Vol. 1217, № 52. – P. 8230-8240.

139. Evaluation of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) versus C18 reversed-phase chromatography for targeted quantification of peptides by mass spectrometry / R. Simon, Q. Enjalbert, J. Biarc [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2012. – Vol. 1264. – P. 31-39.

140. Solving the retention time repeatability problem of hydrophilic interaction liquid chromatography / K. Serafimov, C. Knappe, F. Li [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2024. – Vol. 1730. – P. 465060. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967324004345> (date accessed: 09.03.2026).

141. Kuril, A. K. Ion Exchange Chromatography: A Versatile Technique for Comprehensive Characterization of Therapeutic Proteins and Peptides / A. K. Kuril, S. Elumalai, P. K. Subbappa // *Current Analytical Chemistry*. – 2025. – Vol. 21, № 7. – P. 795-804.

142. Al Musaimi, O. Advances in Therapeutic Peptides Separation and Purification / O. Al Musaimi, D. M. M. Jaradat // *Separations*. – 2024. – Vol. 11, № 8. – P. 233.

143. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals / S. Fekete, A. Beck, J.-L. Veuthey, D. Guillarme // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2015. – Vol. 113. – P. 43-55.
144. Wang, N. W. Ion exchange in purification / N. W. Wang // *Bioprocess Technology*. – 1990. – Vol. 9. – P. 359-400.
145. Mant, C. T. Mixed-mode hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography (HILIC/CEX) of peptides and proteins / C. T. Mant, R. S. Hodges // *Journal of Separation Science*. – 2008. – Vol. 31, № 15. – P. 2754-2773.
146. Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry for Complex Protein Digest Analysis Using Parallel Gradients / R. S. Van Den Hurk, B. Lagerwaard, N. J. Terlouw [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2024. – Vol. 96, № 22. – P. 9294-9301.
147. Quantitation of Human Peptides and Proteins Via MS: Review of Analytically Validated Assays / D. L. Chappell, M. E. Lassman, T. McAvoy [et al.] // *Bioanalysis*. – 2014. – Vol. 6, № 13. – P. 1843-1857.
148. MALDI versus ESI: The Impact of the Ion Source on Peptide Identification / W. M. Nadler, D. Waidelich, A. Kerner [et al.] // *Journal of Proteome Research*. – 2017. – Vol. 16, № 3. – P. 1207-1215.
149. Shen, T.-L. High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis / T.-L. Shen // *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. – Chichester : Wiley, 2006. – P. 1–58. – [Electronic resource]. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470027318.a1618.pub4> (date accessed: 09.03.2026).
150. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers / F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, B. T. Chait // *Analytical Chemistry*. – 1991. – Vol. 63, № 24. – P. 1193A-1203A.
151. Borisov, R. S. Reactive Matrices for Analytical Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Mass Spectrometry / R. S. Borisov, M. D. Matveeva, V. G. Zaikin // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2023. – Vol. 53, № 5. – P. 1027-1043.

152. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Method for Selectively Producing Either Singly or Multiply Charged Molecular Ions / S. Trimpin, E. D. Inutan, T. N. Herath, C. N. McEwen // *Analytical Chemistry*. – 2010. – Vol. 82, № 1. – P. 11-15.

153. Persike, M. Rapid simultaneous quantitative determination of different small pharmaceutical drugs using a conventional matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system / M. Persike, M. Karas // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2009. – Vol. 23, № 22. – P. 3555-3562.

154. Advances in hyphenated analytical techniques for shotgun proteome and peptidome analysis—A review / L. Hu, M. Ye, X. Jiang [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2007. – Vol. 598, № 2. – P. 193-204.

155. Mei, Y. Advances in Protein and Polypeptide Drug Analytics / Y. Mei, H. Liu // *Current Pharmaceutical Design*. – 2026. – [Electronic resource]. – URL: <https://doi.org/10.2174/0113816128355706250626053659> (date accessed: 02.03.2026) (date accessed: 02.03.2026).

156. Comparison of Triple Quadrupole And High-Resolution Tof-Ms For Quantification of Peptides / L. Dillen, W. Cools, L. Vereyken [et al.] // *Bioanalysis*. – 2012. – Vol. 4, № 5. – P. 565-579.

157. Rauh, M. LC–MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry / M. Rauh // *Journal of Chromatography B*. – 2012. – Vol. 883-884. – P. 59-67.

158. Wang, E. H. Multiple Reaction Monitoring for Direct Quantitation of Intact Proteins Using a Triple Quadrupole Mass Spectrometer / E. H. Wang, P. C. Combe, K. A. Schug // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2016. – Vol. 27, № 5. – P. 886-896.

159. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial / V. Lange, P. Picotti, B. Domon, R. Aebersold // *Molecular Systems Biology*. – 2008. – Vol. 4. – P. 222.

160. Current Role and Potential of Triple Quadrupole Mass Spectrometry in Biomedical Research and Clinical Applications / A. Tsakalof, A. A. Sysoev, K. V.

Vyatkina [et al.] // *Molecules*. – 2024. – Vol. 29, № 23. – P. 5808. – [Electronic resource].
– URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11643727/> (date accessed: 10.03.2026).

161. Development of mass spectrometry selected reaction monitoring method for quantitation and pharmacokinetic study of stepharine in rabbit plasma / A. T. Kopylov, K. G. Kuznetsova, O. M. Mikhailova [et al.] // *Advances in Pharmacological Sciences*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 961850. – [Electronic resource]. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1155/2014/961850> (date accessed: 10.03.2026).

162. Allen, D. R. Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications / D. R. Allen, B. C. McWhinney // *The Clinical Biochemist Reviews*. – 2019. – Vol. 40, № 3. – P. 135-146.

163. Mass Spectrometry–Based Proteomics in Clinical Diagnosis of Amyloidosis and Multiple Myeloma: A Review (2012–2024) / K. Kratka, P. Sistik, I. Olivkova [et al.] // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2025. – Vol. 60, № 3. – P. e5116. – [Electronic resource]. – URL: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jms.5116> (date accessed: 16.03.2026).

164. Trobbiani, S. Quantitation using high-resolution mass spectrometry (HRMS) / S. Trobbiani // *Toxicologie Analytique et Clinique*. – 2025. – Vol. 37, № 1. – P. S62. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352007824002944> (date accessed: 16.03.2026).

165. Mycotoxins Contamination in Rice: Analytical Methods, Occurrence and Detoxification Strategies / A. R. Santos, F. Carreiró, A. Freitas [et al.] // *Toxins*. – 2022. – Vol. 14, № 9. – P. 647. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/9/647> (date accessed: 16.03.2026).

166. Mass Spectrometric Identification of Endogenous Peptides / M. Azkargorta, I. Escobes, I. Iloro, F. Elortza // *Peptidomics* / eds. M. Schrader, L. Fricker. – New York,

NY : Springer New York, 2018. – Vol. 1719. – P. 59-70. – [Electronic resource]. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7537-2_4 (дата обращения: 10.03.2026).

167. Nilsson, J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based fragmentation analysis of glycopeptides / J. Nilsson // *Glycoconjugate Journal*. – 2016. – Vol. 33, № 3. – P. 261-272.

168. Shukla, A. K. Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation / A. K. Shukla, J. H. Futrell // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2000. – Vol. 35, № 9. – P. 1069-1090.

169. Bayat, P. Tutorial: ion activation in tandem mass spectrometry using ultra - high resolution instrumentation / P. Bayat, D. Lesage, R. B. Cole // *Mass Spectrometry Reviews*. – 2020. – Vol. 39, № 5-6. – P. 680-702.

170. Riley, N. M. The Role of Electron Transfer Dissociation in Modern Proteomics / N. M. Riley, J. J. Coon // *Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 90, № 1. – P. 40-64.

171. The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis / L. M. Mikesch, B. Ueberheide, A. Chi [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2006. – Vol. 1764, № 12. – P. 1811-1822.

172. Jadhav, S. Optimizing Internal Standard Selection for Precise Bioanalytical Quantification of Antidiabetic Drugs: A Critical Review / S. Jadhav, S. Auti, S. Sharma // *Chromatographia*. – 2025. – Vol. 88, № 9. – P. 637-657.

173. Tsikas, D. Quantitative GC-NICI-MS and GC-NICI-MS/MS analysis by using isotopologs as internal standards: A tutorial review / D. Tsikas // *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2025. – Vol. 1262. – P. 124648.

174. Li, W. Quantification of Endogenous Analytes in Biofluids by a Combination of LC-MS and Construction of Calibration Curves Using Stable-Isotopes as Surrogate Analytes with True Biological Control Matrices / W. Li, L. Cohen, E. Kindt // *Handbook of LC-MS Bioanalysis*. – Hoboken, NJ : Wiley, Ltd, 2013. – P. 649–657. – [Electronic resource]. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118671276.ch51> (date accessed: 02.04.2026).

175. Wang, S. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response?: A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma / S. Wang, M. Cyronak, E. Yang // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2007. – Vol. 43, № 2. – P. 701-707.

176. Stokvis, E. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? / E. Stokvis, H. Rosing, J. H. Beijnen // *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*. – 2005. – Vol. 19, № 3. – P. 401-407.

177. Srinivas, N. R. Insights Influencing the Selection of Stable Isotopically Labeled Internal Standards (SIL-ISs) for LC–MS/MS Quantitative Assays / N. R. Srinivas, R. R. Kallem, M. G. Bartlett // *Biomedical Chromatography*. – 2025. – Vol. 39, № 11. – P. e70236. – [Electronic resource]. – URL: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.70236> (date accessed: 02.04.2026).

178. Remily-Wood, E. R. Evaluation of Protein Quantification using Standard Peptides Containing Single Conservative Amino Acid Replacements / E. R. Remily-Wood, J. M. Koomen // *Journal of mass spectrometry : JMS*. – 2012. – Vol. 47, № 2. – P. 188.

179. Государственный реестр лекарственных средств : офиц. сайт. Гепон. Раствор для приема внутрь. [Электронный ресурс]. – URL: https://grls.pharm-portal.ru/grls/d5341dbc-1d84-467c-9a52-7bdf9affb54e?filters%5Btrade_name%5D%5B0%5D%5Btext%5D=%D0%B3%D0%B5%D0%BF%D0%BE%D0%BD&search=%D0%B3%D0%B5%D0%BF%D0%BE%D0%BD#summary (дата обращения: 23.09.2024).

180. Государственный реестр лекарственных средств : офиц. сайт. Гепон. Лиофилизат для приготовления раствора для приема внутрь. [Электронный ресурс] – URL: https://grls.pharm-portal.ru/grls/1c4a6a98-06a6-4583-b0fe-26c848f7a7c1?filters%5Btrade_name%5D%5B0%5D%5Btext%5D=%D0%B3%D0%B5%D0%BF%D0%BE%D0%BD&search=%D0%B3%D0%B5%D0%BF%D0%BE%D0%BD#summary (дата обращения: 23.09.2024).

181. Peptide Mass Calculator - Peptide Protein Research (PPR Ltd) [Electronic resource] – URL: <https://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/> (дата обращения: 10.03.2026).

182. PepCalc.com - Peptide calculator [Electronic resource] – URL: <https://pepcalc.com/> (дата обращения: 10.03.2026).

183. Peptide Calculator for Research [Electronic resource] – URL: <https://www.peptides.de/Support/Peptide-Calculator/> (date accessed: 20.03.2026).

184. Kalamaridis, D. Drug Partition in Red Blood Cells / D. Kalamaridis, K. DiLoreto // Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods / eds. G. W. Caldwell, Z. Yan. – Totowa, NJ : Humana Press, 2014. – P. 39-47. – [Electronic resource]. – URL: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-742-6_3 (date accessed: 27.02.2026).

185. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel / Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, S. Xie // Computer Methods and Programs in Biomedicine. – 2010. – Vol. 99, № 3. – P. 306-314.

186. Maleknia, S. D. Charge Ratio Analysis Method: Approach for the Deconvolution of Electrospray Mass Spectra / S. D. Maleknia, K. M. Downard // Analytical Chemistry. – 2005. – Vol. 77, № 1. – P. 111-119. – [Electronic resource]. – URL: <https://pubs.acs.org/ancham/article-abstract/77/1/111/3446559/Charge-Ratio-Analysis-Method-Approach-for-the?redirectedFrom=PDF> (дата обращения: 12.03.2026).

187. Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model / A. R. Dongré, J. L. Jones, Á. Somogyi, V. H. Wysocki // Journal of the American Chemical Society. – 1996. – Vol. 118, № 35. – P. 8365-8374.

188. Jupiter 5 μm C18 300 Å, LC Column 50 x 4.6 mm (00B-4053-E0). Phenomenex [Electronic resource] – URL: <https://www.phenomenex.com/part?partNo=00B-4053-E0&srsId=AfmBOooT5cxuvGKAxk1jqbjMcZPI-mD5u1zg1jtRXvWTflk794yJiLVB> (date accessed: 20.03.2026).

189. Theodoropoulos, D. Peptide Synthesis. I. The Use of p-Toluenesulfonyl Chloride for Carboxyl Activation ¹ / D. Theodoropoulos, J. Gazopoulos // The Journal of Organic Chemistry. – 1962. – Vol. 27, № 6. – P. 2091-2093.

