



Вспомогательные вещества в составе биологических лекарственных препаратов: функциональная классификация, проблемы стабильности, аналитические подходы к определению

А.С. Минеро[✉], О.Б. Рунова, И.М. Щербаченко, О.Б. Устинникова

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

✉ Минеро Анастасия Сальвадоровна; minero@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Потенциальное нежелательное действие вспомогательных веществ (ВВ) биологических лекарственных препаратов (БЛП) и сложности их аналитического контроля представляют значительную проблему при разработке и экспертизе лекарственных средств. Современные аналитические методы и инновационные подходы к подбору ВВ позволяют минимизировать риски и усовершенствовать контроль качества БЛП.

ЦЕЛЬ. Анализ современных методов количественного определения вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах и оценка перспектив их применения для совершенствования лабораторной экспертизы при регистрации и подтверждения соответствия качества препаратов при вводе в гражданский оборот.

ОБСУЖДЕНИЕ. Поиск литературы проводился с использованием баз данных SciFinder, PubMed, eLIBRARY.RU. Представлены данные о функциональной классификации ВВ. Проведен анализ потенциального нежелательного действия ВВ: риск сахарозной нефропатии при применении внутривенных препаратов иммуноглобулинов, содержащих сахарозу; гипогликемия, изменение метаболизма аминокислот, снижение синтеза нуклеиновых кислот и угнетение функциональной активности тромбоцитов вследствие высокой концентрации натрия каприлата в препаратах альбумина. Важным аспектом оценки безопасности использования ВВ является изучение продуктов их деградации. Представлены данные о путях решения проблем, связанных с деградацией ВВ, включая снижение содержания или замену ВВ, как в случае с натрием каприлатом, которые многие производители исключают из состава рецептур БЛП. Рассмотрены инновационные подходы к поиску новых адъювантов (MF59, AS01, AS03, AS04, RC-529), совмещающих функции индукторов иммунного ответа и систем доставки. Представлены данные об использовании математического моделирования при выборе состава композиции ВВ. Проведен анализ современных аналитических методов количественного определения ВВ, включая жидкостную и газофазную хроматографию, спектрофотометрические методы для количественной оценки наиболее значимых ВВ в БЛП (аминокислоты, полисорбаты, фенол, феноксизтанол, бензиловый спирт, натрия каприлат). Рассмотрены перспективные методики, такие как эксклюзионная ВЭЖХ для оценки полисорбата 80, HILIC ВЭЖХ для селективного количественного определения аминокислот в составе композиции, гидрофильная ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием и ионообменная ВЭЖХ с амперометрическим детектированием для анализа стабилизаторов углеводной природы (сорбит, маннит, трегалоза, глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза), а также газофазная хроматография для идентификации и количественной оценки 2-феноксизтанола и м-крезола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Выбор ВВ для БЛП представляет собой комплексную задачу, требующую разработки стратегии контроля не только установленных норм их содержания, но и воз-

можных продуктов деградации. Разработка унифицированных аналитических методов для количественного определения ВВ является основным направлением для обеспечения качества БЛП на этапах регистрационной экспертизы и ввода в гражданский оборот.

Ключевые слова: вспомогательные вещества; биологические лекарственные препараты; функциональная классификация; стабильность; деградация; высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭЖХ; консерванты; стабилизаторы; адъюванты; контроль качества

Для цитирования: Минеро А.С., Рунова О.Б., Щербаченко И.М., Устинникова О.Б. Вспомогательные вещества в составе биологических лекарственных препаратов: функциональная классификация, проблемы стабильности, аналитические подходы к определению. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):307–320. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-307-320>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Excipients in biological medicinal products: Functional classification, stability issues, and analytical quantitation approaches

Anastasia S. Minero✉, Olga B. Rounova, Irina M. Shcherbachenko,
Olga B. Ustinnikova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Anastasia S. Minero; minero@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. When developing and evaluating new biological products (BP), potential adverse action and complicated analytical procedure are a specific issue. Innovative analytical methods and selection of excipients allow for risk minimisation and enhanced quality control of biological products.

AIM. This study aimed to analyse modern quantitative approaches to BP excipients and assess their prospects in improving laboratory expertise during authorisation and quality compliance testing of a biological product that has been launched into the commercial market.

DISCUSSION. The literature search was performed using SciFinder, PubMed, and eLIBRARY.RU databases. The authors showed data on functional classification of the excipients. Potential adverse effects were analysed, including sucrose nephropathy when using intravenous immunoglobulin preparations containing sucrose; hypoglycaemia; changes in amino acid metabolism; decreased DNA and RNA synthesis, and inhibition of platelet function caused by elevated sodium caprylate in albumin preparations. Analysed methods are based on excipient degradation. Possible solutions have been described (reduction or replacement with another excipient, such as sodium caprylate excluded from the BPs of many manufacturers). Innovative search approaches were used for new adjuvants (MF59, AS01, AS03, AS04, and RC-529) combining immune response inducers and delivery systems. The described mathematical model was used to select excipient composition. The authors analysed literature covering analytical methods for excipient quantitation, including liquid and gas-liquid chromatography and spectrophotometric quantitation methods of the most significant excipients in BPs (amino acids, polysorbates, phenol, phenoxyethanol, benzyl alcohol, and sodium caprylate). Prospects of different analytical techniques were considered (size-exclusion HPLC for evaluation of polysorbate 80, HILIC HPLC for selective quantitation of amino acid components, hydrophilic HPLC with refractometric detection and ion-exchange HPLC with amperometric detection for selective

quantitation of carbohydrate stabilisers (sorbitol, mannitol, trehalose, glucose, lactose, sucrose, maltose), as well as gas-liquid chromatography for 2-phenoxyethanol and m-cresol.

CONCLUSIONS. Selecting BP excipients is a complex task that requires a control strategy not only for established concentrations, but also for products of possible degradation. Developing unified analytical methods for excipient quantitation is a priority for quality assurance of BPs authorised and launched into the commercial market.

Keywords: excipients; biological products; functional classification; stability; degradation; high performance liquid chromatography; HPLC; preservatives; stabilisers; adjuvants; quality control

For citation: Minero A.S., Rounova O.B., Shcherbachenko I.M., Ustinnikova O.B. Excipients in biological medicinal products: Functional classification, stability issues, and analytical quantitation approaches. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):307–320. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-307-320>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

На рубеже 2000-х гг. произошли значительные изменения в подходах к изучению вспомогательных веществ (ВВ) лекарственных препаратов. В настоящее время исследование их влияния на безопасность и эффективность препаратов представляет собой самостоятельное направление фармацевтической науки [1].

ВВ являются критически важным компонентом лекарственных препаратов, обеспечивающим их механические, физико-химические и биофармацевтические характеристики. Особое значение их состав и концентрация приобретают в биологических лекарственных препаратах (БЛП), где сложная и лабильная природа действующего вещества (белки, нуклеиновые кислоты и др.) обуславливает высокую чувствительность к составу ВВ. Эти вещества играют ключевую роль в поддержании стабильности препаратов, предотвращая агрегацию, сорбцию на поверхности первичной упаковки, окисление и другие пути деградации, что в конечном итоге определяет терапевтическую эффективность и безопасность БЛП.

Актуальность исследования определяется острой необходимостью разработки надежных подходов к количественной оценке ВВ в БЛП. Основная сложность заключается в количественном определении ВВ в составе готовой лекарственной формы БЛП с учетом широкой номенклатуры ВВ, включающей стабилизаторы, буферные системы, поверхностно-активные вещества (ПАВ), антиоксиданты, антимикробные консерванты, регуляторы кислотности, что требует разработки высокочувствительных и селективных методик для каждого химического класса веществ [2]. Существенные трудности создает

отсутствие унифицированных валидированных методик, а также матричные эффекты, обусловленные присутствием высокомолекулярного действующего вещества, других ВВ и продуктов деградации. Эти факторы значительно осложняют оценку качества БЛП при проведении лабораторной фармацевтической экспертизы в процессе регистрации и подтверждения качества при вводе препаратов в гражданский оборот.

