

ФИШЕР
Елизавета Николаевна

**ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Раменская Галина Владиславовна

Официальные оппоненты:

Ивановская Елена Алексеевна – доктор фармацевтических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра фармацевтической химии фармацевтического факультета, заведующий кафедрой

Сергеева Мария Сергеевна – кандидат фармацевтических наук, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», старший научный сотрудник химико-технологической лаборатории Опытно-технологического отдела

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ЯГМУ» Минздрава России)

Защита состоится «__» _____ 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1, и на сайте организации: <http://sechenov.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета Д **208.040.09**

доктор фармацевтических наук,
профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) онкологические заболевания занимают второе место в мире по смертности после сердечно-сосудистых и в последующие несколько десятков лет число случаев заболевания продолжит увеличиваться.

Разработка лекарственных средств (ЛС), на основе модифицированных эндогенных пептидов, — одно из наиболее актуальных направлений современной медицины. Среди них наибольший интерес представляют противоопухолевые пептидные ЛС, которые по эффективности не уступают ни химиотерапии с ее ярко выраженными побочными эффектами, ни хирургическим вмешательствам, которые зачастую тяжело переносятся пациентами. В последнее время на фармацевтический рынок выводится все больше препаратов, являющихся производными олигопептидов. Этому, в первую очередь, способствует их избирательный механизм действия, позволяющий рассматривать пептиды как молекулы с низкой токсичностью. Кроме того, они обладают рядом преимуществ: меньшей иммуногенностью, производственными затратами по сравнению с полноразмерными белками, большей специфичностью, эффективностью и меньшей токсичностью по сравнению с небольшими органическими молекулами. При введении в пептидную структуру стабилизирующих функциональных групп, а также за счёт использования специальных систем доставки, ЛС, производные олигопептидов, могут применяться в качестве инновационных противоопухолевых средств для моно- и/или политерапии различных типов рака. Но, несмотря на большой потенциал таких ЛС, необходима оценка возможного влияния нативных пептидов и их синтетических аналогов на процессы канцерогенеза в организме. Поэтому проводится целый ряд различных доклинических и клинических исследований, в рамках которых изучают основные фармакокинетические параметры препаратов и исследуют влияние пептидов на процессы роста и развития опухолей.

Для определения концентрации таких лекарственных веществ, как олигопептиды в биологической матрице требуется использование высокочувствительных и селективных методов анализа. Однако, в настоящее время среди отечественных публикаций отсутствуют методики количественного определения таких пептидных препаратов, как гозерелин, бусерелин, трипторелин и октреотид. Среди зарубежных публикаций имеются работы по количественному определению в плазме крови человека только октреотида, для остальных пептидов — в биологических жидкостях различных видов животных. Не существует оптимального подхода к пробоподготовке биологической матрицы и условиям хроматографического разделения, несмотря на схожесть в химической структуре и физико-химических свойствах исследуемых веществ. Таким образом, разработка методики

количественного определения олигопептидов в биологической жидкости человека для проведения фармакокинетических исследований является актуальным направлением на сегодняшний день.

Степень разработки темы исследования

Объектами исследования являются противоопухолевые лекарственные средства гозерелин, бусерелин, трипторелин и октреотид, являющиеся олигопептидами. В литературе представлены работы по количественному определению в плазме крови различных животных таких пептидных лекарственных средств, как гозерелин, бусерелин и трипторелин. Однако, разработанные методики значительно отличаются друг от друга по условиям хроматографического разделения. Отсутствуют публикации, посвященные количественному определению гозерелина, бусерелина и трипторелина в плазме крови человека.

Цель исследования

Разработать и валидировать универсальную методику количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови человека и животных методом высокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) с целью изучения их фармакокинетики.

Задачи исследования

1. Изучить методики количественного определения олигопептидов в плазме крови человека и животных. Изучить подходы к проведению фармакокинетических исследований инновационных пептидных лекарственных средств с учетом особенностей химической структуры и лекарственных форм.
2. Изучить и разработать оптимальный способ пробоподготовки плазмы крови для количественного определения олигопептидов.
3. Разработать методику количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови человека и животного.
4. Провести валидацию разработанной методики количественного определения в соответствии с международными документами FDA, EMA, «Руководство по экспертизе лекарственных средств» Том I.
5. Доказать пригодность разработанной методики для проведения доклинических фармакокинетических исследований лекарственных средств, производных олигопептидов. Установить фармакокинетические характеристики оригинального и воспроизведенного лекарственных средств на примере гозерелина.
6. Доказать пригодность разработанной методики для проведения клинко-фармакологических исследований лекарственных средств, производных олигопептидов.

Научная новизна

Впервые разработана и валидирована унифицированная методика количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови человека и животного методом ВЭЖХ-МС/МС, пригодная для проведения доклинических и клинических исследований, исследований биоэквивалентности. Впервые разработана и валидирована методика количественного определения бусерелина в плазме крови человека и животного методом ВЭЖХ-МС/МС. По сравнению с методами капиллярного электрофореза с его ограниченной чувствительностью и иммунохимического анализа с его отсутствием абсолютной селективности и возможными ложноположительными результатами предпочтение в анализе пептидных молекул в биологических жидкостях отдается методу ВЭЖХ-МС/МС. Несмотря на техническую сложность выполнения и возможное перекрытие многозарядных ионов, метод ВЭЖХ-МС/МС обладает большей точностью и специфичностью и требует относительно простой пробоподготовки.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Подобраны оптимальные условия хроматографического разделения, обоснован выбор сорбента, состав подвижной фазы и способ пробоподготовки. Разработанная методика количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови человека и животных с различными способами пробоподготовки позволит провести исследования фармакокинетики аналитов в зависимости от поставленных задач.

На основании результатов исследований обоснован подход к количественному определению олигопептидов в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС. Показана возможность использования методики в рамках доклинических и клинических исследований фармакокинетики для лекарственных средств гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида. Доказана целесообразность применения разработанной методики для сравнительных фармакокинетических исследований воспроизведенных препаратов.

Основные положения, выносимые на защиту

- Обоснование условий количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови человека и животных методом ВЭЖХ-МС/МС.
- Способы пробоподготовки плазмы крови для определения исследуемых веществ с последующим количественным определением методом ВЭЖХ-МС/МС.
- Обоснование методики количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови человека и животных методом ВЭЖХ-МС/МС.
- Результаты валидации разработанной методики количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови человека и животных методом ВЭЖХ-МС/МС.

– Основные фармакокинетические параметры гозерелина у животных (мини-свиней) при подкожном введении капсул пролонгированного действия.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала обоснование выбора метода ВЭЖХ-МС/МС для количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида с учетом их строения и физико-химических свойств, оптимального способа пробоподготовки для обеспечения их максимального извлечения. Пригодность разработанной методики для количественного определения изучаемых соединений в плазме крови была доказана посредством ее валидации. В ходе работы был применен метод ВЭЖХ-МС/МС. Полученные результаты были статистически обработаны с помощью программного обеспечения MicrosoftOfficeExcel и LabSolution (Ver. 5.91), ShimadzuCorporation.

Достоверность научных положений и выводов

Первичные результаты исследований получены при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС. Достоверность научных положений и выводов подтверждена в ходе проведения валидации и статистической обработки полученных данных. Использованное в исследовании оборудование было поверено и сертифицировано.

