

*На правах рукописи*

*З.М. Шпрах*

**Шпрах Зоя Сергеевна**

**Теоретические и экспериментальные основы создания лекарственных средств для  
лечения нейроэндокринных опухолей**

14.04.01 – Технология получения лекарств  
14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора фармацевтических наук

Москва – 2022

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) и федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные консультанты:**

Доктор фармацевтических наук, профессор

Бунятян Наталья Дмитриевна

Доктор фармацевтических наук, профессор

Краснюк Иван Иванович

**Официальные оппоненты:**

**Егорова Светлана Николаевна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт фармации, заместитель директора по образовательной деятельности

**Новиков Олег Олегович** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Научно-образовательный ресурсный центр «Фармация», заместитель директора по научно-образовательной работе

**Ремезова Ирина Петровна** – доктор фармацевтических наук, профессор, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической и аналитической химии, профессор кафедры

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится *«22» июня* 2022 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2

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

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

И.о. ученого секретаря  
диссертационного совета ДСУ 208.002.01,  
доктор фармацевтических наук, профессор



Селиванова Ирина Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) представляют собой гетерогенную группу новообразований, которые возникают из клеток диффузной нейроэндокринной системы и характеризуются способностью вырабатывать пептиды и биогенные амины, которые вызывают специфичные симптомы [Oronskey B., 2017].

Результаты эпидемиологических исследований свидетельствуют о том, что НЭО являются редким заболеванием, однако в последние три десятилетия заболеваемость НЭО выросла более чем в 6 раз и в настоящее время достигла в США 6,98 случаев на 100000 населения. По прогнозам экспертов ВОЗ в ближайшие 2–3 года количество заболеваемости НЭО возрастет до 8 случаев на 100 тысяч населения [Dasari A., 2017]. На сегодняшний день в России нет статистических данных по заболеваемости НЭО [Горбунова В.А., 2021].

Наиболее частая локализация НЭО – желудочно-кишечный тракт (58%), около 30% НЭО встречаются в бронхолегочной системе [Горбунова В.А., 2015; Modlin I.M., 2017].

Большинство НЭО растет медленнее, чем другие эпителиальные злокачественные новообразования, однако и они могут быть агрессивными и резистентными к лечению [Емельянова Г.С., 2012; Oberg K., 2017]. Спектр эффективных химиотерапевтических препаратов, используемых для лечения злокачественных НЭО, ограничен [Borga C., 2021]. Химиотерапия показана при генерализованных формах низкодифференцированных НЭО, у пациентов с быстро прогрессирующими нейроэндокринными карциномами высокой степени злокачественности, особенно при неоперабельных метастазах, с невозможностью выполнения радикального хирургического лечения, у пациентов с декомпенсированным гиперфункциональным синдромом, также при опухолях, резистентных к другим видам лечения.

Стандартами лечения НЭО различных локализаций являются режимы химиотерапии на основе стрептозотоцина [2-дезоксид-2-(3-метил-3-нитрозомочевина)глюкозамина] [Schrader J., 2019]. Комбинации стрептозотоцина с 5-фторурацилом или доксорубицином за рубежом применяют в качестве первой линии лечения у пациентов с метастатическими НЭО поджелудочной железы. В Российской Федерации стрептозотин в настоящее время не зарегистрирован.

Лекарственным препаратом (ЛП), наиболее близким к стрептозотину по химической структуре, имеющим более благоприятный профиль токсичности, является араноза – 3-( $\alpha$ -L-арабинопиранозил-1)-1-метил-1-нитрозомочевина [Багрова С.Г., 2020]. Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г – противоопухолевый ЛП, разработанный и изученный в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, применяется для лечения меланомы кожи. Отдельные случаи применения Аранозы для лечения больных с НЭО

показали ее существенные терапевтические преимущества перед стрептозотоцином не только по эффективности, но и по значительно большей широте терапевтического действия [Полозкова С.А., 2016].

Особую роль в биотерапии НЭО играют аналоги природного гипоталамического гормона соматостатина, которые в настоящее время являются действующим стандартом безопасного и эффективного контроля симптомов гастропанкреатических НЭО. Кроме того, аналоги соматостатина демонстрируют противоопухолевый эффект и являются препаратами выбора для контроля роста опухоли у пациентов с неоперабельными НЭО [Oberг K., 2016; Stueven A.K., 2019].

Первый оригинальный отечественный аналог соматостатина цифетрилин – пентапептид Boc-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Thr-OMe, имеющий нециклическое строение, синтезирован и изучен в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [Шпрах З.С., 2014, 2016, 2021].

Исследованиями *in vitro* показано, что цифетрилин подавляет рост клеток рака молочной железы и карциномы простаты человека. Предварительное изучение цифетрилина *invivo* показало, что он обладает высокой противоопухолевой активностью на перевиваемых экспериментальных опухолях животных и ксенографтах [Шпрах З.С., 2019].

Таким образом, очевидна актуальность и целесообразность фармацевтической разработки отечественных ЛП различных фармакологических групп для лечения НЭО.

#### **Степень разработанности темы исследования**

Учитывая эффективность применения производного нитрозомочевины стрептозотоцина при лечении НЭО, исследователями НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и ИОС им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН синтезированы фармацевтические субстанции данного химического класса (араноза, лизомустин, БХНМ, ормусти́н). Под руководством Т.И. Ключковой проведены исследования по разработке лиофилизированных лекарственных форм (ЛФ) указанных лекарственных средств (ЛС). Однако их производство осуществлялось в лабораторных условиях с использованием оборудования, не позволявшего достичь воспроизводимых характеристик выпускаемых ЛС и обеспечить безопасные условия для персонала при работе с высокотоксичными веществами.

Согласно литературным данным российским пациентам наиболее доступен аналог соматостатина первого поколения Октреотид. Необходимость инъекций 3–4 раза в день делает данный препарат малоприменимым для длительного лечения НЭО. ЛФ Октреотида пролонгированного действия также имеет ряд существенных недостатков: необходимость сложного растворения перед введением, вероятность скачкообразного или даже «взрывного» высвобождения активного вещества и возможная деградация пептида [Stueven A.K., 2019].

Оригинальные аналоги соматостатина на отечественном фармацевтическом рынке отсутствуют. Российскими исследователями [Д.С. Хачатрян, В.Н. Осипов и др., 2018, 2019] синтезированы аналоги соматостатина, которые не проявили противоопухолевой активности достаточного уровня.

В России комплексные исследования теоретического и экспериментального характера по разработке ЛС различных химических классов для лечения НЭО, включающие технологические, биофармацевтические и другие методы исследования до настоящего времени не проводились.

**Цель исследования** – проведение комплекса теоретических и экспериментальных исследований по созданию ЛС для лечения НЭО на основе производного нитрозоалкилмочевины (Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций) и аналога соматостатина (цифетрилин, таблетки).

#### **Задачи исследования**

1. Определить целевой профиль и критичные показатели качества ЛП Араноза, предназначенного для лечения НЭО; провести анализ рисков для качества препарата; определить и валидировать критические стадии технологического процесса.
2. Обосновать подходы к организации производства ЛС для парентерального применения на основе высокотоксичных фармацевтических субстанций на примере лекарственного препарата Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций.
3. Разработать и валидировать аналитические методики стандартизации активной фармацевтической субстанции (АФС) и ЛП Араноза.
4. Определить возможность трансфера технологии и аналитических методик контроля качества на промышленное производство Аранозы.
5. Провести фармацевтическую разработку таблеток цифетрилина 6 мг: обосновать выбор лекарственной формы, подобрать оптимальный состав вспомогательных веществ, разработать технологию получения таблеток, провести предварительную валидацию основных стадий технологического процесса (ТП).
6. Установить целевой профиль качества и критичные показатели для качества таблеток цифетрилина 6 мг, провести анализ и оценку рисков влияния отдельных стадий технологического процесса на критичные показатели качества ЛС.
7. Теоретически и экспериментально обосновать критерии и нормы качества субстанции и таблеток цифетрилина 6 мг, разработать и валидировать аналитические методики стандартизации.
8. Определить стабильность и установить сроки годности АФС и таблеток цифетрилина 6 мг.

9. На основании полученных экспериментальных данных разработать проекты нормативной документации, технологические регламенты и разделы регистрационного досье на таблетки цифетрилина 6 мг.

10. Обосновать и модифицировать состав, технологию получения и аналитические методики контроля качества таблеток цифетрилина с увеличенным содержанием активного ингредиента (60 мг); установить сроки годности таблеток нового состава.

11. Подтвердить противоопухолевую активность аналога соматостатина – таблеток цифетрилина 6 мг и 60 мг на экспериментальных опухолевых моделях, экспрессирующих рецепторы к соматостатину.

### **Научная новизна исследования**

Теоретически и экспериментально обоснованы критерии создания безопасного производства высокотоксичных противоопухолевых ЛС для парентерального применения на примере производного нитрозоалкилмочевины аранозы: применение 100% изоляторов исключает риск выброса препарата в технологическую среду и позволяет создать технологические условия для асептического производства продукта.

Показана возможность трансфера технологии и аналитических методик ЛП Араноза на промышленное производство. Проведена фармацевтическая разработка аналога соматостатина цифетрилина на разных этапах жизненного цикла в ЛФ таблетки, определены основные параметры технологического процесса и проведена его предварительная валидация. Разработаны целевые профили качества ЛС Араноза и цифетрилин для лечения НЭО, определены критичные показатели для качества и их приемлемые значения. Определены и валидированы критические стадии технологических процессов получения Аранозы лиофилизата для приготовления раствора для инъекций и таблеток цифетрилина 6 мг и установлены критерии приемлемости отдельных стадий технологических процессов. Предложены критерии и параметры качества оригинальных отечественных фармацевтических субстанций и лекарственных форм аранозы и цифетрилина, разработаны и валидированы методики стандартизации АФС араноза и цифетрилин и готовых продуктов. Установлена экспрессия рецепторов к соматостатину в моделях экспериментальных опухолей животных (аденокарциноме молочной железы Ca755 и аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ), подтверждающая адекватность их использования для изучения противоопухолевой активности цифетрилина и других аналогов соматостатина.

Научная новизна работы и приоритеты проведенных исследований подтверждены получением 4 патентов на изобретения РФ (RU2254139 C1 от 20.06.2005; RU2601753 C1 от 10.11.2016; RU2703533 C1 от 21.10.2018 и RU2748989 C1 от 06.08.2020).

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработан инновационный проект реконструкции с техническим перевооружением лаборатории НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и создано современное безопасное асептическое производство противоопухолевых ЛС, предусматривающее применение изоляторных технологий на основных стадиях производства.

Предложенные технологические решения позволили успешно провести трансфер технологии и аналитических методик производства ЛП Араноза и получить необходимое количество ЛП для проведения клинических исследований.

По результатам проведенных исследований разработаны опытно-промышленный регламент (ОПР) производства ЛС цифетрилин; проекты нормативной документации (НД) по контролю качества АФС цифетрилин, ЛС «Цифетрилин таблетки 6 мг» и «Цифетрилин таблетки 60 мг».

По результатам доклинических исследований цифетрилина разработан пакет документов для получения разрешения на проведение клинических исследований по изучению безопасности и переносимости цифетрилина у пациентов с диссеминированными нейроэндокринными опухолями.

На основании экспериментальных данных разработаны разделы фармацевтическая разработка, документы по качеству, обзор доклинических данных, включенные в регистрационное досье на ЛС цифетрилин таблетки 6 мг, предназначенное для лечения НЭО.

### **Методология и методы исследования**

Экспериментальные исследования базировались на методологических подходах, изложенных в руководстве ICH Q8 Pharmaceutical Development, и включали все этапы фармацевтической разработки ЛС. В организации производства противоопухолевых препаратов и трансфере технологии и аналитических методик руководствовались требованиями Национального стандарта ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств» (GMP), Правилами надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза, Eudralex V.4 (GMPEС) и ICHQ9 Quality Risk Management. В исследованиях использовали современные технологические методы получения ЛФ (лиофилизация, гранулирование, прессование), физико-химические методы контроля качества (ЯМР-спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), УФ-спектрометрия и др.), фармакологические методы определения специфической активности ЛС. При выполнении работы использованы методы документального анализа; статистические методы анализа и обработки результатов. Экспериментальные исследования выполнены на

сертифицированном оборудовании Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Результаты экспериментальных исследований по трансферу технологии и аналитических методик контроля качества ЛП Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций на производство высокотоксичных противоопухолевых ЛС.
2. Экспериментальные данные по фармацевтической разработке аналога соматостатина цифетрилин на различных этапах жизненного цикла с применением подхода Quality by Design (QbD).
3. Технологические и аппаратурные схемы получения ЛС для лечения НЭО: Аранозы лиофилизата для приготовления раствора для инъекций; таблеток цифетрилина 6 мг и 60 мг.
4. Результаты разработки и валидации методик контроля качества АФС и ЛФ аранозы и цифетрилина.
5. Экспериментальное обоснование возможности использования моделей опухолевого роста для изучения противоопухолевой активности аналогов соматостатина.
6. Результаты доклинического исследования противоопухолевой активности цифетрилина на экспериментальных опухолевых моделях, экспрессирующих рецепторы к соматостатину.
7. Проекты нормативной документации (НД, технологические регламенты) и разделы регистрационного досье на ЛС цифетрилин.

### **Достоверность научных положений и выводов**

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных, применением адекватных методических подходов, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным задачам. В работе проанализирован достаточный объем литературных источников отечественных и зарубежных авторов. Возможность применения разработанных методик подтверждена их валидацией. Метрологическое обеспечение лабораторного оборудования подтверждено квалификацией соответствующего уровня. Результаты экспериментальных исследований статистически обработаны в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ) и сопоставлены с данными научной литературы.