Цель работы — анализ современных методов количественного определения вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах и оценка перспектив их применения для совершенствования лабораторной экспертизы при регистрации и подтверждения соответствия качества препаратов при вводе в гражданский оборот.

Поиск информации проводили с использованием баз данных SciFinder, PubMed, eLIBRARY.RU по ключевым словам на русском и английском языках: «вспомогательные вещества», «биологические лекарственные препараты», «стабилизаторы», «белки», «аминокислоты», «поверхностно-активные вещества», «солюбилизаторы», «лиофилизация», «фармакопея», «ВЭЖХ», «excipients», «biological products», «stabilizers», «proteins», «amino acids», «surfactants», «solubilizer», «lyophilisation», «pharmacopoeia», «HPLC» и др. Были проанализированы обзорные, оригинальные статьи, а также патенты, опубликованные в период с 2014 по 2024 гг.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Классификация вспомогательных веществ

В настоящее время в Российской Федерации и за рубежом придерживаются функциональной классификации ВВ¹, учитывающей различные

¹ United States Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF). USP and NF excipients, listed by functional category. USP; 2025.

функциональные роли одного и того же вещества. В зависимости от основной функции ВВ разделяют на более чем 40 функциональных классов. Установлено, что вариабельность состава ВВ в пределах одного функционального класса может существенно влиять на эффективность и профиль безопасности лекарственных средств даже в случае одинакового действующего вещества [3].

Список ВВ представлен в базах данных различных стран. В США Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) публикует справочник вспомогательных (неактивных) веществ² (Inactive Ingredient Database, IID). Японский совет по фармацевтическим ВВ (Japan Pharmaceutical Excipients Council) систематизирует данные о ВВ, способах их применения и влияния на пациентов, публикуя словарь фармацевтических ВВ (Japanese Pharmaceutical Excipients Directory, JPED). В странах Евразийского экономического союза применяется классификатор ВВ, используемых при производстве лекарственных средств³.

Свойства ВВ и требования к ним, включая физические характеристики, подлинность, химическую и микробиологическую чистоту, регламентированы в отдельных монографиях Европейской фармакопеи, а также в общей монографии Substances for pharmaceutical use⁴. В 2024 г. в Европейскую фармакопею включена монография Functionality-related characteristics of excipients⁵, имеющая рекомендательный статус, согласно которой информация о новых ВВ, помимо указания их функциональных характеристик, может содержать сведения о рекомендуемых методиках определения и установленном диапазоне количественного содержания.

В соответствии с руководством Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) Guideline on the chemistry of active substances⁶ для новых ВВ рекомендуется предоставить подробное описание процесса производства и очистки, физических и химических свойств, валидированные аналитические методики по оценке

подлинности, количественного определения, посторонних примесей, остаточных растворителей, данные по контролю стабильности⁷ и исследованиям безопасности и иммуногенности.

Функциональная роль вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах

Роль вспомогательных компонентов в БЛП, представляющих собой преимущественно растворы или лиофилизаты веществ белковой и/или полисахаридной природы, сводится к выполнению нескольких критически важных функций, баланс которых обеспечивает оптимальный профиль эффективности и безопасности готового продукта: 1) поддержание физико-химической стабильности действующего вещества; 2) модуляция иммуногенных свойств; 3) предотвращение микробной контаминации. Следует отметить, что роль конкретного ВВ редко ограничивается единственной функцией. Как правило, наблюдается комплексное воздействие как на действующее вещество, так и на его молекулярное окружение. При этом особую значимость приобретает вопрос стабильности белковых молекул. В естественных условиях белки сохраняют свою нативную структуру и функциональную активность благодаря сложному микроокружению, однако при выделении и помещении в буферные растворы они часто теряют стабильность. Понятие белковой стабильности включает несколько аспектов: 1) сохранение биологической активности; 2) устойчивость к различным видам денатурации (конформационные изменения, процессы агрегации и полимеризации, окислительная модификация, дезамидирование и др.).

Наиболее распространенные ВВ в БЛП, отнесенные по основному типу действия к определенным функциональным категориям⁸ (табл. 1), могут проявлять в составе конкретного БЛП дополнительные свойства.

Действие стабилизаторов, представленных в таблице 1, направлено преимущественно на предотвращение агрегации и денатурации белковых молекул, а также на сохранение их

² www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm

³ Евразийская экономическая комиссия. Классификатор вспомогательных веществ. <https://portal.eaeunion.org/sites/odata/layouts/15/portal.eec.registry.ui/directoryform.aspx?viewid=c930669b-d628-42e4-999a-06adf5c3609e&listid=0e3ead06-5475-466a-a340-6f69c01b5687&itemid=352#>

⁴ 07/2025:2034 Substances for pharmaceutical use. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2008.

⁵ 07/2024:51500 Functionality-related characteristics of excipients (FRC). European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2008.

⁶ Guideline on the chemistry of active substances (EMA/321776/2024). EMA; 2024.

⁷ Guideline on excipients in the dossier for application for marketing authorisation of a medicinal product. (EMA/CHMP/QWP/396951/2006). EMA; 2008.

Guidance for Industry. Nonclinical studies for the safety evaluation of pharmaceutical excipients. FDA; 2005.

⁸ United States Pharmacopoeia and National Formulary (USP-NF). USP and NF excipients, listed by functional category. USP; 2025.

Таблица 1. Основные вспомогательные вещества, входящие в состав биологических лекарственных препаратов
Table 1. Typical excipients found in biological medicinal products

Функциональная категория <i>Functional category</i>	Наименование вспомогательного вещества <i>Name of excipient</i>
Буферные вещества <i>Buffering agents</i>	Натрия фосфат, калия фосфат, натрия сукцинат, натрия цитрат, натрия ацетат, гистидин, аланин, аргинин, лизин, лимонная кислота, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота <i>Sodium phosphate, potassium phosphate, sodium succinate, sodium citrate, sodium acetate, histidine, alanine, arginine, lysine, citric acid, aspartic acid, glutamic acid</i>
Поверхностно-активные вещества <i>Surfactants</i>	Полисорбат 80, полисорбат 20, поллоксамер 188, пальмитиновая кислота, натрия лаурил сульфат <i>Polysorbate 80, polysorbate 20, poloxamer 188, palmitic acid, sodium lauryl sulfate</i>
Крио- и лиопротекторы <i>Cryo- and lyoprotectors</i>	Сахароза, декстран 40, глицин, лактоза, маннит, трегалоза <i>Sucrose, dextran 40, glycine, lactose, mannitol, trehalose</i>
Изотонирующие агенты <i>Tonicity agents</i>	Декстроза, гуанидина гидрохлорид, магния хлорид, мальтоза, глюкоза, калия хлорид, натрия хлорид, сорбит, глицерин <i>Dextrose, guanidine hydrochloride, magnesium chloride, maltose, glucose, potassium chloride, sodium chloride, sorbite, glycerin</i>
Регуляторы pH <i>pH regulators</i>	Фосфорная кислота, натрия гидроксид, натрия бикарбонат, натрия карбонат <i>Phosphoric acid, sodium hydroxide, sodium bicarbonate, sodium carbonate</i>
Антимикробные консерванты <i>Antimicrobial preservatives</i>	Фенол, тиомерсал, бензиловый спирт, кальция хлорид, метакрезол, метилпарабен, пропилпарабен <i>Phenol, thimerosal, benzyl alcohol, calcium chloride, metacresol, methylparaben, propylparaben</i>
Стабилизаторы <i>Stabilisers</i>	Натрия каприлат, каприловая кислота, альбумин человека, протамин сульфат, цинк, глицин, аргинин, пролин, лизин, N-ацетил-DL-триптофан <i>Sodium caprylate, caprylic acid, human albumin, protamine sulfate, zinc, glycine, arginine, proline, lysine, N-acetyl-DL-tryptophan</i>
Солюбилизаторы <i>Solubilisers</i>	Полиэтиленгликоль 3350, полиэтиленгликоль 6000 <i>Polyethylene glycol 3350, polyethylene glycol 6000</i>
Антиоксиданты <i>Antioxidants</i>	Метионин, никотинамид <i>Methionine, nicotinamide</i>