Апробация результатов исследований

Основные результаты работы доложены и обсуждены на III Международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шымкент, Казахстан, 2015), 6-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2016» «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ» (Воронеж, 2016), IV Международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шымкент, Казахстан, 2016), Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы достижения, перспективы» (Москва, 2018), 4-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МЕДХим-Россия 2019» (Екатеринбург, 2019). Апробация диссертации проведена 05 сентября 2019 г. на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. Автором лично проведена разработка и

валидация методики количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови человека и животных методом ВЭЖХ-МС/МС. Вклад автора является определяющим на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в публикациях, докладах и внедрения в практику.

Внедрение результатов исследования

Разработанная методика количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида внедрена в практическую деятельность биоаналитической лаборатории общества с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» и лаборатории фармакокинетики и лекарственных форм ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 4 паспорта специальности.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Выполнение диссертационной работы проводилось в рамках плана и в соответствии с темой научно-исследовательской работы на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева «Основные направления создания и оценки качества лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01.2.009.07145).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 136 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, 6 общих выводов и списка литературы. Диссертация включает 45 таблиц, 39 рисунков. Библиографический список содержит 145 источников, из них 125 – на иностранных языках.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 2 – в издании из Перечня ВАК, 1 – в журнале, входящем в международные базы данных (индексируемых в Scopus).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объекты исследования:

- Стандартные образцы исследуемых ЛС: гозерелина ацетат, бусерелина ацетат, октреотида ацетат (Sigma, США), трипторелина ацетат (PharmaceuticalStandart, Канада), даларгина ацетат (American Custom Chemicals Corporation, США).

• Образцы интактной плазмы крови человека, плазмы крови мини-свиньи. Образцы плазмы крови пациентов, принимавших противоопухолевые лекарственные средства.

Реактивы: ацетонитрил (LC-MSgrade, Biosolve, Израиль), метанол (HPLC-grade, Panreac, Испания), кислота муравьиная (Extrapure, Sigma, США), вода Milli-Q.

Оборудование: высокоэффективный жидкостной хроматограф Nexera (Shimadzu, Япония), оснащенный дегазатором (DGU-20A_{5R}), градиентным насосом (LC-30AD), термостатируемым автосамплером (SIL-30AC), термостатом колонок (СТО-20AC), диодно-матричным (SPD-M20A) и тандемным масс-спектрометрическим детектором (LCMS-8040) (Shimadzu, Япония) под управлением программного обеспечения LabSolution (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation (**лаборатория 1**), высокоэффективный жидкостной хроматограф NexeraXR (Shimadzu, Япония), оснащенный дегазатором (DGU-20A_{5R}), градиентным насосом (LC-20AD), термостатируемым автосамплером (SIL-20AC), термостатом колонок (СТО-20A), диодно-матричным (SPD-20A) и тандемным масс-спектрометрическим детектором (LCMS-8040) (Shimadzu, Япония) под управлением программного обеспечения LabSolution (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation (**лаборатория 2**), картриджи для ТФЭ Oasis® HLB cartridges, 30 mg, 1 cc (Waters, США); хроматографическая колонка Jupiter® 5мкм C18 50x4.6 мм 300Å, ультрацентрифуга Eppendorf 5427 (Германия), встряхиватель типа "вортекс" HeidolphReaxTop (Германия), весы аналитические A&DGR-200 (Япония), дозатор переменного объема одноканальный «Техно» 100 – 1000 мкл, ThermoScientific (Россия), дозатор переменного объема одноканальный «Техно» 10 – 100 мкл, ThermoScientific (Россия), механический степпер HandyStep® S (Германия), испаритель под током азота Ndk 200-2 (Китай).

Разработка методики хроматографического разделения и МС/МС-детектирования

При анализе в режиме сканирования полного ионного тока в масс-спектре гозерелина наблюдался пик молекулярного иона $[M+2H]^{2+}$ с m/z 635,60, в масс-спектре бусерелина – пик молекулярного иона $[M+2H]^{2+}$ с m/z 620,60, в масс-спектре трипторелина – пик молекулярного иона $[M+2H]^{2+}$ с m/z 656,50, в масс-спектре октреотида – пик молекулярного иона $[M+2H]^{2+}$ с m/z 510,40. Во всех случаях большую интенсивность имели дважды протонированные молекулярные ионы. Данные ионы были выбраны в качестве ионов-прекурсоров для поиска фрагментных ионов для анализа в режиме MRM. В ходе экспериментов было установлено, что присутствие муравьиной кислоты в качестве динамического модификатора подвижной фазы благотворно сказывается на эффективности ионизации исследуемых веществ. В этой связи в ходе дальнейших исследований использовали подвижную фазу состава: элюент А – водный раствор 0,1% муравьиной кислоты, элюент В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Далее был проведен анализ ионов, образующихся при фрагментации ионов-предшественников. Наибольшую интенсивность в масс-спектре имели фрагменты, имеющие m/z 607,60 для гозерелина, m/z 249,10 и 592,0 для бусерелина, m/z 248,95 для трипторелина и m/z 120,05 для октреотида (рис. 1).

