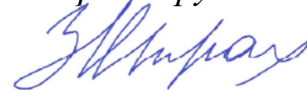


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ  
ИМЕНИ Н.Н. БЛОХИНА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*



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

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора фармацевтических наук

**Научные консультанты:**  
доктор фармацевтических наук, профессор  
Бунятян Наталья Дмитриевна  
  
доктор фармацевтических наук, профессор  
Краснюк Иван Иванович

Москва – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	6
<b>ГЛАВА 1. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ</b>	
<b>НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....</b>	<b>18</b>
1.1 Лекарственные средства для таргетной терапии .....	20
1.2 Химиотерапевтические лекарственные средства .....	22
1.2.1 Производные нитрозоалкилмочевины и их лекарственные формы .....	24
1.3 Лекарственные средства для биотерапии нейроэндокринных опухолей.....	44
1.3.1 Аналоги соматостатина. Лекарственные формы .....	44
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	
2.1 Материалы и реактивы .....	62
2.1.1 Активные фармацевтические субстанции, вспомогательные вещества и реактивы .....	62
2.2 Оборудование .....	63
2.3 Методы исследования.....	65
2.3.1 Аналитические методы.....	65
2.3.2 Валидация аналитических методик.....	71
2.3.3 Методы оценки фармацевтико-технологических характеристик .....	73
2.3.4 Иммуногистохимическое исследование экспрессии рецепторов к соматостатину в экспериментальных опухолях животных .....	74
2.3.5 Методы, использованные в исследованиях на лабораторных животных .....	76
2.4 Основные элементы концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD).....	81
2.5 Определение индексов воспроизводимости процессов .....	84
2.6 Метод матрицы анализа и снижения рисков.....	84
2.7 Статистическая обработка данных.....	85
<b>ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ТРАНСФЕРУ ТЕХНОЛОГИИ</b>	
<b>ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА АРАНОЗА ЛИОФИЛИЗАТ ДЛЯ</b>	
<b>ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ 0,5 Г .....</b>	<b>87</b>

3.1 Применение концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD) при трансфере технологии получения лекарственного препарата Араноза .....	89
3.2 Масштабирование технологического процесса производства Аранозы.....	100
3.3 Валидация технологических операций производства Аранозы лиофилизата для приготовления раствора для инъекций .....	102
3.4 Изолирующие технологии в производстве лекарственного препарата на основе высокотоксичной субстанции араноза.....	106
3.5 Изучение диабетогенного действия аранозы .....	117
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ, ВАЛИДАЦИИ И ТРАНСФЕРУ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА АРАНОЗА .....	122
4.1 Исследования по валидации методики количественного определения аранозы в фармацевтической субстанции .....	123
4.2 Исследования по разработке и валидации методик контроля качества лекарственного препарата Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г.....	131
4.2.1 Разработка и валидация методик определения подлинности лекарственного препарата Араноза.....	131
4.2.2 Разработка и валидация методики определения родственных примесей в лекарственном препарате Араноза .....	134
4.2.3 Разработка и валидация методики количественного определения аранозы в лекарственном препарате .....	137
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ЦИФЕТРИЛИН.....	147
5.1 Разработка методик определения подлинности цифетрилина .....	148
5.2 Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в фармацевтической субстанции .....	158
5.3 Определение родственных примесей в АФС цифетрилин .....	167
5.4 Изучение условий хранения и стабильности фармацевтической субстанции цифетрилин .....	171

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА АНАЛОГА СОМАТОСТАТИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ	177
6.1 Определение пути введения лекарственного средства цифетрилин .....	177
6.1.1 Изучение экспрессии рецепторов к соматостатину в экспериментальных опухолях животных.....	177
6.1.2 Выбор оптимального пути введения лекарственного средства .....	190
6.2 Разработка технологии получения таблеток цифетрилина .....	191
6.2.1 Изучение фармацевтико-технологических свойств цифетрилина.....	191
6.2.2 Выбор вспомогательных веществ для получения таблеток цифетрилина...	193
6.2.3 Изучение возможности использования метода влажного гранулирования для получения таблеток цифетрилина .....	195
6.3 Применение концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD) при разработке лекарственного средства цифетрилин.....	200
6.3.1 Технологический процесс получения таблеток цифетрилина .....	202
6.4 Валидация технологического процесса получения таблеток цифетрилина ...	208
6.5 Оценка противоопухолевой активности таблеток цифетрилина 6 мг .....	212
ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ЦИФЕТРИЛИН ТАБЛЕТКИ 6 МГ .....	219
7.1 Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в таблетках .....	221
7.2 Изучение условий хранения и стабильности таблеток цифетрилина 6 мг .....	235
ГЛАВА 8. РАЗРАБОТКА ТАБЛЕТОК ЦИФЕТРИЛИНА НОВОГО СОСТАВА .....	242
8.1 Разработка технологии получения таблеток цифетрилина 60 мг .....	242
8.2 Разработка методик контроля качества таблеток цифетрилина 60 мг .....	245
8.3 Изучение условий хранения и стабильности таблеток цифетрилина 60 мг ...	249
8.4 Оценка противоопухолевой активности таблеток цифетрилина 60 мг .....	253
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	255
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ .....	259
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	262

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	266
Приложение А. Патенты на изобретения .....	315
Приложение Б. Акт о внедрении результатов научно-исследовательской..... работы в учебный процесс .....	323
Приложение В. Акты о внедрении (использовании) результатов научной и инновационной деятельности .....	324
Приложение Г. Опытно-промышленные регламенты.....	326
Приложение Д. НД по контролю качества лекарственных средств .....	328
Приложение Е. Разрешения на клинические исследования лекарственных препаратов для лечения НЭО .....	332

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 [Oronsky 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-дезоксидезокси-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 стрептозотозин в настоящее время не зарегистрирован.

Лекарственным препаратом (ЛП), наиболее близким к стрептозотоцину 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 Вос-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 *in vivo* 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, ормустин). 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. Инъекции 3–4 раза в день делают 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.

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 достаточного уровня противоопухолевой активности.

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 и задачи исследования**

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 цифетрилин 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 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 подтверждена получением 4 патентов на изобретения РФ (RU2254139 С1 от 20.06.2005; RU2601753 С1 от 10.11.2016; RU2703533 С1 от 21.10.2018 и RU2748989 С1 от 06.08.2020) (Приложение А).

### **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.

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 Фирма «ГЛЕС» и ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО» при контроле производственного процесса и стандартизации препарата (Приложение В; Приложение Г; Приложение Д).

Предложенные технологические решения позволили успешно провести трансфер технологии и аналитических методик производства ЛП Араноза и

получить необходимое количество ЛП для проведения клинических исследований (Приложение Е).

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». Основные технологические стадии производства и валидированные методики контроля качества ЛС цифетрилин апробированы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Приложения В; Приложение Г; Приложение Д).

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 (Приложение Е).

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.

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) (Приложение Б).

### **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 (GMP EC) и ICH Q9 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

### **Степень достоверности результатов**

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) конференция «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 фармакопей 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.

### **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.

### **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 и оформления автореферата и диссертационной работы.

### **Соответствие паспорту специальности**

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальностей 14.04.01 «Технология получения лекарств» и 14.04.02 «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 «Разработка лекарственных форм противоопухолевых препаратов с организацией лабораторного производства», 114112440113 «Аналитические исследования потенциальных противоопухолевых соединений; стандартизация отобранных веществ и созданных на их основе лекарственных форм; разработка нормативной



документации», АААА-А20-120031190013-9 «Фармацевтическая разработка и доклинические исследования оригинальных инновационных лекарственных средств с улучшенным профилем безопасности для лечения злокачественных новообразований»; 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.).

### **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 286 – на иностранных языках.

## ГЛАВА 1. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) развиваются из клеток диффузной нейроэндокринной системы и представляют собой очень гетерогенную группу новообразований. НЭО могут возникнуть практически в любых органах и тканях – центральной нервной системе, железах внутренней секреции, ЖКТ, почках, коже, тимусе и других [144; 313]. В настоящее время НЭО называют всю группу новообразований из клеток диффузной нейроэндокринной системы, заменив ранее существовавший термин «карциноид» [18; 243].

По данным эпидемиологических исследований НЭО являются достаточно редким заболеванием – их количество составляет от 0,5% до 1,0% от общего числа опухолей зарегистрированных впервые [370].

В последние три десятилетия заболеваемость НЭО интенсивно растет: ретроспективная оценка заболеваемости НЭО по программе SEER, показала, что с 1973 по 2012 год обнаружение НЭО всех локализаций в США выросло в 6,4 раза и достигло 6,98 случаев на 100000 населения [184].

В 2014 году в США общее количество больных НЭО превысило 170000, НЭО впервые диагностированы более чем у 12000 пациентов. Тем не менее, заболеваемость НЭО по-прежнему соответствует критериям орфанного заболевания: менее 200000 на количество жителей США в целом [168; 227; 295]. По прогнозам экспертов ВОЗ в ближайшие 2–3 года количество заболеваемости НЭО возрастет до 8 случаев на 100 тысяч населения [416].

Достоверно причины такого роста данного вида злокачественных опухолей не установлены, но они могут включать как фактическое увеличение случаев заболевания, так и совершенствование методов диагностики данного вида злокачественных опухолей. Определенное влияние также оказывают онкологическая настороженность (более частое проведение скрининговых обследований для выявления онкологических заболеваний), факторы внешней среды, использование современных лекарственных средств (ЛС). И все же об

истинных цифрах заболеваемости НЭО судить сложно, поскольку частота выявления НЭО зависит от степени выраженности клинических симптомов, которые часто отсутствуют до возникновения осложнений или до развития карциноидного синдрома [227; 256; 416].

В России национальный регистр по учету НЭО или приблизительные данные о распространенности патологии отсутствуют, однако с учетом численности населения России можно предположить, что ежегодно должно регистрироваться около 7350 больных НЭО [13].

С точки зрения места локализации первичной опухоли наибольшее количество НЭО развивается в ЖКТ (около 20 % – в толстом кишечнике, 19 % – в тонком кишечнике; 7% – в поджелудочной железе и 4% – в аппендиксе) [210] и бронхолегочной системе (около 25%) [283]. Соответственно, НЭО легких, тонкого кишечника и прямой кишки демонстрируют самые высокие показатели заболеваемости. Встречаются также НЭО редких локализаций [244; 370].

Гипотезы появления НЭО предполагают, что НЭО:

- образуются из зрелых нейроэндокринных клеток в результате мутаций,
- они происходят из предшественников нейроэндокринных клеток, которые претерпевают мутации;
- происходят из *не*-нейроэндокринных клеток, которые приобретают нейроэндокринные характеристики в процессе канцерогенеза вследствие потери определенных генов [181; 315].

НЭО характеризуются синтезом более 60 типов пептидов и биогенных аминов, которые обычно действуют как гормоны или нейротрансмиттеры, влияют на деление и рост разных типов клеток и обуславливают наличие связанных с опухолью специфичных симптомов, по которым НЭО могут быть диагностированы [319]. Кроме того, для диагностики НЭО проводят определение биомаркеров плазмы крови и мочи, а более точный гистопатологический диагноз устанавливают иммуногистохимически [238; 416].

В качестве первой линии лечения НЭО используют хирургическое удаление опухоли, позволяющее добиться полного выздоровления больных [151; 202; 238; 250; 306]. Однако в большинстве случаев хирургическая операция носит лишь паллиативный характер, так как более, чем у 50% пациентов на момент постановки диагноза обнаруживается уже распространенный процесс [48; 70]. Для неоперабельных опухолей цель лечения заключается в контроле опухолевого роста и симптомов заболевания, обусловленных гиперпродукцией аминов и гормонов, и осложнений, вызванных ростом опухоли, и увеличении продолжительности жизни [48; 306]. У пациентов с прогрессированием заболевания существующие возможности лечения ограничены.

Стратегию лекарственного лечения НЭО определяет их разделение на функционально активные (функционирующие) и нефункционирующие [284; 285; 304; 407], хотя сегодня некоторые исследователи считают, что концепция такого разделения НЭО является архаичной, поскольку данные опухоли не различимы на клеточном, биологическом и морфологическом уровнях [286].

Современная системная терапия НЭО включает как цитотоксические лекарственные препараты и их комбинации, так и биотерапевтические (аналоги соматостатина и интерферона) и таргетные препараты (эверолимус, сунитиниб, бевацизумаб) [193; 198].

### **1.1 Лекарственные средства для таргетной терапии**

Изучение молекулярных особенностей НЭО позволило выявить мишени для направленной (таргетной) системной терапии этих опухолей.

#### *Ингибиторы mTOR*

Рядом исследователей показано, что рост, пролиферация, ангиогенез и метаболизм нейроэндокринных опухолевых клеток в значительной степени обусловлены гиперактивацией сигнального пути PI3K/AKT/mTOR [174; 178; 214; 421]. То есть можно предположить, что таргетные препараты, направленные на

ингибирование mTOR, могут быть эффективными терапевтическими агентами для лечения НЭО [167; 418].

*Эверолимус* (RAD – (40-*O*-(2-гидроксиэтил)-рапамицин) – ингибитор mTOR, применяемый для специфической терапии НЭО ПЖ и других отделов пищеварительной системы в режиме монотерапии или в комбинации с АС. Ингибирование mTORC1 приводит к торможению синтеза протеинов, роста и пролиферации опухолевых клеток. Эверолимус также подавляет экспрессию васкулярного эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor, VEGF) и фактора, индуцируемого гипоксией, блокируя ангиогенез в опухоли [156; 255].

Современное исследование эверолимуса 3 фазы RADIANT-4 у 302 пациентов с распространенными прогрессирующими высокодифференцированными нефункционирующими НЭО легких и ЖКТ показало, что эверолимус на 52% снижает риск прогрессирования заболевания. В клиническом исследовании также продемонстрировано увеличение медианы времени до прогрессирования при приеме эверолимуса на 7,1 месяцев (до 11,0 месяцев) [360].

#### *Ингибиторы ангиогенеза*

Как показано А. Couvelard с соавторами [179], важную роль в развитии НЭО играет васкуляризация: такие опухоли характеризуются повышенной экспрессией васкулярного эндотелиального фактора роста, тромбоцитарного фактора роста, а также С-КІТ и их рецепторов, которые вовлечены в ангиогенез и являются потенциальными мишенями для терапевтического лечения [132; 325; 362]. ЛП, ингибирующие ангиогенез (антиангиогенные препараты), эффективно ограничивают рост опухоли, увеличивают время до прогрессирования и/или общую выживаемость, что позволяет перевести НЭО в хроническое заболевание. Кроме того, антиангиогенные препараты имеют удовлетворительный профиль токсичности и могут применяться в течение длительного времени [39; 173].

Значимую эффективность в лечении пациентов с панкреатическими НЭО демонстрирует мультитаргетный ингибитор сунитиниб (сунитиниба малат;

SU11248; SUTENT; Pfizer Inc, США) – мультитаргетный ингибитор тирозинкиназы с противоопухолевой и антиангиогенной активностью [199]. В экспериментах *in vitro* установлено, что сунитиниб ингибирует рост клеточных линий, экспрессирующих рецепторы тромбоцитарного фактора роста, васкулярного эндотелиального фактора роста, а также рецептор фактора стволовых клеток, Fms-подобную тирозинкиназу-3, рецепторы колониестимулирующего фактора 1 и рецепторы нейротрофического глиального фактора [137; 277], а также индуцирует апоптоз в эндотелиальных клетках пуповинной вены человека [200].

В 2011 году сунитиниб одобрен для лечения прогрессирующих высокодифференцированных НЭО поджелудочной железы у пациентов с неоперабельными, локально распространенными опухолями или метастатической болезнью [158]. Опыт применения сунитиниба для лечения НЭО поджелудочной железы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России показал, что эффективность и профиль безопасности препарата соответствует данным, представленным в научной литературе [76].

Бевацизумаб – гуманизированное моноклональное антитело, которое специфически связывается с VEGF в кровяном русле и блокирует его дальнейшее связывание с соответствующим рецептором, экспрессируемым опухолевыми клетками [235]. Анализ отдельных случаев продолжительного лечения бевацизумабом в комбинации показывает, что применение препарата позволяет достигнуть длительной стабилизации заболевания и увеличивает как время без прогрессирования, так и общую продолжительность жизни [35; 176; 246; 419].

## **1.2 Химиотерапевтические лекарственные средства**

Роль химиотерапии в лечении НЭО является предметом постоянного обсуждения. Ответы на химиотерапевтическое лечение являются чрезвычайно гетерогенными и зависят, прежде всего, от степени дифференцировки опухоли и расположения первичного очага: в целом, высокодифференцированные НЭО хуже

отвечают на химиотерапию цитостатиками, чем низкодифференцированные. Однако данная зависимость не является абсолютной и пациенты с высокодифференцированными опухолями, демонстрирующими агрессивный рост и/или течение болезни с декомпенсированными клиническими симптомами, а также резистентными к другим видам лечения, могут получать химиотерапевтическое лечение [402]. Наиболее эффективным является использование цитостатиков у пациентов с метастатическими гастропанкреатическими НЭО. НЭО других локализаций демонстрируют более слабый ответ на лечение [302; 307; 363; 386; 419].

Стандартная химиотерапия панкреатических НЭО включает комбинацию адриамицина и стрептозоцина (STZ), реже используется комбинация STZ и 5-фторурацила [336; 343].

Более подробно о стрептозоцине и других производных нитрозомочевины, механизмах их действия и лекарственных формах рассказано в *ГЛАВЕ 1, 1.1.2.1 Производные нитрозомочевины и их лекарственные формы.*

Благоприятный профиль токсичности в лечении метастатических панкреатических НЭО установлен для темозоломида. *Темозоломид* – [3,4-дигидро-3-метил-4-оксоимидазо[5,1-d]-1,2,3,5-тетразин-8-карбоксамид] – препарат, схожий с дикарбазином по химической структуре, образующий при попадании в системный кровоток метаболит (монометилтриазеномидазолкарбоксамид), способный метилировать ДНК [290].

Наиболее ярко синергизм применения двух препаратов проявился в клиническом исследовании комбинации темозоломида и капецитабина – объективный ответ на терапию составил 70%, а общая выживаемость без прогрессирования достигала 18 месяцев [363].

Роль химиотерапии в лечении низкодифференцированных НЭО ЖКТ (не панкреатических) более неопределенна, ввиду относительно низкой эффективности, показанной в небольших клинических исследованиях с применением STZ, 5-фторурацила, капецитабина, темозоломида и доксорубина [182].

### **1.2.1 Производные нитроалкилмочевины и их лекарственные формы**

Производные нитроалкилмочевины (НАМ) – класс противоопухолевых соединений, которые широко используются в клинической практике для лечения различных солидных опухолей и лейкозов [215].

В настоящее время в Российской Федерации зарегистрировано 5 лекарственных препаратов, производных нитроалкилмочевины. Данные ЛП демонстрируют одинаковый механизм цитотоксического и противоопухолевого действия, который является результатом неферментного разрушения с образованием продуктов с алкилирующей и карбомоилирующей активностью. Кроме того, спонтанная деградация производных НАМ сопровождается образованием органических изоцианатов, которые способны карбомоилировать лизиновые остатки протеинов, что приводит к нарушению восстановления некоторых ферментов репарации ДНК [258; 294].

Производные НАМ используются для лечения злокачественных новообразований различной этиологии (Таблица 1).



Таблица 1 – Производные НАМ в обращении на фармацевтическом рынке Российской Федерации [28]

МНН	Торговое наименование <sup>1</sup> , производитель	Показания к применению	Лекарственная форма
Кармустин	БиКНУ	Злокачественные опухоли головного мозга и метастазы в головной мозг, множественная миелома, лимфогрануломатоз, неходжкинские лимфомы, меланома	Лиофилизат для приготовления раствора для инфузий 100 мг в комплекте с растворителем (этанол 3,0 мл)
Ломустин	СииНУ, Ломустин Медак	Первичные и метастатические опухоли мозга, лимфогрануломатоз (болезнь Ходжкина), рак желудка и кишечника и некоторые солидные опухоли	Капсулы 40 мг
Фотемустин	Мюстофоран	Диссеминированная злокачественная меланома (особенно с метастазами в мозг), злокачественные опухоли головного мозга	Порошок для приготовления раствора для инфузий 208 мг в комплекте с растворителем
Лизомустин	Лизомустин ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО», Россия	Меланома кожи, рак легкого	Лиофилизат для приготовления раствора для инфузий
Араноза	Араноза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО»	Меланома кожи, монотерапия нейроэндокринных опухолей различной локализации	Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций

Примечание – В Таблице 1 приведены торговые наименования ЛП производных НАМ, зарегистрированные в Российской Федерации [28]

## Стрептозотоцин

Как указано выше, в течение долгого времени основным химиотерапевтическим препаратом для лечения НЭО считался стрептозотоцин [235; 343].

Стрептозотоцин – соединение природного происхождения, продуцируемое почвенной бактерией *Streptomyces achromogenes*, представляющее собой смесь  $\alpha$ - и  $\beta$ -стереоизомеров (Рисунок 1).

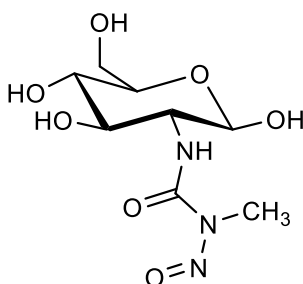


Рисунок 1 – Стрептозотоцин

Химическое название – 2-дезоксид-2(метилнитрозокарбомойл)- $\alpha$ -D-глюкопираноза

Эмпирическая формула  $C_8H_{15}N_3O_7$

Молекулярная масса 265,00

Стрептозотоцин – белый или светло-желтый кристаллический порошок, легко растворимый в воде и этиловом спирте 95% и мало растворимый в полярных органических растворителях [395; 401; 405]. STZ – производное глюкозамина, в котором цитотоксическая группа (N-метил-N-нитрозомочевина) присоединена к молекуле глюкозы. STZ представляет собой гидрофильное соединение, легко растворимое в воде и физиологическом растворе, растворимое в этаноле. STZ чувствителен к свету и влажности и быстро разлагается при температуре выше 70°C. Раствор STZ относительно стабилен при pH 7,4 и 37°C в течение 1 часа. Водный раствор STZ можно хранить при комнатной температуре в защищенном от света месте, в таком случае его необходимо использовать в течение 12 часов [257; 327; 350]. Период полужизни STZ в плазме крови составляет 5–15 минут.

STZ используют как химиотерапевтический ЛП алкилирующего действия: он ингибирует синтез ДНК как в бактериальных клетках, так и в клетках млекопитающих [161; 259].

Особенно сильное цитотоксическое воздействие STZ оказывает на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы: эффект препарата проявляется в течение 72 часов после введения и является дозозависимым.

В настоящее время механизм цитотоксического действия STZ изучен не до конца и представляется следующим образом: как токсический аналог глюкозы (Glu) и N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) STZ аккумулируется  $\beta$ -клетками поджелудочной железы посредством захвата транспортером GLUT 2 [393].

При метилировании ДНК остатком нитрозоалкилмочевины в положении O<sub>6</sub> гуанина происходит фрагментация ДНК  $\beta$ -клеток, что приводит к их гибели. Активация поли(АДФ-рибозы)полимеразы (polyADP-ribose polymerase, PARP) как части механизма репарации ДНК вызывает истощение клеточной NAD<sup>+</sup> и, как результат, уменьшение запасов АТФ и энергетическую недостаточность  $\beta$ -клеток. Несмотря на то, что STZ также метилирует белки  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, именно метилирование ДНК является наиболее ответственным за цитотоксический эффект препарата [292; 324].

Кроме этого, по всей видимости, механизм цитотоксического действия STZ включает образование в процессе метаболизма свободных радикалов, таких как пероксид водорода, и гиперпродукцию окиси азота [84; 382; 393; 416], а также влияние на клеточный сигнальный путь NF- $\kappa$ B. Следует особо отметить, что STZ индуцирует дисфункцию и апоптоз  $\beta$ -клеток в концентрациях ниже, чем вызывает некроз этих клеток [223; 245; 248].

В доклинических исследованиях показана противоопухолевая активность STZ на модели лейкоза мышей L1210 в широком диапазоне доз при различных режимах парентерального введения.

Лекарственный препарат STZ (торговое название Занозар, TEVA PHARMS, USA) содержит 1 г АВ и 220 мг безводной лимонной кислоты и представляет собой стерильный лиофильно высушенный ЛП. Раствор для внутривенного

введения получают, прибавляя к содержимому флакона воду для инъекций или раствор глюкозы, или раствор натрия хлорида для инъекций. При соблюдении условий растворения рН раствора составляет от 3,5 до 4,5. В случае необходимости рН раствора регулируется добавлением раствора гидроксида натрия или хлористоводородной кислоты.

Стрептозотоцин – первый ЛП, продемонстрировавший эффективность при лечении панкреатических НЭО [288].

FDA одобрила STZ для монотерапевтического или комбинированного (в сочетании, например, с доксорубицином, фторурацилом и др.) лечения НЭО поджелудочной железы. Обычно препарат применяют у пациентов, хирургическое лечение которых невозможно, в дозах 500 мг/м<sup>2</sup>/день в течение 5 дней, повторяя циклы лечения каждые 4–6 недель [170]. Несмотря на то, что комбинированная химиотерапия, включающая STZ и 5-фторурацил, является общепринятым стандартом лечения НЭО, такое лечение часто сопровождается значительной токсичностью [187; 318].

В двух ранних рандомизированных клинических исследованиях, в которых оценивали биохимический и клинический ответы, продемонстрирована высокая эффективность комбинаций STZ и 5-фторурацила и STZ и доксорубицина – частота ответа составила до 63% и 69%, соответственно [146; 288; 289]. В более позднем ретроспективном клиническом исследовании STZ, 5-фторурацила и доксорубицина показан объективный ответ, равный 39% [251].

Схожий объективный ответ (33%) в клиническом исследовании II фазы у пациентов с панкреатическими НЭО достигнут при использовании другого цитотоксического агента – дакарбазина ([5-(3,3-диметил-1-триазено)-имидазол-4-карбоксамид]). Однако эти результаты были сведены к минимуму высоким уровнем токсичности химиотерапии [332].

Ввиду высокой токсичности STZ для β-клеток поджелудочной железы в научных исследованиях препарат используют для индукции инсулина и диабета у экспериментальных животных [211; 221].

В Российской Федерации STZ не производится и в настоящее время на российский фармацевтический рынок не поставляется [28].

### Кармустин

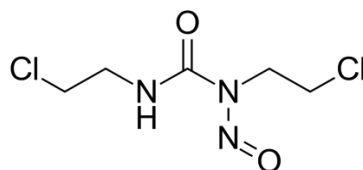


Рисунок 2 – Кармустин

Химическое название – 1,3-ди(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина (Рисунок 2)

Эмпирическая формула  $C_5H_9Cl_2N_3O_2$

Молекулярная масса 214,05

Кармустин является активным фармацевтическим ингредиентом двух ЛФ, применяемых внутривенно и интракраниально. На российском фармацевтическом рынке представлена только лекарственная форма для внутривенных инфузий, которая представляет собой лиофилизат (в виде отдельных мелких хлопьев или лиофилизированной массы), содержащий 100 мг АВ, в комплекте с растворителем (3 мл стерильного этанола). Перед введением к ЛП прибавляют последовательно растворитель и 27 мл воды для инъекций и получают раствор, содержащий 3,3 мг кармустина в 10%-ом этаноле. К полученному раствору прибавляют 500 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия или 5%-го раствора глюкозы (концентрация кармустина в растворе для инфузий около 0,07 мг/мл).

Лиофилизированная ЛФ кармустина не содержит консервантов и выпускается в однократных контейнерах из стекла или полиэтилена, не содержащего поливинилхлорид. Растворение лиофилизата и дальнейшее разведение следует проводить в асептических условиях, при этом необходимо избегать контакта препарата с кожей, используя хирургические перчатки, нарукавники и респиратор.

Низкая молекулярная масса и хорошая растворимость в липидах позволяют кармустину проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), что делает

логичным применение препарата для лечения опухолей головного мозга, как первичных, так и метастатических.

Внутривенное введение препарата при лечении опухолей мозга ограничено значительной острой токсичностью для костного мозга и ЖКТ и отсроченными токсическими эффектами для печени и легких [311]. А внутриартериальное применение раствора кармустина сопровождалось неприемлемой офтальмологической и неврологической токсичностью и не позволило увеличить общую выживаемость пациентов с злокачественными глиомами [349].

Попытка разработки ЛФ кармустина для лечения злокачественных опухолей головного мозга привела к созданию ЛП с пролонгированным высвобождением кармустина – Глиадел<sup>®</sup>.

Глиадел<sup>®</sup> – имплантат для интракраниального введения [396], который вводится непосредственно в операционное поле, что обеспечивает максимальный и длительный контакт препарата с опухолью и минимизирует общее системное воздействие на организм. У пациентов с рецидивирующей мультиформной глиобластомой препарат продемонстрировал небольшой, но значимый клинический эффект [169]. Глиадел<sup>®</sup> представляет собой стерильную облатку, диаметром примерно 1,45 см и толщиной 1 мм, содержащую 7,7 мг (3,85%) кармустина, равномерно распределенного в полимерной матрице. Каждая облатка также содержит 102,3 мг биodeградируемого полиангирида кополимера полифепросана 20 (поли[бис(р-карбоксифенокси)]пропана и себаценовой кислоты (PCPP:SA) в молярном соотношении 20:80 [349]. Для получения препарата кармустин смешивают с полифепросаном 20 в растворе дихлорметана, после выпаривания растворителя полученный порошок прессуется в облатки. Если позволяет размер, в полость, образовавшуюся при хирургическом удалении опухоли, вводят 8 таких облаток, то есть при имплантации может быть введено до 61,6 мг кармустина. При соприкосновении с водным содержимым операционной полости происходит деградация полимера, сопровождающаяся высвобождением кармустина. В деградации полимера можно выделить две фазы: на первой фазе, которая длится примерно 10 часов, происходит гидролиз ангидридных связей

кополимера: связи себациновая кислота-себациновая кислота и себациновая кислота-СРР деградируют достаточно быстро, значительно медленнее разрушаются связи СРР-СРР. Постепенная деградация кополимера не только способствует медленному высвобождению кармустина, но и защищает его от инактивации после высвобождения. После начального разрушения связей полимера следует фаза эрозии, развивающейся на поверхности облатки, что подтверждается данными, полученными методом электронной микроскопии [183; 265]. Высвободившийся из Глиадела кармустин диффундирует в окружающие ткани головного мозга в точной терапевтической дозе и, алкилируя ДНК и РНК, проявляет противоопухолевый эффект [165; 204; 400]. В экспериментах *in vitro* высвобождение Кармустина происходит в течение 3–4 дней. У пациентов скорость высвобождения препарата индивидуальна и меняется от пациента к пациенту: обычно длительность высвобождения кармустина составляет от нескольких дней до нескольких недель (обычно 70% кополимера распадается на мономеры в течение трех недель [242]). Однако некоторые данные, полученные при повторной операции или аутопсии, демонстрируют остатки облаток с минимальными количествами кармустина и через 232 дня после имплантации Глиадела.

Упаковка Глиадела содержит 8 облаток, помещенных индивидуально в двухслойные саше из алюминиевой фольги, покрытые легко отслаивающейся пленкой. Внутренняя поверхность саше стерильна и предназначена для сохранения стерильности продукта и его защиты от влажности внешней среды. Глиадел должен храниться при температуре  $-15^{\circ}\text{C}$ . Невскрытые облатки могут храниться при комнатной температуре максимально в течение шести часов [189].

Созданию ЛФ кармустина, в том числе, средств направленной доставки, способных снизить системную токсичность и повысить терапевтическую эффективность препарата при лечении злокачественных новообразований головного мозга, посвящено значительное количество исследований. В большинстве работ продемонстрирована высокая противоопухолевая активность

таких ЛФ в опытах *in vitro* и в доклинических исследованиях, но трансляция полученных результатов в клиническую практику была неудачной.

Наиболее успешным оказался препарат DTI015 – раствор кармустина для интратуморального введения (внутриопухолевых инъекций) (Direct Therapeutics, Inc., США), получивший в ЕС и США статус препарата для лечения орфанного заболевания – интракраниальных злокачественных новообразований (глиом). DTI015 представляет собой раствор кармустина в абсолютном этиловом спирте (концентрация кармустина – 12,5 мг/мл). Использование органического растворителя, смешивающегося с водой, позволяет препарату легко проникать через мембраны и создавать в опухоли высокую концентрацию АВ при скорости введения препарата 1 мл/мин.

Pietronigro et al. в доклинических исследованиях показали, что введение DTI-015 значительно ингибирует рост опухолей (40% излеченных экспериментальных животных с глиосаркомой T9) и увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных (> 400%), что, скорее всего, происходит за счет увеличения времени контакта препарата с опухолевыми тканями [159; 224; 226]. В клинических исследованиях I/II фазы DTI-015 продемонстрировал удовлетворительную переносимость пациентами с неоперабельными мультиформными глиобластомами [236].

Среди систем направленной доставки кармустина для лечения злокачественных глиом следует выделить биodeградируемые наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (poly(lactic-co-glycolic acid, PLGA):

- мицеллы, образованные PLGA, конъюгированным с пептидом T-7; демонстрирующие более выраженное и длительное накопление в опухоли по сравнению с неконъюгированным образцом [156; 385];

- резорбируемые полимерные микрочипы на основе PLGA диаметром 10 мм и толщиной 1 мм, содержащие 0,17, 0,67 или 1,24 мг кармустина. G.Y. Kim с сотрудниками показали, что кармустин в микрочипах более стабилен, чем в коммерческом имплантате Глиадел (содержание кармустина при 37°C через 48



часов составляет 70% и 38% от начального, соответственно), а скорость высвобождения препарата сравнима с результатами, полученными для имплантата [241]. Y. Li и G.Y. Kim продемонстрировали медленную деградацию тонкой полимерной мембраны, покрывающей микрочип, и высокую противоопухолевую активность ЛС по сравнению с «пустыми» микрочипами [264]. L. Qian и J. Zheng разработали наночастицы PLGA, модифицированные хитозаном, нагруженные кармустином в сочетании с O<sub>6</sub>-бензилгуанином. O<sub>6</sub>-бензилгуанин истощает запасы MGMT опухолевой клетки, что усиливает терапевтическую эффективность кармустина. При внутривенном введении в эксперименте такая наноструктурированная ЛФ значительно повышает продолжительность жизни крыс с глиомой F98 по сравнению с введением растворов двух ЛП отдельно или по сравнению с заключенным в наночастицы кармустином [331];

– микросферы кармустина размером около 35 мкм [239].

Исследования *in vitro* показали медленное высвобождение кармустина из микросфер в течение 21 дня. Исследователи отмечают, что 320 мг микросфер содержат 61,6 мг кармустина, что соответствует его содержанию в 1600 мг (8 облатках) Глиадела, и предполагают возможность стереотактического интракраниального введения препарата при помощи инъекционной иглы без резекции опухоли или циторедукции [195].

Особый интерес представляет система направленной доставки, использующая естественную транспортную систему головного мозга – рецептор-опосредованный эндоцитоз. Поскольку эндотелиальные клетки мозга и клетки глиобластомы экспрессируют рецепторы к лактоферрину, он представляется удачным агентом для повышения специфичности переносимого ЛС. Группой индийских исследователей получены наночастицы, в которых лактоферрин использовался как матрица, нагруженная кармустином. Наночастицы имели сферическую форму с диаметром 32–41 нм. Показано, что включение кармустина в такие наночастицы ощутимо выше ( $43 \pm 3,7\%$ ) по сравнению с включением в

коммерческий имплантат кармустина и частицы из биodeградируемых полимеров и составляет 3,85% и 28%, соответственно [312; 396].

Максимальную скорость высвобождения кармустина из наночастиц наблюдали при pH 5,85–7,35 (pH внеклеточной среды опухоли), что свидетельствует о возможности незначительной потери кармустина при системной циркуляции наночастиц и, соответственно, об их низкой системной токсичности. Полученные наночастицы с лактоферрином, нагруженные кармустином, продемонстрировали обещающие результаты в исследованиях эффективности *in vitro* [148].

### Ломустин

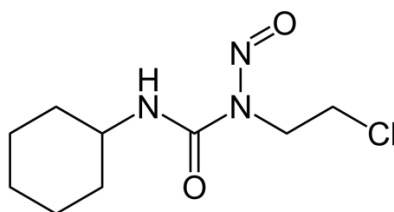


Рисунок 3 – Ломустин

Химическое название – 3-циклогексил-1-(2-(хлорэтил)-1-нитрозомочевина (Рисунок 3)

Эмпирическая формула  $C_9H_{16}ClN_3O_2$

Молекулярная масса 233,71

Ломустин практически нерастворим в воде, что делает логичной его ЛФ для приема внутрь. Препарат выпускается в форме желатиновых капсул в трех дозировках, содержащих 10, 40, и 100 мг ломустина и вспомогательные вещества (ВВ) – маннит и стеарат магния; капсулы содержат красители в зависимости от дозировки препарата – диоксид титана и/или оксид железа желтый и/или индигокармин (Indigotine – FD&C Blue2). ЛП может храниться при комнатной температуре.

Ввиду высокой растворимости ломустина в липидах и слабой ионизации соединения при физиологических значениях pH, ломустин достаточно эффективно проникает через ГЭБ, что делает возможным его применение для

лечения первичных и метастатических опухолей мозга. Однако клиническое применение ломустина, как и других производных НАМ, лимитируется нарушениями со стороны органов кроветворения (миелосупрессией) и ЖКТ (гепатотоксичностью), что приводит к ограничению используемой дозы ЛП.

Для увеличения концентрации препарата в опухоли и снижения общей токсичности предприняты попытки включения ломустина в наноструктурированные ЛФ наночастицы, липосомы и т.п.

Fisusi F.A. с коллегами разработали наночастицы, образованные GCPQ (N-пальмитоил-N-монометил-N,N-диметил-N,N,N-триметил-6-O-гликохитозаном) – самособирающимся амфифильным полимером, способным ускользать от захвата печенью при внутривенном введении. Внутривенное введение мышам с ксенографтом опухоли головного мозга U87MG таких наночастиц, нагруженных ломустином, позволило повысить концентрацию ломустина в плазме крови и, соответственно, в тканях головного мозга без повышения концентрации ломустина в областях потенциальной токсичности – печени и костном мозге [203].

A. Mehrotra и др. получили наночастицы хитозана, нагруженные ломустином, которые характеризовались двухфазным пролонгированным высвобождением АВ в течение 8 часов. Наночастицы эффективно ингибировали рост клеток рака легкого L132 [274].

Позднее эти же авторы включали ломустин в полимерные наночастицы, образованные PLG, и установили, что высвобождение ломустина из полученного полимерного матрикса *in vitro* имеет быструю стадию, которая продолжается 24 часа. Затем в течение 48 часов *in vivo* и *in vitro* происходит разрушение большого числа полимерных цепей, что приводит не только к повышению концентрации ломустина в легких, но и к замедлению элиминации и снижению токсичности [275].

Китайские исследователи разработали технологию получения мембран, содержащих микрокапсулы на основе желатина, включающих ломустин и показали *in vitro* медленное высвобождение ломустина из мембран в течение 10

дней. Предполагается, что такие мембраны могут быть имплантированы в организм животного или человека, где будет происходить равномерное высвобождение ломустина [367]. Сравнительные токсикологические исследования мембран ломустина и коммерческого препарата для перорального применения на здоровых мышцах показали, что имплантируемая ЛФ оказывает менее выраженное негативное воздействие на клетки крови и головного мозга и не вызывает острого угнетения костного мозга и нейротоксичности [368].

Исследователи под руководством С.Р. Bethune получили липосомы, включающие в липидную оболочку более 90% ломустина, и установили, что ассоциация с липидами значительно повышает стабильность препарата и его цитотоксическую активность на клеточной культуре медуллобластомы *in vitro*. Подкожное введение препарата увеличивало время циркуляции ЛП в крови и его накопление в опухоли, не усиливая гематологическую и нейротоксичность [154].

Исследования *in vivo* продемонстрировали, что липосомы ломустина значимо замедляют рост глиомы 36В-10 крыс Fisher F-344: в два раза эффективнее раствора ломустина при подкожном введении [155], в 10 раз – при прямом интракраниальном введении и в 15 раз более эффективны по сравнению с раствором ломустина в 0,9%-ом изотоническом растворе хлорида натрия с добавлением 10%-го этилового спирта и 2%-го Твина 80 [420].

Ломустин имеет отличный от STZ профиль безопасности. Клиническое применение схемы, включающей ломустин и фторурацил, показало значимое симптоматическое и гормональное улучшение и умеренный объективный ответ у пациентов с метастатическими гастроэнтеропанкреатическими НЭО. При этом проявления побочных эффектов были минимальными [237].

### Фотемустин

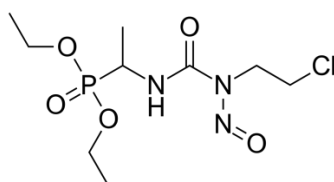


Рисунок 4 – Фотемустин

Химическое название – 1-(2-хлорэтил)-3-(1-диэтоксифосфорилэтил)-1-нитрозомочевина (Рисунок 4)

Эмпирическая формула  $C_9H_{19}ClN_3O_5P$

Молекулярная масса 315,69

Фотемустин – нитрозопроизводное третьего поколения, обладающее идеальным фармакологическим профилем для лечения первичных опухолей головного мозга, демонстрирующее эффективность при всех типах глиом [152]. Проникновение препарата в опухолевые клетки и прохождение через ГЭБ обусловлено присутствием в молекуле фотемустина биоизомера аланина (амино-1-этилфосфоновой кислоты).

Фотемустин обладает более выраженной липофильностью по сравнению с другими производными нитрозоалкилмочевины, такими как кармустин и ломустин [335]. Препарат продемонстрировал высокий коэффициент проницаемости в головной мозг при введении в правую наружную сонную артерию крыс [260]. Показано, что фотемустин активнее проникает в нейроны и нейроглии, чем кармустин [279].

Липофильность и способность фотемустина проникать через клеточные мембраны является причиной высокого объема распределения препарата в тканях, что делает его необычайно активным в отношении различных типов опухолей, особенно в отношении опухолей центральной нервной системы [266; 280].

Лиофилизированная ЛФ фотемустина содержит 208 мг АВ и выпускается в комплекте с растворителем, включающим 3,35 мл 96%-го этилового спирта и воду для инъекций – до 4 мл, что эквивалентно 80%-му этанолу. После расчета необходимой дозы раствор дополнительно разбавляют 5%-ым раствором глюкозы. Препарат, приготовленный для введения, представляет собой раствор, содержащий 50 мг/мл фотемустина.

Препарат хранят в холодильной камере при температуре от +2°C до +8°C в защищенном от света месте. Приготовленный для введения раствор следует использовать в течение 1 ч после приготовления.

В литературе имеются лишь отдельные упоминания о разработке наночастиц, содержащих фотемустин [205]. В клиническую практику ни одна из таких разработок не была внедрена.

### Араноза

Араноза – оригинальный отечественный препарат, созданный в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [3; 122] (Рисунок 5).

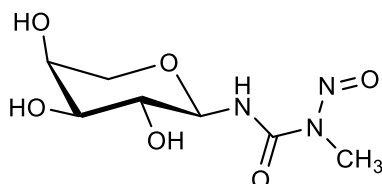


Рисунок 5 – Араноза

Химическое название – 3-( $\alpha$ -L-арабинопиранозил)-1-метил-1-нитрозомочевина

Эмпирическая формула  $C_7H_{13}N_3O$

Основные физико-химические свойства аранозы приведены в *ГЛАВЕ 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ* (Таблица 3).

Араноза – производное нитрозоалкилмочевины, близкое по структуре к STZ, но отличающееся от него углеводным компонентом – носителем цитотоксической группы является моносахарид L-арабиноза. Данные структурные особенности объясняют некоторые свойства аранозы, в том числе ее биологическую активность и стабильность [16].

Ранее считалось, что основным механизмом противоопухолевого действия аранозы индукция метилирования ДНК в  $O_6$ -позиции гуанина и, с другой стороны, угнетение активности ДНК- и РНК-полимераз. Такое глубокое воздействие на структуру и функции нуклеиновых кислот в конечном итоге приводит к гибели клетки [116]. В ряде исследований установлено, что араноза блокирует клеточный цикл клеток лейкоза L1210 в фазах  $G_2$  и S значительно дольше (96 часов), чем нитрозометилмочевина (НММ) (48 часов) и STZ (24 часа) [15].

В современных исследованиях механизма действия аранозы установлено, что его выраженность во многом обусловлена уровнем экспрессии фермента O<sub>6</sub>-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT), который репарирует образовавшийся при метилировании ДНК O<sub>6</sub>-метилгуанин [88].

Д.А. Хоченковым с соавторами проведено исследование влияния аранозы на неоангиогенез – способность блокировать формирование новых сосудов в тканях опухоли, которое показало, что однократное введение аранозы мышам с перевитой эпидермоидной карциномой легкого Lewis (LLC) вызывает снижение числа микрососудов в тканях опухоли. При этом эффект сохраняется на протяжении 8 суток после введения и является дозозависимым [116].

Способность аранозы, как ДНК-алкилирующего агента, индуцировать апоптоз – программу клеточной гибели – в клеточной линии меланомы *Mel II* показана А.А. Вартанян и др. [11, 392].

В доклинических исследованиях противоопухолевая активность аранозы установлена при лимфолейкозах и солидных опухолях как в монорежиме, так и комбинациях с известными противоопухолевыми соединениями [80].

Исследование эффективности комбинаций аранозы и фотемустина, и аранозы и цисплатина, обладающих схожим механизмом действия, показало наличие синергического эффекта на лимфолейкозе P388: увеличение продолжительности жизни (УПЖ) – 246% и излечение 40% животных по сравнению с эффектами в тех же дозах препаратов в режиме монотерапии [47].

Кроме того, араноза продемонстрировала эффективность на подкожных ксенографтах различных опухолей человека у бестимусных мышей и крыс, в том числе на лимфоме Беркитта P3HR1, меланоме MeWo, саркоме Юинга и немелкоклеточном раке легкого, а также РЛ4 [8].

ЛФ аранозы – лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, содержащий 500 мг АВ и ВВ – Коллидон 17 PF и сорбиновую кислоту. Непосредственно перед введением содержимое флакона растворяют в 20 мл 5%-го раствора глюкозы.

Несмотря на удовлетворительную клиническую переносимость аранозы и режимов на ее основе, существенным недостатком препарата является то, что, по крайней мере, у 50% пациентов терапия сопровождается различными побочными эффектами [17; 80].

Для повышения избирательности действия аранозы были предприняты попытки создания липосомальной ЛФ. Исследования на клеточных линиях показали, что липосомальная ЛФ аранозы в отличие от лиофилизированной не индуцирует апоптоз в клетках, экспрессирующих рецептор CD95/Fas, опосредующий внешний сигнальный путь индукции апоптоза. Араноза в липосомах активирует внутренний сигнальный путь индукции апоптоза. Об этом же свидетельствует тот факт, что араноза подавляет аутофагию на линиях клеток меланомы [1; 5; 29].

К сожалению, в исследованиях на экспериментальных животных липосомальная ЛФ не продемонстрировала значимых преимуществ по эффективности по сравнению с лиофилизированной ЛФ [46].

Для экспериментального определения возможности использования аранозы при НЭО В.С. Покровский с соавторами экспериментально оценили эффективность аранозы в монорежиме и в схемах комбинированной химиотерапии с противоопухолевыми препаратами, входящими в схемы лечения мелкоклеточного рака легкого (МРЛ) или НЭО. В качестве моделей использованы эпидермоидная карцинома легкого мышей LLC и эпителиоидная карцинома легкого человека РЛ4/А549, экспрессирующие специфические маркеры, в частности, серотониновые рецепторы 5-гидрокситриптамина 5HT<sub>2</sub>. Установлено, что препарат в монорежиме эффективно и длительно ингибирует рост LLC до ТРО=74–83%, удерживая эффект на достоверном уровне в течение последующих 3-х недель [85].