Таблица составлена авторами с использованием данных USP⁹ и источников [9, 10] / The table is prepared by the authors using USP⁹ data and sources [9, 10]

нативной структуры. Для стабилизации белковых молекул в готовом БЛП, как правило, применяют композиции из нескольких ВВ. Так, например, крио- и лиопротекторы, изотонирующие агенты, а также антиоксиданты проявляют стабилизирующие свойства в отношении белковых растворов благодаря синергетическому эффекту совместимых растворенных компонентов в составе различных композиций [4, 5]. Данный эффект позволяет рассматривать композиции аминокислот, сахаров и/или полиолов в качестве альтернативы высокомолекулярному стабилизатору — человеческому сывороточному альбумину. Известно свойство аргинина стабилизировать белковые молекулы, подавляя их агрегацию в результате взаимодействия с боковыми цепями аминокислотных остатков [6]. Кроме того, аргинин влияет на температуру стеклования, изменяя кинетическую стабильности молекулы белка [7, 8].

ВВ углеводной природы, кроме перечисленных в таблице 1 функций, применяются

в качестве разбавителей и наполнителей, обеспечивающих необходимые физико-химические свойства, такие как твердость и распадаемость (например, маннит и сорбит) [11, 12]. Маннит и сорбит применяются в качестве наполнителей в основном для лиофилизированных форм моноклональных антител и вакцин, а также таблетированной лекарственной формы препаратов аллергенов. Лактоза используется в составе вакцин; мальтоза — в препаратах иммуноглобулина человека нормального, а также в составе некоторых генно-инженерных иммуносупрессивных препаратов. Сахароза входит в состав препаратов факторов свертываемости крови, моноклональных антител, пегилированных интерферонов, соматотропинов, иммунодепрессивных препаратов. Глюкоза присутствует в некоторых препаратах иммуноглобулина человека нормального, а трегалоза — в отдельных генно-инженерных препаратах. Перечисленные соединения могут присутствовать в БЛП в различных композициях.

⁹ United States Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF). USP and NF excipients, listed by functional category. USP; 2025.

Содержание углеводов соединений в готовых лекарственных формах варьирует в широком диапазоне, что определяется типом препарата и его дозировкой. Например, в препарате иммуносупрессивного моноклонального антитела базиликсимаба содержание сахарозы и маннита составляет 20 и 80 мг/флакон соответственно, тогда как действующего вещества — 20 мг/флакон. В другом иммуносупрессивном препарате белатацепте содержание сахарозы достигает 550 мг/флакон, а действующего вещества — 275 мг/флакон¹⁰. Следует отметить, что описанный ранее риск развития сахарозной нефропатии при применении внутривенных препаратов иммуноглобулина стимулировал поиск альтернативных стабилизаторов с крио- и лиопротекторными свойствами. Их использование в композиции позволило исключить или снизить содержание сахарозы в лиофилизированных формах [13, 14]. Добавление кристаллического маннита в рецептуры, содержащие сахарозу, уменьшает время восстановления лиофилизированных препаратов терапевтических белков, что, возможно, обусловлено изменением структуры лиофилизата — она приобретает частично кристаллическое состояние [15].

К числу значимых достижений последних лет относятся данные ЯМР-спектроскопии, демонстрирующие влияние модификаторов — глицерина, сорбита и глюкозы — на сокращение длины водородных связей в основной цепи белка [16]. Несмотря на незначительность изменений водородной связи, следует учитывать воздействие осмолитов на структуру белков и потенциально связанных с ней функций молекулы.

Несмотря на многолетнюю тенденцию к отказу от использования консервантов в БЛП, их применение в ряде случаев остается необходимым¹¹. Консерванты требуются в препаратах многодозовых форм выпуска, а также в препаратах, для которых проведение стерилизующей фильтрации невозможно и/или обнаружение контаминации затруднено из-за непрозрачности растворов и др. Наличие в составе БЛП сахаров и аминокислот также является фактором, повышающим риск роста микроорганизмов [17].

В качестве консервантов для большинства отечественных вакцин и анатоксинов традиционно используют тиомерсал в концентрации

от 30 до 120 мкг/мл, а также фенол для препаратов аллергенов и некоторых вакцин (например, полисахаридных) в концентрации от 1,5 до 4,0 мг/мл. Согласно данным L. Stroppel с соавт. [18], зарубежные производители чаще применяют (в порядке убывания частоты использования): м-крезол, бензиловый спирт, бензалкония хлорид, хлорбутанол, метилпарабен и 2-феноксэтанол. Авторы считают перспективным направлением использование в качестве альтернативных консервантов алкилгликозидов, демонстрирующих высокую антимикробную активность.

Бензиловый спирт сочетает свойства консерванта и стабилизатора. В производстве БЛП это соединение не имеет широкого применения и содержится лишь в отдельных препаратах (например, интерферон альфа-2а и его пегилированная форма) в концентрациях 9,0–11,0 мг/мл, что соответствует требованиям ВОЗ (допустимая суточная доза до 20 мг/кг при парентеральном применении)¹². В исследованиях показано влияние бензинового спирта на искажение результатов оценки аномальной токсичности, что поддерживает аргументацию в пользу отмены данного теста [19].

Важно отметить, что консерванты влияют на агрегацию белковых молекул. В ряде исследований показано дозозависимое дестабилизирующее действие фенола, 2-феноксэтанол, м-крезола и бензинового спирта [20–23].

Для исследования механизмов стабилизации белковых молекул различными ВВ в настоящее время широко применяют математические модели, в частности эмпирические фазовые диаграммы. Примером такого подхода является изучение агрегации рекомбинантного антигена возбудителя сибирской язвы, проведенное с помощью построения фазовой диаграммы изменения pH и температуры при определении мутности раствора методом флуоресцентного анализа для различных ВВ (трегалоза, сорбит, маннит, декстроза, натрия цитрат) [24]. Данный подход позволяет быстро и эффективно проводить скрининг ВВ [25–27].

Необходимость использования консервантов для многодозовых форм стимулировала поиск сорастворителей, уменьшающих нежелательный эффект консервантов. Было установлено,

¹⁰ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>

¹¹ ОФС.1.7.1.0001.15 Аллергены. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

Points to consider on the reduction, elimination or substitution of thiomersal in vaccines (CPMP/BWP/ 2517/00). EMA; 2001. Thimerosal and Vaccines. FDA; 2018

¹² <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/364703/9789240054646-eng.pdf?sequence=1>

что триметиламин-N-оксид эффективно подавляет агрегацию IgG, вызванную бензиловым спиртом [28]. В отдельных исследованиях показано дестабилизирующее действие м-крезола на вирусоподобные частицы на основе белков вируса папилломы человека, адсорбированные на геле гидроксида алюминия [29].