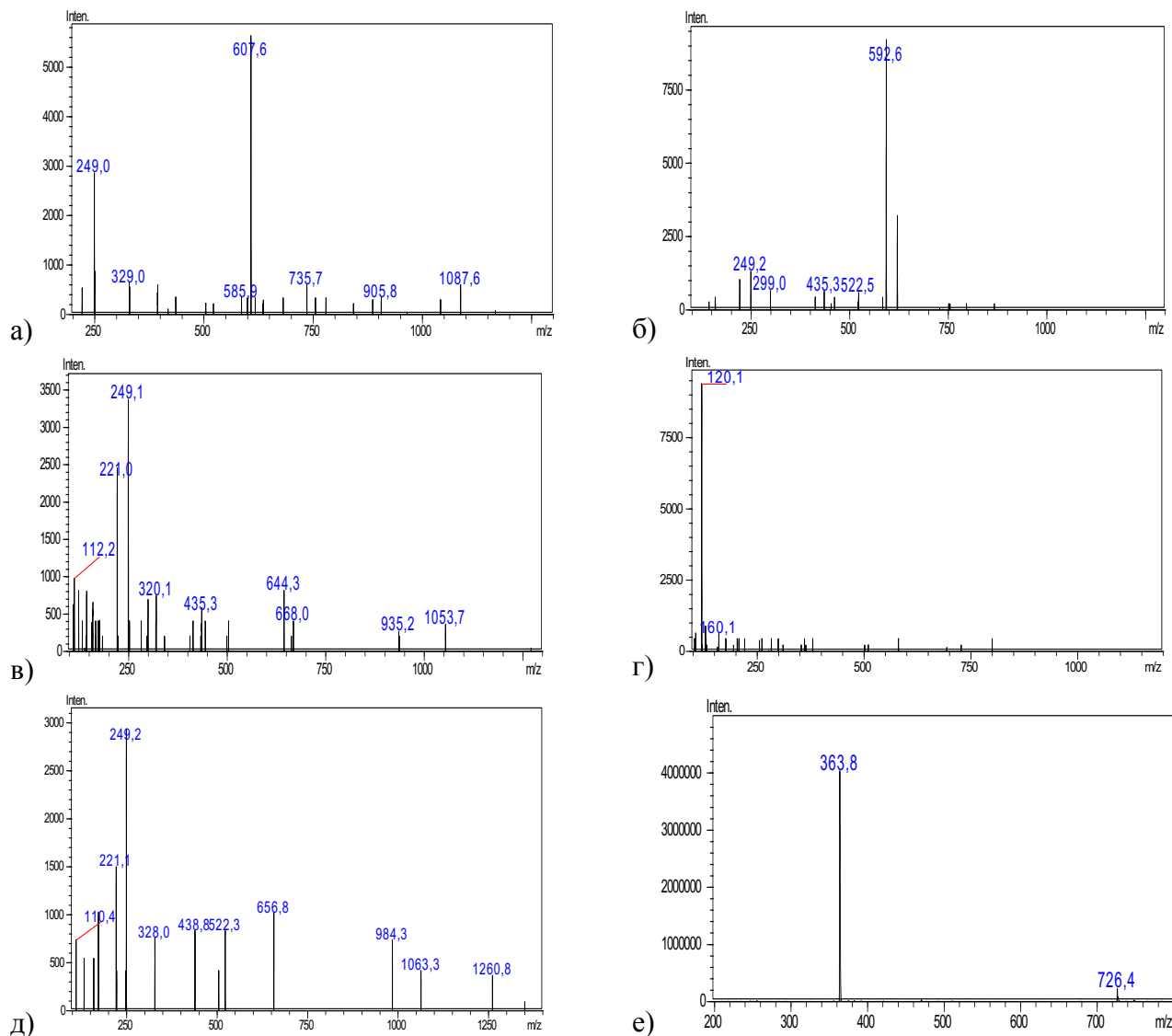


Рисунок 1. Масс-спектр фрагментации гозерелина для иона-прекурсора 635,60 m/z (а), бусерелина для иона-прекурсора 620,45 m/z (б, в), октреотида для иона-прекурсора 510,40 m/z (г), трипторелина для иона-прекурсора 656,50 m/z (д), даларгина по полному ионному току (е) в режиме положительной полярности

Твердофазная экстракция (ТФЭ) использовалась как основной способ пробоподготовки пептидных молекул для обнаружения более низких значений концентраций на уровне нижнего предела количественного определения (нПКО). В качестве возможного способа рассматривалось осаждения белков, где осаждающими реактивами были выбраны ацетонитрил и метанол в соотношениях 1:2 и 1:3. В ходе исследования было выявлено, что извлечение гозерелина из биологической матрицы позволяет обнаружить его в концентрации на уровне 1 нг/мл в отличие от бусерелина, трипторелина и октреотида, у которых наблюдалось неполное

извлечение из биологической матрицы при осаждении белков метанолом в соотношении 1:3, а в соотношении 1:2 уровень нПКО для всех аналитов составил разные значения от 0,5 нг/мл для бусерелина и от 10,0 нг/мл для трипторелина. Использование ацетонитрила в соотношениях 1:2 и 1:3 привело к неполному извлечению аналитов, а также к значительному размыванию хроматографических пиков. Таким образом, для целей клинико-фармакологических исследований гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида оптимальным способом пробоподготовки плазмы крови является ТФЭ ввиду более высокой степени извлечения аналитов. При проведении тех видов исследований фармакокинетики когда нет необходимости определять концентрации исследуемых веществ ниже 1-5 нг/мл, например доклинических, в качестве пробоподготовки плазмы крови целесообразней применять осаждение белков метанолом в соотношении 1:2, как более простой в выполнении способ.

Пробоподготовка способом ТФЭ.

1000 мкл интактной плазмы (либо 990 мкл с прибавлением 10 мкл раствора стандартного образца) помещали в пробирку типа Eppendorf, прибавляли 10 мкл внутреннего стандарта (ВС) с концентрацией 50 мкг/мл (даларгин) и пробы встряхивали на вортексе. Аликвоту 100 мкл переносили в центрифужную пробирку и прибавляли 200 мкл смеси метанол:вода очищенная:муравьиная кислота (60:40:0,08), 500 мкл метанола. Затем пробы встряхивали на вортексе и центрифугировали в течение 15 мин при 14500 об/мин, после чего к супернатанту прибавляли 500 мкл воды очищенной и наносили на картридж Oasis® HLB 1cc 30mg (Waters), предварительно активированный 1 мл метанола и 1 мл воды деионизированной. После нанесения образца картриджи промывались 1 мл воды деионизированной и 1 мл смеси метанол:вода очищенная (60:40) с последующим элюированием 1 мл 0,1% раствором муравьиной кислоты в метаноле и выпариванием до сухого остатка в токе азота при температуре 45°C в течение 20 мин. Сухой остаток растворяли в 100 мкл смеси метанол:вода деионизированная:муравьиная кислота (60:40:0,08).

Пробоподготовка способом осаждения белков.

Пробоподготовка была проведена способом осаждения белков метанолом в соотношении 1:2. 400 мкл интактной плазмы (либо 360 мкл с прибавлением 40 мкл раствора стандартного образца) помещали в пробирку типа Eppendorf, прибавляли 10 мкл ВС с концентрацией 2000 нг/мл и 800 мкл метанола. Затем пробы встряхивали на вортексе и центрифугировали в течение 15 минут при 14500 об/мин, после чего супернатант переносили в хроматографические вials.

Условия хроматографического разделения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида.

Хроматографическое разделение проводили на хроматографической колонке Jupiter® 5мкм C18 50x4.6 мм 300Å. В качестве подвижной фазы была использована смесь 0,1% раствора муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В) в градиентном режиме элюирования со скоростью потока 1,2 мл/мин и температурой колонки 40°C. Объем вводимой пробы, полученной после пробоподготовки ТФЭ, составил 20 мкл, а пробы, полученной после осаждения метанолом, составил 10 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме мониторинга множественных реакций при положительной ионизации электрораспылением, 5 кВ. Параметры детектирования в режиме мониторинга множественных реакций представлены в таблице 1.

Таблица 1. Детектирование в режиме мониторинга множественных реакций (MRM)

Вещество	Ион-прекурсор, m/z	Дочерний ион, m/z	Энергия соударений, В
Гозерелин	635,60	607,60	-20,0
Бусерелин	620,60	249,10	-37,0
		592,60	-19,0
Трипторелин	656,50	248,95	-40,0
Октреотид	510,40	120,05	-34,0
Даларгин	363,80	120,10	-43,0
		135,95	-22,0
		492,30	-13,0

Общий подход к валидации методики количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида

Валидацию биоаналитической методики проводили по следующим параметрам: селективность, линейность, эффект матрицы, правильность (внутри цикла и между циклами), прецизионность (внутри цикла и между циклами), нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность. Валидацию проводили на двух приборах компании Shimadzu в двух разных лабораториях с целью подтверждения межлабораторной воспроизводимости.

Валидация методики количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида с пробоподготовкой способом ТФЭ

При оценке селективности на хроматограмме пробы интактной плазмы не наблюдалось пиков с временами удерживания и MRM переходов, соответствующих исследуемым веществам (рис. 2). При оценке калибровочной зависимости проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови с добавлением рабочих стандартных растворов гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида до концентраций 0,5 нг/мл, 1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл и рабочего стандартного раствора ВС до концентрации 50 нг/мл. Пример хроматограммы модельного образца плазмы, содержащего аналиты на уровне 5 нг/мл, представлен на рисунке 3. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах

отношение площади пика аналита к площади пика ВС от отношения концентрации аналита к концентрации ВС в плазме крови (рис. 4). Полученные коэффициенты корреляции соответствовали нормам (не менее 0,99). Рассчитанные отклонения соответствуют нормам руководств (не более 20% для нПКО, не более 15% - для остальных точек).