### **Апробация результатов исследования**

Основные положения диссертации представлены и обсуждены на научных конференциях: «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2005, 2010, 2011;

Минск, 2013; Москва, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018; Екатеринбург, 2019), Съездах онкологов и радиологов России и стран СНГ (Минск, 2016; Сочи, 2018), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016), Международной научно-практической конференции «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии» (Томск, 2017), IV Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2018), I Международной (II Всероссийской) конференции «Реальный путь от научных разработок до лекарственных средств» (Москва, 2018), международной научно-практической конференции «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке» (Москва, 2018), IV Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2018), 22<sup>nd</sup> International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Formulations (Barcelona, Spain, 2018), 4-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием МедХим-Россия (Екатеринбург, 2019), The 45<sup>th</sup> FEBS Congress (Ljubljana, Slovenia, 2021), Международном форуме «Инновационная онкология» (Москва, 2021) и др.

Апробация диссертационной работы проведена на межкафедральной конференции кафедр: фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования, промышленной фармации Института профессионального образования, фармации Института фармации имени А.П. Нелюбина, Центра фармацевтических технологий МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), лабораторий: разработки лекарственных форм, химико-фармацевтического анализа, химического синтеза, экспериментальной химиотерапии, экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Института фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств и Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Института фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Минздрава России и кафедры токсикологической и аналитической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России 9 декабря 2021 г.

#### **Внедрение результатов исследования**

Основные технологические стадии производства ЛП Араноза апробированы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, ООО Фирма «ГЛЕС» и ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО»; валидированные методики контроля качества ЛП Араноза

используются ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, ООО «ГЛЕС» и ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО» при контроле производственного процесса и стандартизации препарата (Акты внедрения от 14.09.2021 и 28.06.2021).

Основные технологические стадии производства и валидированные методики контроля качества ЛС цифетрилин апробированы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Акт внедрения от 14.09.2021).

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Акт внедрения от 10.09.2021).

### **Личный вклад автора**

Автору принадлежит ведущая роль при выборе научного направления диссертационных исследований, определении цели и задач работы. Автором самостоятельно проведены экспериментальные исследования, сделан анализ и обобщение полученных результатов, разработана нормативная документация по контролю качества фармацевтических субстанций и ЛС. Автору принадлежит основная роль во внедрении результатов исследования, подготовке научных публикаций и докладов. Личный вклад автора является определяющим и состоит в непосредственном участии на всех этапах выполнения исследования и оформления автореферата и диссертационной работы.

### **Соответствие паспорту специальности**

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 14.04.01 «Технология получения лекарств» и 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты экспериментальных исследований соответствуют области исследований научных специальностей: конкретно пунктам 1, 2, 3 паспорта специальности «Технология получения лекарств» и пунктам 2, 3 паспорта специальности «Фармацевтическая химия, фармакогнозия».

### **Связь задач исследований с проблемным планом фармацевтической науки**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (номера государственной регистрации тем ВНИИЦ: 01201373444, 114112440113, АААА-А20-120031190013-9); а также в рамках федеральных целевых программ «Предупреждение и борьба с социально-значимыми заболеваниями» (2007–2012 гг.) и «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (2011–2020 гг.).

## Публикации

По результатам исследования опубликовано 49 работ, в том числе: научных статей, отражающих основные результаты диссертации – 28 статей, из них: в изданиях из Перечня Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки – 11 статей; в журналах, включенных в международные базы: Scopus – 15 статей; Web of Science – 2 статьи; в иных изданиях – 21; обзорных статей – 4; патенты на изобретение – 4.

## Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 333 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалы и методы, 6 глав собственных исследований), заключения, выводов, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 78 таблицами и 56 рисунками. Библиографический указатель включает 422 источника, в том числе 285 – на иностранных языках.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

В исследовании использовали фармацевтические субстанции араноза – 3-( $\alpha$ -L-арабинопиранозил-1)-1-метил-1-нитрозомочевина и цифетрилин – Вос-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Thr-OMe, синтезированные в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Вспомогательные вещества, растворители и реактивы отвечали требованиям действующей нормативной документации.

Состав модельных смесей (МС) для получения таблеток цифетрилина выбирали на основании технологических характеристик АФС; фармацевтико-технологические характеристики МС и готовых продуктов оценивали по методикам ГФ РФ.

Для контроля качества АФС и ЛС использовали методики, разработанные в ходе собственных исследований, а также методы, описанные в соответствующих общих фармакопейных статьях (ОФС) ГФ РФ. Методика количественного определения аранозы в субстанции основана на измерении объема азота, образующегося в результате реакции внутримолекулярного карбомоилирования аранозы. Для подтверждения подлинности цифетрилина в субстанции разработали оригинальный метод, основанный на использовании мультаядерной ЯМР-спектроскопии. При стандартизации субстанции цифетрилина для определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания применяли метод ВЭЖХ в изократическом режиме со спектрофотометрическим детектированием. Для количественного определения аранозы и цифетрилина в ЛФ разработаны методики спектрофотометрического определения, основанные на способности АФС поглощать излучение

в УФ-области спектра. Метод УФ-спектрофотометрии также использовали для определения аранозы в воздухе рабочей зоны.

Оценку экспрессии рецепторов к соматостатину (SSTR) в экспериментальных опухолях животных проводили иммуногистохимическим методом (ИГХ). Методика оценки экспрессии SSTRc использованием соответствующих антител разработана в ходе исследования.

Экспериментальные исследования с лабораторными животными проводили в соответствии с национальными и международными требованиями – ГОСТ 33044-2014, Директива 2010/63/EU и другими. В исследованиях использовали иммунокомпетентных линейных мышей и гибридов первого поколения обоего пола. Исследования с лабораторными животными одобрены Комиссией по биоэтике НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Разработанные методики валидировали в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» и «Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств» ЕАЭС (2018). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 7.0.

Разработку целевого профиля качества ЛС для лечения НЭО и оценку критичных показателей качества проводили методом экспертных оценок. Для определения воздействия операций ТП на критичные показатели качества готового продукта использовали метод матрицы анализа и снижения рисков (The Risk Analysis and Mitigation Matrix, RAMM).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Исследования по трансферу технологии лекарственного препарата

#### Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г

Как указано выше, отечественный противоопухолевый препарат Араноза по химической структуре близок к стрептозотоцину, который является стандартом лечения НЭО (Рисунок 1).

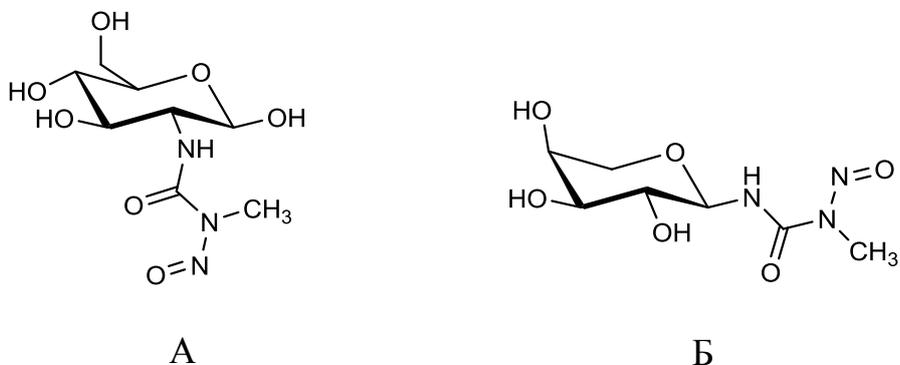


Рисунок 1 – Производные нитрозомочевины для лечения НЭО: А – стрептозотоцин; Б – араноза

Араноза применяется для лечения меланомы кожи в монотерапии и в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами. Изучение Аранозы на моделях экспериментальных

опухолей мышей и на ксенографтах рака легкого человека позволило спрогнозировать противоопухолевый эффект препарата при НЭО.

Расширение показаний к применению ЛП Араноза для лечения НЭО явилось основной предпосылкой для проведения исследований по трансферу (переносу) технологий и аналитических методик и организации современного производства ЛП на основе высокотоксичных субстанций.

Трансфер технологии на участок по производству препаратов, содержащих высокотоксичные вещества (цитостатики), потребовал проведения анализа и оценки рисков отдельных стадий ТП; масштабирования ТП и валидации стадий ТП; валидации и трансфера аналитических методик контроля качества, а также разработку проекта организации современного производства ЛП на основе высокотоксичных субстанций на примере Аранозы.

### **Концепция Качество путем разработки при трансфере технологии Аранозы**

При трансфере технологии производства Аранозы применяли основные элементы концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD):

- определение целевого профиля качества продукта (Quality Target Product Profile, QTPP);
- выявление критичных показателей качества (Critical Quality Attributes, CQAs);
- предварительная оценка рисков (Initial Risk Assessment).

Целевой профиль качества продукта – комплекс характеристик ЛП, который в идеале должен быть достигнут для обеспечения запланированного качества с учетом безопасности и эффективности ЛС (International Conference on Harmonization (ICH) ICH. Q8 (R2), 2009). Целевой профиль качества Аранозы представлен в Таблице 1.

Таблица 1 – Целевой профиль качества (QTPP) препарата Араноза

Элементы QTPP	Целевой показатель
Целевое назначение	Лечение нейроэндокринных опухолей
Целевая популяция	Пациенты с гистологически и иммуногистохимически подтвержденным диагнозом НЭО различной локализации (желудочно-кишечный тракт, легкие, средостение и т.д.)
Лекарственная форма	Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций
Путь введения	Парентеральный
Дозировка	0,5 г
Стерильность	Препарат должен быть стерильным
Стабильность	Не менее 3 лет при температуре не выше +10°C в сухом, защищенном от света месте
Упаковка	Флаконы из нейтрального стекла вместимостью 20 мл, укуренные пробками из резины под обкатку алюминиевыми колпачками

Критичный показатель качества – физическое, химическое, биологическое или микробиологическое свойство или характеристика, которые должны находиться в определенном диапазоне, пределе или иметь соответствующее распределение для обеспечения

запланированного качества (ICHQ8 (R2), 2009). Как наиболее критичные определены количественное содержание аранозы в единице упаковки и рН раствора после регидратации.

Для определения воздействия отдельных стадий ТП на критичные показатели готового продукта и выявления высокорисковых операций проведена предварительная оценка рисков (Initial Risk Assessment) методом матрицы анализа и снижения рисков (The Risk Analysis and Mitigation Matrix, RAMM). Результаты количественной оценки влияния основных стадий ТП производства Аранозы на критичные показатели качества представлены в виде матрицы в Таблице 2.

Таблица 2 – Предварительная оценка рисков производства Аранозы

Критичный показатель качества (CQA)	Производственный процесс				Итого 1 <sup>3</sup>
	Баллы <sup>1</sup>	Приготовление стерильного раствора аранозы <sup>2</sup>	Получение лиофилизата <sup>2</sup>	Упаковка и маркировка	
Подлинность, в том числе время растворения	12	9	1	1	132
Однородность массы	18	9	3	1	234
Прозрачность раствора	3	3	1	1	15
Цветность раствора	3	3	1	1	15
рН	24	9	1	1	264
Посторонние примеси	9	3	1	1	45
Потеря в массе при высушивании	18	1	9	1	198
Количественное определение	24	9	3	1	312
Упаковка/ маркировка	12	1	1	9	132
<b>Итого 2<sup>3</sup></b>		<b>47</b>	<b>21</b>	<b>17</b>	

Примечания –<sup>1</sup>Баллы – критичность; <sup>2</sup>ТП-4. включает ТП-4.1. и ТП-4.2.; ТП-5. включает ТП-5.1. и ТП-5.2.; <sup>3</sup>итого 1 – произведение критичности и суммы оценок для каждого процесса; итого 2 – сумма оценок процесса

Представленные данные свидетельствуют о том, что наибольшее влияние на качество лекарственного препарата оказывает стадия ТП-4. Приготовление стерильного раствора Аранозы. Графически основные факторы, определяющие риски стадий ТП-4 и ТП-5 производства Аранозы, представлены в виде диаграммы Ишикавы на Рисунке 2.

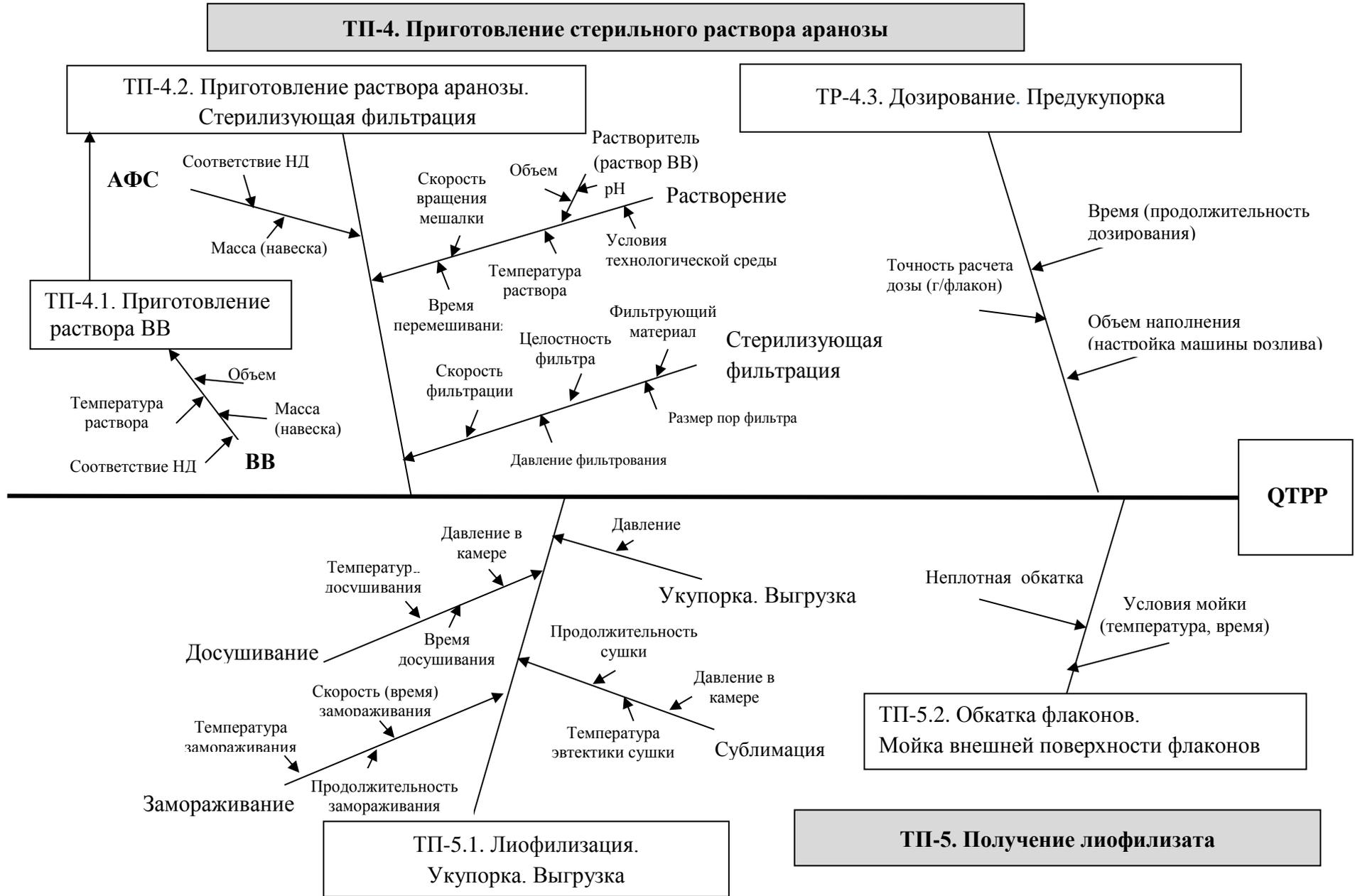


Рисунок 2 – Диаграмма Ишикавы для технологических стадий получения аранозы лиофилизата для приготовления раствора для инъекций