190. N-terminus FITC labeling of peptides on solid support: the truth behind the spacer / M. Jullian, A. Hernandez, A. Maurras [et al.] // Tetrahedron Letters. – 2009. – Vol. 50, № 3. – P. 260-263.

191. Koller, M. Derivatization of peptides for their determination by chromatographic methods : Chromatography of Peptides / M. Koller, H. Eckert // Analytica Chimica Acta. – 1997. – Vol. 352, № 1. – P. 31-59.

192. Chhanikar, P. T. Derivatizing Reagents for Detection of Organic Compounds By HPLC / P. T. Chhanikar, K. R. Gupta, M. J. Umekar // Asian Journal of Applied Chemistry Research. – 2021. – Vol. 9, № 2. – P. 1-13.

193. In Matrix Derivatization Combined with LC-MS/MS Results in Ultrasensitive Quantification of Plasma Free Metanephrines and Catecholamines / M. van Faassen, R. Bischoff, K. Eijkelenkamp [et al.] // Analytical Chemistry. – 2020. – Vol. 92, № 13. – P. 9072-9078.

194. Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry / B. A. Garcia, S. Mollah, B. M. Ueberheide [et al.] // Nature Protocols. – 2007. – Vol. 2, № 4. – P. 933-938.

195. Stevens, W. Mixed carboxylic acid anhydrides: II. Esterification of alcohols with the formic acid/acetic anhydride reaction mixture / W. Stevens, A. Van Es // Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas. – 1964. – Vol. 83, № 12. – P. 1287-1293.

196. An Effective Use of Benzoic Anhydride and Its Derivatives for the Synthesis of Carboxylic Esters and Lactones: A Powerful and Convenient Mixed Anhydride Method Promoted by Basic Catalysts / I. Shiina, M. Kubota, H. Oshiumi, M. Hashizume // The Journal of Organic Chemistry. – 2004. – Vol. 69, № 6. – P. 1822-1830.

197. Otera, J. Transesterification / J. Otera // Chemical reviews. – 1993. – Vol. 93, № 4. – P. 1449-1470.

198. Derivatizing Agent Selection for Hydrophilic Lysine- and Arginine-Containing Tetradecapeptide Analysis in Human Plasma by RP HPLC-MS/MS /

M. A. Tokareva, E. S. Melnikov, E. N. Fisher [et al.] // *Analytica*. – 2025. – Vol. 6, № 3. – P. 23.

199. Фишер, Е. Н. Разработка и валидация методики количественного определения бусерелина в плазме крови животных / Е. Н. Фишер, Е. С. Мельников, И. Е. Шохин // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2019. – Т. 8, № 3. – С. 79-84.

200. PubChem. Buserelin [Electronic resource] – URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/50225> (date accessed: 20.03.2026).

201. Caruso, F. S. Pharmacokinetics and clinical pharmacology of indapamide / F. S. Caruso, R. R. Szabadi, R. A. Vukovich // *American Heart Journal*. – 1983. – Vol. 106, № 1, Part 2. – P. 212-220.

202. Разработка и валидация методики определения тетрадекапептида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС / М. А. Токарева, Е. С. Мельников, М. В. Белова [и др.] // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 171-180.

203. Ewles, M. Bioanalytical approaches to analyzing peptides and proteins by LC–MS/MS / M. Ewles, L. Goodwin // *Bioanalysis*. – 2011. – Vol. 3, № 12. – P. 1379-1397.

204. Schulz, J. A. Plasma protein-mediated uptake and contradictions to the free drug hypothesis: a critical review / J. A. Schulz, D. M. Stresser, J. C. Kalvass // *Drug Metabolism Reviews*. – 2023. – Vol. 55, № 3. – P. 205-238.

205. Zhao, H. Plasma Protein Binding as an Optimizable Parameter for In Vivo Efficacy / H. Zhao // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2025. – Vol. 68, № 11. – P. 12136-12140.

206. Wagner, J. G. Simple model to explain effects of plasma protein binding and tissue binding on calculated volumes of distribution, apparent elimination rate constants and clearances / J. G. Wagner // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 1976. – Vol. 10, № 6. – P. 425-432.

207. ICH M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals : Scientific guideline / European Medicines Agency. –

[Electronic resource]. – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m3-r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-pharmaceuticals-scientific-guideline> (date accessed: 18.03.2026).

208. Investigation of drug interactions : Scientific guideline / European Medicines Agency. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/investigation-drug-interactions-scientific-guideline> (date accessed: 18.03.2026).

209. Изучение особенностей распределения терапевтического олигопептида в цельной крови человека *in vitro* / М. А. Токарева, Е. С. Мельников, И. П. Ремезова, М. В. Белова // Естественные и технические науки. – 2026. – Т. 216, № 5. – С. 151-160.

210. Maddison, J. E. Clinical pharmacokinetics / J. E. Maddison, S. W. Page, T. M. Dyke // Small Animal Clinical Pharmacology. – Edinburgh : Elsevier, 2008. – P. 27–40. – [Electronic resource]. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978070202858850004X> (date accessed: 19.03.2026).

211. Kuan, I. H. S. The influence of flip - flop in population pharmacokinetic analyses / I. H. S. Kuan, D. F. B. Wright, S. B. Duffull // CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology. – 2023. – Vol. 12, № 3. – P. 285-287.

212. Population pharmacokinetic-pharmacodynamic model of subcutaneous bupivacaine in a novel extended-release microparticle formulation / I. K. Storgaard, E. K. Jensen, S. Bøgevig [et al.] // Basic & clinical pharmacology & toxicology. – 2024. – Vol. 134, № 5. – P. 676-685.

213. Impact of injection sites on clinical pharmacokinetics of subcutaneously administered peptides and proteins / P. Zou, F. Wang, J. Wang [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2021. – Vol. 336. – P. 310-321.

214. There is Only One Valid Definition of Clearance: Critical Examination of Clearance Concepts Reveals the Potential for Errors in Clinical Drug Dosing Decisions / L. Z. Benet, J. K. Sodhi, G. Makrygiorgos, A. Mesbah // The AAPS Journal. – 2021. – Vol. 23, № 3. – P. 67.

Приложение А. Акт внедрения в учебный процесс Института фармации им. А.П. Нелюбина



23 АПР 2026

АКТ 927

о внедрении результатов диссертации Токаревой Маргариты Алексеевны в учебный процесс Института Фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Токаревой Маргариты Алексеевны

на тему «Разработка, валидация и апробация методики определения инновационного лекарственного средства пептидной структуры в биологических образцах» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармации им. А.П. Нелюбина

при изучении дисциплин «Методы фармакопейного анализа», читаемых студентам по направлению подготовки 33.05.01 Фармация.

Директор Института Фармации
им. А.П. Нелюбина

(Подпись)

Раменская Г.В.

Заведующий учебной частью
кафедры фармацевтической и
токсикологической химии им.
А.П. Арзамасцева

(Подпись)

Кузина В.Н.

Начальник Учебного
управления

(Подпись)

Юдина Л.Ю.

Рисунок А.1 – Акт внедрения в учебный процесс Института фармации им. А.П.Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Приложение Б. Акт внедрения в ООО «Центр Фармацевтической Аналитики»



Общество с ограниченной ответственностью
«ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АНАЛИТИКИ»

Юр./факт. адрес: 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д.8, пом.1/1.
ИНН 9701010444, КПП 772701001, ОГРН 1157746853780, ОКПО 49285758,
Р/с 40702810838000271503 в ПАО СБЕРБАНК г. Москва, к/с 30101810400000000225,
website: cpha.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ЦФА»
д.фарм.н., Шохин И. Е.



Акт внедрения

Предмет внедрения: биоаналитическая методика количественного определения пептида треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в человеческой плазме крови человека, применяемая для проведения фармакокинетических исследований препаратов треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата, результаты проведения исследований фармакокинетики препаратов треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата.

Кем предложен: соискателем учёной степени кандидата фармацевтических наук Токаревой Маргаритой Алексеевной.

Кем и где выдан: исследовательский центр ООО «ЦФА».

Цель внедрения: проведение исследований фармакокинетики препаратов треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в рамках проведения клинических исследований.

Результат внедрения: предложение методологические основы и подходы внедрены в научно-практическую деятельность исследовательского центра ООО «ЦФА».

Директор исследовательского центра, д.фарм.н.



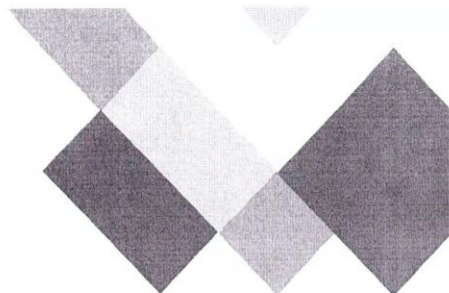
Комаров Т. Н.

Рисунок Б.1 – Акт внедрения в научно-практическую деятельность ООО «Центр фармацевтической аналитики»

Приложение В. Акт внедрения в ООО «Лаборатория Фармацевтических Исследований»

ООО «Лаборатория Фармацевтических Исследований»

ИНН 9731103329, КПП 772801001, ОГРН 1227700742521, ОКПО 94713568
117246, Город Москва, вн.тер. г. Муниципальный Округ Черемушки,
проезд Научный, дом 20, строение 3
+7(495) 481-63-68
www.lphr.ru



Исх. №2026-10_21-04-26_01_Исх от 21.04.2026

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ЛФИ»

 Минин В.С.

«21» апреля 2026 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Токаревой Маргариты Алексеевны

Я, генеральный директор ООО «ЛФИ» Минин Вячеслав Сергеевич, настоящим удостоверяю, что в научно-практическую работу исследовательского центра ООО «ЛФИ» внедрена биоаналитическая методика количественного определения пептида треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат в человеческой плазме крови с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Указанная методика используется в целях изучения фармакокинетических параметров.

Автором данной разработки является соискатель учёной степени кандидата фармацевтических наук Токарева Маргарита Алексеевна. Работа выполнена в рамках подготовки диссертационного исследования на тему: «Разработка, валидация и апробация методики определения инновационного лекарственного средства пептидной структуры в биологических образцах».

Генеральный директор ООО «ЛФИ»

 Минин В.С.



Рисунок В.1 – Акт внедрения в научно-практическую деятельность ООО «Лаборатория Фармацевтических Исследований»

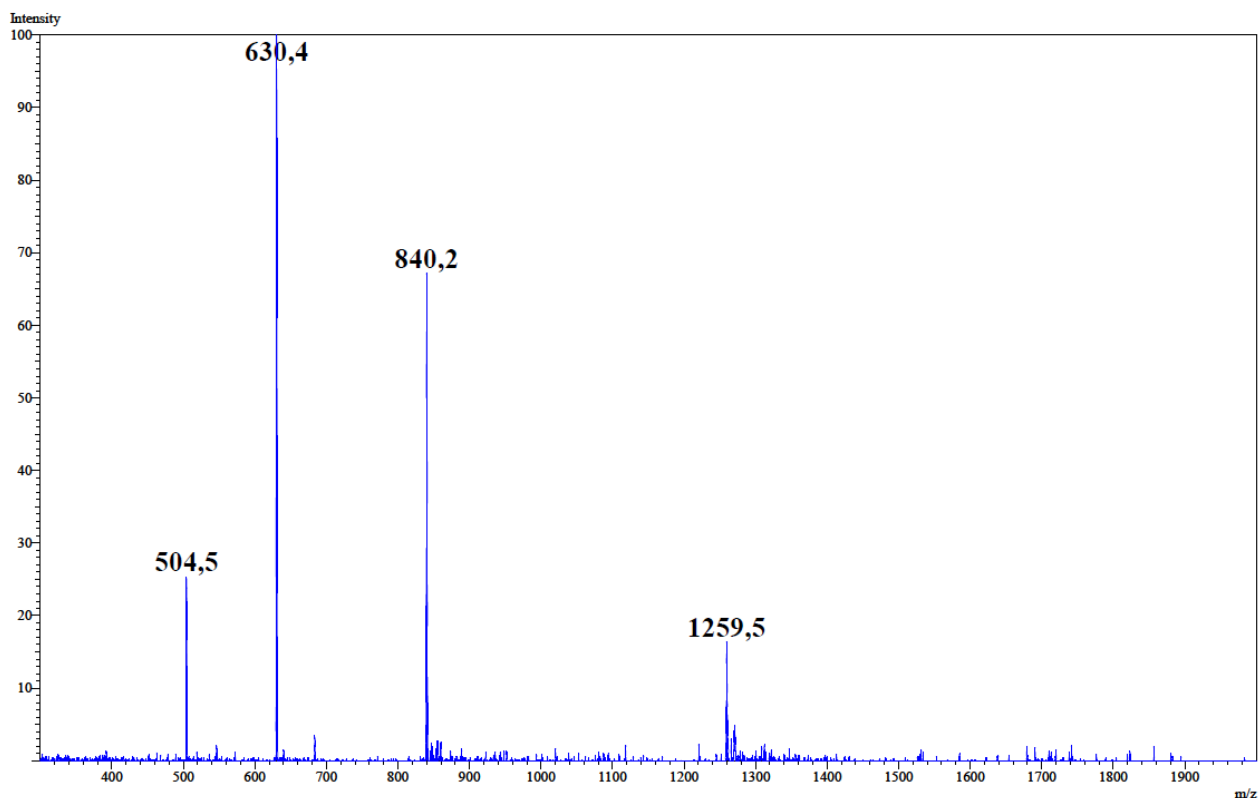
Приложение Г. Масс-спектры дериватизованных производных НЕР-1