Араноза также показала значимые результаты на подкожных ксенографтах рака легкого человека РЛ4/А549 в двух- (в сочетании с цисплатином, этопозидом, иринотеканом и топотеканом) и трехкомпонентных комбинациях на основе

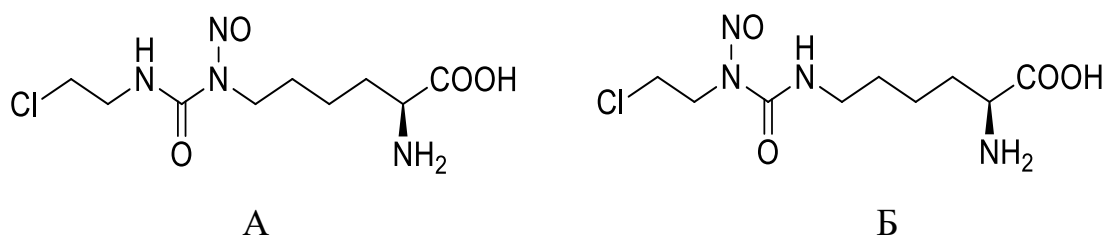


дуплета цисплатин + араноза. Добавление аранозы ко всем схемам лечения не ухудшало переносимость изученных комбинаций [56; 86].

В настоящее время араноза широко применяется в клинической практике для лечения меланомы кожи [34; 114; 115].

Применение Аранозы у пациентов с НЭО показало эффективность ЛП при распространенных НЭО в монорежиме: объективный ответ составил 37%, а контроль роста опухоли – 74%. Такие же результаты получены при лечении аранозой в комбинациях с капецитабином или темозоломидом. При этом один больной, получивший лечение араноза+капецитабин, продемонстрировал гистологически подтвержденный полный объективный эффект. При использовании режимов на основе Аранозы регистрировали гематологическую и негематологическую токсичность, в основном, I и II степени, что свидетельствует о возможности амбулаторного применения ЛП [2; 19; 58; 87].

### Лизомустин



А – 9-(2-хлорэтил)-7-нитрозо-L-гомоцитруллин;

Б – 9-(2-хлорэтил)-9-нитрозо-L-гомоцитруллин

Рисунок 6 – Лизомустин

Химическое название – 9-(2-хлорэтил)-7-нитрозо-L-гомоцитруллин и 9-(2-хлорэтил)-9-нитрозо-L-гомоцитруллин (Рисунок 6).

Соотношение изомеров А : Б составляет 75% : 25%.

Эмпирическая формула  $C_9H_{17}ClN_4O_4$

Молекулярная масса 280,71

Лизомустин – оригинальный отечественный противоопухолевый ЛП, который синтезирован в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского

Уральского отделения РАН и изучен в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [52; 53; 54; 55].

Лизомустин – ЛП широкого спектра противоопухолевого действия, превосходящий по эффекту известные производные нитрозоалкилмочевины – кармустин и НММ. Доклинические исследования лизомустина показали отсутствие у него канцерогенных свойств, умеренную токсичность и мутагенность [38; 81; 82; 83].

Клиническое применение лизомустина выявило его высокую эффективность при лечении больных диссеминированной меланомой и мелкоклеточным раком легкого. При этом лизомустин оказывает выраженный симптоматический эффект, что позволяет улучшить качество жизни пациентов [20; 57].

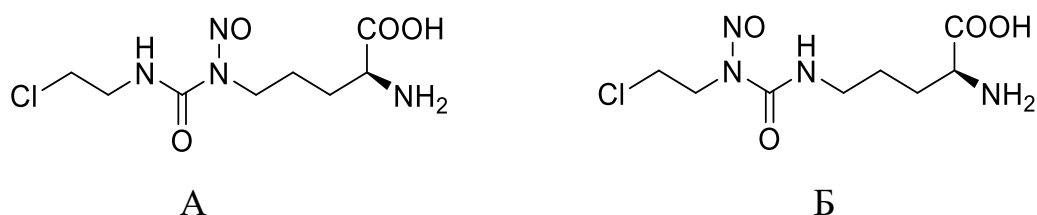
Препарат высоко эффективен при лечении лейкозов с приобретенной устойчивостью к широко используемым в онкологической практике препаратам: 5-фторурацилу, цисплатину и сарколизину. Кроме того, клинические исследования показали регрессию метастазов рака легкого в головном мозге при длительных курсах лечения лизомустином [16; 21; 22; 114].

ЛФ лизомустина – лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, содержащий 100 мг АВ. В качестве ВВ используются декстран (М.м. 60000 ± 10000) и лимонная кислота. Непосредственно перед введением больному содержимое флакона растворяют в 20 мл 5%-го раствора декстрозы с последующим разбавлением раствором декстрозы до 200 мл.

Для расширения диапазона терапевтических доз лизомустина в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработана ЛФ лизомустина в виде стерически стабилизированных липосом, включающих в свой состав ПЭГ-500- и ПЭГ-2000-липиды. Исследования *in vivo* продемонстрировали максимальный терапевтический эффект ЛС в отношении лейкоза L-1210 (100%-е излечение экспериментальных животных) и LLC без проявлений токсического действия [50; 119].

В Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского

отделения РАН синтезировано оригинальное производное нитрозомочевины **ормустин** [108].



А – 8-(2-хлорэтил)-6-нитрозо-L-цитруллин

Б – 8-(2-хлорэтил)-8-нитрозо-L-цитруллин

Рисунок 6 а) - Ормустин

Химическое название – 8-(2-Хлорэтил)-6-нитрозо-L-цитруллин и 8-(2-хлорэтил)-8-нитрозо-L-цитруллин (Рисунок 6а)

Соотношение изомеров А : Б составляет 80% : 20%.

Эмпирическая формула  $C_8H_{15}ClN_4O_4$

Молекулярная масса 266,68

Действие ормустина как производного нитрозомочевины является нециклоспецифичным, т. е. он оказывает противоопухолевое воздействие вне зависимости от фазы клеточного цикла, в том числе в фазе G<sub>0</sub>. Исследования ормустина *in vitro* показали, что препарат является индуктором апоптоза опухолевых клеток, действуя на CD95 рецепторно-лигандную систему. При повышении концентраций ормустина в изученных клеточных линиях наблюдается повреждение клеточной мембраны и опухолевой ДНК, приводящее к некрозу опухолевых клеток. Поражения ДНК опухолевых клеток, вызванные действием ормустина, в отличие от действия других нитрозомочевин, не устраняются ферментами репарации [4; 101; 102].

Лекарственная форма ормустина в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций, содержащая 125 мг АВ, разработана в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Чтобы повысить растворимость ормустина использовали 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты [77; 296].

В доклинических исследованиях ормустин продемонстрировал высокую противоопухолевую активность с излечением до 86 % животных с солидной формой лимфолейкоза P388 [101]. Ормустин также дозозависимо замедлял рост экспериментальных солидных опухолей меланомы B16 и карциомы легкого Lewis на 100–87% и 99–66%, соответственно [102].

### **1.3 Лекарственные средства для биотерапии нейроэндокринных опухолей**

Для контроля симптомов НЭО у некоторых пациентов может использоваться интерферон  $\alpha$ . Связывание интерферона- $\alpha$  с соответствующими рецепторами на поверхности нейроэндокринных клеток приводит к разрушению секреторного пептида и подавлению синтеза РНК и супрессии опухолевого роста. Кроме того, известно об антиангиогенных свойствах интерферона, его способности ингибировать ростовые факторы и индуцировать арест клеточного цикла. Сегодня интерферон- $\alpha$  обычно применяется во второй линии симптоматической терапии пациентов с НЭО ввиду менее благоприятного профиля безопасности (применение интерферона- $\alpha$  ограничивают побочные эффекты: жар, озноб, миалгия, депрессия и миелосупрессия и другие) и отсроченности ответа по сравнению с аналогами соматостатина. Иногда интерферон  $\alpha$  является средством дополнительной терапии у пациентов, у которых карционидный синдром не контролируется аналогами соматостатина [282; 305].

#### **1.3.1 Аналоги соматостатина. Лекарственные формы**

Аналоги соматостатина, изначально предназначенные для менеджмента карциноидного синдрома и других симптомов гиперпродукции гормонов, биоактивных пептидов и нейроаминов нейроэндокринной опухолью, в клинических исследованиях продемонстрировали значимое увеличение времени без прогрессирования у пациентов с неоперабельными или метастатическими НЭО желудочно-кишечного тракта. В настоящее время АС являются стандартной

терапией для функционирующих НЭО любого размера. Эти препараты обычно хорошо переносятся и побочные явления, включая холестаз, гипотирозидизм, брадикардию и гипергликемию обычно поддаются коррекции и нечасто оказывают влияние на качество жизни [287; 303; 364; 417].

Соматостатин впервые выделен в 1973 году французскими исследователями и описан как гипоталамический ингибитор гормона роста (Рисунок 7).

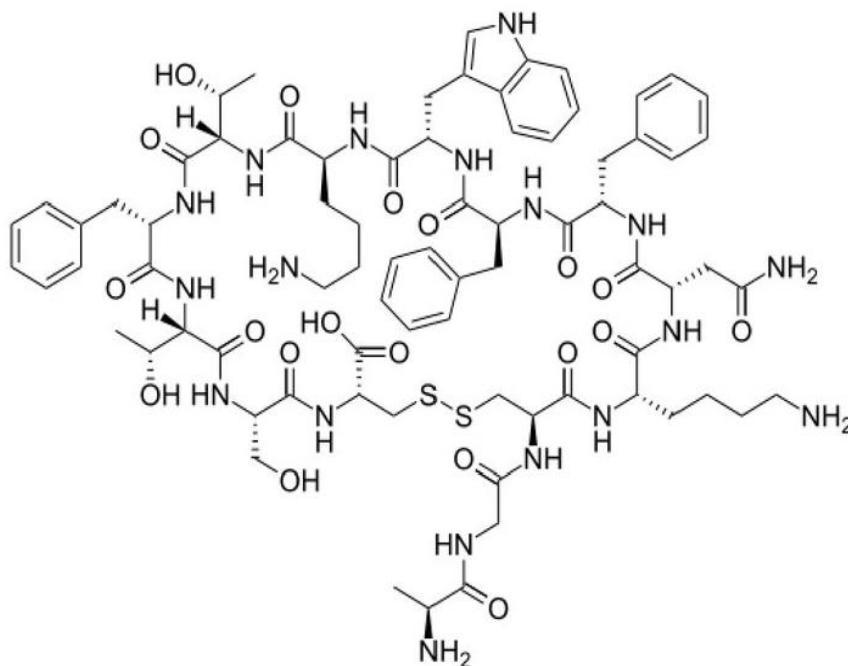


Рисунок 7 – Соматостатин

Позднее стало понятно, что соматостатин является универсальным «выключателем» вследствие своего экзокринного, эндокринного, паракринного и аутокринного ингибирующего действия. Соматостатин контролирует множество физиологических функций, включая нейротрансдукцию, сократимость гладкой мускулатуры, моторику желудка и кишечника и всасывание питательных веществ. Он также тормозит рост опухолей, ингибируя пролиферацию опухолевых клеток и ангиогенез, а также индуцируя апоптоз [166; 369].

Под аналогами соматостатина понимают модифицированные производные природного соматостатина-14, обладающие соответствующей биологической активностью. Прямые эффекты АС, в том числе, противоопухолевые, реализуются при их взаимодействии со специфическими соматостатиновыми

рецепторами (SSTR),, которые экспрессируются на плазматической мембране нормальных и опухолевых клеток, и в клетках микроокружения опухоли [94; 387]. В результате активации соматостатином каждый рецептор взаимодействует с G-протеинами, ферментами и/или с каркасными белками, что приводит к активации или ингибированию определенных путей трансдукции, специфичного для каждого подтипа рецептора и типа клеток, в котором экспрессируется этот рецептор [145; 166; 330]. Индуцированная АС активация внутриклеточных сигнальных путей может также включать регуляторные эффекты, которые не зависят от G-протеинов [175].

Рецепторы к соматостатину регулируют специфические сигнальные пути, активированные факторами роста или ангиогенными факторами, а также посредством дефосфорилирования тирозина рецепторов тирозинкиназы, экспрессируемых опухолевыми клетками, или через ингибирование внутриклеточных эффекторов и нижележащих субстратов [166].

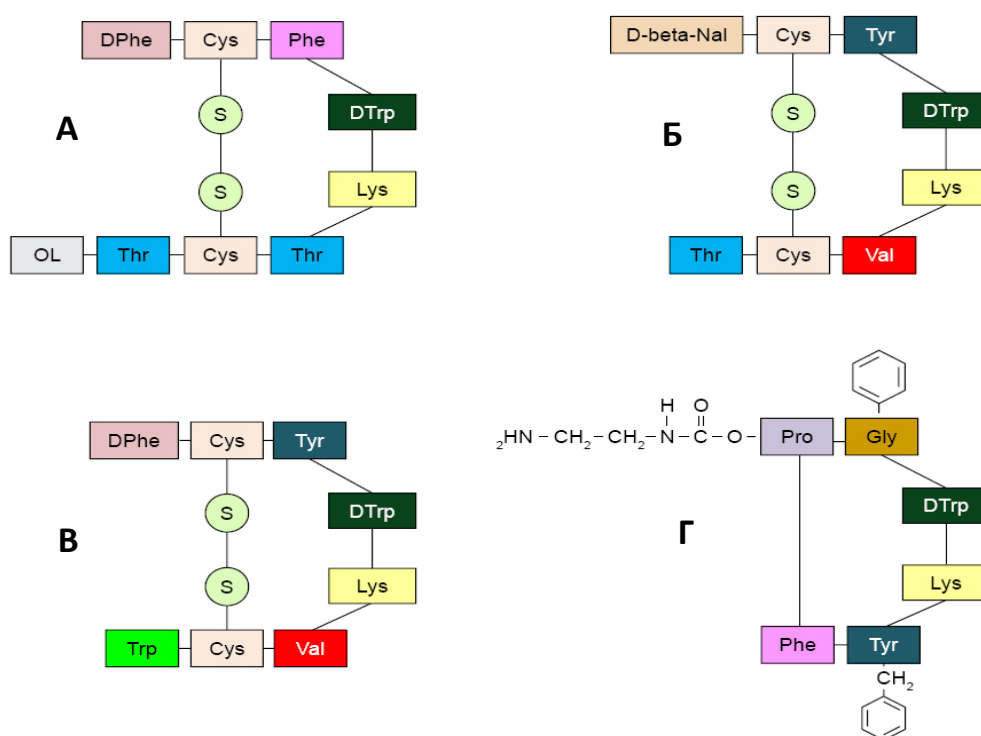
Непрямое противоопухолевое действие АС проявляется через подавление выработки различных факторов роста, например, VEGF, инсулиноподобного фактора роста (IGF) и гормона роста, которые вовлечены в аутокринные и паракринные пути стимуляции или блокаду рецепторов, экспрессируемых на эндотелиальных клетках и моноцитах [252; 254; 345; 410].

Ингибирующее действие соматостатина на секрецию гормонов и рост опухоли делает его логичным лекарственным кандидатом, однако очень короткое время полужизни нативного соматостатина в плазме крови (около двух-трех минут) не позволяет использовать его в качестве ЛС [166].

Уже в 1974 году фармацевтическая компания Sandoz, Германия, инициировала проект по синтезу длительно действующих синтетических аналогов с более высокой активностью, чем у природного соматостатина. Позднее созданы АС, которые оказались более устойчивыми к ферментативному расщеплению и обладали улучшенными фармакокинетическими и терапевтическими характеристиками (Рисунок 8) [273; 358].

В настоящее время в терапии НЭО используют три основных АС – октреотид (Рисунок 8, А), ланреотид (Рисунок 8, Б) и пасиреотид (Рисунок 8, Г). В клинических исследованиях высокую противоопухолевую активность проявил вапреотид (Рисунок 8, В).

Первым и наиболее изученным АС является октреотид (МНН), который демонстрирует эффективность и безопасность на протяжении уже более 30 лет [180; 409].



А – октреотид; Б – ланреотид; В – вапреотид; Г – пасиреотид

Рисунок 8 – Аналоги соматостатина

Октреотид – синтетический циклический октапептид – обладает сходным с соматостатином профилем фармакологической активности, но существенно превосходит его по эффективности благодаря значительно более продолжительному периоду полувыведения (около 10 минут) [339].

Группа ЛП, содержащих октреотид, включает как препараты немедленного действия, так и пролонгированные ЛФ. Препараты «короткого» действия представлены растворами для инъекций или инфузий, а пролонгированные (депо) ЛФ – микросферами для приготовления суспензии для внутримышечного

введения в виде лиофилизата. При этом необходимо отметить, что препараты октреотида «короткого» и пролонгированного действия не обладают перекрестной резистентностью и с успехом заменяют друг друга [31].

Изначально октреотид разработан как препарат немедленного высвобождения, который необходимо вводить 2–3 раза в сутки. Октреотид для инъекций представляет собой прозрачный бесцветный стерильный раствор октреотида ацетата для внутривенного или подкожного введения с концентрацией от 0,05 мг/мл до 0,6 мг/мл в ампулах или флаконах вместимостью 1 мл или многодозовых флаконах, вмещающих 5 мл раствора с концентрацией 0,2 мг/мл или 1 мг/мл. Препарат также выпускается в предварительно заполненных одноразовых шприцах (торговое наименование – Серакстал, Italfarmaco, Италия).

Раствор октреотида для инъекций кроме АВ содержит молочную кислоту, маннитол, гидрокарбонат натрия и воду для инъекций. Молочная кислота и гидрокарбонат натрия добавляются для получения забуференного раствора с рН  $4,2 \pm 0,3$ . Многодозовые флаконы также включают в свой состав 5 мг фенола/мл. Раствор октреотида применяют при острых состояниях, например, при язвенных кровотечениях. Для продолжительного лечения НЭО он малопригоден из-за необходимости частых инъекций.

Для биотерапии НЭО в настоящее время используют ЛФ октреотида пролонгированного действия в виде депо (LAR), которую вводят внутримышечно один раз в месяц [338].

Наиболее изученным АС пролонгированного действия, который широко применяется в клинической практике, является Сандостатин Лар, Novartis Pharma AG, Швейцария [145]. Преимущество данного ЛП перед короткоживущим октреотидом – это возможность поддержания постоянной концентрации АВ в организме, что увеличивает симптоматический и противоопухолевый эффекты.

Депо-форма октреотида Сандостатин Лар представляет собой порошок для приготовления суспензии для внутримышечного введения и содержит октреотид, инкапсулированный и равномерно распределенный внутри микросфер из сополимера молочной и гликолевой кислот и D-(+)-глюкозы (PLGA D-(+)



glucose). Включение октреотида в микросферы обуславливает особенности его фармакокинетики, а количество инъекций сокращается с 3 в течение одного дня до 1 в месяц. Полимер имеет среднюю молекулярную массу около 52 кДа, средний диаметр микросфер составляет около 50 мкм. Постепенное медленное высвобождение октреотида происходит при биодegradации полимера, прежде всего при его гидролизе. К флакону с препаратом прилагается сложный растворитель в предварительно заполненном одноразовом шприце. При смешивании микросфер в виде лиофилизата с растворителем формируется суспензия. Растворитель, содержащий натрия карбоксиметилцеллюлозу, маннитол, полоксамер 188 и воду для инъекций, представляет собой прозрачный раствор от бесцветного до светло-желтого или коричневого цвета. Маннитол добавляют в ЛФ для повышения суспендируемости. Ресуспендирование препарата, проводимое при охлаждении, включает семь различных стадий, в том числе очень деликатное встряхивание, с целью получения гомогенной суспензии препарата перед введением. К недостаткам препарата можно отнести сложную процедуру его подготовки к использованию, чрезвычайную болезненность внутримышечной инъекции, которую проводят с помощью длинной толстой иглы, и длительность инъекции, обусловленной высокой вязкостью препарата.

Новая лекарственная депо-форма октреотида для подкожного введения – октреотид-депо sc – разработана с использованием технологии FluidCrystal® (Camurus AB, Lund, Швеция), которая позволяет снять указанные выше недостатки Сандостатина ЛАР (Octreotide FluidCrystal® Product CAM2029).

ЛФ октреотид-депо sc представляет собой готовую к использованию пролонгированную ЛФ октреотида, предполагаемую к выпуску в предварительно заполненных шприцах (препарат может вводиться большими самостоятельно с помощью автоинжектора). В отличие от Сандостатина ЛАР, вводимого внутримышечно, Октреотид-депо sc предназначен для подкожного введения через тонкую иглу (22–27 G). При этом подкожно вводится небольшой объем жидкости, которая в месте введения трансформируется в *биодegradуемый жидкокристаллический* гель. Формирование жидкокристаллической фазы

является спонтанным процессом, происходящим при самоагрегации липидов, начинающейся немедленно после инъекции. Это приводит к эффективному высвобождению АВ из депо-матрикса без его вскрытия, обеспечивая быстрое («взрывное») начальное высвобождение октреотида, за которым следует его более медленное и стабильное высвобождение.

Сравнительные клинические исследования показали, что октреотид-депо sc обладает удовлетворительным профилем безопасности, сходным с Сандостатином ЛАР, и соответствует ему по продолжительности терапевтического действия. Явными преимуществами октреотида-депо sc являются в 5 раз более высокая биодоступность, позволяющая эффективно контролировать симптомы у пациентов с функционирующим НЭО, и удобство применения препарата пациентами и медицинским персоналом [378; 379; 380].

Попытку создать ЛФ октреотида пролонгированного действия предприняла и фармацевтическая компания Endo Pharmaceuticals, Ирландия, которая разработала фармацевтическую композицию длительного высвобождения для подкожного введения в форме имплантата. Препарат представляет собой октреотид, заключенный в гидрофильный полимер на основе полиуретана/метакрилата, который содержит высвобождающее вещество Brij 35 (полиоксиэтиленлауриловый эфир), полиоксиэтилен(20) сорбитантриолеата, Твин20, Твин80, витамин Е, TPGS или их смеси из любых двух или более веществ. ЛП высвобождает от 30 до 800 мкг октреотида в день в течение шести месяцев *in vivo*. Доза октреотида в имплантате – от 40 до 120 мкг [310].

Клинические исследования продемонстрировали безопасность и эффективность имплантата октреотида у пациентов, которые ранее использовали Сандостатин-ЛАР, при этом биохимические показатели и параметры безопасности сохранялись неизменными в течение более чем 24 недель [177; 212].

Еще один АС, активно применяемый в клинической практике, – **Ланреотид**. Ланреотид представляет собой циклический октапептид, содержащий внутри кольца D-триптофан, стабилизирующий молекулу, а также N-концевой D-аланин, повышающий избирательность действия препарата. Специальными

исследованиями установлено, что антисекреторное действие ланреотида в 85 раз превышает таковое нативного соматостатина [229].

Ланреотид используют в двух ЛФ пролонгированного действия – Соматулин® и Соматулин® Аутожель® (Ipsen Pharma, Франция) [361].

Соматулин® представляет собой лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения. Так же, как и в Сандостатине ЛАР, в Соматулине действующее вещество заключено в микросферы из сополимера молочной и гликолевой кислот. Постепенное высвобождение ланреотида из микросфер обуславливает длительное присутствие препарата в крови (до 10–14 суток). При этом фармакологическую эффективность препарата можно корректировать, изменяя интервал между повторными инъекциями: через 7, 10 или 14 дней [267]. К флакону с лиофилизатом прилагается ампула с растворителем, представляющим собой 0,8%-ый раствор маннитола. Леофилизат диспергируют в данном растворителе, получая суспензию белого или белого с желтоватым оттенком цвета.

ЛФ аналогов соматостатина (октреотида и ланреотида) пролонгированного действия, полученные методом микроинкапсулирования, показали свою эффективность в лечении НЭО. Но в настоящее время такие ЛФ считаются препаратами первого поколения ввиду целого ряда недостатков:

- необходимость растворения перед введением,
- достаточно сложный технологический процесс производства, требующий использования органических растворителей, которые часто являются токсичными,
- вероятность скачкообразного или даже «взрывного» высвобождения АВ,
- образование кислых (кислотных) метаболитов в процессе деградации полимера
- и возможная деградация пептида [194; 262; 359].

Кроме того, внутримышечные инъекции этих препаратов часто болезненны, необходимость введения большого объема приводит к ограничению количества

единовременно вводимого препарата и, следовательно, приводит к сокращению времени между инъекциями и, соответственно, снижает качество жизни пациентов. Все это потребовало разработки новой ЛФ ланреотида с улучшенным фармакокинетическим профилем и свободной от перечисленных выше недостатков.

В процессе разработки такой ЛФ обнаружено, что при определенных условиях ланреотид в водном растворе образует гель без использования ВВ или дополнительных процедур [216; 217; 314; 325; 326; 389; 390].

На первом этапе образования геля ланреотид как циклический октапептид формирует нековалентносвязанные димеры, которые сшиваются в филаменты (волокна), стабилизированные водородными связями. Двадцать шесть филаментов образуют полую нанотрубку однородного диаметра, равного 24 нм. Структура мягкого геля зависит от концентрации ланреотида: при концентрации ланреотида от 10% до 15% нанотрубки в мягком геле могут организоваться в гексагональную кристаллическую решетку, при более высоких концентрациях ланреотида начинает формироваться плотноупакованная трубка с трубчатыми структурами внутри (встроенные нанотрубки). Нанотрубки стабилизированы нековалентными водородными связями между димерными субъединицами, гидрофобными взаимодействиями и  $\pi$ - $\pi$  стэкингом ароматических боковых цепей внутри нитей [216; 326].

Такие взаимодействия могут формироваться и существовать в воде и не требуют присутствия каких-либо ВВ. Эксперименты *in vitro* показали, что образование таких нанотрубок абсолютно обратимо: при низких концентрациях ланреотида нанотрубки медленно «разбираются», медленно и контролируемо высвобождая АВ непосредственно сразу после трансфера в разбавленный раствор [216]. ЛП получил название Соматулин® Аутогель®.

Считается, что *in vivo* Соматулин® Аутогель® формирует депо в месте инъекции при взаимодействии препарата с физиологическими жидкостями, при этом высвобождение ланреотида регулируется собственными свойствами пептида и, с большой степенью вероятности, происходит за счет пассивной диффузии

ланреотида из депо в окружающие ткани с последующей абсорбцией в кровяное русло [381].

Фармакокинетические исследования препарата подтвердили, что при подкожном введении Соматулин® Аутожель® в течение одного дня формирует депо с высокими концентрациями препарата, а затем происходит контролируемое длительное высвобождение препарата в течение значительного периода времени. Так, у пациентов с НЭО, получавших дозу 120 мг ланреотида-депо каждые четыре недели плато концентрации препарата в сыворотке крови достигалось спустя четыре или пять инъекций, при этом концентрация составляла 5,3 до 8,6 нг/мл. Таким образом, фармакокинетические характеристики депо-формы ланреотида позволяют применять препарат с интервалом в 4 недели.

Депо-форма ланреотида имеет и другие существенные преимущества: готовый к применению препарат упакован в предварительно заполненное устройство (шприц), что исключает необходимость многоступенчатого процесса приготовления раствора; подкожные инъекции препарата малого объема могут проводиться людьми без специальной медицинской подготовки.

Кроме того, новая конструкция такого шприца для инъекций ланреотида дает дополнительную гарантию безопасности в виде защитного устройства, автоматически втягивающего и блокирующего иглу после использования, предотвращая случайный укол после инъекции, и прозрачного шприца, при полном высвобождении которого раздается щелчок, что позволяет контролировать введение препарата. То есть использование Соматулина® Аутожеля® позволяет достичь контроля опухоли без нарушения качества жизни пациента [139; 140; 406; 408].

Октреотид и ланреотид имеют сродство к рецепторам 2-го подтипа (SSTR2), умеренно связываются с рецепторами 5-го подтипа (SSTR5), очень слабо связываются с SSTR3 и практически не имеют сродства с SSTR1 и SSTR4 [303].

Концепция метаболически устойчивого АС, обладающего более универсальным профилем связывания с соответствующими рецепторами, воплощена в циклическом гексапептиде – пасиреотиде (SOM 230). Пасиреотид

обладает высоким сродством к рецепторам SSTR1, SSTR2, SSTR3 и SSTR5. При этом аффинность пасиреотида к SSTR1, SSTR3 и SSTR5 в 30, 11 и 158 раз выше, чем у октреотида, соответственно [171; 341].

Доклинические исследования пасиреотида показали, что он может ингибировать рост НЭО *in vitro* значительно эффективнее, чем октреотид [219].

Кроме того, уникальный профиль связывания пасиреотида с рецепторами к слматостатину позволяет использовать препарат у пациентов с распространенными НЭО, рефрактерными или резистентными к октреотиду и/или ланреотиду, а также в случаях других опухолей, при которых имеют значение типы SSTR2 и SSTR5 [164; 201; 321].

Первоначально ЛФ пасиреотида содержала 3 мл раствора с концентрацией АВ 0,05 мг/мл или 1,0 мг/мл во флаконах. По результатам клинических исследований ЛФ пасиреотида была оптимизирована и зарегистрированный в США, ЕС и России препарат (Сигнифор, Novartis Pharma AG, Швейцария) представляет собой раствор пасиреотида диаспартата для инъекций с концентрацией 0,3 мг/мл, 0,6 мг/мл или 0,9 мг/мл в стеклянных ампулах объемом 1 мл. Кроме АВ препарат содержит маннитол как регулятор тоничности раствора, винную кислоту как буферный агент, натрия гидроксид для регулирования рН и воду для инъекций как растворитель. Препарат рекомендуется для подкожного введения два раза в день.

Пролонгированная ЛФ пасиреотида (Сигнифор ЛАР, Novartis Pharma AG, Швейцария) представляет собой порошок для приготовления суспензии для инъекций во флаконе, который следует суспендировать в прилагаемом растворителе непосредственно перед применением. Активным веществом Сигнифора ЛАР является пасиреотида *памоат* (эмбонат), который в отличие от пасиреотида *диаспартата* практически не растворим в воде и буферных растворах с рН ниже 4,0 и проявляет высокую стабильность в выбранной полимерной системе контролируемого высвобождения. В пролонгированной ЛФ пасиреотида памоат (10, 20 мг, 30, 40 мг или 60 мг) равномерно распределен среди биodeградируемых микросфер на основе PLGA. Оба сополимера

принадлежат к хорошо известному семейству биосовместимых поли (D,L-лактид-со-гликолид)сополимеров, которые в течение многих лет используются в схожих коммерческих ЛП. Они состоят из лактида и гликолида, образующих блоки и деградирующих на молочную и гликолевую кислоты, которые являются физиологичными для организма и метаболизируются нормальными физиологическими путями и подходят для использования у человека при парентеральном введении. АВ постепенно высвобождается из микросфер, прежде всего, за счет диффузии и гидролиза/распада. Предполагается, что при медленном высвобождении пасиреотида из ЛФ концентрация препарата колеблется незначительно, что позволит минимизировать побочные эффекты. В ходе доклинического изучения и I фазы клинических исследований разработаны и протестированы различные варианты композиций сополимеров, их соотношений и производственных процессов. Окончательный состав был выбран как имеющий наиболее благоприятный фармакокинетический профиль.

Упаковка ЛП представляет собой блистер, содержащий флакон с пасиреотидом и предварительно заполненный растворителем шприц, а также адаптер к флакону и специальную иглу для безопасных инъекций. Растворитель включает кармелозу натрия, маннитол, полоксамер 188 и воду для инъекций и представляет собой 2 мл прозрачного раствора светло-желтого или светло-коричневого цвета. Выбор растворителя (ВВ, процесса производства и укупорочной системы контейнера) основан на предшествующем опыте Novartis Pharma AG по созданию ЛП на основе микросфер. Сигнифор-Лар вводится внутримышечно один раз в 28 дней. Клинические исследования показали, что использование пролонгированной ЛФ пасиреотида позволяет добиться лучшего контроля над заболеванием по сравнению с препаратами стандартной терапии АС – октреотидом ЛАР и Соматулин® Аутожель® [253].

**Вапреотид** (Октастатин, Санвар, RC 160, ВМУ 41606) – АС – представляет собой синтетический циклический октапептид. Препарат разработан в Tulane University School of Medicine, США [300; 328].

Вапреотид проявляет аффинность к рецепторам SSTR2 и, в меньшей степени, к SSTR5. Прямое и не прямое действие вапреотида, как и для других АС, проявляется через ингибирование высвобождения гормона роста и других пептидов, которые регулируют высвобождение инсулина и гастроинтестинальных гормонов. По данным доклинических и клинических исследований вапреотид обладает более высокой метаболической стабильностью по сравнению с другими известными АС – это единственный аналог соматостатина, который стабилен в течение длительного периода времени при комнатной температуре. Терапевтический потенциал вапреотида, однако, ограничивается коротким периодом полужизни.

Вапреотид обычно вводится подкожно (ЛФ немедленного высвобождения), однако в клинических исследованиях изучается и пролонгированная ЛФ препарата для внутримышечного введения. Другие ЛФ с замедленным высвобождением находятся на стадии фармацевтической разработки [185].

Санвар® (N3 Pharma Inc., Канада) препарат немедленного высвобождения (600 мкг вапреотида) продемонстрировал в клинических исследованиях статистически значимые преимущества раннего использования при лечении острого эзофагального варикозного кровотечения. В настоящее время проводится III фаза клинических исследований препарата [391].

Представленная выше информация свидетельствует о том, что ЛП препараты – аналоги соматостатина – выпускаются в виде ЛФ для парентерального применения и вводятся внутримышечно или подкожно. Разработка и использование ЛФ аналогов соматостатина для перорального применения ограничивается физико-химическими свойствами субстанций – большим размером молекул, склонностью к агрегации, адсорбции и денатурации [149; 346].

Кроме того, пероральное применение АС характеризуется низкой и изменчивой системной биодоступностью, которая обусловлена возможностью ферментативного расщепления в ЖКТ, неспособностью преодолевать



эпителиальный барьер тонкого кишечника и коротким временем полужизни в плазме крови [377].

Попытки увеличения кишечной абсорбции октреотида для создания пероральной ЛФ предпринимались неоднократно, но ни одна из них не была коммерчески успешной [190; 372; 373].

Не так давно компания Chiasma, Inc., США, разработала ЛФ октреотида (Октреолин) в виде капсул. При получении препарата используется инновационная запатентованная технология, называемая Transient Permeability Enhancer (ТРЕ<sup>®</sup>), которая облегчает гастроинтестинальную абсорбцию немодифицированного октреотида в кровоток. Препарат, полученный по данной технологии, представляет собой капсулы с кишечнорастворимой (желудочно-резистентной) оболочкой, заполненные суспензией ЛП и каприлата натрия в гидрофильных микрочастицах, которые помещаются в липофильную среду, что позволяет повысить кишечную проницаемость [322].

Разработчики ЛП утверждают, что система ТРЕ<sup>®</sup> (прежде всего, каприлат натрия, входящий в состав ЛП) повышает биодоступность октреотида при пероральном введении: индуцирует временное и обратимое раскрытие непроницаемых межклеточных сочленений слизистого эпителия тонкого кишечника. Это обеспечивает улучшенную парацеллюлярную абсорбцию пептида через стенку тонкого кишечника и его эффективное попадание в системный кровоток в неизменной нативной активной форме. С другой стороны, технология ТРЕ<sup>®</sup> защищает молекулу ЛВ от агрессивного воздействия среды ЖКТ. В доклинических исследованиях показано, что кишечная абсорбция октреотида является дозозависимой, а воздействие препарата на гормон роста сравнимо с действием инъекционной формы октреотида [383].

Клинические исследования продемонстрировали безопасность и удовлетворительную переносимость препарата, и отсутствие серьезных побочных эффектов. Показано, что фармакокинетические профили препарата идентичны при однократном пероральном и подкожном применении [384].

Клинические исследования Октреолина, проведенные Chiasma совместно с Roche (Швейцария), продемонстрировали его эффективность в контроле инсулиноподобного фактора роста и гормона роста при переводе пациентов с зарегистрированных инъекционных АС. Исследование показало, что профиль безопасности Октреолина не отличается от такового для одобренных инъекционных АС. Однако отмечали действие пищевых продуктов на эффективность ЛП и наблюдали эффекты межлекарственных взаимодействий: применение капсул с октреотидом после еды или с ингибиторами протонового насоса, например, эзомепразолом, приводило к изменениям рН желудочного содержимого, значительно влияя на пероральную абсорбцию пептида [276].

Попытку создания ЛФ октреотида для перорального применения предприняла также компания Aegis Therapeutics LLC, США. E.T. Maggio и P. Grasso изучили биодоступность октреотида ацетата, растворенного в Intravail® (Intravail® – запатентованный алкилсахарид, соединение, улучшающее трансмукозальную абсорбцию). Результаты сравнительного исследования фармакокинетики показали, что пероральное применение октреотида ацетата в Intravail® является эффективным способом введения препарата, который значительно повышает его общее всасывание (1254,08 нг/мл/мин против 311,63 нг/мл/мин, соответственно), биодоступность (4,0 против 1,0) и время полужизни в сыворотке крови (52,1 мин против 1,3 мин), по сравнению с подкожным введением. Таким образом, пероральное введение октреотида в форме Intravail® является новым эффективным подходом в неинвазивном лечении НЭО [271].

В Таблице 2 представлены АС для лечения НЭО, находящиеся в обращении на фармацевтическом рынке Российской Федерации.

Сегодня в России зарегистрированы три ЛП аналогов соматостатина:

– октреотид (10, 20, 30 мг) в виде раствора для инфузий, раствора для внутривенного введения и раствора для подкожного введения, в том числе оригинальный ЛП компании Новартис Фарма АГ, Швейцария, под торговым наименованием Сандостатин®. Также доступны несколько воспроизведенных лекарственных препаратов октреотида отечественных и зарубежных

фармацевтических компаний. Кроме того, на российском фармацевтическом рынке присутствуют лекарственные формы октреотида пролонгированного действия в виде лиофилизата и микросфер, в том числе, оригинальный Сандостатин®-ЛАР производства Новартис Фарма АГ, Швейцария;

– ланреотид представлен оригинальным ЛП в уникальной лекарственной форме Соматулин®Аутожель® производства Ипсен Фарма, Франция;

– пасиреотид – раствором для подкожного введения Сигнифор® (оригинальный ЛП) фирмы Рекордати Рэа Дизизез, Франция.

Таблица 2 – Аналоги соматостатина в обращении на российском фармацевтическом рынке [28]

МНН	Торговое наименование <sup>1</sup>	Лекарственная форма
Октреотид	Октреотид, Октретекс, Генфастат, Серакстал, Сандостатин®	Раствор для инфузий, раствор для внутривенного введения, раствор для подкожного введения
	Октреотид-депо, Октретид-лонг, Сандостатин®-ЛАР	Лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения пролонгированного действия
		Микросферы для приготовления суспензии для внутримышечного введения пролонгированного действия
Ланреотид	Соматулин®Аутожель®	Гель для подкожного введения пролонгированного действия
Пасиреотид	Сигнифор®	Раствор для подкожного введения

Оригинальные ЛП аналоги соматостатина в Российской Федерации не производятся. Российскими исследователями синтезированы новые пептидные аналоги соматостатина, которые, к сожалению, не проявили противоопухолевой активности достаточного уровня [7; 78; 414].

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Проведенный анализ фармацевтического рынка и литературных данных показал, что для лечения НЭО используются лекарственные средства различных

химических классов: одним из стандартов химиотерапии НЭО является производное нитрозоалкилмочевины – стрептозотоцин; аналоги соматостатина (октреотид, ланреотид и др.) обладают противоопухолевым эффектом и позволяют контролировать симптомы заболевания.

2. Производные нитрозоалкилмочевины выпускаются в виде лиофилизатов для приготовления растворов для инъекций/инфузий, а нерастворимые в воде НАМ – в форме капсул. Для направленной доставки производных НАМ в опухоль, повышения терапевтической эффективности и снижения системной токсичности предприняты попытки создания наноструктурированных ЛФ – различных типов наночастиц, микрочипов, липосом, мицелл, микросфер и т.п., демонстрирующих высокую противоопухолевую активность *in vitro* и в доклинических исследованиях. Но внедрение полученных результатов в клиническую практику было неудачным.

3. В настоящее время для биотерапии НЭО используются ЛФ аналогов соматостатина пролонгированного действия, которые позволяют поддерживать непрерывную концентрацию препарата в организме и тем самым увеличивают симптоматический и противоопухолевый эффекты. В главе подробно описаны современные лекарственные формы аналогов соматостатина, которые применяются для лечения НЭО – микросферы, биodeградируемый жидкокристаллический гель, имлантаты и др.

4. Разработка и использование ЛФ аналогов соматостатина для перорального применения ограничивается их физико-химическими свойствами. Кроме того, пероральное применение аналогов соматостатина характеризуется низкой и изменчивой системной биодоступностью, которая обусловлена возможностью ферментативного расщепления в ЖКТ, неспособностью преодолевать эпителиальный барьер тонкого кишечника и коротким временем полужизни в плазме крови.

5. Выявлено, что российским пациентам наиболее доступен аналог соматостатина первого поколения Октреотид, который малоприспособлен для продолжительного лечения НЭО из-за необходимости частых инъекций.

Оригинальные аналоги соматостатина на отечественном фармацевтическом рынке отсутствуют.

6. Оригинальные лекарственные препараты для лечения НЭО – производные НАМ и аналоги соматостатина – на отечественном фармацевтическом рынке отсутствуют. Таким образом, создание отечественных ЛП различных фармакологических групп для лечения НЭО является чрезвычайно актуальной задачей.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы и реактивы

#### 2.1.1 Активные фармацевтические субстанции, вспомогательные вещества и реактивы

##### Араноза

Активная фармацевтическая субстанция (АФС) араноза синтезирована в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (*ГЛАВА 1, 1.2.1 Производные нитрозоалкилмочевины и их лекарственные формы*).

Основные свойства аранозы приведены в Таблице 3.

Таблица 3 – Основные свойства фармацевтической субстанции араноза

Свойство	Информация	Примечание
Молекулярная масса	235,20	
Внешний вид	Белый с желтоватым оттенком порошок	
Растворимость в воде	1:4	при 20°C
Термостабильность	Нет	Быстрое спонтанное разрушение при температурах выше 30°C с образованием азота, оксида азота и/или диазометана. Гидролиз 10%-го водного раствора начинается через 5–10 мин после приготовления при температуре 2325°C
Фотостабильность	Нет	Разрушение аранозы в 10%-ом водном растворе при освещенности 200 лк в течение 2 часов
Гидролитическая стабильность	Нет	Гидролиз гликозидной связи при pH ≤ 3, полная деструкция в течение 3 часов при pH 10–11 (0,5%-ый раствор в NaOH)
Гигроскопичность	Да	

##### Цифетрилин

Оригинальная АФС цифетрилин синтезирована в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Спецификация на АФС цифетрилин приведена в Таблице 37 (ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ЦИФЕТРИЛИН).

В исследовании использовали вспомогательные вещества и реактивы, соответствующие требованиям действующей нормативной документации: ГФ XIV [27], Европейской Фармакопеи [197] и отдельных фармакопейных статей.

## 2.2 Оборудование

В исследованиях использовали сертифицированное аналитическое оборудование:

- хроматограф Agilent 1200 Series (Agilent, США);
- ЯМР спектрометр Bruker AVANCE<sup>III</sup> 500 (Bruker, США);
- поляриметр (Unipol L, США);
- автоматический титратор VD-20 (Mettler-Toledo, Швейцария);
- вакуумный сушильный шкаф–VD 23 (Binder, Германия);
- электрошкаф сушильный BINDER - ED (Binder, Германия);
- спектрофотометр Cary-100 (Varian, США);
- весы аналитические Sartorius 2405 (SartoriusAG, Германия);
- весы аналитические Sartorius LA 1200 S (Sartorius AG, Германия);
- аналитический жидкостный хроматограф Agilent 1200 (Agilent, США);
- pH-метр pH 211 (HANNA Instruments, Германия));
- микроцентрифуга ELMi CM-50 (ELMI, Латвия);
- автоматический биохимический анализатор ChemWell 2910 Awareness Technology (США) и другое;

приборы для определения технологических характеристик порошков и определения фармацевтико-технологических характеристик таблеток (Erweka, Германия);

технологическое оборудование для получения таблеток:

- восьмипуансонный таблеточный пресс TRD8 (Erweka, Германия);
- ротогранулятор ROTO CUBE12, обеспечивающий полный технологический цикл гранулирования от загрузки сырья и связующего агента до выгрузки сухих гранул (ИМА, Италия);
- блистерная машина BF100 (O.M.A.R. s.r.l., Италия) и другое.

При трансфере технологии лекарственного препарата Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций использовали следующее технологическое оборудование:

*передающая сторона*

- реактор стеклянный XC5L;
- верхнеприводная механическая RZR 2021 с пропеллерным перемешивающим элементом PR 30 (Heidolph, Германия)
- фильтрационная система Stericup GP Millipore Express Plus (Millipore, Франция) со стеклянным фильтродержателем в комплекте с колбой (Millipore, Франция);
- полуавтоматическая машина для наполнения флаконов FLR25/G (ROTA, Великобритания)
- сублимационная установка Minifast 1.0 (BOC EDWARDS, Китай)
- полуавтомат ПЗР-34-ВИПС-МЕД для укупорки флаконов колпачками К-2-20 и К-3-34 (ООО «Фирма «ВИПС-МЕД», Россия) и другое;

*принимающая сторона*

- комплект оборудования для приготовления раствора (встроенная в изолятор емкость для приготовления раствора, снабженная рубашкой, мешалкой, скорость мешалки 50–400 об/мин, рН-метр, ручной клапан нижнего спуска, комплект загрузочных устройств с портом для загрузки сырья, панель управления);
- комплект оборудования для стерилизующей фильтрации и розлива раствора (встроенная в изолятор система фильтрации и розлива раствора (трубопроводы, фитинги, емкость для приема стерильного раствора, фильтрующая установка для предварительной и стерилизующей фильтрации, включая фильтры фирм "Pall",



"Millipore", с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм, машина наполнения VFM100, панель управления);

– установка для лиофильной сушки Lyofast, встроенная в изолятор (Steriline, Италия);

– машина для обкатки колпачками, встроенная в изолятор (Steriline, Италия);

– машина для мойки внешней поверхности флаконов, встроенная в изолятор (Steriline, Италия) и другое.

## 2.3 Методы исследования

### 2.3.1 Аналитические методы

Для контроля качества и стандартизации АФС и ЛФ использовали методики, разработанные и валидированные в ходе настоящего исследования, и методы, описанные в соответствующих общих фармакопейных статьях (ОФС) ГФ XIV [27] (Таблица 4).

**Количественное определение аранозы** в субстанции проводили проводили волюметрическим методом, описанным в [109].

#### *Методика*

Около 0,06 г аранозы (точная навеска) помещают в реакционный сосуд объемом 25 мл, снабженный барботером, газоотводной трубкой и капельной воронкой. В капельную воронку помещают 5 мл натрия гидроксида раствора 5%. Барботер реакционного сосуда через пустую U-образную трубку объемом 50 мл присоединяют к крану отводного отверстия аппарата Киппа, заряженного предварительно прокипяченным в воде мрамором и кислотой хлористоводородной. Газоотводную трубку реакционного сосуда присоединяют к азотометру, имеющему объем градуированной части, равный 5–7 мл. В качестве рабочей жидкости (и поглотителя углекислого газа) для заполнения уравнительного сосуда и азотометра используют калия гидроксида раствор 50%.