### Валидация технологических операций производства Аранозы

Анализ данных, представленных в Таблице 3 и на Рисунке 2, позволил определить контрольные точки технологического процесса получения Аранозы, их параметры и критерии приемлемости. Оценку возможностей стабильного процесса проводили, рассчитывая индексы воспроизводимости процессов  $C_p$  и  $C_{pk}$  (Таблица 3).

Таблица 3 – Контрольные точки стадии ТП-4. Приготовление стерильного раствора аранозы

Контрольная точка	Контролируемый параметр	Критерий приемлемости	
ТП-4.1. Приготовление раствора вспомогательных веществ			
КТ-ТП-4.1.1 Раствор сорбиновой кислоты	Температура, °С	22 ± 2	
ТП-4.2. Приготовление раствора аранозы. Стерилизующая фильтрация			
КТ-ТП-4.2.1 Раствор аранозы	Температура, °С	Не более 20	
КТ-ТП-4.2.2 Раствор аранозы	Количественное содержание аранозы, г/мл	LSL	USL
		0,090	0,110
Индекс воспроизводимости		$C_p$	$C_{pk}$
		1,32	1,08
КТ-ТП-4.2.3 Раствор аранозы	рН раствора	LSL	USL
		3,0	4,5
Индекс воспроизводимости		$C_p$	$C_{pk}$
		1,15	1,05
КТ-ТП-4.2.4 Стерилизующая фильтрация	Целостность фильтра	Отсутствие дефектов	
КТ-ТП-4.2.5 Дозирование	Объем раствора во флаконе, мл	От 4,9 до 5,1	

В ходе валидации ТП для трех серий препарата показано, что содержание аранозы в растворе для дозирования и значения рН не выходят за рамки установленных опытно-промышленным регламентом (ОПР) пределов. Относительное стандартное отклонение не превышает 2%, индекс возможностей процесса для всех стадий производства –  $C_{pk} > 1$  (Таблица 3). Результаты проведенных исследований подтвердили стабильность ТП и возможность получения ЛП, полностью соответствующего требованиям спецификации.

### Изолирующие технологии в производстве лекарственного препарата на основе высокотоксичной субстанции араноза

В основу концепции организации производства Аранозы положены следующие характеристики активного вещества:

- токсические свойства аранозы как производного нитрозоалкилмочевины (вещество относится к 1 классу опасности по токсичности – чрезвычайно опасные вещества);

- термоллабильность (араноза не выдерживает термической стерилизации).

Организация производства высокотоксичного ЛП потребовала решения двух основных задачи:

- обеспечение безопасности персонала и технологической среды и
- создание асептического производства продукта, исключающего возможность контаминации и кросс-контаминации.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ перед проектированием производства провели оценку рисков токсического воздействия аранозы на персонал на всех технологических стадиях и при контроле качества и определили производственные операции, которые характеризуются наиболее продолжительной экспозицией аранозы и наибольшим количеством экспонируемых лиц. Показано, что основной операцией с АФС и открытым продуктом является стадия ТП-4. Приготовление стерильного раствора (Таблица 4).

Таблица 4 – Оценка рисков воздействия аранозы на персонал

Экспозиция аранозы, час <sup>1</sup>	Путь поступления в организм			Вероятность возникновения, балл	Вероятность обнаружения, балл	Всего <sup>2</sup>
	ингаляция	абсорбция через				
		кожу	слизистые оболочки			
<b>ТП-4. Приготовление стерильного раствора</b>						
ТП-4.2. Приготовление раствора аранозы. Стерилизующая фильтрация						
2	++++	+++	+++	2	1	<b>40</b>
ТП-4.3. Дозирование. Предукупорка						
4,2	++	+++	+	2	1	<b>50,4</b>
<b>ТП-5. Получение лиофилизата</b>						
ТП-5.1. Лиофилизация. Укупорка. Выгрузка						
1	++	++	—	2	2	<b>16</b>
ТП-5.2. Обкатка флаконов. Мойка внешней поверхности флаконов						
1	++	++	+++	2	1	<b>14</b>
<b>Контроль качества</b>						
3	+	++	++	1	1	<b>15</b>

Примечания – <sup>1</sup>В соответствии с ОНР; <sup>2</sup>приоритет уровня риска (risk priority number, RPN): экспозиция аранозы x поступление в организм x вероятность возникновения x вероятность обнаружения;  $\geq 40$  – высокий риск,  $\geq 20$  и  $< 40$  – средний риск и  $< 20$  – низкая степень риска

Исследование параметров воздушной среды при использовании «открытого» оборудования показало чрезвычайно высокий уровень содержания аранозы в воздухе и на рабочих поверхностях в производственных и лабораторных помещениях (Таблица 5).

Таблица 5 – Содержание аранозы в воздухе и на поверхностях производственных и лабораторных помещений («открытое» оборудование)

Технологическая операция	Концентрация аранозы	
	Воздух рабочей зоны, мг/м <sup>3</sup>	Поверхность оборудования, мг/м <sup>2</sup>
Приготовление раствора — зона взятия навесок	0,001	0,001
Стерилизующая фильтрация	0,001	0,002
Дозирование	0,001	0,001
Выгрузка из лиофильной сушки	< ПО	< ПО
Лаборатория ОКК	< ПО	0,002

Исключить воздействие аранозы на операторов и окружающую среду, обеспечив при этом асептические условия производства, возможно благодаря использованию 100% изоляторов на всех стадиях ТП, при мойке внешней поверхности флаконов с готовым продуктом, отборе проб и контроле качества (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Блок-схема основных стадий ТП производства ЛП Араноза с применением изоляторов

Мониторинг параметров воздушной среды производственных помещений и рабочих зон изоляторов показал отсутствие следов аранозы в воздухе производственных помещений и рабочих зонах изоляторов.

## Разработка, валидация и трансфер аналитических методик контроля качества лекарственного препарата Араноза

Неотъемлемой частью трансфера технологии является передача аналитических методик контроля качества, подтверждение соответствия продукта требованиям спецификации и валидация передаваемых методик.

Валидацию методики количественного определения аранозы в субстанции проводили по характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (повторяемость, промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность).

Специфичность методики обеспечивается свойством, присущим только аранозе. При обработке субстанции избытком разбавленной щелочи араноза вступает в реакцию внутримолекулярного карбоамилирования с образованием  $N^1, O^3$ -карбонил- $\alpha$ -L-арабинопиранозиламина. Методика количественного определения аранозы в субстанции основана на измерении объема азота, образующегося в эквимольном количестве (Рисунок 4).

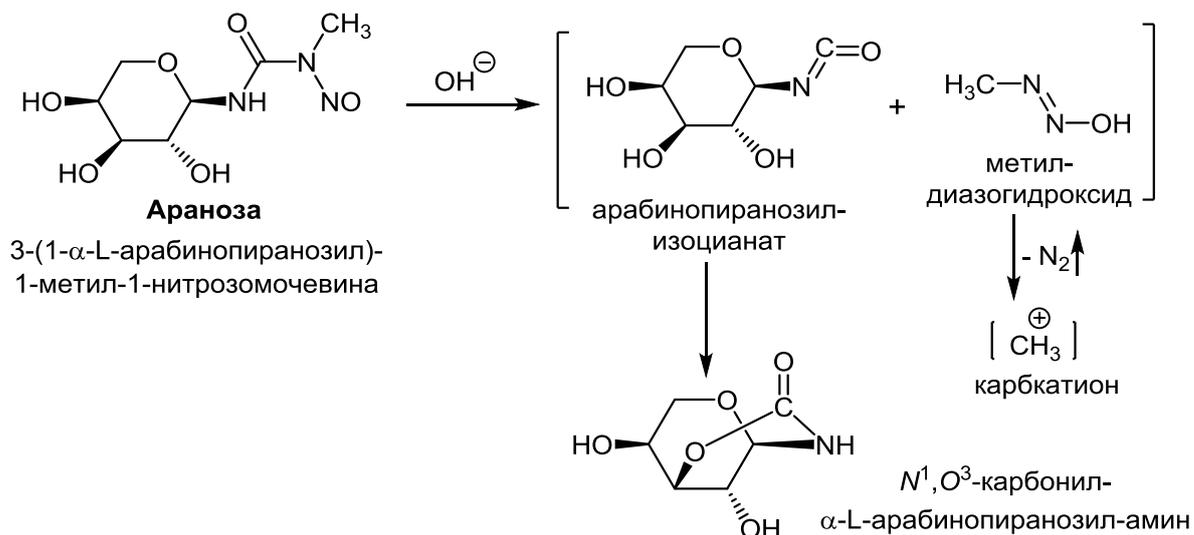


Рисунок 4 – Реакция внутримолекулярного карбоамилирования аранозы

Линейный характер параметров количественного определения аранозы в субстанции подтверждали расчетным путем (Таблица 6).

Таблица 6 – Результаты статистической обработки данных, полученных при изучении линейности

$f$	$\bar{x}$	$\bar{y}$	$b$	$a$	$s_a$	$\Delta b$	$\Delta a$	$s_0^2$	$r$
8	0,0569	6,0233	107,771	-0,104	0,0048	0,1982	0,0113	0,0004	0,998

Статистически достоверно установлено, что результаты количественного определения аранозы в субстанции описываются линейной зависимостью по уравнению:  $y = 107,771x - 0,104$ . Коэффициент корреляции  $r$  равен 0,998 и соответствует рекомендуемому условию  $|r| \geq 0,99$ , то

есть линейная зависимость между  $x$  (навеска образца аранозы) и  $y$  (объем выделившегося газа) не является случайной.

При оценке повторяемости (сходимости) установлено, что среднее содержание аранозы в субстанции составляет  $(99,82 \pm 0,22)\%$  и находится в пределах нормы, установленной спецификацией ( $\geq 98,0\%$  в пересчете на высушенное вещество). Вычисленное значение критерия Стьюдента  $t(P,f)$  равно 1,91, что меньше справочного (2,31), коэффициент вариации – 0,09%. Таким образом, результаты, полученные с использованием разработанной методики, не отягощены систематической ошибкой и являются повторяемыми (сходимыми).

Для определения внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности двумя аналитиками в разные дни проанализированы по 9 одинаковых образцов одной серии субстанции. Среднее значение содержания аранозы составило 99,77% и 99,82%, соответственно, а вычисленные значения критерия Стьюдента  $t(95,8)$ , рассчитанные по результатам двух выборок – 2,03 и 1,91, соответственно. Относительная ошибка среднего результата для двух исследователей составляет 0,27% и 0,21%, соответственно. Рассчитанный критерий Фишера  $F$  равен 1,55, что меньше  $F(P, f, f)$  – табличного значения при  $P(99\%)=6,03$ . То есть статистически достоверное различие в значениях величин дисперсий, полученных по результатам анализа двух аналитиков, не может быть признано значимым (Таблица 7).

Таблица 7 – Метрологические характеристики среднего результата при оценке внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики количественного определения аранозы

Метрологические характеристики среднего результата									
	$\bar{x},\%$	$S$	$S^2$	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$	$t(P,f)$ табл.	$t(P,f)$ вычисл. сл.	$F(P, f, f)$ вычисл.
1	99,77	0,3435	0,1180	0,1145	0,27	0,27	2,31	2,03	1,55
2	99,82	0,2761	0,0762	0,0920	0,22	0,21		1,91	

При оценке правильности установлено, что значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительного интервала среднего результата, относительная ошибка среднего результата ( $\bar{\varepsilon}$ ) не превышает 2,00%, а численное значение критерия Стьюдента, рассчитанное по результатам анализа выборки, составляет 1,31, то есть,  $t_{\text{вычисл.}} < t_{\text{табл.}}(P, f) = 2,31$ .

Вычисленные пределы обнаружения и количественного определения составили 0,016 г и 0,048 г, соответственно.

## Разработка и валидация методики количественного определения аранозы в лекарственном препарате

Изучение спектральных характеристик аранозы показало, что в электронном спектре поглощения ее водного раствора наблюдается максимум при длине волны (240±2) нм. Поскольку растворы ВВ (Коллидона и сорбиновой кислоты) имеют максимумы поглощения при (195±2)нм и (256±2)нм, соответственно, то максимум (240±2) нм использовали как аналитический.