Аспекты безопасности вспомогательных веществ

Изучение механизма действия стабилизаторов белковых молекул и данные об их побочных эффектах послужили основанием для пересмотра традиционных составов некоторых БЛП с длительной практикой клинического применения. Так, для обеспечения температурной стабильности препаратов альбумина при пастеризации ранее традиционно использовали натрия каприлат (натриевая соль октановой кислоты) [30]. Однако исследования показали, что присутствие в препарате натрия каприлата в значительных концентрациях способно вызывать гипогликемию, изменение метаболизма аминокислот, снижение синтеза ДНК и РНК, угнетение функциональной активности тромбоцитов и др. [31, 32]. В связи с этим большинство зарубежных и часть отечественных производителей изменили состав препаратов альбумина, сократив содержание натрия каприлата и включив натриевую соль N-ацетил-DL-триптофана [33].

Важным аспектом оценки безопасности использования ВВ является изучение продуктов их деградации. Некоторые ВВ подвержены деградации при нарушении условий хранения. При этом образующиеся примеси, как правило, остаются вне зоны контроля, что может влиять на стабильность БЛП. Примером служат полисорбаты (полисорбат 80 и полисорбат 20) — широко применяемые неионогенные поверхностно-активные соединения благодаря способности снижать адсорбцию и самоассоциацию белковых молекул путем взаимодействия с их гидрофобными частями и конкурентной адсорбции [34]. Полисорбаты также способны эффективно инактивировать оболочечные вирусы, например, ксенотропный вирус лейкемии мышей и вирус псевдобешенства [31, 35]. Однако молекулы полисорбата могут подвергаться гидролизу и/или химическому распаду с образованием нежелательных продуктов деградации: эфиры жирных кислот, сорбитаны, изосорбиды, альдегиды, кетоны, кислоты, пероксиды, алканы и др. [36, 37]. Известны варианты ферментативного гидролиза сложноэфирной связи полисорбата липопротеинлипазами,

присутствующими в качестве технологической примеси среди остаточных белков клеточной линии CHO [38, 39].

Исследования показали, что при неправильном хранении глицерин может окисляться до соответствующих карбонильных соединений, образование которых было подтверждено методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [40]. Результаты стресс-тестов продемонстрировали снижение содержания терапевтического белка в БЛП, содержащих глицерин: 66,4% в составах с деградированным глицерином по сравнению с 95,8% в других составах после стресс-теста. Таким образом, можно сделать вывод о необходимости не только количественной оценки, но и анализа возможных структурных изменений ВВ при хранении, изучении стабильности в реальных или ускоренных условиях.

Современные подходы к применению вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах

Для усиления иммуногенности вакцинных препаратов традиционно используются адъюванты. На смену производным алюминия, доказавшим свою эффективность в составе вакцин (аттенуированные, инактивированные вирусные вакцины, конъюгированные полисахаридные вакцины и др.), приходят новые поколения адъювантов: AS04, содержащий адсорбированный MPL (3-O-дезацил-4'-монофосфорил липид A — детоксифицированный липополисахарид *Salmonella minnesota*), и RC-529, содержащий адсорбированный синтетический лиганд TLR4 (толл-подобный рецептор 4) [41, 42].

Особый интерес представляют адъюванты на основе водно-масляных эмульсий, состоящие, в отличие от масляных адъювантов первого поколения, из метаболизируемых масел: MF59 (скален, полисорбат 80, сорбитан триолеат) [43], AS01 (комбинация MPL и сапонины) [44], AS03 (скален, α -токоферол, полисорбат 80) [45, 46].

В Российской Федерации разрешены к применению иммуномодулятор-адъювант полиоксидоний (сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбокси)-1,4-этиленпиперазиния бромид) и адъювант совидон (сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона), которые входят в состав отечественных гриппозных вакцин; зарегистрированы вакцина и мультивакцина для профилактики коронавирусной инфекции, содержащие адъювант на основе скалена,

и вакцина против вируса ветряной оспы, содержащая MPL¹³ [47, 48].

Современные тенденции в разработке БЛП связаны с созданием новых систем доставки. Разработка инновационных генотерапевтических ДНК- и РНК-содержащих препаратов основана на применении аденовирусных векторов или аденовирусных капсидов [49–51]. Для доставки мРНК применяют катионную наноземлю на основе MF59 и AS03, в которой для инкапсуляции мРНК использован катионный липид – 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP) [52].

Приведенные подходы демонстрируют важность подбора ВВ как части сбалансированной системы, в которой изменение состава (замена компонентов, изменение концентрации) может нарушить баланс и привести к снижению эффективности и безопасности БЛП.

Аналитические подходы к оценке вспомогательных веществ

В настоящее время для количественной оценки ВВ наиболее информативными, высокоселективными и относительно доступными являются хроматографические методы анализа. Данные методы обладают существенными преимуществами перед традиционными методами количественного химического анализа, такими как спектрофотометрия, колориметрия, титриметрия и др., что обуславливает их широкое применение. Следует отметить, что для ряда ВВ отсутствуют фармакопейные методики количественного определения, что требует разработки производителями так называемых «методик фирм» (in-house methods).

Хроматографическое определение полисорбата 80 осуществляется главным образом путем анализа продукта гидролиза – олеиновой кислоты. Для этого применяют метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) [53–56] или газовой хроматографии (ГХ) [57] с использованием следующих типов детекторов: ультрафиолетового детектора, детектора заряженного аэрозоля, детектора по светорассеянию, масс-спектрометрического детектора. Содержание олеиновой кислоты в полисорбате 80 разных производителей существенно варьирует – от 40 до 98%. Это ограничивает применимость данного метода в качестве основного способа количественного определения полисорбата 80 в составе большинства лекарственных средств, поскольку требуется использование полисорбата 80

именно той марки и партии, которая применялась при производстве серии препарата. Существуют другие подходы, основанные на анализе нативного полисорбата 80 путем его отделения от белков методами ОФ-ВЭЖХ в градиентном режиме или эксклюзионной ВЭЖХ на различных типах сорбентов [58–63].

Спектрофотометрические методы определения полисорбата 80, основанные на формировании комплекса полисорбата с солями кобальта [64–67], имеют ограниченное применение вследствие сложной пробоподготовки, относительно низкой воспроизводимости и недостаточной информативности результатов, поскольку не позволяют выявлять продукты деградации.

Определение аминокислот в составе БЛП продолжает оставаться сложной задачей. Это связано с высокой трудоемкостью методик, требующих проведения многоступенчатой пробоподготовки, включающей этапы элиминации высокомолекулярных компонентов, химической модификации аминокислот, разделения смеси и последующей идентификации.

Анализ аминокислот проводится с помощью различных хроматографических методов: ионообменная ВЭЖХ [68], ОФ-ВЭЖХ [69–72], ГХ [73]. Эти методы включают стадию химической модификации аминокислот различными реагентами, такими, как о-фталдальдегид – для первичных аминокислот, фенилизотиоцианат – для вторичных аминокислот, 6-аминохинолин-N-гидроксисукцинимидил карбамат – для обоих типов аминокислот и для цистеина. Для регистрации результатов обычно применяют ультрафиолетовый или флуоресцентный детектор. В последние годы широко внедряются масс-спектрометрические (МС) методы детекции, обладающие более высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью по сравнению с традиционными методами [74].

В работе Н. Kaspar с соавт. [75] было проведено сравнение трех основных методов анализа аминокислот: ГХ-МС, ВЭЖХ-МС и метода с использованием аминокислотного анализатора. Оценивались следующие характеристики: стадия депротенизации, объем пробы, время выполнения анализа, стоимость одного анализа и предел количественного определения. Хроматографические методы продемонстрировали преимущества по времени анализа и количеству израсходованного образца. К особенностям метода ГХ-МС относится меньшая стоимость анализа, высокая производительность и отсутствие необходимости предварительного осаждения белка.