Таблица 4 – Аналитические методы контроля качества исследуемых АФС и ЛФ

Показатель	Метод	Араноза		Цифетрилин	
		АФС	ЛФ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций	АФС	ЛФ, таблетки
1	3	4	5	6	7
Описание	Визуальный	+	+	+	+
Растворимость	ОФС.1.2.1.0005.15	+	+	+	Неприменимо
Подлинность	Спектрометрия	ОМ	ОМ	ОМ	ОМ
	ТСХ	ОМ	ОМ	ОМ	ОМ
	ВЭЖХ			ОМ	ОМ
	Качественные реакции	ОМ	ОМ		
Удельное вращение	ОФС.1.2.1.0018.15	+	+	+	+
Прозрачность раствора	ОФС.1.2.1.0007.15	+	+	Неприменимо	Неприменимо
Цветность раствора	ОФС.1.2.1.0006.15	+	+	Неприменимо	Неприменимо
Посторонние примеси	ТСХ	ОМ	ОМ		
	ВЭЖХ			ОМ	ОМ
Сульфатная зола, тяжелые металлы	ОФС.1.2.2.2.0014.15; ОФС.1.2.2.2.0012.15	+	+	+	+
Определение воды (метод К. Фишера)	ОФС.1.2.3.0002.15			+	Неприменимо
Потеря в массе при высушивании	ОФС.1.2.1.0010.15	+	+		Неприменимо
рН	ОФС.1.2.1.0004.15	+	+	Неприменимо	Неприменимо
Механические включения	ОФС.1.4.2.0005.18	Неприменимо	+	Неприменимо	Неприменимо

Продолжение Таблицы 4

1	3	4	5	6	7
Однородность массы дозированных лекарственных форм	ОФС.1.4.2.0009.15	+	+	+	+
Однородность дозирования	ОФС.1.4.2.0008.18	Неприменимо	Неприменимо	Неприменимо	ОМ
Распадаемость таблеток и капсул	ОФС.1.4.2.0013.15	Неприменимо	Неприменимо	Неприменимо	+
Количественное определение	ВЭЖХ			ОМ	
	Титриметрия	ОМ			ОМ
	Спектрометрия		ОМ		ОМ

Примечание – ОМ – оригинальная методика

Систему в сборе продувают в течение 3–5 мин углекислым газом. Краном на входе азотомера перекрывают поток газа-носителя, заполняют азотомер рабочей жидкостью до верха и снова открывают доступ углекислого газа в азотомер.

Пузырьки газа, проходящие через градуированную часть азотомера, должны быть исчезающе малыми. В реакционный сосуд, не прекращая продувки, приливают из капельной воронки 4 мл калия гидроксида или натрия гидроксида раствора 5%.

Азот, выделившийся в результате реакции внутримолекулярного карбамоилирования, током углекислого газа вытесняется в азотомер, где углекислый газ (газ-носитель) поглощается рабочей жидкостью, а азот собирается в градуированной части. Когда поднимающиеся в градуированной части пузырьки углекислого газа вновь становятся исчезающе малыми, продувку прекращают, уравнивают давление в азотомере с атмосферным и измеряют объем выделившегося азота. Фиксируют температуру на рабочем месте ( $^{\circ}\text{K}$ ) и атмосферное давление (мм рт. ст.), учитываемые в расчетах.

Параллельно в тех же условиях проводят контрольный опыт, пропуская газ-носитель в течение того же времени, что и в основном опыте.

Количество аранозы в пробе ( $X$ , %) рассчитывают по формуле:

$$\begin{aligned}
 X &= \frac{M \times T_0 \times (V - V_0) \times 0,98 \times P}{P_0 \times 22,4 \times T \times 1000 \times a \times 0,01(100 - Aq)} \times 100 = \\
 &= 3,7718 \times \frac{(V - V_0) \times 0,98 \times P}{T \times 1000 \times a \times 0,01(100 - W)} \times 100 \quad (1)
 \end{aligned}$$

где  $M$  – 235,205 (молярная масса аранозы, г/моль);

$T_0$  – 273  $^{\circ}\text{K}$ ;

$P_0$  – 760 мм рт.ст.;

$T$  – температура проведения опыта,  $^{\circ}\text{K}$ ;

$P$  – атмосферное давление, мм рт. ст.;

0,98 – поправочный коэффициент к объему на смачиваемость стекла  
50% раствором щелочи;

$V$  – объем азота, выделившегося в опыте, мл;

$V_0$  – объем газа в холостом опыте, мл;

$a$  – навеска аранозы, г;

$W$  – содержание воды в аранозе, определенное по методу К. Фишера, %.

Содержание  $C_7H_{13}N_3O_6$  (аранозы) в субстанции должно быть не менее 98,0% в пересчете на безводное вещество.

### ***Методики определения подлинности аранозы***

0,02 мг антипирина растворяют в 0,1 мл воды очищенной, прибавляют 0,1 мл кислоты хлористоводородной разведенной 10 % и 0,02 г аранозы; встряхивают и нагревают на кипящей водяной бане: через 8–10 с раствор окрашивается в зеленый цвет [27].

0,01 г субстанции сплавляют в пробирке на кипящей водяной бане с 0,01 г фенола, охлаждают, прибавляют 0,1–0,2 мл серной кислоты концентрированной; появляется темно-красное окрашивание, быстро переходящее в темно-зеленое. После прибавления 0,04 мл воды очищенной окрашивание вновь становится темно-красным. При осторожном наслаивании 0,2 мл натрия гидроксида раствора 2 М слой последнего окрашивается в темно-синий цвет.

### ***Методика определения родственных примесей в АФС араноза методом тонкослойной хроматографии***

*Испытуемый раствор.* 0,20 г тщательно растертой субстанции растворяют в 10 мл метанола. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца L(+)-арабинозы.* 0,03 г L(+)-арабинозы растворяют в 30 мл метанола в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора метанолом до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца АПММ.* 0,03 г (в пересчете на сухое вещество) 3-( $\alpha$ -L-арабинопиранозил-1)-1-метилмочевины (АПММ) растворяют в

30 мл метанола в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора метанолом до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

*Анилинфталата раствор для проявления хроматограммы.* 1,66 г фталевой кислоты и 0,75 мл свежеперегнанного анилина растворяют в 100 мл водонасыщенного бутанола нормального. При хранении в холодильнике раствор пригоден в течение двух месяцев.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* 1 мл испытуемого раствора переносят количественно в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора метанолом до метки (0,2 мкг/мл). Раствор используют свежеприготовленным.

На линию старта хроматографической пластинки ПТСХ-АФ-В-УФ (Сорбфил, Россия) размером 10x15 см и толщиной слоя 100 мкм или аналогичной наносят по 5 мкл испытуемого раствора (100 мкг) и раствора для проверки пригодности хроматографической системы (1,0 мкг); 5 мкл и 10 мкл 0,03% раствора L(+)-арабинозы (1,5 мкг и 3,0 мкг, соответственно) и 5 мкл и 10 мкл 0,03% раствора АПММ (1,5 мкг и 3,0 мкг, соответственно). Пластинку с нанесенными пробами подсушивают на воздухе в течение 5 мин, помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей этилацетат – метанол (4:1) (объемное соотношение) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 10 см, пластинку вынимают из камеры и высушивают на воздухе в течение 5 мин до полного удаления запаха растворителей. Пластинку опрыскивают раствором анилинфталата, высушивают на воздухе и выдерживают в сушильном шкафу при температуре от 120 до 130°C в течение 5 мин. При этом во всех пробах проявляются пятна коричневого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться одно пятно коричневого цвета. Возможные дополнительные пятна на хроматограмме испытуемого раствора должны соответствовать по положению пятнам на хроматограммах проб L(+)-арабинозы и АПММ. Величина и интенсивность окраски дополнительных пятен не должна превышать величины и интенсивности пятен 10 мкл (3 мкг) L(+)-арабинозы и АПММ.

Допускается суммарное содержание L(+)-арабинозы АПММ и не более 3,0 %. На хроматограмме не должны наблюдаться пятна каких-либо дополнительных примесей, кроме L(+)-арабинозы и АПММ.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы четко видно одно пятно коричневого цвета (араноза).

### 2.3.2 Валидация аналитических методик

Разработанные методики валидировали в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [27], «Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств» ЕАЭС [97] и Руководства ICH Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [233]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 7.0.

При валидации исследовали следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, прецизионность (повторяемость (сходимость) и внутрилабораторная прецизионность), правильность [27; 97; 233].

*Специфичность* разработанных методик определяли, анализируя способность оценивать исследуемые АВ в присутствии компонентов лекарственной формы или примесей и/или растворителей в АФС [27; 97; 233].

*Линейность* аналитических методик определяли как наличие прямо пропорциональной зависимости аналитического сигнала (количества выделившегося газа для количественного определения аранозы в АФС; площади пика цифетрилина при его количественном определении в АФС; оптической плотности раствора для количественного определения аранозы или цифетрилина в ЛФ) от концентрации (количества) анализируемого вещества в образце в пределах аналитической области методики [27; 97; 233].

Полученные результаты представляли с использованием линейной модели:

$$y = b \cdot x + a$$

где  $x$  – количество или концентрация определяемого вещества;

$y$  – величина отклика;

$b$  – угловой коэффициент;

$a$  – свободный член линейной зависимости.

Линейность разработанных методик дополнительно подтверждали графическим изображением соответствующих регрессионных прямых.

Руководство по валидации аналитических методик [97] определяет *прецизионность* как близость (степень разброса) результатов между сериями измерений, проведенными на множестве проб, взятых из одной и той же однородной пробы, в условиях, предписанных методикой [97; 233]. Для разработанных методик определяли прецизионность на двух уровнях как повторяемость и промежуточную (внутрилабораторную) прецизионность.

Для определения повторяемости один аналитик в короткий промежуток времени проводил 9 параллельных определений в соответствии с валидируемой методикой. Испытания проводили в одной лаборатории, с использованием одного и того же оборудования, в одинаковых условиях и с одними и теми же реактивами.

Для оценки внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности два аналитика анализировали в соответствии с валидируемой методикой по 9 одинаковых образцов одной серии ЛС в разные дни.

Под *правильностью* разработанных методик понимали близость между принятым истинным и полученным значением и выражали как открываемость, %. [27; 97; 233]. Правильность определяли на трех уровнях концентраций 80%, 100% и 120%.

*Предел обнаружения* (ПО) определяли как наименьшее количество определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено с помощью валидируемой методики [27; 97].



ПО рассчитывали по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика линейной зависимости по формуле:

$$\text{ПО} = \frac{3,3 \times S_a}{b} \quad (2)$$

где  $b$  – угловой коэффициент линейной зависимости;

$S_a$  – стандартное отклонение свободного члена линейной зависимости.

*Предел количественного определения* (ПКО) – наименьшее количество вещества в образце, которое можно количественно определить с помощью валидируемой методики с соответствующей прецизионностью и правильностью [27; 97; 233].

ПКО также рассчитывали с использованием параметров линейной зависимости по формуле:

$$\text{ПКО} = \frac{10 \times S_a}{b} \quad (3)$$

где  $b$  – угловой коэффициент линейной зависимости;

$S_a$  – стандартное отклонение свободного члена линейной зависимости.

### **2.3.3 Методы оценки фармацевтико-технологических характеристик**

Фармацевтико-технологические характеристики модельных смесей для прессования оценивали по параметрам: сыпучесть, угол естественного откоса, насыпная плотность, которые определяли по методикам ГФ XIV [27] на приборах GDT и SVM (Erweka, Германия), соответственно.

Распадаемость таблеток оценивали с помощью тестера распадаемости ZT300 (тип – качающаяся корзинка) (Erweka, Германия), а механическую прочность – на приборе модели ТВТ (Erweka, Германия) [27].

### **2.3.4 Иммуногистохимическое исследование экспрессии рецепторов к соматостатину в экспериментальных опухолях животных**

Для иммуногистохимического исследования экспрессии рецепторов к соматостатину 1, 2 и 5 типов выбрали две опухоли – аденокарциному молочной железы Ca755 и аденокарциному толстой кишки АКАТОЛ.

Опухоли росли до 7–9 дня и когда они достигали размеров 0,7–1,0 см<sup>3</sup>, их удаляли и помещали в 10%-ый забуференный раствор формалина (pH 7,2).

Иммуногистохимическое определение экспрессии рецепторов к соматостатину в клетках экспериментальных опухолей мышей проводили на серийных парафиновых срезах с помощью иммунопероксидазного метода с применением первичных антител к различным типам рецепторов [30; 228; 342].

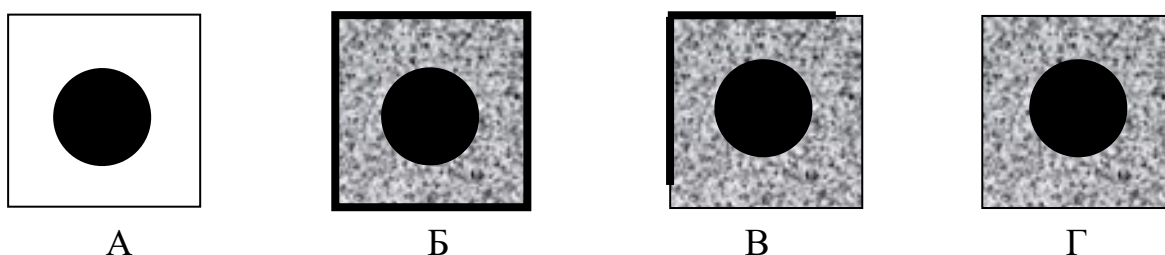
Для иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания образцы опухолевой ткани после формалина проводили по спиртам и ксилолам, заливали в парафин и готовили серийные срезы толщиной 3–5 мкм, которые наносили на стекла с адгезивным покрытием (Polysine, Menzel-Glaser, США). Один срез каждой опухоли окрашивали гематоксилином и эозином.

Срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной схеме. Для демаскировки антигенов проводили предварительную обработку парафиновых срезов в водяной бане в течение 40 мин при 95°C с использованием восстанавливающего раствора pH 6,0 (Labvision, США) с последующим охлаждением в течение 20 мин. Срезы инкубировали с первичными антителами в течение одного часа при комнатной температуре. Для визуализации реакции использовали стандартный набор реагентов UltraVision ONE Detection System (Labvision, США). Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера. Контрольный срез инкубировали с фосфатно-солевым буфером. В качестве положительного контроля использовали парафиновые срезы нормальной ткани поджелудочной железы мыши.

Для каждого образца оценивали 5 полей зрения при большом увеличении микроскопа (x400).

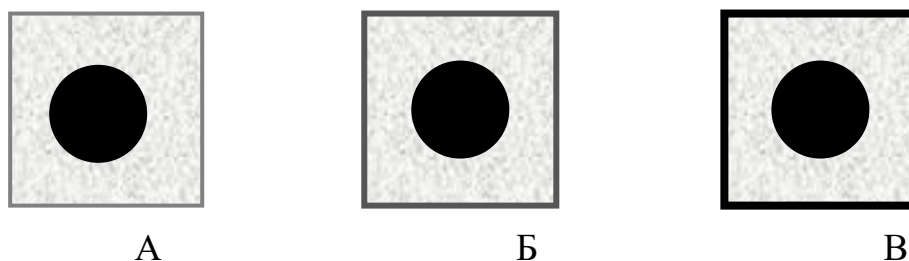
Оценку экспрессии рецепторов в опухолевых моделях проводили полуколичественным методом, учитывая:

- тип экспрессии – полная (циркулярная) мембранная, частичная (неполная) мембранная, цитоплазматическая (положительной считали полную или частичную мембранную и цитоплазматическую экспрессию SSTR) (Рисунок 9);
- выраженность (интенсивность) окрашивания мембран в баллах (Рисунок 10) и количество антиген-позитивных клеток.



А – негативная, Б – полная мембранная, В – частичная мембранная, Г – цитоплазматическая

Рисунок 9 – Типы экспрессии SSTR



А – слабая (1 балл); Б – умеренная (2 балла); В – высокая (3 балла)

Рисунок 10 – Интенсивность специфической реакции

Мембранную экспрессию SSTR оценивали по количеству позитивно окрашенных клеток независимо от наличия цитоплазматической реакции по специально разработанной шкале (Таблица 5).

Для окончательной оценки мембранной иммунореактивности при ИГХ определении подтипов SSTR интенсивность (от 1 до 3 баллов) умножали на процент позитивно окрашенных клеток (от 1 до 4 баллов). Таким образом, максимальная выраженность реакции могла быть оценена в 12 баллов (12+).

Таблица 5– Шкала для оценки мембранной экспрессии SSTR

Балл	Окрашенные клетки, %
0	менее 10
1	10–25
2	26–50
3	51–75
4	более 75

### 2.3.5 Методы, использованные в исследованиях на лабораторных животных

Исследования с использованием лабораторных животных проводили в соответствии с национальными и международными требованиями [25; 26; 33; 69; 75; 86; 95; 96; 329; 413]. Исследования с лабораторными животными одобрены Комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Протокол № 2 от 05.02.2021).

Иммунокомпетентных мышей-самок и мышей-самцов линий C57Bl/6 и CBA использовали в качестве доноров опухолевого материала и при сравнительном изучении уровня СТГ и глюкозы в периферической крови мышей под действием аранозы и стрептозотоцина (3.5 Экспериментальные исследования аранозы). Исследования проводили с гибридами первого поколения BDF1 (C57Bl/6J x DBA/2).

В эксперименты включали мышей в возрасте 8–12 недель с массой тела не менее 18 г. Мышей получали из питомников Филиал "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства" (Филиал «Столбовая» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России), Филиал «Андреевка» Федерального Государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий" Федерального медико-биологического агентства (филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России), а также из разведения экспериментально-биологической лаборатории (вивария) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животных содержали в

конвенциональных условиях экспериментально-биологической лаборатории (вивария) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Кормление мышей проводили ежедневно *ad libitum* с использованием полнорационного экструдированного комбикорма для лабораторных животных, мыши получали фильтрованную воду без ограничений.

При проведении экспериментов животных разделяли на группы по 7–8 мышей в опытной группе и 10–12 мышей в контрольной группе.

### ***Модели опухолевого роста***

В исследовании использовали штаммы перевиваемых опухолей мышей из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [134]:

Рак шейки матки РШМ5 (плоскоклеточный ороговевающий, метастазирует лимфогенно). Модель характеризуется высокой дифференцированностью и медленным ростом. Для поддержания штамма и в опытах используются мыши линии СВА.

Аденокарцинома молочной железы Ca755. Быстрорастущая солидная опухоль, иммуногенная, неметастазирующая, гормоночувствительная. Штамм поддерживается на линейных мышах-самках C57Bl/6. В исследованиях обычно используют мышей-самок C57Bl/6 и гибридов BDF1 [95; 134].

Эпидермоидная карцинома легкого Lewis. Неиммуногенная, метастазирует в легкие. Штамм поддерживается на линейных мышах-самцах C57Bl/6. Для исследований используют мышей-самцов C57Bl/6B и гибридов BDF1 или F1 [95; 134].

Дифференцированная аденокарцинома толстой кишки АКАТОЛ. Неметастазирующая опухоль. Спонтанно не регрессирует. Отличается вариабельностью темпов роста не только в разных опытах, но и у отдельных животных. Штамм поддерживается на мышах линии Balb/c. Для опытов используются мыши линии Balb/c обоего пола [134].

В исследовании влияния цифетрилина на статус рецепторов к SSTR1–5 использовали образцы аденокарциномы молочной железы Ca755, полученные:

- на девятый день после перевивки опухоли (от шести мышей-самок гибридов BDF1 (6 образцов) – контрольная группа;
- на девятый день после перевивки от пяти мышей-самок гибридов BDF1 (5 образцов) – опытная группа №1 после перорального введения цифетрилина (10 мг/24ч x 7);
- на четырнадцатый день после перевивки от пяти мышей-самок гибридов BDF1 (5 образцов) – опытная группа №2 после перорального введения цифетрилина (10мг/24ч x 7).

Опухоли (2–7 пассажи штаммов) перевивали лабораторным животным по стандартной методике. Для перевивки опухолевую ткань измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10 и 0,5 мл полученной суспензии (около 50 мг опухолевых клеток) вводили подкожно в область правой подмышечной впадины.

Через 48 часов после трансплантации опухолей начинали введение цифетрилина животным [124].

#### ***Введение лекарственных средств***

1. Прототипы ЛФ цифетрилина вводили мышам, дозируя по объему в соответствии с разовой дозой.

Прототипы ЛФ цифетрилина вводили ежедневно в течение 5 дней следующим образом:

- перорально в форме взвеси в 1% крахмальном клейстере в объемах 0,2–0,4 мл (от 1 до 120 мг/кг) с помощью металлического зонда;
- внутривентриально в виде высокодисперсной эмульсии в дозах 30–70 мг/кг;
- в виде липосомальной дисперсии в дозах 20–40 мг/кг.

Изучение противоопухолевой активности ЛФ цифетрилина проводили, применяя таблетки в виде гранулированной массы для прессования ежедневно перорально в течение 5 дней.

Дозы таблеток цифетрилина рассчитывали индивидуально на экспериментальное животное: доза (мг/кг) x масса мыши (кг). Взвесь таблеточной

массы в 1% крахмальном клейстере готовили *ex tempore* и вводили мышам перорально в объемах 0,2–0,4 мл в зависимости от разовой дозы (от 1 до 120 мг/кг) с помощью зонда.

3. Приготовление растворов аранозы и стрептозотоцина в экспериментах по изучению диабетогенного действия аранозы

Для введения мышам фармацевтические субстанции аранозы и стрептозотоцина растворяли в физиологическом растворе хлорида натрия в день введения *ex tempore*.

ЛС вводили однократно:

– в/в в дозе 1000 мг/кг

или

– в/б аранозу в дозах – 200 мг/кг и 750 мг/кг, а стрептозотоцин – в дозах 60 мг/кг и 200 мг/кг.

STZ в изученных дозах охарактеризован, как индуктор гипергликемии в сыворотке крови мышей [45; 196], дозы аранозы – по отсутствию этого эффекта [65].

### ***Оценка противоопухолевой активности***

Критериями оценки противоопухолевой активности служили торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) животных, получавших ЛС, по сравнению с контрольными животными [96].

Для оценки противоопухолевого действия объемы опухолей измеряли на 1, 8–9, 15–16, 22 и 30 дни.

Объем опухоли (V) вычисляли перемножением трех максимальных взаимно перпендикулярных размеров опухоли (длина – *l*, ширина – *b*, высота – *h*) у каждого животного.

Торможение роста опухоли вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = (V_{\text{к}} - V_{\text{о}}) / V_{\text{к}} \times 100 \quad (4)$$

где:  $V_{\text{к}}$  — средний объем опухолей в контрольной группе ( $\text{мм}^3$ );

$V_{\text{о}}$  — средний объем опухолей в опытной группе ( $\text{мм}^3$ ).

Увеличение продолжительности жизни вычисляли по формуле:

$$\text{УПЖ (\%)} = (\text{СПЖо} - \text{СПЖк}) / \text{СПЖк} \times 100 \quad (5)$$

где: СПЖк – средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни);

СПЖо – средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

Активными в противоопухолевом отношении считали дозы цифетрилина, вызывающие ТРО  $\geq 70\%$  с сохранением значимого эффекта не менее 7 суток или УПЖ  $\geq 75\%$ .

Переносимость цифетрилина оценивали, контролируя состояние и поведение животных.

Критерием оценки антиметастической активности служило торможение роста метастазов (ТРМ, %) в легких, которое вычисляли по формуле:

$$\text{ТРМ (\%)} = (\text{МЛк} - \text{МЛо}) / \text{МЛк} \times 100 \quad (6)$$

где МЛк – средняя масса легких животных в контрольной группе, мг;

МЛо – средняя масса легких животных в опытной группе, мг.

Хирургическое удаление опухоли проводили на 9-й день после перевивки экспериментальной опухоли. Введение цифетрилина также начинали на 9-й день эксперимента и вводили ежедневно внутрь в течение 10 дней в дозе 10 мг/кг. В группе животных с комбинированным воздействием цифетрилин начинали вводить за 1 час до хирургического удаления опухоли.

Для оценки антиметастической активности мышей выводили из эксперимента на 37-й день опыта после гибели 1-ой мыши в контрольной группе.

#### ***Завершение экспериментов на экспериментальных животных***

Экспериментальных животных умерщвляли передозировкой эфирного наркоза после окончания наблюдения, трупы подвергали аутопсии для выявления визуальных патологических изменений внутренних органов, после чего кремировали в специализированном подразделении с учетом международных



рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных.

## **2.4 Основные элементы концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD)**

Современные подходы к созданию ЛС предполагают системный подход к его разработке от определения области его использования до получения ЛП и включает понимание процесса его получения и стратегию контроля качества. При этом качество ЛС определяется как его соответствие предполагаемому использованию, а критичные показатели качества ЛС и критические параметры технологического процесса его получения должны быть сформулированы еще на стадии его разработки.

Разработку лекарственного средства цифетрилин и трансфер технологии производства ЛП араноза осуществляли, применяя основные элементы концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD), сформулированной в Руководствах ICHQ8, ICHQ9 и ICHQ10 [230–232].

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

Целевой профиль качества продукта – комплекс характеристик ЛП, который в идеале должен быть достигнут, чтобы обеспечить запланированное качество с учетом безопасности и эффективности ЛС [230].

Целевые профили качества продуктов разрабатывала специально созданная междисциплинарная комиссия, включавшая специалистов по фармацевтической технологии, контролю качества, регуляторной практике и врача-онколога. Целевые профили качества ЛС включали качественные характеристики

разрабатываемых ЛС, ЛФ и дозировки в единице лекарственной формы, которые обеспечивают его эффективность и безопасность.

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 (ICH Q8 (R2), 2009) [230].

CQAs определяли как характеристики, оказывающие наиболее значительное влияние на QTPP, которые должны контролироваться для обеспечения качества, безопасности и эффективности лекарственного средства.

Междисциплинарная комиссия также проводила анализ степени непосредственного влияния каждого критичного показателя на качество и эффективность лекарственного средства (оценка критичности). Методом экспертного опроса каждому показателю выставляли оценку в баллах в соответствии со специально разработанной шкалой, приведенной в Таблице 6.

Под наиболее критичными понимали те показатели качества, нарушение или отклонение которых может повлиять на безопасность и эффективность ЛП и привести к развитию серьезных неблагоприятных реакций у пациента.

Относительную критичность показателя качества рассчитывали как произведение оценок – [степень влияния x вероятность отклонения].

Таблица 6 – Шкала для оценки критичности показателей качества лекарственных средств

Влияние	Балл	Изменения безопасности/эффективности	Вероятность	Балл	Описание
Очень высокое	15	Необратимые побочные явления/Очень значительные	Очень высокая	5	Информация отсутствует
Высокое	12	Обратимые побочные явления/ Значительные	Высокая	4	Литературные данные или информация для аналогичного продукта
Среднее	9	Контролируемые побочные явления/Умеренные	Средняя	3	Данные доклинических исследований <i>in vitro/in vivo</i>
Низкое	3	Преходящие побочные явления/ Приемлемые изменения	Низкая	2	Данные клинических исследований изучаемого продукта
Отсутствует	1	Отсутствие побочных явлений/ Изменения отсутствуют	Очень низкая	1	Данные медицинского применения

## 2.5 Определение индексов воспроизводимости процессов

При валидации технологических процессов индексы воспроизводимости процессов  $C_p$  и  $C_{pk}$  рассчитывали по формулам в соответствии с ГОСТ Р 50779.44-2001 Статистические методы. Показатели возможностей процессов. Основные методы расчета [24]:

$$C_p = \frac{USL - LSL}{6\delta} \quad (7)$$

$$C_{pk} = \min \left[ \frac{USL - \bar{X}}{3\delta}, \frac{\bar{X} - LSL}{3\delta} \right] \quad (8)$$

где  $C_p$  – индекс воспроизводимости процесса, оценивающий возможности удовлетворять технический допуск без учета положения среднего значения;  $C_{pk}$  – индекс воспроизводимости процесса, оценивающий возможности удовлетворять технический допуск с учетом фактического положения среднего значения; индекс применяется для анализа процессов, стабильных как по разбросу, так и по настройке;

LSL (Lower Specification Limit) – нижний предел допуска (минимально допустимое значение показателя качества);

USL (Upper Specification Limit) – верхний предел допуска (максимально допустимое значение показателя качества);

$\delta$  – стандартное отклонение контролируемого параметра (показателя качества) [24].

## 2.6 Метод матрицы анализа и снижения рисков

Метод матрицы анализа и снижения рисков The Risk Analysis and Mitigation Matrix – RAMM использовали для определения воздействия отдельных операций

технологического процесса на критичные показатели готового продукта и определения высокорисковых операций [106; 398].

Метод позволяет непосредственно оценить влияние каждого технологического риска на качество продукта и определить стадии производственного процесса, которые нуждаются во внутрипроизводственном контроле.

## **2.7 Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку данных проводили согласно требованиям ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [27], с применением стандартного программного обеспечения Excel.

Статистическую обработку данных, полученных в исследованиях по изучению противоопухолевой активности, проводили с использованием доверительных интервалов средних сравниваемых величин по стандартному методу Стьюдента в модификации Р.Б. Стрелкова. Для оценки достоверности различий определяли t-критерий (t-тест), значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Статистически значимым считали ТРО  $\geq 50\%$ .

Дизайн диссертационного исследования приведен на Рисунке 11.



Рисунок 11 – Дизайн диссертационного исследования [126; 351, 354]

### **ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ТРАНСФЕРУ ТЕХНОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА АРАНОЗА ЛИОФИЛИЗАТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ 0,5 Г**

Любой продукт проходит жизненный цикл. Жизненный цикл ЛП, начинающийся с момента его регистрации и начала применения в клинической практике, включает четыре стадии:

- выведение на рынок;
- рост (значительное увеличение объемов реализации);
- зрелость (постепенное замедление роста реализации);
- спад (значительное снижение объемов реализации).

Один традиционный жизненный цикл проходят только очень специфические продукты. Повтор жизненного цикла для оригинальных ЛП (брендов) возможен путем реализации следующих стратегий:

- разработка ЛФ, предполагающей иной путь введения;
- создание ЛФ с более рациональным режимом применения (например, пролонгированного действия);
- создание ЛФ для применения в особых возрастных группах пациентов (например, для использования ЛС в педиатрической практике);
- изменение упаковки ЛП (характерно для лекарственных средств, отпускаемых без рецепта врача).

При этом для противоопухолевых ЛП, наиболее распространенной является стратегия расширения показаний к применению, то есть определение новых локализаций, гистологических типов и/или нозологических форм рака для использования оригинального ЛС.

Араноза – отечественный противоопухолевый лекарственный препарат, разрешенный для лечения меланомы [3; 28].

Как указано выше, араноза по химической структуре близка к стрептозотоцину, который является стандартом лечения НЭО (*ГЛАВА 1, 1.1.2.1 Производные нитрозоалкилмочевины и их лекарственные формы*).

Изучение Аранозы на моделях экспериментальных опухолей мышей и ксенографтах рака легкого человека позволило спрогнозировать противоопухолевый эффект препарата при НЭО [19; 56; 58; 85; 86]. Анализ результатов отдельных случаев применения Аранозы у больных НЭО показал ее существенные терапевтические преимущества перед стрептозотоцином не только по эффективности и значимому ингибированию запущенных опухолей, но и по значительно большей широте фармакологического действия [87; 88].

Необходимость производства достаточного количества ЛП для клинических исследований у пациентов с НЭО и организация выпуска коммерческих серий Аранозы послужили предпосылками для трансфера технологии получения ЛП Араноза.

Трансфер технологии производства ЛП Араноза потребовал провести:

- анализ и оценку рисков отдельных стадий ТП;
- масштабирование технологического процесса;
- валидацию стадий технологического процесса;
- валидацию и трансфер аналитических методик контроля качества

*Аранозы (ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ, ВАЛИДАЦИИ И ТРАНСФЕРУ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА АРАНОЗА).*

В качестве критериев успешности трансфера технологии производства Аранозы лиофилизата для приготовления раствора для инъекций 0,5 г рассматривали:

- получение ЛП, соответствующего требованиям спецификаций (на выпуск и на конец срока годности) соответствующих спецификациям регистрационного досье;
- успешная валидация технологического процесса и аналитических методик принимающей стороной;
- подтвержденная способность принимающей стороны в рутинном режиме воспроизводить ЛС, ТП или аналитическую методику в соответствии с



определенным набором спецификаций, согласованных с передающей стороной [99; 371].

Трансфер технологии получения Аранозы осуществляли на специально организованный участок по производству препаратов, содержащих высокотоксичные вещества (цитостатики).

### **3.1 Применение концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD) при трансфере технологии получения лекарственного препарата Араноза**

Трансфер технологии производства Аранозы осуществляли, применяя основные элементы концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD) (ГЛАВА 2, 2.4 Основные элементы концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD)) с учетом требований, изложенных в [230; 231; 232; 371; 404].

Состав лекарственного препарата Араноза приведен в Таблице 7.

Таблица 7 – Состав лекарственного препарата Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г

Ингредиент	Спецификация	Назначение	Количество, г/флакон
Араноза	ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России	Активное вещество [3, 28]	0,5
Коллидон 17PF	Ph.Eur. действующего издания	ВВ – наполнитель, стабилизатор [73;74]	0,5
Сорбиновая кислота	Ph.Eur. действующего издания	ВВ – регулятор pH [333]	0,004

Целевой профиль качества препарата Араноза разработан междисциплинарной комиссией, включавшей специалистов по фармацевтической технологии, контролю качества, регуляторной практике и врача-онколога. Следует отметить, что целевой профиль качества Аранозы разработан с учетом всех имеющихся данных по доклиническим и клиническим исследованиям и

медицинскому применению препарата при меланоме. Целевой профиль качества (QTPP) Аранозы приведен в Таблице 8.

Таблица 8 – Целевой профиль качества (QTPP) лекарственного препарата Араноза

Элементы QTPP	Целевой показатель
Целевое назначение	Лечение нейроэндокринных опухолей
Целевая популяция	Пациенты с гистологически и иммуногистохимически подтвержденным диагнозом НЭО различной локализации (ЖКТ, легкие, средостение и т.д.)
Лекарственная форма	Лиофилизат [72; 123; 191]
Дизайн лекарственной формы	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, укупоренные пробками из резины под обкатку алюминиевыми колпачками

В Таблице 9 приведены CQAs лекарственного препарата Араноза. Как видно из представленных данных, CQAs лекарственного препарата Араноза являются характерными для ЛС для парентерального применения и лиофилизатов и определяются требованиями ГФ XIV и Европейской Фармакопеи (European Pharmacopoeia, PhEur), предъявляемым к данным ЛФ [27; 188].

На следующем этапе исследования провели анализ степени непосредственного влияния каждого критичного показателя на качество и эффективность ЛС (оценку критичности). Методом экспертного опроса каждому показателю выставили оценку в баллах в соответствии со специально разработанной шкалой, приведенной в Таблице 6 (ГЛАВА 2, 2.4 Основные элементы концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD)).

Таблица 9 – Критичные показатели для качества (CQAs) лекарственного препарата Араноза

Показатель качества (Quality attribute, QA)	Нормы	CQA?	Обоснование
Описание (внешний вид)	Сухая пористая масса белого цвета с желтоватым оттенком	Нет	Не влияет непосредственно на безопасность и эффективность ЛС
Подлинность	Положительная для аранозы	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
Время растворения	Менее 1 мин	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
Однородность массы	Отклонение от средней массы $\pm 5,0\%$	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
Прозрачность раствора <sup>1</sup>	Должен быть прозрачным	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
Цветность раствора <sup>1</sup>	Не превышает окраску эталона Y <sub>4</sub> или GY <sub>4</sub>	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
pH <sup>1</sup>	От 3,0 до 4,5	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
Удельное вращение <sup>2</sup>	От +12,0° до +16,2°	Нет	Не влияет на безопасность и эффективность ЛС
Механические включения <sup>3</sup>	Должен выдерживать требования	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
Посторонние примеси	Не более 3%	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
Потеря в массе при высушивании	Не более 8,0%	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
Пирогенность <sup>3</sup>	Должен быть апиrogenным	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
Аномальная токсичность <sup>3</sup>	Должен быть нетоксичным	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
Стерильность <sup>3</sup>	Должен быть стерильным	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС
Количественное определение	От 0,450 г до 0,550 г	Да	Влияет на безопасность и эффективность ЛС

Примечания – <sup>1</sup> Раствор содержимого флакона в 20 мл воды

<sup>2</sup> Раствор содержимого флакона в 50 мл метанола

<sup>3</sup> Показатели качества «Механические включения», «Пирогенность», «Аномальная токсичность», «Стерильность» гарантируются характеристиками производства, технологическими процессами и обусловлены свойствами фармацевтической субстанции.

Под наиболее критичными понимали показатели качества, нарушение или отклонение которых может повлиять на безопасность и эффективность ЛП и привести к развитию серьезных неблагоприятных реакций у пациента. Следует отметить, что, в отличие от других производных НАМ, при применении Аранозы в терапевтических дозах отмечается незначительная токсичность со стороны

периферической крови (угнетение лейкопоза, тромбоцитопоза и в меньшей степени эритропоза), ЖКТ, почек и ЦНС. Побочные эффекты при лечении Аранозой обратимы и не лимитируют проведение химиотерапии [3; 303].

Результаты оценки критичности показателей для качества лекарственного препарата Араноза приведены в Таблице 10.

Таблица 10 – Относительная критичность показателей для качества лекарственного препарата Араноза

12	18	3	3	24	9	18	24	12
Подлинность, в том числе время растворения	Однородность массы	Прозрачность раствора	Цветность раствора	pH	Посторонние примеси	Потеря в массе при высушивании	Количественное определение	Упаковка/маркировка

Примечание – Относительную критичность показателя качества рассчитывали как произведение степени влияния на QTPP и вероятности отклонения от спецификации

Из данных, представленных в Таблице 10, очевидно, что наиболее критичными критериями качества являются pH раствора после регидратации и количественное содержание аранозы в единице упаковки.

Параллельно с определением QTPP и CQAs Аранозы провели анализ ТП производства лиофилизированной лекарственной формы Аранозы в соответствии с ОПР 17495490-2-2003 (Рисунок 12) и установили связь между отдельными операциями ТП производства Аранозы, критичными показателями для качества промежуточного продукта на стадиях ТП и критичными показателями для качества лекарственного препарата (Рисунок 13).

### ***Краткое описание ТП***

Технологический процесс получения ЛП Араноза состоит из следующих стадий, характерных для производства лиофилизированных лекарственных средств [71; 74; 112; 209; 240; 209].

1. Стадии ВР (вспомогательные работы), включающие получение воды для инъекций; подготовку к работе в асептических условиях (подготовку азота,

сжатого воздуха, вентиляционного воздуха), приготовление дезинфицирующих и моющих растворов, подготовку производственных помещений и оборудования, технологической одежды и персонала. На этих стадиях проводится подготовка сырья и материалов – взвешивание АФС и вспомогательных веществ, а также подготовка материалов для упаковки (флаконов, пробок и алюминиевых колпачков).

## 2. Стадии ТП

Приготовление раствора аранозы проводят в следующем порядке: сначала готовят раствор вспомогательных веществ – рассчитанное количество сорбиновой кислоты растворяют в горячей воде при постоянном перемешивании, охлаждают. В полученном растворе сорбиновой кислоты растворяют Коллидон 17PF. Растворение аранозы проводят в растворе Коллидона 17PF в сорбиновой кислоте. Проводят предварительную фильтрацию полученного раствора аранозы через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Для стерилизующей фильтрации используют мембранные фильтры GSTF/GSWP с размером пор 0,22 мкм.

Стерильный раствор аранозы разливают по 5 мл в стерильные флаконы из трубки стеклянной для лекарственных средств ФО-1-20-НС-1 вместимостью 20 мл и немедленно закрывают пробками резиновыми до риски на пробке для лиофильных продуктов. Наполненные и преукупоренные флаконы помещают в металлические кассеты и передают на стадию лиофилизации. Кассеты с флаконами помещают на полки сублимационной установки и проводят лиофильную сушку раствора аранозы в соответствии с программой лиофилизации [44; 355]. Общее время сушки препарата во флаконах вместимостью 20 мл составляет 24–30 часов. По окончании сушки гасят вакуум в сублимационной камере, включают подъем полок сушилки для укупорки флаконов пробками. Кассеты с препаратом выгружают из сублимационной камеры и передают на стадию Обкатка флаконов. Мойка внешней поверхности флаконов. Укупоренные флаконы помещают в кассеты и передают на стадию Упаковки, маркировки и отгрузки готового продукта (УМО).

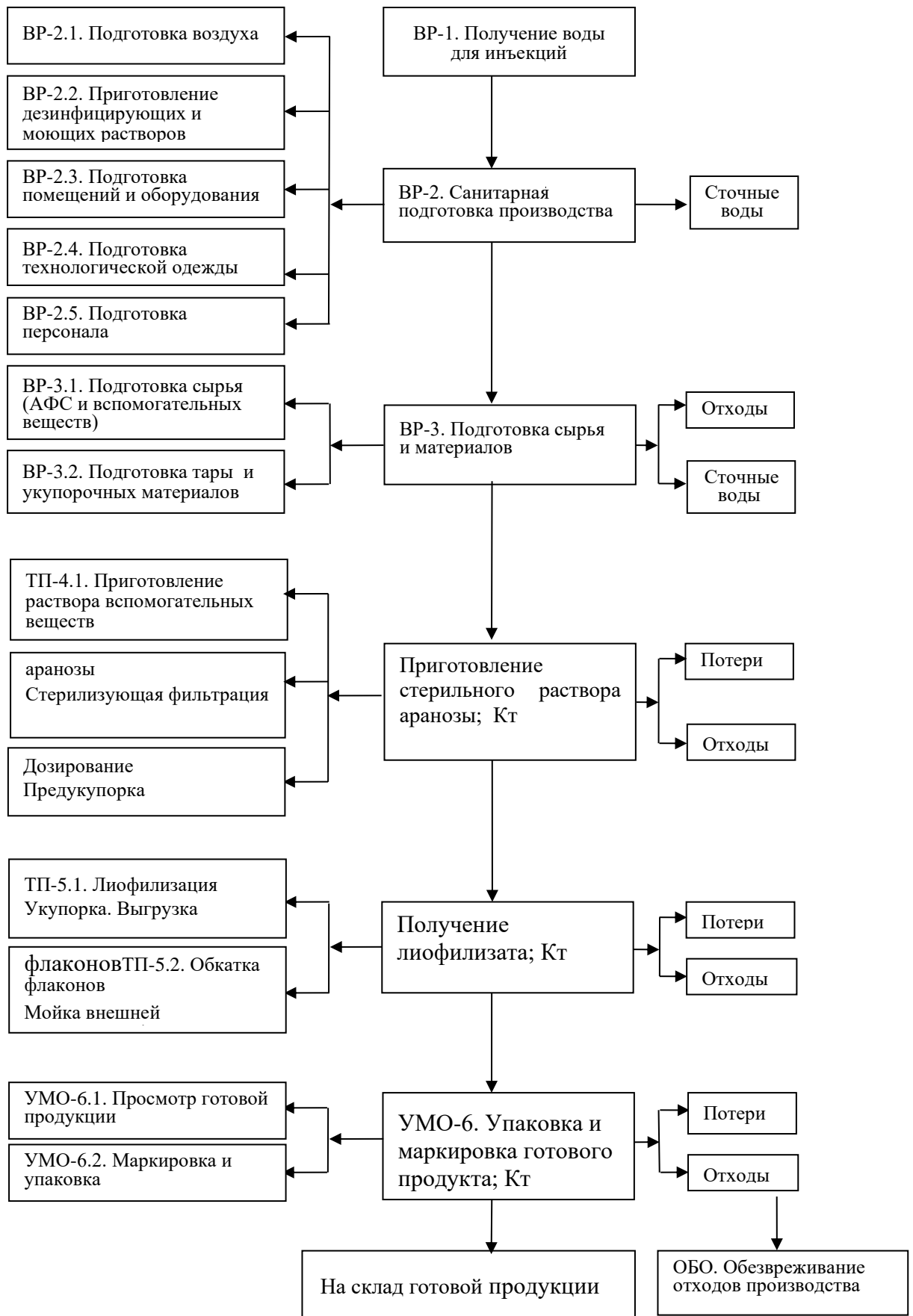


Рисунок 12 – Блок-схема технологического процесса производства Аранозы, лиофилизата для приготовления раствора для инъекций

### 3. Стадия УМО

Флаконы с высушенным препаратом в кассетах (ГФ-36) передают на просмотр и отбраковку, которую проводят визуально. На флаконы с готовой продукцией наклеивают этикетку установленного образца. 6 флаконов и инструкцию по применению помещают в картонную пачку из картона. После контроля качества готовой продукции по всем показателям НД ЛП упаковывают в групповую и транспортную упаковку [44].

Из схемы, представленной на Рисунке 13, видно, что приготовление стерильного раствора аранозы оказывает влияние практически на все критичные показатели качества готового продукта.



Рисунок 13 – Связь между операциями технологического процесса и критичными показателями качества ЛПП Араноза



Для оценки рисков междисциплинарная комиссия использовала специально разработанную шкалу в баллах:

1 балл – технологические процессы, оказывающие незначительное влияние на характеристики готового препарата;

3 балла – процессы, имеющие умеренное влияние или уровень риска;

9 баллов – процессы, воспринимаемые как имеющие значительное влияние [6].

Таблица 11 – Предварительная оценка рисков процесса производства Аранозы лиофилизата для приготовления раствора для инъекций

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
pH	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>	123	<b>47</b>	<b>21</b>	<b>17</b>	

Примечания – <sup>1</sup>Баллы – относительная критичность (Таблица 11)

<sup>2</sup>ТП-4. включает ТП-4.1. и ТП-4.2.; ТП-5. включает ТП-5.1. и ТП-5.2. (Рисунок 13)

<sup>3</sup>Итого 1 – (критичность) x (сумма оценок каждого процесса); Итого 2 – сумма оценок процесса

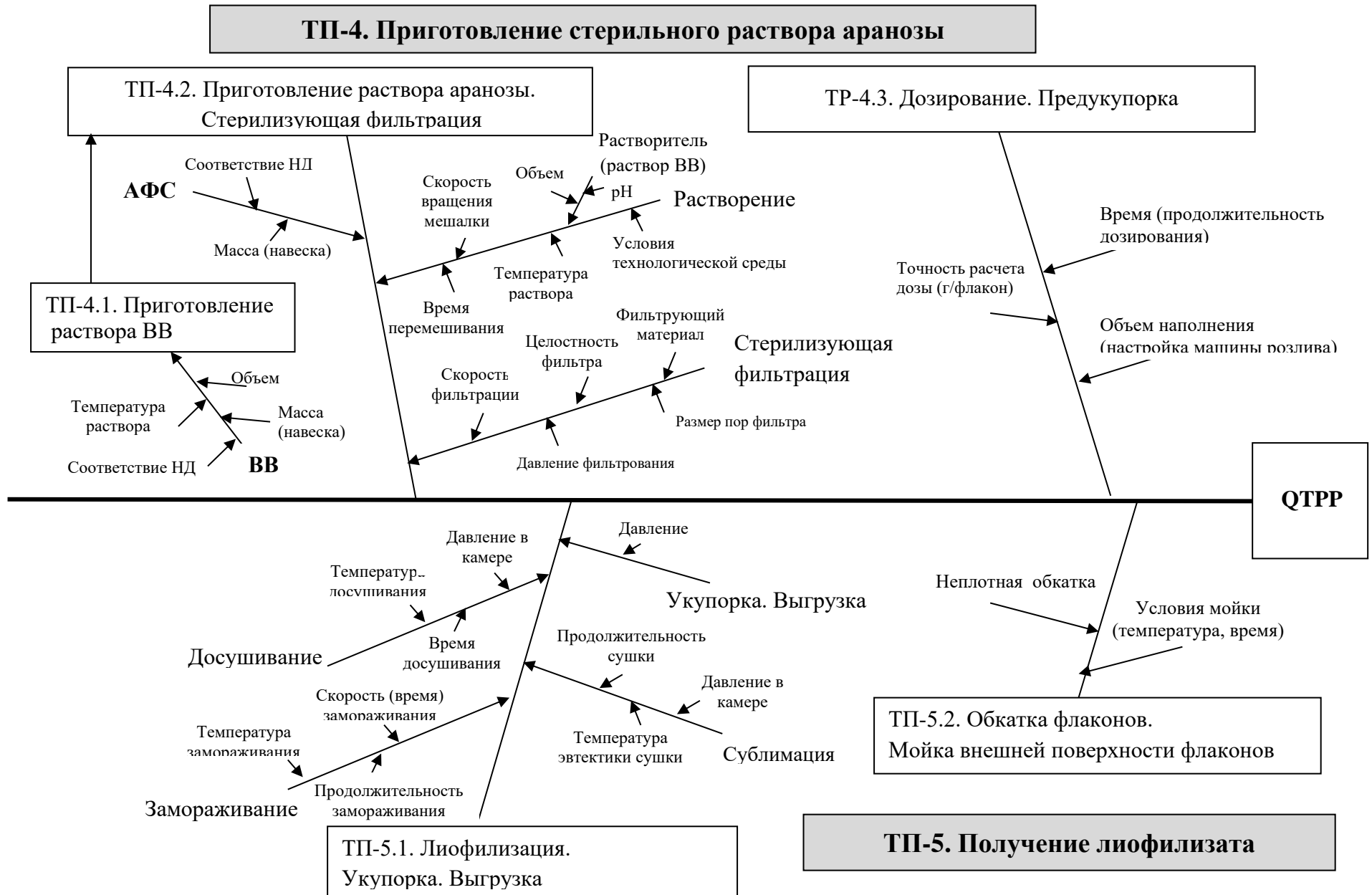


Рисунок 14 – Диаграмма Ишикавы для процесса производства Аранозы лиофилизата для приготовления раствора для инъекций

В Таблице 11 приведены результаты количественной оценки влияния основных стадий ТП производства Аранозы на критичные показатели качества препарата, представленные в виде матрицы.