Валидацию методики количественного определения аранозы в ЛФ проводили на образцах препарата и модельных смесях по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость и внутрिलाбораторная прецизионность).

Установлено, что вспомогательные вещества лиофилизированной ЛФ не влияют на спектральные характеристики аранозы, то есть выполняется основное условие специфичности методики – возможность однозначно определять анализируемое вещество в присутствии других компонентов.

Отчет о валидации методики количественного определения аранозы в ЛП приведен в Таблице 8.

Таблица 8 – Результаты определения валидационных характеристик методики количественного определения аранозы в ЛП

Метрологические характеристики среднего результата	Валидационная характеристика			
	Повторяемость (сходимость)	Промежуточная прецизионность		Правильность
		Аналитик 1	Аналитик 2	
$\bar{x}$	0,501	0,498	0,500	99,62
$S$	0,0064	0,0107	0,0080	1,3341
$S^2$	$4,0528 \times 10^{-5}$	$1,1353 \times 10^{-4}$	$6,4250 \times 10^{-5}$	1,3291
$S\bar{x}$	0,0021	0,0036	0,0027	0,4447
$\Delta\bar{x}$	0,005	0,008	0,006	1,05
$t(P,f)$ табл	2,31			
$t(P,f)$ вычисл	0,47	0,56	0,13	0,86
$\bar{\varepsilon}, \%$	1,00	1,68	1,26	1,05
F(P, f, f) вычисл.	1,77			
Параметры линейной зависимости				
a = 0,0195	b = 1,3357	$y = 1,3357x + 0,0195$		Коэффициент корреляции $r = 0,9980$

Примечание – n=9, f=8, P=95%

Линейность используемой методики установлена экспериментально: данные, представленные в Таблице 8, демонстрируют, что результаты количественного определения

хорошо описываются уравнением линейной зависимости  $y = 1,3357x + 0,0195$ , а коэффициент корреляции  $r$ , равный  $0,9980$ , отвечает необходимому условию  $|r| \geq 0,99$ .

Прецизионность методики определяли, оценивая повторяемость (сходимость) результатов и внутрилабораторную прецизионность. При оценке сходимости установлено, что среднее значение содержания аранозы ( $\bar{x}$ , г) в проанализированных сериях ЛФ составляет  $0,501$  г и находится в пределах установленной нормы ( $0,450-0,550$  г). Относительная ошибка среднего результата  $-1,00\%$ , а вычисленное значение критерия Стьюдента  $t(P,f)=0,47$ , что меньше справочного  $t(P,f)=2,31$ . То есть результаты, полученные по разработанной методике, не отягощены систематической ошибкой и являются сходимыми.

При исследовании внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности показано, что относительная ошибка среднего результата для разных исследователей составила  $1,68\%$  и  $1,26\%$ , а значение критерия Стьюдента, рассчитанное по результатам анализа двух выборок  $t_{\text{вычисл.}}(95\%,8) = 0,56$  и  $0,13$ , соответственно, что значительно меньше  $t_{\text{табл.}}(95\%,8) = 2,31$ . Коэффициент вариации  $-0,71\%$  и  $0,54\%$  для каждого из исследователей, соответственно. Вычисленный критерий Фишера  $F = 1,77 \ll F(99\%,8,8) = 6,03$ . Таким образом, статистически достоверное различие в значениях величин дисперсий, полученных по результатам анализа двух аналитиков, не может быть признано значимым.

Правильность валидируемой методики подтверждали при анализе модельных смесей в трипликатах. Показано, что разработанная методика соответствует критерию приемлемости: относительная ошибка среднего результата оставляет  $\bar{\varepsilon} = 1,03\%$ , результаты лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ( $99,62 \pm 1,03$ ) и приближаются к истинному значению. Вычисленное значение критерия Стьюдента значительно меньше табличного ( $0,86 \ll 2,31$ ), то есть, полученные результаты не отягощены систематической ошибкой и являются правильными.

Указанные характеристики разработанной методики делают ее приемлемой для количественного определения аранозы в лиофилизированной ЛФ и в растворе для дозирования при контроле ТП (КТ-ТП-4. Приготовление раствора аранозы).

### **Создание лекарственного средства аналога соматостатина для лечения НЭО**

В НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в течение ряда лет проводились исследования по поиску потенциальных противоопухолевых соединений в ряду пептидных гормонов. По результатам изучения в экспериментах *in vitro* и *in vivo* для дальнейших исследований отобран аналог гипоталамического гормона соматостатина цифетрилин – метиловый эфир N<sup>α</sup>-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-L-цистеинил-L-фенилаланил-D-триптофил-N<sup>ε</sup>-карбо-бензоксид-лизил-L-треонина (Рисунок 5).

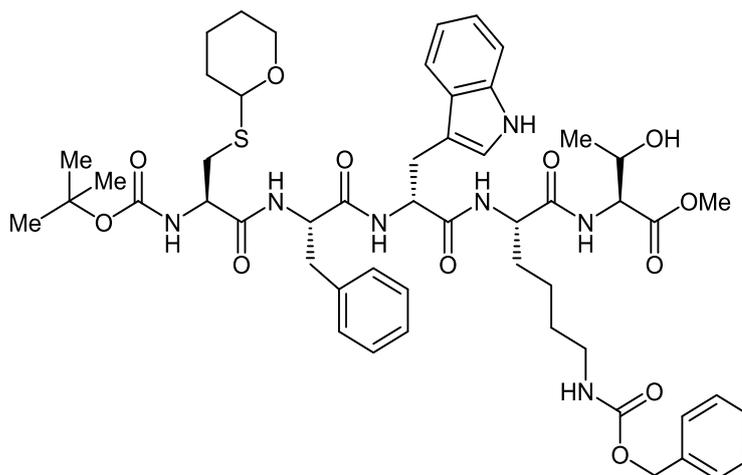


Рисунок 5 – Цифетрилин

На Рисунке 6 приведен дизайн разработки инновационного лекарственного средства цифетрилин, включающей комплекс технологических, аналитических и фармакологических исследований.



Рисунок 6 – Дизайн разработки инновационного лекарственного средства цифетрилин

## Стандартизация фармацевтической субстанции цифетрилин

Стандартизацию субстанции цифетрилин проводили с учетом химической структуры и физико-химических свойств в соответствии с требованиями ГФ РФ. В результате исследований образцов субстанции, полученных в разное время, выбраны основные критерии оценки качества АФС цифетрилина, разработаны соответствующие аналитические методики и определены приемлемые нормы для каждого критерия.

Для подтверждения подлинности субстанции цифетрилина была разработана оригинальная методика, основанная на мультаядерной ЯМР-спектроскопии. Структурную интерпретацию спектров  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  проводили на основе анализа данных двумерных корреляционных 2D экспериментов ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC и  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC) (Рисунок 7). В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  характеристичными являются сигналы NH- и  $\alpha$ -CH-протонов аминокислотных остатков, которые наблюдаются в диапазонах 11,0–6,6 и 4,7–4,0 м.д., соответственно. В спектре  $^{13}\text{C}$  цифетрилина практически все химически неэквивалентные углероды дают отдельные сигналы, за исключением некоторых сигналов ароматических углеродов и двух  $\alpha$ -углеродов аминокислотных остатков фенилаланина (Phe) и триптофана (Trp), сигналы которых сливаются в одну уширенную линию  $\delta$  с 53,36 м.д. Двумерный гетероядерный эксперимент  $2\text{D}^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, в котором корреляции обусловлены спин-спиновым взаимодействием через 2–3 связи  $^2,3J_{\text{CH}}$ , позволил идентифицировать сигналы непротонированных углеродов, в том числе карбонильных атомов аминокислот и защитных групп, а также других четвертичных углеродов. Отнесение сигналов  $^{15}\text{N}$  осуществляли с помощью двумерного эксперимента  $2\text{D}^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC по корреляциям между азотами и NH-протонами с известными химическими сдвигами.

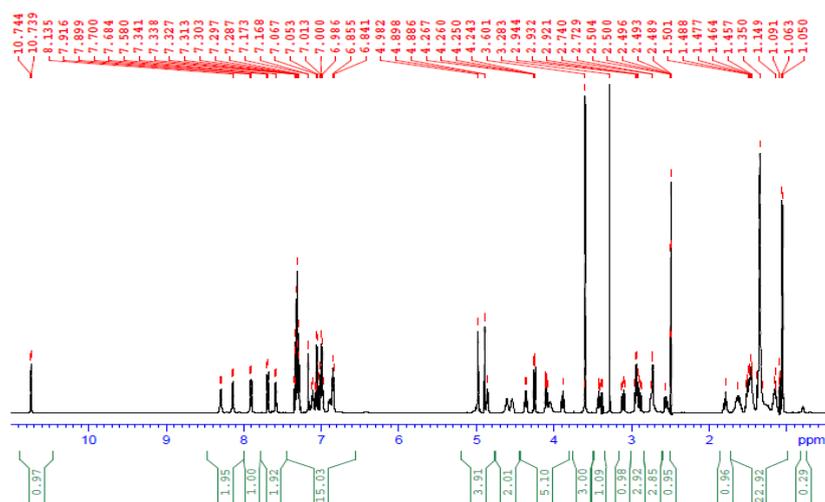


Рисунок 7 – Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (500 МГц, ДМСО- $d_6$ , 35°C)

Следует подчеркнуть, что анализ результатов эксперимента позволил установить наличие всех аминокислотных остатков и связи между соседними остатками вдоль пептидной цепи, тем самым подтвердив последовательность аминокислот в цифетрилине.

Для определения подлинности цифетрилина методом спектрометрии использовали способность соединения поглощать излучение в ультрафиолетовом диапазоне длин волн, которая обусловлена наличием в молекуле нескольких ароматических систем. УФ-спектр растворов цифетрилина в спирте этиловом 95% в области от 250 до 350 нм имеет максимумы поглощения при  $(274\pm 2)$  нм,  $(282\pm 2)$  нм и  $(290\pm 4)$  нм и минимумы при  $(248\pm 2)$  нм,  $(266\pm 2)$  нм и  $(287\pm 2)$  нм (Рисунок 8).

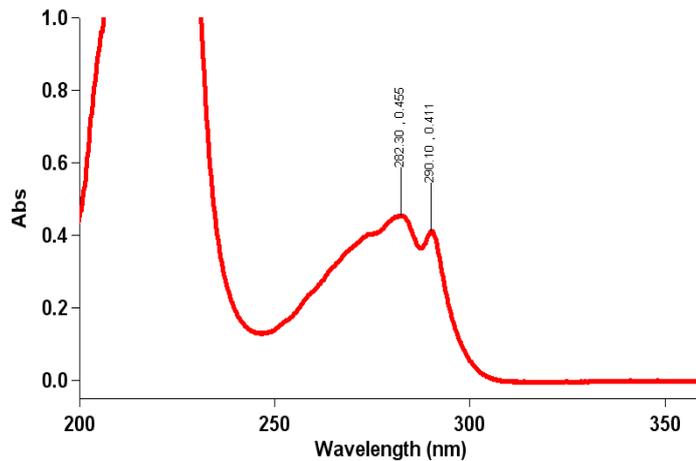


Рисунок 8 – УФ-спектр цифетрилина (0,008% раствор в спирте этиловом)

Для определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания цифетрилина в субстанции применяли метод ВЭЖХ. Хроматограмма одного из образцов представлена на Рисунке 9.

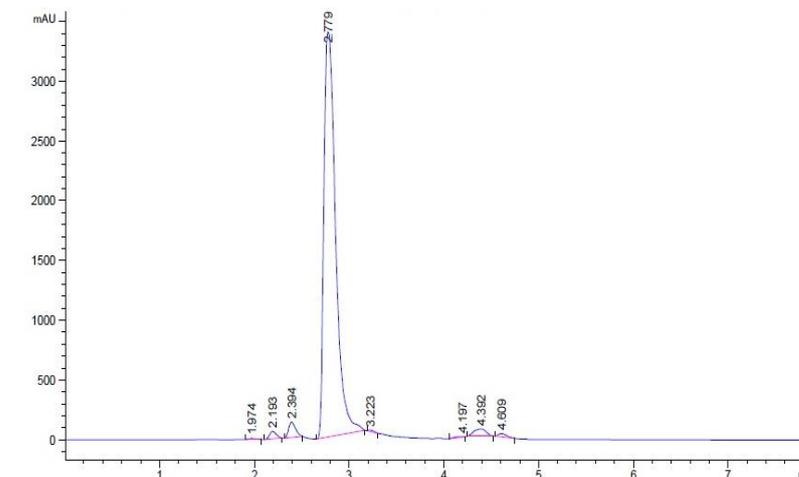


Рисунок 9 – ВЭЖХ-хроматограмма образца цифетрилина

Исследование выполняли в режиме изократического элюирования (гептан:метанол:хлороформ) при комнатной температуре, хроматографическая колонка УМС-РАСК 150x3 мм, 5 мкм. Для детектирования использовали спектрофотометрический детектор с фиксацией оптической плотности при длине волны  $(290 \pm 4)$  нм. Пределы контроля, идентификации и квалификации родственных примесей в цифетрилине установлены в соответствии с требованиями ГФ РФ к пептидам, полученным методами химического синтеза. Все исследованные образцы цифетрилина содержали не менее 97,0% активного вещества в пересчете на высушенное вещество, не более 1,0% единичной примеси и не более 3,0% суммы примесей.

Валидацию методики количественного определения цифетрилина в АФС проводили по характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (повторяемость/сходимость) и промежуточная прецизионность.

Специфичность методики ВЭЖХ оценивали, сравнивая хроматограммы исследуемых образцов и растворителя. Установлено, что растворитель не создает помех при хроматографировании субстанции и не оказывает влияния на время удерживания основного вещества и родственных соединений, а пик, соответствующий цифетрилину, имеет острую и симметричную форму.

При экспериментальном определении линейности установлено, что зависимость площади пика цифетрилина от его концентрации в растворе хорошо описывается уравнением  $y=5,0197 \cdot 10^7 x + 53923$ , коэффициент корреляции  $r=0,999$ .