Рисунок Г.1 – Масс-спектр тридансированного производного НЕР-1

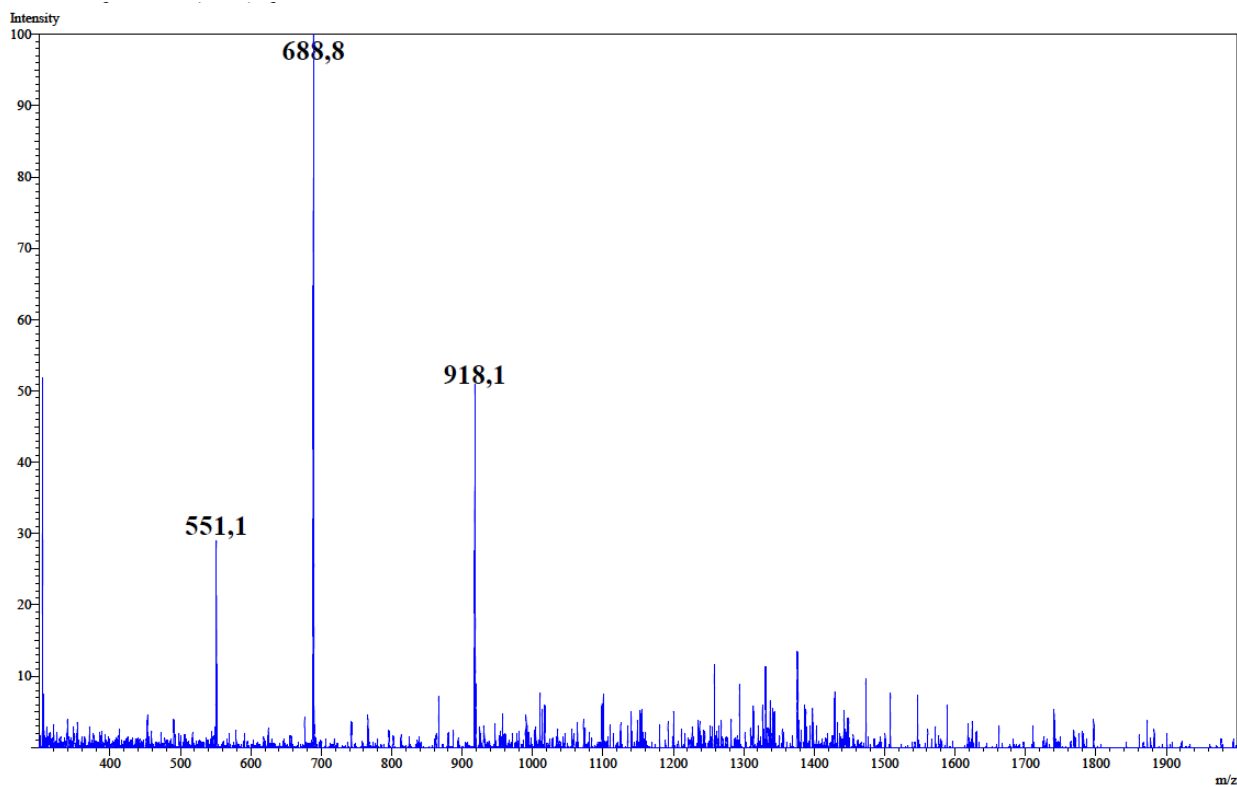


Рисунок Г.2 – Масс-спектр тетрадансированного производного НЕР-1

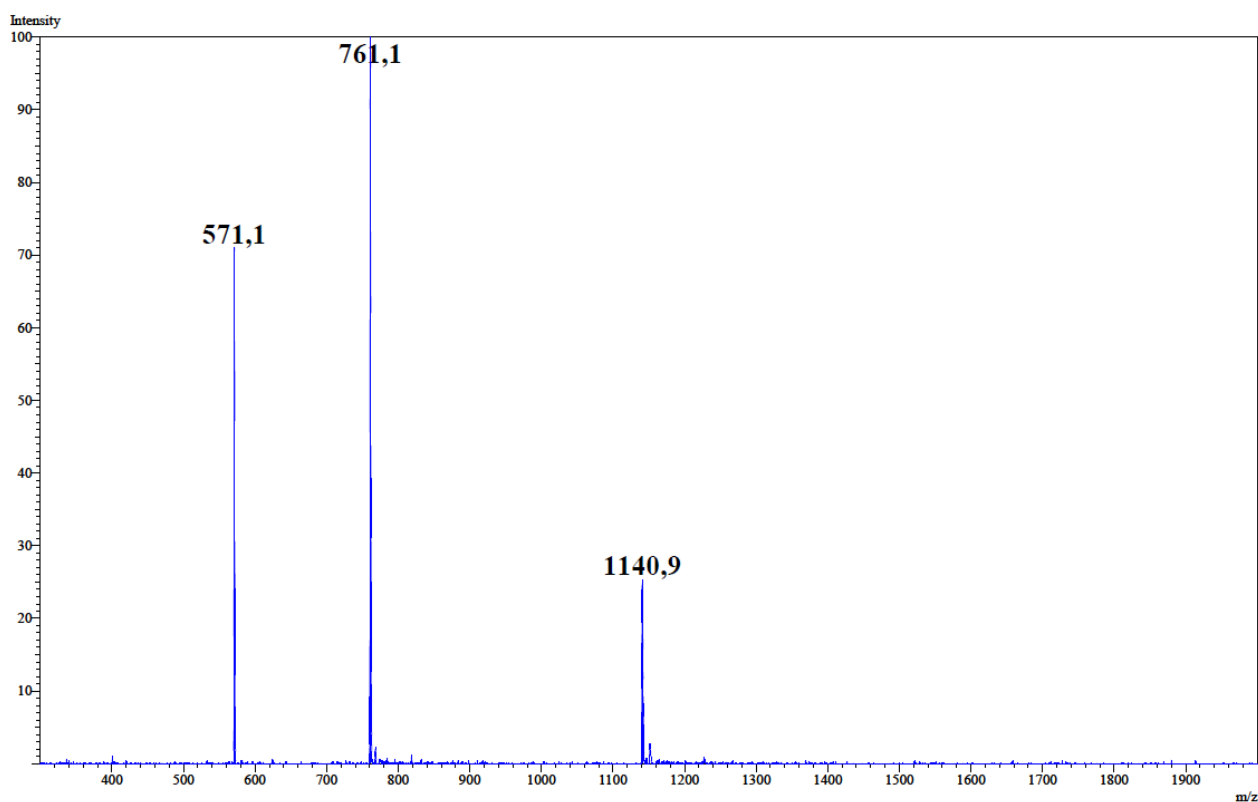


Рисунок Г.3 – Масс-спектр тритозилированного производного НЕР-1

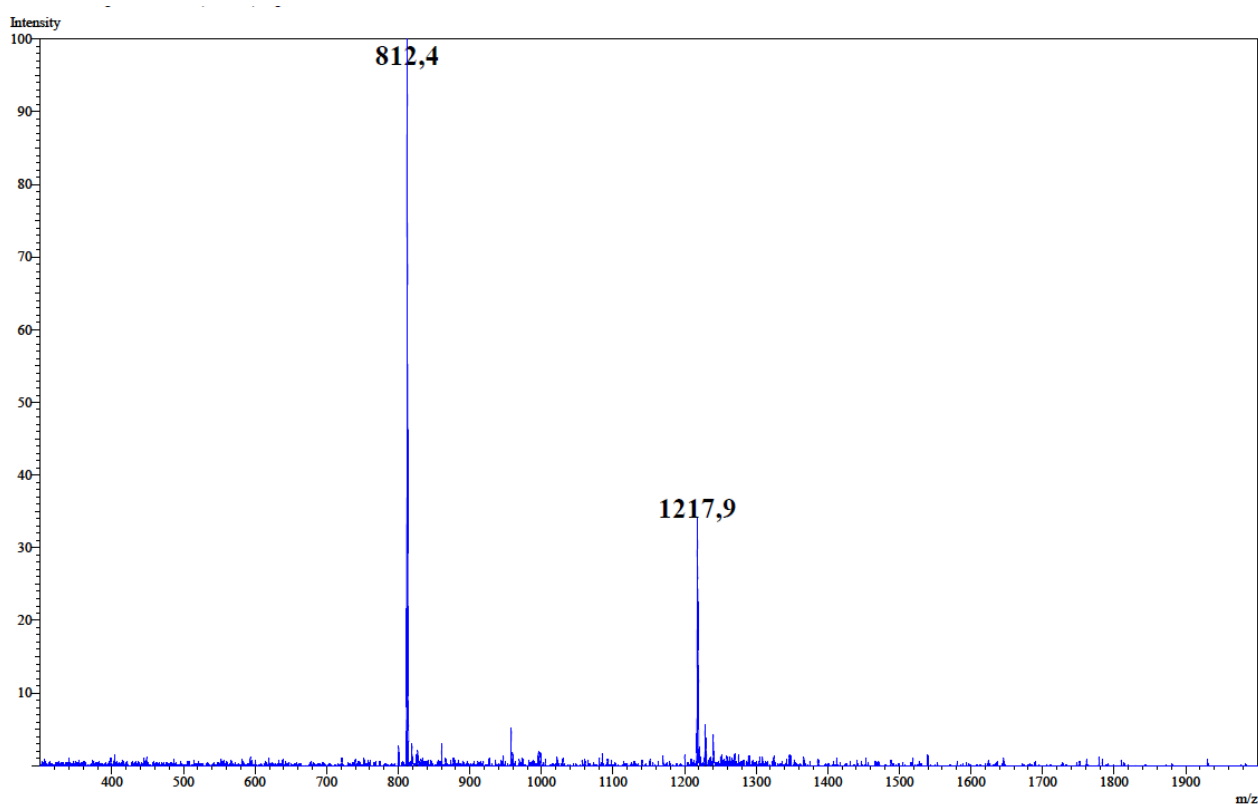


Рисунок Г.4 – Масс-спектр тетратозилированного производного НЕР-1

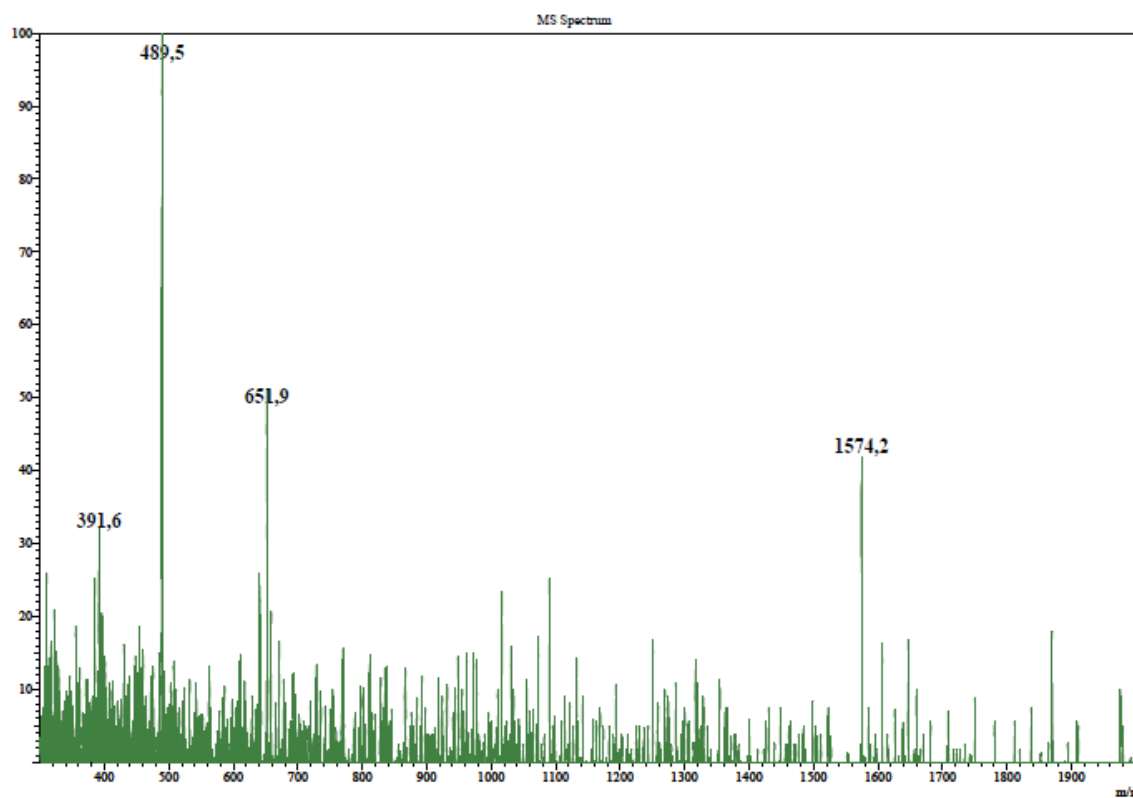


Рисунок Г.5 – Масс-спектр моно-ФИТЦ производного НЕР-1

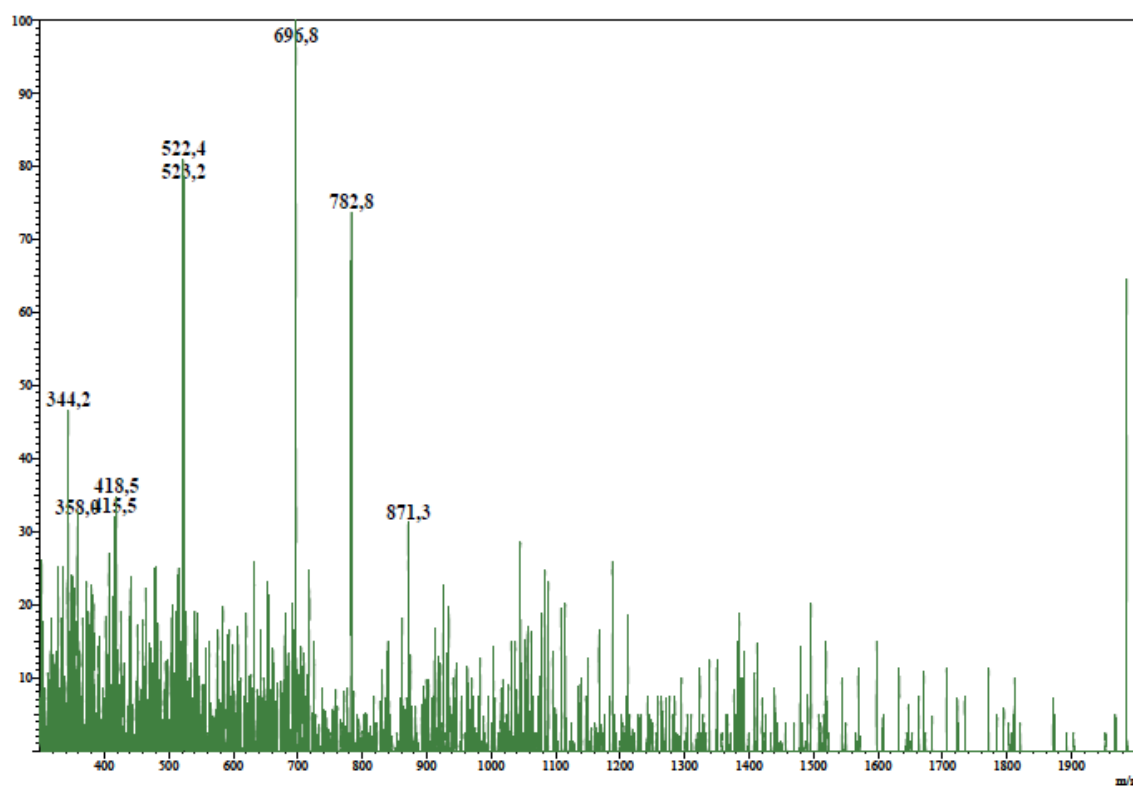


Рисунок Г.6 – Масс-спектр ди-ФИТЦ производного НЕР-1

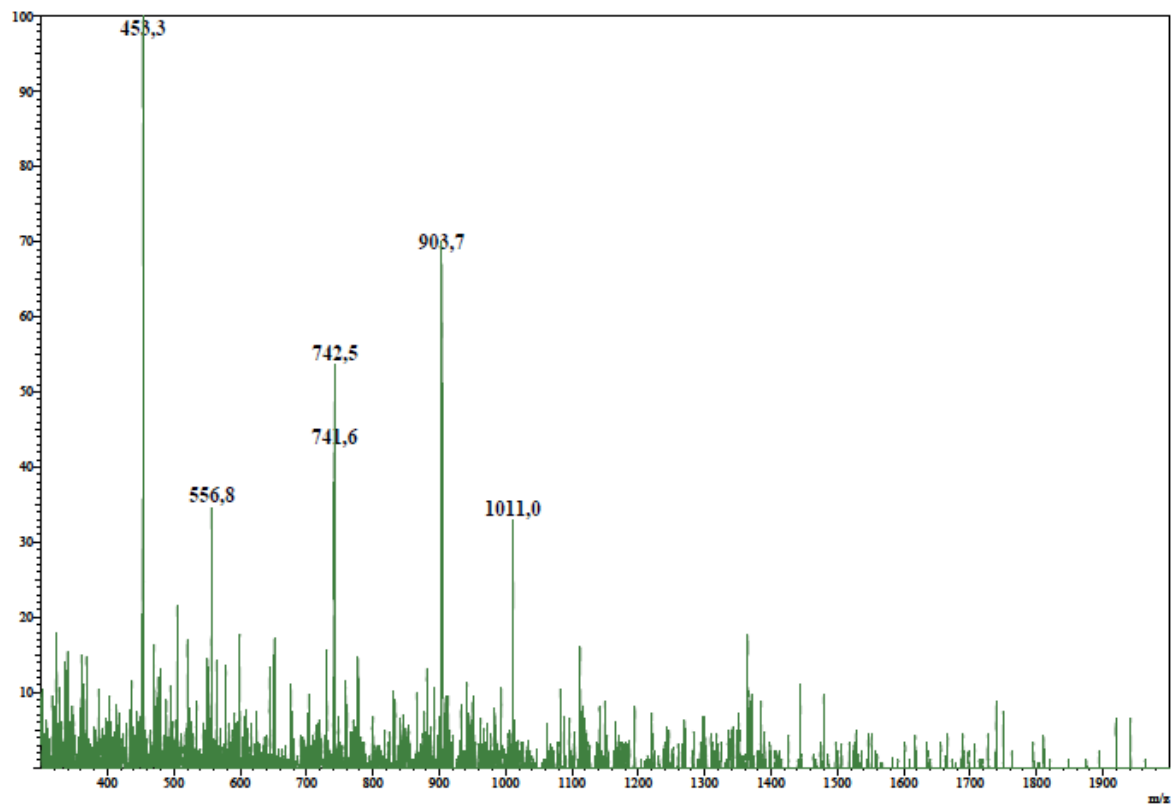


Рисунок Г.7 – Масс-спектр три-ФИТЦ производного НЕР-1

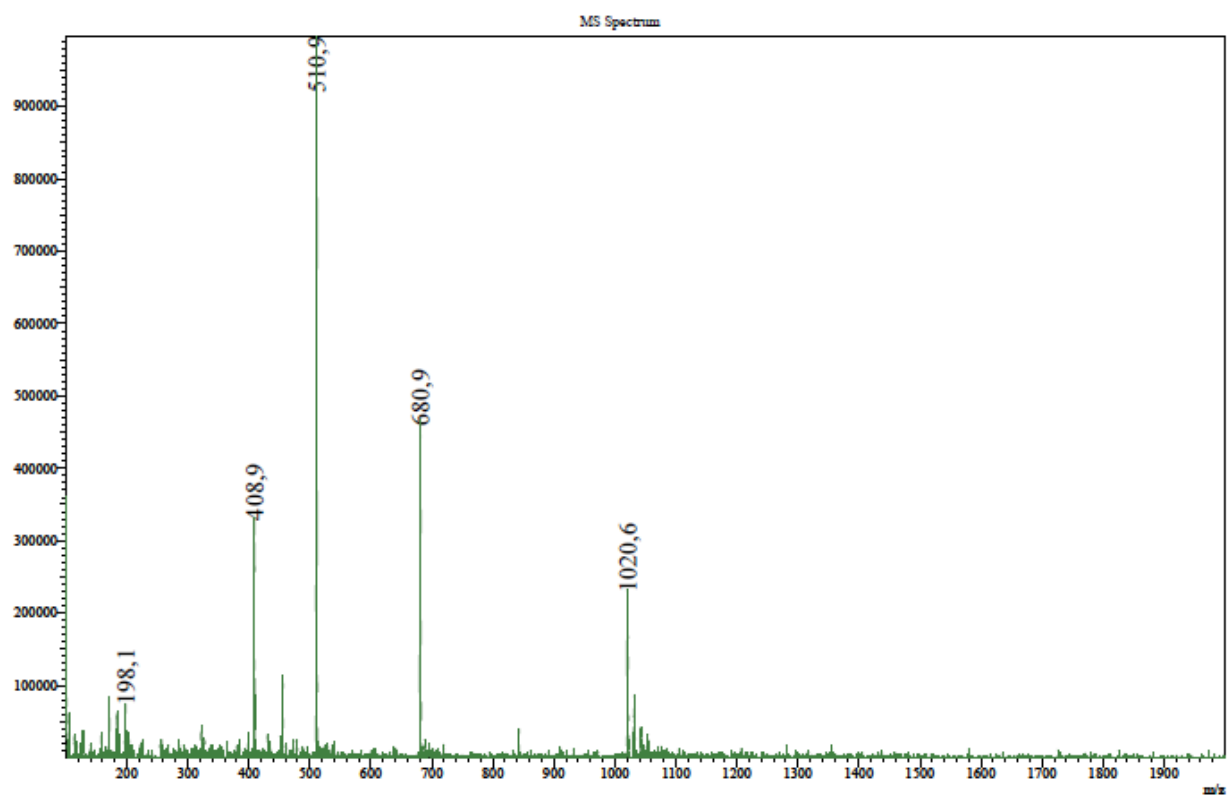


Рисунок Г.8 – Масс-спектр моно-Гмос производного НЕР-1

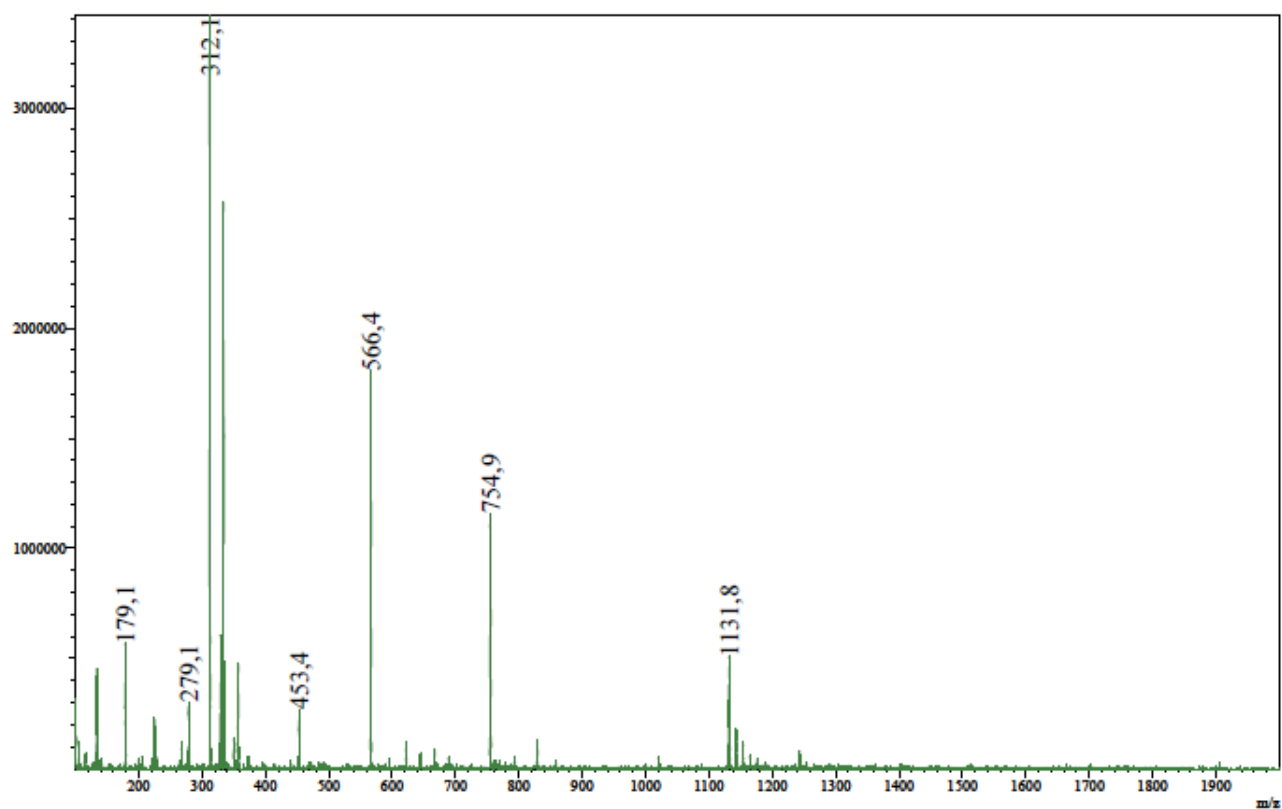


Рисунок Г.9 – Масс-спектр ди-Фмос производного НЕР-1

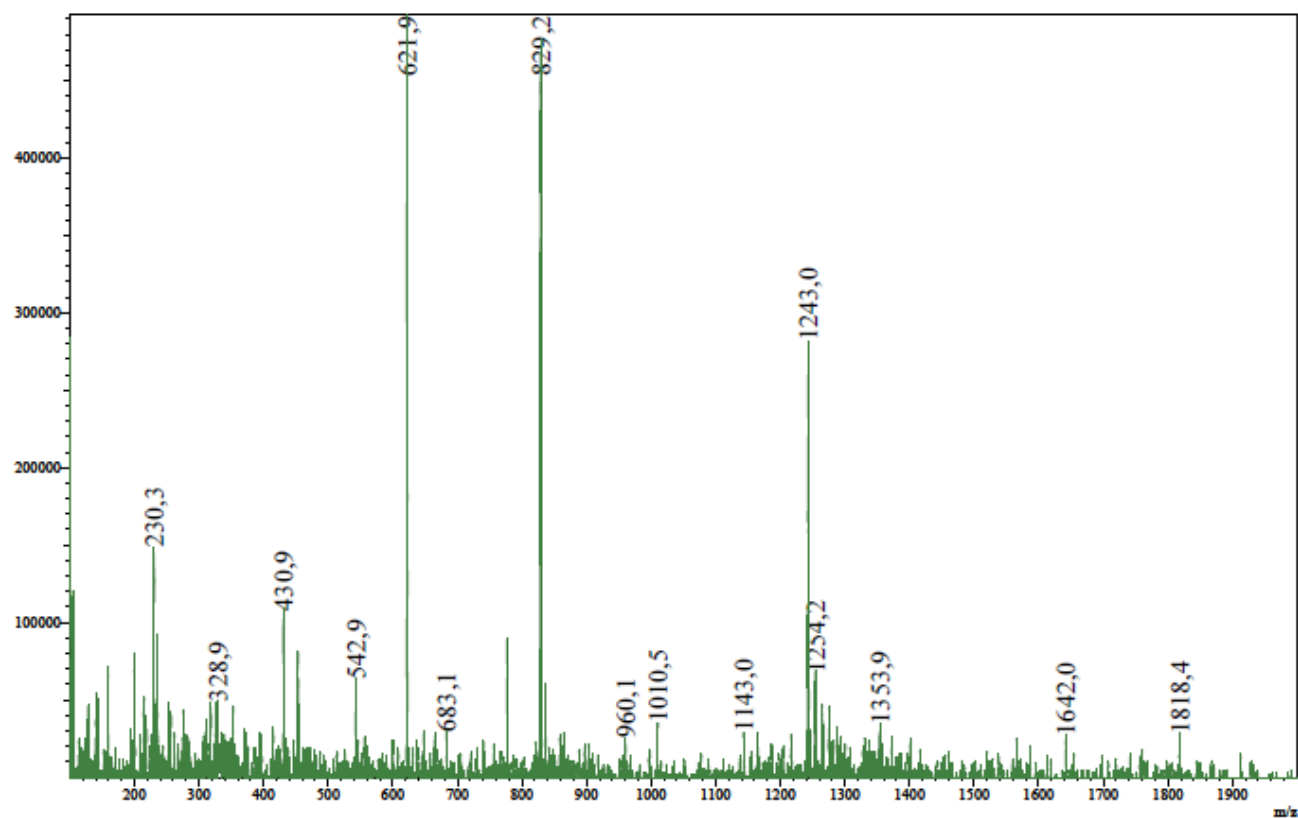


Рисунок Г.10 – Масс-спектр три-Фмос производное НЕР-1

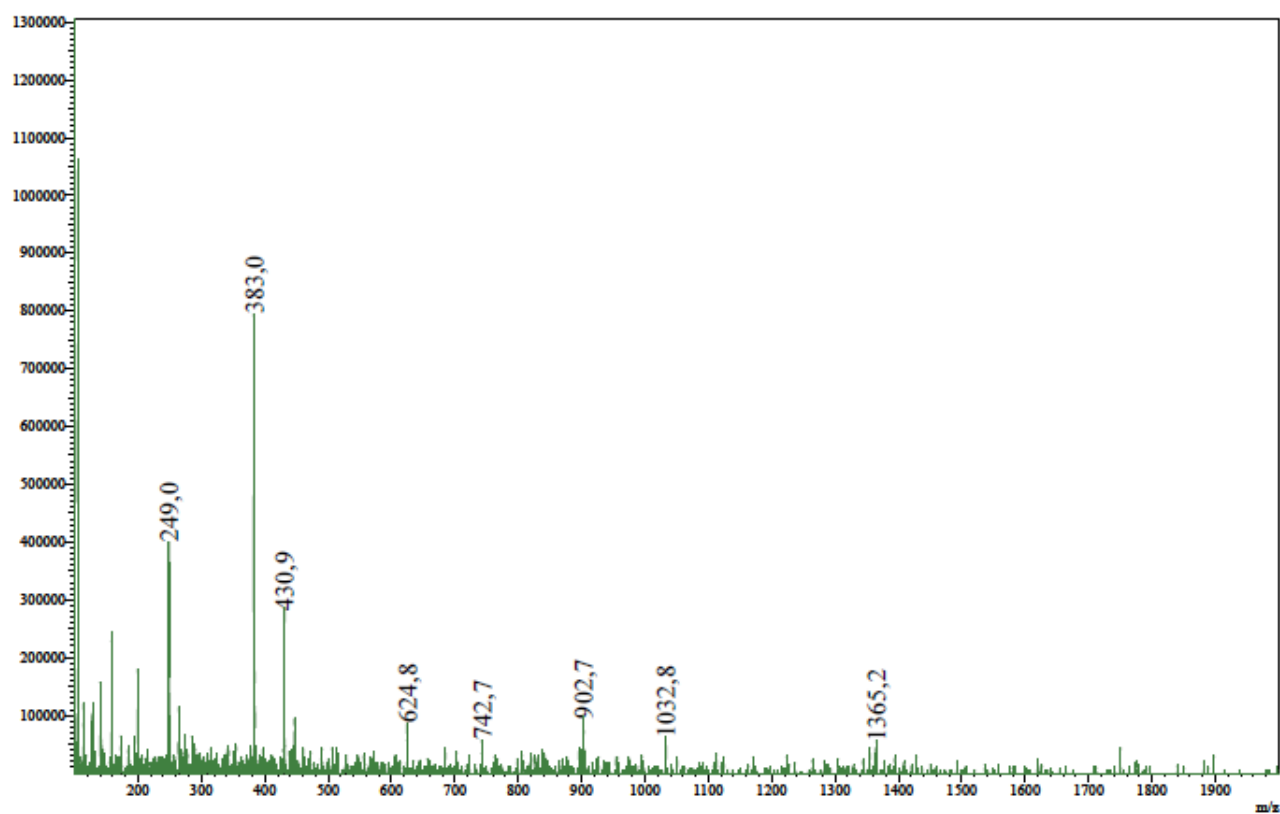


Рисунок Г.11 – Масс-спектр тетра-Гмос производное НЕР-1