Представленные данные подтверждают, 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 14.

Анализ данных, представленных на Рисунке 14 и в Таблице 11, позволил определить контрольные точки технологического процесса получения Аранозы, их параметры и критерии приемлемости. В Таблице 12 приведены контрольные точки стадии ТП-4 и соответствующие критерии приемлемости.

Таблица 12 – Контрольные точки ТП-4. Приготовление стерильного раствора аранозы

Контрольная точка	Контролируемый параметр	Критерий приемлемости
ТП-4. Приготовление стерильного раствора аранозы		
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	От 0,090 до 0,110
КТ-ТП-4.2.3 Раствор аранозы	рН раствора	От 3,0 до 4,5
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

Контроль параметров проводили по методикам, разработанным в ходе настоящего исследования (*ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ, ВАЛИДАЦИИ И ТРАНСФЕРУ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ*

*КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА АРАНОЗА*) и описанным в ГФ XIV [27]. Количественное содержание аранозы в растворе для дозирования рассчитывали по формуле (11).

### **3.2 Масштабирование технологического процесса производства Аранозы**

К началу работ по переносу технологии Араноза уже выпускалась ООО фирма «ГЛЕС» в крупно-лабораторных условиях в соответствии с ОПР 17495490-2-2003 по лицензионному договору с ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. На существовавшем лабораторном производстве выпускались серии небольшого объема (до 300 флаконов) и использовалось оборудование «открытого» типа, не отвечавшее требованиям безопасности для окружающей среды и персонала, контактирующего с препаратом.

При масштабировании получали серии в объеме 1/10 от планируемой промышленной серии, полностью воспроизводя разработанный ранее ТП. При этом использовали оборудование, отличавшееся по производительности, но полностью идентичное по операционным принципам [43].

В процессе масштабирования проводили качественный и количественный контроль промежуточного продукта и образцов готового ЛП по показателям, указанным в спецификации на ЛП (Таблица 9, Таблица 13) и ОПР (Приложение Г) по методикам, описанным в *ГЛАВЕ 4 (ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ, ВАЛИДАЦИИ И ТРАНСФЕРУ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА АРАНОЗА)* и ГФ XIV [27]. Количественное содержание аранозы в ЛП и растворе для дозирования рассчитывали по формулам (10) и (11), соответственно.

Таблица 13 – Результаты контроля промежуточного продукта и готового ЛП при масштабировании

Показатель качества	Критерий приемлемости	Объем серии (флаконы)	
		1 (300)	10 (3000)
<b>Промежуточный продукт – раствор аранозы для дозирования</b>			
рН	От 3,0 до 4,5	3,3	3,4
Количественное содержание аранозы, г/мл	От 0,090 до 0,110	0,107	0,105
Объем раствора во флаконе, мл	От 4,9 до 5,1	5,0	5,0
<b>Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г</b>			
Описание	Сухая пористая масса белого цвета с желтоватым оттенком	Соответствует	Соответствует
Подлинность	Положительная для аранозы	Соответствует	Соответствует
Время растворения	Менее 1 мин	Соответствует	Соответствует
Однородность массы	Отклонение от средней массы $\pm 5,0\%$	$\pm 3,8\%$	$\pm 3,2\%$
Прозрачность раствора <sup>1</sup>	Должен быть прозрачным	Соответствует	Соответствует
Цветность раствора <sup>1</sup>	Не превышает окраску эталона Y <sub>4</sub> или GY <sub>4</sub>	Соответствует	Соответствует
рН <sup>1</sup>	От 3,0 до 4,5	3,3	3,3
Удельное вращение	От + 12,0° до +16,2°	+15,9°	+15,8°
Посторонние примеси	Не более 3%	Соответствует	Соответствует
Потеря в массе при высушивании	Не более 8,0%	1,2	1,1
Количественное определение	От 0,450 г до 0,550 г	0,498	0,507

Примечание – <sup>1</sup>Раствор содержимого флакона в 20 мл воды;

<sup>2</sup>Раствор содержимого флакона в 50 мл метанола;

<sup>3</sup>ЛП соответствовал требованиям НД по показателям «Механические включения», «Пирогенность», «Аномальная токсичность», «Стерильность»

В результате проведенного исследования по масштабированию ТП получения Аранозы незначительные изменения потребовались на стадии ТП-4: установлено, что приготовление раствора ВВ требует увеличения времени растворения и скорости вращения пропеллерной мешалки. Приготовление раствора аранозы с использованием рассчитанного коэффициента увеличения объема (равного 0,67 мл/г для Коллидона 17PF и аранозы [43; 44]) позволяет использовать точное количество растворителя и увеличить объем получаемого

раствора. При этом порядок приготовления раствора аранозы и температуру растворения ВВ и аранозы не изменяли. При получении увеличенных серий Аранозы параметры и условия фильтрования не изменяли. На основании проведенных исследований разработан ОПР № 01897624-13 (Приложение Г).

Данные, представленные в Таблице 13, свидетельствуют о том, что промежуточный продукт и готовый ЛП, полученные при масштабировании, соответствуют критериям качества, установленным в НД (Таблица 14).

### **3.3 Валидация технологических операций производства Аранозы лиофилизата для приготовления раствора для инъекций**

Для документированного подтверждения того, что процесс производства ЛП в пределах установленных параметров выполняется эффективно и воспроизводимо приводит к получению лекарственного препарата, соответствующего установленным спецификациям и показателям [98], проводили валидацию технологических операций, определенных как критичные.

При составлении валидационного плана в соответствии с ОПР № 01897624-13 определили контрольные точки, контролируемые параметры и установили для них количественные диапазоны допустимых значений, соблюдение которых позволит гарантированно получать препарат надлежащего качества.

В ходе валидации технологического процесса три идущие подряд серии Аранозы лиофилизата для приготовления раствора для инъекций (с. 010613, 020613 и 030913) получали в соответствии с опытно-промышленным регламентом ОПР № 01897624-13 (Приложение Г). Параметры качества раствора аранозы контролировали с помощью разработанных и валидированных аналитических методик (*ГЛАВА 4, 4.2 Исследования по разработке и валидации методик контроля качества лекарственного препарата Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г*).

Оценку возможностей стабильного процесса проводили, рассчитывая индексы воспроизводимости процессов  $C_p$  и  $C_{pk}$  по формулам (2) и (3),

соответственно [ГЛАВА 2, 2.5 *Определение индексов воспроизводимости процессов*]. Количественное содержание аранозы в растворе (г/мл) рассчитывали по формуле (11). Результаты проверки стабильности процесса приведены на Рисунках 15 и 16 и в Таблице 14.

На Рисунке 15 видно, что результаты количественного определения аранозы в растворе (КТ-ТП-4.2.2) лежат в диапазоне от 0,099 до 0,102 г/мл; среднее значение составляет 0,101 г/мл. При этом все результаты находятся в пределах трех стандартных отклонений относительно среднего результата – от 0,098 до 0,105 г/мл, а индексы воспроизводимости процесса составляют  $C_p=1,32$  и  $C_{pk}=1,08$ .

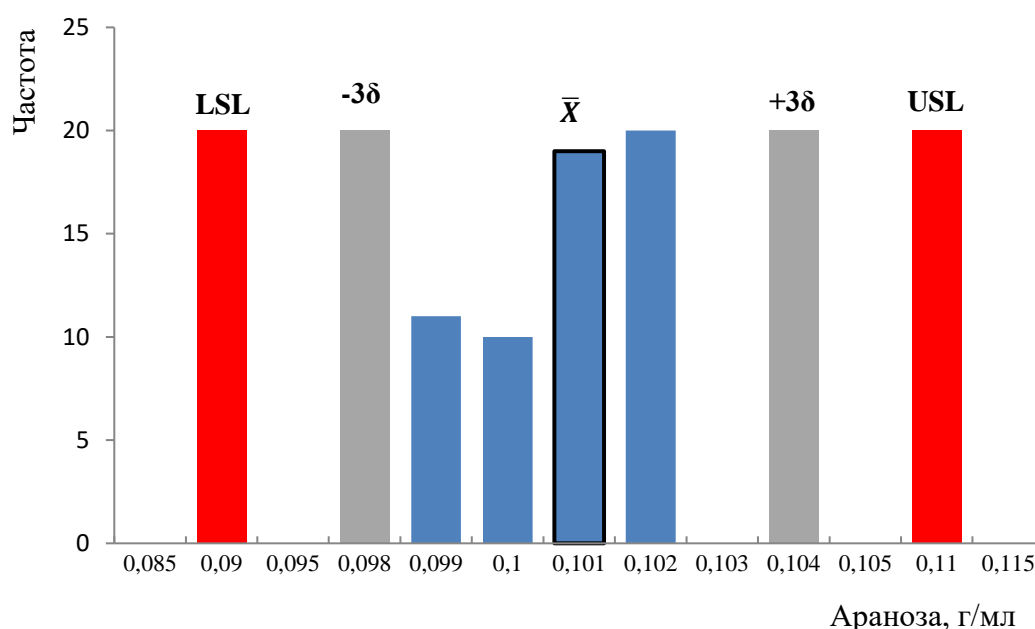


Рисунок 15 – Гистограмма распределения результатов количественного определения аранозы в растворе (КТ-ТП-4.2.2), г/мл

Данные, представленные на Рисунке 16, свидетельствуют о том, что среднее значение рН раствора аранозы, подготовленного для дозирования, составляет 3,5. Результаты всех определений укладываются в пределы от 3,2 до 3,8, то есть лежат в пределах трех стандартных отклонений относительно среднего значения. Рассчитанные индексы воспроизводимости процесса  $C_p$  и  $C_{pk}$  составляют 1,15 и 1,05, соответственно.

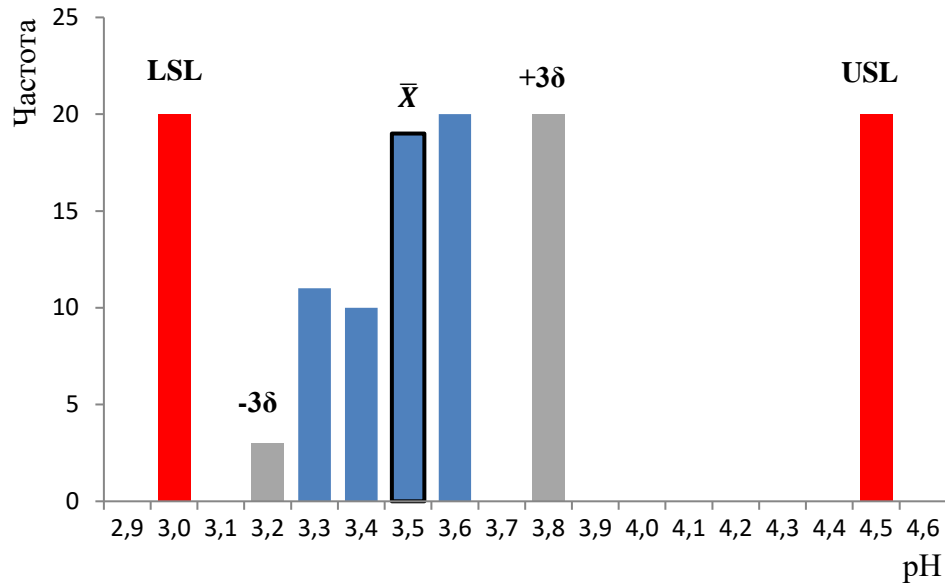


Рисунок 16 – Гистограмма распределения результатов определения pH в растворе аранозы (КТ-ТП-4.2.3)

Таким образом, в проведенном исследовании с помощью аналитических методик показано, что проведение наиболее критичной стадии технологического процесса получения ЛП Араноза (ТП-4 Приготовление стерильного раствора аранозы) в пределах определенных параметров позволяет получить полупродукты и ЛП, характеристики которых соответствуют спецификации и воспроизводимы (Таблица 14). При этом рассчитанные  $C_p$  и  $C_{pk}$  выше 1,0, а  $C_p > C_{pk}$ .



Таблица 14 – Показатели качества ЛП Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г согласно требованиям НД при валидации технологического процесса

Показатель	Нормы по НД (ФСП 42-0105-0656-00)	010613	020613	030913
Описание	Сухая пористая масса белого цвета с желтоватым оттенком	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Подлинность	Положительная для аранозы	Положительная	Положительная	Положительная
Средняя масса, г, однородность массы, %	От 0,90 до 1,10; Отклонение массы от средней $\pm 5,0$	0,96; $\pm 1,8$	0,97; $\pm 2,7$	0,98; $\pm 2,1$
Прозрачность раствора	Должен быть прозрачным	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Цветность раствора	Интенсивность окрашивания не должна превышать эталон Y <sub>4</sub> и GY <sub>4</sub>	Соответствует	Соответствует	Соответствует
pH	От 3,0 до 4,5	3,5	3,5	3,6
Удельное вращение, °	От +12,0 до +16,2	+14,1	+15,0	13,1
Посторонние примеси, %	Не более 3,0	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Потеря в массе при высушивании, %	Не более 8,0	<0,1	<0,1	<0,1
Количественное определение, г	От 0,450 г до 0,550 г	0,500	0,504	0,492

Примечание – Все протестированные серии ЛП соответствовали требованиям НД по показателям Механические включения, Пирогенность, Аномальная токсичность и Стерильность

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

В основу концепции организации нового производства положены стандарты GMP [68; 89; 374], информация о характеристиках ЛП и методах его производства, полученные на стадии фармацевтической разработки и малосерийного производства [43; 44; 74; 356] и инновационные технологии, обеспечивающие безопасность продукта, персонала и технологической среды.

Анализ всех стадий производства показал, что технологическая схема производства Аранозы характерна для производства лиофилизированных препаратов. Однако процесс производства ЛП Араноза имеет два существенных ограничения, которые обусловлены:

- фармако-токсикологическими свойствами аранозы, как производного нитрозоалкилмочевины и
- физико-химическими характеристиками аранозы – прежде всего, ее термолабильностью, исключаящую финишную стерилизацию (*ГЛАВА 2, 2.1.1 Активные фармацевтические субстанции, Таблица 3*).

Потенциальная опасность противоопухолевых ЛС, обусловленная механизмом их действия, как для пациентов, так и для персонала, связанного с производством и применением цитотоксических препаратов, известна с 1940-х годов, когда данные ЛП стали использоваться в онкологической практике [142; 153; 422]. В ряде исследований установлено, что контакты с химиотерапевтическими препаратами при вдыхании и/или попадании на слизистые оболочки и кожу, могут приводить как к острым побочным реакциям (раздражение кожи и слизистой оболочки глаз, головная боль, тошнота и рвота и другие), так и к грозным нарушениям здоровья (угнетению гемопоэза, развитию заболеваний печени, бесплодию или потенциальной возможности патологии беременности и др.). Кроме того, известно, что многие противоопухолевые препараты обладают выраженными иммунодепрессивными, мутагенными и

канцерогенными свойствами. Опасность работы с цитостатиками установлена для персонала, занятого на всех этапах получения ЛП – от синтеза АФС до работников, связанных с утилизацией медицинских отходов [143; 298; 301; 397].

На основании имеющихся доказательств опасности Международное агентство по изучению рака Всемирной организации здравоохранения (International Agency for research of cancer World Health Organization, IACR) относит противоопухолевые соединения – производные нитрозоалкилмочевины – ко второй группе (2А или 2В) по канцерогенной активности, то есть к веществам, для которых весьма вероятно проявление канцерогенных свойств [147; 294].

Анализ материалов доклинических и клинических исследований показал, что араноза обладает выраженными токсическими свойствами и опасными отдаленными эффектами и может быть отнесена к категории «опасных лекарственных средств» (hazardous drug, HD) [147; 298]. Изучение токсических свойств позволило охарактеризовать аранозу, как вещество, обладающее сверхкумулятивными свойствами, а специально проведенными исследованиями установлена способность аранозы к резорбции через кожу [41; 42; 63; 105; 118].

По результатам токсиколого-гигиенического изучения аранозы рекомендовано полное исключение профессионального контакта с препаратом и его попадание в окружающую среду, в том числе запрещен сброс аранозы в водные объекты сточных вод [14; 92].

Таким образом, при организации производства Аранозы необходимо решить две задачи:

- обеспечить безопасность персонала и технологической среды,
- создать технологическую среду, необходимую для асептического производства продукта, защитив его от негативного воздействия человеческого фактора и исключив возможность контаминации и кросс-контаминации.

Это потребовало применения принципиально нового подхода к организации производства ЛП Араноза уже на стадии разработки концепт-дизайна будущего производства.

В первую очередь в соответствии с рекомендациями ВОЗ на этапе проектирования провели оценку рисков воздействия аранозы на персонал на всех стадиях технологического процесса и определили производственные операции, которые характеризуются наиболее продолжительной экспозицией аранозы и наибольшим количеством экспонируемых лиц [403].

В процессе производства попадание аранозы в организм возможно ингаляционным путем и при адсорбции через кожные покровы и слизистые оболочки. На первый взгляд, наиболее опасным является ингаляционный путь, который характеризуется быстрым поступлением соединения в кровь за счет большой поверхности всасывания и интенсивного кровотока, кроме того, при вдыхании араноза минует печень, что обуславливает ее высокую концентрацию в крови. Однако в настоящее время считается, что основным путем воздействия токсичных препаратов является их адсорбция с контаминированных поверхностей через кожу и слизистые оболочки (рта и/или глаз) [207; 208; 249].

Анализ блок-схемы ТП (Рисунок 12) показал, что основной операцией с АФС и открытым продуктом является стадия ТП-4:

(1) ТП-4. Приготовление стерильного раствора Аранозы

- ТП-4.1. Приготовление раствора ВВ;
- ТП-4.2. Приготовление раствора Аранозы. Стерилизующая фильтрация;
- ТП-4.3 Дозирование. Предукупорка.

На стадии ТП-5. Получение лиофилизата возможен контакт персонала с аранозой при нарушении целостности флаконов в процессе лиофильной сушки и/или при выгрузке из лиофильной сушки, а также при наличии следов аранозы на внешней поверхности флакона.

Количественную оценку рисков воздействия аранозы на персонал провели с учетом возможного времени экспозиции аранозы (в соответствии с ОПП), путей поступления в организм, вероятности возникновения и обнаружения контакта с аранозой (Таблица 15).

Как видно из Таблицы 15, ТП с наиболее высокими рисками с точки зрения воздействия токсического вещества является приготовление стерильного раствора Аранозы (ТП-4.2. Приготовление раствора аранозы. Стерилизующая фильтрация и ТП-4.3. Дозирование. Предукупорка).

Следует отметить, что персонал может подвергаться воздействию аранозы не только во время производственных операций, но и при отборе технологических проб и контроле качества препарата, а также при чрезвычайных ситуациях (например, при разгерметизации оборудования).

Оценку содержания аранозы в воздухе производственных помещений проводили спектрофотометрически, модифицировав методику, описанную в [59], используя в качестве стандартного образца (СО) субстанцию аранозы с известным содержанием АВ.

Таблица 15 – Оценка рисков воздействия аранозы на работающий персонал

Технологическая стадия	Экспозиция аранозы, час <sup>1</sup>	Путь поступления в организм			Вероятность возникновения, балл	Вероятность обнаружения, балл	Всего <sup>2</sup>
		Ингаляция	Абсорбция через кожу	Абсорбция через 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>
Контроль качества ЛП	2	+	++	++	1	1	<b>15</b>

Примечания – <sup>1</sup>В соответствии с ОПР;

<sup>2</sup>Приоритет уровня риска (risk priority number, RPN): экспозиция аранозы x поступление в организм x вероятность возникновения x вероятность обнаружения; ≥40 – высокий риск, ≥20 и <40 – средний риск и <20 – низкая степень риска.

### **Методика**

20 м<sup>3</sup> воздуха аспирируют через фильтр АФА-ВП-10, помещенный в фильтродержатель, меняя фильтр через каждые 40 мин.

*Испытуемый раствор.* Фильтр с отобранной пробой переносят в бюксы, содержащие 10 мл воды очищенной, и оставляют на 10-15 мин, периодически помешивая стеклянной палочкой для лучшего растворения. Затем фильтр тщательно отжимают досуха и удаляют. В этом же растворе последовательно обрабатывают так же следующие 4 фильтра. Объем пробы доводят водой очищенной до 10 мл. Степень десорбции вещества с фильтра – 98% [59].

*Раствор СО аранозы.* Около 0,5 г (точная навеска) аранозы помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в 10–15 мл воды, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора относительно воды очищенной на спектрофотометре в максимуме при длине волны (240±2) нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО аранозы.

Содержание аранозы в пробе воздуха (X, г/м<sup>3</sup>) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 1 \times 10}{A_0 \times 250 \times 100 \times 20} = \frac{A \times a_0}{A_0 \times 50000} \quad (9)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора СО аранозы;

a<sub>0</sub> – навеска СО аранозы, г;

25000 – разведение испытуемого раствора;

20 – объем пробы воздуха, м<sup>3</sup>.

Из данных, представленных в Таблице 16, видно, что при использовании «открытого» оборудования чрезвычайно высокий уровень содержания аранозы

обнаруживали не только в воздухе рабочих зон, но и на поверхностях оборудования производственных и лабораторных помещений [44].

Таблица 16 – Содержание аранозы в воздухе и на поверхностях производственных и лабораторных помещений при использовании «открытого» оборудования

Технологическая зона	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

То есть для организации безопасного производства Аранозы необходимо найти принципиальные решения, подразумевающие не только использование комплекса индивидуальных средств защиты и санитарно-гигиенических мероприятий, но и применение инженерно-технических средств обеспечения безопасности [43; 125; 128; 129].

При этом планировка помещений, технологическое оборудование и инженерные системы должны:

- обеспечивать отсутствие перекрестной контаминации между сериями продукта и различными производимыми продуктами;
- предотвращать возникновение событий, которые могут негативно сказаться на стерильности и других специфицированных характеристиках конечного продукта (например, следует предусмотреть исключение возможности смешивания чистых и загрязненных материалов);
- предотвращать попадание пыли цитостатиков в воздух рабочей зоны и сточные воды;
- гарантировать выполнение требований и норм техники безопасности, норм пожарной безопасности.



Исходя из вышесказанного, были использованы 100%-е барьерные изоляторы, которые гарантируют постоянную изоляцию внутреннего пространства от технологической среды. Использование изоляторов предусмотрели на всех стадиях ТП с использованием АФС и открытого продукта, а также при мойке внешней поверхности флаконов с готовым продуктом, отборе проб и контроле качества ЛП.

На Рисунке 17 приведена разработанная блок-схема использования изоляторов в основных технологических операциях производства Аранозы.

Основным вопросом, который был решен при проектировании изоляторных систем – перепад давления между изолятором, в том числе рабочей зоной изолятора, и чистым помещением, в котором он установлен. Во внутреннем пространстве рабочей зоны изоляторов предусмотрено отрицательное давление (скорость потока воздуха  $0,45 \text{ м/с} \pm 20\%$ ,  $\leq -2,5 \text{ Па}$  ( $-0,01 \text{ WC}$ , кратность воздухообмена  $\geq 12$ ). Кроме того, предусмотрели изменение перепада давления от начала технологического процесса к его завершению. Изоляторы с отрицательным давлением также предложили использовать для отбора проб, приготовления навесок АФС и выполнения контроля качества субстанции [23].

В процессе приготовления раствора использование изоляторов с отрицательным давлением и обеспечение/контроль целостности изоляторов, в первую очередь, перчаток, защищает оператора от воздействия аранозы и предотвращает любой риск выброса препарата в окружающую среду. Изолятор зоны загрузки/выгрузки флаконов из лиофильной сушки позволяет защитить оператора и окружающую среду при разбивании флаконов в сублимационной сушке. Мойка внешней поверхности заполненных флаконов, которая проводится в изоляторе на последней стадии технологического процесса, обеспечивает удаление возможных следов раствора аранозы с первичной упаковки [206].

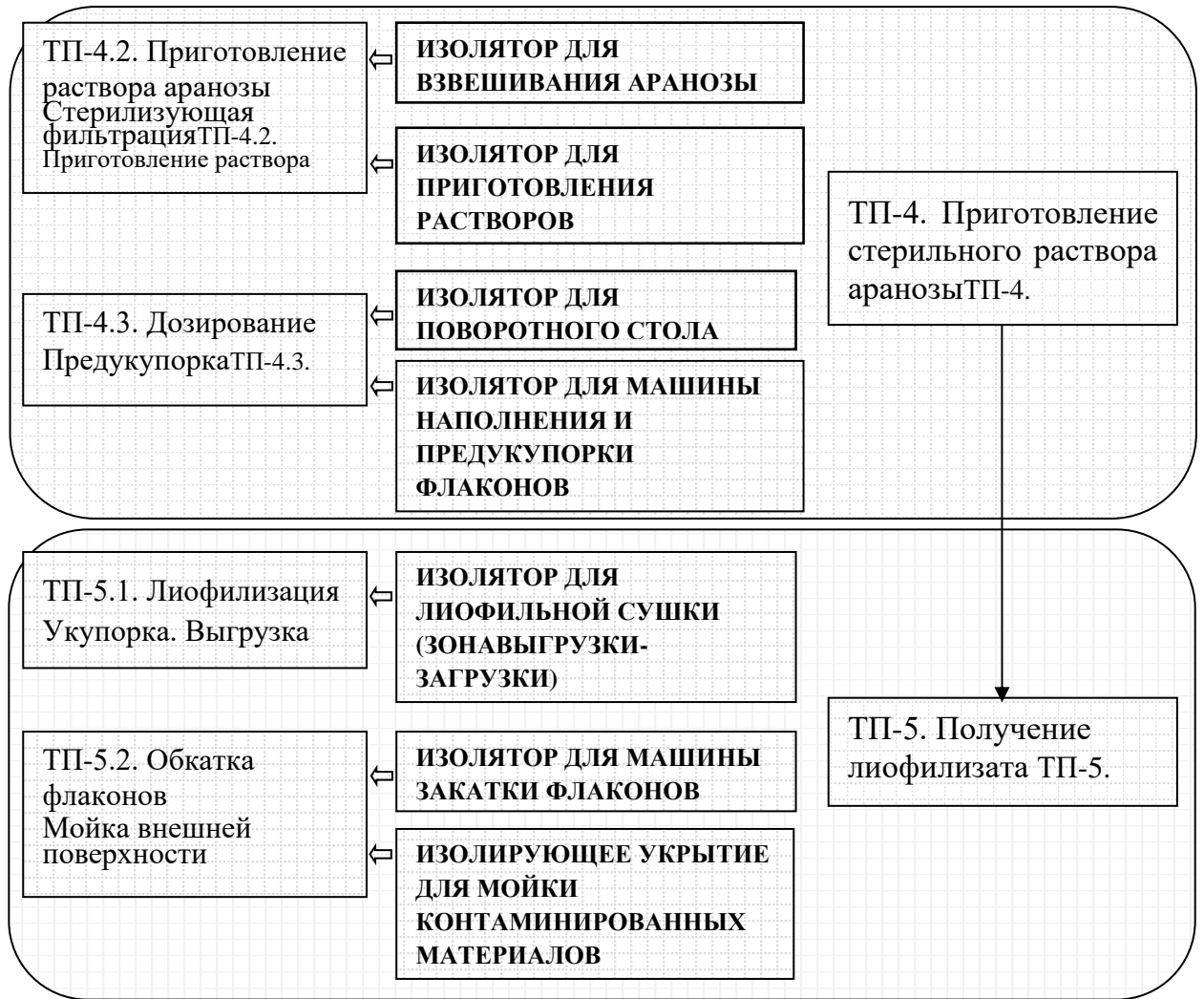


Рисунок 17 – Блок-схема применения изоляторов при выполнении стадий ТП производства Аранозы

Изоляторы представляют собой полностью герметичные системы, соответствующие требованиям ISO 5 (Class 100) во внутреннем пространстве, сконструированные таким образом, что не могут открыться во время технологического процесса. Технологическое оборудование встроено в изоляторные системы, а работа оператора осуществляется через перчатки и закрытые системы трансфер-портов. Поступление материалов в изолятор и из него проводится через специальные DРTE порты (шлюзы), исключая контакт персонала или крышки переносных контейнеров с АФС или полупродуктом (Рисунок 18).

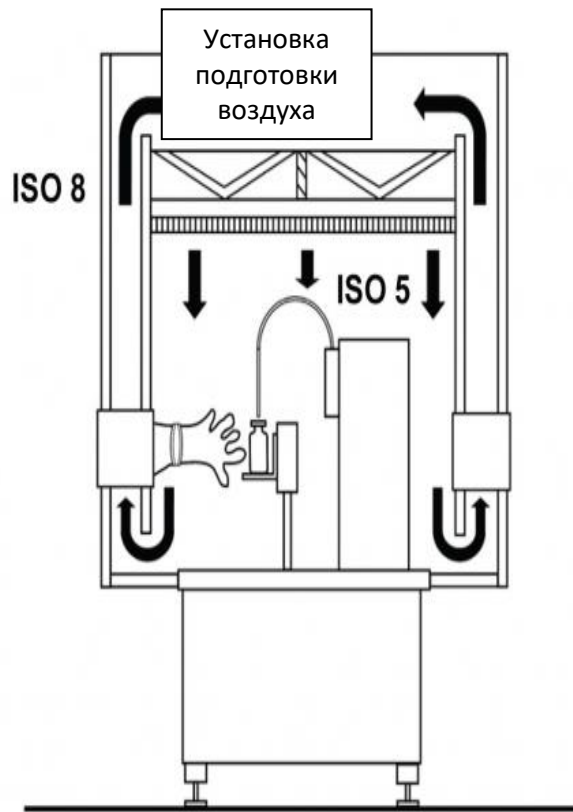


Рисунок 18 – Воздушные потоки в изоляторе (адаптировано из [234])

На Рисунке 19 изображены изоляторы, используемые в технологическом процессе производства Аранозы (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России).



А



Б

А – изолятор для приготовления растворов; Б – изолятор наполнения флаконов

Рисунок 19 – Изоляторы производственной технологической линии

Изоляторы установлены в помещениях более низкого класса чистоты – ISO 8 (Class 100000), в которой работает оператор без прямого контакта с получаемым продуктом и в комфортных условиях.

Важным является безопасность данного производства для внешних факторов. С этой целью используется самоочистка системы в закрытом цикле, поэтому можно уверенно сказать, что производство не наносит вреда экологии.

Для подтверждения эффективности используемых изоляторов проводили мониторинг параметров воздушной среды чистых помещений и рабочих зон изоляторов. При этом кроме определения микробной контаминации и концентрации частиц, подтверждали отсутствие содержания следов аранозы в воздухе рабочей зоны.

Таблица 17 – Содержание аранозы в воздухе производственных помещений и в рабочих зонах изоляторов

Изолятор	Концентрация аранозы	
	Воздух рабочей зоны, мг/м <sup>3</sup>	Рабочая зона изолятора, мг/м <sup>2</sup>
Взвешивания аранозы	< ПО	< ПО
Приготовления растворов	< ПО	< ПО
Поворотного стола	< ПО	< ПО
Машины наполнения и предукупорки флаконов	< ПО	< ПО
Лиофильной сушки (зона загрузки-выгрузки)	< ПО	< ПО
Машины закатки флаконов	< ПО	< ПО
Изолирующее устройство для мойки контаминированных материалов	< ПО	< ПО
Изолятор ОКК	< ПО	< ПО

Данные, представленные в Таблице 17, демонстрируют, что следы аранозы в воздухе производственных помещений и рабочих зонах изоляторов отсутствуют (находятся ниже предела обнаружения). Таким образом, изоляторы предотвращают любой риск выброса препарата в технологическую среду и обеспечивают безопасную работу персонала.

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

### **3.5 Изучение диабетогенного действия аранозы**

Как указано в ГЛАВЕ 1, клиническое использование стрептозотоцина ограничивается его высокой токсичностью для  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, что приводит к развитию диабета. Диабетогенное действие STZ проявляется и при введении препарата экспериментальным животным: мышам, собакам, морским свинкам. Это позволяет использовать препарат в научных исследованиях для индукции инсулита и диабета [211; 221].

Учитывая близость химических структур аранозы и стрептозотоцина, мы изучили диабетогенное действие аранозы. Исследование проводили, определяя в плазме крови уровень соматотропного гормона, контролирующего гомеостаз глюкозы, и измеряя уровень глюкозы в сыворотке крови здоровых мышей. Аранозу и STZ вводили внутривенно или внутрибрюшинно однократно в терапевтических и максимально переносимых дозах.

#### *Определение уровня СТГ при внутривенном введении аранозы и STZ*

Через 15 мин после однократного внутривенного введения аранозы и STZ в дозе 1000 мг/кг (доза, близкая к максимально переносимой) уровень СТГ в плазме крови мышей экспериментальных групп оставался на уровне контрольной группы: концентрация СТГ колебалась от 11,04 до 13,7 нг/мл, достоверные различия в группах отсутствовали (Таблица 18).

Таблица 18 – Концентрация СТГ в плазме крови мышей

Группа	Доза, мг/кг	Режим введения	СТГ, нг/мл			
			0	15	30	60
Контроль	–	–		12,36 ± 2,09	12,80 ± 1,46	12,63 ± 1,33
Араноза	1000	в/в, однократно	12,39 ± 1,18	12,09 ± 1,61	12,09 ± 1,19	12,26 ± 1,06
Стрептозотонин				12,44 ± 2,17	24,90 <sup>1</sup> ± 3,14	25,00 <sup>1</sup> ± 3,06

Примечание – <sup>1</sup>Отличия от контроля и аранозы достоверны,  $p < 0,05$

Через 30 и 60 минут после введения STZ уровень СТГ возрастал до 24,9–25,0 нг/мл, то есть увеличивался в два раза, тогда как в группе аранозы он оставался на прежнем уровне (уровне контроля) (Таблица 18).

*Определение уровня глюкозы при внутривенном введении аранозы и STZ*

Уровень глюкозы при однократном внутривенном введении аранозы и STZ мышам в течение всего времени наблюдения не отличался от контрольного и составлял во всех группах от 6,59 до 8,01 ммоль/л (Таблица 19).

Таблица 19 – Концентрация глюкозы в сыворотке крови мышей

Группа	Доза, мг/кг	Режим введения	Глюкоза, ммоль/л			
			0	15	30	60
Контроль	–	–		7,14 ± 1,04	7,24 ± 0,65	6,81 ± 0,88
Араноза	1000	в/в, однократно	6,97 ± 1,39	7,07 ± 1,08	7,18 ± 0,84	6,90 ± 0,74
Стрептозотонин				7,13 ± 0,99	7,09 ± 0,83	6,82 ± 0,82

*Определение уровня СТГ при внутрибрюшинном введении аранозы и STZ*

Через 5 минут после внутрибрюшинного введения STZ в дозе 60 мг/кг или аранозы в дозе 200 мг/кг уровень СТГ в плазме крови оставался в пределах колебаний контроля 9,24–9,38 нг/мл (Рисунок 20).

Через 10 мин после введения аранозы в дозе 200 мг/кг уровень СТГ в плазме крови оставался на уровне контроля. После введения STZ в дозе 60 мг/кг показатель достоверно снижался до 6,42 нг/мл, то есть на 33% относительно концентрации СТГ в контрольной группе и группе, получавшей аранозу.

Восстановление концентрации СТГ в плазме крови мышей в группе, получавшей STZ, до уровня контрольной группы ( $10,32 \pm 2,04$  нг/мл) происходило к 15 минуте. При этом уровень СТГ в группе аранозы оставался на уровне значений в контрольной группе, не получавшей ЛС.

Через 30 мин после в/б введения аранозы СТГ оставался на уровне контроля, в то время как в группе STZ, введенного в дозе 60 мг/кг, уровень СТГ возрастал до  $17,28 \pm 2,15$  нг/мл, то есть был в 1,6 раза выше уровня в контрольной группе и группе аранозы (Рисунок 20).

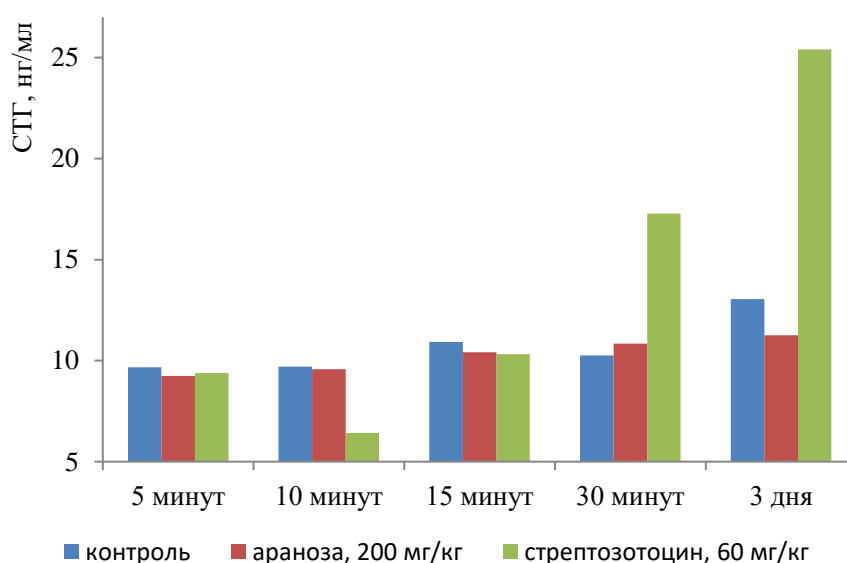


Рисунок 20 – Уровень СТГ в плазме крови мышей после однократного внутривенного введения аранозы и STZ

Уровень СТГ в плазме крови мышей на третьи сутки после в/б введения аранозы в дозе 750 мг/кг оставался на уровне контроля. В группе, получавшей STZ в дозе 200 мг/кг, СТГ возрастал до  $25,40 \pm 4,13$  нг/мл, то есть увеличивался в два раза по сравнению с показателями в контрольной группе и группе, получавшей аранозу (Таблица 20).

Уровень глюкозы в сыворотке крови на третьи сутки после введения STZ в дозе 200 мг/кг возрастал до  $19,19 \pm 3,76$  ммоль/л, то есть почти в 2 раза, а в группе аранозы оставался на уровне контроля (Таблица 20).

Таблица 20 – Уровень СТГ и глюкозы в сыворотке крови мышей на 3 сутки после однократного внутривенного введения аранозы и STZ

Группа	Доза, мг/кг	СТГ, нг/мл	Глюкоза, ммоль/л
Контроль	—	13,04 ± 2,28	7,40 ± 0,71
Араноза	750	11,25 ± 0,82	6,89 ± 0,64
Стрептозотоцин	200	25,40 <sup>1</sup> ± 4,13	19,19 ± 3,76

Примечание – <sup>1</sup>Отличия достоверны по сравнению с контролем и аранозой, p<0,05

### ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Установлен целевой профиль качества и определены критичные показатели качества (CQAs) лекарственного препарата Араноза. Оценка относительной критичности CQAs показала, что наиболее критичными критериями качества Аранозы являются pH раствора после регидратации и количественное содержание аранозы в единице упаковки.

2. Анализ связи между отдельными операциями технологического процесса производства Аранозы, критичными показателями качества промежуточного продукта на стадиях ТП и готового препарата с использованием метода 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.

3. Для трансфера технологии производства ЛП Араноза проведено масштабирование технологического процесса в пилотных условиях в масштабе 1:10. Показано, что использование оборудования различной производительности, но с идентичными принципами работы позволяет получить лекарственный препарат Араноза, полностью соответствующий требованиям спецификации.

4. Валидация критических стадий производства лекарственного препарата Араноза продемонстрировала возможность достижения воспроизводимых характеристик получаемого продукта – средние значения контролируемых параметров соответствовали требованиям спецификации, относительное стандартное отклонение контролируемых параметров не превышало 2%.



Рассчитанные индексы воспроизводимости процессов  $C_p$  и  $C_{pk}$  превышают 1,0 ( $C_p > C_{pk}$ ). Таким образом, процесс получения лекарственного препарата Араноза является статистически управляемым и надежным.

5. Разработаны подходы к организации производства высокотоксичного лекарственного препарата производного НАМ Араноза. Показано, что при использовании 100%-х изоляторов в основных технологических процессах следы аранозы в воздухе производственных помещений и рабочих зонах изоляторов отсутствуют. То есть изоляторы исключают риск выброса препарата в технологическую среду и обеспечивают безопасную работу персонала.

6. Экспериментально подтверждено, что араноза при парентеральном введении не вызывает у лабораторных животных непосредственных или отсроченных изменений уровней СТГ и глюкозы в крови.

#### ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ, ВАЛИДАЦИИ И ТРАНСФЕРУ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА АРАНОЗА

Поскольку эффективность трансфера технологии можно определить только доказав соответствие продукта требованиям спецификации при проведении испытаний по аналитическим методикам, передача таких методик является неотъемлемой частью трансфера технологии [113].

Согласно Руководству [371], трансфер аналитических методов тестирования ЛС предполагает передачу методик, не описанных в действующем издании Государственной Фармакопеи. При этом аналитические методики, подлежащие трансферу, должны быть валидированы [10; 89; 374; 404] (Таблица 21).

Таблица 21 – Методы контроля качества фармацевтической субстанции и лекарственного препарата Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г, подлежащие валидации и трансферу

Показатели	Нормативный документ	Фармацевтическая субстанция	Лекарственный препарат
Описание	спецификация	–	–
Растворимость	ГФ	–	неприменимо
Растворение (время растворения)		–	+
Подлинность	НД (ФСП)	+	+
Удельное вращение	ГФ	–	–
Прозрачность раствора	ГФ	–	–
Цветность раствора	ГФ	–	–
Родственные примеси	НД (ФСП)	+	+
рН	ГФ	–	–
Неспецифические примеси	ГФ	–	
Вода/потеря в массе при высушивании	ГФ	–	–
Количественное определение	НД (ФСП)	+	+

Как видно из Таблицы 21, для АФС араноза валидации и трансферу подлежат методики количественного определения, определения подлинности и родственных примесей. Специфичность и предел обнаружения как критерии валидации для методик определения подлинности и родственных примесей были определены ранее при регистрации препарата (Р N000449/01-180512). При трансфере технологии провели валидацию методики количественного определения аранозы в АФС по всем критериям, установленным в [27] и [98].

#### 4.1 Исследования по валидации методики количественного определения аранозы в фармацевтической субстанции

Количественное определение аранозы в АФС проводили по методике, описанной в [109] и *ГЛАВЕ 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ*.

Методика количественного определения аранозы основана на ее способности вступать в реакцию внутримолекулярного карбомилирования при обработке избытком 5%-го раствора натрия гидроксида. В результате реакции образуется  $N^1, O^3$ -карбонил- $\alpha$ -L-арабинопиранозиламин и выделяется эквимолярное количество азота, которое может быть точно измерено (Рисунок 21) [67; 109].

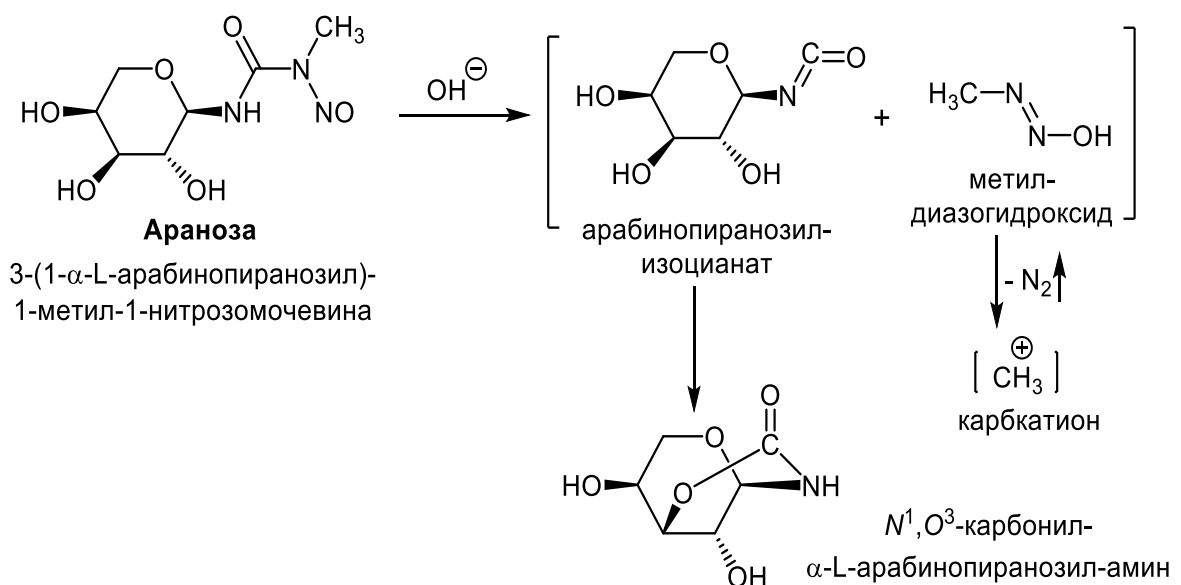


Рисунок 21 – Реакция внутримолекулярного карбомилирования аранозы

Содержание аранозы рассчитывали по формуле (1). Результаты количественного определения аранозы в 3 сериях фармацевтической субстанции приведены в Таблице 22.