¹³ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>

Для определения фенола используют колориметрический метод, основанный на образовании соединений фенола с 4-аминоантипирином в присутствии феррицианида калия¹⁴, а также метод броматометрического титрования¹⁵. Определение 2-феноксизанола проводят с помощью газовой хроматографии¹⁶. Для определения бензилового спирта применяют ОФ-ВЭЖХ с детекцией в ближней ультрафиолетовой области [76, 77].

Методика количественного определения натрия каприлата в препаратах человеческого альбумина методом ГХ с использованием гептановой кислоты в качестве внутреннего стандарта была разработана в 1980-х гг. [78]. Позднее был предложен упрощенный и быстрый метод определения содержания натрия каприлата с применением ОФ-ВЭЖХ и детектированием в УФ-области [79]. Для повышения чувствительности методики содержание натрия каприлата оценивали по его основному продукту — октановой кислоте после ее предварительной дериватизации омега-бромацетофеноном и 18-краун-6 с последующим анализом методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Nova-Pak C18 [80].

Еще один подход к определению содержания натрия каприлата и каприловой кислоты предложен в работе M. Athavale с соавт. [81], где использовали спектрофотометрический метод с коммерческим набором реагентов для анализа свободных жирных кислот (non-esterified fatty acids, NEFA). Показано, что чувствительность метода составила для каприловой кислоты 7,21 мкг/мл, для натрия каприлата — 8,31 мкг/мл.

Наиболее распространенными методами количественного определения стабилизаторов углеводной природы являются титриметрический и спектрофотометрический. Эти методы применимы для восстанавливающих углеводов, таких как глюкоза, мальтоза и лактоза. В молекулах данных сахаридов присутствует гликозидная гидроксильная группа, вступающая в реакции с окислителями с образованием окрашенных комплексов. Разновидностью спектрофотометрического метода является ферментативный способ, который применим как к восстанавливающим, так и к невосстанавливающим сахаридам. Кроме того, для количественной оценки стабилизаторов углеводной природы производители БЛП применяют поляриметрический и рефрактометрический методы.

Особенности строения углеводов, такие как отсутствие хромофорных групп и наличие многочисленных гидроксильных групп, обуславливают выбор основных методов их хроматографического определения: ион-эксклюзионная ВЭЖХ с применением в качестве неподвижной фазы сульфированного полистирола и дивинилбензола в водородной форме или в форме ионов различных металлов; гидрофильная ВЭЖХ с использованием неподвижных фаз на основе полярных полимеров или химически модифицированного силикагеля. Сахариды характеризуются высокими значениями pK_a и в щелочных условиях способны ионизироваться, что делает возможным их анализ методом ионообменной ВЭЖХ.

Применение новых ВВ требует разработки новых аналитических подходов для их идентификации и количественного определения. Так, описана методика ВЭЖХ с детектором заряженного аэрозоля (HPLC-CAD), предназначенная для идентификации и определения липидных компонентов в инкапсулированных мРНК-вакцинах против COVID-19 [82]. Разнообразие методических решений усложняет процедуру контроля качества БЛП в ходе лабораторной фармацевтической экспертизы и подтверждения качества. Эти сложности связаны с необходимостью широкого технического оснащения испытательной лаборатории и интеграции максимально возможного количества функциональных модулей оборудования.

С целью оптимизации процесса оценки качества БЛП по ряду наиболее востребованных ВВ авторами ранее были разработаны следующие унифицированные методики:

- для оценки полисорбата 80 разработана методика, основанная на методе эксклюзионной ВЭЖХ, позволяющая косвенно оценивать нежелательную деградацию молекулы полисорбата 80 [83, 84];
- для селективного количественного определения аминокислот в составе их композиции (метионин, глицин, лизин, пролин, гистидин, аргинин) предложена методика на основе жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) с использованием доступного для большинства производителей метода ВЭЖХ с УФ-детектированием [85–87];
- для селективного количественного определения стабилизаторов углеводной природы

¹⁴ 01/2008:20515. Phenol in immunosera and vaccines. European Pharmacopeia. 7th ed.; 2018.

¹⁵ Phenol. United States Pharmacopeia. USP41–NF36; 2018.

¹⁶ Phenoxyethanol. United States Pharmacopeia. USP43–NF38: 2020.

07/2016:0781. Phenoxyethanol. European Pharmacopeia. 9th ed.; 2016.

в составе композиций (сорбит, маннит, трегалоза, глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза) разработаны методика гидрофильной ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием и методика ионообменной ВЭЖХ с импульсным амперометрическим детектированием [88–90];

- на основе метода газожидкостной хроматографии разработана методика определения фенола, которая также может быть рассмотрена для оценки 2-феноксиэтанола и м-крезола [91, 92].

Данные методики апробированы на широком спектре БЛП и могут быть верифицированы производителями с целью использования на любых стадиях жизненного цикла БЛП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ позволил систематизировать данные о функциональной классификации ВВ, используемых в БЛП, определить вещества, наиболее часто применяемые в рецептурах БЛП, и установить их влияние на фармакологические свойства действующих веществ. Результаты исследования показали, что вариативность состава ВВ в пределах одного функционального класса может существенно влиять на эффективность и профиль безопасности лекарственных средств, даже в случае одинакового действующего вещества.

В работе рассмотрены данные о потенциальном нежелательном действии ВВ, включая риск сахарозной нефропатии при применении внутривенных препаратов иммуноглобулинов, содержащих сахарозу; гипогликемию, изменение метаболизма аминокислот, снижение синтеза нуклеиновых кислот и угнетение функциональной активности тромбоцитов вследствие

высокой концентрации натрия каприлата в препаратах альбумина. Важным аспектом оценки безопасности использования ВВ является изучение продуктов их деградации.

В исследовании проанализированы современные подходы к выбору ВВ. Рассмотрены инновационные подходы к поиску новых адъювантов, совмещающих функции индукторов иммунного ответа и систем доставки. Представлены данные об использовании математического моделирования при выборе состава композиции ВВ.

Особое внимание уделено современным аналитическим методам количественного определения ВВ. Освещены унифицированные аналитические методики, разработанные авторами с целью оптимизации процесса оценки качества БЛП по ряду наиболее востребованных ВВ, предназначенные для количественного определения полисорбата 80, аминокислот (метионин, глицин, лизин, пролин, гистидин, аргинин), консервантов (фенол, 2-феноксиэтанол, м-крезол), стабилизаторов углеводной природы (сорбит, маннит, трегалоза, глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза).

Выбор ВВ для БЛП представляет собой комплексную задачу и должен предусматривать контроль не только самих вспомогательных компонентов в соответствии с установленными нормами, но и продуктов их возможной деградации и/или образования новых соединений, а также учитывать возможные побочные эффекты. Перспективным направлением дальнейших исследований является разработка унифицированных методик для количественной оценки отдельных групп ВВ и их примесей, что позволит существенно повысить качество и безопасность БЛП на этапах их разработки, регистрационной экспертизы и ввода в гражданский оборот.