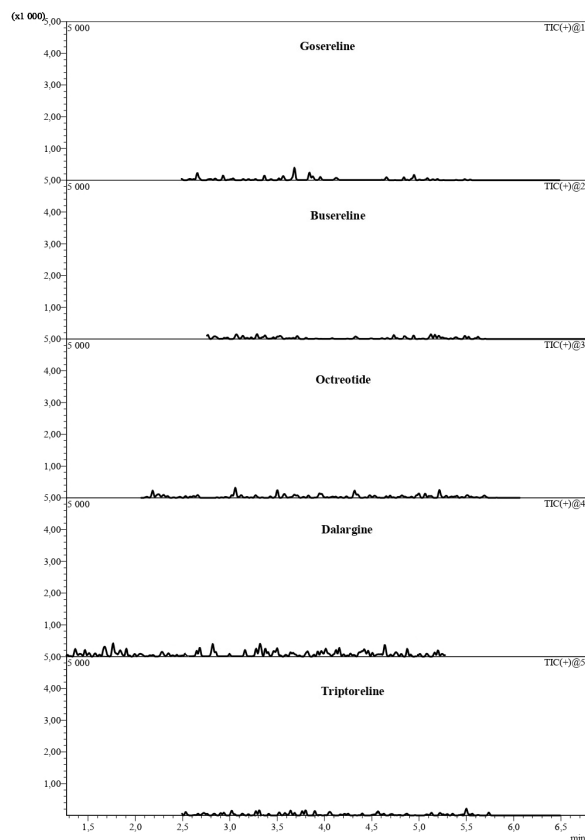


Рисунок 2. Хроматограмма образца интактной плазмы крови (пробоподготовка - ТФЭ)

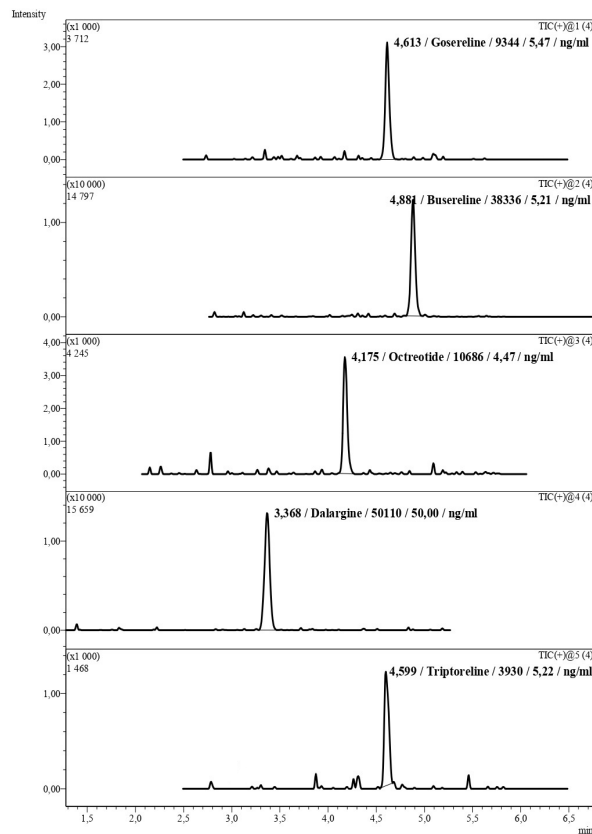


Рисунок 3. Хроматограмма модельного образца плазмы, содержащего аналиты на уровне 5 нг/мл (пробоподготовка - ТФЭ)

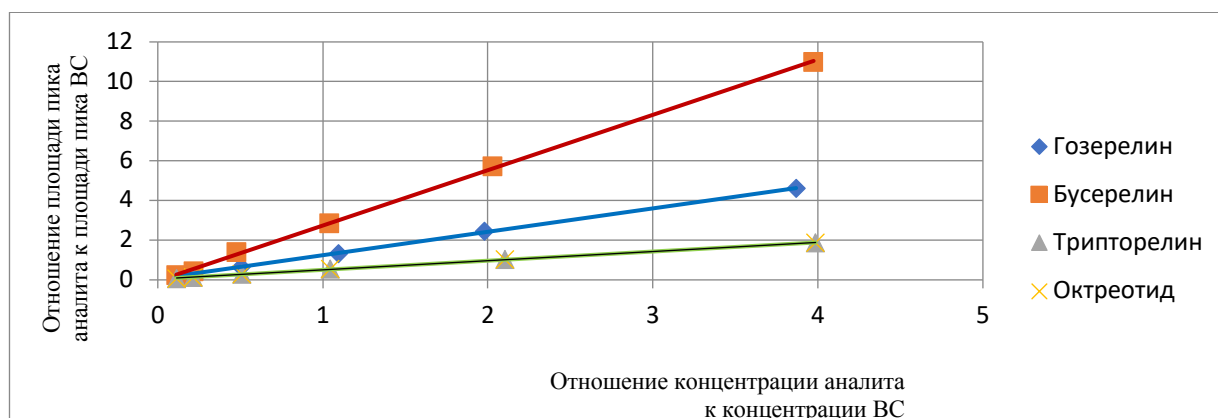


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости отношения площади пика аналита к площади пика ВС от отношения концентрации аналита к концентрации ВС в плазме крови

При оценке МЕ на приборе в лаборатории 1 на калибровочном уровне с концентрацией аналитов 1 нг/мл наименьшее значение наблюдалось для октреотида 66% и трипторелина 73%, для остальных аналитов – более 85%,. На верхнем уровне 20 нг/мл значение МЕ составило от 79% до 89%. Наименьшая степень извлечения на уровне 1 нг/мл наблюдалась для трипторелина 53% и на уровне 20 нг/мл – 65% для трипторелина и октреотида, для остальных аналитов степень извлечения на нижнем уровне составила от 69% до 82% и на верхнем от 77% до 88%.

При оценке МЕ на приборе в лаборатории 2 на калибровочном уровне с концентрацией аналитов 1 нг/мл наименьшее значение наблюдалось для октреотида 63% и трипторелина 68%, для остальных аналитов значение МЕ составило более 80%, с концентрацией аналитов 20 нг/мл наименьшее значение МЕ наблюдалось для гозерелина 75%, а для остальных аналитов в диапазоне от 80% до 96%. Степень извлечения составила от 65% до 79% с наименьшим значением для бусерелина на нижнем уровне и от 76% до 87% на верхнем. Таким образом, степень извлечения на нижнем и верхнем уровне имеет незначительное отличие, тем самым показывая одинаковую степень извлечения на всех калибровочных уровнях.

Для оценки правильности и прецизионности был проведен анализ 4 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов до концентрации аналитов 0,5 нг/мл, 1 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл. Образцы хроматографировали по 5 раз на каждом уровне концентрации аналита. Исследование проводили в течение 1-й последовательности (внутри цикла) и 2-й последовательности (между циклами). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), представленные в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Правильность и прецизионность методики внутри и между циклами (лаборатория 1)

Вещество	Введено, нг/мл	Внутри цикла			Между циклами		
		Найдено, среднее (n=5), нг/мл	RSD (n=5), %	E, %	Найдено, среднее (n=10), нг/мл	RSD (n=10), %	E, %
Гозере-лин	0,50	0,46	8,71	-7,60	0,51	8,40	1,00
	1,00	1,04	11,10	3,80	1,02	6,18	2,10
	10,00	9,73	7,26	-2,70	10,31	6,10	3,07
	20,00	19,49	7,63	-2,54	20,21	7,03	1,07
Бусере-лин	0,50	0,51	8,89	2,40	0,48	4,67	-4,60
	1,00	0,97	6,60	-2,80	0,96	7,27	-4,50
	10,00	10,44	4,75	4,36	9,99	3,99	-0,06
	20,00	20,44	5,80	2,18	20,07	5,31	0,33
Трипто-релин	0,50	0,50	6,15	-0,80	0,49	7,88	-1,40
	1,00	1,00	7,67	0,40	1,01	8,04	0,90
	10,00	10,14	8,28	1,36	9,81	6,99	-1,92
	20,00	19,93	10,14	-0,34	19,79	8,02	-1,03