Таблица 22 – Результаты количественного определения аранозы в АФС

Серия	Навеска, г	Объем выделившегося газа, мл <sup>2</sup>	Найдено аранозы	
			г	% <sup>3</sup>
010115 <sup>1</sup>	0,05195	5,50	0,05182	99,75
	0,05373	5,68	0,05351	99,59
	0,05515	5,82	0,05483	99,42
	0,05590	5,95	0,05606	100,29
	0,05601	5,93	0,05587	99,75
	0,05738	6,08	0,05728	99,83
	0,05891	6,22	0,05860	99,47
	0,06050	6,45	0,06077	100,45
	0,06215	6,58	0,06199	99,74
010814 <sup>1</sup>	0,05375	5,62	0,05365	99,81
	0,05561	5,82	0,05556	99,91
	0,05847	6,15	0,05871	100,41
	0,05919	6,20	0,05919	100,00
	0,05937	6,18	0,05900	99,38
	0,06056	6,30	0,06014	99,31
	0,06084	6,32	0,06034	99,18
	0,06127	6,35	0,06062	98,94
	0,06328	6,62	0,06320	99,87
010217 <sup>1</sup>	0,06226	6,40	0,06033	96,90
	0,06197	6,40	0,06033	97,35
	0,06166	6,35	0,05986	97,08
	0,06179	6,35	0,05986	96,88
	0,06192	6,38	0,06015	97,14
	0,06127	6,30	0,05939	96,93
	0,06056	6,25	0,05892	97,29
	0,06084	6,30	0,05939	97,62
	0,05909	6,10	0,05751	97,33

Примечания – <sup>1</sup>Содержание воды в субстанции серии 010115 составляло 0,19% (хроматографически чистый образец); в серии 010814 – 1,50% (хроматографически чистый образец); 010217 – 0,25% воды, 3% АПММ (ТСХ);

<sup>2</sup>объем выделившегося газа с учетом контрольного опыта;

<sup>3</sup>в пересчете на безводное вещество.

Условия эксперимента: P=753 мм рт. ст.; T = 296 °К

Нами проведена валидация предложенной методики количественного определения аранозы в АФС в соответствии с требованиями [27; 98] по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и

прецизионность (повторяемость и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность).

Как сказано выше, в определенных условиях араноза способна вступать в реакцию внутримолекулярного карбамоилирования. Это свойство присуще только аранозе и обеспечивает специфичность методики в отношении возможной примеси – 3-(1- $\alpha$ -L-арабинопиранозил)-1-метилмочевины (АПММ) (Рисунок 22). АПММ – полупродукт синтеза аранозы, который может присутствовать в субстанции при нарушении процесса очистки. Качество АПММ контролируется разработанными нами Техническими Условиями). Биологическими исследованиями показано, что содержание до 3% АПММ в препарате не изменяет фармакологических и токсикологических свойств аранозы [63]. Поскольку в молекуле АПММ отсутствует N-нитрозогруппа, АПММ не разлагается щелочью с выделением газов.

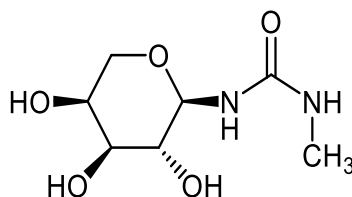


Рисунок 22 – 3-(1- $\alpha$ -L-арабинопиранозил)-1-метилмочевина (АПММ)

Подтверждение специфичности методики количественного определения аранозы проводили с использованием модельных смесей, в которые вносили заданное количество АПММ. Составы модельных смесей, результаты количественного определения аранозы и метрологические характеристики представлены в Таблице 23.

Таблица 23 – Результаты количественного определения аранозы в модельных смесях

Навеска модельной смеси, г	Найдено аранозы <sup>1</sup>		Метрологические характеристики ( $P=95\%$ , $n=9$ , $f=8$ )
	г	%	
Модельная смесь № 1 – 94% аранозы + 6% АПММ (470 мг аранозы + 30 мг АПММ)			
0,06473	0,05988	92,51	$\bar{x} = 93,74\%$ $S = 0,8306$ $s\bar{x} = 0,2769$ $\Delta\bar{x} = 0,65$ $t \text{ табл.} = 2,31$ $t \text{ вычисл.} = 0,94$ $\bar{\varepsilon} = 0,70 \%$
0,07531	0,07037	93,44	
0,06324	0,05857	92,62	
0,06134	0,05830	95,04	
0,06460	0,06058	93,78	
0,05825	0,05475	93,99	
0,06239	0,05905	94,65	
0,06525	0,06134	94,01	
0,05995	0,05615	93,66	
Модельная смесь № 2 – 97% аранозы + 3% АПММ (485 мг аранозы + 15 мг АПММ)			
0,07916	0,07629	96,37	$\bar{x} = 97,04\%$ $s = 0,9211$ $s\bar{x} = 0,3070$ $\Delta\bar{x} = 0,73$ $t \text{ табл.} = 2,31$ $t \text{ вычисл.} = 0,13$ $\bar{\varepsilon} = 0,74\%$
0,08117	0,07893	97,24	
0,08120	0,07965	98,09	
0,08000	0,07815	97,69	
0,07730	0,07356	95,16	
0,06895	0,06765	98,11	
0,07187	0,06885	96,80	
0,07674	0,07432	96,85	
0,06921	0,06718	97,07	
Модельная смесь № 3 – 90% аранозы + 10% АПММ (450 мг аранозы + 50 мг АПММ)			
0,08244	0,07317	88,76	$\bar{x} = 89,80\%$ $s = 1,1985$ $s\bar{x} = 0,3995$ $\Delta\bar{x} = 0,94$ $t \text{ табл.} = 2,31$ $t \text{ вычисл.} = 0,50$ $\bar{\varepsilon} = 1,05\%$
0,06978	0,06146	88,08	
0,06943	0,06169	88,85	
0,07139	0,06391	89,52	
0,07174	0,0639	89,17	
0,05823	0,05295	90,93	
0,07295	0,06585	90,27	
0,08312	0,07582	91,22	
0,07127	0,06514	91,40	

Примечание – <sup>1</sup>В пересчете на безводное вещество

Статистическая обработка полученных результатов позволяет сделать заключение, что АПММ не оказывает влияния на определение аранозы, то есть методику количественного определения аранозы в АФС можно считать специфичной.

Линейный характер параметров количественного определения аранозы в субстанции подтверждали расчетным путем, используя экспериментальные данные, представленные в Таблице 22 (серия 010115).

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости, представлены в Таблице 24.

Таблица 24 – Результаты статистической обработки данных, полученных при изучении линейной зависимости

$f$	$\bar{x}$	$\bar{y}$	$b$	$a$	$t(95\%,8)$	$\Delta b$	$\Delta a$	$s_0^2$
8	0,0569	6,0233	107,771	-0,104	2,31	0,1982	0,0113	0,0004

Представленные данные подтверждают линейный характер параметров количественного определения аранозы в субстанции и хорошо описываются линейной зависимостью по уравнению  $y = 107,771x - 0,104$ , где:

- угловой коэффициент линейной зависимости  $b = 107,771$ ,
- свободный член линейной зависимости  $a = -0,104$ .

Изображение регрессионной прямой, описываемой приведенным выше уравнением (Рисунок 23), также служит подтверждением линейности зависимости объема выделившегося газа от содержания аранозы в образце.

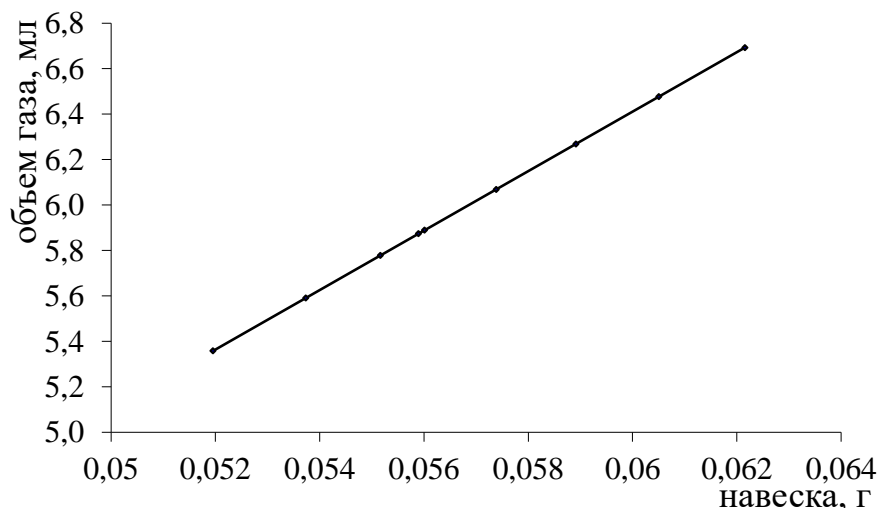


Рисунок 23 – Линейная зависимость объема выделившегося газа от содержания аранозы в АФС

Рассчитанный 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.

Прецизионность методики количественного определения аранозы в АФС определяли, оценивая повторяемость (сходимость) результатов и внутрилабораторную прецизионность.

Результаты, полученные при определении повторяемости (сходимости) (ГЛАВА 2, 2.3.2 *Валидация аналитических методик*), и метрологические характеристики среднего результата приведены в Таблице 25.

Таблица 25 – Результаты определения повторяемости (сходимости) методики количественного определения аранозы в АФС

Опыт	1	2	3	4	5	6	7	8	9
араноза, %	99,97	99,42	99,89	100,08	99,38	99,87	99,93	99,85	100,02
Метрологические характеристики среднего результата									
n	f	$\bar{x}$ , %	$s$	$s^2$	$s\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$t(P,f)$ табл.	$t(P,f)$ вычисл.	$\bar{\varepsilon}$ , %
9	8	99,82	0,2761	0,0762	0,0920	0,22	2,31	1,91	0,21

При оценке повторяемости установлено, что среднее содержание аранозы в АФС составляет 99,8%, что соответствует требованиям ФСП (не менее 98,0%). Относительная ошибка среднего результата – 0,21%. Вычисленное значение критерия Стьюдента  $t(P,f)$  равно 1,91, что меньше справочного  $t(P,f) = 2,31$ . Коэффициент вариации – 0,09%. Таким образом, результаты, полученные по разработанной методике, не отягощены систематической ошибкой и являются повторяемыми (сходимыми).

Поскольку валидацию методики количественного определения проводили при трансфере аналитических методов, особое внимание уделили оценке внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности (ГЛАВА 2, 2.3.2 *Валидация аналитических методик*). Полученные данные и результаты их статистической обработки представлены в Таблице 26.



Вычисленные значения критерия Стьюдента  $t(P,f)$  равны 2,03 и 1,91, соответственно, что в обоих случаях меньше табличного значения  $t(P,f) = 2,31$ .

Таблица 26 – Статистическая обработка результатов для оценки внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики количественного определения аранозы

Аналитик	араноза, %								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	99,81	99,52	99,48	100,23	99,97	99,86	99,21	100,07	99,76
2	99,97	99,42	99,89	100,08	99,38	99,87	99,93	99,85	100,02
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.	F(P, f, f) вычисл.	
99,77	0,3435	0,1180	0,1145	0,27	0,27	2,31	2,03	1,55	
99,82	0,2761	0,0762	0,0920	0,22	0,21		1,91		

Примечание –  $n=9, f=8, P=95\%$

Данные Таблицы 26 свидетельствуют о том, что относительная ошибка среднего результата для двух исследователей составляет 0,27% и 0,21%, соответственно. Вычисленный при этом критерий Фишера F равен 1,55, что меньше  $F(P, f, f)$  – табличного значения при  $P(99\%)=6,03$ . Это означает, что статистически достоверное различие в значениях величин дисперсий, полученных по результатам анализа двух аналитиков, не может быть признано значимым.

Рассчитанное средневзвешенное значение  $s^2 = 0,0105, s = 0,3240; s_p = 0,1527, f = n_1 + n_2 - 2 = 16$ . Вычисленный критерий Стьюдента  $t = 0,33$ , что меньше  $t = 0,33 < t(95\%; 16) = 2,12$  и  $t = 0,33 < t(99\%; 16) = 2,92$ . То есть гипотеза  $x_1 = x_2$  может быть признана верной.

Таким образом, установлено, что результаты, полученные в отдельных сериях экспериментов, не отягощены систематической ошибкой, а различия между результатами являются случайными, что свидетельствует о

промежуточной прецизионности разработанной методики количественного определения аранозы в АФС.

Для оценки правильности методики использовали результаты, полученные при изучении модельных смесей (Таблица 23). Правильность в трипликатах вычисляли как соотношение полученного результата и ожидаемого значения содержания аранозы в субстанции.

Согласно данным, представленным в Таблице 27, разработанная методика может считаться правильной, поскольку среднее значение результатов в трипликатах находится в диапазоне от 98,0 до 102,0%. Вычисленное по результатам анализа выборки значение критерия Стьюдента, составляет 1,31, то есть  $t_{\text{вычисл.}} < t_{\text{табл.}}(P, f)$ . При этом значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительного интервала среднего результата, а относительная ошибка среднего результата ( $\bar{\varepsilon}$ ) не превышает 2,00 %.

Таблица 27 – Результаты оценки правильности методики

Опыт	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Найдено аранозы, %	88,08	88,85	91,22	92,51	95,04	93,78	96,37	95,16	97,07	
Открываемость, %	97,87	98,72	101,36	98,41	101,11	99,77	99,35	98,10	100,07	
Среднее, %	99,32			99,76			99,17			
Метрологические характеристики среднего результата										
n	f	$\bar{x}$ , %	s	$s^2$	$s\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	P, %	$t(P, f)$ табл.	$t(P, f)$ вычисл.	$\bar{\varepsilon}$ , %
9	8	99,42	1,7666	1,3291	0,4430	1,02	95	2,31	1,31	1,03

Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) рассчитывали с использованием параметров линейной зависимости по формулам (2) и (3). Вычисленные пределы ПО и ПКО составили 0,016 г и 0,048 г, соответственно.

Таким образом, проведенными исследованиями показано, что методика количественного определения аранозы в АФС специфична, линейна, правильна и соответствует критериям приемлемости по прецизионности.

Следует отметить, что при контроле качества других отечественных производных нитрозоалкилмочевины (лизомустина, ормустина) на первый план выходят проблемы, связанные с особенностями химического строения и свойств этих препаратов и наряду с определением количественного содержания АВ контролируют изомерный состав и содержание продуктов гидролитического разложения [66; 293].

#### **4.2 Исследования по разработке и валидации методик контроля качества лекарственного препарата Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г**

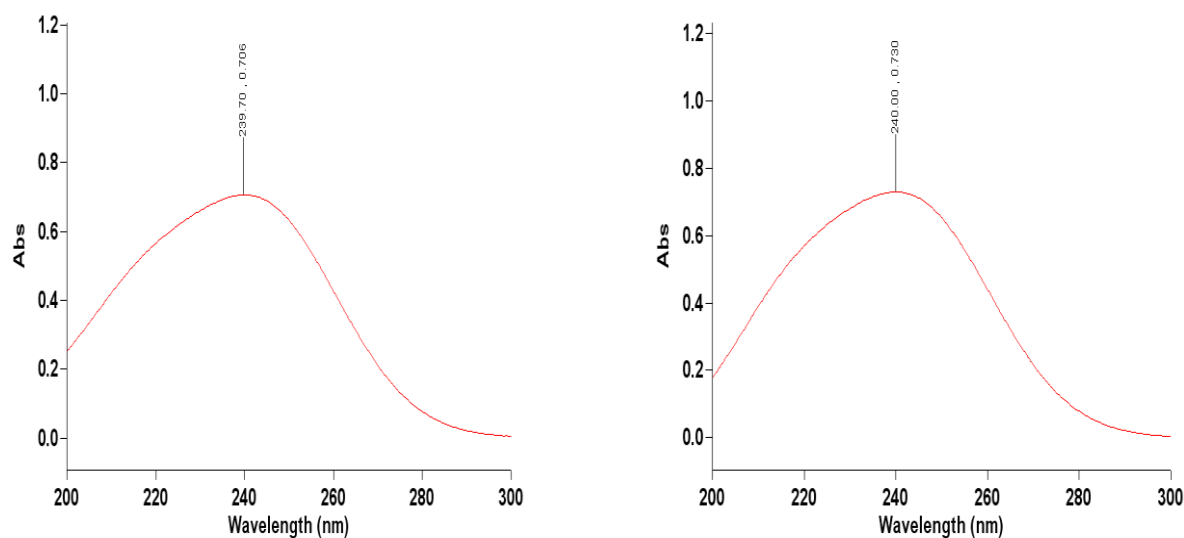
Данные, представленные в Таблице 9, свидетельствуют о том, что критичные показатели для качества ЛП Араноза соответствуют требованиям, предъявляемым к лекарственным средствам для парентерального применения, в том числе, к лиофилизатам [27, 188, 60; 61].

Как видно из Таблицы 21, при трансфере технологии ЛП Араноза необходимо валидировать аналитические методики количественного определения, определения подлинности и родственных примесей. Нами разработаны соответствующие методики и проведена их валидация по критериям, определенным в [27] и [98]. Методики включены в ФСП 42-0105-0656-00 (Приложение Д).

##### **4.2.1 Разработка и валидация методик определения подлинности лекарственного препарата Араноза**

Подлинность ЛП подтверждали, учитывая химическую структуру аранозы, как производного нитрозоалкилмочевины, и содержание Коллидона 17PF и сорбиновой кислоты в составе ЛФ (Таблица 7). Для этого разработали методики УФ-спектрометрии, качественные реакции и методику ТСХ [225; 323; 375; 376]. В качестве валидационных характеристик рассматривали специфичность и предел обнаружения.

УФ-спектр поглощения аранозы характерен для производных нитрозоалкилмочевины и, как и для субстанции, электронный спектр поглощения водного раствора ЛФ аранозы в диапазоне от 200 до 300 нм имеет максимум поглощения при  $(240 \pm 2)$  нм (Рисунок 24).



А – АФС (0,02 мг/мл); Б – ЛФ (0,02 мг/мл аранозы)

Рисунок 24 – УФ-спектры поглощения водного раствора аранозы

Подлинность ЛФ подтверждали по совпадению УФ-спектров поглощения растворов ЛФ и субстанции аранозы, полученных по методике количественного определения. Определенный ПО – 0,46 мг.

УФ-спектр ЛФ аранозы, представленный на Рисунке 24Б, подтверждает специфичность данного метода характеристики подлинности: ВВ не изменяют спектральных характеристик аранозы и не влияют на положение максимума и интенсивность поглощения в максимуме.

Наличие нитрозогруппы в молекуле аранозы доказывали классическими качественными реакциями, которые использовали для подтверждения подлинности АФС (*ГЛАВА 2, 2.1.2 Активные фармацевтические субстанции*) – реакцией с антипирином в кислой среде при нагревании [27] и реакцией Либермана с кристаллическим фенолом и кислотой серной концентрированной. Показано, что обе реакции позволяют качественно определить аранозу в присутствии ВВ. Установленный для обеих реакций ПО – 0,5 мкг.

В ФСП включена реакция с антипирином, как наиболее чувствительная, простая и надежная в исполнении.

#### ***Методика***

0,02 мг антипирина растворяют в 0,1 мл воды очищенной, прибавляют 0,1 мл кислоты хлористоводородной разведенной 10% и 0,02 г ЛП; встряхивают и нагревают на кипящей водяной бане: через 8–10 с раствор окрашивается в зеленый цвет (араноза).

При обработке ЛП 1 М водным раствором едкого натра происходит образование diazometana, что свидетельствует о принадлежности аранозы к производным нитрозоалкилмочевины. Предел обнаружения составил  $5 \cdot 10^{-3}$  мг.

#### ***Методика***

0,04 г препарата помещают в пробирку с притертой пробкой, прибавляют 1 мл эфира и 2 мл натрия гидроксида раствора 1 М, наблюдают появление пузырьков diazometana. После осторожного перемешивания эфирный слой окрашивается в желтый цвет (нитрозопроизводное мочевины; реакция выполняется под тягой!).

Реакция с молекулярным иодом позволяет обнаруживать  $1 \cdot 10^{-3}$  мг Коллидона 17PF в ЛФ.

#### ***Методика***

0,01 г препарата растворяют в 1 мл воды очищенной, прибавляют 1,5 мл раствора йода, появляется красновато-коричневое окрашивание.

Подлинность ЛФ аранозы методом тонкослойной хроматографии подтверждали одновременно с определением родственных примесей – положение пятен АВ на хроматограммах испытуемого раствора и раствора стандартного образца, полученных по методике определения посторонних примесей, должны совпадать (*ГЛАВА 4, 4.2.2 Разработка и валидация методики определения родственных примесей в ЛП Араноза*).

#### **4.2.2 Разработка и валидация методики определения родственных примесей в лекарственном препарате Араноза**

Как указано выше (*ГЛАВА 4, 4.1 Исследования по валидации методики количественного определения аранозы в фармацевтической субстанции*), полупродуктом синтеза аранозы является АПММ, не более 3,0% которой может присутствовать в АФС в качестве родственной примеси.

Для определения возможной примеси АПММ в ЛП разработали методику тонкослойной хроматографии (ТСХ). В качестве сорбента использовали готовые хроматографические пластинки ПТСХ-АФ-В-УФ (Сорбфил, Россия) размером 10x15 см и толщиной слоя 100 мкм. Подвижную фазу (ПФ) выбирали экспериментально в соответствии с физико-химическими свойствами аранозы, АПММ и ВВ. Хроматографирование в системе растворителей бензол – этилацетат – метанол (6:3:1) (в объемном соотношении) позволило добиться хорошего разрешения аранозы, АПММ и сорбиновой кислоты (Рисунок 25). Подобрать ПФ, позволяющую получить индивидуальную зону Коллидона 17PF, не удалось.

##### ***Методика***

*Испытуемый раствор.* 0,04 г ЛП растворяют в 1 мл метанола. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца аранозы.* 0,2 г АФС араноза растворяют в 10 мл метанола. Раствор должен быть свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца АПММ.* 0,03 г (в пересчете на сухое вещество) АПММ растворяют в 30 мл метанола в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора метанолом до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

*Коллидона 17PF раствор.* 2 г Коллидона 17PF растворяют в 100 мл метанола. Раствор должен быть свежеприготовленным.

*Сорбиновой кислоты раствор.* 0,016 г сорбиновой кислоты растворяют в 100 мл метанола. Раствор должен быть свежеприготовленным.

*Реактив Эрлиха для проявления хроматограммы.* 2 г п-диметиламинобензальдегида растворяют в смеси 95 мл спирта этилового 95%-го и 20 мл хлористоводородной кислоты концентрированной. Раствор должен быть свежеприготовленным.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* 1 мл раствора стандартного образца аранозы помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора метанолом до метки. Раствор должен быть свежеприготовленным.

На линию старта хроматографической пластинки ПТСХ-АФ-В-УФ (Сорбфил, Россия) размером 10x15 см и толщиной слоя 100 мкм или аналогичной наносят по 5 мкл испытуемого раствора, раствора стандартного образца аранозы, раствора стандартного образца АПММ, раствора Коллидона 17PF, раствора сорбиновой кислоты и раствора для проверки пригодности хроматографической системы (1,0 мкг). Пластинку с нанесенными пробами подсушивают на воздухе в течение 5 мин, помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей бензол – этилацетат – метанол (6:3:1) (объемное соотношение) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 15 см, пластинку вынимают из камеры и высушивают на воздухе до полного удаления запаха растворителей в течение 5 мин.

Пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме в пробе испытуемого раствора должны обнаруживаться два пятна сине-фиолетового цвета на уровне пятен раствора стандартного образца аранозы и раствора сорбиновой кислоты.

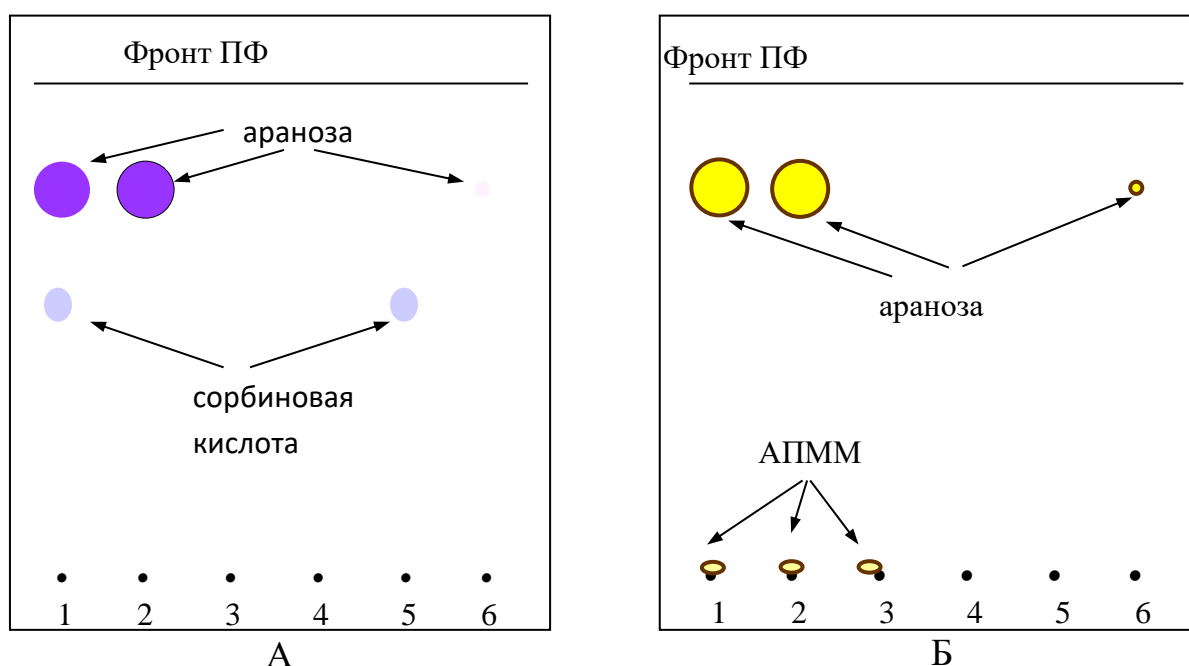
Затем пластинку опрыскивают реактивом Эрлиха и помещают в сушильный шкаф при температуре (160–180)°С на 5–8 секунд. При этом проявляются пятна желтого цвета с коричневым контуром. Допускается появление светло-желтого пятна на старте, которое по площади и интенсивности окрашивания не должно превышать пятна в пробе раствора АПММ, что соответствует содержанию АПММ в препарате не более 3,0%.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы четко видно одно пятно при детектировании реактивом Эрлиха.

Хроматограммы оценивали по интенсивности окрашивания и площади пятен в пробе испытуемого раствора и пробах стандартных растворов. При проявлении УФ-светом обнаруживали аранозу и сорбиновую кислоту в пробах ЛФ и соответствующих растворах СО.

Применение реактива Эрлиха позволило обнаруживать помимо основного пятна желтого цвета с коричневым контуром, соответствующего аранозе, АПММ в виде светло-желтого пятна с коричневым контуром на старте (Рисунок 25 Б).

Проверку пригодности хроматографической системы проводили, оценивая пятно в пробе раствора для проверки пригодности хроматографической системы при детектировании реактивом Эрлиха, содержащей 1 мкг аранозы – в пробе должно быть четко видно пятно желтого цвета с коричневым контуром.



1 – испытуемый раствор; 2 – раствор стандартного образца аранозы; 3 – раствор стандартного образца АПММ; 4 – раствор Коллидона 17РФ; 5 – раствор сорбиновой кислоты; 6 – раствор для проверки пригодности хроматографической системы

А – проявление в УФ-свете (длина волны 254 нм); Б – проявление реактивом Эрлиха

Рисунок 25 – Определение родственных примесей в аранозе методом ТСХ



Исследуемые валидационные характеристики методики ТСХ – специфичность и ПО: специфичность методики определена как возможность идентифицировать аранозу в ЛФ в присутствии ВВ, а минимум, открываемый с помощью реактива Эрлиха (ПО), для аранозы и АПММ одинаков и составляет 1 мкг.

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

Если для контроля качества АФС араноза применяют прямой метод определения содержания АВ, то для определения аранозы в лиофилизированной ЛФ разработали методику спектрофотометрического определения с использованием субстанции аранозы с известным содержанием АВ в качестве стандартного образца.

Электронный спектр поглощения водного раствора аранозы в области от 200 до 300 нм имеет максимум поглощения при длине волны  $(240 \pm 2)$  нм (Рисунок 24, А), удельный показатель поглощения –  $E_{1\text{см}}^{1\%} = 279 \pm 9$  [130].

Исследование зависимости интенсивности поглощения аранозы от ее концентрации в водных растворах показало, что в диапазоне концентраций растворов от 0,01 мг/мл до 0,04 мг/мл зависимость имеет линейный характер, то есть соблюдается закон Бугера-Ламберта-Бера [130].

При концентрации аранозы в растворе около 0,02 мг/мл оптическая плотность в максимуме поглощения составляет около 0,7 единиц (Рисунок 24 А, Б). При этом концентрация сорбиновой кислоты в растворе ЛФ – около 0,00016 мг/мл и её поглощение не мешает количественному определению аранозы. Концентрация Коллидона 17PF в испытуемом растворе ЛФ составляет около 0,02 мг/мл и такой раствор имеет незначительное собственное поглощение (около 0,06 единиц оптической плотности). Чтобы исключить систематические и случайные ошибки количественного определения, в качестве раствора сравнения

использовали раствор ВВ, а расчет проводили, учитывая количественное содержание аранозы в стандартном образце (субстанции аранозы).

На Рисунке 24, Б представлен УФ-спектр поглощения водного раствора ЛФ аранозы. Очевидно, что вспомогательные вещества ЛФ не изменяют спектральных характеристик аранозы: не влияют на положение максимума и интенсивность поглощения в максимуме.

### ***Методика количественного определения аранозы в ЛП***

*Испытуемый раствор.* Содержимое флакона растворяют в небольшом количестве воды очищенной, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают.

*Раствор стандартного образца (СО) аранозы.* Около 0,5 г (точная навеска) аранозы помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде очищенной, прибавляют 5 мл Коллидона 17PF раствора 10% в сорбиновой кислоты растворе 0,08%, доводят водой до метки и перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор Б).

*Сорбиновой кислоты раствор 0,08%.* Навеску сорбиновой кислоты около 0,08 г растворяют в 100 мл воды очищенной при нагревании до 60–70°C в течение 15 мин. Раствор хранят в защищенном от света месте при температуре не выше +10°C в течение 5 дней.

*Коллидона 17PF раствор 10% в сорбиновой кислоты растворе 0,08%.* Раствор готовят в мерном цилиндре. Навеску Коллидона 17PF (PhEur) около 10,0 г насыпают на поверхность сорбиновой кислоты раствора 0,08% (80–90 мл), перемешивают до полного растворения и доводят объем раствора до 100 мл сорбиновой кислоты раствором 0,08%.

*Раствор сравнения.* 5 мл Коллидона 17PF раствора 10% в сорбиновой кислоты растворе 0,08% помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. 1 мл

полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора относительно раствора сравнения на спектрофотометре в максимуме при длине волны  $240 \pm 2$  нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца (СО) аранозы.

Содержание аранозы в одном флаконе в граммах (X, г) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 250 \times 100 \times 1 \times C}{A_0 \times 250 \times 100 \times 1 \times 100} = \frac{A \times a_0 \times C}{A_0 \times 100} \quad (10)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_0$  – оптическая плотность раствора СО аранозы;

$a_0$  – навеска СО аранозы, г;

C – содержание аранозы в субстанции, %.

Содержание  $C_7H_{13}N_3O_6$  (аранозы) в одном флаконе всех изученных серий препарата составило от 0,450 до 0,550 г (Таблицы 13 и 14).

Валидацию методики количественного определения аранозы в ЛП проводили на серийных образцах препарата и модельных смесях по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость (сходимость) и внутрилабораторная прецизионность) [27; 39; 130].

Выше было показано, что присутствие ВВ в ЛФ аранозы не влияет на положение максимумов поглощения в электронных спектрах поглощения (Рисунок 24 А, Б) и не мешает спектрометрическому определению аранозы в ЛФ. То есть можно считать, что разработанная методика позволяет однозначно определять аранозу в присутствии ВВ и отвечает требованиям ГФ XIV [27] к специфичности.

Линейность разработанной методики подтверждали экспериментально, устанавливая зависимость оптической плотности (аналитического сигнала) от концентрации аранозы. Определение проводили в пяти модельных смесях с содержанием аранозы от 80% до 120% от ее номинального количества в единице ЛФ. Полученные данные обрабатывали методом наименьших квадратов, рассчитывая  $b$  и  $a$  – угловой коэффициент и свободный член линейной зависимости, соответственно, и коэффициент корреляции  $r$ .

Данные, представленные в Таблице 28, и графическое изображение регрессионной прямой (Рисунок 26) демонстрируют, что результаты количественного определения аранозы в лиофилизированной ЛФ хорошо описываются уравнением линейной зависимости  $y = 1,3357x + 0,0195$ , а коэффициент корреляции  $r$ , равный 0,9980, отвечает необходимому условию  $|r| \geq 0,99$  [27].

Таблица 28 – Результаты определения параметров линейной зависимости методики количественного определения аранозы в ЛП

% от номинального содержания	Оптическая плотность	Найдено аранозы, г	Параметры линейной зависимости
80	0,566	0,405	Угловой коэффициент линейной зависимости $b = 1,3357$ Свободный член линейной зависимости $a = 0,0195$ $y = 1,3357x + 0,0195$ Коэффициент корреляции $r = 0,9980$
90	0,624	0,453	
100	0,675	0,496	
110	0,745	0,547	
120	0,823	0,596	

В соответствии с требованиями ГФ XIV при валидации оценивали прецизионность методики, определяя повторяемость (сходимость) результатов и промежуточную (внутрилабораторную) прецизионность (ГЛАВА 2, 2.3.2 Валидация аналитических методик).

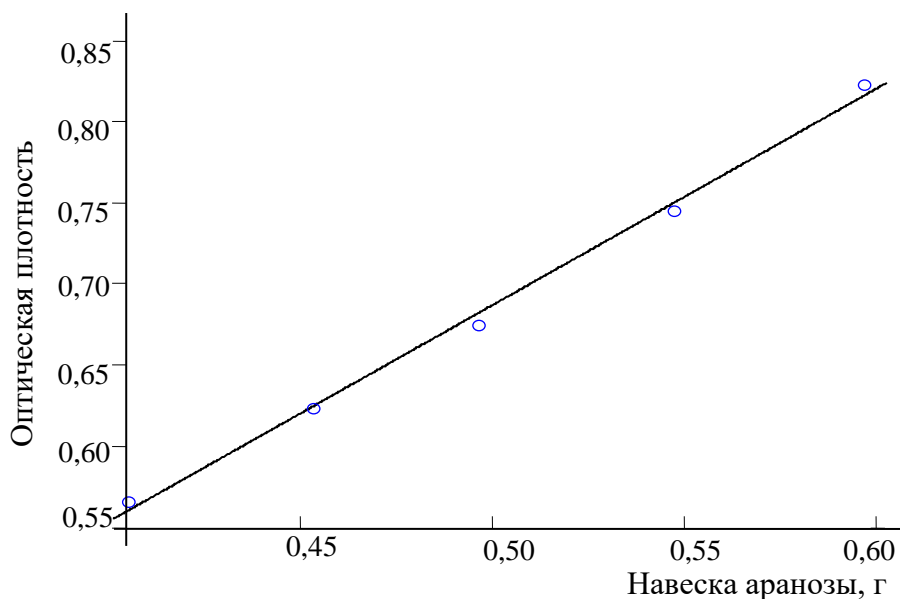


Рисунок 26 – Графическое изображение регрессионной прямой

Результаты, полученные при определении повторяемости (сходимости) методики, и метрологические характеристики среднего результата приведены в Таблице 29.

Таблица 29 – Результаты определения повторяемости (сходимости) аналитической методики количественного определения аранозы в ЛП

№ п/п	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Найдено аранозы, г	0,504	0,502	0,507	0,488	0,504	0,497	0,510	0,499	0,502
Метрологические характеристики среднего результата									
n	f	$\bar{x}$ , г	s	$s\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$t(P,f)_{\text{табл.}}$	$t(P,f)_{\text{вычисл.}}$	$\bar{\epsilon}$ , %
9	8	0,501	0,0064	0,0021	0,0050	0,501±0,005	2,31	0,47	1,00

Среднее значение содержания аранозы во флаконе составило 0,501 г, что находится в пределах установленного диапазона (0,450–0,550г). Относительная ошибка среднего результата – 1,00%. При доверительной вероятности  $P=95\%$  для проанализированных образцов аранозы доверительный интервал среднего результата составил (0,501±0,005) г. Вычисленное значение критерия Стьюдента равно  $t(P,f) = 0,47$ , что меньше справочного  $t(P,f) = 2,31$ , коэффициент вариации –

0,42%. То есть результаты, полученные по разработанной методике, не отягощены систематической ошибкой и являются сходимыми.

При исследовании внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности определение проводили два сотрудника в разные дни (*ГЛАВА 2, 2.3.2 Валидация аналитических методик*).

Из данных, представленных в Таблице 30, видно, что различия между средними значениями результатов, полученных разными сотрудниками, незначительны. Относительная ошибка среднего результата составила 1,68% и 1,26%, а вычисленные значения критерия Стьюдента  $t_{\text{вычисл.}}(95\%,8) = 0,56$  и  $0,13$ , соответственно, что значительно меньше  $t_{\text{табл.}}(95\%,8) = 2,31$ . Коэффициент вариации составил 0,71% и 0,54% для каждого из исследователей, соответственно. Вычисленный критерий Фишера  $F = 1,77 \ll F(99\%,8,8) = 6,03$ .

Таблица 30 – Результаты исследования промежуточной прецизионности методики количественного определения аранозы в ЛП

Араноза, г									
Аналитик	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0,500	0,506	0,502	0,498	0,495	0,502	0,512	0,476	0,487
2	0,505	0,503	0,497	0,501	0,495	0,498	0,483	0,503	0,512
Метрологические характеристики среднего результата <sup>1</sup>									
$n$	$f$	$\bar{x}$	$S$	$S\bar{x}$	$S\bar{x}\%$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon},\%$	$t(P,f)$ вычисл.	F(P, f, f) вычисл.
9	8	0,498	0,0107	0,0036	0,71	0,008	1,68	0,56	1,77
		0,500	0,0080	0,0027	0,54	0,006	1,26	0,13	

Примечание – <sup>1</sup>P=95% ,  $t(P,f)_{\text{табл.}} = 2,31$

Таким образом, статистически достоверное различие в значениях величин дисперсий, полученных по результатам анализа двух аналитиков, не может быть признано значимым.

При этом рассчитанное средневзвешенное значение  $s^2 = 8,9 \cdot 10^{-5}$ ,  $s = 0,0094$ ;  $s_p = 0,0515$ ,  $f = n_1 + n_2 - 2 = 16$ . Вычисленный критерий Стьюдента  $t = 0,33$ , что меньше  $t = 0,04 < t(95\%; 16) = 2,12$  и  $t = 0,4 < t(99\%; 16) = 2,92$ .

То есть гипотеза  $x_1 = x_2$  может быть признана верной, а разработанная методика количественного определения аранозы в лиофилизированной ЛФ соответствует требованию прецизионности.

Правильность разработанной методики, характеризующую близость результатов количественного определения аранозы в ЛФ к истинному значению, оценивали по результатам анализа серии модельных смесей в трипликатах. Для каждой смеси, содержащей 80%, 100% или 120% аранозы от номинального содержания во флаконе и ВВ, проводили по три определения. Открываемость в трипликатах вычисляли как соотношение полученного результата и истинного содержания аранозы в модельной смеси.

Полученные результаты и метрологические характеристики среднего результата анализа приведены в Таблице 31.

Таблица 31 – Результаты определения правильности методики количественного определения аранозы в ЛП

		Араноза, %								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Истинное содержание аранозы, г		0,405	0,408	0,402	0,496	0,507	0,499	0,596	0,589	0,578
Найдено аранозы, г		0,398	0,403	0,399	0,500	0,515	0,498	0,588	0,597	0,567
Открываемость, %		98,27	98,77	99,25	100,80	101,58	99,80	98,66	101,36	98,09
Среднее, %		98,76			100,73			99,37		
Метрологические характеристики среднего результата										
f	$\bar{x}$	s	$s^2$	$s\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	P, %	$t(P,f)_{\text{табл.}}$	$t(P,f)_{\text{вычисл.}}$	$\bar{\epsilon}$	
8	99,62	1,3341	1,3291	0,4447	1,05	95	2,31	0,86	1,03	

Из данных, представленных в Таблице 31, видно, что среднее значение результатов в трипликатах лежит в диапазоне 98,0–102,0%, относительная ошибка среднего результата ( $\bar{\epsilon}$ ) составляет 1,03%, а результаты лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ( $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ ) = 99,62±1,03 и приближаются к истинному значению.

Вычисленное значение критерия Стьюдента значительно меньше табличного ( $t$  вычисл. = 0,86 <  $t$  табл. = 2,31), что позволяет считать, что полученные результаты не отягощены систематической ошибкой и являются правильными.

ПО и ПКО рассчитывали с использованием параметров линейной зависимости по формулам (2) и (3). Вычисленные ПО и ПКО составили 0,46 мг и 1,40 мг, соответственно.

Валидация позволила использовать разработанную методику для количественного определения аранозы в растворе для дозирования при контроле технологического процесса (КТ-ТП-4. Приготовление раствора аранозы). При этом изменили лишь методику приготовления испытуемого раствора.

### ***Методика***

*Испытуемый раствор.* 5 мл раствора аранозы, подготовленного для дозирования, помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивали. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают.

*Приготовление сорбиновой кислоты раствора 0,08%, Коллидона 17PF раствора 10% в сорбиновой кислоты растворе 0,08%, раствора СО аранозы и раствора сравнения* проводят, как описано в методике количественного определения аранозы в ЛП).

Измеряли оптическую плотность полученного раствора относительно раствора сравнения на спектрофотометре в максимуме при длине волны (240±2) нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца (СО) аранозы.



Содержание аранозы в одном мл в граммах (X, г) вычисляют по формуле (11):

$$X = \frac{A \times a_0 \times 250 \times 100 \times 1 \times C}{A_0 \times 5 \times 250 \times 100 \times 1 \times 100} = \frac{A \times a_0 \times C}{A_0 \times 500} \quad (11)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора СО аранозы;

a<sub>0</sub> – навеска СО аранозы, г;

C – содержание аранозы в субстанции, %.

Содержание C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (аранозы) в одном мл раствора для дозирования должно быть 0,090 до 0,110 г.

#### ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Проведена валидация методики волюметрического количественного определения аранозы в АФС. Приемлемость методики по критерию специфичность определяется возможностью количественно определять аранозу в присутствии полупродукта синтеза 3-(1-α-L-арабинопиранозил)-1-метилмочевинны (АПММ). Продемонстрирована линейность методики (вычисленный коэффициент корреляции равен 0,998) и ее приемлемость по критериям правильность и прецизионность. Вычисленные пределы обнаружения и количественного определения составили 0,016 г и 0,048 г, соответственно.

2. Разработаны методики определения подлинности аранозы в лекарственном препарате и установлена их приемлемость по критерию специфичность: метод УФ-спектрометрии позволяет определять аранозу в лекарственной форме, поскольку вспомогательные вещества не влияют на спектральные характеристики аранозы. Качественные реакции также позволяют определить аранозу в присутствии вспомогательных веществ лекарственной формы.

3. Разработанная методика определения родственных примесей в лекарственном препарате методом ТСХ позволяет полуколичественно

контролировать наличие допустимой примеси АПММ в присутствии вспомогательных веществ.

4. Разработана методика количественного определения аранозы в лекарственном препарате методом УФ-спектрометрии и проведена ее валидация. Статистическая обработка полученных результатов показала, что разработанная методика соответствует требованиям по критериям специфичности, линейности (коэффициент корреляции равный 0,998, отвечает необходимому условию  $|r| \geq 0,99$ ). При определении правильности показано, что среднее значение результатов в трипликатах находится в диапазоне от 98,0% до 102,0%, а результаты лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа  $(\bar{x} \pm \Delta\bar{x}) = 99,62 \pm 1,03$  и приближаются к истинному значению. Во всех сериях экспериментов стандартное отклонение не превышало 2,0%, а вычисленные значения критерия Стьюдента значительно меньше табличного, что позволяет считать, что полученные результаты не отягощены систематической ошибкой. Рассчитанные пределы обнаружения и количественного определения – 0,46 мг и 1,40 мг, соответственно.

## ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ЦИФЕТРИЛИН

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в течение ряда лет проводился поиск соединений с противоопухолевой активностью в ряду пептидных гормонов. По результатам изучения в экспериментах *in vitro* и *in vivo* для дальнейших исследований отобран аналог гипоталамического гормона соматостатина, названный цифетрилин [100; 121; 357; 358].

Цифетрилин – метиловый эфир N<sup>α</sup>-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-L-цистеинил-L-фенилаланил-D-триптофил-N<sup>ε</sup>-карбобензоксипептид, защищенный по функциональным группам [110; 132] (Рисунок 27).

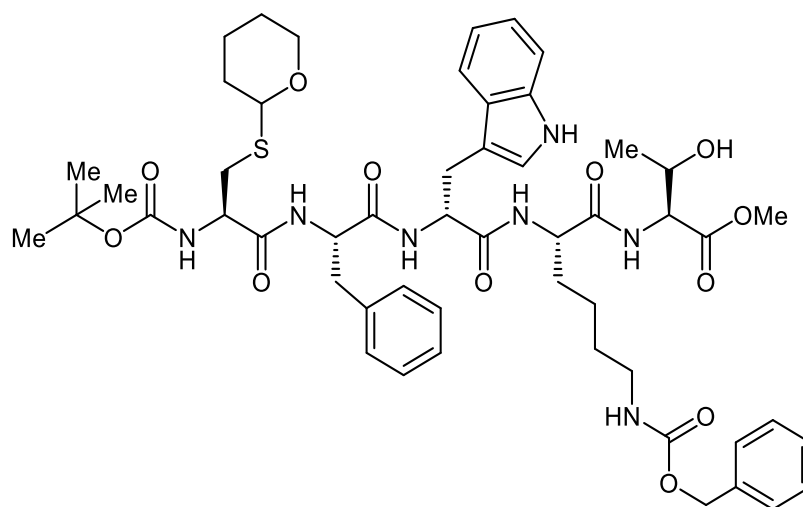


Рисунок 27 – Цифетрилин

Синтез цифетрилина осуществляли классическими методами пептидной химии, получая стандартную фармацевтическую субстанцию [104; 132].

Разработку аналитических методик и определение пределов нормирования и осуществляли на сериях АФС, полученных в разное время в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Критерии и параметры качества АФС цифетрилин выбирали с учетом химической структуры ЛС и его физико-химических свойств.

Исследование проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0006.15. Фармацевтические субстанции [27], с учетом обязательных критериев качества регламентированных для характеристики фармацевтической субстанции и ее предполагаемого назначения [132; 133]. Для стандартизации АФС цифетрилин использовали методы, описанные в [27], и разработанные нами методики (Таблица 4).

### **5.1 Разработка методик определения подлинности цифетрилина**

Для подтверждения подлинности субстанции цифетрилина разработали оригинальный метод, основанный на использовании *мультиядерной ЯМР-спектроскопии* [64; 365]. 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,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC и  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC) [127].

#### ***Условия регистрации ЯМР спектров***

ЯМР спектрометр Bruker AVANCE<sup>III</sup> 500, рабочие частоты 500,1 ( $^1\text{H}$ ), 125,7 ( $^{13}\text{C}$ ), 50,7 МГц ( $^{15}\text{N}$ ). Растворитель – ДМСО- $d_6$ , температура 308,2 К (+35°C). Химические сдвиги приведены в шкале  $\delta$  от следующих стандартов: для  $^1\text{H}$  – внутренний ТМС, для  $^{13}\text{C}$  – сигнал растворителя ДМСО ( $\delta_{\text{C}} = 39.5$  м.д.), для  $^{15}\text{N}$  – внешний жидкий аммиак. Регистрация и обработка ЯМР спектров осуществлялось с помощью пакета программ TopSpin, версия 2.1. Полное отнесение сигналов выполнено на основе анализа данных двумерных корреляционных ЯМР экспериментов 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBSC,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC. 2D эксперименты выполнены по стандартным программам, входящих в состав библиотеки импульсных последовательностей программного пакета TopSpin.