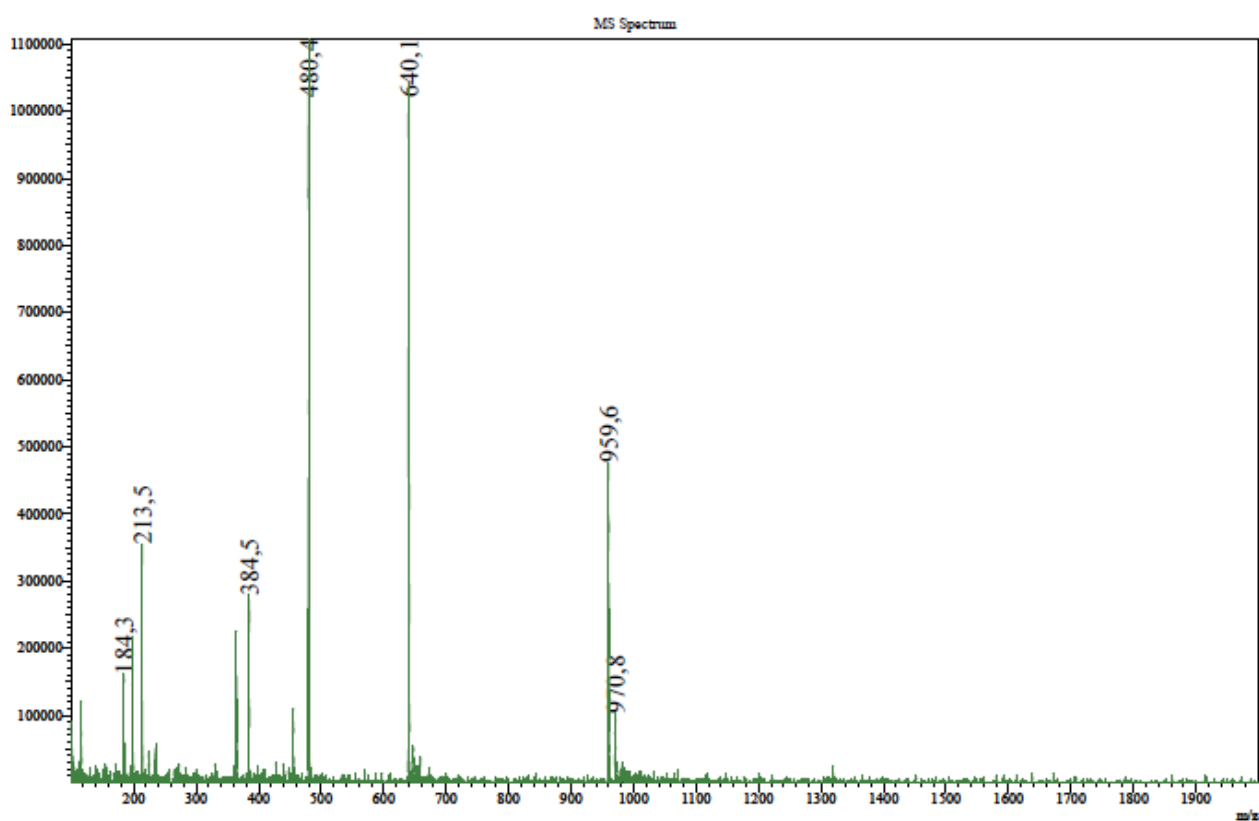


Рисунок Г.12 – Масс-спектр моно-Вос производное НЕР-1

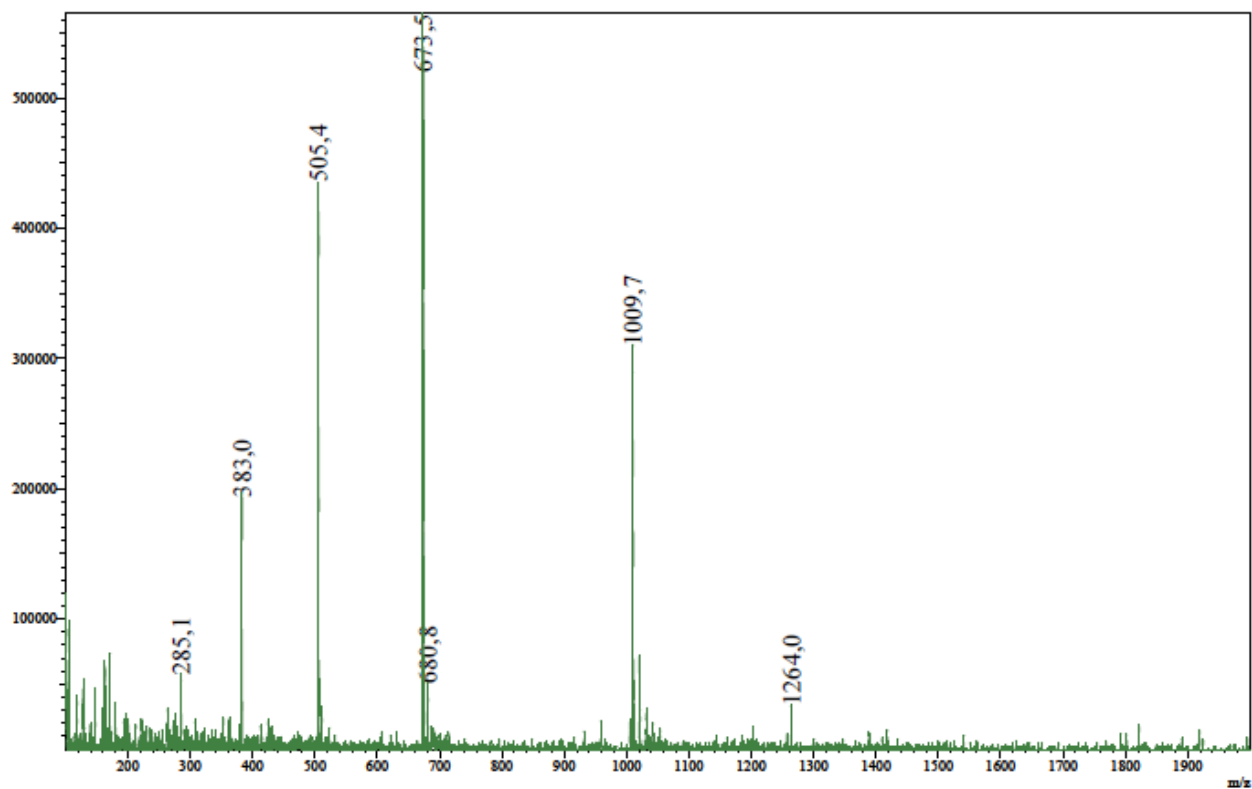


Рисунок Г.13 – Масс-спектр ди-Вос производное НЕР-1

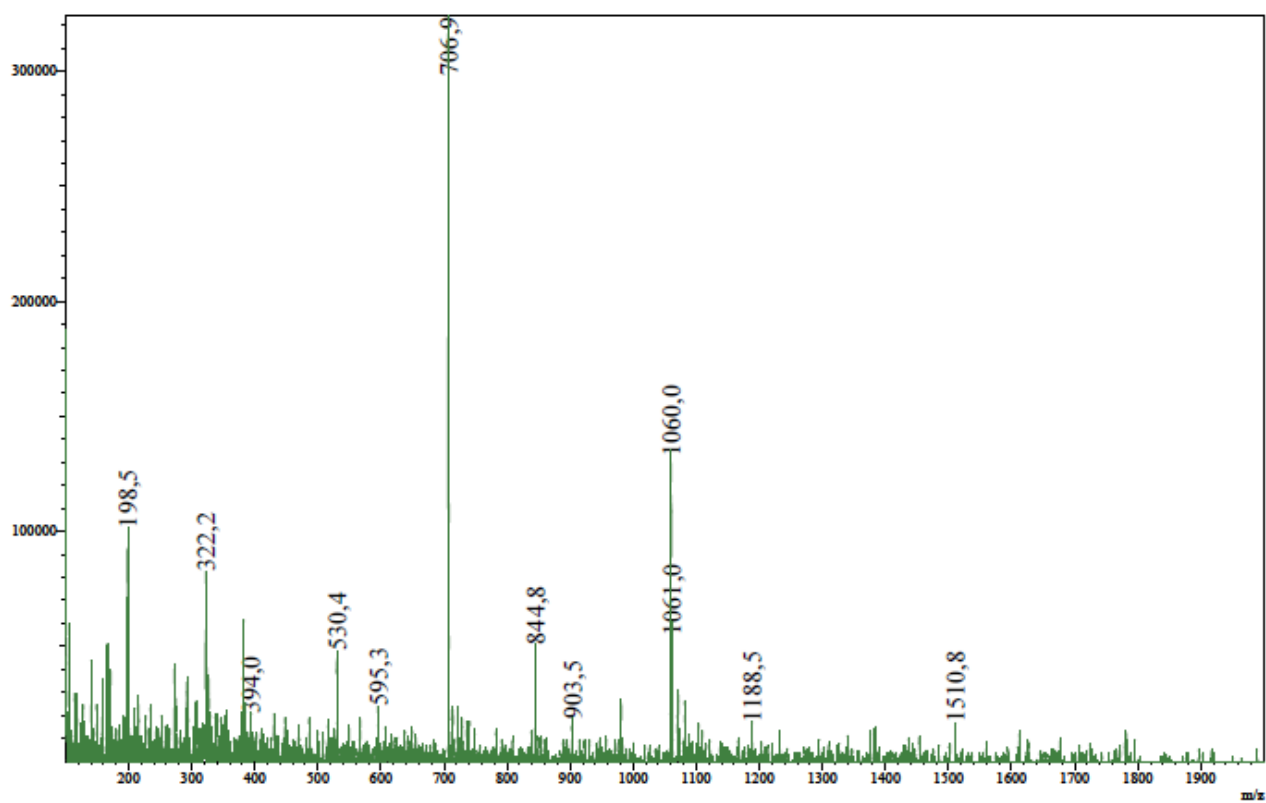


Рисунок Г.14 – Масс-спектр три-Вос производное НЕР-1

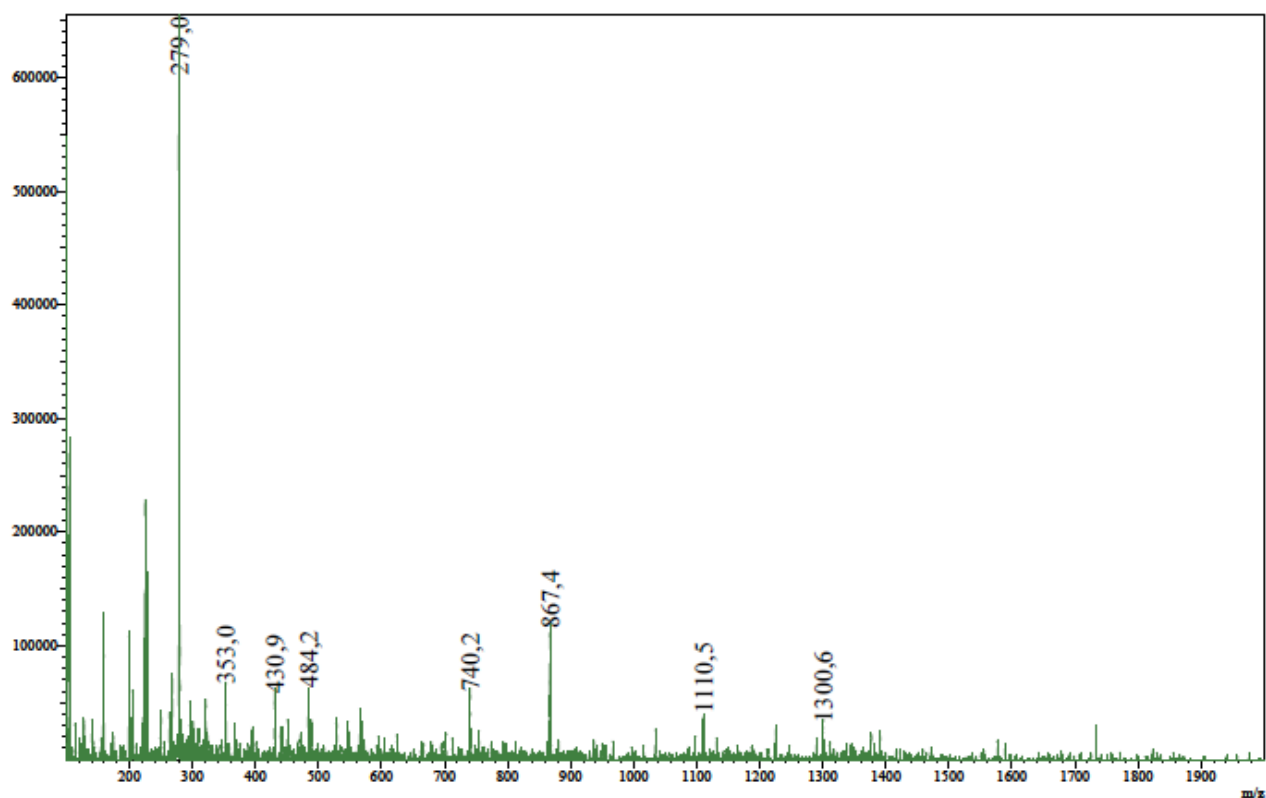


Рисунок Г.15 – Масс-спектр тетра-Вос производное НЕР-1

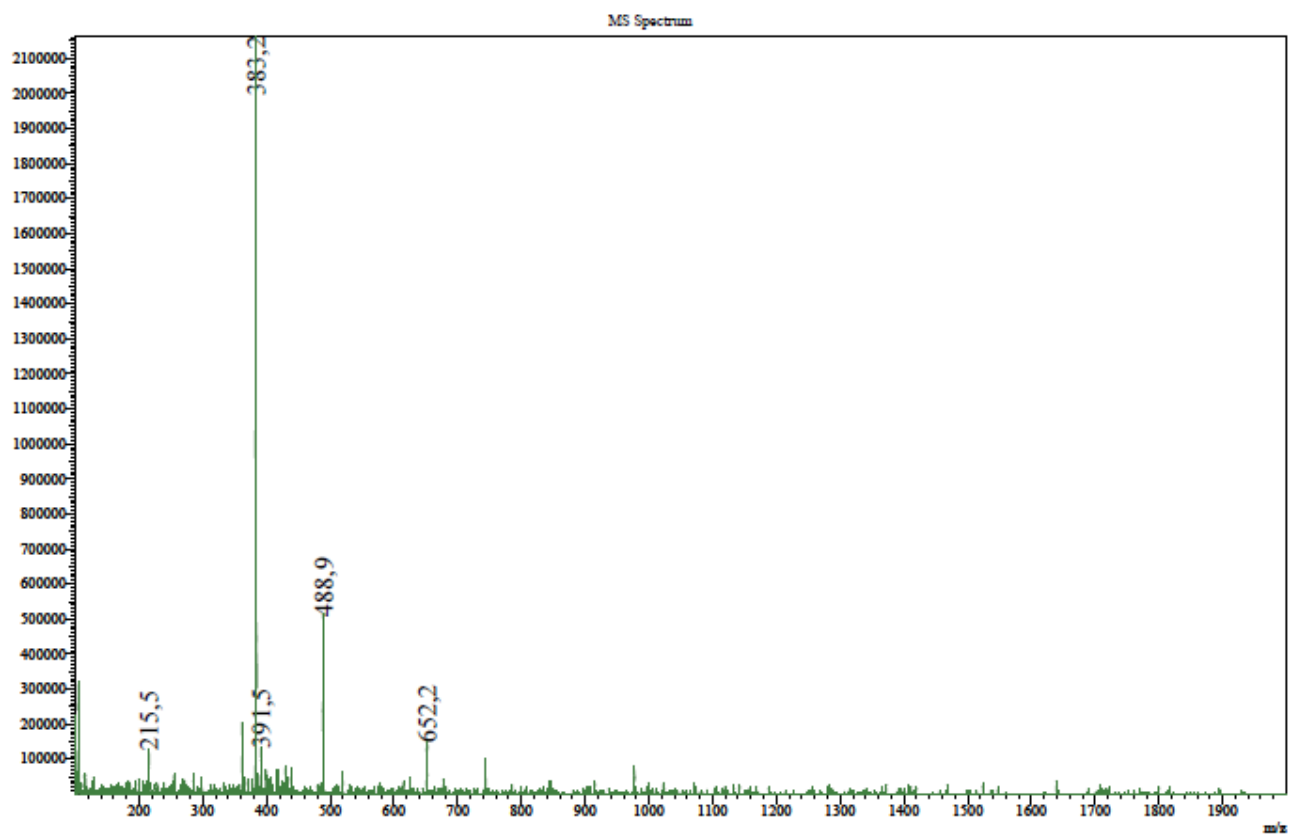


Рисунок Г.16 – Масс-спектр моно-Cbz производное НЕР-1

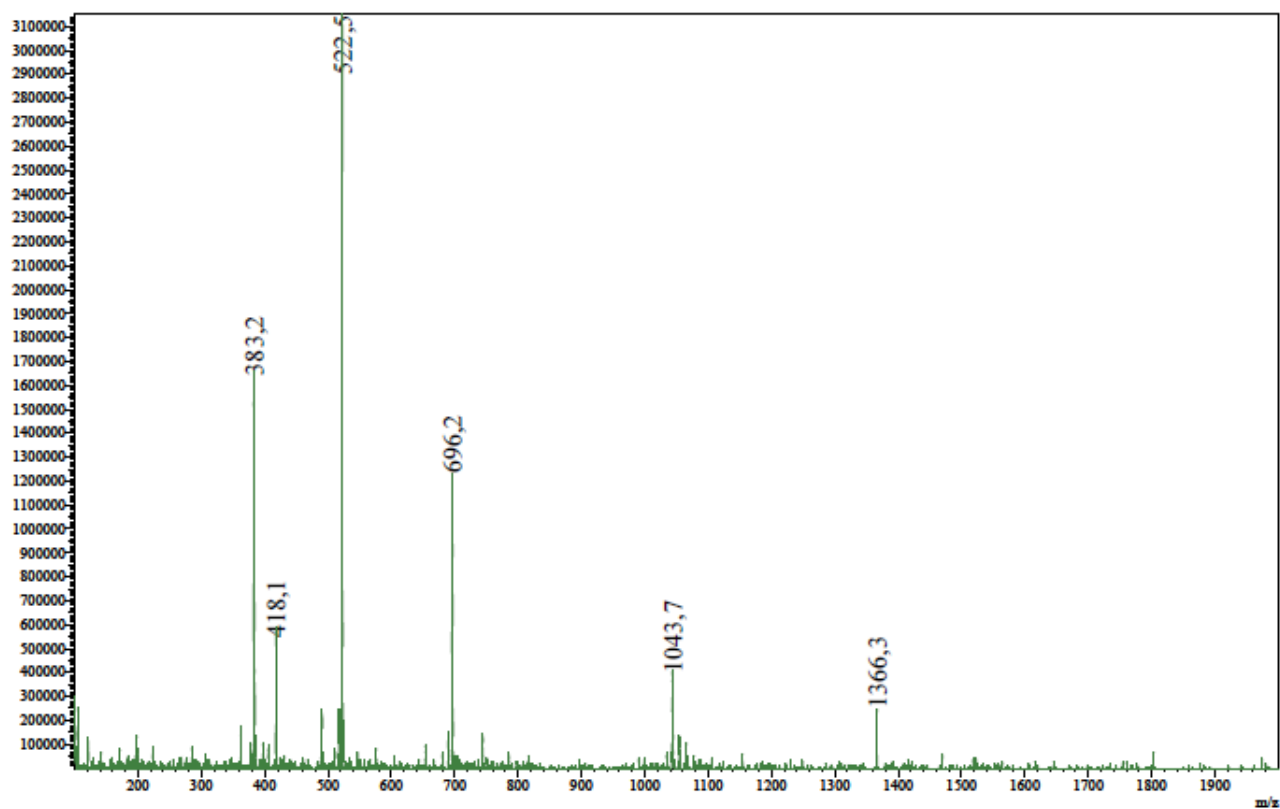


Рисунок Г.17 – Масс-спектр ди-Cbz производное НЕР-1

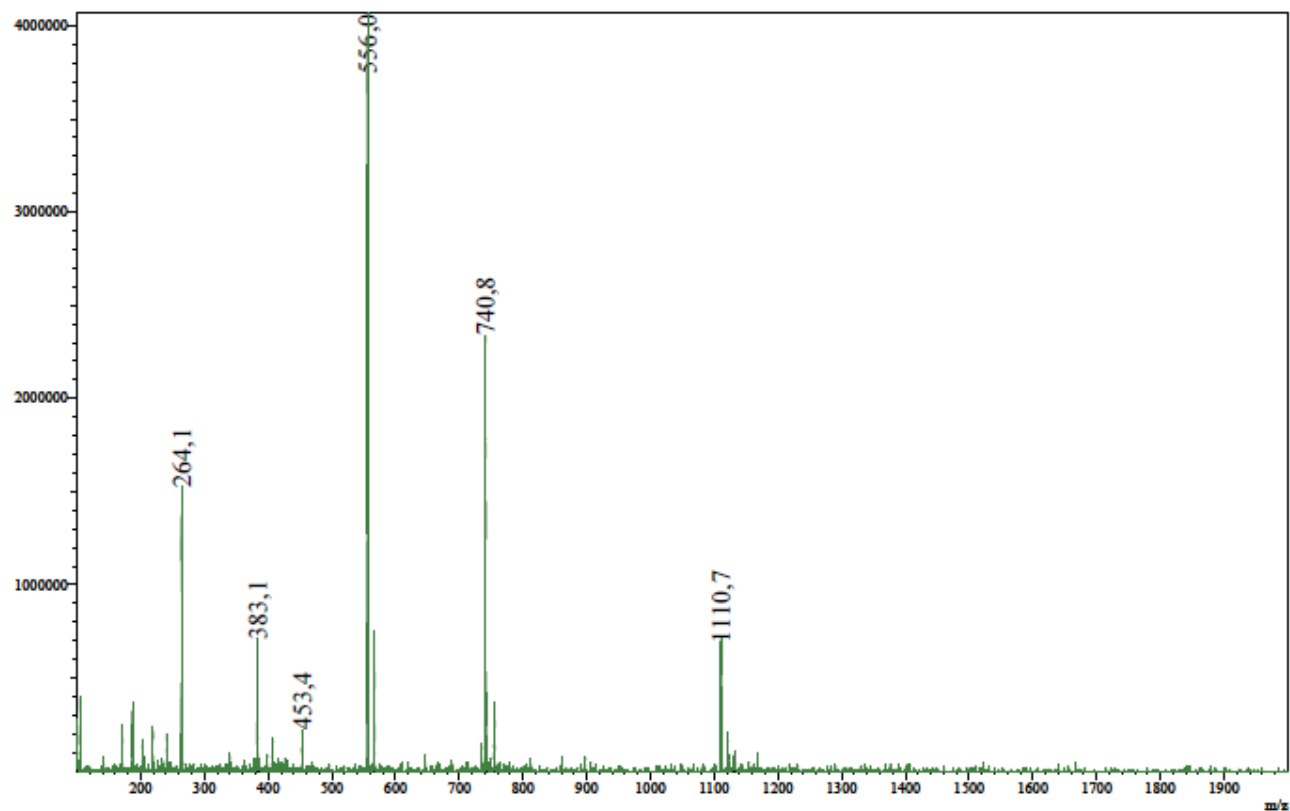


Рисунок Г.18 – Масс-спектр три-Cbz производное НЕР-1

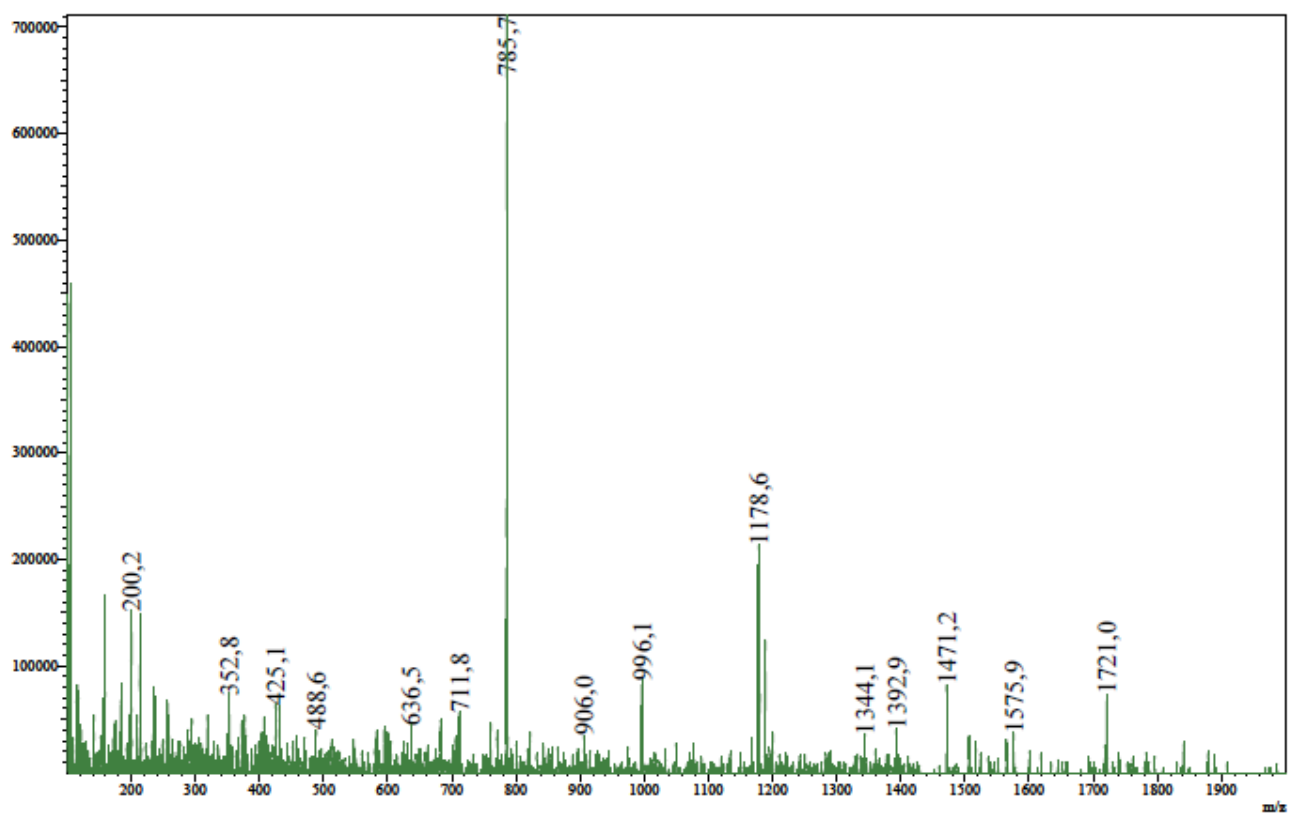


Рисунок Г.19 – Масс-спектр тетра-Cbz производное НЕР-1

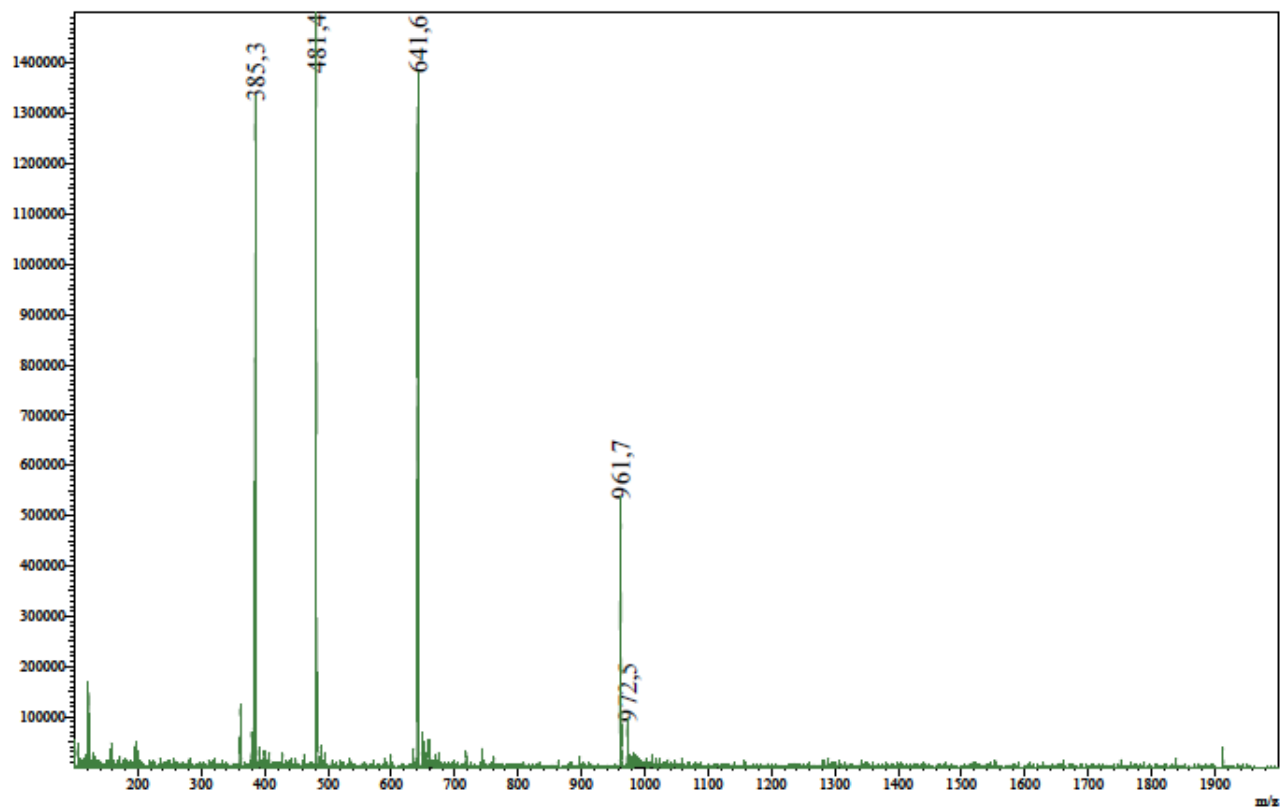


Рисунок Г.20 – Масс-спектр моно-Benz производное НЕР-1

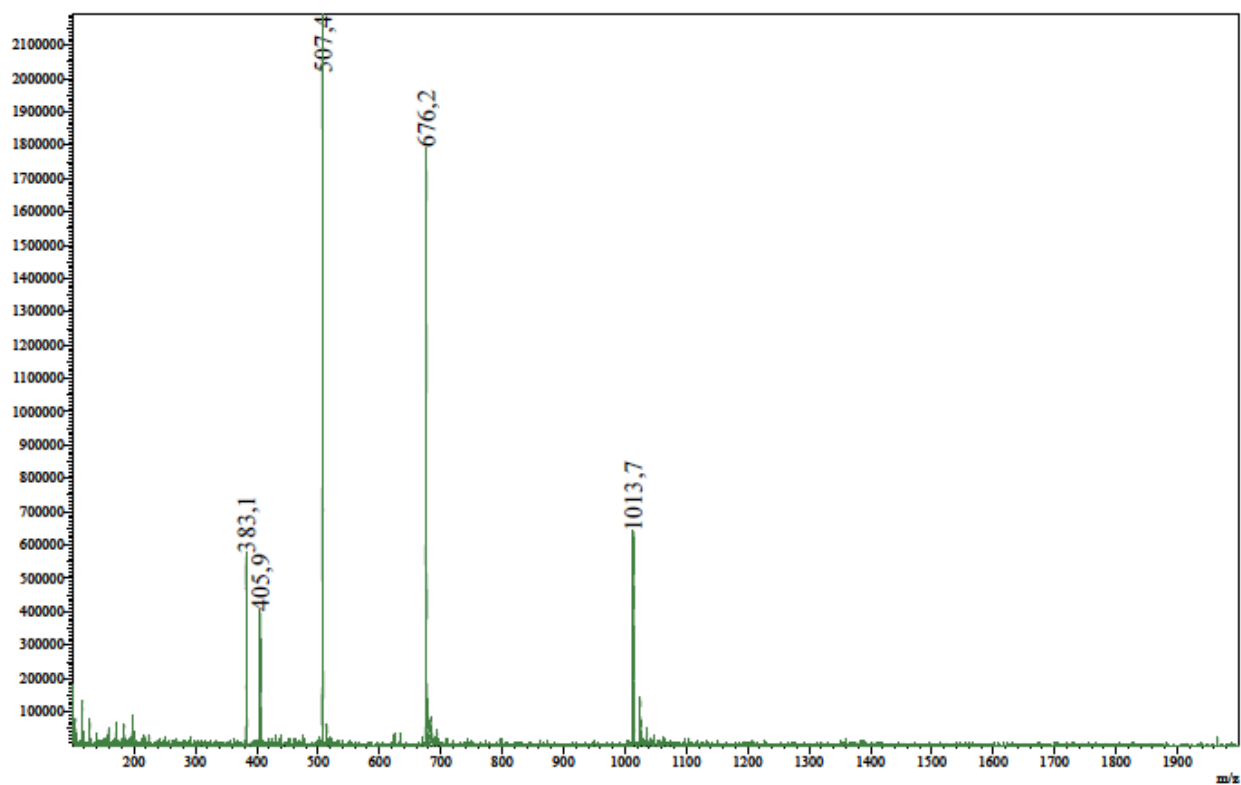


Рисунок Г.21 – Масс-спектр ди-Benz производное НЕР-1

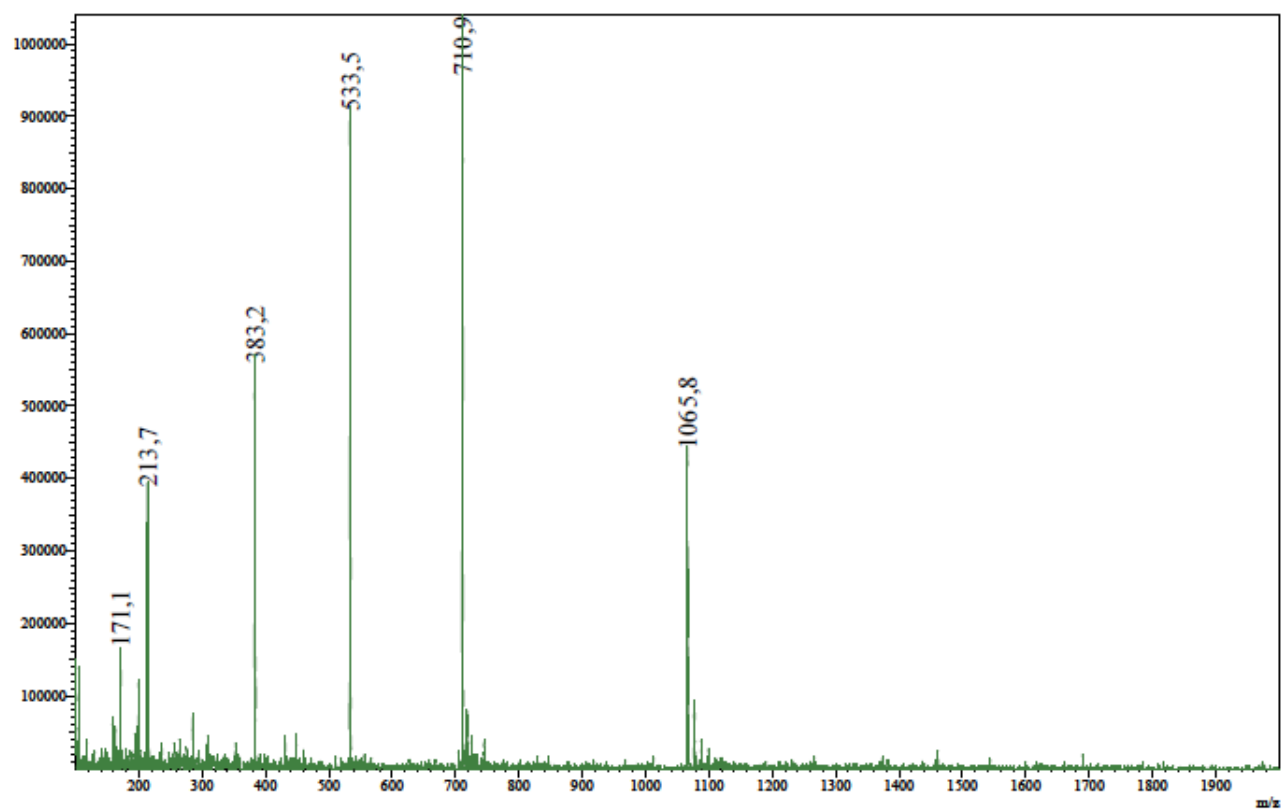


Рисунок Г.22 – Масс-спектр три-Benz производное НЕР-1