При исследовании прецизионности оценивали повторяемость и внутрилабораторную прецизионность. Показано, что среднее значение содержания цифетрилина составляет 97,70%, а относительная ошибка среднего результата – 0,53%. Метрологические характеристики, вычисленные при оценке внутрилабораторной прецизионности, свидетельствуют об отсутствии систематической ошибки измерений и случайности различий между средними значениями и стандартными отклонениями результатов параллельных определений. Гипотеза  $x_1 = x_2$  может быть признана верной, поскольку вычисленный критерий Стьюдента  $t = 0,909$ , что меньше табличных значений  $t = 0,909 < t(95\%; 16) = 2,12$  и  $t = 0,909 < t(99\%; 16) = 2,92$ .

Правильность методики подтверждали, оценивая содержание цифетрилина в трипликатах, рассчитывая открываемость и метрологические характеристики. Согласно данным, представленным в Таблице 9, разница между средними и истинными значениями в трипликатах не превышает 1,00%, а результаты анализа неотягощены систематической ошибкой, то есть, разработанная методика может считаться правильной.

Таблица 9 – Метрологические характеристики среднего результата при определении правильности

Найдено цифетрилина, мг/мл	0,402	0,378	0,428	0,490	0,508	0,586	0,629	0,609	0,595	
Открываемость, %	100,12	99,52	99,70	99,93	100,16	100,45	100,72	100,27	99,65	
Среднеезначени е	99,78			100,18			100,21			
Метрологические характеристики среднего результата										
n	f	$\bar{x}$	s	$s^2$	$s\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	P,%	t(P,f) табл.	t(P,f) <sub>выч. числ.</sub>	$\bar{\epsilon}$ ,%
9	8	100,06	0,3955	0,156	0,132	0,32	95	2,31	0,44	0,32

По результатам исследований разработан проект нормативного документа по качеству фармацевтической субстанции цифетрилин.

Исследование стабильности субстанции цифетрилина в предлагаемой упаковке (пластиковые банки из полиэтилена высокой плотности, укупоренные навинчиваемыми пластиковыми крышками) показало неизменность показателей качества АФС при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C (холодильная камера) в течение трех лет.

### **Изучение экспрессии рецепторов к соматостатину в экспериментальных опухолях мышей**

Прямое противоопухолевое действие аналогов соматостатина реализуется при их связывании, по крайней мере, с одним из пяти рецепторов к соматостатину (SSTR1-5), которые экспрессируются в нормальных и опухолевых клетках и клетках микроокружения опухоли.

При оценке релевантности моделей опухолевого роста для доклинических исследований цифетрилина определяли экспрессию подтипов SSTR методом ИГХ в экспериментальных опухолевых моделях – аденокарциноме молочной железы Ca755 и аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ.

Максимальную интенсивность экспрессии SSTR1, SSTR2 и SSTR5 выявили в аденокарциноме молочной железы Ca755. В клетках данной опухолевой модели позитивную иммунореактивность наблюдали в 100% исследованных образцов, из них более 80% клеток обнаруживали выраженную иммунореактивность на клеточной мембране (полное мембранное окрашивание) при окрашивании клеток опухоли с помощью антител к SSTR2 (Рисунок 10).

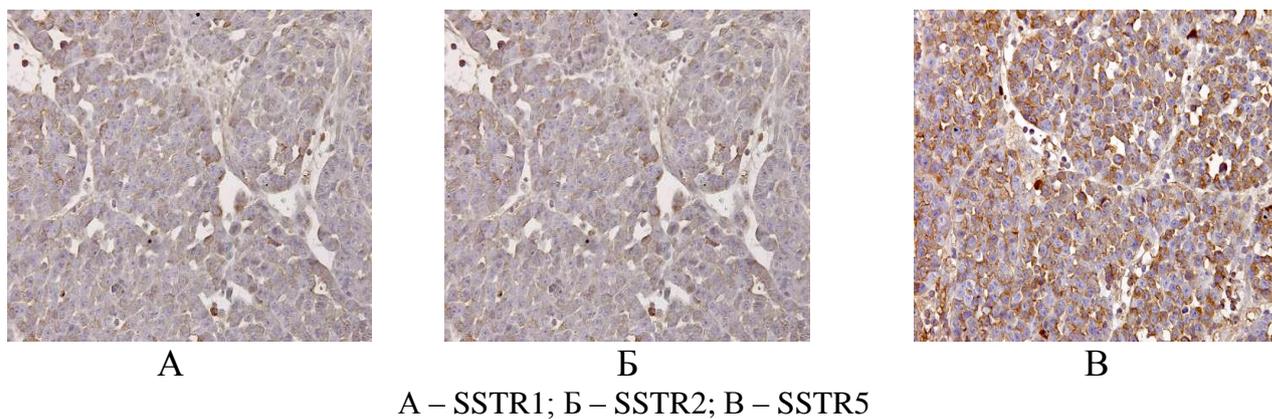
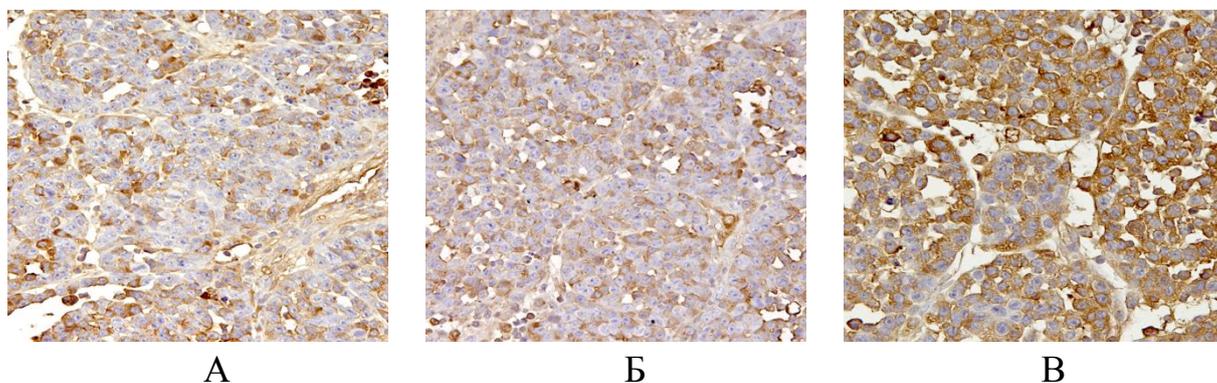


Рисунок 10 – Аденокарцинома молочной железы Ca 755

Аденокарциному молочной железы Ca755 использовали для исследования уровня экспрессии SSTR1-5 до и после введения цифетрилина (Рисунок 11).



А – контрольная группа; Б – опытная группа №1, 9-ый день после перевивки опухоли; В – опытная группа №2, 14-ый день после перевивки опухоли

Рисунок 11 – ИГХ оценка экспрессии SSTR5 в клетках аденокарциномы молочной железы Ca755 до и после введения цифетрилина

По окончании курса введения ЛС животным наблюдали изменение рецепторного статуса опухоли: – уровень экспрессии SSTR1 и SSTR2 уменьшался после введения цифетрилина, а уровень SSTR5 значительно увеличивался. При этом рецепторный статус опухоли в контрольной группе сохранялся (Рисунок 11).

### **Выбор оптимального пути введения цифетрилина**

Для определения оптимального пути введения проводили изучение эффективности цифетрилина в экспериментальных образцах различных ЛФ (высокодисперсной эмульсии, липосомальной дисперсии, суспензии в крахмальном клейстере) при различных путях введения (внутривенном, внутрибрюшинном и пероральном) на модели рака шейки матки мышей РШМ5.

Данные, представленные в Таблице 10, свидетельствуют о том, что наиболее ярко противоопухолевое действие цифетрилина реализовалось при пероральном введении в дозах 50 мг/кг и 10 мг/кг – ТРО 83% и 90%, соответственно, после окончания введения ЛС. При этом наблюдали статистически значимое сохранение терапевтического эффекта в течение трех недель, а УПЖ составило 49% и 55%, соответственно. Цифетрилин оказался эффективным при пероральном применении и в дозе 1 мг/кг: ТРО непосредственно после окончания введения – 73%; терапевтический эффект сохранялся в течение 15 дней.

Таблица 10 – Противоопухолевая активность прототипов ЛФ цифетрилина при ежедневном введении в течение 5-ти дней на РШМ5

Группа	Доза, мг/кг	Путь введения	ТРО,% (дни после окончания лечения)					УПЖ,%
			1	8-9	15-16	22	30	
Высокодисперсная эмульсия	70	внутри-брюшинно	49	44	31	50	44	5
	50	так же	62 <sup>1</sup>	66 <sup>1</sup>	48 <sup>1</sup>	52 <sup>1</sup>	46	9
	30	- « -	39	66 <sup>1</sup>	46	54	40	
Липосомальная дисперсия	40	внутривенно	68 <sup>1</sup>	45 <sup>1</sup>	56 <sup>1</sup>	45	47	0
	20	- « -	70 <sup>1</sup>	39	34	24	-	0
Суспензия в крахмальном клейстере	50	внутри	83 <sup>1</sup>	80 <sup>1</sup>	70 <sup>1</sup>	53 <sup>1</sup>	-	49
	10	- « -	90 <sup>1</sup>	76 <sup>1</sup>	67 <sup>1</sup>	54 <sup>1</sup>	-	55
	1	- « -	73 <sup>1</sup>	72 <sup>1</sup>	56 <sup>1</sup>	35	-	35

Примечание – <sup>1</sup>p < 0,05 по отношению к контролю

### Разработка технологии получения таблеток цифетрилина 6 мг

Субстанция цифетрилина представляет собой полидисперсный порошок, частицы которого имеют различную форму и размер (около 90% составляет фракция с размером частиц менее 0,25 мм). Поскольку цифетрилин обладает низкой сыпучестью (0,10±0,02 г/с), доза цифетрилина в таблетке должна составлять всего 6 мг, для получения таблеток необходимо введение ВВ, обеспечивающих точность дозирования АФС, стабильность ТП и качество готовых таблеток.

В качестве ВВ использовали лактозы моногидрат (ЛМ), микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ), повидон (ПВ), картофельный крахмал; при дозировании использовали опудривающую смесь, состоящую из картофельного крахмала, стеарата магния и талька.

Таблетки цифетрилина получали методом влажного гранулирования. Лучшими технологическими характеристиками (сыпучесть 3,08±0,03 г/с, насыпная плотность 0,15±0,01 г/мл и угол естественного откоса 40,4±1,1°) обладала модельная смесь, полученная с использованием в качестве гранулирующего агента 5% крахмального клейстера. Однако

полученные при ее прессовании таблетки не соответствовали требованиям ГФ РФ по показателю прочность на раздавливание. Оптимального соотношения технологических характеристик массы для прессования и таблеток удалось добиться при введении в состав повидона (Таблица 11).

Таблица 11 – Фармацевтико-технологические характеристики модельной смеси и полученных из нее таблеток

Модельная смесь			Таблетки	
Насыпная плотность, г/мл	Сыпучесть, г/с	Угол естественного откоса <sup>1</sup> , °	Распадаемость <sup>1</sup> , мин	Прочность на раздавливание, Н
0,49±0,01	6,43±0,02	40,8 ± 1,1	9,3±1,2	38,3±0,12

Примечание – <sup>1</sup>среднее значение, n=3; ±SN

На Рисунке 11 представлена блок-схема, демонстрирующая связь между отдельными операциями ТП получения таблеток цифетрилина и критическими показателями качества продуктов на стадиях ТП и готового ЛС.



Рисунок 11 – Связь между операциями технологического процесса получения таблеток цифетрилина и критическими показателями качества

Разработанные технологическая и аппаратурная схемы производства ЛС легли в основу опытно-промышленного регламента производства таблеток цифетрилина 6 мг (ОПР 01897624-06-14).

В Таблице 12 приведены контрольные точки ТП и их допустимые пределы в соответствии с ОПР.

Таблица 12 – Контрольные точки ТП получения таблеток цифетрилина и допустимые пределы контролируемых параметров

Стадия ТПа	Контролируемый параметр	Норма
ТП-4. Получение массы для прессования	Размер гранул, мм	Не более 1
	Влажность гранулята, %	Не более 4,0
	Сыпучесть, г/с	Не менее 6,00
	Количественное определение (АФС/1,0 г гранулята)	От 55,0 мг до 65,0
ТП-5. Прессование (таблетирование)	Внешний вид	Круглые двояковыпуклые таблетки белого цвета
	Прочность на раздавливание, Н	Не менее 30
	Средняя масса таблетки, мг, и однородность массы, %	От 95 до 116; $\pm 7,5$

Для документированного подтверждения того, что процесс соответствует технологическому регламенту, воспроизводится и позволяет получить ожидаемый результат, проведена предварительная валидация ТП получения таблеток цифетрилина. При этом параметры качества массы для прессования и таблеток контролировали методами, описанными в ГФ РФ, и с использованием специально разработанных и валидированных аналитических методик.

Таблица 13 – Соответствие таблеток цифетрилина 6 мг критериям оценки

	Средняя масса, мг	Распадаемость, мин	Количественное определение, мг/таблетка
Среднее значение	107,1	9,3	6,0
$\delta$	2,1	1,2	0,3
LSL	95	–	5,4
USL	116	15	6,6
$C_p$	1,25	1,15	1,24
$C_{pk}$	1,12	1,05	1,14
Количество измерений	60	60	60
Заключение	Соответствует	Соответствует	Соответствует

Результаты статистической обработки данных, полученных в ходе предварительной валидации, и значения индексов воспроизводимости, представленные в Таблице 13,

свидетельствуют о том, что ТП воспроизводится и позволяет получать качественный готовый продукт, отвечающий требованиям спецификации.