#### ***Параметры ЯМР экспериментов***

1D ЯМР  $^1\text{H}$ : спектральный диапазон 7002 Гц, количество точек данных 32К, длительность импульса 30°, время выборки 2,34 с, релаксационная задержка 1 с, число накоплений 16, аподизация функцией Лоренца-Гаусса с параметрами LB

= -1 Гц, GB = 0,25, ручная настройка фазы, автоматическая коррекция базовой линии спектра.

1D ЯМР  $^{13}\text{C}$ : спектральный диапазон 25252 Гц, количество точек данных 64К, длительность импульса  $30^\circ$ , время выборки 1,3 с, релаксационная задержка 0,8 с, число накоплений 1024, функция аподизации — экспонента LB = 2 Гц, автоматическая коррекция базовой линии спектра и настройка фазы.

1D ЯМР  $^{15}\text{N}$ : импульсная последовательность INEPT-90, спектральный диапазон 7599 Гц, количество точек данных 32К, длительность импульса  $90^\circ$ , время выборки 2.16 с, релаксационная задержка 2 с, эволюционная задержка 5,5 мс, число накоплений 512, функция аподизации — экспонента LB = 3 Гц, автоматическая коррекция базовой линии спектра и настройка фазы.

2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY: спектральный диапазон 5498 Гц, количество точек данных по  $F_2$  4К, 512 инкрементов по  $F_1$ , число накоплений 2 на один инкремент, релаксационная задержка 1 с. Размер матрицы данных после Фурье-преобразования  $2\text{K} \times 2\text{K}$ , функция аподизации по обеим осям —  $\sin$ , автоматическая коррекция базовой линии.

2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC: спектральный диапазон 4252 Гц по  $F_2$  и 16350 Гц по  $F_1$ , количество точек данных по  $F_2$  1К, 512 инкрементов по  $F_1$ , число накоплений 2 на один инкремент, релаксационная задержка 1 с, эволюционная задержка 3.45 мс. Размер матрицы данных после Фурье-преобразования  $2\text{K} \times 1\text{K}$ , функция аподизации по обеим осям —  $\cos^2$ , ручная настройка фазы, автоматическая коррекция базовой линии.

2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBSC: спектральный диапазон 5498 Гц по  $F_2$  и 21380 Гц по  $F_1$ , количество точек данных по  $F_2$  4К, 512 инкрементов по  $F_1$ , число накоплений 8 на один инкремент, релаксационная задержка 1 с, эволюционные задержки 3,45 и 65 мс. Размер матрицы данных после Фурье-преобразования  $2\text{K} \times 1\text{K}$ , функция аподизации по обеим осям —  $\cos^2$ , автоматическая коррекция базовой линии.

2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC: спектральный диапазон 3001 Гц по  $F_2$  и 7096 Гц по  $F_1$ , количество точек данных по  $F_2$  1К, 256 инкрементов по  $F_1$ , число накоплений 8 на один инкремент, релаксационная задержка 1.5 с, эволюционная задержка 5.5 мс.

Размер матрицы данных после Фурье-преобразования  $1\text{K} \times 1\text{K}$ , функция аподизации по обеим осям —  $\sin^2$ , автоматическая коррекция базовой линии.

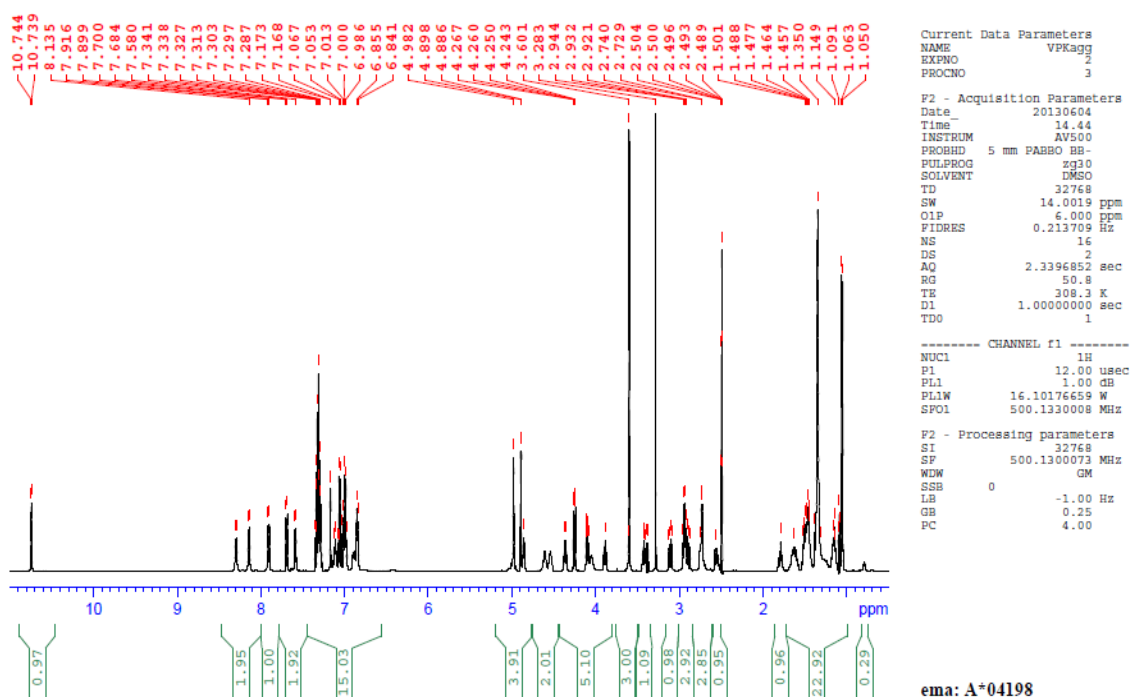


Рисунок 28 – Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ,  $35^\circ\text{C}$ )

В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  (Рисунок 28) 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.

Самый слабopольный сигнал среди NH-протонов ( $\delta_{\text{H}}$  10.74 м.д.) относится к индольному циклу триптофана, остальные – к протонам  $\alpha$ -NH-групп, проявляющимся в спектре в виде дублетов за счет спин-спинового взаимодействия с  $\alpha$ -CH-протонами, и  $\epsilon$ -NH-протону лизина, сигнал которого имеет вид уширенного триплета. Среди  $\alpha$ -протонов легко идентифицируется сигнал треонина H2-Thr ( $\delta_{\text{H}}$  4.26, dd,  $J = 8.2, 3.5$  Hz), имеющий характерную мультиплетность дублет дублетов, в отличие от других  $\alpha$ -CH-протонов, сигналы которых имеют более сложную мультиплетность, поскольку участвуют в спин-спиновом взаимодействии с NH-протоном и двумя неэквивалентными протонами  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-групп. Результирующий тип мультиплета зависит от соотношения vicинальных KCCB и может иметь вид триплета дублетов, квартета или

неразрешенного мультиплета. Сигнал  $\beta$ -протона треонина ( $\delta_{\text{H}}$  4.10 м.д.), химический сдвиг которого также попадает в рассматриваемую область, имеет характерную мультиплетность кватер дублетов за счет взаимодействия с  $\alpha$ -СН-, ОН-протонами и метильной группой.

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 и триптофана, сигналы которых сливаются в одну уширенную линию  $\delta_{\text{C}}$  53.36 м.д.

Отнесение сигналов  $^{15}\text{N}$  осуществляли с помощью двумерного эксперимента 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  НМРС по корреляциям между азотами и NH-протонами с известными химическими сдвигами.

Двумерный гетероядерный эксперимент 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМРС (Рисунок 29), корреляции в котором обусловлены спин-спиновым взаимодействием через 2–3 связи  $^{2,3}J_{\text{CH}}$ , позволил идентифицировать сигналы непротонированных углеродов, в том числе карбонильных атомов аминокислот и защитных групп, и других четвертичных углеродов. Кроме того, при детальном анализе данных этого эксперимента установили связи между соседними остатками вдоль пептидной цепи, и тем самым подтвердили последовательность аминокислот в пентапептиде.

Комбинация 1D и 2D ЯМР экспериментов на ядрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  подтверждает структуру и химическую индивидуальность цифетрилина. При этом по спектрам ЯМР  $^1\text{H}$  в качестве незначительных примесей идентифицированы вода и этанол. Кроме того, в спектрах проявляются следовые количества неидентифицированных примесей, например, в области ароматических протонов.

Данные спектров ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ :

– ЯМР  $^1\text{H}$ : 10.74 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz, NH1'-Trp); 8.30 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz, NH-Trp); 8.14 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, NH-Lys); 7.91 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz, NH-Thr); 7.69 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, H4'-Trp); 7.59 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, NH-Phe); 7.36 – 7.26 (m, 6H, Ph-Z, H7'-Trp); 7.17 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz, H2'-Trp); 7.11 (br.t, 1H,  $J = 5.9$  Hz, NH'-Lys); 7.08 – 7.04 (m, 2H, H4'-Phe, H6'-Trp); 7.01 – 6.97 (m, 3H, H3'-Phe, H5'-Trp); 6.89 (br.d, 1H,  $J = 8.4$  Hz,

NH-Cys); 6.85 (d, 2H,  $J = 7.2$  Hz, H2'-Phe); 4.98 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>-Z), 4.89 (d, 1H,  $J = 5.8$  Hz, OH-Thr); 4.86 (br.t, 1H,  $J = 5.1$  Hz, H2'-Cys); 4.61 (td, 1H,  $J = 8.1, 6.1$  Hz, H2-Trp); 4.54 (td, 1H,  $J = 7.3, 4.8$  Hz, H2-Phe); 4.36 (td, 1H,  $J = 8.3, 5.4$  Hz, H2-Lys); 4.26 (dd, 1H,  $J = 8.2, 3.5$  Hz, H2-Thr); 4.10 (qdd, 1H,  $J = 6.4, 6.1, 3.6$  Hz, H3-Thr); 4.05 (m, 1H, H2-Cys); 3.89 (ddd, 1H,  $J = 11.1, 6.5, 4.4$  Hz, H6'A-Cys); 3.60 (s, 3H, OMe); 3.42 (ddd, 1H,  $J = 11.1, 6.4, 4.4$  Hz, H6'B-Cys); 3.11 (dd, 1H,  $J = 14.3, 6.1$  Hz, H3A-Trp); 2.94 (td, 2H,  $J = 6.9, 5.9$  Hz, H6-Lys); 2.90 (dd, 1H,  $J = 14.3, 9.0$  Hz, H3B-Trp); 2.77 – 2.67 (m, 3H, H3-Cys, H3A-Phe); 2.56 (dd, 1H,  $J = 13.7, 9.1$  Hz, H3B-Phe); 1.80 (td, 1H,  $J = 8.7, 3.1$  Hz, H3'-Cys); 1.69 – 1.56 (m, 2H, H3A-Lys, H4'A-Cys); 1.54 – 1.32 (m, 5H, H3B-Lys, H3'B, H4'B, H5'-Cys); 1.39 – 1.30 (m, 11H, Me-Boc, H5-Lys); 1.15 (m, 2H, H4-Lys); 1.06 (d, 3H,  $J = 6.4$  Hz, H4-Thr).

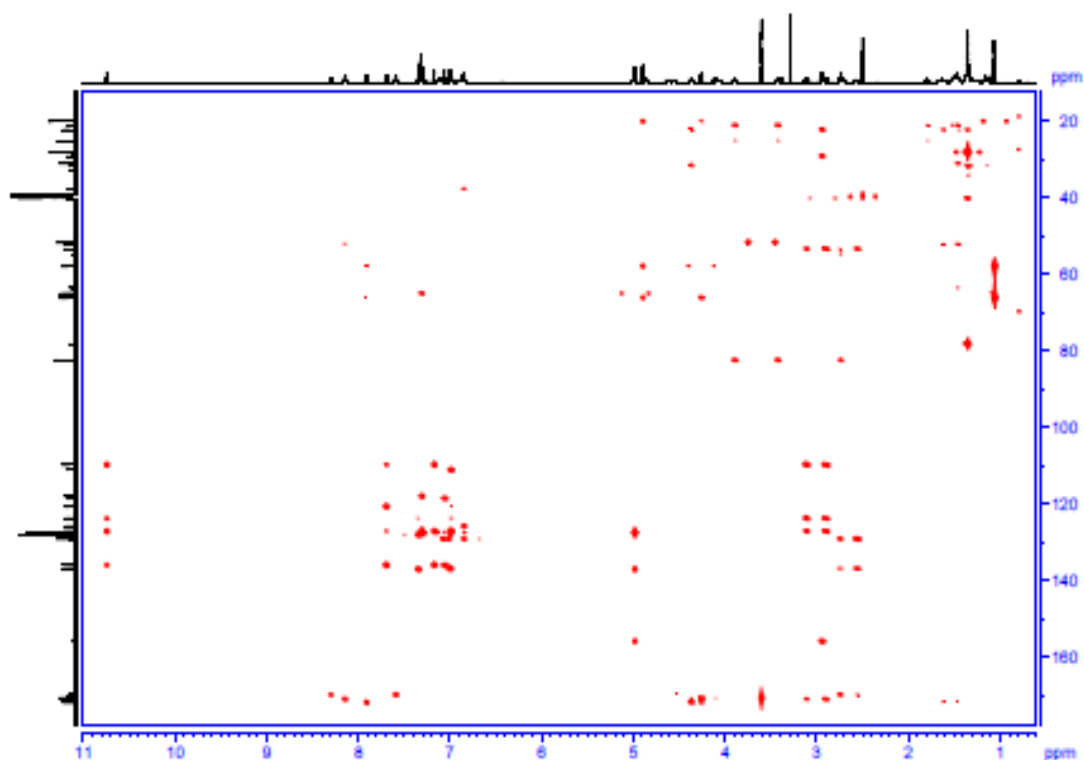


Рисунок 29 – Спектр ЯМР 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBSC (500 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, 35°C)

– ЯМР <sup>13</sup>C: 171.93 (C1-Lys), 171.13 (C1-Trp), 170.85 (C1-Thr), 170.02 (C1-Phe), 169.97 (C1-Cys), 155.96 (CO-Z), 154.99 (CO-Boc), 137.19 (C1'-Z), 136.96 (C1'-Phe), 136.07 (C7'a-Trp), 129.20 (C2'-Phe), 128.20 (C3'-Z, C4'-Z), 127.58 (C2'-Z, C3'-Phe), 127.17 (C3'a-Trp), 125.90 (C4'-Phe), 123.88 (C2'-Trp), 120.73 (C6'-Trp), 118.58



(C4'-Trp), 118.04 (C5'-Trp), 111.12 (C7'-Trp), 109.81 (C3'-Trp), 82.48 (C2'- Cys), 78.26 (C-Boc), 66.12 (C3-Thr), 65.02 (OCH<sub>2</sub>-Z), 63.57 (C6'-Cys), 57.86 (C2-Thr), 54.70 (C2-Cys), 53.36 (C2-Phe, C2-Trp), 52.15 (C2-Lys), 51.61 (OMe), 40.14 (C6-Lys), 37.68 (C3-Phe), 32.74 (C3-Cys), 31.52 (C3-Lys), 31.00 (C3'-Cys), 29.05 (C5-Lys), 28.33 (C3-Trp), 28.03 (Me-Boc), 25.03 (C5'-Cys), 22.18 (C4-Lys), 21.07 (C4'-Cys), 19.98 (C4-Thr).

– ЯМР <sup>15</sup>N: 131.1 (N'-Trp), 119.8 (N-Trp), 119.5 (N-Lys), 115.4 (N-Phe), 109.7 (N-Thr), 89.6 (N-Cys), 84.1 (N'-Lys).

Для определения подлинности цифетрилина методом *спектрометрии* использовали способность соединения поглощать излучение в ультрафиолетовом диапазоне длин волн, которая обусловлена наличием в молекуле нескольких ароматических систем [127; 132; 323]. УФ-спектр растворов цифетрилина в спирте этиловом 95% в области от 250 до 350 нм имеет максимумы поглощения при (274±2) нм, (282±2) нм и (290±4) нм и минимумы при (248±2) нм, (266±2) нм и (287±2) нм (Рисунок 30).

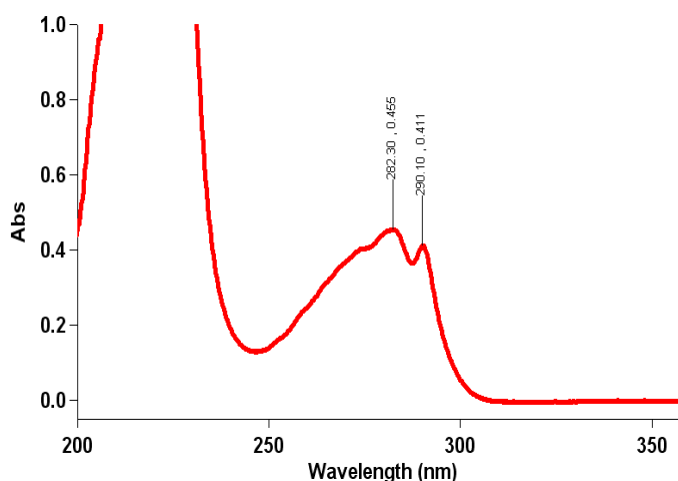


Рисунок 30 – УФ-спектр цифетрилина  
(0,008%-ный раствор в спирте этиловом 95%)

Спектральные характеристики цифетрилина использовали как при разработке методик количественного определения таблеток 6 мг (ГЛАВА 7 РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО

*СРЕДСТВА ЦИФЕТРИЛИН ТАБЛЕТКИ 6 мг* [131] и 60 мг (*ГЛАВА 8, 8.2 Разработка методик контроля качества таблеток цифетрилина 60 мг*), так и в исследованиях других лекарственных форм цифетрилина [110;188; 340].

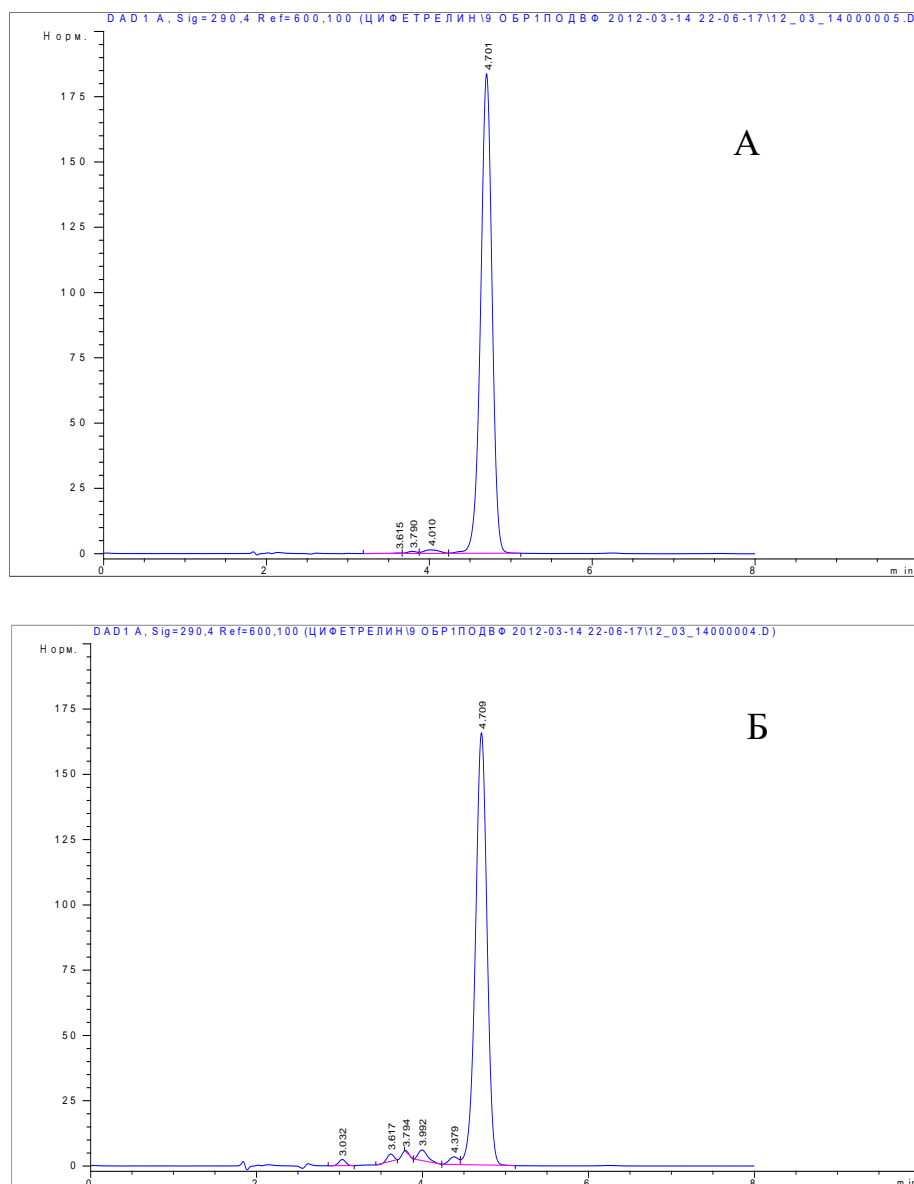
Для определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания цифетрилина в АФС использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [51; 132; 133; 263; 297].

Методика определения, условия хроматографирования и тест проверки пригодности хроматографической системы приведены в разделе *5.2 Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в АФС*.

Во всех проанализированных образцах время удерживания цифетрилина (RT) составляло от 4,5 до 4,7 мин и совпадало со временем удерживания стандартного образца цифетрилина. Как видно на Рисунке 31 А, Б, пики, соответствующие цифетрину, гомогенны и достаточно далеко отстоят по времени удерживания от ближайших пиков, соответствующих примесям. Времена удерживания стандартного образца цифетрилина и испытуемого образца практически совпадают.

Для определения подлинности цифетрилина также использовали метод тонкослойной хроматографии [111; 132]. Оптимальные условия хроматографирования были подобраны экспериментально:

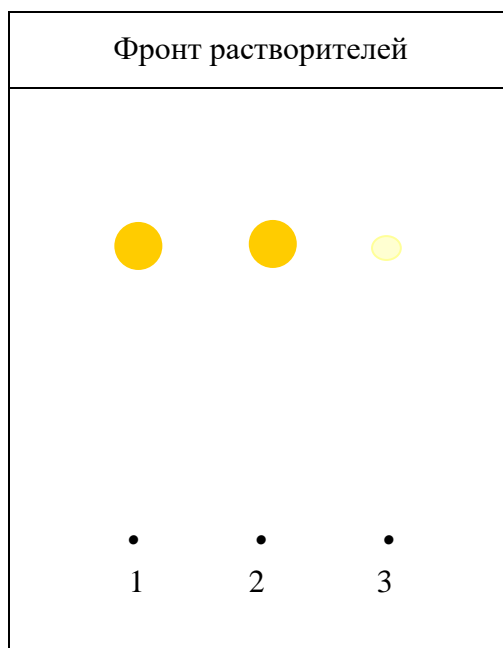
- система растворителей хлороформ - метанол (9:1) (объемное соотношение);
- хроматографические пластины ПТСХ-АФ-В-УФ (Сорбфил, Россия) размером 10x15 см и толщиной слоя 100 мкм;
- способ проявления хроматограммы – опрыскивание 0,05% водным раствором иодида калия после выдерживания пластинки в камере, насыщенной парами хлора.



А – стандартный образец цифетрилина; Б – АФС цифетрилин

Рисунок 31 – ВЭЖХ-хроматограммы АФС и стандартного образца цифетрилина

На пластину наносили пробы испытуемого образца АФС, стандартного образца цифетрилина и пробу для проверки пригодности хроматографической системы. Хроматограмму оценивали по положению и площади и интенсивности окрашивания пятен в пробе испытуемого раствора и пробах стандартных растворов (Рисунок 32).



1 – испытуемый образец АФС; 2 – СО цифетрилина; 3 – проба для проверки пригодности хроматографической системы

Рисунок 32 – Тонкослойная хроматография АФС цифетрилин

На хроматограммах испытуемых растворов всех исследованных образцов АФС обнаруживали одно пятно желтого цвета по положению, совокупности величины и интенсивности окраски соответствующее пятну в пробе раствора стандартного образца цифетрилина.

#### **Методика**

*Испытуемый раствор.* 6 мг субстанции помещают в стеклянный стакан вместимостью 5 мл, растворяют в 2 мл хлороформа и перемешивают (3 мг/мл). Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца цифетрилина.* 6 мг стандартного образца цифетрилина помещают в стеклянный стакан вместимостью 5 мл, растворяют в 2 мл хлороформа и перемешивают (3 мг/мл). Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* К 1 мл раствора стандартного образца цифетрилина прибавляют 4 мл хлороформа и перемешивают (0,6 мг/мл). Раствор используют свежеприготовленным.

*Калия иодида раствор 0,05%. 0,05 г калия иодида растворяют в свежепрокипяченной и охлажденной воде и доводят объем раствора водой для 100 мл. Раствор используют свежеприготовленным.*

*Хлористоводородная кислота разведенная 18%. Смешивают хлористоводородную кислоту концентрированную с водой в соотношении 1:1.*

*Камера, насыщенная парами хлора, для проявления хроматограмм. К 25 мл калия перманганата раствора насыщенного прибавляют 25 мл хлористоводородной кислоты разведенной 18%. Полученную смесь в открытом стеклянном бюксе помещают в камеру, закрывают камеру крышкой и выдерживают в течение 10 мин.*

На линию старта хроматографической пластинки ПТСХ-АФ-В-УФ (Сорбфил, Россия) размером 10x15 см и толщиной слоя 100 мкм или аналогичной наносят по 10 мкл испытуемого раствора (30 мкг), раствора стандартного образца (30 мкг) и раствора для проверки пригодности хроматографической системы (6 мкг). Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 3 мин, помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей хлороформ – метанол (9:1) (объемное соотношение) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 12 см, пластинку вынимают из камеры и высушивают на воздухе до удаления запаха растворителей в течение 5 мин.

Пластинку помещают в камеру, насыщенную парами хлора, и выдерживают в течение 5–10 мин, затем опрыскивают 0,05 % раствором калия иодида.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы четко видно одно пятно.

ПО – 0,006 мг цифетрилина.

## 5.2 Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в фармацевтической субстанции

Для количественного определения цифетрилина в АФС разработали методику ВЭЖХ [51; 111; 132; 133; 263; 297]. Хроматографические условия подобраны экспериментально: колонка с геометрическими параметрами 150x3 мм была выбрана для уменьшения расхода растворителей и продолжительности времени анализа [111; 132; 133]. Сорбент с размером частиц 5 мкм использовали для улучшения разделения между пиками цифетрилина и примесей с большим временем удерживания. Разделение проводили при комнатной температуре в режиме изократического элюирования. Поскольку цифетрилин растворим в хлороформе, данный растворитель использовали для приготовления испытуемого раствора и ПФ. ПФ включала гептан : метанол : хлороформ в объемном соотношении 230 : 22 : 210. Электронный спектр поглощения 0,05 % раствора цифетрилина в хлороформе, как и раствор цифетрилина в этиловом спирте, имеет спектр поглощения с максимумами поглощения при  $(274 \pm 2)$  нм,  $(282 \pm 2)$  нм и  $(290 \pm 4)$  нм (Рисунок 30). Для детектирования использовали спектрофотометрический детектор с фиксацией оптической плотности при длине волны  $(290 \pm 4)$  нм.

### **Методика**

*Испытуемый раствор.* Около 12,5 мг (точная навеска) цифетрилина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл хлороформа и доводят тем же растворителем до метки, перемешивают.

*Раствор СО цифетрилина.* Около 12,5 мг (точная навеска) СО цифетрилина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл хлороформа и доводят тем же растворителем до метки, перемешивают.

*Приготовление подвижной фазы.* Смешивают 230 мл гептана, 210 мл хлороформа и 22 мл метанола, перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Хроматографические условия.

– аналитический жидкостный хроматограф;

<i>Колонка</i>	УМС-РАСК SiO <sub>2</sub> , длина 150 мм, внутренний диаметр 3 мм, размер частиц 5 мкм, диаметр пор 6 нм. Допускается использование альтернативной колонки, удовлетворяющей требованиям пригодности хроматографической системы.
<i>Подвижная фаза</i>	Гептан:метанол:хлороформ 230:22:210 (о/о/о)
<i>Скорость потока</i>	0,4 мл/мин
<i>Температура колонки</i>	25°C
<i>Детектор</i>	спектрофотометрический, (290±4) нм
<i>Объём вводимой пробы</i>	5 мкл

Время хроматографирования – 10 мин.

Время удерживания цифетрилина 4,5–4,7 мин.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Проверку пригодности хроматографической системы проводят хроматографируя не менее 5 раз раствор стандартного образца.

*Хроматографическую систему считают пригодной*, если выполняются следующие условия:

- разрешение между пиком цифетрилина и пиком примеси с относительным временем удерживания (RRT) около 0,86 – не менее 2;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику цифетрилина, – не менее 4500 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение площади пика цифетрилина не более 2,0%;
- фактор асимметрии пика – не более 1,3.

Порог регистрации пиков: пик с RRT 0,67 исключают из обсчета (пик растворителя).

Хроматографируют попеременно испытуемый раствор и раствор стандартного образца (не менее 5 раз) и определяют площади пиков.

Содержание  $C_{52}H_{69}N_7O_{12}S$  (цифетрилина) в субстанции в пересчете на сухое вещество в процентах ( $X$ ) рассчитывают по формуле (12):

$$X = \frac{S \times a_0 \times P \times 100 \times 100}{S_0 \times a \times 100 \times (100 - W)} = \frac{S \times a_0 \times P}{S_0 \times a \times (100 - W)} \times 100 \quad (12)$$

где  $S$  – площадь пика цифетрилина на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика цифетрилина на хроматограмме раствора СО;

$a_0$  – навеска СО цифетрилина, мг;

$a$  – навеска АФС цифетрилина, мг;

$W$  – содержание воды в АФС, % ;

$P$  – содержание цифетрилина в СО, %.

Все изученные образцы АФС цифетрилин содержали не менее 97,0% АВ в пересчете на сухое вещество (Таблица 38).

Валидацию методики количественного определения цифетрилина в фармацевтической субстанции проводили, исследуя следующие характеристики:

- специфичность,
- линейность,
- правильность,
- прецизионность:

1) повторяемость (сходимость),

2) промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность [27; 98; 233; 333].

Специфичность разработанной методики подтверждали, хроматографируя испытуемый образец и растворитель в условиях, описанных выше.

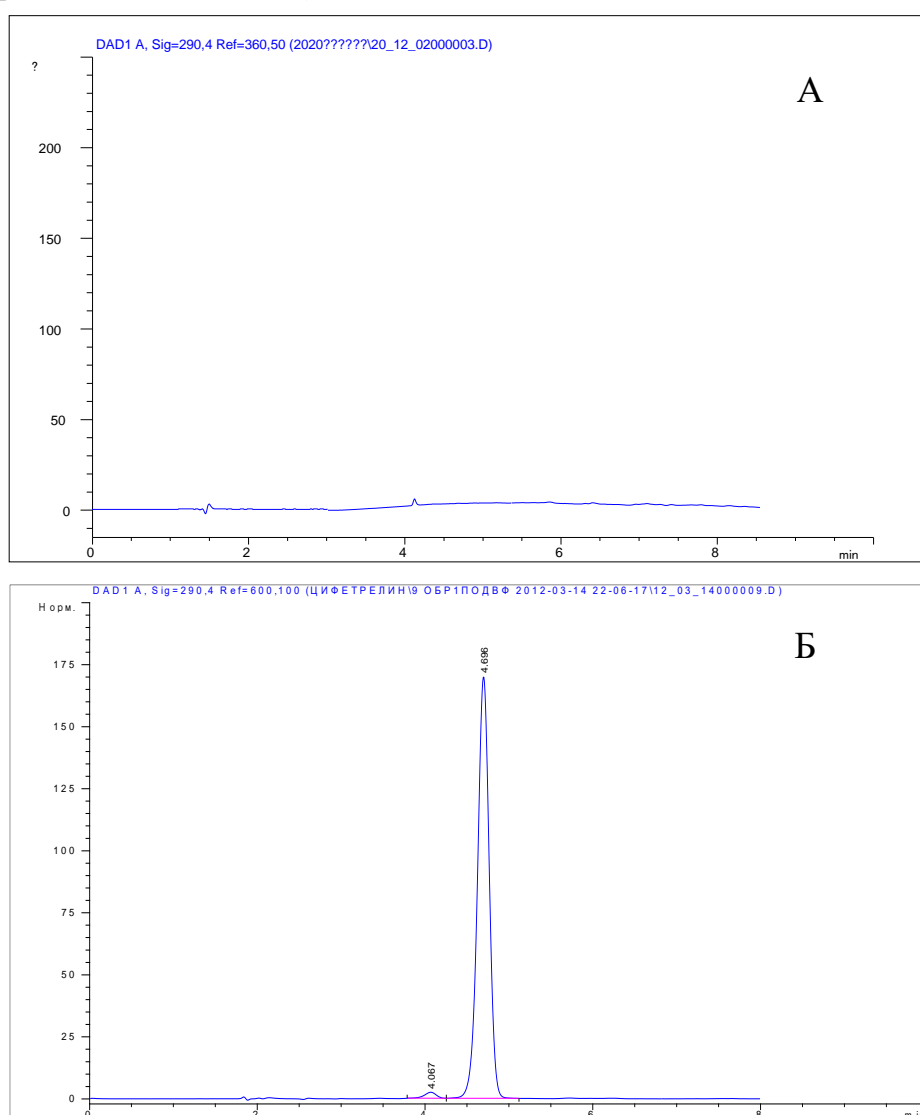
Хроматограммы растворителя (Рисунок 33, А) сравнивали с хроматограммами испытуемого образца (Рисунок 33, Б) для определения



возможных помех и искажений, создаваемых растворителем/подвижной фазой в процессе анализа.

Оценка полученных хроматограмм позволяет сделать заключение, что растворитель не создает помех при хроматографировании субстанции и не оказывает влияния как на время удерживания цифетрилина, так и на времена удерживания родственных примесей. Пик, соответствующий цифетрину, имеет острую и симметричную форму.

На следующем этапе исследования специфичности оценивали метрологические характеристики определения цифетрилина в тесте пригодности хроматографической системы (Таблица 32).



А – растворитель, Б – цифетрин

Рисунок 33 – Хроматограммы растворителя и образца цифетрилина

Таблица 32 – Результаты определения пригодности хроматографической системы

Цифетрилин				Разрешение между пиком цифетрилина и пиком с RRT 0,86
Эффективность колонки	Асимметрия пика	Площадь пика	Метрологические характеристики	
4500	1,32	26027257	$\bar{x} = 26138239,67$	2,10
4500	1,29	25594436	$S = 462812,23$	2,10
4500	1,27	26556294	$S\bar{x} = 154270,74$	2,00
4500	1,31	26656523	$\Delta\bar{x} = 436456,71$	2,12
4500	1,30	25623356	$t(95\%, 5)_{\text{табл.}} = 2,31$	2,18
4500	1,30	26371572	$\bar{\varepsilon} = 1,67\%$	2,10

Из данных, представленных в Таблице 32, видно, что относительное стандартное отклонение площади пика цифетрилина, рассчитанное по 6 хроматограммам, не превышает 2,0% и соответствует определенному критерию приемлемости; значение разрешения между пиком цифетрилина и пиком с RRT 0,86 для каждого из проведенных определений превышает 2,0, что соответствует рекомендуемым значениям [135].

В выбранных условиях хроматографирования RT цифетрилина для всех исследованных серий субстанции цифетрилина составляло 4,5–4,7 мин и совпадало со временем удерживания стандартного образца цифетрилина.

Линейность разработанной методики анализа определяли экспериментально, доказывая линейный характер соотношения между концентрацией цифетрилина в анализируемом растворе и величиной сигнала (площадью пика).

Для определения линейности готовили серию растворов с концентрацией цифетрилина в диапазоне от 80 до 130%. Полученные растворы анализировали методом ВЭЖХ по методике, описанной выше, при этом каждый образец анализируемого раствора инжесктировали три раза.

На основе полученных данных строили график зависимости площади пика цифетрилина от его концентрации в анализируемом растворе и определяли параметры линейной зависимости вида  $y = b \cdot x + a$  и коэффициент корреляции. Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости, представлены в Таблице 33.

Таблица 33 – Определение линейности методики количественного определения цифетрилина. Экспериментальные данные и результаты их статистической обработки

Концентрация цифетрилина в растворе, мг/мл		Площадь пика ( $\cdot 10^7$ ) <sup>1</sup>	Параметры линейной зависимости		
0,4092		2,0580	Угловой коэффициент линейной зависимости $b = 5,0197 \cdot 10^7$ Свободный член линейной зависимости $a = 52923$ $y = 5,0197 \cdot 10^7 x + 53923$ Коэффициент корреляции $r = 0,9999$		
0,4524		2,2800			
0,5180		2,6027			
0,5492		2,7641			
0,6148		3,0869			
0,6724		3,3835			
$\bar{x}$	$\bar{y}$	$s_0^2$	$S_a$	$S_b$	
0,5360	$2,6959 \cdot 10^7$	$1,7838 \cdot 10^7$	0,2928	0,5388	

Примечание – <sup>1</sup> Среднее значение из трех определений

На Рисунке 34 приведено графическое изображение определенной линейной зависимости.

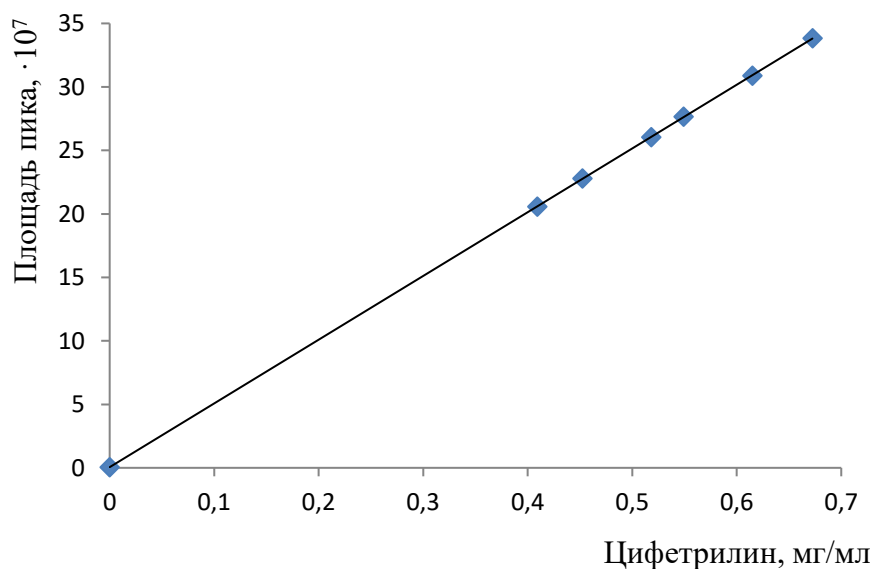


Рисунок 34 – Линейная зависимость площади пика от концентрации цифетрилина в растворе

Рассчитанный коэффициент корреляции  $r$  составляет 0,9999, то есть линейная зависимость соответствует рекомендуемому условию  $|r| \geq 0,99$ , что позволяет утверждать, что линейная зависимость между  $x$  (концентрация

цифетрилина в анализируемом растворе, мг/мл) и у (площадь пика цифетрилина на хроматограмме) не является случайной.

При определении прецизионности методики количественного определения цифетрилина в субстанции оценивали повторяемость (сходимость) результатов и внутрилабораторную прецизионность (ГЛАВА 2, 2.3.2 Валидация аналитических методик). Расчеты проводили по формуле (12). Полученные результаты и метрологические характеристики среднего результата приведены в Таблице 34.

Таблица 34 – Результаты исследования повторяемости (сходимости) для методики количественного определения цифетрилина в субстанции

№ п/п	Цифетрилин								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Навеска, мг	11,94	12,31	12,97	12,82	12,67	12,16	13,11	12,34	11,56
Площадь пика · 10 <sup>7</sup>	2,4677	2,3937	2,6806	2,6496	2,6186	2,5132	2,7051	2,5504	2,3892
Найдено цифетрилина, %	97,09	97,24	98,43	97,11	98,03	97,14	98,55	98,52	97,15
Метрологические характеристики среднего результата									
$\bar{x}$	s	s <sup>2</sup>	s $\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	t(P,f) табл.	t(P,f) вычисл.	$\bar{\epsilon}$ , %	
97,70	0,6694	0,4481	0,2231	0,52	97,70 ± 0,52	2,31	2,08	0,53	

Примечание – n=9, f=8, P=95%

Испытания проводили в одной лаборатории, с использованием одного и того же хроматографа и хроматографической колонки, не изменяя условия хроматографирования и с одними и теми же растворителями.

При оценке повторяемости (сходимости) установлено, что среднее значение содержания цифетрилина в субстанции составляет 97,70% и соответствует установленной норме (не менее 97,00% в пересчете на высушенное вещество). Относительная ошибка среднего результата – 0,53%. При доверительной вероятности P = 95% для проанализированных образцов цифетрилина доверительный интервал результата отдельного определения ( $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ ) составил

97,70 ± 0,52, а относительное стандартное отклонение среднего результата не превышает 2,0%.

Вычисленное значение критерия Стьюдента  $t(P,f)$  равно = 2,08, что меньше справочного  $t(P,f) = 2,31$ , коэффициент вариации – 0,23%. То есть результаты, полученные по разработанной методике, не отягощены систематической ошибкой и являются повторяемыми (сходимыми).

Для оценки внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики количественного определения цифетрелина проводили анализ субстанции серии 251114 двумя сотрудниками в разные дни. Каждый исполнитель проанализировал по 9 образцов одной серии. Количественное содержание цифетрелина в субстанции рассчитывали по формуле (12). В Таблице 35 приведены результаты статистической обработки полученных данных.

Таблица 35 – Метрологические характеристики оценки внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики количественного определения цифетрелина в субстанции

Метрологические характеристики среднего результата									
N	$\bar{x}$	s	$s^2$	$s\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	t(P,f) табл.	t(P,f) вычисл.	$\bar{\epsilon}, \%$
1	97,62	0,8507	0,7236	0,2836	0,70	97,62±0,70	2,31	1,93	0,71
2	97,67	0,8081	0,6530	0,2694	0,62	97,67±0,62		2,19	0,64

Примечание – n=9, f=8, P=95%

Данные, представленные в Таблице 35, свидетельствуют о том, что относительная ошибка среднего результата исследователей составила 0,71% и 0,64%, соответственно. Вычисленные значения критерия Стьюдента  $t(P,f)$  равны 1,93 и 2,19, соответственно, что меньше табличного значения  $t(P,f) = 2,31$ . То есть результаты, полученные в отдельных сериях экспериментов, не отягощены систематической ошибкой.

Рассчитанный критерий Фишера F равен 1,11, что меньше  $F(P, f, f)_{\text{табл.}}$  - табличного значения 6,03, то есть различие  $s_1^2$  и  $s_2^2$  не может быть признано значимым и не является статистически достоверным. Гипотеза  $x_1 = x_2$  может быть

признана верной, поскольку вычисленный критерий Стьюдента  $t = 0,909$ , что меньше  $t = 0,909 < t(95\%; 16) = 2,12$  и  $t = 0,909 < t(99\%; 16) = 2,92$ .

Вышесказанное свидетельствует о промежуточной прецизионности разработанной методики методики количественного определения цифетрилина в субстанции методом ВЭЖХ.

Правильность разработанной методики доказывали, проводя количественное определение цифетрилина в субстанции в растворах на трех уровнях концентраций (80%, 100% и 120%) и рассчитывая открываемость, %, и метрологические характеристики среднего результата.

Таблица 36 – Результаты оценки правильности методики количественного определения цифетрилина в АФС

Цифетрилин	Опыт								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Навеска, мг	10,23	9,67	10,95	12,50	12,93	12,26	14,82	15,47	15,22
Площадь пика, $\cdot 10^7$	2,1709	2,0388	2,3130	2,6463	2,6027	2,6090	3,1625	3,2861	3,2133
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
Среднее значение в трипликате	99,78			100,18			100,21		
Метрологические характеристики среднего результата									
$\bar{x}$	s	$s^2$	$s\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	t(P,f) табл.	t(P,f) вычисл.	$\bar{\varepsilon}, \%$	
100,06	0,396	0,156	0,132	0,32	100,06 $\pm$ 0,32	2,31	0,44	0,32	

Примечание – n=9, f=8, P=95%

Согласно данным, представленным в Таблице 36, разработанная методика может считаться правильной, поскольку среднее значение результатов в трипликатах находится в диапазоне 98,0–102,0%. Численное значение критерия Стьюдента, рассчитанное по результатам анализа выборки, составляет 0,44, то

есть  $t_{\text{вычисл.}} < t_{\text{табл.}}(P,f)$ , а относительная ошибка среднего результата ( $\bar{\varepsilon}$ ) не превышает 1,00%.

Пределы обнаружения и количественного определения, рассчитанные по формулам (2) и (3) составили 1,93 мкг/мл и 5,83 мкг/мл, соответственно.

### 5.3 Определение родственных примесей в АФС цифетрилин

Пределы контроля, идентификации и квалификации родственных примесей в цифетрилине установлены в соответствии с требованиями предъявляемым к пептидам, полученным синтетическим путем [27].

Условия хроматографирования и тест проверки пригодности хроматографической системы приведены в *методике количественного определения цифетрилина в АФС (ГЛАВА 5, 5.2 Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в фармацевтической субстанции)*.

На хроматограммах наблюдали пики с RRT от 0,65 до 1,15. Пик с RRT 0,87 является пиком растворителя и при расчете содержания родственных примесей в АФС во внимание не принимали (Рисунок 35).

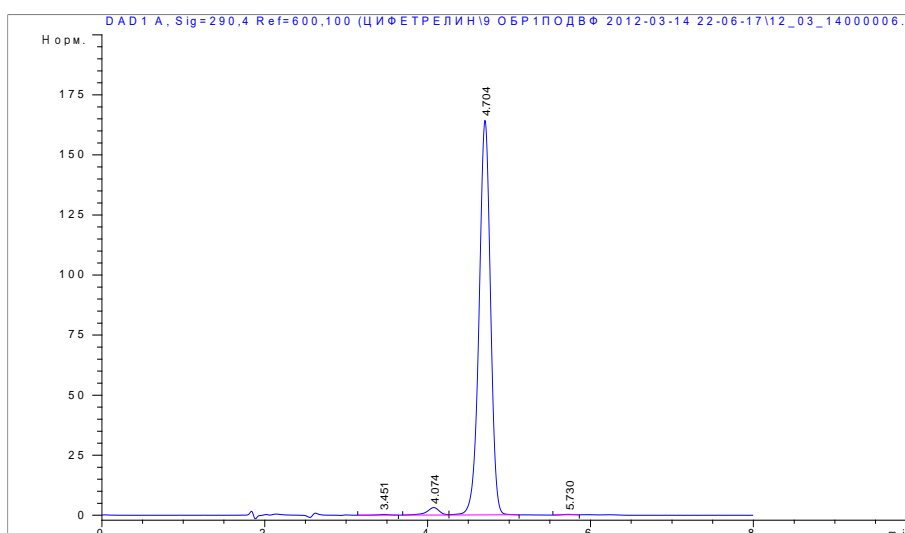


Рисунок 35 – Хроматограмма образца АФС цифетрилин

Содержание любой единичной неидентифицированной примеси в АФС в процентах (X, %) вычисляли по формуле (13):

$$X = \frac{S_i \times 100}{S_1 + S_2 + \dots + S_i} \quad (13)$$

где:  $S_i$  – площадь пика любой единичной неидентифицированной примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_1 + S_2 + \dots + S_i$  – сумма площадей пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

Все изученные образцы цифетрилина содержали не более 1,0 % любой единичной неидентифицированной примеси и не более 3,0 % суммы примесей (Таблица 38).