Октреотид	0,50	0,49	7,79	-1,20	0,49	5,29	-2,20
	1,00	0,98	8,86	-2,40	1,03	5,84	2,50
	10,00	10,17	10,17	1,74	10,25	6,58	2,48
	20,00	19,98	4,11	-0,09	19,75	2,28	-1,27

Таблица 3. Правильность и прецизионность методики внутри и между циклами (лаборатория 2)

Вещество	Введено, нг/мл	Внутри цикла			Между циклами		
		Найдено, среднее (n=5), нг/мл	RSD (n=5), %	E, %	Найдено, среднее (n=10), нг/мл	RSD (n=10), %	E, %
Гозерелин	0,50	0,52	4,40	3,60	0,49	4,92	-1,60
	1,00	1,03	8,93	2,80	1,02	4,85	2,10
	10,00	10,27	6,16	2,70	9,70	8,69	-2,99
	20,00	20,16	5,59	0,80	19,76	3,70	-1,21
Бусерелин	0,50	0,51	3,53	2,80	0,48	4,27	-3,20
	1,00	1,03	4,03	2,80	1,05	4,32	5,25
	10,00	10,75	5,05	7,48	10,44	4,21	4,42
	20,00	19,78	4,86	-1,10	20,44	3,04	2,18
Трипторелин	0,50	0,51	7,73	1,20	0,51	5,32	2,00
	1,00	1,02	5,87	1,80	1,04	4,70	4,00
	10,00	10,02	0,35	0,20	10,14	4,04	1,42
	20,00	20,28	4,09	1,40	20,24	2,95	1,19
Октреотид	0,50	0,52	6,51	3,20	0,50	6,64	-0,20
	1,00	1,02	3,92	2,00	1,03	3,45	2,90
	10,00	9,54	2,56	-4,60	10,07	3,49	0,71
	20,00	20,49	3,55	2,45	20,20	2,92	0,98

Полученные значения RSD и E соответствовали нормам руководств (не более 20% для нПКО и не более 15% для остальных точек).

За нПКО методики были приняты минимальные концентрации гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови, для которых возможно определение аналитов со значениями RSD и E не более 20% в диапазоне линейной зависимости. нПКО аналитов в плазме крови составил 0,5 нг/мл на двух приборах. Стабильность анализируемых веществ и внутреннего стандарта была оценена в составе исходного и рабочего стандартных растворов на уровнях концентраций 1 нг/мл и 20 нг/мл. Площадь пиков при повторных анализах на двух приборах не изменялась более чем на 15%. Отсутствие переноса пробы в лабораториях 1 и 2 было доказано последовательным анализом образца с концентрацией аналитов 20 нг/мл и образца холостой плазмы крови.

Валидация методики количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида с пробоподготовкой способом осаждения белков метанолом

При оценке селективности на хроматограмме пробы интактной плазме не наблюдалось пиков с временами удерживания и MRM переходов, соответствующих исследуемым веществам (рис. 5). Для определения калибровочной зависимости проводили анализ 6 образцов интактной

плазмы крови с добавлением рабочих стандартных растворов гозерелина до концентрации 2, 2,5, 5, 8, 10 и 20 нг/мл, бусерелина и октреотида до концентраций 1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 5 нг/мл, 8 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл и рабочего стандартного раствора ВС до концентрации 50 нг/мл. Пример хроматограммы модельного образца плазмы, содержащего аналиты на уровне 10 нг/мл, и образцов интактной плазмы крови представлен на рисунке 6. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика аналита к площади пика ВС от отношения концентрации аналита к концентрации ВС в плазме крови (рис. 7 и 8). Полученные коэффициенты корреляции соответствовали нормам (не менее 0,99). Рассчитанные отклонения соответствуют нормам руководств (не более 20% для нПКО, не более 15% - для остальных точек).

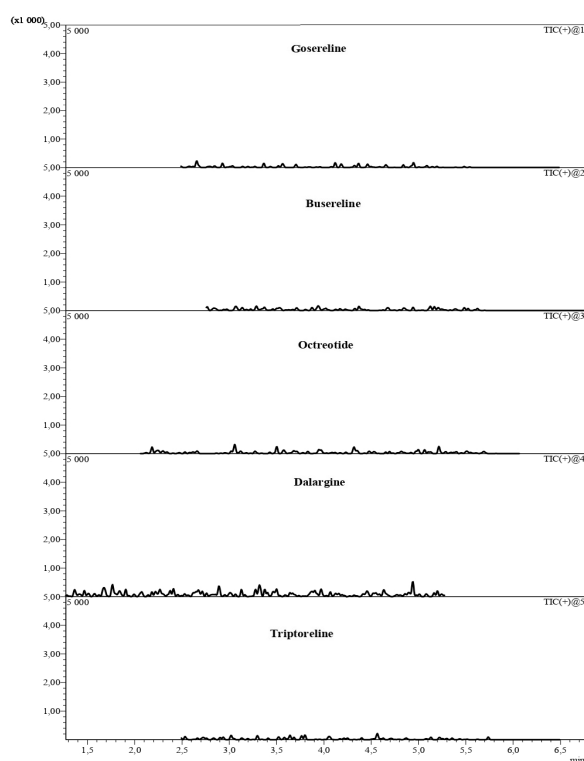


Рисунок 5. Хроматограмма образца интактной плазмы крови (пробоподготовка - осаждение белков метанолом)

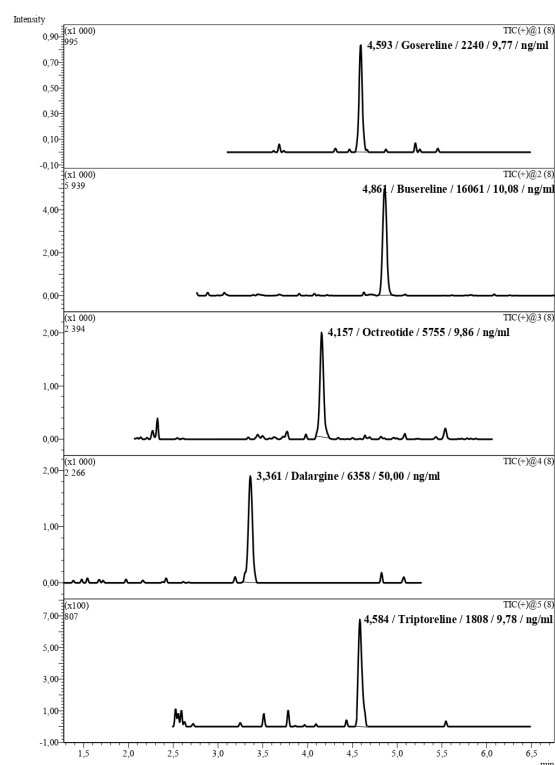


Рисунок 6. Хроматограмма модельного образца плазмы, содержащего аналиты на уровне концентрации 10 нг/мл (пробоподготовка - осаждение белков метанолом)