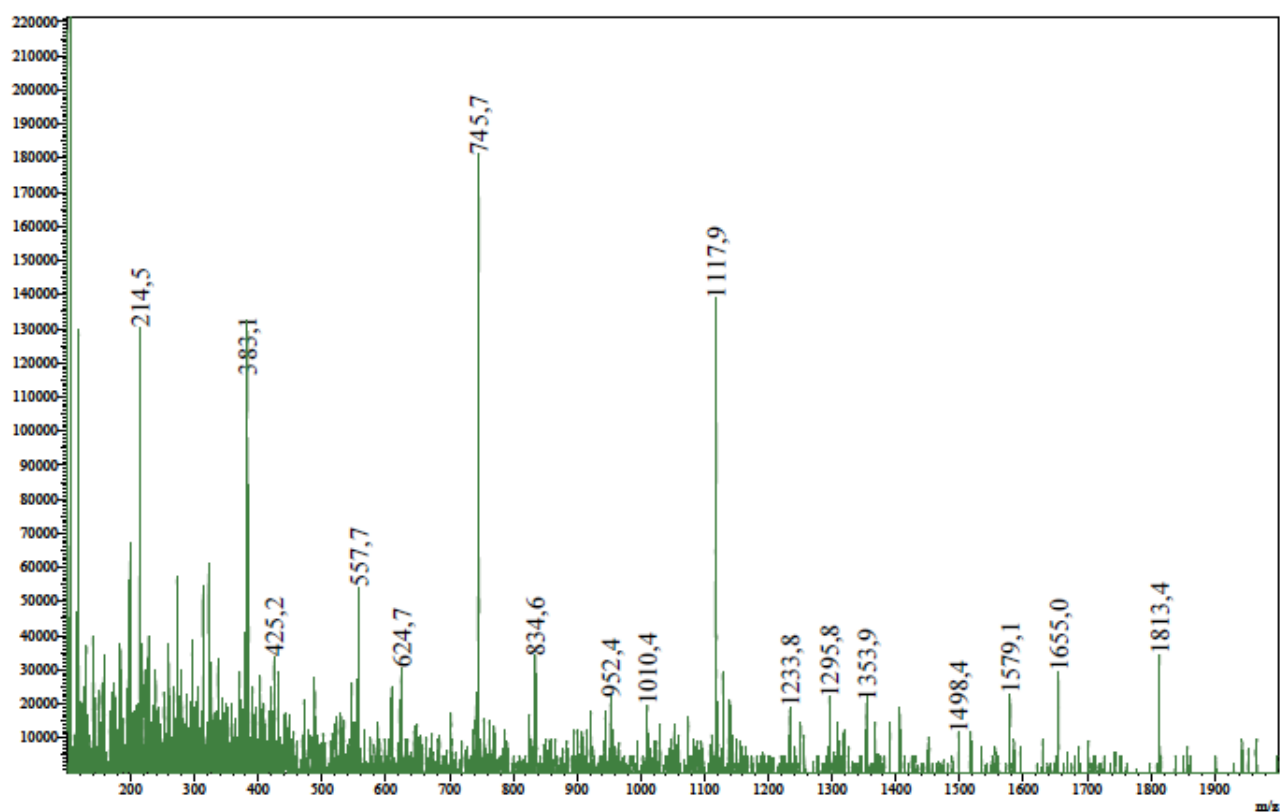


Рисунок Г.23 – Масс-спектр тетра-Benz производное НЕР-1

**Приложение Д. Расчет m/z заряженных дериватизованных производных
НЕР-1**

Таблица Д.1 – Расчет m/z заряженных дансилированных производных НЕР- 1

Дансилированное производное, m/z						
Заряд молекулы	1	2	3	4	5	6
Количество дериватизованных групп						
1	2051,0	1026,0	684,3	513,5	411,0	342,7
2	2284,1	1142,5	762,0	571,8	457,6	381,5
3	2517,1	1259,1	839,7	630,0	504,2	420,4
4	2750,2	1375,6	917,4	688,3	550,8	459,2
5	2983,2	1492,1	995,1	746,6	597,5	498,0
6	3216,3	1608,6	1072,8	804,8	644,1	536,9
7	3449,3	1725,2	1150,4	863,1	690,7	575,7

Таблица Д.2 – Расчет m/z заряженных тозилированных производных НЕР- 1

Тозилированное производное, m/z						
Заряд молекулы	1	2	3	4	5	6
Количество дериватизованных групп						
1	1972,0	986,5	658,0	493,8	395,2	329,5
2	2126,0	1063,5	709,3	532,3	426,0	355,2
3	2280,0	1140,5	760,7	570,8	456,8	380,8
4	2434,0	1217,5	812,0	609,3	487,6	406,5
5	2588,0	1294,5	863,3	647,8	518,4	432,2
6	2742,0	1371,5	914,7	686,3	549,2	457,8