Для контроля качества АФС также использовали методы, описанные в ГФ XIV [27] (Таблица 4):

- *растворимость* (Таблица 37);
- *удельное вращение* также может служить показателем подлинности и качества субстанции. Все измерения проводили на поляриметре марки "Perkin-Elmer-241"(США), откалиброванном с точностью  $\pm 0,01^\circ$  для 1% раствора цифетрилина в диметилформамиде. Вещество дополнительно не высушивали, учитывая, что оно негигроскопично. Результаты, полученные для образцов АФС, в которых содержание цифетрилина составляло не менее 97,0%, укладывались в интервал от  $+17,5^\circ$  до  $+19,0^\circ$ .

- исходя из условий выделения цифетрилина на последней стадии синтеза, АФС может содержать некоторое *количество воды*, которое определяли по методу К. Фишера [27, методика Б]. Во всех исследованных сериях АФС цифетрилин содержание воды не превышало 1,0%;

- все изученные серии АФС цифетрилин практически не содержали золы и тяжелых металлов.



По результатам исследований разработан проект нормативного документа по качеству фармацевтической субстанции цифетрилин (Приложение Д). В Таблице 37 приведена спецификация на АФС цифетрилин, а в Таблице 38 – результаты контроля качества исследованных серий АФС цифетрилин.

Таблица 37 – Спецификация на АФС цифетрилин

Критерий	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуальный	Белый или белый со слабым желтоватым оттенком кристаллический порошок, без запаха
Растворимость	ГФ XIV	Растворим в хлороформе, диметилформамиде; мало растворим в спирте этиловом 95%; очень мало растворим в разбавленных минеральных кислотах и щелочах; практически нерастворим в воде
Подлинность	Спектрофотометрия	Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,008 % раствора цифетрилина в спирте этиловом 95% в области от 250 до 350 нм должен иметь максимумы поглощения при (274±2) нм, (282±2) нм и (290±4) нм и минимумы при (248±2) нм, (266±2) нм и (287±2) нм
	ТСХ	На хроматограмме должно обнаруживаться одно пятно по положению, совокупности величины и интенсивности окраски соответствующее пятну стандартного образца цифетрилина
	ВЭЖХ	Время удерживания цифетрилина 4,5–4,7 мин
Удельное вращение	ГФ XIV ОФС.1.2.1.0018.15	От +17,0 до +20,0°
Родственные примеси	ВЭЖХ	Любая единичная неидентифицированная примесь — не более 1,0%; Сумма примесей — не более 3,0%
Сульфатная зола и тяжелые металлы	ГФ XIV ОФС.1.2.2.2.0014.15	Сульфатная зола — не более 0,10%; тяжелые металлы — не более 0,001%
Вода (по методу К.Фишера)	ГФ XIV ОФС.1.2.3.0002.15	Не более 1,0%
Микробиологическая чистота	ГФ XIV ОФС.1.2.4.0002.18	Категория 2.2
Количественное определение	ВЭЖХ	Не менее 97,0%

Таблица 38 – Показатели качества и результаты исследования АФС цифетрилин согласно требованиям проекта НД

Показатель	Нормы по НД	041014	051014	061114
Описание	Белый или белый со слабым желтоватым оттенком кристаллический порошок, без запаха	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Растворимость	Растворим в хлорформе, диметилформамиде; мало растворим в спрте этиловом 95%, ацетоне; очень мало растворим в разбавленных минеральных кислотах и щелочах; практически нерастворим в воде	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Подлинность	Спектрометрия	Положительная	Положительная	Положительная
	ТСХ	Положительная	Положительная	Положительная
	ВЭЖХ	Положительная	Положительная	Положительная
Удельное вращение, °	От +17,0 до +20,0	+ 18,0	+ 17,5	+ 18,0
Родственные примеси, %	Любой единичной неидентифицированной примеси - не более 1,0	1,0; 0,4	0,2; 1,0; 1,0	0,5; 1,0; 1,0
	суммы примесей - не более 3,0	1,4	2,2	2,5
Сульфатная зола, %	Не более 0,10	0,03	0,05	0,03
Тяжелые металлы, %	Не более 0,001	Менее 0,001	Менее 0,001	Менее 0,001
Вода (по методу К.Фишера), %	Не более 1,0	0,5	0,8	0,6
Количественное определение, %	Не менее 97,0	98,6	97,8	97,5

Примечание – Все протестированные серии АФС соответствовали требованиям НД по показателю Микробиологическая чистота

#### **5.4 Изучение условий хранения и стабильности фармацевтической субстанции цифетрилин**

Оценку стабильности АФС цифетрилин проводили в соответствии с требованиями [27] по результатам контроля качества трех серий 201011, 020212 и 030212. Образцы каждой серии (по 10 г АФС) хранились в пластиковых банках цилиндрической формы из полиэтилена высокой плотности вместимостью 20 мл с горловиной с винтовой резьбой, укупоренных навинчиваемыми пластиковыми крышками (EN ISO, 14644-1, Класс ISO 8). Образцы субстанции хранили в сухом защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C (холодильная камера). Контроль качества проводили по выбранным критериям: внешний вид, растворимость, удельное вращение, родственные примеси, содержание воды, количественное определение. Результаты, представленные в Таблице 39, свидетельствуют о том, что цифетрилин достаточно устойчив в заявленной упаковке и при соблюдении условий хранения стабилен в течение 3 лет.

Таблица 39 – Результаты исследования стабильности АФС цифетрилин

Упаковка – Банки пластиковые из полиэтилена высокой плотности с горловиной с винтовой резьбой укупоренной навинчиваемой пластиковой крышкой

Условия хранения – В сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С

№ серии	Дата анализа	Описание	Растворимость	Удельное вращение, °	Родственные примеси, %		Вода, %	Количественное определение, %	Срок хранения
					единичная	сумма			
Нормы по проекту НД		Белый или белый со слабым желтоватым оттенком кристаллический порошок, без запаха	Растворим в хлороформе, диметилформамиде, мало растворим в спирте этиловом 95%, очень мало растворим в разбавленных минеральных кислотах и щелочах, практически нерастворим в воде	От + 17,0 до 20,0	Любой единичной примеси - не более 1,0; суммы примесей - не более 3,0		Не более 1,0	Не менее 97,0 в пересчете на сухое вещество	
021013	10.2013	Соответствует	Соответствует	+ 18,0	0,6; 0,9; 0,9	2,4	0,9	97,8	Входной контроль
	01.2014	То же	То же	+ 18,0	0,6; 0,8; 0,9	2,3	0,9	97,6	3 месяца
	04.2014	- « -	- « -	+ 17,5	0,5; 0,9; 1,0	2,4	0,8	97,4	6 месяцев
	08.2014	- « -	- « -	+ 18,4	0,5; 1,0; 1,0	2,5	0,9	97,5	9 месяцев
	10.2014	- « -	- « -	+ 18,5	0,7; 1,0; 1,0	2,7	0,9	97,4	1 год
	04.2015	- « -	- « -	+ 18,0	0,7; 0,9; 0,9	2,5	1,0	97,8	1 год 6 месяцев
	10.2015	- « -	- « -	+ 18,0	0,7; 0,9; 0,9	2,5	0,9	97,5	2 года
	04.2016	- « -	- « -	+ 18,5	0,5; 0,9; 1,0	2,4	0,8	97,4	2 года 6 месяцев
	10.2016	- « -	- « -	+ 18,0	0,7; 1,0; 1,0	2,7	0,8	97,5	3 года

Продолжение Таблицы 39

№ серии	Дата анализа	Описание	Растворимость	Удельное вращение, °	Родственные примеси, %		Вода, %	Количественное определение, %	Срок хранения
					единичная	сумма			
Нормы по проекту НД		Белый или белый со слабым желтоватым оттенком кристаллический порошок, без запаха	Растворим в хлороформе, диметилформамиде, мало растворим в спрте этиловом 95%, очень мало растворим в разбавленных минеральных кислотах и щелочах, практически нерастворим в воде	От + 17,0 до 20,0	Любой единичной неидентифицированной примеси - не более 1,0; суммы примесей - не более 3,0		Не более 1,0	Не менее 97,0 в пересчете на сухое вещество	
020212	02.2014	Соответствует	Соответствует	+ 18,0	0,6; 0,9; 0,9	2,4	0,5	97,2	Входной контроль
	05.2014	То же	То же	+ 18,0	0,6; 1,0; 0,9	2,5	0,5	97,1	3 месяца
	08.2014	- « -	- « -	+ 18,5	0,7; 0,9; 0,9	2,5	0,6	97,2	6 месяцев
	11.2014	- « -	- « -	+ 18,0	0,7; 0,9; 0,8	2,4	0,6	97,1	9 месяцев
	02.2015	- « -	- « -	+ 18,0	0,6; 1,0; 0,7	2,3	0,4	97,0	1 год
	08.2015	- « -	- « -	+ 18,0	0,8; 0,8; 0,6	2,2	0,5	96,8	1 год 6 месяцев
	02.2016	- « -	- « -	+ 19,0	0,5; 1,0; 1,0	2,5	0,6	96,9	2 года
	08.2016	- « -	- « -	+ 18,5	0,5; 0,9; 0,9	2,3	0,5	97,0	2 года 6 месяцев
	02.2017	- « -	- « -	+ 18,0	0,5; 1,0; 1,0	2,5	0,6	97,1	3 года
030215	02.2014	Соответствует	Соответствует	+17,5	0,6; 0,9; 0,9	2,4	0,4	97,1	Входной контроль
	05.2014	То же	То же	+ 18,0	0,8; 0,9; 0,9	2,6	0,5	97,2	3 месяца
	08.2014	- « -	- « -	+ 18,0	0,9; 0,9; 0,9	2,7	0,5	97,5	6 месяцев
	11.2014	- « -	- « -	+ 17,5	0,9; 0,9; 1,0	2,8	0,4	97,4	9 месяцев

Продолжение Таблицы 39

№ серии	Дата анализа	Описание	Растворимость	Удельное вращение, °	Родственные примеси, %		Вода, %	Количественное определение, %	Срок хранения
Нормы по проекту НД					Любой неидентифицированной примеси - не более 1,0; суммы примесей - не более 3,0	единичная			
030215	02.2015	- « -	- « -	+ 18,0	0,7; 1,0; 1,0	2,7	0,5	97,1	1 год
	08.2015	- « -	- « -	+ 17,5	0,8; 0,7; 0,6	2,1	0,5	97,5	1 год 6 месяцев
	02.2016	- « -	- « -	+ 18,0	0,7;0,9; 1,0	2,6	0,5	97,2	2 года
	08.2016	- « -	- « -	+ 17,5	0,5; 0,9; 1,0	2,4	0,5	97,1	2 года 6 месяцев
	02.2017	- « -	- « -	+ 18,0	0,7; 1,0; 1,0	2,7	0,5	97,0	3 года

Примечание – По показателям «Подлинность» и «Сульфатная зола и тяжелые металлы» все серии АФС соответствовали требованиям проекта НД

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработаны методики контроля качества АФС цифетрилин. Для определения подлинности АФС цифетрилина разработан оригинальный метод, основанный на использовании мультитядерной ЯМР-спектроскопии. Для подтверждения подлинности цифетрилина также разработаны спектрофотометрические и хроматографические (ТСХ и ВЭЖХ) методики, для которых в ходе валидации установлена приемлемость по критериям специфичность и предел обнаружения.

2. Разработана методика определения родственных примесей в АФС цифетрилин методом ВЭЖХ. Пределы контроля, идентификации и квалификации родственных примесей в цифетрилине установлены в соответствии с требованиями предъявляемым к пептидам, полученным синтетическим путем и составляют не менее 1,0% единичной примеси и не более 3% суммы примесей.

3. Экспериментально выбраны условия для количественного определения цифетрилина в АФС методом ВЭЖХ и проведена валидация разработанной методики. Оценка полученных данных свидетельствует о том, что методика соответствует требованиям по критерию специфичности: растворитель не создает помех при хроматографировании субстанции и не оказывает влияния как на время удерживания цифетрилина, так и на времена удерживания родственных примесей. Установлена приемлемость разработанной методики по критерию линейность – рассчитанный коэффициент корреляции  $r$  равный 0,9999, отвечает необходимому условию  $|r| \geq 0,99$ . При оценке повторяемости (сходимости) установлено, что среднее значение содержания цифетрилина в субстанции составляет 97,70% и соответствует требованию спецификации. Разработанная методика может считаться правильной, поскольку среднее значение результатов в трипликатах находится в диапазоне от 98,0% до 102,0%.

4. Результаты, полученные при изучении стабильности АФС, свидетельствуют о том, что качество цифетрилина не изменяется в течение 3 лет при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C.



## **ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА АНАЛОГА СОМАТОСТАТИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

### **6.1 Определение пути введения лекарственного средства цифетрилин**

#### **6.1.1 Изучение экспрессии рецепторов к соматостатину в экспериментальных опухолях животных**

Антипролиферативное, антиангиогенное и проапоптотическое действие соматостатина (SST) и его структурных аналогов обусловлено связыванием со специфическими рецепторами (SSTR) и напрямую зависит от их локализации и количества.

В настоящее время известно пять основных типов рецепторов SSTR: SSTR1–SSTR5 [166; 228; 342; 399], включающих в себя подтипы, которые различаются по своей структуре и экспрессируются в характерных количествах при соответствующих патологиях [316].

У человека SSTR экспрессируются в нормальных и опухолевых клетках центральной и периферической нервной системы, ЖКТ и эндокринных органов, включая поджелудочную железу, гипофиз, щитовидную и паращитовидную железу и клетки микроокружения опухоли [32; 387].

Также известно об экспрессии всех пяти подтипов SSTR в органах и тканях мышей и крыс: в головном мозге и гипофизе, легких, печени, почках, желудке и поджелудочной железе и др. [141; 162; 222; 269; 270; 281].

Изучение специфической противоопухолевой активности цифетрилина потребовало исследований по определению экспрессии рецепторов к соматостатину в экспериментальных опухолях, то есть определения релевантности используемых моделей.

Оценку экспрессии рецепторов к соматостатину 1, 2 и 5 типов проводили иммуногистохимическим методом в экспериментальных опухолях животных –

аденокарциноме молочной железы Ca755 и аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ (ГЛАВА 2, 2.3.5 Методы, использованные в исследованиях на лабораторных животных) [30; 334].

Результаты определения экспрессии SSTR1, 2 и 5 в образцах аденокарциномы молочной железы Ca 755 приведены в Таблице 40.

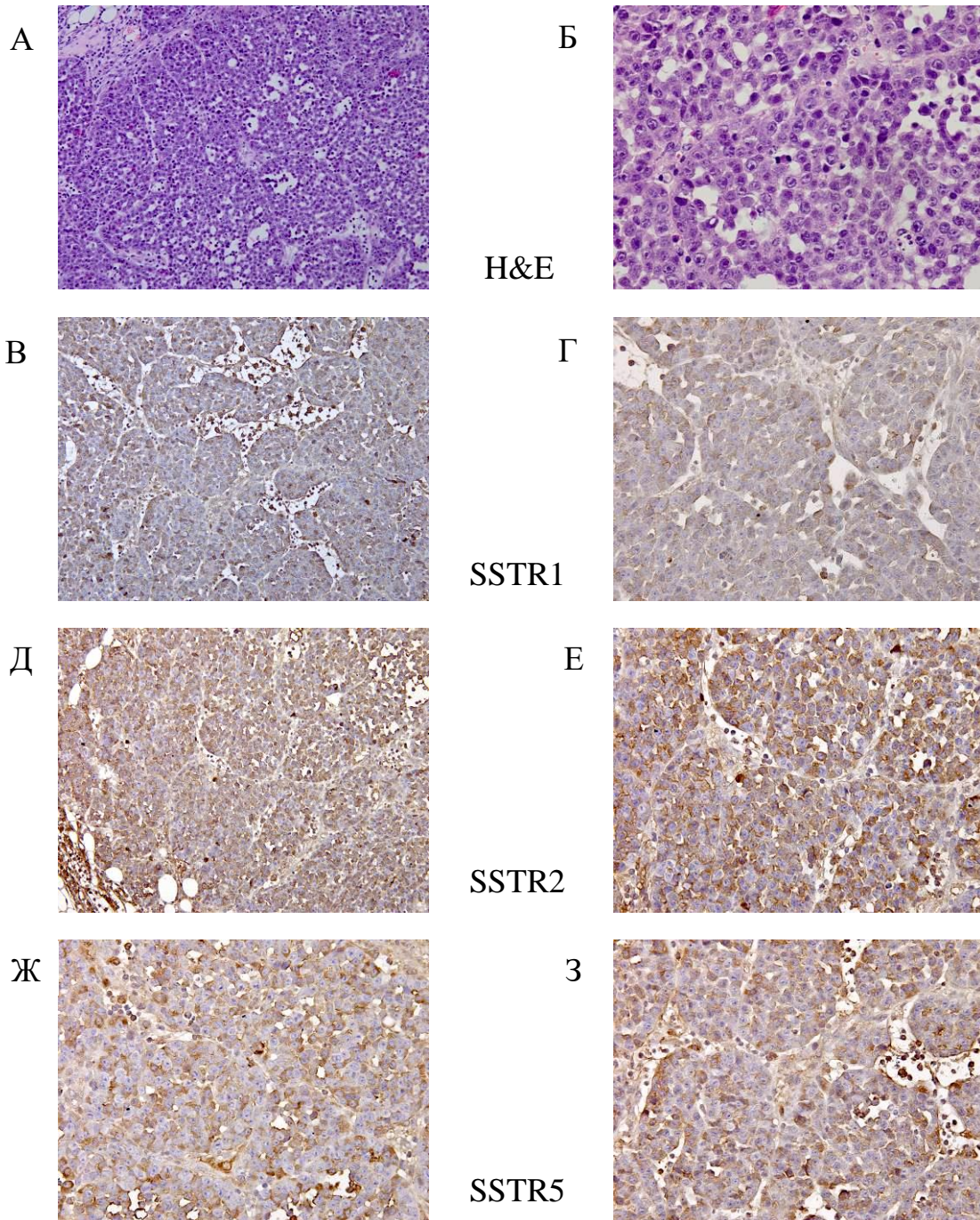
Из данных, представленных в Таблице 40, видно, что в образцах аденокарциномы молочной железы Ca755 преобладала частичная мембранная экспрессия SSTR1, которая в двух образцах сочеталась с цитоплазматической окраской.

Таблица 40 – Оценка экспрессии SSTR1,2,5 в образцах аденокарциномы молочной железы Ca-755

Образец	Тип экспрессии	Интенсивность реакции, балл	Антигенпозитивные клетки		Общая оценка, балл
			%	балл	
SSTR1 <sup>1</sup>					
1	В	1	15	1	1+
2	В	2	60	3	6+
3	Б+Г	3	55	3	9+
4	В	2	27	2	4+
5	Б+Г	1	17	1	1+
SSTR2 <sup>2</sup>					
1	Б+Г	2	69	3	6+
2	В	3	55	3	9+
3	В	2	76	4	8+
4	В+Г	3	68	3	9+
5	Б+В+Г	3	80	4	12+
SSTR5 <sup>2</sup>					
1	Б	3	70	3	9+
2	А	—	—	—	0
3	В	2	71	3	6+
4	В	3	58	3	9+
5	В	2	50	2	4+

Примечание – <sup>1</sup>Окрашивание с помощью антител Abbiotic (polyclonal, Rb)

<sup>2</sup>Окрашивание с помощью антител Epitomics (monoclonal Rb UMB-1)



А – образец 1, гематоксилин-эозин (x200); Б – образец 3, гематоксилин-эозин (x400); В, Г – оценка экспрессии SSTR1, частичное окрашивание мембраны клеток опухоли, оценка 4+; Д, Е – оценка экспрессии SSTR2, интенсивное мембранное окрашивание более 80% клеток опухоли – полное мембранное окрашивание, оценка 12+; Ж, З – оценка экспрессии SSTR5, мембранное окрашивание (частичное+полное) большинства опухолевых клеток, умеренная интенсивность, оценка 9+ (x400; x600). Ядра клеток докрашены гематоксилином Майера

Рисунок 36 – Аденокарцинома молочной железы Ca 755

Интенсивность реакции была высокой в двух образцах, процент антиген-позитивных клеток варьировал от 15% до 60%. Максимальный балл при оценке общей иммунореактивности – 9+ (в одном образце), а в остальных от 1+ до 6+ (Рисунок 36 В, Г).

Большинство образцов демонстрировали частичную мембранную экспрессию SSTR2 (Epitomics, monoclonal Rb, clone UMB1), которая в трех случаях сочеталась с фокальной цитоплазматической экспрессией (Таблица 40, Рисунок 36 Д, Е). Интенсивность реакции была высокой или умеренной, количество антиген-позитивных клеток варьировало от 55% до 80%. Максимальный балл при оценке общей иммунореактивности – 12+ (в одном образце), в остальных – от 6+ до 9+.

В исследованных образцах регистрировали мембранную (полную или частичную) экспрессию SSTR5 (Epitomics (monoclonal Rb, clone UMB1) была (Таблица 40, Рисунок 36 Ж, З). В одном образце иммунореактивность отсутствовала. Интенсивность реакции была умеренной: количество антиген-позитивных клеток варьировало от 45% до 70%. Максимальный балл при оценке общей иммунореактивности — 9+ (в двух случаях).

В образцах аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ наблюдали частичную мембранную экспрессию SSTR1, которая в трех образцах сочеталась с окрашиванием цитоплазмы части клеток, особенно расположенных в апикальной части железистых структур (Таблица 41, Рисунок 37 В, Г). В одном случае реакция отсутствовала. Интенсивность окрашивания клеток опухоли варьировала, процент антиген-позитивных клеток составил от 17% до 45%. Максимальный балл при оценке общей иммунореактивности – 8+ (в одном случае).

В исследованных образцах преобладала мембранная экспрессия SSTR2 (полная и частичная) высокой или умеренной интенсивности. Количество антиген-позитивных клеток варьировало от 45% до 80%. Максимальный балл при оценке общей иммунореактивности – 12+ (в одном образце), в одном случае

реакция отсутствовала, в остальных оценки варьировали от 6+ до 9+ (Таблица 41, Рисунок 37 Д, Е).

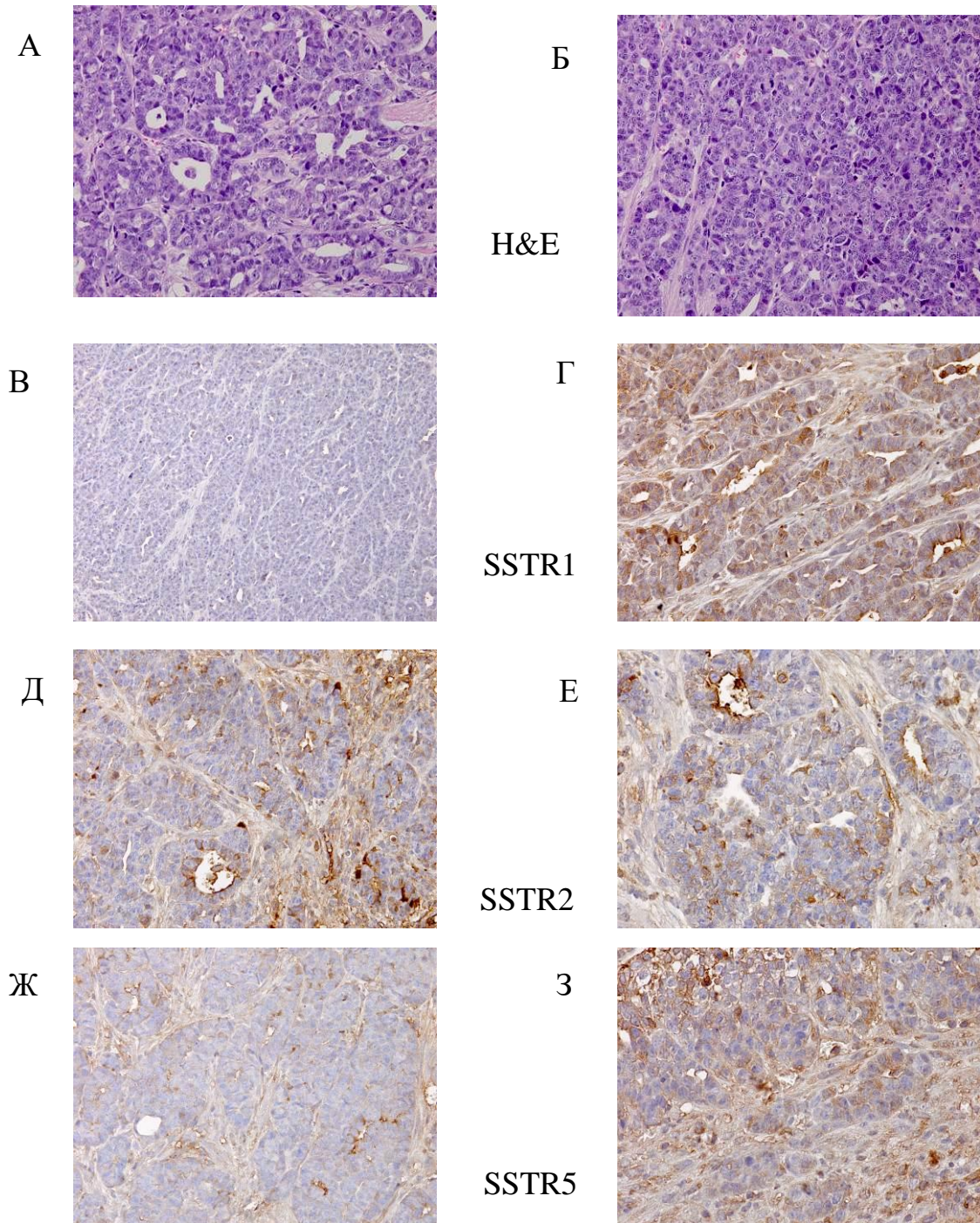
Таблица 41 – Оценка экспрессии SSTR1,2,5 в образцах аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ

Образец	Тип экспрессии	Интенсивность реакции, балл	Антигенпозитивные клетки		Общая оценка, балл
			%	балл	
SSTR1 <sup>1</sup>					
1	—	—	—	—	0
2	В+Г	3	25	1	3+
3	Б+В+Г	2	45	2	4+
4	В	3	29	2	8+
5	В+Г	1	17	1	1+
SSTR2 <sup>2</sup>					
1	Б+В	2	76	4	8+
2	Б+В	3	45	2	9+
3	В	2	70	3	6+
4	—	—	—	—	0
5	Б+В	3	80	4	12+
SSTR5 <sup>2</sup>					
1	Б+В	2	12	1	2+
2	Б+В	3	72	3	9+
3	Б+В	3	53	3	9+
4	—	—	—	—	0
5	—	—	—	—	0

Примечание – <sup>1</sup> Окрашивание с помощью антител Abbiotic (polyclonal, Rb)

<sup>2</sup> Окрашивание с помощью антител Epitomics (monoclonal Rb UMB-1)

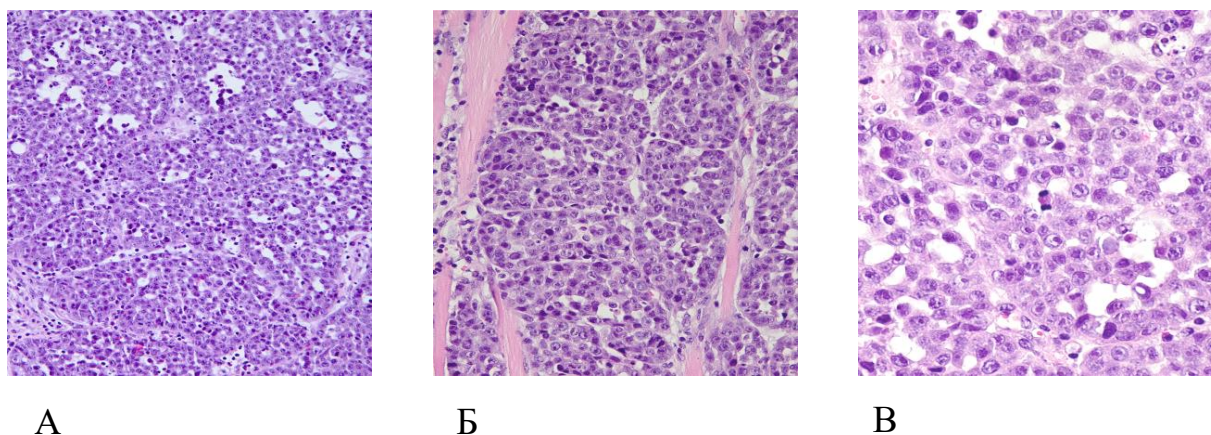
Три образца аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ продемонстрировали полную или частичную экспрессию SSTR5. Интенсивность реакции была высокой или умеренной, процент антиген-позитивных клеток варьировал от 12% до 72%. В двух образцах иммунореактивность отсутствовала. Максимальный балл при оценке общей иммунореактивности – 9+ (2 случая) (Таблица 41, Рисунок 37 Ж, З).



А, Б – образец 1, гематоксилин-эозин (x200); (x400); В, Г – оценка экспрессии SSTR1, образец 1 – окрашивание клеток опухоли отсутствует, оценка 0 (x200); образец 3 – участок выраженного мембранного окрашивания, оценка 8+ (x400); Д, Е – оценка экспрессии SSTR2, образцы 2 и 3 – мембранное окрашивание части клеток опухоли, оценка 6+ (x400; x600); Ж, З – оценка экспрессии SSTR5, образец 1 – слабое частичное окрашивание, оценка 2+ (x400), образец 3 – полное мембранное окрашивание части опухолевых клеток, умеренная интенсивность, оценка 9+(x600). Ядра клеток докрашены гематоксилином Майера

Рисунок 37 – Аденокарцинома толстой кишки АКАТОЛ

Исследование влияния цифетрилина на статус рецепторов к соматостатину проводили на аденокарциноме молочной железы Ca755. При гистологическом исследовании препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, экспериментальная аденокарцинома молочной железы Ca755 представлена солидными и альвеолярными структурами из относительно мономорфных округлых клеток с гиперхромными ядрами, эозинофильной цитоплазмой и высокой митотической активностью (Рисунок 38 А). После окончания введения цифетрилина в опухолях наблюдались обширные участки некрозов и ослабление клеточных контактов (Рисунки 38 Б, В).



А – контрольная группа без лечения – клетки опухоли формируют солидные структуры, имеют округлую форму, гиперхромные ядра и эозинофильную цитоплазму (x100); Б – опытная группа №1 – комплексы опухолевых клеток разделены прослойками фиброзной стромы (x200); В – опытная группа №2 – опухоль состоит их рыхло расположенных клеток, теряющих межклеточные связи (x400). Окраска гематоксилином и эозином

Рисунок 38 – Гистологическое строение аденокарциномы молочной железы Ca755 до и после введения цифетрилина

При ИГХ окрашивании Ca755 антителами к SSTR1–5 иммунореактивность выявлялась в виде полной или частичной мембранной окраски как в опухолях контрольной группы (до лечения), так и в двух опытных группах после введения цифетрилина. Однако интенсивность окраски и количество антиген-позитивных клеток варьировали в исследованных образцах опухолей, полученных до и после введения цифетрилина. Кроме того, выраженность специфической реакции значительно различалась при выявлении различных подтипов SSTR. Внутренним

положительным контролем служило выраженное окрашивание эндотелия сосудов.

Результаты оценки ИГХ реакции, основанной на подсчете фракции клеток с мембранной позитивностью в опухолях контрольной и опытных групп, представлены в Таблице 42.

Таблица 42 – Оценка частоты экспрессии SSTR1–5 в аденокарциноме молочной железы Ca755 до и после введения цифетрилина

Группа	Уровень экспрессии	SSTR, % образцов				
		1	2	3	4	5
Контрольная группа	Высокий (2/3 балла)	50	50	0	0	67
	Низкий (1 балл)	33	33	67	33	16
	Отсутствие реакции (0 баллов)	17	17	33	67	17
Опытная группа №1 <sup>1</sup>	Высокий (2/3 балла)	20	40	0	0	40
	Низкий (1 балл)	40	40	40	40	20
	Отсутствие реакции (0 баллов)	40	20	60	60	40
Опытная группа №2 <sup>2</sup>	Высокий (2/3 балла)	20	40	0	0	40
	Низкий (1 балл)	40	40	40	40	20
	Отсутствие реакции (0 баллов):	40	20	60	60	40

Примечание – <sup>1</sup> На девятый день после перевивки опухоли;

<sup>2</sup> На четырнадцатый день после перевивки опухоли

В 6 образцах опухолей контрольной группы наиболее выраженную ИГХ реакцию (2/3 балла) наблюдали при использовании антител к SSTR5 и SSTR1 – 67% (4/6) и 50% (3/6), соответственно. Уровень иммунореактивности SSTR2 составил 2 балла в 50% (3/6) образцов опухолей. Рецепторы третьего подтипа демонстрировали в образцах Ca755 низкий уровень иммунореактивности: в 67% (4/6) образцов наблюдали экспрессию 1 балл. Самый низкий уровень экспрессии в опухоли демонстрировали SSTR4: в четырех образцах реакция отсутствовала, а в двух образцах составила 1 балл. В большинстве образцов преобладало неполное мембранное окрашивание. Интенсивность реакции была высокой или умеренной, а процент антиген-позитивных клеток варьировал от 15% до 50%.



В 5 образцах опухолей опытной группы №1 после введения цифетрилина уровень экспрессии, равный 3 баллам не наблюдали, наиболее высокий уровень экспрессии составил 2 балла, экспрессия SSTR2 была выявлена в 80 %, а SSTR1 и SSTR5 – в 60% образцов. Как и до лечения, в клетках опухолей преобладала неполная мембранная иммунореактивность. Интенсивность реакции была умеренной и слабой, процент антиген-позитивных клеток варьировал от 10% до 40%.

В 5 образцах опухолей опытной группы №2 после введения цифетрилина (на 14 день после перевивки опухоли) уровень экспрессии, равный 3 баллам, наблюдался в 3 случаях: по одному образцу опухоли к SSTR1, SSTR2 и SSTR 5. В целом, высокий уровень экспрессии, составлявший 2/3 балла, чаще всего демонстрировали рецепторы 2 и 5 подтипов (в 40% образцов). Преобладала частичная мембранная иммунореактивность, интенсивность окрашивания чаще всего была умеренной и наблюдалась в 10% – 30% клеток опухоли.

Частота экспрессии SSTR1–5 различных уровней представлена на диаграмме (Рисунок 39), на которой видно, что снижение частоты положительной экспрессии SSTR2 после введения цифетрилина в обеих опытных группах было незначительным, а для SSTR1 и SSTR5 – выраженным. Для SSTR3 отмечали уменьшение частоты положительной экспрессии после введения цифетрилина и в первой, и во второй группах. Частота встречаемости положительной экспрессии SSTR4 в обеих опытных группах не отличалась и была несколько выше, чем в контрольной группе.

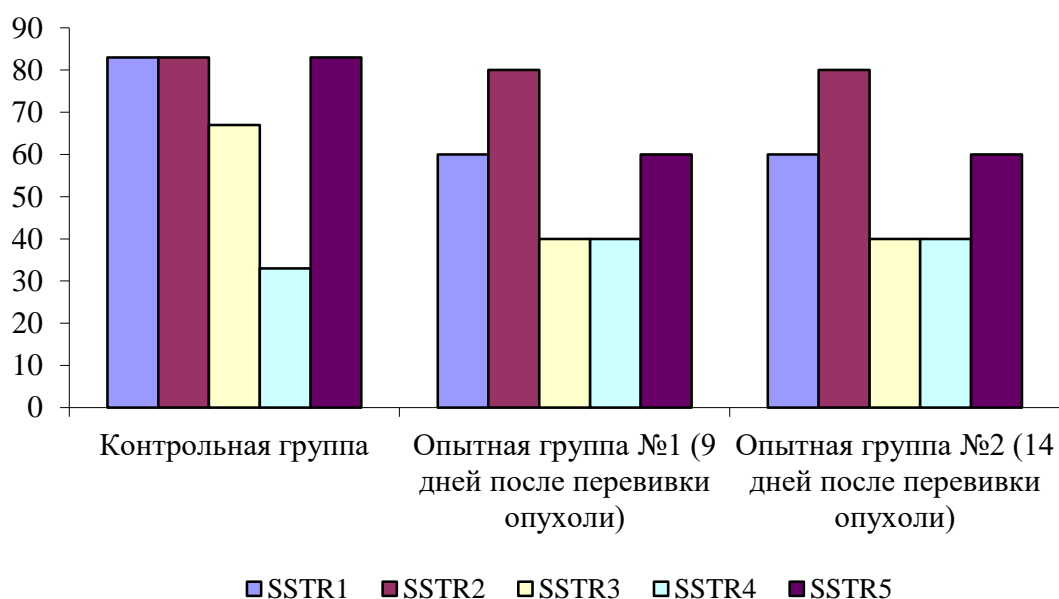
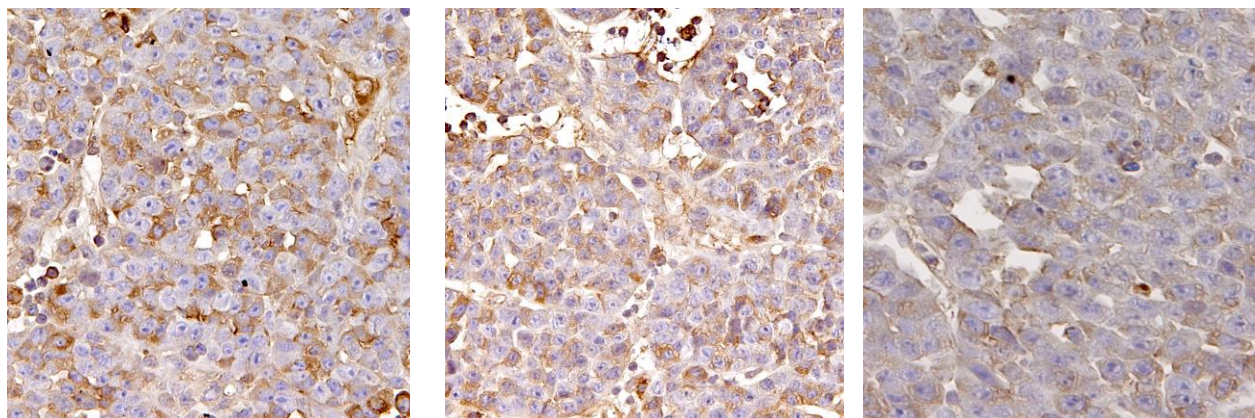


Рисунок 39 – Частота положительной экспрессии SSTR1–5 в аденокарциноме молочной железы Ca755 после введения циметидина

Характер и выраженность позитивной иммунореактивности в клетках аденокарциномы молочной железы Ca755 в контрольной и опытных группах продемонстрированы на Рисунках 40, 41 и 42.

Интенсивность специфической реакции с антителами к SSTR1 уменьшалась в первой и более выражено – во второй опытной группе: если в контрольной группе наблюдали полное интенсивное окрашивание мембран 50% клеток опухоли, то в опытной группе №1 – неполное окрашивание мембран 30% клеток опухоли умеренной интенсивности, а в опытной группе №2 – неполное окрашивание мембран 15% клеток опухоли низкой интенсивности (Рисунок 40).



А

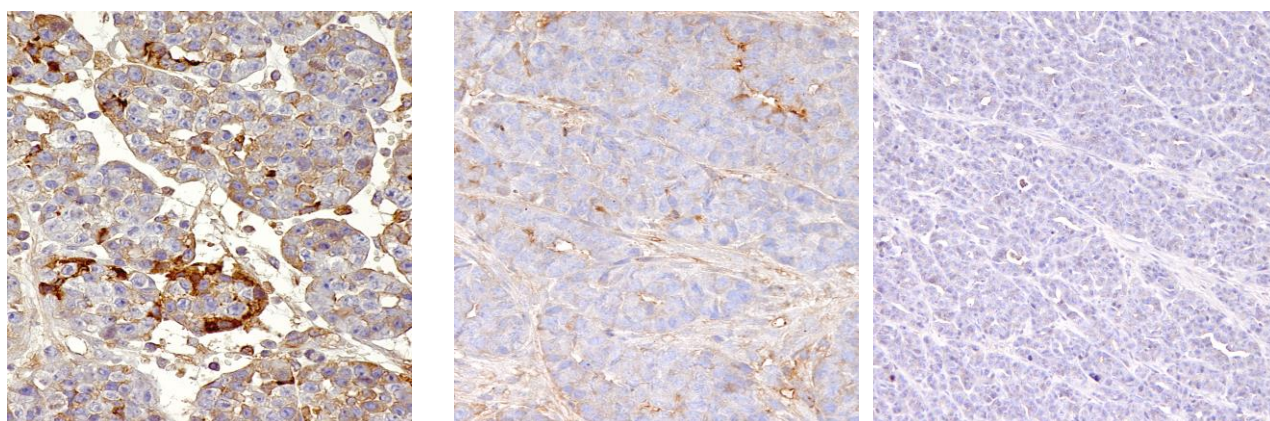
Б

В

А – контрольная группа, уровень экспрессии 3 балла (x200); Б – опытная группа №1, уровень экспрессии 2 балла (x200); В – опытная группа №2, уровень экспрессии 1 балл (x400); ядра клеток докрашены гематоксилином Майера

Рисунок 40 – Иммуногистохимическая оценка экспрессии SSTR1 в клетках аденокарциномы молочной железы Ca755 до и после введения цифетрилина

С помощью антител к SSTR2 в образцах контрольной группы показано полное и частичное окрашивание мембраны 40% клеток опухоли, высокой и умеренной интенсивности, в опытной группе №1 – неполное слабое окрашивание мембран 10% клеток опухоли, а в опытной группе №2 иммунореактивность клеток опухоли отсутствовала (Рисунок 41).



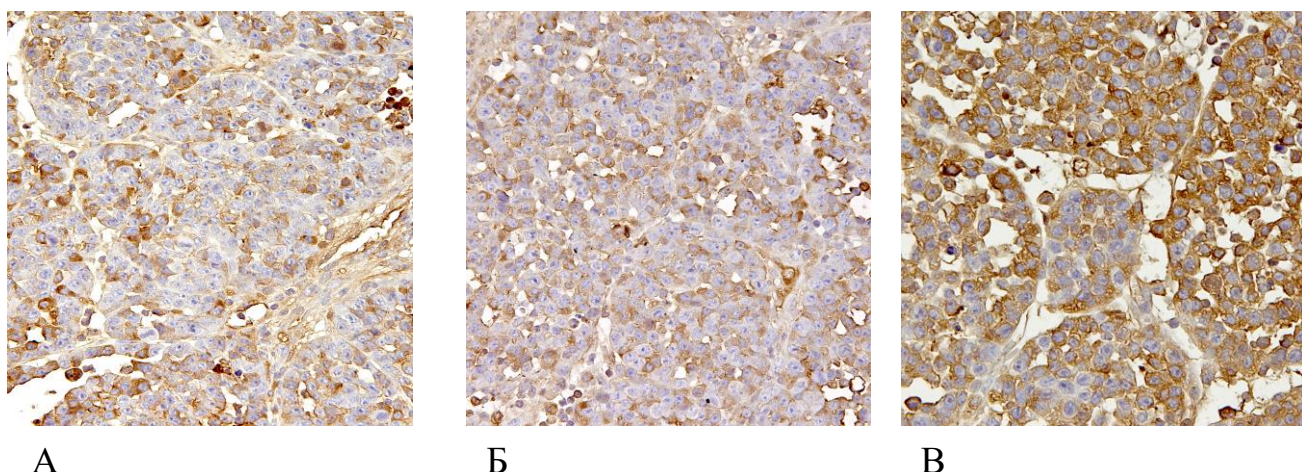
А

Б

В

А – контрольная группа, уровень экспрессии 3 балла (x200); Б – опытная группа №1, уровень экспрессии 1 балл (x200); В – опытная группа №2, уровень экспрессии 0 баллов (x100); ядра клеток докрашены гематоксилином Майера

Рисунок 41 – Иммуногистохимическая оценка экспрессии SSTR2 в клетках аденокарциномы молочной железы Ca755 до и после введения цифетрилина



А – контрольная группа, уровень экспрессии 2 балла (x200); Б – опытная группа №1, уровень экспрессии 2 балла (x200); В – опытная группа №2, уровень экспрессии 3 балла (x200); ядра клеток докрашены гематоксилином Майера

Рисунок 42 – Иммуногистохимическая оценка экспрессии SSTR5 в клетках аденокарциномы молочной железы Ca755 до и после введения цифетрилина

На Рисунке 42 видно, что 25% клеток аденокарциномы молочной железы Ca755 контрольной группы демонстрировали частичное окрашивание мембран умеренной интенсивности при реакции с антителами к SSTR5. Неполное окрашивание мембраны умеренной интенсивности наблюдали в 30% клеток опухоли в опытной группе №1. В опытной группе №2 полное окрашивание мембраны высокой интенсивности регистрировали в 30% клеток опухоли.

Анализ экспрессии SSTR высокого уровня в клетках аденокарциномы молочной железы Ca755 показал, что уровень экспрессии SSTR1 и SSTR2 уменьшался после введения цифетрилина в первой и еще более значительно уменьшался – во второй опытной группах, а уровень SSTR5 значительно увеличивался (Рисунок 43).

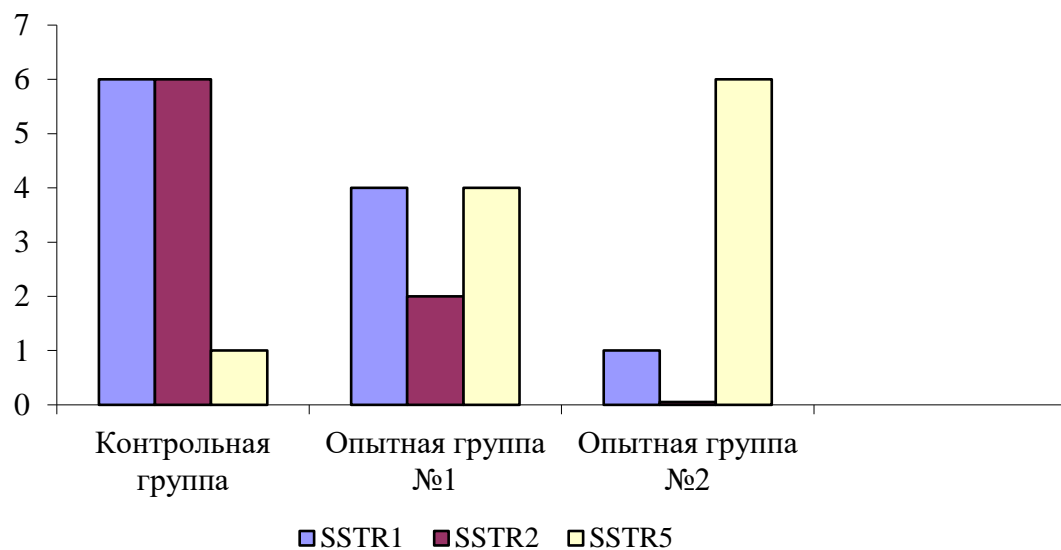


Рисунок 43 – Высокий уровень положительной экспрессии (2/3 балла) SSTR1, 2 и 5 в аденокарциноме молочной железы Ca755 до и после введения циметидина

Экспрессия низкого уровня разных подтипов рецепторов к соматостатину варьировала как до, так и после введения циметидина: наблюдалась реже после введения ЛС в обеих опытных группах для 3 и 5 типов рецепторов, но, напротив, встречалась чаще после введения во второй опытной группе для 1, 2 и 4 типов (Рисунок 44) [355].