### **Разработка и валидация методики количественного определения и однородности дозирования цифетрилина в таблетках 6 мг**

Фармацевтико-технологические характеристики таблеток цифетрилина 6 мг проводили в соответствии с ОФС ГФ РФ. Количественное определение цифетрилина в таблетках и определение однородности дозирования проводили методом прямой спектрофотометрии с использованием рабочего стандартного образца. Максимум при длине волны ( $282 \pm 2$ ) нм использовали в качестве аналитического, так как удельный показатель поглощения при данной длине волны имеет наибольшее значение. Предварительно исследована зависимость интенсивности поглощения цифетрилина от его концентрации в растворах. Показано, что растворы цифетрилина удовлетворяют закону Бугера-Ламберта-Бера в диапазоне концентраций от 0,02 мг/мл до 0,20 мг/мл. Поскольку раствор ВВ в «рабочей» концентрации имеет собственное поглощение (около 0,08 единиц оптической плотности) в качестве раствора сравнения использовали раствор ВВ соответствующей концентрации.

Валидацию методики количественного определения проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ на образцах ЛС и модельных смесях, полученных в лабораторных условиях. При этом исследовали следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность), правильность.

Для подтверждения специфичности аналитической методики показано, что ВВ не влияют на спектральные характеристики цифетрилина. Линейность предложенной методики подтверждена экспериментально: результаты количественного определения цифетрилина в ЛФ хорошо описываются линейной зависимостью по уравнению  $y = - 0,0199 + 0,0603x$  в аналитическом максимуме, а коэффициент корреляции  $r$  равен 0,998 и отвечает условию  $|r| \geq 0,99$ .

В ходе валидации установлено, что результаты, полученные предложенным методом, являются сходимыми и не отягощены систематической ошибкой: среднее содержания цифетрилина ( $\bar{x}$ , мг) в представленной серии ЛФ составило 5,98 мг и находится в пределах установленной нормы (5,40–6,60 мг); относительная ошибка среднего результата составляет 1,37%; доверительный интервал результата отдельного определения  $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$  составил ( $5,98 \pm 0,08$ ) мг при доверительной вероятности  $P = 95\%$ .

Оценка внутрилабораторной (промежуточной прецизионности) показала, что различия между результатами, полученными двумя исследователями, незначительны: относительная

ошибка среднего результата составляет 1,37% и 1,11%, а численное значение критерия Стьюдента, рассчитанное по результатам анализа двух выборок  $t = 0,905$ , что меньше табличных значений.

Для подтверждения правильности аналитической методики анализировали модельные смеси с известным содержанием цифетрилина. Спектрофотометрическая методика количественного определения цифетрилина признана правильной, так как относительная ошибка среднего результата в интервале концентраций от 70 до 130% не превышает 2% и составляет  $\bar{\epsilon} = 1,63\%$ ; полученные результаты в трипликатах приближаются к истинному значению и лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ( $\bar{x} \pm \Delta x$ ), который составил  $99,28 \pm 1,63$  (Таблица 14). Все указанные характеристики методики делают её пригодной для количественного определения цифетрилина в таблетках.

Таблица 14 – Результаты валидации методики количественного определения цифетрилина в таблетках 6 мг

Аналитическая характеристика	Установленный критерий	Результат
Специфичность	Вспомогательные вещества, входящие в состав ЛФ не должны влиять на положение и величину максимумов в УФ-спектре цифетрилина	Результаты соответствуют установленным критериям
Линейность	Коэффициент корреляции не менее 0,990	$y = -0,0199 + 0,0603x$ $r = 0,998$
Повторяемость (сходимость)	Относительная ошибка среднего результата не более 2,0%	относительная ошибка среднего результата 1,4%
Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность	Относительная ошибка среднего результата не более 2,0%	относительная ошибка среднего результата 1,4% критерий Стьюдента – 0,905 критерий Фишера – 0,556
Правильность	Относительная ошибка среднего результата не более 2,0%	относительная ошибка среднего результата 1,6%
	Значения, принимаемые за истинные, должны лежать внутри доверительного интервала	Результаты лежат внутри доверительного интервала ( $99,28 \pm 1,62$ )%

При валидации методики количественного определения показано, что она обеспечена приемлемой правильностью и линейностью в диапазоне от 70% до 130% от номинального значения. Это позволяет считать методику валидированной и для использования в тесте «однородность дозирования».

Испытания на однородность дозирования проводили прямым определением содержания цифетрилина в каждой таблетке. Исследование осуществляли по методике количественного определения для каждой из 10 таблеток выборки порознь и выражали полученные результаты в процентах от номинального содержания действующего вещества в таблетке. Результаты, полученные для 5 серий препарата, показали, что содержание цифетрилина в каждой таблетке соответствует требованиям ГФ РФ.

### **Изучение противоопухолевой активности таблеток цифетрилина 6 мг**

Противоопухолевую активность цифетрилина изучали на моделях перевиваемых опухолей мышей: раке шейки матки РШМ5 и аденокарциноме молочной железы Ca755 в широком диапазоне доз от 1 до 120 мг/кг, аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ и меланоме В16 в низких дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг. Действие цифетрилина на запущенную опухоль изучали на РШМ5, изучение антиметастатической активности проводили на эпидермоидной карциноме легкого Lewis (LLC).

Эксперименты проведены на 940 мышах обоего пола линий C57Bl/6, Balb/c и CBA (доноры опухолевого материала) и гибридах первого поколения BDF<sub>1</sub> (C<sub>57</sub>Bl/6J x DBA/2) массой тела 20–22 г. Животных разделяли на группы по 10 особей в контрольной группе и 7 особей в опытной группе. В опытах использовали 2–7 пассажи штаммов перевиваемых опухолей мышей. Образцы опухолевой ткани перевивали лабораторным животным подкожно в область правой подмышечной впадины.

В исследованиях на РШМ5 установили, что при увеличении дозы цифетрилина от 1 мг/кг до 10 мг/кг противоопухолевый эффект усиливался по ТРО и УПЖ. Максимальный противоопухолевый эффект наблюдали непосредственно после окончания введения ЛС: в дозе 10 мг/кг – 86% ТРО, а в дозе 1 мг/кг – 72% ТРО. Эффект сохранялся до 30-го дня после окончания введения (ТРО – 74% и 61%, соответственно). Продолжительность жизни мышей, получавших цифетрилин в дозе 10 мг/кг, увеличилась на 48%, а в дозе 1 мг/кг – на 28%. Важно отметить, что зависимость противоопухолевой активности цифетрилина от дозы не была прямой: терапевтическое действие в дозах 50 мг/кг и 10 мг/кг оказалось равноценным.

Из данных, представленных в Таблице 15, видно, что на аденокарциноме молочной железы Ca755 прямая зависимость противоопухолевого эффекта цифетрилина от дозы также отсутствует. Применение цифетрилина в дозе 10 мг/кг вызывало более значимое, чем в дозе 1 мг/кг, УПЖ опытных животных, которое составило 59 и 8%, соответственно.

Следует отметить, что в ходе экспериментальных исследований, связанных с введением цифетрилина, гибели животных не наблюдали.

Таблица 15– Противоопухолевая активность цифетрилина на аденокарциноме молочной железы Ca755

Ежедневная доза, мг/кг	Курсовая доза, мг/кг	ТРО, % (дни после окончания введения ЛС)			УПЖ, %
		1	8 – 9	15 – 16	
120	600	86 <sup>1</sup>	76 <sup>1</sup>	58 <sup>1</sup>	53 <sup>1</sup>
100	500	78 <sup>1</sup>	67 <sup>1</sup>	38	14
50	250	85 <sup>1</sup>	54 <sup>1</sup>	28	14
10	50	69 <sup>1</sup>	82 <sup>1</sup>	78 <sup>1</sup>	59 <sup>1</sup>
1	5	85 <sup>1</sup>	76 <sup>1</sup>	57 <sup>1</sup>	8

Примечание – <sup>1</sup>p < 0,05 по отношению к контролю

При изучении эффективности цифетрилина на аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ отмечали некоторое терапевтическое преимущество дозы 10 мг/кг по сравнению с дозой 1 мг/кг: ТРО = 79% и 63%; 62% и 58%, соответственно. В то же время, цифетрилин в дозе 1 мг/кг вызывал УПЖ на 43%, а в дозе 10 мг/кг – всего 13% (Таблица 16).

Таблица 16 – Противоопухолевая активность таблеток цифетрилина на аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ

Ежедневная доза, мг/кг	Курсовая доза, мг/кг	ТРО, % (дни после окончания введения ЛС)					УПЖ, %
		1	8—9	15—16	22	30	
10	50	79 <sup>1</sup>	63 <sup>1</sup>	58 <sup>1</sup>	52 <sup>1</sup>	51 <sup>1</sup>	13
1	5	62 <sup>1</sup>	58 <sup>1</sup>	61 <sup>1</sup>	58 <sup>1</sup>	57 <sup>1</sup>	43 <sup>1</sup>

Примечание – <sup>1</sup>p < 0,05 по отношению к контролю

Исследование, проведенное на меланоме В16, показало незначительные различия в эффективности цифетрилина в дозах 10 мг/кг и 1 мг/кг в течение всего срока наблюдения по критериям ТРО и УПЖ.

В ходе эксперимента выбран оптимальный режим ежедневного перорального введения цифетрилина в течение 5 дней. При этом противоопухолевая активность ЛС в дозе 10 мг/кг на опухолях РШМ5 и Ca755 характеризовалась высоким ТРО и значительным УПЖ (Таблица 17).

Поскольку большинство НЭО диагностируются достаточно поздно (более 50% случаев характеризуются распространенным процессом с массивным опухолевым узлом и наличием метастазов), важным является высокий противоопухолевый эффект цифетрилина при действии на развившуюся опухоль в дозе 10 мг/кг. При этом ТРО достигает 79–76% и сохраняется в течение 20 дней.

Таблица 17 – Выбор оптимального режима введения цифетрилина

Опухоль	Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, % (дни после окончания введения ЛС)				УПЖ, %
			1	8	14	22	
РШМ5	10	50	90 <sup>1</sup>	76 <sup>1</sup>	67 <sup>1</sup>	54 <sup>1</sup>	55 <sup>1</sup>
	1	5	73 <sup>1</sup>	72 <sup>1</sup>	56 <sup>1</sup>	45	34 <sup>1</sup>
Ca755	10	50	79 <sup>1</sup>	82 <sup>1</sup>	78 <sup>1</sup>	–	59 <sup>1</sup>
	1	5	85 <sup>1</sup>	76 <sup>1</sup>	57 <sup>1</sup>	–	8
АКАТОЛ	10	50	68 <sup>1</sup>	63 <sup>1</sup>	58 <sup>1</sup>	52 <sup>1</sup>	13
	1	5	72 <sup>1</sup>	58 <sup>1</sup>	61 <sup>1</sup>	58 <sup>1</sup>	14
Меланома В16	10	100	76 <sup>1</sup>	63 <sup>1</sup>	59 <sup>1</sup>	–	18
	1	5	63 <sup>1</sup>	59 <sup>1</sup>	59 <sup>1</sup>	–	18

Примечание – <sup>1</sup>p < 0,05 по отношению к контролю

Выявлено также антиметастатическое действие препарата – при ежедневном пероральном введении 10 мг/кг цифетрилина в течение 10 дней после удаления первичной опухоли LLC торможение роста метастазов (ТРМ) в легких составляет 61% (p < 0,05).

#### Изучение стабильности таблеток цифетрилина 6 мг

Исследование стабильности таблеток цифетрилина 6 мг проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ при хранении в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C. Образцы каждой серии хранили в первичной упаковке – пластиковой банке из полиэтилена высокой плотности, укупоренной навинчиваемой пластиковой крышкой или в блистерной упаковке из алюминиевой фольги, закрытой плёнкой ПВХ. В результате проведенных исследований (определение количественного содержания цифетрилина, посторонних примесей и распадаемости) установлено, что качество таблеток цифетрилина 6 мг не изменяется в течение трех лет.

#### Разработка технологии получения таблеток цифетрилина 60 мг

На основании отчета о клинических исследованиях безопасности и переносимости таблеток цифетрилина 6 мг, проведенных в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, установлено, что данное количество активного вещества в таблетке недостаточно, а необходимая доза цифетрилина достигается при назначении до 60 таблеток одновременно.

В связи этим была поставлена задача по разработке состава и технологии получения таблеток с увеличенным содержанием цифетрилина. Подобран оптимальный состав таблеток: количество цифетрилина увеличено до 60 мг, содержание лактозы, как разбавителя, значительно снижено, дополнительно введены ВВ – лимонная кислота и карбонат магния.

Разработанный состав таблеток цифетрилина позволил достичь оптимальных фармацевтико-технологических характеристик, прежде всего соотношения распадаемости и прочности таблеток на раздавливание. Получение таблеток проводили методом прямого прессования.

Для стандартизации разрабатываемых таблеток использовали фармацевтико-технологические методы, описанные в ГФ РФ. Оценку количественного содержания цифетрилина проводили по разработанной нами методике прямого спектрофотометрического определения. Данные, представленные в Таблице 18, свидетельствуют о том, что таблетки цифетрилина 60 мг соответствуют требованиям ГФ РФ.

На основании результатов контроля качества образцов таблеток цифетрилина 60 мг разработан проект нормативного документа по качеству лекарственного средства цифетрилин таблетки 60 мг.

Таблица 18 – Основные показатели качества таблеток цифетрилина 60 мг

Наименование показателя качества	Требование	Полученный результат
Внешний вид	Круглые двояковыпуклые таблетки белого цвета	Соответствуют
Средняя масса	От 237 мг до 265 мг	245 мг
Однородность массы	Отклонение от средней массы $\pm 5\%$	$\pm 1,1\%$
Распадаемость	Не более 15 минут	5 минут
Посторонние примеси	Единичной неидентифицированной примеси – не более 1%; сумма примесей – не более 3,0 %	0,3; 1,0 1,3
Количественное содержание	От 57,0 до 63,0 мг	61,6 мг

Изучение условий хранения и стабильности таблеток цифетрилина нового состава показало, что их качество остается неизменным в течение 18 месяцев (срок наблюдения) при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C.