Литература/References

1. Abrantes CG, Duarte D, Reis CP. An overview of pharmaceutical excipients: Safe or not safe? *J Pharm Sci.* 2016;105(7):2019–26. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.019>
2. Makkad S, Sheikh M, Shende S, Jirvankar P. Pharmaceutical excipients: Functions, selection criteria, and emerging trends. *Int J Pharm Investig.* 2025;15(2):361–76. <https://doi.org/10.5530/ijpi.20251676>
3. Тенцова АИ, Терешкина ОИ, Рудакова ИП и др. Современные биофармацевтические аспекты вспомогательных веществ. *Фармация.* 2012;(7):3–6. Tentsova AI, Tereshkina OI, Rudakova IP, Samylina IA, Guskova TA, et al. Current biopharmaceutical aspects of excipients. *Pharmacy.* 2012;(7):3–6 (In Russ.). EDN: PEWXXK
4. Jena S, Krishna Kumar NS, Aksan A, Suryanarayanan R. Stability of lyophilized albumin formulations: Role of excipient crystallinity and molecular mobility. *Int J Pharm.* 2019;569:118568. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118568>
5. Thakral S, Sonje J, Munjal B, et al. Mannitol as an excipient for lyophilized injectable formulations. *J Pharm Sci.* 2023;112(1):19–35. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.08.029>
6. Arakawa T, Tsumoto K, Kita Y, et al. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino Acids.* 2007;33(4):587–605. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0506-3>
7. Stärtzel P. Arginine as an excipient for protein freeze – Drying: A mini review. *J Pharm Sci.* 2018;107(4):960–7. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.11.015>
8. Hackl E, Darkwah J, Smith G, Ermolina I. Effect of arginine on the aggregation of protein in freeze-dried formulations containing sugars and polyol: II. BSA reconstitution and aggregation. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(7):2934–47. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1114-0>

9. Ionova Y, Wilson L. Biologic excipients: Importance of clinical awareness of inactive ingredients. *PLoS One*. 2020;15(6):e0235076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235076>
10. Rao VA, Kim JJ, Patel DS, et al. A comprehensive scientific survey of excipients used in currently marketed, therapeutic biological drug products. *Pharm Res*. 2020;37(10):200. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02919-4>
11. Megarry A, Taylor A, Gholami A, et al. Twin-screw granulation and high-shear granulation: The influence of mannitol grade on granule and tablet properties. *Int J Pharm*. 2020;590:119890. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119890>
12. Liu J, Klinzing GR, Nie H. Effect of material properties and variability of mannitol on tablet formulation development. *Pharm Res*. 2023;40(8):2071–85. <https://doi.org/10.1007/s11095-023-03577-y>
13. Chapman SA, Gilkerson KL, Davin TD, Pritzker MR. Acute renal failure and intravenous immune globulin: occurs with sucrose-stabilized, but not with D-sorbitol-stabilized, formulation. *Ann Pharmacother*. 2004;38(12):2059–67. <https://doi.org/10.1345/aph.1E040>
14. Zhang R, Szerlip HM. Reemergence of sucrose nephropathy: acute renal failure caused by high-dose intravenous immune globulin therapy. *South Med J*. 2000;93(9):901–4.
15. Kulkarni SS, Suryanarayanan R, Rinella JV Jr, Bogner RH. Mechanisms by which crystalline mannitol improves the reconstitution time of high concentration lyophilized protein formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;131:70–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.022>
16. Li J, Chen J, An L, et al. Polyol and sugar osmolytes can shorten protein hydrogen bonds to modulate function. *Commun Biol*. 2020;3:528. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01260-1>
17. Fraiese AP, Maillard JY, Sattar SA, eds. Russell, Hugo & Ayliffe's: *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 5th ed. Chichester: Wiley–Blackwell; 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118425831>
18. Stroppel L, Schultz-Fademrecht T, Cebulla M, et al. Antimicrobial preservatives for protein and peptide formulations: An overview. *Pharmaceutics*. 2023;15(2):563. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020563>
19. Xie J, Ottaviani G, Sun K, et al. Potential confounding effects of benzyl alcohol as a formulation excipient support the elimination of the abnormal toxicity test from pharmacopoeias. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015;73(2):509–14. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.033>
20. Bis RL, Singh SM, Cabello-Villegas J, Mallela KMG. Role of benzyl alcohol in the unfolding and aggregation of interferon α -2a. *J Pharm Sci*. 2014;104(2):407–15. <https://doi.org/10.1002/jps.24105>
21. Zhang Y, Roy S, Jones LS, et al. Mechanism for benzyl alcohol-induced aggregation of recombinant human interleukin-1-receptor antagonist in aqueous solution. *J Pharm Sci*. 2004;93(12):3076–89. <https://doi.org/10.1002/jps.2019>
22. Bis RL, Mallela KM. Antimicrobial preservatives induce aggregation of interferon α -2a: The order in which preservatives induce protein aggregation is independent of the protein. *Int J Pharm*. 2014;472(1–2):356–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.044>
23. Arora J, Joshi SB, Middaugh CR, et al. Correlating the effects of antimicrobial preservatives on conformational stability, aggregation propensity, and backbone flexibility of an IgG1 mAb. *J Pharm Sci*. 2017;106(6):1508–18. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.02.007>
24. Jiang G, Joshi SB, Peek LJ, et al. Anthrax vaccine powder formulations for nasal mucosal delivery. *J Pharm Sci*. 2006;95(1):80–96. <https://doi.org/10.1002/jps.20484>
25. Alsenaidy MA, Kim JH, Majumdar R, et al. High-throughput biophysical analysis and data visualization of conformational stability of an IgG1 monoclonal antibody after deglycosylation. *J Pharm Sci*. 2013;102(11):3942–56. <https://doi.org/10.1002/jps.23730>
26. Telikepalli SN, Kumru OS, Kalonia C, et al. Structural characterization of IgG1 mAb aggregates and particles generated under various stress conditions. *J Pharm Sci*. 2014;103(3):796–809. <https://doi.org/10.1002/jps.23839>
27. Goldberg DS, Lewus RA, Esfandiary R, et al. Utility of high throughput screening techniques to predict stability of monoclonal antibody formulations during early stage development. *J Pharm Sci*. 2017;106(8):1971–7. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.039>
28. Yoshizawa S, Oki S, Arakawa T, Shiraki K. Trimethylamine N-oxide (TMAO) is a counteracting solute of benzyl alcohol for multi-dose formulation of immunoglobulin. *Int J Biol Macromol*. 2018;107(Pt A):984–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.072>
29. Caringal RT, Hickey JM, Sharma N, et al. A combined LC-MS and immunoassay approach to characterize preservative-induced destabilization of human papillomavirus virus-like particles adsorbed to an aluminum-salt adjuvant. *Vaccines (Basel)*. 2024;12(6):580. <https://doi.org/10.3390/vaccines12060580>
30. Johnston A, Uren E, Johnstone D, Wu J. Low pH, caprylate incubation as a second viral inactivation step in the manufacture of albumin. Parametric and validation studies. *Biologicals*. 2003;31(3):213–21. [https://doi.org/10.1016/s1045-1056\(03\)00062-9](https://doi.org/10.1016/s1045-1056(03)00062-9)
31. Ohbo M, Katoh K, Sasaki Y. Effects of saturated fatty acids on amylase release from exocrine pancreatic segments of sheep, rats, hamsters, field voles and mice. *J Comp Physiol B*. 1996;166(5):305–9. <https://doi.org/10.1007/BF02439916>
32. Hillgartner FB, Charron T. Arachidonate and medium-chain fatty acids inhibit transcription of the acetyl-CoA carboxylase gene in hepatocytes in culture. *J Lipid Res*. 1997;38(12):2548–57.
33. Томилин МВ, Короткова ТВ, Логинов ПА. Сравнительный анализ показателей качества лекарственного препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):411–21. Tomilin MV, Korotkova TV, Loginov PA. Comparative analysis of quality attributes of a human albumin preparation with a modified stabilizing composition. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1): 411–21 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-411-421>
34. Grabarek AD, Bozic U, Rousel J, et al. What makes polysorbate functional? Impact of polysorbate 80 grade and quality on IgG stability during mechanical stress. *J Pharm Sci*. 2020;109(1):871–80. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.015>
35. Chen D, Luo W, Hoffman J, et al. Insights into virus inactivation by polysorbate 80 in the absence of solvent. *Biotechnol Prog*. 2020;36(3):e2953. <https://doi.org/10.1002/btpr.2953>
36. Tomlinson A, Demeule B, Lin B, Yadav S. Polysorbate 20 degradation in biopharmaceutical formulations: quantification of free fatty acids, characterization of particulates, and insights into the degradation mechanism. *Mol Pharm*. 2015;12(11):3805–15. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00311>
37. Jones MT, Mahler HC, Yadav S, et al. Considerations for the use of polysorbates in biopharmaceuticals. *Pharm Res*. 2018;35(8):148. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2430-5>