7	2896,0	1448,5	966,0	724,8	580,0	483,5

Таблица Д.3 – Расчет m/z заряженных ФИТЦ производных НЕР- 1

ФИТЦ производное, m/z						
Заряд молекулы	1	2	3	4	5	6
Количество дериватизованных групп						
1	1952,0	976,5	651,3	488,8	391,2	326,2
2	2086,0	1043,5	696,0	522,3	418,0	348,5
3	2220,0	1110,5	740,7	555,8	444,8	370,8
4	2354,0	1177,5	785,3	589,3	471,6	393,2
5	2488,0	1244,5	830,0	622,8	498,4	415,5
6	2622,0	1311,5	874,7	656,3	525,2	437,8
7	2756,0	1378,5	919,3	689,8	552,0	460,2

Таблица Д.4 – Расчет m/z заряженных Fmoc производных НЕР- 1

Fmoc производное, m/z						
Заряд молекулы	1	2	3	4	5	6
Количество дериватизованных групп						
1	2040,0	1020,5	680,7	510,8	408,8	340,8
2	2262,1	1131,6	754,7	566,3	453,2	377,9
3	2484,2	1242,6	828,7	621,8	497,6	414,9
4	2706,2	1353,6	902,8	677,3	542,1	451,9
5	2928,3	1464,7	976,8	732,8	586,5	488,9
6	3150,4	1575,7	1050,8	788,4	630,9	525,9
7	3372,4	1686,7	1124,8	843,9	675,3	562,9

Таблица Д.5 – Расчет m/z заряженных Boc производных НЕР- 1

Boc производное, m/z						
Заряд молекулы	1	2	3	4	5	6
Количество дериватизованных групп						