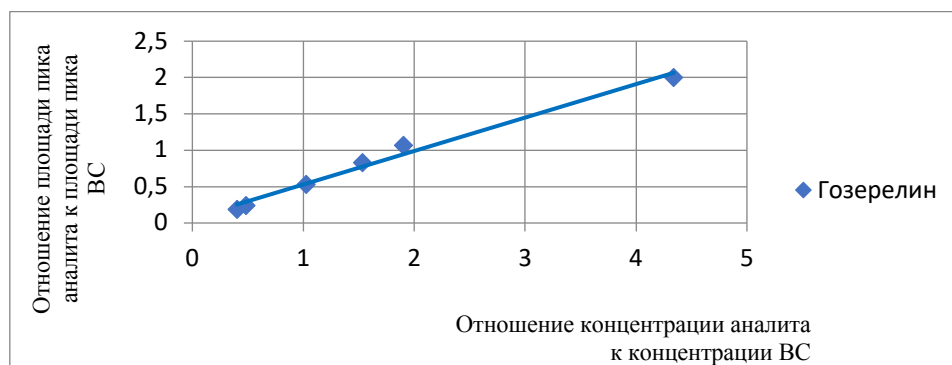


Рисунок 7. Калибровочный график зависимости отношения площади пика гозерелина к площади пика ВС от отношения концентрации гозерелина к концентрации ВС в плазме крови

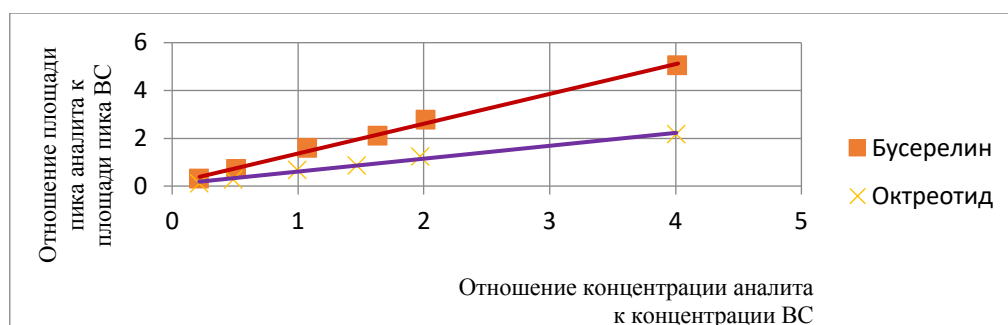


Рисунок 8. Калибровочный график зависимости отношения площади пика аналита к площади пика ВС от отношения концентрации аналита к концентрации ВС в плазме крови

При оценке МЕ и степени извлечения на приборе в лаборатории 1 на калибровочном уровне с концентрацией 2,5 нг/мл значения МЕ для бусерелина и октреотида находились на равном уровне – 79% и 83%, для гозерелина с концентрацией 5 нг/мл – 73%. На верхнем калибровочном уровне с концентрацией 20 нг/мл значение МЕ составило для гозерелина – 63%, а для бусерелина и октреотида 71% и 87%. Степень извлечения на нижнем уровне концентрации 2,5 нг/мл для бусерелина и октреотида составила 66% и 77%, для гозерелина составила 65% с нижним уровнем концентрации 5 нг/мл, а на верхнем уровне с концентрацией 20 нг/мл для всех аналитов в диапазоне от 68% до 81%.

При оценке МЕ и степени извлечения на приборе в лаборатории 2 на калибровочном уровне с концентрацией 2,5 нг/мл значения МЕ для бусерелина и октреотида находились на равном уровне – 71% и 81%, для гозерелина с концентрацией 5 нг/мл – 67%. На верхнем калибровочном уровне с концентрацией 20 нг/мл наиболее высокое значение МЕ составило для гозерелина – 93%, а для бусерелина и октреотида 70% и 67%. Степень извлечения на нижнем уровне концентрации 2,5 нг/мл для бусерелина и октреотида составила 83% и 70%, для гозерелина составила 65% с нижним уровнем концентрации 5 нг/мл, а на верхнем уровне с концентрацией 20 нг/мл для всех аналитов в диапазоне от 65% до 78%. Таким образом, степень

извлечения на нижнем и верхнем уровне имеет незначительное отличие, тем самым показывая одинаковую степень извлечения на всех калибровочных уровнях.

Для оценки правильности и прецизионности был проведен анализ 4 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов до концентрации гозерелина 2 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, до концентрации бусерелина и октреотида 1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл. Образцы хроматографировали по 5 раз на каждом уровне концентрации аналита. Исследование проводили в течение 1-й последовательности (внутри цикла) и 2-й последовательности (между циклами). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), представленные в таблицах 4 и 5.

Таблица 4. Правильность и прецизионность методики внутри и между циклами (лаборатория 1)

Вещество	Введено, нг/мл	Внутри цикла			Между циклами		
		Найдено, среднее (n=5), нг/мл	RSD (n=5), %	E, %	Найдено, среднее (n=10), нг/мл	RSD (n=10), %	E, %
Гозерелин	2,00	1,89	8,31	-5,30	1,96	5,10	-1,95
	5,00	4,89	4,78	-2,28	4,98	4,33	-0,44
	10,00	9,42	6,69	-5,78	9,97	2,63	-0,26
	20,00	20,19	3,84	0,96	19,98	2,03	-0,10
Бусерелин	1,00	0,95	11,73	-4,60	0,98	6,59	-1,90
	2,5	2,58	5,63	3,04	2,48	3,66	-0,80
	10,00	10,03	6,39	0,32	9,90	7,18	-0,99
	20,00	20,07	5,51	0,34	20,02	2,20	0,09
Октреотид	1,00	1,03	6,40	3,40	1,01	5,17	0,60
	2,5	2,45	5,29	-2,08	2,53	4,25	1,28
	10,00	9,80	3,81	-1,98	10,07	7,12	0,67
	20,00	20,00	3,23	0,00	19,82	2,87	-0,90

Таблица 5. Правильность и прецизионность методики внутри и между циклами (лаборатория 2)

Вещество	Введено, нг/мл	Внутри цикла			Между циклами		
		Найдено, среднее (n=5), нг/мл	RSD (n=5), %	E, %	Найдено, среднее (n=10), нг/мл	RSD (n=10), %	E, %
Гозерелин	2,50	2,04	3,76	1,90	2,04	6,10	1,85
	5,00	5,25	5,83	5,00	5,16	2,93	3,26
	10,00	10,17	2,85	1,70	10,27	3,07	2,74
	20,00	20,07	0,47	0,34	20,17	2,11	0,85
Бусерелин	1,00	0,96	5,37	-3,80	1,02	7,68	1,80
	2,5	2,60	6,78	4,00	2,55	7,17	2,04
	10,00	9,79	7,15	-2,08	9,52	4,90	-4,77
	20,00	20,52	4,80	2,62	19,89	3,28	-0,57

Октреотид	1,00	1,01	7,24	1,00	1,01	6,54	1,20
	2,5	2,50	5,66	-0,08	2,56	4,69	2,24
	10,00	9,75	4,47	-2,54	9,92	3,97	-0,85
	20,00	20,22	3,87	1,11	19,95	4,79	-0,27

Полученные значения RSD и E соответствовали нормам руководств (не более 20% для нПКО и не более 15% для остальных точек).

По результатам оценки линейности, правильности и прецизионности был определен нПКО, который для гозерелина в плазме крови составил 2,0 нг/мл, бусерелина и октреотида 1,0 нг/мл на двух приборах. Для бусерелина предел обнаружения составил 0,5 нг/мл, что соответствует нПКО методики количественного определения с пробоподготовкой ТФЭ. Для гозерелина и октреотида предел обнаружения соответствует уровню нПКО. Для трипторелина предел обнаружения составил 8 нг/мл, что во многом превышает значения других аналитов. Таким образом, разработанная методика количественного определения в плазме крови с пробоподготовкой осаждением метанолом не была валидирована по трипторелину из-за низкой чувствительности.