38. Dixit N, Salamat-Miller N, Salinas PA, Taylor KD. Residual host cell protein promotes polysorbate 20 degradation in a sulfatase drug product leading to free fatty acid particles. *J Pharm Sci.* 2016;105(5):1657–66. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.02.029>
39. Hall T, Sandefur SL, Frye CC, et al. Polysorbates 20 and 80 degradation by group XV lysosomal phospholipase A2 iso-mer X1 in monoclonal antibody formulations. *J Pharm Sci.* 2016;105(5):1633–42. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.02.022>
40. Sun MF, Liao JN, Jing ZY, et al. Effects of polyol excipient stability during storage and use on the quality of biopharmaceutical formulations. *J Pharm Anal.* 2022;12(5):774–82. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.03.003>
41. Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol.* 2018;39:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001>
42. O'Hagan DT, Friedland LR, Hanon E, Didierlaurent AM. Towards an evidence based approach for the development of adjuvanted vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2017;47:93–102. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.07.010>
43. Ko EJ, Kang SM. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(12):3041–5. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1495301>
44. Didierlaurent AM, Laupèze B, Di Pasquale A, et al. Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2016;16(1):55–63. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1213632>
45. Del Giudice G, Rappuoli R. Inactivated and adjuvanted influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;386:151–80. https://doi.org/10.1007/82_2014_406
46. Roman F, Clément F, Dewé W, et al. Effect on cellular and humoral immune responses of the AS03 adjuvant system in an A/H1N1/2009 influenza virus vaccine administered to adults during two randomized controlled trials. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(5):835–43. <https://doi.org/10.1128/CVI.00480-10>
47. Караулов АВ, Быков АС, Волкова НВ. Обзор исследований вакцин семейства Гриппол и развития современных адъювантов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2019;18(4):101–19. Karaulov AV, Bykov AS, Volkova NV. Review of Gripol Family vaccine studies and modern adjuvant development. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2019;18(4):101–19 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-101-119>
48. Никифорова АН, Бушменков ДС, Меркулов ВА, Степанов НН. Результаты изучения иммуногенности инактивированной сезонной гриппозной вакцины с адъювантом «Совидон™». *Врач-Провизор-Пациент.* 2011;(1):M8. Nikiforova AN, Bushmenkov DS, Merkulov VA, Stepanov NN. Results of the study of the immunogenicity of the inactivated seasonal influenza vaccine with the adjuvant "Sovidon™". *Doctor-Pharmacist-Patient.* 2011;(1):M8 (In Russ.).
49. Шмаров ММ, Алексеева СВ, Довженко НА и др. Безопасность, реактогенность и иммуногенность векторной вакцины против гриппа А: открытое клиническое исследование I фазы. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2025;25(1):7–21. Shmarov MM, Alekseeva SV, Dovzhenko NA, et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a viral vector vaccine against influenza A: Phase I open clinical trial. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2025;25(1):7–21 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-1-7-21>
50. El Kashif A, Alhashimi M, Sayedahmed EE, et al. Adenoviral vector-based platforms for developing effective vaccines to combat respiratory viral infections. *Clin Transl Immunology.* 2021;10(10):e1345. <https://doi.org/10.1002/cti2.1345>
51. Muravyeva A, Smirnikhina S. Strategies for modifying adenoviral vectors for gene therapy. *Int J Mol Sci.* 2024;25(22):12461. <https://doi.org/10.3390/ijms252212461>
52. Ramachandran S, Satapathy SR, Dutta T. Delivery strategies for mRNA vaccines. *Pharmaceut Med.* 2022;36(1):11–20. <https://doi.org/10.1007/s40290-021-00417-5>
53. Adamo M, Dick LW Jr, Qiu D, et al. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography method for polysorbate 80 quantitation in monoclonal antibody drug products. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(21):1865–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.04.039>
54. Ilko D, Braun A, Germershaus O, et al. Fatty acid composition analysis in polysorbate 80 with high performance liquid chromatography coupled to charged aerosol detection. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;94:569–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.11.018>
55. Christiansen A, Backensfeld T, Kühn S, Weitschies W. Stability of the non-ionic surfactant polysorbate 80 investigated by HPLC-MS and charged aerosol detector. *Pharmazie.* 2011;66(9):666–71. PMID: 22026121
56. Puschmann J, Evers DH, Müller-Goymann CC, Herbig ME. Development of a design of experiments optimized method for quantification of polysorbate 80 based on oleic acid using UHPLC-MS. *J Chromatogr A.* 2019;1599:136–43. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.015>
57. Shende N, Karale A, Bhagade S, et al. Evaluation of a sensitive GC-MS method to detect polysorbate 80 in vaccine preparation. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;183:113126. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113126>
58. Zhang R, Wang Y, Tan L, et al. Analysis of polysorbate 80 and its related compounds by RP-HPLC with ELSD and MS detection. *J Chromatogr Sci.* 2012;50(7):598–607. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms035>
59. Tania TH, Moore JM, Patapoff TW. Single step method for the accurate concentration determination of polysorbate 80. *J Chromatogr A.* 1997;786(1):99–106. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00540-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00540-2)
60. Nair LM, Stephens NV, Vincent S, et al. Determination of polysorbate 80 in parenteral formulations by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A.* 2003;1012(1):81–6. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01105-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01105-1)
61. Shi S, Chen Z, Rizzo JM, et al. A highly sensitive method for the quantitation of polysorbate 20 and 80 to study the compatibility between polysorbates and m-cresol in the peptide formulation. *J Anal Bioanal Tech.* 2015;6(3):1–8. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000245>
62. Fekete S, Ganzler K, Fekete J. Fast and sensitive determination of polysorbate 80 in solutions containing proteins. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;52(5):672–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.02.035>
63. Pan J, Ji Y, Du Z, Zhang J. Rapid characterization of commercial polysorbate 80 by ultra-high performance supercritical fluid chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2016;1465:190–6. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.051>
64. Kim J, Qiu J. Quantitation of low concentrations of polysorbates in high protein concentration formulations by solid phase extraction and cobalt-thiocyanate derivatization. *Anal Chim Acta.* 2014;806:144–51. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.005>
65. Savjani N, Babcock E, Khor HK, Raghani A. Use of ferric thiocyanate derivatization for quantification of polysorbate 80 in high concentration protein formulations.