1	1918,0	959,5	640,0	480,3	384,4	320,5
2	2018,1	1009,5	673,4	505,3	404,4	337,2
3	2118,1	1059,6	706,7	530,3	424,4	353,9
4	2218,2	1109,6	740,1	555,3	444,4	370,5
5	2318,2	1159,6	773,4	580,3	464,5	387,2
6	2418,3	1209,6	806,8	605,3	484,5	403,9
7	2518,3	1259,7	840,1	630,3	504,5	420,6

Таблица Д.6 – Расчет m/z заряженных Cbz производных НЕР- 1

Cbz производное, m/z						
Заряд молекулы	1	2	3	4	5	6
Количество дериватизованных групп						
1	1952,0	976,5	651,3	488,8	391,2	326,2
2	2086,0	1043,5	696,0	522,3	418,0	348,5
3	2220,1	1110,5	740,7	555,8	444,8	370,9
4	2354,1	1177,6	785,4	589,3	471,6	393,2
5	2488,2	1244,6	830,1	622,8	498,4	415,5
6	2622,2	1311,6	874,7	656,3	525,2	437,9
7	2756,2	1378,6	919,4	689,8	552,1	460,2

Таблица Д.7 – Расчет m/z заряженных Benz производных НЕР- 1

Benz производное, m/z						
Заряд молекулы	1	2	3	4	5	6
Количество дериватизованных групп						
1	1922,0	961,5	641,3	481,3	385,2	321,2
2	2026,0	1013,5	676,0	507,3	406,0	338,5
3	2130,1	1065,5	710,7	533,3	426,8	355,8
4	2234,1	1117,5	745,4	559,3	447,6	373,2
5	2338,1	1169,6	780,0	585,3	468,4	390,5