Стабильность анализируемых веществ и внутреннего стандарта была оценена в составе исходного и рабочего стандартных растворов на уровнях концентраций 2,5 нг/мл и 20 нг/мл для бусерелина и октреотида, на уровнях 5 нг/мл и 20 нг/мл для гозерелина. Площадь пиков при повторных анализах на двух приборах не изменялась более чем на 15%. Отсутствие переноса пробы в лабораториях 1 и 2 было доказано последовательным анализом образца с концентрацией аналитов 20 нг/мл и образца холостой плазмы крови.

При проведении валидации методики количественного определения гозерелина, бусерелина и октреотида в плазме крови животного (мини-свиней) методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием в качестве способа пробоподготовки осаждение белков метанолом в соотношении 1:2 сравнивались значения степени извлечения и эффекта матрицы с полученными результатами валидации методики количественного определения гозерелина, бусерелина и октреотида в плазме крови человека (Таблицы 6-9).

Таблица 6. Степень извлечения и эффект матрицы для бусерелина и октреотидана уровне концентрации 2,5 нг/мл

Вещество	Эффект матрицы (ME), %		Эффект матрицы, нормализованный по ВС (ME _{norm}), %		Степень извлечения (RE), %	
	человек	животное	человек	животное	человек	животное
Бусерелин	71,23±2,04	76,20±1,79	84,74±1,92	97,67±2,30	82,68±1,03	72,67±2,92
Октреотид	81,09±1,07	69,24±2,38	97,03±0,98	88,74±3,05	70,11±1,54	61,80±2,60
ВС (50 нг/мл)	83,11±1,32	78,02±0,47	-	-	66,42±0,98	70,02±0,46

Таблица 7. Степень извлечения и эффект матрицы для бусерелина и октреотида на уровне концентрации 20 нг/мл

Вещество	Эффект матрицы (ME), %		Эффект матрицы, нормализованный по ВС (ME _{norm}), %		Степень извлечения (RE), %	
	человек	животное	человек	животное	человек	животное
Бусерелин	70,35±0,84	73,42±0,76	93,43±1,13	96,08±1,00	74,60±0,71	79,96±0,34
Октреотид	66,93±2,21	70,86±1,87	89,09±2,07	92,73±2,44	65,26±1,68	68,23±2,43
ВС (50 нг/мл)	75,37±1,27	76,20±0,78	-	-	70,56±1,42	82,89±1,00

Таблица 8. Степень извлечения и эффект матрицы для гозерелина на уровне концентрации 5 нг/мл

Вещество	Эффект матрицы (ME), %		Эффект матрицы, нормализованный по ВС (ME _{norm}), %		Степень извлечения (RE), %	
	человек	животное	человек	животное	человек	животное
Гозерелин	67,06±0,83	78,10±3,22	80,29±3,05	100,11±4,13	65,31±0,74	63,11±1,30
ВС (50 нг/мл)	83,11±1,32	78,02±0,47	-	-	66,42±0,98	70,02±0,46

Таблица 9. Степень извлечения и эффект матрицы для гозерелина на уровне концентрации 20 нг/мл

Вещество	Эффект матрицы (ME), %		Эффект матрицы, нормализованный по ВС (ME _{norm}), %		Степень извлечения (RE), %	
	человек	животное	человек	животное	человек	животное
Гозерелин	92,88±1,01	86,99±0,63	123,59±1,12	113,84±0,82	78,07±0,89	72,13±0,45
ВС (50 нг/мл)	75,37±1,27	76,20±0,78	-	-	70,56±1,42	82,89±1,00

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что значения степени извлечения и эффекта матрицы практически идентичны. В свою очередь это доказывает пригодность разработанной методики для количественного определения гозерелина, бусерелина и октреотида в плазме крови как человека, так и животного.

Практическое применение разработанной методики количественного определения гозерелина, бусерелина и октреотида в плазме крови животных

Разработанная методика количественного определения противоопухолевых пептидных препаратов была применена для фармакокинетического исследования отечественного тестового препарата гозерелина и оригинального препарата Золадекс® у мини-свиней (самцов и самок). Способ введения препаратов – подкожное введение капсул пролонгированного действия. Временные точки отбора проб 0, 1, 2, 5, 8, 12, 24, 96, 192, 288, 336, 360, 408, 504 и 672 ч – первое введение препарата; 1, 2, 5, 8, 12, 24, 96, 192, 288, 336, 360, 408, 480 и 648 ч – второе введение препарата. Концентрация гозерелина достигала максимума дважды – в течение первых часов после введения препарата и спустя несколько недель.

На основании полученных результатов измерения концентрации гозерелина в плазме крови животных были рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: максимальная концентрация в плазме крови (C_{max} , нг/мл), время достижения максимальной концентрации (T_{max} , час), площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время», рассчитанная от нуля до последней точки, ($AUC_{0-t,нг*час/мл}$), площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время», рассчитанная от нуля до бесконечности, ($AUC_{0-\infty}$, нг*час/мл), среднее время пребывания в организме (MRT, час), константа скорости элиминации (K_{el}), объем распределения (Vd, л) и период полувыведения ($T_{1/2}$, час). Средняя максимальная концентрация гозерелина в плазме крови животных после первого и повторного приема тестового и референтного препаратов приведена в таблице 10.

Таблица 10. Значения средней максимальной концентрации гозерелина в плазме крови животных

Препарат	Самцы				Самки			
	C_{max1} , нг/мл	C_{max2} , нг/мл	C_{max1} , нг/мл	C_{max2} , нг/мл	C_{max1} , нг/мл	C_{max2} , нг/мл	C_{max1} , нг/мл	C_{max2} , нг/мл
	Первое введение		Повторное введение		Первое введение		Повторное введение	
Тестовый	11,33± 4,93	13,33± 2,52	16,33± 1,15	12,67± 3,21	14,33± 1,53	13,33± 1,15	11,33± 3,06	16,33± 1,53
Золадекс®	-	14,00± 7,00	-	-	13,00± 1,73	12,67± 1,15	10,00± 2,65	15,00± 1,00

Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} гозерелина у самцов после введения тестового препарата составили $2421,20 \pm 174,87$ и $2402,45 \pm 177,99$ нг*ч/мл после первого введения и $3130,45 \pm 688,14$ и $2871,83 \pm 780,51$ после второго введения, соответственно. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} гозерелина у самцов после первого введения препарата Золадекс® составили $2749,47 \pm 1633,49$ и $2774,63 \pm 1634,18$ нг*ч/мл, после второго введения – $3541,19 \pm 849,55$ и $3301,67 \pm 850,78$ нг*ч/мл.

У самок значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} гозерелина после введения тестового препарата составили $3496,61 \pm 367,04$ и $3248,00 \pm 363,91$ нг*ч/мл после первого введения и $3552,04 \pm 298,86$ и $3366,50 \pm 265,92$ нг*ч/мл после второго введения. Значения $AUC_{0-\infty}$ и AUC_{0-t} гозерелина у самок после первого введения препарата Золадекс® составили $3189,23 \pm 19,51$ и $3013,17 \pm 145,52$ нг*ч/мл, после второго – $3559,95 \pm 234,32$ и $3422,00 \pm 238,36$ нг*ч/мл.

Полученные результаты подтверждают возможность использования предложенной методики для проведения фармакокинетических исследований гозерелина.