### **Противоопухолевая активность таблеток цифетрилина 60 мг**

Подтверждение противоопухолевой активности таблеток цифетрилина 60 мг проводили в сравнении с АФС на аденокарциноме молочной железы Ca755. Противоопухолевая активность цифетрилина непосредственно после окончания введения ЛС была одинаково высокой для доз 50 мг/кг и 100 мг/кг и составила ТРО=96% и ТРО=97%, соответственно. При этом противоопухолевый эффект постепенно снижался, но оставался значимым до 12 дня после окончания введения цифетрилина – 71% и 75% ТРО и соответствовал результатам, полученным при введении АФС (91–76%, соответственно).

Таким образом, анализ фармацевтического рынка и литературных данных показал, что для лечения НЭО используются лекарственные средства различных химических классов. В качестве стандарта химиотерапевтического лечения НЭО используют производное нитрозоалкилмочевины стрептозотоцин, для контроля симптомов НЭО и биотерапии широко применяются аналоги соматостатина. Отсутствие оригинальных отечественных лекарственных препаратов для лечения НЭО – производных нитрозомочевины и аналогов соматостатина на российском фармацевтическом рынке определило актуальность проведенного исследования.

На основании полученных экспериментальных данных установлен целевой профиль качества и определены критичные показатели качества лекарственного препарата Араноза. Показано, что наибольшее влияние на все критичные показатели качества готового продукта оказывает стадия приготовления стерильного раствора аранозы. Валидация критических стадий производства лекарственного препарата Араноза продемонстрировала возможность достижения воспроизводимых характеристик получаемого продукта.

В результате проведенных исследований обоснованы принципы организации производства высокотоксичных лекарственных средств на примере лекарственного препарата Араноза. Показано, что использование 100%-ых изоляторов в основных технологических процессах исключает риск выброса препарата в технологическую среду и обеспечивает безопасную работу персонала. Проведен трансфер технологии и аналитических методик контроля качества Аранозы. Валидирована методика волнометрического количественного определения аранозы в фармацевтической субстанции, обоснованы критерии и нормы качества лекарственного препарата Араноза, разработаны и валидированы аналитические методики его стандартизации.

Разработаны методики контроля качества фармацевтической субстанции цифетрилин: разработана оригинальная методика, основанная на использовании мультіядерной ЯМР-спектроскопии, а также спектрофотометрические и хроматографические методики, для которых проведена валидация.

Изучение стабильности цифетрилина показало, что его качество не изменяется в течение 3 лет при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C.

Оценка моделей лекарственной формы цифетрилина, предназначенных для различных путей введения, показала, что его противоопухолевая активность наиболее полно проявляется при пероральном введении экспериментальным животным. В дозе 10 мг/кг торможение роста опухоли непосредственно после окончания лечения составило 90%, статистически значимый терапевтический эффект сохранялся в течение 22 дней, а продолжительность жизни мышей увеличилась на 55%. Предварительно установлено, что клетки используемых опухолей

животных экспрессируют рецепторы к соматостатину (SSTR1–5), то есть являются релевантными моделями для доклинического исследования.

Фармацевтическая разработка аналога соматостатина цифетрилина проведена с использованием основных элементов подхода Качество путем разработки (Quality by Design):

- установлен целевой профиль качества таблеток цифетрилина 6 мг;
- определены фармацевтико-технологические свойства фармацевтической субстанции;
- показана необходимость использования влажного гранулирования для получения таблеток и выбран состав вспомогательных веществ;
- разработана технологическая схема получения таблеток цифетрилина;
- анализ профиля CQA качества таблеток цифетрилина показал, что наиболее критичными являются «количественное определение» и «однородность дозирования»;
- определены критические точки и валидированы основные стадии технологического процесса.

Изучение противоопухолевой активности полученных таблеток цифетрилина показало, что наиболее эффективным является ежедневное пероральное введение лекарственного средства в течение 5 дней, выявлена выраженная противоопухолевая эффективность цифетрилина в отношении развившейся опухоли РШМ5 и антиметастатическая активность лекарственного средства после удаления первичной опухоли.

Определены критерии качества таблеток цифетрилина, разработаны и валидированы аналитические методики их стандартизации. При исследовании срока годности таблеток цифетрилина в двух видах упаковки установлено, что лекарственное средство стабильно в течение 2 лет.

Клиническое исследование I фазы продемонстрировало необходимость увеличения количества активного вещества в таблетке. Установлено, что введение в состав таблеток новых ВВ и использование метода прямого прессования позволяет получать таблетки цифетрилина 60 мг, соответствующие требованиям ГФ XIV и разработанной спецификации. Показано, что разработанные методики контроля качества таблеток цифетрилина могут применяться для стандартизации таблеток цифетрилина 60 мг при изменении условий пробоподготовки. Определено, что качество лекарственного средства не изменяется в течение 18 месяцев (срок наблюдения) при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C.

Результаты доклинических исследований таблеток цифетрилина свидетельствуют о его выраженной противоопухолевой активности и перспективности для лечения НЭО.

## ВЫВОДЫ

1. Установлен целевой профиль качества ЛП Араноза. Показано, что наиболее критичными критериями для качества препарата являются количественное содержание аранозы в единице дозированной лекарственной формы и рН раствора, полученного после регидратации. Анализ связи между отдельными операциями технологического процесса, критичными показателями качества промежуточного продукта и готового препарата, проведенный методом матрицы анализа и снижения рисков (The Risk Analysis and Mitigation Matrix) показал, что стадия ТП-4. Приготовление стерильного раствора аранозы оказывает наибольшее влияние на все критичные показатели качества готового продукта, что подтверждено валидацией.

2. Разработаны подходы к организации производства ЛС на основе высокотоксичных фармацевтических субстанций на примере ЛП Араноза. Экспериментально установлено, что использование 100%-ых изоляторов исключает риск выброса токсичного продукта в технологическую среду, обеспечивая безопасность работы персонала.

3. Разработаны аналитические методики контроля качества и стандартизации субстанции и ЛП Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г, пригодность которых подтверждена валидацией: коэффициенты корреляции при определении линейности отвечали необходимому условию  $|r| \geq 0,99$ ; средние значения результатов в трипликатах при определении правильности находились в диапазоне от 98,0% до 102,0%; относительная ошибка среднего результата не превышала 2,0% и составляла 0,67% и 1,24% для количественного определения аранозы в субстанции и лекарственной форме, соответственно.

4. Проведен трансфер технологии и аналитических методик контроля качества и стандартизации ЛП Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г на промышленное производство.

5. Осуществлена фармацевтическая разработка аналога соматостатина цифетрилина с использованием подхода Качество путем дизайна (Quality by Design): определена оптимальная лекарственная форма, подобран состав вспомогательных веществ, разработана технологическая схема получения таблеток цифетрилина 6 мг методом влажного гранулирования; установлены допустимые пределы контролируемых параметров технологического процесса. Валидация основных стадий технологического процесса показала его воспроизводимость и соответствие полученных таблеток требованиям ГФ XIV и разработанной нами спецификации.

6. Установлен целевой профиль качества таблеток цифетрилина 6 мг. Показано, что наиболее критичными являются показатели «количественное определение» и «однородность дозирования», а наибольшее влияние на качество таблеток оказывают стадии ТП-4. Получение массы для прессования и ТП-5. Прессование.

7. Обоснованы критерии качества субстанции и таблеток цифетрилина 6 мг; разработаны и валидированы аналитические методики определения; экспериментально установлены нормы для каждого критерия; определена приемлемость разработанных методик по критериям специфичность, линейность, правильность и прецизионность. Статистический анализ показал, что среднее значение содержания цифетрилина в изученных образцах таблеток находится в пределах нормы, установленной в спецификации, а относительная ошибка среднего результата не превышает 2,0%.

8. При изучении условий хранения и стабильности цифетрилина показано, что качество активной фармацевтической субстанции не изменяется в течение 3-х лет. Срок годности таблеток цифетрилина 6 мг составляет 2 года при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C.

9. На основании полученных экспериментальных данных разработаны нормативная документация по качеству, технологический регламент и разделы регистрационного досье на цифетрилин таблетки 6 мг.

10. Разработаны таблетки цифетрилина с увеличенным до 60 мг количеством активного ингредиента; выбран оптимальный состав вспомогательных веществ; обоснована технологическая схема изготовления таблеток нового состава методом прямого прессования; адаптированы разработанные ранее аналитические методики контроля качества; установлена стабильность таблеток цифетрилина 60 мг в течение 1,5 лет (срок наблюдения).

11. На экспериментальных опухолевых моделях, экспрессирующих рецепторы к соматостатину, подтверждена высокая противоопухолевая и антиметастатическая активность таблеток цифетрилина 6 мг и 60 мг в широком диапазоне терапевтических доз: торможение роста опухоли составило от 76% до 90%, увеличение продолжительности жизни – до 59%.

### **Практические рекомендации**

Результаты проведенных исследований использованы при разработке лабораторных и опытно-промышленных регламентов на производство таблеток аналога соматостатина цифетрилина. Основные элементы подхода Качество путем разработки могут применяться в аналогичных исследованиях при фармацевтической разработке инновационных ЛС.

Проектная концепция фармацевтического производства, разработанная для производного нитрозоалкилмочевины Аранозы, может быть рекомендована к использованию при создании современных производств лекарственных средств на основе высокотоксичных фармацевтических субстанций.

### Перспективы дальнейшей разработки темы

Результаты фармацевтической разработки таблеток цифетрилина 6 мг станут основой для изучения таблеток цифетрилина нового состава и других лекарственных форм аналога соматостатина (липосомальных дисперсий, микросфер и других).

Разработанная нормативная документация может быть использована при производстве и контроле качества фармацевтических субстанций и лекарственных форм аналогов соматостатина и производных нитрозоалкилмочевины в ходе доклинических и клинических исследований.

### Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. Оборотова, Н.А. Разработка инъекционных лекарственных форм цитостатиков с использованием растворимого поливинилпирролидона / Н.А. Оборотова, **З.С. Шпрах**, В.Л. Багирова, П.В. Лопатин, Н.Е. Рышкова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, М.А. Краснова, Б.С. Кикоть, Е.В. Игнатьева, А.Ю. Барышников // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2001. – Т. 35. – № 5. – С. 39–43. [**Scopus**]

2. **Шпрах, З.С.** Основные принципы разработки проекта реконструкции с техническим перевооружением и организации производства противоопухолевых лекарственных средств для инъекций в опытно-нарабочей лаборатории ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН / **З.С.Шпрах** // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2005. – Т. 4. – №3. – С. 14–19. [**Перечень ВАК**]

3. Клочкова, Т.И. Организация, масштабирование и оптимизация производства лиофилизированных препаратов / Т.И. Клочкова, **З.С. Шпрах** // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2006. – Т. 5. – №3. – С. 115–122. [**Перечень ВАК**]

4. Митькина, Л.И. Лекарственные средства для парентерального применения / Л.И. Митькина, **З.С. Шпрах**, Е.Л. Ковалева // **Фармация**. – 2011. – №1. – С.3–5. [**Перечень ВАК**]

5. **Шпрах, З.С.** Синтез и химико-фармацевтические характеристики аналога соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью / **З.С. Шпрах**, И.В. Ярцева, Е.В. Игнатьева, А.П. Смирнова, Л.П. Сушинина, С.В. Устинкина, Л.И. Смирнова, А.П. Будько, Н.И. Зимакова // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2014. – Т. 48. – №3. – С.19 – 22. [**Scopus**]

6. Санарова, Е.В. Перспективность создания лекарственной формы отечественного аналога гипоталамического гормона соматостатина для лечения гормонозависимых опухолей / Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, Е.И. Михаевич, **З.С. Шпрах**, Л.И. Смирнова, Н.П. Яворская, Н.А. Оборотова // **Биофармацевтический журнал**. – 2016. – Т. 8. – №2. – С. 14–19. [**Scopus**]

7. Вартанян, А.А. Блокатор васкулогенной мимикрии восстанавливает чувствительность резистентных клеток меланомы к ДНК-алкилирующим агентам / А.А. Вартанян, М.А. Барышникова, О.С. Бурова, Л.В. Эктова, Л.И. Смирнова, **З.С. Шпрах** // Вестник РОНЦ. – 2016. – Т. 27. – № 2. – С.165–172. [**Перечень ВАК**]

8. Сапрыкина, Н.С. Противоопухолевая активность Ормустина на перевиваемых лейкозах мышей / Н.С. Сапрыкина, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, З.С. Смирнова, В.П. Краснов, Г.Л. Левит, В.В. Мусияк, М.А. Барышникова, В.М. Бухман, **З.С. Шпрах**, М.М. Давыдов // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2016. – Т. 15. – № 2. – С. 24–31. [**Перечень ВАК**]

9. **Шпрах, З.С.** Разработка и валидация методики количественного определения цифетрелина в таблетках /**З.С. Шпрах**, Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева, Н.А. Дмитричева, Л.И. Смирнова // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2016. – Т. 15. – № 3. – С. 55–61. [**Перечень ВАК**]

10. Осипов, В.Н. Цитотоксические аналоги цифетрелина (сообщение I) / В.Н. Осипов, Л.П. Сушинина, С.В. Устинкина, Л.И. Смирнова, **З.С.Шпрах** // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2016. – Т. 15. – № 4. – С. 85–88. [**Перечень ВАК**]

11. Борисова, Л.М. Цитотоксические аналоги цифетрелина (сообщение II) / Л.М. Борисова, М.П. Киселева, В.Н. Осипов, Л.П. Сушинина, С.В. Устинкина, Л.И. Смирнова, **З.С. Шпрах** // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2017. – Т. 16. – № 2. – С. 23–29. [**Перечень ВАК**]

12. **Шпрах, З.С.** Разработка и валидация методики количественного определения аранозы в лекарственной форме / **З.С. Шпрах**, Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2018. – Т. 17. – № 2. – С. 57–62. [**Перечень ВАК**]

13. Сапрыкина, Н.С. Противоопухолевая активность ормустина на перевиваемых солидных опухолях мышей. Часть 1. / Н.С. Сапрыкина, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, В.П. Краснов, Г.Л. Левит, В.В. Мусияк, М.А. Барышникова, В.М. Бухман, З.С. **Шпрах** // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2017. – Т. 16. – № 4. – С. 55–60. [**Перечень ВАК**]