6	2442,1	1221,6	814,7	611,3	489,2	407,9
7	2546,2	1273,6	849,4	637,3	510,0	425,2

Таблица Е.2 – Полученные концентрации при внутримышечном введении пациентам в дозе 4 мг два раза в день на протяжении 10 дней

Рандом. № добров.	Время, ч						
	0,00	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00	12,00
26- день 1	0,00	21,64	11,41	5,29	0,00	0,00	0,00
26- день 10	0,00	22,71	13,68	0,00	0,00	0,00	0,00
33- день 1	0,00	16,31	7,67	0,00	0,00	0,00	0,00
33- день 10	0,00	15,19	7,02	0,00	0,00	0,00	0,00
34- день 1	0,00	10,19	5,23	0,00	0,00	0,00	0,00
34- день 10	0,00	20,41	5,41	0,00	0,00	0,00	0,00
36- день 1	0,00	17,74	5,87	0,00	0,00	0,00	0,00
36- день 10	0,00	19,47	9,64	5,39	0,00	0,00	0,00
37- день 1	0,00	12,83	5,74	0,00	0,00	0,00	0,00
37- день 10	0,00	19,56	11,85	5,18	0,00	0,00	0,00
Mean	0,00	17,61	8,35	1,59	0,00	0,00	0,00
Gmean	---	17,15	7,87	---	---	---	---
Median	0,00	18,61	7,35	0,00	0,00	0,00	0,00
SD	0,00	3,98	3,08	2,55	0,00	0,00	0,00
CV, %	---	23%	37%	161%	---	---	---
Max	0,00	22,71	13,68	5,39	0,00	0,00	0,00
Min	0,00	10,19	5,23	0,00	0,00	0,00	0,00