Практическое применение разработанной методики количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови пациентов

Разработанная методика количественного определения противоопухолевых пептидных препаратов была применена для определения уровня концентрации в плазме крови пациентов, страдающих раком предстательной железы. Пациентам были назначены лекарственные препараты гозерелина, трипторелина и бусерелина на разных этапах лечения. Полученные результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11. Результаты определения гозерелина, бусерелина и трипторелина в плазме крови пациентов

№ пациента	Вводимый ЛП, ЛС, дозировка	Общее время терапии	День отбора	Найденная концентрация, нг/мл
1	Золадекс®, гозерелина ацетат, 10,8 мг	6 месяцев	29-й/84	13,57
2	Золадекс®, гозерелина ацетат, 3,6 мг	9 дней	8-й/28	0,95
3	Золадекс®, гозерелина ацетат, 10,8 мг	2 месяца	59-й/84	0,55
4	Золадекс®, гозерелина ацетат, 10,8 мг	3 дня	3-й/84	-
5	Трипторелин-лонг®, трипторелина ацетат, 11,25 мг	3 месяца	83-й/84	-
6	Золадекс®, гозерелина ацетат, 10,8 мг	3 месяца	74-й/84	-
7	Золадекс®, гозерелина ацетат, 10,8 мг	8 месяцев	10-й/84	7,81
8	Золадекс®, гозерелина ацетат, 3,6 мг	2 года	16-й/28	16,23
9	Бусерелин-депо®, бусерелина ацетат, 3,75 мг	2 года	27-й/28	-

У пациентов № 4, 5, 6 и 9 концентрация аналитов находилась ниже уровня нПКО. Отбор пробы осуществлялся или в первые дни после подкожного введения, или в последние дни курса лечения. Экспериментально было доказано, что концентрация гозерелина в плазме крови возрастает, начиная со второй недели терапии. Таким образом, при проведении клинико-фармакологических исследований отбирать образцы крови у пациентов целесообразно с 10-12-го дня после введения лекарственного препарата, когда его концентрация будет находиться на максимальном уровне или на стадии «плато».

Разработанная методика с пробоподготовкой способом ТФЭ позволила определить в плазме крови лекарственный препарат гозерелина на терапевтическом уровне со следовыми концентрациями около 0,5 нг/мл и показала, что выбранный аналитический диапазон соответствует ожидаемым значениям.

Полученные результаты подтверждают, что разработанная методика может быть

использована при проведении клинико-фармакологических исследований у пациентов, страдающих раком предстательной железы, и позволяет определить временной диапазон отбора образцов крови с ЛВ, находящимся на терапевтическом уровне, а также с целью оценки биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Изучены существующие методики количественного определения олигопептидов в плазме крови. Предпочтение в анализе пептидных молекул в биологических жидкостях отдается методу ВЭЖХ-МС/МС со способом ионизации электрораспылением в режиме положительной полярности, так как пептиды обычно являются достаточно полярными молекулами, способными легко протонироваться. В ходе исследования фармакокинетики ЛС возникает ряд проблем, связанных с их структурой и физико-химическими свойствами, таких как низкая проницаемость, структурная нестабильность, короткий период полувыведения пептидных молекул.

2. Изучены условия пробоподготовки плазмы крови для количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида. Показано, что основным способом пробоподготовки является ТФЭ с более высоким процентным извлечением аналитов с целью проведения клинико-фармакологических исследований. Для проведения доклинических и клинических исследований фармакокинетики в качестве пробоподготовки целесообразней использовать осаждение белков метанолом в соотношении 1:2, как наиболее простой в выполнении метод без расходования большого количества реактивов с обнаружением требуемого уровня нПКО.

3. Разработана методика количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови человека и животного. Выбор муравьиной кислоты в качестве модификатора подвижной фазы, использование хроматографической колонки с диаметром пор 300Å обусловлены физико-химическими свойствами исследуемых веществ. При анализе в режиме сканирования полного ионного тока в масс-спектрах всех веществ большую интенсивность имели дважды протонированные молекулярные ионы, которые были выбраны в качестве ионов-прекурсоров. Параметры детектирования были подобраны экспериментально.

4. Проведена валидация разработанных методик количественного определения гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида в плазме крови с унифицированными условиями хроматографического разделения. Аналитический диапазон методики с пробоподготовкой способом ТФЭ составил 0,5-20,0 нг/мл для гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида. Аналитический диапазон методики с пробоподготовкой способом осаждения белков метанолом составил 1,0-20 нг/мл для бусерелина и октреотида, 2,0-20,0 нг/мл для гозерелина. Доказана межлабораторная воспроизводимость разработанной методики.

5. Доказана возможность использования разработанной методики для количественного определения гозерелина, бусерелина и октреотида в плазме крови животных с целью проведения фармакокинетических исследований. Получены и статистически обработаны результаты определения основных фармакокинетических параметров в ходе исследования препаратов гозерелина на животных.

6. Доказана возможность использования разработанной методики для количественного определения гозерелина, бусерелина и трипторелина методом ВЭЖХ-МС/МС в плазме крови пациентов с целью проведения клинико-фармакологических исследований.

Практические рекомендации

Разработанную методику количественного определения целесообразно использовать в рамках доклинических и клинико-фармакологических исследований гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида, а также для оценки биоэквивалентности лекарственных средств.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Разработанная методика количественного определения может быть применена с целью изучения фармакокинетики лекарственных средств гозерелина, бусерелина, трипторелина и октреотида с новой дозировкой. Также могут быть использованы условия хроматографического разделения и способы пробоподготовки при разработке методики количественного определения аналогов гонадотропин-рилизинг гормона и соматостатина.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Фишер, Е.Н.** Применение инновационных препаратов в лечении онкологических заболеваний / **Е.Н. Фишер**, Раменская Г.В. // Вестник ЮКГФА. – 2015. – №4(73). – С. 44-45.
2. **Фишер, Е.Н.** Лекарственные препараты на основе регуляторных пептидов /**Е.Н. Фишер**, Г.В. Раменская // Мат. 6-й международной науч.-метод. конф. «Фармообразование-2016» «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ» (Воронеж, 21-23 апреля 2016 г.) / [под. общ. ред. А.С. Беленовой]; Воронежский государственный университет. – Воронеж, 2016. – С. 648.
3. **Фишер, Е.Н.** Методы определения пептидных препаратов в биологических жидкостях / **Е.Н. Фишер**, Т.Н. Комаров, Е.С. Мельников, Г.В. Раменская // Вестник ЮКГФА. – 2016 – №4(77). – С. 44-45.
4. **Фишер, Е.Н.** Определение гозерелина в плазме крови человека методом ВЭЖХ с масс-селективным детектированием / Ю.В. Медведев, И.Е. Шохин, **Е.Н. Фишер**, Т.Н. Комаров, Е.С. Мельников, Г.В. Раменская // **Биофармацевтический журнал.** –2017. – №9(3). – С. 34-39.

5. **Фишер, Е.Н.** Пептиды как противоопухолевые лекарственные средства / **Е.Н. Фишер**, Г.В. Раменская, В.В. Смирнов // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2018. – №17. – С. 76-77.
6. **Fisher, E.** Peptide-Based Therapeutics for Oncology / E. Fisher, K. Pavlenko, A. Vlasov, G. Ramenskaya // **Pharmaceutical Medicine**. – 2019. – V. 33(1). – P. 9-20.
7. **Fisher, E.N.** The development of the HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantitation of several antitumor peptide-based therapeutics // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants «MedChem Russia 2019». – 2019. – P. 342.
8. **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. – №8(3). – С. 79-84.