14. Коняева, О.И. Предклиническое токсикологическое изучение аналога гипоталамического гормона цифетрелина / О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, Н.П. Ермакова, В.А. Чалей, И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, В.М. Бухман, **З.С.Шпрах** // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2018. – Т. 17. – № 2. – С. 63–70. [**Перечень ВАК**]

15. **Шпрах, З.С.** Доклиническое изучение противоопухолевой активности Цифетрелина на экспериментальных опухолях животных / **З.С. Шпрах**, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, З.С. Смирнова // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2019. – Т. 82. – № 8. – С. 27–31. [**Scopus**]

16. Игнатъева, Е.В. Разработка и валидация методики количественного определения димерного макроциклического танина в лекарственной форме/ Е.В. Игнатъева, И.В. Ярцева, **З.С. Шпрах**, С.А. Сасов, О.Л. Орлова // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2020. – Т. 9. – № 4. – С. 93–98. [Scopus]
17. **Шпрах, З.С.** Аналоги соматостатина для лечения нейроэндокринных опухолей. Лекарственные формы и пути введения (обзор) / **З.С. Шпрах** // **Биофармацевтический журнал.** – 2020. – Т. 12. – № 2. – С. 3–12.[Scopus]
18. Оборотова, Н.А. Особенности создания лиофилизированных противоопухолевых препаратов (обзор) / Н.А. Оборотова, Л.Л. Николаева, Л.А. Король, О.Л. Орлова, **З.С. Шпрах**, А.В. Ланцова, М.В. Дмитриева, А.П. Полозкова, Е.В. Санарова // **Биофармацевтический журнал.** – 2020. – Т. 12. – № 3. – С. 3–13. [Scopus]
19. Vartanian, A. Inhibitor of vasculogenic mimicry restores sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-damaging agents / A. Vartanian, M. Baryshnikova, O. Burova, D. Afanasyeva, V. Misyurin, **Z. Shprakh**, // **Melanoma Res.** – 2017. – № 1. – P. 8–16. [Scopus]
20. **Shprakh, Z.S.** Formulation and evaluation of Somatostatin analogue tablets / **Z.S. Shprakh**, O.L. Orlova, N.A. Oborotova, N.D. Bunyatyan // **International Journal of Applied Pharmaceutics.** – 2019. – Vol. 11. – No. 4. – P. 220–223. [Scopus]
21. Орлова, О.Л. Метод солеобразования в технологии получения инъекционных лекарственных форм плохо растворимых противоопухолевых соединений / О.Л. Орлова, Л.Л. Николаева, М.В. Дмитриева, А.В. Ланцова, А.П. Полозкова, **З.С. Шпрах**, Н.Ю. Кульбачевская, О.И.Коняева, Н.А. Оборотова // **Фармация.** – 2019. – Т. 68. – № 4. – С. 17–26. [Перечень ВАК]
22. Sanarova, E. Development of a Liposomal Dosage Form for a New Somatostatin Analogue /E. Sanarova, A. Lantsova, N. Oborotova, A. Polozkova, M. Dmitrieva, O. Orlova, L. Nikolaeva, L. Borisova, **Z. Shprakh** // **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.** – 2019. – Vol. 81. – No. 1. – P.146-149. [Scopus][WoS]
23. **Shprakh, Z.** Somatostatin analogues for the treatment of neuroendocrine tumours. Dosage forms and routes of administration (review) / **Z. Shprakh** // **International Journal of Applied Pharmaceutics.** – 2020. – Vol. 12. – No. 2. – P. 6–11. [Scopus]
24. **Shprakh, Z.** Pharmaceutical Development of Nitrosourea Compound for the treatment of Neuroendocrine Tumours / **Z. Shprakh** // **International Journal of Pharmaceutical Investigation.** – 2020. – Vol. 10. – No. 4. – P. 466–470. [WoS]
25. **Dmitrieva, M.** Selection of the composition of a liposomal dosage form of a Russian somatostatin analogue with antitumor activity /M. Dmitrieva, **Z. Shprakh**, O. Orlova, E. Ignatieva, A. Lantsova, L. Nikolaeva, I. Krasnyuk I. // **International Journal of Applied Pharmaceutics.** –

2020. – Vol. 12. – No. 6. – P. 65–68. [Scopus]

26. **Шпрах, З.С.** Гармонизация стандартных терминов, используемых в отечественной и зарубежной фармакопейной практике / **З.С. Шпрах** // **Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.** – 2020. – Т. 10. – №3. – С. 184–191. [Перечень ВАК]

27. **Shprakh, Z.** Development and validation of HPLC method for analysis of indolocarbazole derivative LCS-1269 / **Z. Shprakh, A. Budko, D. Kozin, L. Ektova, D. Gusev, V. Reshetnyak, O. Nesterova** // **Pharmacia.** – 2021. – Vol. 68. – No. 2. – P. 427–431. [Scopus]

28. **Shprakh, Z.** Formulation of Somatostatin Analogue Tablets using Quality by Design Approach / **Z. Shprakh** // **Journal of Applied Pharmaceutical Science.** – 2021. – Vol. 11. – No. 4. – P. 96–105. [Scopus]

29. Отечественные противоопухолевые препараты / А.Ю. Барышников, **З.С.Шпрах** // Рациональная фармакотерапия в онкологии: руководство для практикующих врачей / под ред. М.И. Давыдова, В.А. Горбуновой. – М.: Литерра, 2015. – Гл. 21. – С. 95–101.

30. **Шпрах, З.С.** Использование изоляторов в производстве противоопухолевых лекарственных средств для инъекций (на примере реконструкции с техническим перевооружением опытно-нарабочей лаборатории ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН) / **З.С. Шпрах** // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты». – **Российский биотерапевтический журнал.** – 2005. – Т. 4. – № 1. – С. 78. [Перечень ВАК]

31. **Шпрах З.С.** Основные принципы проектирования производства противоопухолевых лекарственных средств для инъекций (на примере реконструкции с техническим перевооружением опытно-нарабочей лаборатории ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН) // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты». – **Российский биотерапевтический журнал.** – 2005. – Т. 4. – №1. – С. 78. [Перечень ВАК]

32. Митькина, Л.И. Стандарты качества на лекарственные средства для парентерального применения / Л.И. Митькина, Е.В. Ковалева, **З.С. Шпрах** // XVIII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». Сборник материалов конгресса. – М. – 2008. – С. 543.

33. Смирнова, А.П. Синтез и противоопухолевая активность цифетрилина при пероральном введении / А.П. Смирнова, Л.П. Сушина, С.В. Устинкина, **З.С. Шпрах,** А.П. Будько, Л.И. Смирнова, Н.П. Яворская, И.С. Голубева, Е.И. Михаевич, З.С. Смирнова // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты». – **Российский биотерапевтический журнал.** – 2009. – Т. 8. – № 2. – С. 18. [Перечень ВАК]

34. **Шпрах, З.С.** Цифетрелин – разработка проекта ФСП на субстанцию / **З.С. Шпрах**, Л.И. Смирнова, А.П. Смирнова, Л.П. Сушнина, С.В. Устинкина, В.Н. Осипов, А.П. Будько, Н.А. Дмитричева, И.В. Ярцева // *Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»*. – **Российский биотерапевтический журнал**. – 2010. – Т. 9. – № 2. – С. 84.

[Перечень ВАК]

35. Смирнова, А.П. Цифетрелин: оптимизация и масштабирование синтеза / А.П. Смирнова, Л.П. Сушнина, С.В. Устинкина, В.Н. Осипов, Л.И. Смирнова, А.П. Будько, **З.С. Шпрах**, И.В. Ярцева, Е.В. Игнатъева // *Материалы X Всероссийской научной конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»*. – **Российский биотерапевтический журнал**. – 2011. – Т. 10. – № 1. – С. 57. [Перечень ВАК]

36. **Шпрах, З.С.** Араноза: результаты доклинических и клинических исследований / **З.С.Шпрах** // *Материалы Белорусско-Российской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»*. – **Российский биотерапевтический журнал**. – 2013. – Т. 12. – № 2. – С. 92. [Перечень ВАК]

37. **Шпрах, З.С.** Определение подлинности аналога гипоталамического гормона методом спектроскопии ЯМР / **З.С. Шпрах**, М.И. Кодесс, Г.Л. Левит, М.А. Ежикова, В.П. Краснов, Л.И. Смирнова // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике»*. – **Российский биотерапевтический журнал**. – 2014. – Т. 13. – № 1. – С. 140. [Перечень ВАК]

38. Ярцева, И.В. Валидация методики количественного определения цифетрилина в лекарственной форме / И.В. Ярцева, Е.В. Игнатъева, Н.А. Дмитричева, **З.С. Шпрах** // *Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»*. – **Российский биотерапевтический журнал**. – 2015. – Т.14 – № 1. – С.150. [Перечень ВАК]

39. Мусияк, В.В. Идентификация продуктов гидролитического разложения нового противоопухолевого препарата Ормустин / В.В. Мусияк, И.Н. Ганебных, Т.В. Матвеева, Г.Л. Левит, **З.С. Шпрах**, В.П. Краснов. В книге: XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Тезисы докладов в 5 томах. – Уральское отделение Российской академии наук. – 2016. – С. 523.

40. **Шпрах, З.С.** Аналог гипоталамического гормона Цифетрилин: доклиническое изучение и первый опыт клинического применения / **З.С.Шпрах** // *Материалы IV Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи», Автономная некоммерческая научно-медицинская организация «Вопросы онкологии»*. – 2018. – С. 169. [Scopus]

41. **Шпрах, З.С.** Лекарственные средства для лечения нейроэндокринных опухолей. Фармацевтическая разработка на протяжении жизненного цикла / **З.С. Шпрах** // В книге: Гармонизация подходов к фармацевтической разработке. Сборник тезисов Международной научно-практической конференции. РУДН. – 2018. – С. 212–214.

42. **Shprakh, Z.S.** A modern approach to development of antitumor drugs: the case of somatostatin analogue / **Z.S. Shprakh** // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants «MedChem Russia 2019». – 2019. – P. 112.

43. Musiyak, V.V. Features of Hydrolytic Decomposition of Antitumor Agents Lysomustine and Ormustine / V.V. Musiyak, M.G. Pervova, I.N. Ganebnykh, **Z.S. Shprakh**, V.P. Krasnov // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants «MedChem Russia 2019» – 2019. – P. 80.

44. Shprakh, Z. Somatostatin analogue: One substance and two formulations / **Z.S. Shprakh**// 22nd International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Formulations // **J Formul Sci Bioavailab.** – 2019. – Vol. 3. – P. 48.

45. **Shprakh, Z.** New somatostatin analogue interacts with receptors of experimental tumour models / **Z. Shprakh**, V. Delektorskaya, I. Kubasova, M. Kiseleva, S. Kovalenko // **FEBSOpenBIO.** – 2021. – Vol.11. – No. S1. – P. 216. [**Scopus**]

46. Средство, обладающее противоопухолевым действием / Л.И. Смирнова, С.В. Устинкина, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова, З.С. Смирнова, И.Ю. Кубасова, **З.С. Шпрах**. Патент на изобретение RU2254139 С1. 20.06.2005.

47. Способ получения  $N^{\delta}$ -нитрозо- $N^{\delta}$ -[(2-хлорэтил)карбомоил]-L-орнитина / В.П. Краснов, Г.Л. Левит, В.В. Мусияк, Т.В. Матвеева, А.А. Тумашов, **З.С. Шпрах**, В.Н. Чарушин. Патент на изобретение RU2601753 С1. 10.11.2016.

48. Средство для лечения гормонозависимых опухолей и способ его получения / М.В. Дмитриева, Е.В. Санарова, Л.И. Смирнова, Н.А. Оборотова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, **З.С. Шпрах**, С.В. Устинкина, А.В. Ланцова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, Л.Л. Николаева, Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева, Д.В. Гусев. Патент на изобретение RU2703533 С1. 21.10.2018.

49. Противоопухолевое лекарственное средство для перорального применения / А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Л.И. Смирнова, С.В. Устинкина, **З.С. Шпрах**, Е.В. Игнатьева, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, М.В. Дмитриева, Л.Л. Николаева, А.В. Ланцова, И.С. Голубева, Н.А. Оборотова, Е.В. Санарова, Н.Ю. Кульбачевская, Н.П. Ермакова, Д.В. Гусев, В.С. Косоруков. Патент на изобретение RU2748989 С1. 06.08.2020.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

- АФС – активная фармацевтическая субстанция
- ВВ – вспомогательные вещества
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания
- ИГХ – иммуногистохимический анализ
- ЛМ – лактозы моногидрат
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛС – лекарственное средство
- ЛФ – лекарственная форма
- МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза
- МС – модельная смесь
- НД – нормативная документация
- НЭО – нейроэндокринные опухоли
- ОПР – опытно-промышленный регламент
- ОФС – общая фармакопейная статья
- ПВ – повидон
- РШМ5 – рак шейки матки (экспериментальная опухоль мышей)
- ТП – технологический процесс
- ТРО – торможение роста опухолей
- УПЖ – увеличение продолжительности жизни
- УФ – ультрафиолетовая спектроскопия
- ФС – Фармакопейная статья
- ФСП – Фармакопейная статья предприятия
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- CQA – Critical Quality Attribute, критичный показатель для качества продукта
- ICH – International Conference on Harmonization
- GMP – Good Manufacturing Practice, Надлежащая Производственная Практика
- LSL – Lower Specification Limit, наименьшее предельное значение показателя качества
- QbD – Quality-by-Design, качество путем разработки
- QTPP – Quality Target Product Profile, целевой профиль качества продукта
- RAMM – The Risk Analysis and Mitigation Matrix, метод матрицы анализа и снижения рисков
- SSTR1-5 – somatostatin receptors, рецепторы к соматостатину
- USL – Upper Specification Limit, наибольшее предельное значение показателя качества