- Talanta*. 2014;130:542–6.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.052>
66. McKean DL, Pesce AJ, Koo W. Analysis of polysorbate and its polyoxyethylated metabolite. *Anal Biochim*. 1987;161(2):348–51.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90461-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90461-1)
 67. Zheng S, Smith P, Burton L, Adams ML. Sensitive fluorescence-based method for the rapid determination of polysorbate-80 content in therapeutic monoclonal antibody products. *Pharm Dev Technol*. 2015;20(7):872–6.
<https://doi.org/10.3109/10837450.2014.930490>
 68. Berridge BJ, Chao WR, Peters JH. Analysis of plasma and urinary amino acids by ion-exchange column chromatography. *Am J Clin Nutr*. 1971;24(8):934–9.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/24.8.934>
 69. Fekkes D, van Dalen A, Edelman M, Voskuilen A. Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1995;669(2):177–86.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00111-U](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00111-U)
 70. Fekkes D. State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996;682(1):3–22.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(96\)00057-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(96)00057-6)
 71. Dai Z, Wu Z, Jia S, Wu G. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthalaldehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2014;964:116–27.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.025>
 72. Cohen SA. Amino acid analysis using precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Methods Mol Biol*. 2000;159:39–47.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-047-0:039>
 73. Ichiara K, Kohsaka C, Yamamoto Y. Determination of proteinaceous free amino acids by gas chromatography. *Anal Biochem*. 2021;633:114423.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114423>
 74. Desmons A, Thioulouse E, Hautem JY, et al. Direct liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of amino acids in human plasma. *J Chromatogr A*. 2020;1622:461135.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461135>
 75. Kaspar H, Dettmer K, Chan Q, et al. Urinary amino acid analysis: a comparison of iTRAQ-LC-MS/MS, GC-MS, and amino acid analyzer. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(20–21):1838–46.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.019>
 76. Mahgoub S. Validated RP-HPLC method for quantitative determination of tolfenamic acid and benzyl alcohol in a veterinary pharmaceutical preparation. *Austin Chromatogr*. 2017;4(1):1046.
 77. Čudina OA, Čomor MI, Janković I.A. Simultaneous determination of bifenazole and benzyl alcohol in pharmaceutical formulations by reverse-phase HPLC. *Chroma*. 2005;61:415–8.
<https://doi.org/10.1365/s10337-005-0524-9>
 78. Yu MW, Finlayson JS. Quantitative determination of the stabilizers octanoic acid and N-Acetyl-DL-tryptophan in human albumin products. *J Pharm Sci*. 1984;73(1):82–6.
<https://doi.org/10.1002/jps.2600730122>
 79. Dengler T, Kellner S, Fürst G. Quantitative determination of sodium-octanoate in human serum albumin preparations. *Infusionstherapie*. 1988;15(6):273–4.
<https://doi.org/10.1159/000222305>
 80. Jiang CL, Wang LN, Han JH, Ye J. Detection of sodium caprylate in human serum albumin by precolumn derivation reversed phase high performance liquid chromatography. *Chinese J Anal Chem*. 2010;38(3):425–8.
<https://doi.org/10.3724/SP.J.1096.2010.00425>
 81. Athavale M, Fernandes A, Kaundinya J, Daftary G. Validation of a simple, rapid and cost effective method for the estimation of caprylic acid and sodium caprylate from biological products using NEFA-C kit. *Biologicals*. 2010;38(2):321–4.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.10.001>
 82. Yang H, Fei C, Wang S, et al. Validation of an HPLC-CAD method for measuring the lipid content of novel LNP-encapsulated COVID-19 mRNA vaccines. *J Virol Methods*. 2024;330:115040.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2024.115040>
 83. Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Разработка методики количественного определения полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Химико-фармацевтический журнал*. 2024;57(12):59–64.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-12-59-64>
 84. Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Development of a quantitative determination method for polysorbate 80 in biologicals by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Pharm Chem J*. 2024;57(12):2013–8.
<https://doi.org/10.1007/s11094-024-03110-4>
 85. Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Определение полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах. Патент Российской Федерации № 2812788; 2024. Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Determination of polysorbate 80 in biological medicinal products. Patent of the Russian Federation No 2812788; 2024 (In Russ.). EDN: VMQXVZ
 86. Rounova O, Demin P, Korotkov M, et al. Development of a hydrophilic interaction high-performance liquid chromatography method for the determination of glycine in formulations of therapeutic immunoglobulins. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(26):6935–42.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1297-y>
 87. Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Разработка условий прямого количественного определения аминокислот в биологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(6):53–8.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2021-55-6-53-58>
 88. Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Development of the conditions for direct quantitative determination of amino acids in biologicals by hydrophilic interaction HPLC. *Pharm Chem J*. 2021;55(6):621–6.
<https://doi.org/10.1007/s11094-021-02467-0>
 89. Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Способ количественного определения глицина в биологических лекарственных препаратах методом гидрофильной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Патент Российской Федерации № 2700831; 2019. Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Method for quantitative determination of glycine in biological medicinal preparations by hydrophilic high-performance liquid chromatography. Patent of the Russian Federation No 2700831; 2019 (In Russ.). EDN: FQWVES
 90. Минеро АС, Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Разработка методики ионообменной ВЭЖХ для количественного определения стабилизаторов углеводной природы в биологических лекарственных препаратах. *Химико-фармацевтический журнал*. 2023;57(4):59–64.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-4-59-64>
 91. Minero AS, Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Development of an ion-exchange HPLC technique for quantitative determination of carbohydrate stabilizers in biological medicinal products. *Pharm Chem J*. 2023;57(4):578–83.
<https://doi.org/10.1007/s11094-023-02923-z>

89. Минеро АС, Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Разработка методики количественного определения стабилизаторов углеводной природы в биологических лекарственных препаратах на основе метода ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием. *Химико-фармацевтический журнал*. 2024;58(3):54–9. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2024-58-3-54-59>
Minero AS, Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Development of a method for the quantitative determination of carbohydrate stabilizers in biological drugs based on the HPLC method with refractometric detection. *Pharm Chem J*. 2024;58(3):512–8. <https://doi.org/10.1007/s11094-024-03172-4>
90. Минеро АС, Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Определение стабилизаторов углеводной природы в биологически активных препаратах. Патент Российская Федерация № 2816030; 2024. Minero AS, Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Determination of carbohydrate stabilizers in biologically active preparations. Patent of the Russian Federation No 2816030; 2024 (In Russ.). EDN: [LWHOTE](#)
91. Колесникова ОН, Рунова ОБ, Устинникова ОБ. Разработка и валидация методики количественного определения фенола методом газожидкостной хроматографии в биологических лекарственных препаратах. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(5):60–4. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-5-60-64>
Kolesnikova ON, Runova OB, Ustinnikova OB. Development and validation of a gas-liquid chromatography method for quantitative determination of phenol in biological medicinal products. *Pharm Chem J*. 2018;52(5):478–82. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1843-0>
92. Колесникова ОН, Устинникова ОБ, Рунова ОБ. Способ количественного определения фенола методом газожидкостной хроматографии в биологических лекарственных препаратах. Патент Российская Федерация № 2693518; 2019. Kolesnikova ON, Ustinnikova OB, Rounova OB. Method for quantitative determination of phenol in biological medicinal preparations by gas-liquid chromatography. Patent of the Russian Federation No 2693518; 2019 (In Russ.). EDN: [CMEFUS](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.С. Минеро** — написание текста рукописи, оформление списка литературы; **О.Б. Рунова** — написание текста рукописи, формулировка выводов исследования; **И.М. Щербаченко** — систематизация и обобщение данных литературы; **О.Б. Устинникова** — идея исследования, написание текста рукописи, окончательное утверждение версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.S. Minero** drafted the manuscript and prepared the list of references. **O.B. Rounova** drafted the manuscript and formulated the conclusions. **I.M. Shcherbachenko** generalised the materials and interpreted the results. **O.B. Ustinnikova** conceptualised the study, drafted the manuscript, and approved the final version for publication.

Об авторах / Authors

Минеро Анастасия Сальвадоровна / Anastasia S. Minero

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>

Рунова Ольга Борисовна, канд. хим. наук / **Olga B. Rounova**, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>

Щербаченко Ирина Михайловна, канд. биол. наук / **Irina M. Shcherbachenko**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9378-3312>

Устинникова Ольга Борисовна, канд. биол. наук / **Olga B. Ustinnikova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>

Поступила 25.04.2025

После доработки 11.08.2025

Принята к публикации 12.09.2025

Received 25 April 2025

Revised 11 August 2025

Accepted 12 September 2025