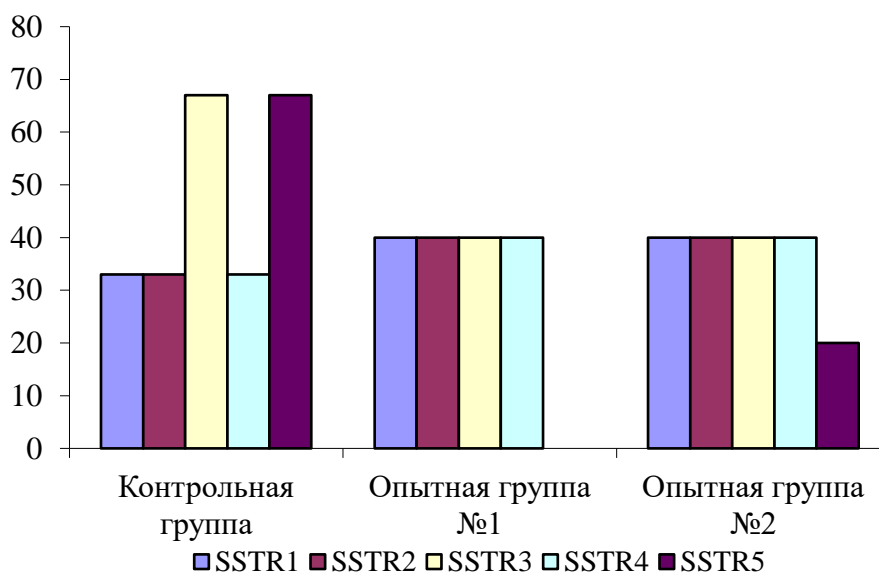


Рисунок 44 – Низкий уровень положительной экспрессии (1 балл) SSTR1–5 в аденокарциноме молочной железы Ca755 до и после введения циметидина

### 6.1.2 Выбор оптимального пути введения лекарственного средства

Выбор оптимального пути введения цифетрилина проводили при внутрибрюшинном, внутривенном и пероральном применении прототипов ЛФ. В исследованиях использовали модель рака шейки матки РШМ5 (ГЛАВА 2, 2.3.5 Методы, использованные в исследованиях на лабораторных животных). ТРО, % и УПЖ, % рассчитывали по формулам (4) и (5), соответственно [7; 95; 96; 124; 134].

Цифетрилин в высокодисперсной эмульсии при в/б ведении демонстрировал умеренный противоопухолевый эффект – только в дозе 50 мг/кг ТРО, непосредственно после окончания введения ЛС, превысило 60%. Результат сохранялся в течение 8–9 дней. Продолжительность жизни экспериментальных мышей при этом увеличивалась незначительно по сравнению с контрольными животными (УПЖ = 9%) (Таблица 43).

Таблица 43 – Противоопухолевая активность прототипов лекарственных форм цифетрилина при ежедневном введении в течение 5-ти дней на РШМ5

Группа	Доза, мг/кг	Путь введения	ТРО,%					УПЖ,%
			дни после окончания лечения					
			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	5
Липосомы	40	внутривенно	68 <sup>1</sup>	45 <sup>1</sup>	56 <sup>1</sup>	45	47	0
	20	так же	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	так же	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

ТРО липосомального цифетрина в течение недели наблюдения снижалось от 68% и 70% до 45% и 39%, соответственно. Продолжительность жизни лабораторных животных при этом не увеличивалась [124].

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 [103]. 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.

Таким образом, установлено, что наиболее эффективной является суспензия цифетрилина в крахмальном клейстере при пероральном введении.

## **6.2 Разработка технологии получения таблеток цифетрилина**

### **6.2.1 Изучение фармацевтико-технологических свойств цифетрилина**

Выбор технологии получения таблеток определяется, прежде всего, характеристиками активной фармацевтической субстанции, которые определяют использование конкретных видов прессования и необходимость введения ВВ в смесь для прессования [186; 213].

Фармацевтико-технологические характеристики цифетрилина, определенные по методикам, указанным в *ГЛАВЕ 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ*, приведены в Таблице 44.

Таблица 44 – Фармацевтико-технологические характеристики фармацевтической субстанции цифетрилин

Характеристика	Результат		
Химические свойства			
Растворимость	Мало растворим в спирте этиловом 95%, практически нерастворим в воде		
Смачиваемость	Полностью не смачивается		
Гигроскопичность	Негигроскопичен		
Технологические свойства			
Фракционный состав (размер частиц), %	Размер, мм		
	0,1 мм и менее	0,1 – 0,25 мм	Более 0,25 мм
	86	4	10
Форма частиц	Круглые	Игольчатые кристаллы	Шарообразные конгломераты
Насыпная плотность (без уплотнения) <sup>1</sup>	0,090 ± 0,010 г/мл		
Сыпучесть <sup>1</sup>	0,10 ± 0,02 г/с		
Вода, % <sup>1</sup>	0,63 ± 0,01 (по методу К. Фишера)		

Примечание – <sup>1</sup>Среднее значение из трех определений

Данные, представленные в Таблице 44, свидетельствуют о том, что:

– цифетрилин является полидисперсным порошком – частицы различаются как по размеру, так и по форме: бóльшую часть (около 90%) составляет фракция с размером частиц менее 0,25 мм; по форме можно выделить круглые частицы (размером 0,1 мм и менее), игольчатые кристаллы (размером 0,1–0,25 мм) и крупные шарообразные конгломераты размером более 0,25 мм, которые, по всей видимости, образуются ввиду электризации субстанции — в состав необходимо введение более крупных частиц [411];

– цифетрилин относится к группе полностью не смачиваемых веществ – необходимо введение ингредиентов, улучшающих распадаемость таблетки и снижающих адгезию к пресс-инструменту.

Поскольку порошок цифетрилина содержит, в основном, мелкую фракцию и обладает низкой сыпучестью (Таблица 44), для улучшения сыпучести и предотвращения расслоения массы для таблетирования, повышения точности дозирования и прочности таблеток фракцию укрупненных и утяжеленных частиц



необходимо увеличить. Это может быть достигнуто созданием смеси, содержащей более крупные и тяжелые частицы или гранулированием [353; 354].

Так как доза цифетрилина в таблетке должна составлять всего 6 мг (6.2 *Выбор оптимального пути введения лекарственного средства*), для точного введения АФС в таблетку необходимо введение разбавителей.

Таким образом, для получения таблеток цифетрилина надлежащего качества в массу для прессования необходимо введение ВВ, обеспечивающих точность дозирования АФС, стабильность технологического процесса (повышающих сыпучесть, равномерность заполнения матричного канала, уменьшающих адгезию к пресс-инструменту и др.) и качество готовых таблеток (распадаемость, твердость, растворение) [192; 278].

### **6.2.2 Выбор вспомогательных веществ для получения таблеток цифетрилина**

При разработке оригинальных составов использовали не готовые прописи, а составленные композиции вспомогательных веществ, которые можно было варьировать – уменьшением, увеличением количества или заменой какой-либо составляющей.

В качестве ВВ для получения таблеток 6 мг цифетрилина использовали:

- лактозы моногидрат, обеспечивающий хорошую прессуемость и смешиваемость [160];
- микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) для улучшения сыпучих свойств гранулята, его однородности и распадаемости таблеток [291];
- повидон, позволяющий получить таблетки удовлетворительной прочности и, с другой стороны, повышающий биодоступность АФС [9];
- крахмал как разрыхлитель, для улучшения распадаемости таблеток [12; 172].

Чтобы исключить залипание гранул при дозировании использовали опудривающую смесь, состоящую из картофельного крахмала, стеарата магния и талька. Поскольку содержание цифетрилина в таблетке чрезвычайно мало, способ

его введения не будет оказывать существенного влияния на технологические характеристики массы для прессования, ход технологического процесса и качество готовых таблеток. Исходя из этого, на первом этапе разрабатывали состав таблеток, осуществляя прямое ручное прессование без введения АФС. Составы некоторых исследованных модельных смесей для прессования (МС) представлены в Таблице 45.

Данные, представленные в Таблице 45, свидетельствуют о том, что все МС обладали низкой насыпной плотностью. Кроме того, все МС расслаивались при прессовании. Для увеличения насыпной плотности массы для прессования и прочности таблеток применили влажное гранулирование.

Таблица 45 – Составы модельных смесей для прямого прессования и их фармацевтико-технологические характеристики

Ингредиенты, мг/таблетка	Модельная смесь для прессования			
	1	2	3	4
Лактозы моногидрат	150	–	–	–
МКЦ	–	150	–	–
Крахмал	100	50	100	50
Повидон	–	–	100	150
Опудривающая смесь <sup>1</sup>	50	50	50	50
Насыпная плотность (без уплотнения), г/мл	0,393±0,002	0,284±0,002	0,468±0,005	0,331±0,005
Сыпучесть, г/с	3,68±0,04	2,36±0,08	4,79±0,09	6,74±0,03

Примечания – <sup>1</sup>Опудривающая смесь (состав на одну таблетку): крахмал – 0,03 г, стеарат магния – 0,005 г, тальк – 0,015 г

### ***Методика получения модели лекарственной формы цифетрилина методом прямого прессования***

Рассчитанное количество картофельного крахмала, необходимое для получения 20 таблеток, помещают в реактор и растирают. Затем в реактор помещают цифетрилин (с учетом количественного содержания АВ и влаги), растирают и тщательно перемешивают. Постепенно добавляют остальные ВВ и тщательно перемешивают до получения однородной массы. Массу обрабатывают опудривающей смесью и просеивают для удаления излишка опудривающей

смеси. Полученную массу прессуют на эксцентриковом однопуансонном таблеточном прессе по 100 мг.

### 6.2.3 Изучение возможности использования метода влажного гранулирования для получения таблеток цифетрилина

Гранулирование широко применяется для улучшения технологических свойств фармацевтических порошков, поскольку позволяет уменьшить расслоение порошка, улучшить сыпучесть и прессуемость смеси АВ и ВВ и уменьшить пылеобразование [347]. Самые распространенные разбавители, используемые при гранулировании – лактоза и микрокристаллическая целлюлоза, в качестве связующих чаще всего используются крахмал и повидоны [317; 412].

Поскольку цифетрилин нерастворим в воде, а смесь цифетрилина с ВВ хорошо смачивается водой, в качестве гранулирующего агента исследовали 1%-ый и 2%-ый раствор повидона (МС1–2 и МС3–4, соответственно) и 5%-ый крахмальный клейстер (МС5–7).

Модели ЛФ с различным соотношением ВВ получали по методике, описанной ниже, применяя ручное (МС1–7) и/или автоматическое прессование (МС7–11). Содержание цифетрилина в каждой таблетке составляло 6 мг. Составы МС представлены в Таблице 46.

Таблица 46 – Модельные смеси

Ингредиент, мг/таб	Модельная смесь										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Цифетрилин	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Лактоза	50	30	35	45	50	50	55	60	60	55	55
МКЦ	25	35	15	20	15	10	10	10	5	10	5
Крахмал	10	20	35	25	25	30	25	25	25	20	25
Повидон										10	5
Опудривающая смесь <sup>1</sup>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Примечание – <sup>1</sup> Опудривающая смесь: крахмал, стеарат магния и тальк

***Методика получения модели лекарственной формы цифетрилина методом влажного гранулирования***

Рассчитанное количество крахмала картофельного, необходимое для получения 20 таблеток, помещают в реактор и растирают. Затем в реактор помещают цифетрилин (с учетом количественного содержания АВ и влаги), растирают и тщательно перемешивают, постепенно добавляя остальные ВВ. Увлажняют 5%-ым крахмальным клейстером или 1%-ым или 2%-ым раствором повидона, гранулируют (диаметр отверстия сита 0,67 мм) и сушат в течение 24 часов на воздухе при комнатной температуре [353; 354]. Затем гранулят обрабатывают опудривающей смесью. Полученную массу прессуют на однопуансонном эксцентриковом таблеточном прессе Egweka (Германия) по 100 мг.

Изученные МС1–7 продемонстрировали удовлетворительную сыпучесть и насыпную плотность, хорошо спрессовались и позволили получить таблетки.

Лучшими технологическими характеристиками (необходимая сыпучесть ( $6,43 \pm 0,03$  г/с), насыпная плотность ( $0,49 \pm 0,01$  г/мл) и угол естественного откоса ( $40,8 \pm 1,1^\circ$ )) обладала МС7, полученная с использованием 5%-ого крахмального клейстера.

Полученные экспериментальные образцы таблеток оценивали в соответствии с требованиями [27] по следующим фармацевтико-технологическим параметрам:

- внешний вид (поверхность таблеток, наличие повреждений и деформаций, сколов и расслаивания) [27, 353, 354];
- прочность на раздавливание (не менее 30 Н);
- истираемость (не более 1%);
- распадаемость (не более 15 мин);
- средняя масса таблетки и однородность массы (от 95 до 116 мг;  $\pm 7,5\%$ ) (Таблица 47).

Таблица 47 – Фармацевтико-технологические характеристики таблеток цифетрилина (МС1–11)

МС	Описание	Прочность на раздавливание, Н	Истираемость, %	Распадаемость, мин	Средняя масса таблетки, мг	Однородность массы, %
1	Таблетки белого цвета с глянцевой поверхностью и ровными, без сколов краями	10,79 ± 0,28	0,91	8	98,62 ± 7,28	5,48
2	Таблетки с неравномерным окрашиванием поверхности с ровными, без сколов краями	7,32 ± 0,43	1,20	3	107,89 ± 9,31	7,12
3	То же	8,99 ± 0,37	1,15	6	103,46 ± 6,44	6,49
4	Таблетки белого цвета с глянцевой поверхностью и ровными, без сколов краями	17,76 ± 0,11	0,83	14	94,67 ± 8,89	6,32
5	То же	14,40 ± 0,29	0,99	9	102,38 ± 7,96	5,67
6	- « -	15,04 ± 0,59	1,08	11	100,31 ± 4,96	7,29
7	- « -	19,60 ± 0,15	0,98	9	106,99 ± 10,16	4,67
8	- « -	14,76 ± 0,18	0,94	8	112,43 ± 7,92	6,39
9	Таблетки с неравномерным окрашиванием поверхности с ровными, без сколов краями	7,50 ± 0,64	1,12	3	101,49 ± 9,42	5,08
10	Таблетки белого цвета с глянцевой поверхностью и ровными, без сколов краями	24,81 ± 0,21	0,96	12	98,32 ± 6,29	6,75
11	Таблетки белого цвета с глянцевой поверхностью и ровными, без сколов краями	38,32 ± 0,12	0,93	9,3	102,39 ± 6,71	5,86

Внешний вид таблетки и однородность массы – простейшие и наиболее однозначные показатели соблюдения технологии получения таблеток. Из данных, представленных в Таблице 47, видно, что большинство полученных образцов представляли собой круглые двояковыпуклые таблетки диаметром около 6 мм с ровными, без сколов краями, белого цвета с глянцевой поверхностью. Поверхность таблеток, полученных прессованием МС2, МС3 и МС9 была окрашена неравномерно (наблюдали мраморность).

Определение однородности массы показало, что отклонение массы от средней таблеток всех составов не превышало  $\pm 7,5\%$  (Таблица 47), что соответствует требованиям, установленным ГФ XIV [27].

Механические характеристики таблеток обеспечивают их потребительские свойства и стабильность в процессе производства и использования. Результаты, полученные в тесте «Прочность на раздавливание», находились в пределах от 7,32 до 38,32 Н. Только таблетки, полученные прессованием МС11, соответствовали требованиям ГФ XIV, предъявляемым к таблеткам диаметром 6 мм (не менее 30 Н).

Все образцы выдерживали тест на распадаемость (время дезинтеграции таблеток составляло не более 15 мин): таблетки составов МС4, МС6 и МС10 распадались в течение времени, близкого к предельному, МС2 и МС9 – в течение значительно более короткого времени.

Результаты теста «Истираемость» оказались неудовлетворительными для таблеток составов МС2, МС3, МС6 и МС9 (более 1%). Результаты исследования других образцов укладывались в нормы, определенные ГФ XIV, что свидетельствует об удовлетворительной механической устойчивости разрабатываемых таблеток.

Данные, представленные в Таблице 47, свидетельствуют о том, что введение в состав МС пovidона (МС10 и МС11) привело к повышению прочности получаемых таблеток на раздавливание. Оптимального соотношения технологических характеристик массы для прессования и свойств получаемых из нее таблеток удалось добиться для МС11 (Таблица 47 и Таблица 48).

Таблица 48 – Фармацевтико-технологические характеристики МС11 и полученных из нее таблеток

МС11			Таблетки (МС11)	
Насыпная плотность, г/мл	Сыпучесть, г/с	Угол естественного откоса <sup>1</sup> , °	Распадаемость <sup>2</sup> , мин	Прочность на раздавливание, Н
0,65 ± 0,02	7,52 ± 0,05	34,7 ± 1,2	9,3 ± 1,2	38,3 ± 0,12

Примечание – <sup>1</sup>Среднее значение, n=3; <sup>2</sup>среднее значение, n=6; ±SN

Выбранный состав таблеток цифетрилина представлен в Таблице 49 [353].

Таблица 49 – Состав таблеток цифетрилина

Ингредиент	Спецификация	Назначение	Количество, мг/таблетка
Цифетрилин	ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»	Активное вещество	6
Вспомогательные вещества			
Лактоза моногидрат	Ph.Eur. действующего издания	ВВ – улучшение прессуемости и смешиваемости	55
Целлюлоза микрокристаллическая	Ph.Eur. действующего издания	ВВ – улучшение сыпучих свойств и однородности гранулята и распадаемости таблеток	5
Крахмал картофельный	Ph.Eur. действующего издания	ВВ – разрыхлитель	25
Повидон	Ph.Eur. действующего издания	ВВ -улучшение прочности и биодоступности цифетрилина	5
Опудривающая смесь: тальк – 30%; стеарат магния –10%; крахмал картофельный – 60%	Все – Ph.Eur. действующего издания	Опудривающая смесь	10

### 6.3 Применение концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD) при разработке лекарственного средства цифетрилин

QTPP и CQAs для таблеток цифетрилина 6 мг, сформулированные междисциплинарной комиссией (ГЛАВА 2, 2.4 Основные элементы концепции Качество путем разработки (Quality by Design, QbD)), приведены в Таблицах 50 и 51, соответственно [354].

Таблица 50 – Целевой профиль качества (QTPP) лекарственного средства цифетрилин таблетки 6 мг

Элементы QTPP	Целевой показатель
Целевое назначение	Лечение НЭО различной локализации
Целевая популяция	Пациенты с гистологически и иммуногистохимически подтвержденным диагнозом НЭО
Лекарственная форма	Таблетки
Путь введения	Для приема внутрь
Дозировка	6 мг
Микробиологическая чистота	Должен соответствовать требованиям ГФ XIV
Стабильность	Не менее 2 лет при температуре от 2 до 8°C в сухом, защищенном от света месте
Упаковка	В банки пластиковые из полиэтилена высокой плотности, укупороенные навинчиваемыми пластиковыми крышками или в блистерную упаковку из фольги алюминиевой и плёнки ПВХ

Анализ влияния каждого критичного показателя на качество и эффективность ЛС (оценка критичности) проведен методом экспертного опроса, как описано в ГЛАВЕ 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ, Таблица 6. Очевидно, что при разработке оригинального ЛС опирались исключительно на литературные данные и результаты собственных исследований [48; 124], то есть степень критичности каждого показателя является чрезвычайно высокой. И решающим при оценке критичности каждого показателя качества было мнение врача-онколога, основанное на большом опыте работы с ЛП – аналогами соматостатина.

Из данных, представленных в Таблице 51, видно, что критичные показатели, оказывающие влияние на безопасность и эффективность таблеток цифетрилина, характерны для данного типа ЛФ [27, 197]. А наиболее критичными



критериями качества таблеток цифетрилина являются количественное определение и однородность дозирования, что связано, прежде всего, с чрезвычайно малым содержанием АВ в таблетке.

Таблица 51 – Критичные показатели качества (CQAs) лекарственного средства цифетрилин таблетки 6 мг и их относительная критичность

Показатель качества (Quality attribute, QA)	Норма	CQA?	Относительная критичность, балл <sup>1</sup>		
			степень влияния	вероятность отклонения	всего
Описание (внешний вид)	Круглые двояковыпуклые таблетки белого цвета	Нет	–	–	–
Подлинность	Положительная для цифетрилина	Да	1	3	3
Распадаемость	Не более 15 минут	Да	9	3	27
Родственные примеси	Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,0%, сумма примесей – не более 3,0%	Да	3	3	9
Однородность дозирования	Должен соответствовать требованиям	Да	12	3	36
Микробиологическая чистота	Должен соответствовать требованиям	Да	9	3	27
Количественное определение	От 5,40 до 6,60 мг	Да	12	3	36

Примечание – <sup>1</sup>Относительную критичность показателя качества рассчитывали как произведение оценок [степень влияния x вероятность отклонения]

Показатель «Подлинность», безусловно, является наиболее значимым показателем для эффективности и безопасности любого ЛС, однако мы не определили данный показатель как критичный, поскольку, во-первых, он не подвергается воздействию какого-либо технологического процесса, и, во-вторых, вероятность события (выпуск таблеток без АФС или с заменой АФС) чрезвычайно низка.

Как указано в Таблице 38 и [132], цифетрилин гидролитически и термически устойчив. В процессе фармацевтической разработки и при

исследовании стабильности таблеток цифетрилина показано, что профиль примесей не изменяется в процессе получения таблеток цифетрилина и при их хранении – дополнительные пики в пробах образцов не появляются и существующие пики не исчезают (*ГЛАВА 7, 7.2 Изучение условий хранения и стабильности таблеток цифетрилина 6 мг*). Анализ УФ-спектров АФС, ВВ и модельных смесей АФС и ВВ также подтверждает отсутствие взаимодействия между АФС и ВВ – положение максимумов поглощения и интенсивность поглощения не изменялись (*ГЛАВА 7, 7.2 Изучение условий хранения и стабильности таблеток цифетрилина 6 мг*). Таким образом, показатель «Родственные примеси» (родственные соединения и продукты взаимодействия АФС-ВВ) имеет низкий риск воздействия на эффективность и безопасность ЛС. При этом следует учитывать, что примеси в АФС и ВВ контролируются в соответствии со спецификацией при входном контроле.

### **6.3.1 Технологический процесс получения таблеток цифетрилина**

Технологический процесс получения таблеток цифетрилина является типичным для производства таблеток и включает следующие основные стадии [144; 353; 354]:

1. Стадии ВР, включающие подготовку воздуха, воды, помещений и оборудования и персонала, а также подготовку сырья. На этой стадии готовят 5% крахмальный клейстер, используемый в качестве гранулирующего раствора. Опудривающую смесь получают при тщательном перемешивании картофельного крахмала, талька и стеарата магния.

2. Основные стадии ТП. В реактор последовательно помещают навески лактозы моногидрата, крахмала картофельного, целлюлозы микрокристаллической, повидона и цифетрилина, компоненты тщательно перемешивают.

К смеси компонентов таблетки постепенно добавляют гранулирующий агент и тщательно перемешивают до получения однородной массы. Затем смесь

протирают через металлическую сетку с размером ячеек 1,0 мм. Полученный гранулят помещают на поддон и высушивают при температуре  $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$  в затемненном месте в течение 24 часов, после высушивания гранулы повторно протирают через сито и помещают в сборник.

В полученный гранулят добавляют опудривающую смесь и тщательно перемешивают.

При использовании ротогранулятора (*ГЛАВА 2, 2.2 Оборудование*) для смешивания компонентов сырье загружают в ротогранулятор, включают смеситель (скорость 70-100 об/мин) и перемешивают компоненты в течение 2–5 мин. Затем в гранулятор подают крахмальный клейстер, увеличивая температуру в камере ротогранулятора до  $70\text{--}80^\circ\text{C}$ . Сушку гранулята проводят в течение 20–30 мин. Внутреннее сухое измельчение позволяет получить гранулы, готовые к передаче на стадию прессования (таблетирования).

Прессование гранулята проводят на восьмимипуансонном прессе Erweka TRD8; полученные таблетки обеспыливают на ручных ситах или на таблеточном пылеочистителе (обеспыливателе).

На стадии УМО таблетки цифетрилина упаковывают в банки пластиковые цилиндрической формы из полиэтилена высокой плотности вместимостью 20 мл с горловиной с винтовой резьбой, укупоренные навинчиваемыми пластиковыми крышками, или в блистерную упаковку из фольги алюминиевой, закрытую пленкой ПВХ. Блок-схема технологического процесса производства таблеток цифетрилина приведена на Рисунке 45.

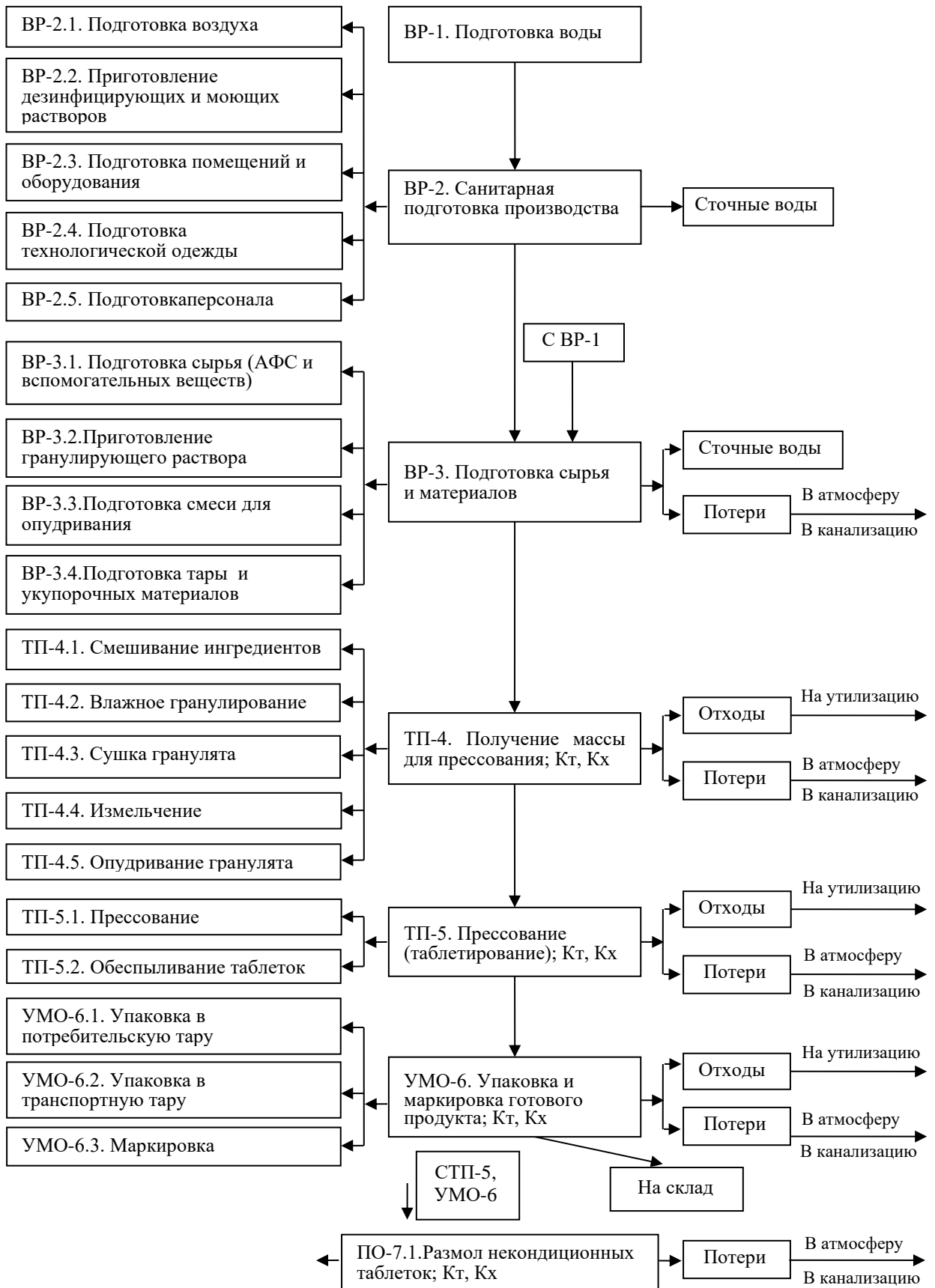


Рисунок 45– Блок-схема технологического процесса получения таблеток цифетрилина 6 мг

На Рисунке 46 продемонстрирована связь между отдельными операциями ТП получения таблеток цифетрилина и критичными показателями качества полупродуктов стадий технологического процесса и готового продукта.



Рисунок 46 – Связь между операциями технологического процесса получения таблеток цифетрилина и критичными показателями качества

Для определения воздействия отдельных операций ТП на критичные показатели качества готового продукта и определения высокорисковых операций провели оценку рисков всех стадий производства ЛПП методом матрицы анализа и снижения рисков The Risk Analysis and Mitigation Matrix – RAMM (ГЛАВА 2 2.6 Метод матрицы анализа и снижения рисков) [6; 106; 398].

Результаты предварительной количественной оценки влияния основных стадий ТП получения таблеток цифетрилина на критичные показатели качества ЛС представлены в виде матрицы в Таблице 52.

Таблица 52 – Предварительная оценка рисков процесса получения таблеток цифетрилина 6 мг

Критичный показатель качества (CQA)	Производственный процесс				Итого 1 <sup>3</sup>
	Баллы <sup>1</sup>	Получение массы для прессования <sup>2</sup>	Прессование	Упаковка/ маркировка	
Описание (внешний вид)	3	3	3	1	21
Подлинность	3	1	1	1	9
Родственные примеси	9	1	1	1	27
Распадаемость	27	3	9	1	351
Однородность дозирования	36	9	9	1	684
Количественное определение	36	3	9	1	468
Микробиологическая чистота	27	9	1	3	351
<b>Итого 2<sup>3</sup></b>	141	<b>29</b>	<b>33</b>	<b>9</b>	

Примечания – <sup>1</sup>Баллы – критичность (см. Таблицу 51)

<sup>2</sup>Включает смешивание, влажное гранулирование, высушивание гранулята, измельчение гранулята и опудривание (Рисунок 35)

<sup>3</sup>Итого 1 – (критичность) x (сумма оценок каждого процесса); итого 2 – сумма оценок процесса

Из данных, представленных в Таблице 52, видно, что наиболее критичными являются основные стадии ТП получения таблеток – получение массы для прессования и прессование (таблетирование).

Взаимосвязь между QTTP, CQA стадий ТП и CQAs ЛС представлена на Рисунке 47 в виде диаграммы Ишикавы.

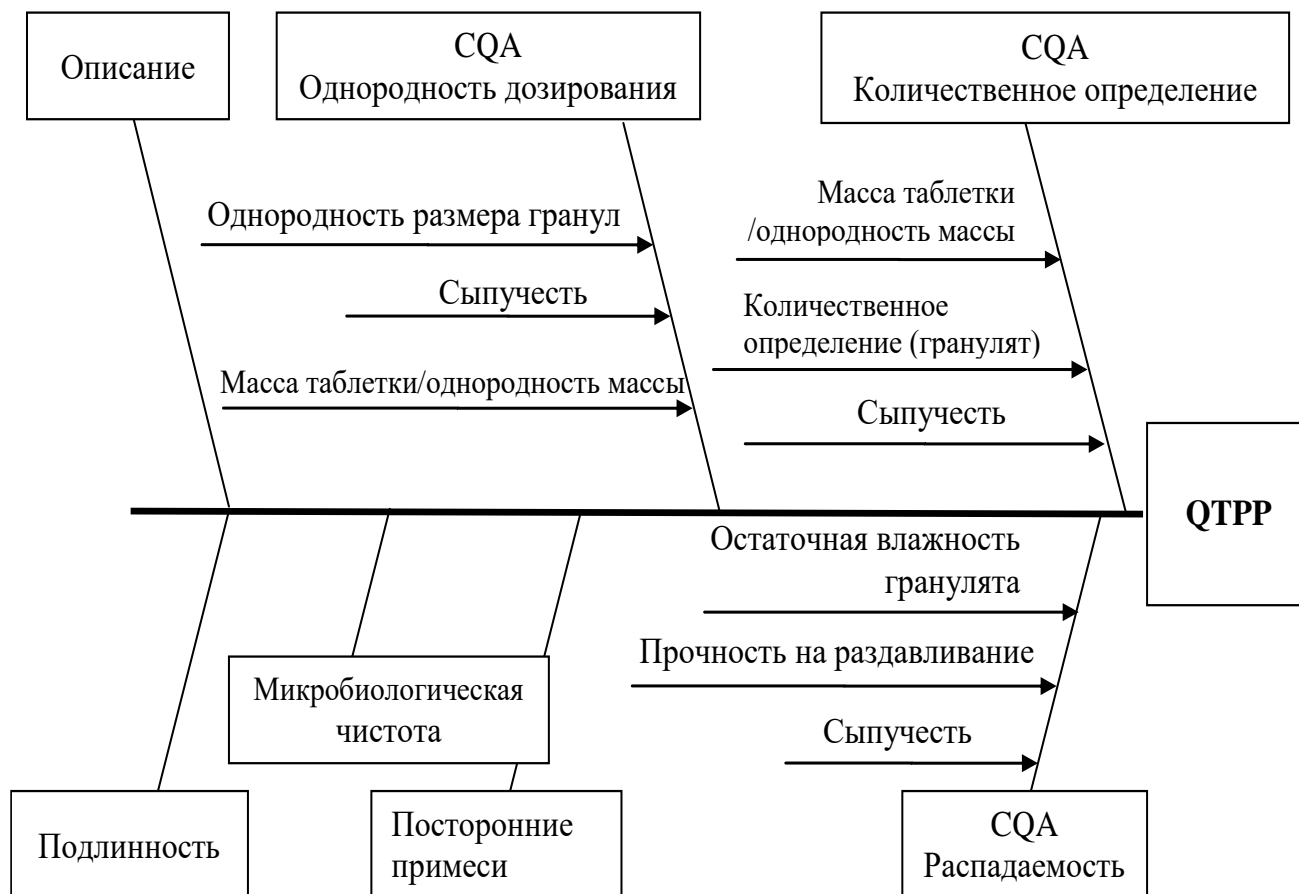


Рисунок 47 – Взаимосвязь между QTPP, CQA стадий технологического процесса и CQAs готового продукта [354]

Влияние остаточной влажности гранулята на процесс прессования и качество получаемых при этом таблеток хорошо известно: повышение остаточной влажности массы для прессования снижает ее сыпучесть, а при незначительном содержании влаги в прессуемой массе уменьшается сцепление между отдельными частицами, что приводит к уменьшению прочности таблеток [272; 299; 337].

Данные, представленные в Таблице 53, свидетельствуют о том, что повышение остаточной влажности МС11 выше 4,0% приводит к потере сыпучести гранулята и его залипанию на пуансонах. При этом прочность на раздавливание таблеток, полученных из такого гранулята, незначительно повышается, а истираемость практически не изменяется.

Таблица 53 – Влияние остаточной влажности гранулята на его сыпучесть и фармацевтико-технологические характеристики таблеток цифетрилина

Остаточная влажность гранулята, %	Сыпучесть <sup>1</sup> , г/с	Истираемость, %	Прочность, Н	Распадаемость, мин
4,21 ± 0,92	3,23 ± 0,29	97,2 ± 0,8	44 ± 3,25	14 ± 2
3,87 ± 0,56	6,23 ± 0,33	99,5 ± 0,4	39 ± 5,11	9 ± 1
2,78 ± 0,68	6,48 ± 0,24	99,3 ± 0,2	36 ± 7,52	9 ± 3
1,91 ± 0,48	6,24 ± 0,18	99,2 ± 0,2	34 ± 6,21	13 ± 4
1,59 ± 0,32	6,38 ± 0,19	99,7 ± 0,2	34 ± 3,25	14 ± 3

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

#### 6.4 Валидация технологического процесса получения таблеток цифетрилина

Валидацию ТП процесса производства таблеток цифетрилина проводили для документированного подтверждения того, что процесс соответствует технологическому регламенту, воспроизводится на производственном участке и позволяет получить ожидаемый результат.

Таблетки (три идущие подряд серии 011114, 021114 и 031214) получали в соответствии с разработанным опытно-промышленным регламентом ОПР 01897624-06-14 (Приложение Г). Параметры качества массы для прессования и таблеток контролировали методами, описанными в ГФ XIV, и с помощью специально разработанных и валидированных аналитических методик (*ГЛАВА 7, 7.1 Количественное определение цифетрилина в таблетках. Разработка и валидация методики*).

В Таблице 54 приведены контрольные точки ТП и их допустимые пределы в соответствии с ОПР.

Оценку возможностей стабильного процесса проводили, рассчитывая индексы воспроизводимости процессов  $C_p$  и  $C_{pk}$  по формулам (2) и (3), соответственно (*ГЛАВА 2, 2.5 Определение индексов воспроизводимости процессов*) [24].



Таблица 54 – Контрольные точки технологического процесса производства таблеток цифетрилина и допустимые пределы контролируемых параметров

Стадия технологического процесса	Контролируемый параметр	Норма
ТП-4. Получение массы для прессования	Размер гранул, мм	Не более 1
	Остаточная влажность гранулята, %	Не более 4,0
	Сыпучесть, г/с	Не менее 6,00
	Количественное определение (цифетрилин, мг/г)	От 54,0 до 66,0
ТП-5. Прессование	Внешний вид	Круглые двояковыпуклые таблетки белого цвета
	Прочность на раздавливание, Н	Не менее 30
	Средняя масса таблетки, мг; однородность массы, %	От 95 до 116; $\pm 7,5$

На гистограмме (Рисунок 48) видно, что средняя масса таблеток цифетрилина составляет от 103 мг до 112 мг и находится в пределах трех стандартных отклонений относительно среднего значения, равного 107,1 мг. Рассчитанные индексы воспроизводимости процесса  $C_p$  и  $C_{pk}$  (ГЛАВА 2, 2.5 *Определение индексов воспроизводимости процессов*), составляют 1,25 и 1,12, соответственно.

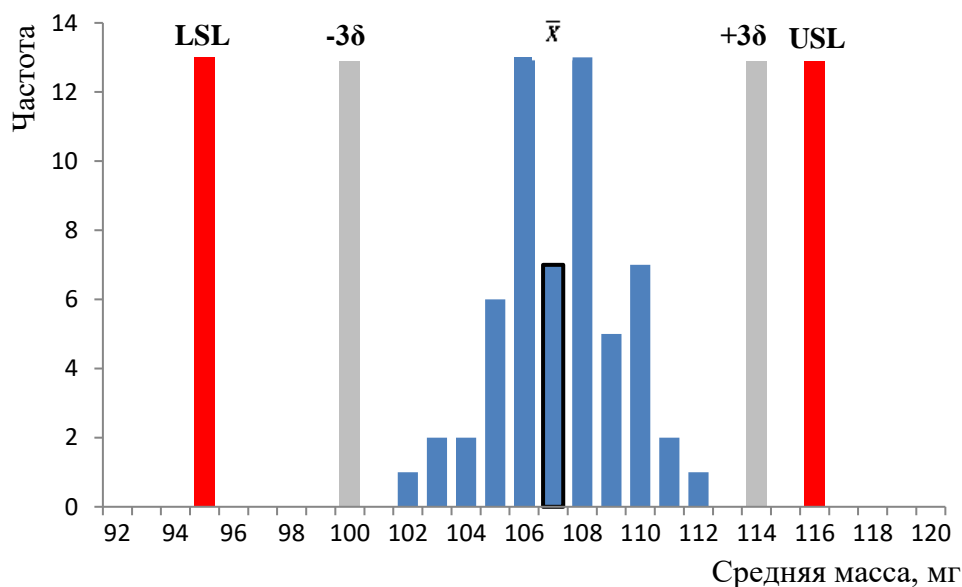


Рисунок 48 – Распределение таблеток цифетрилина по массе

Количественное содержание цифетрилина в 1 г гранулята (Рисунок 49) укладывается в диапазон от 54 мг до 66 мг. На гистограмме видно, что все результаты не выходят за пределы трех стандартных отклонений относительно среднего значения, при этом рассчитанные индексы воспроизводимости процесса составляют  $C_p=1,24$  и  $C_{pk}=1,14$ .

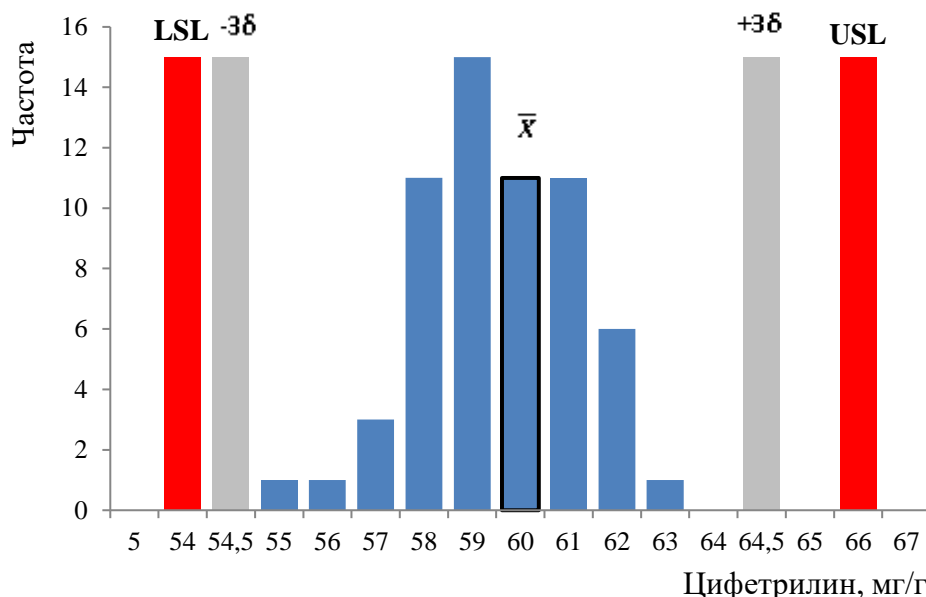


Рисунок 49 – Распределение результатов количественного определения цифетрилина в грануляте

Гистограмма, представленная на Рисунке 50, свидетельствует о том, что время распадаемости таблеток цифетрилина не превышает 15 минут, результаты всех определений укладываются в пределы трех стандартных отклонений относительно среднего значения (9,3 мин), а рассчитанные индексы воспроизводимости процесса составляют  $C_p=1,15$  и  $C_{pk}=1,05$ , соответственно.

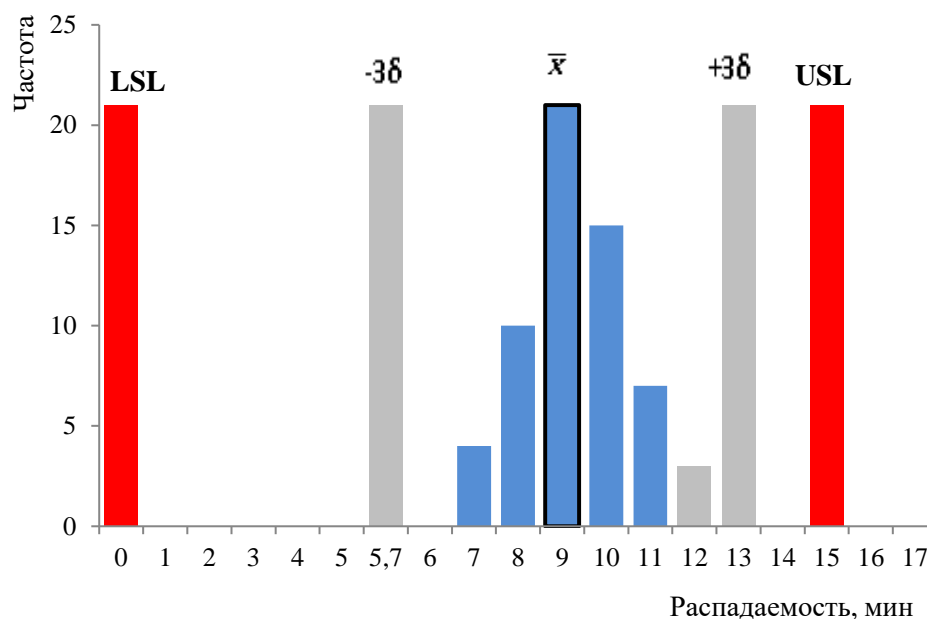


Рисунок 50 – Распределение результатов определения распадаемости таблеток цифетрилина

Результаты статистической обработки аналитических данных, полученных в ходе валидации, и значения индексов воспроизводимости, представленные в Таблице 55, свидетельствуют о том, что наиболее критичные стадии ТП воспроизводимы и позволяют получать качественный продукт, отвечающий требованиям ГФ XIV и разработанной спецификации (Таблица 69).

Таблица 55 – Соответствие продуктов ТП критериям оценки

	Средняя масса, мг	Распадаемость, мин	Количественное определение, мг/г гранулята
Среднее значение	107,1	9,3	60,0
$\delta$	2,1	1,2	3,0
LSL	95	–	54,0
USL	116	15	66,0
$S_p$	1,25	1,15	1,24
$S_{pk}$	1,12	1,05	1,14
Количество измерений	60	60	60
Заключение	Соответствует	Соответствует	Соответствует

## 6.5 Оценка противоопухолевой активности таблеток цифетрилина 6 мг

Изучение противоопухолевой активности разработанного ЛС проводили на моделях рака шейки матки РШМ5 и аденокарциномы молочной железы Ca755 (в широком диапазоне доз от 1 до 120 мг/кг) и на аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ (в низких дозах – 1 мг/кг и 10 мг/кг) [124].

Оценку противоопухолевой активности проводили по критериям торможение роста опухоли (ТРО) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ) животных, получавших ЛС, по сравнению с контрольными животными (*ГЛАВА 2, 2.3.5 Методы, использованные в исследованиях на лабораторных животных*). ТРО (%) и УПЖ (%) рассчитывали по формулам (4) и (5), соответственно [96; 124].

В исследованиях на РШМ5 установлено, что при увеличении дозы цифетрилина от 1 мг/кг до 10 мг/кг противоопухолевый эффект усиливался как по торможению роста опухоли, так и увеличению продолжительности жизни опытных животных по сравнению с контрольными животными (Таблица 56). Максимальный противоопухолевый эффект цифетрилина непосредственно после окончания его введения составлял в дозе 10 мг/кг – 86% ТРО, а в дозе 1 мг/кг – 72% ТРО. Такой высокий эффект сохранялся до 30 дня после окончания лечения: ТРО составляло 74% и 61%, соответственно. При этом продолжительность жизни мышей, получавших цифетрилин в дозе 10 мг/кг, увеличилась на 48%, а в дозе 1 мг/кг – на 28%.

Следует особо отметить, что зависимость противоопухолевой активности цифетрилина от дозы не была прямой и противоопухолевая активность ЛС в дозе 50 мг/кг оказалась равной его терапевтическому действию в дозе 10 мг/кг. Далее с увеличением используемой дозы цифетрилина с 50 мг/кг до 120 мг/кг его противоопухолевая активность снижалась, что может быть связано с блокировкой рецепторов к соматостатину. Непосредственно после введения цифетрилина в дозе 50 мг/кг ТРО составило 83%, а в дозе 120 мг/кг – 65%, на 15 день ТРО – 70% и 62%, соответственно. Также с увеличением дозы ЛС уменьшалась средняя

продолжительность жизни опытных мышей и, соответственно, уменьшалось УПЖ с 49% до 21%.

Таблица 56 – Противоопухолевая активность таблеток цифетрилина на раке шейки матки РШМ5

Ежедневная доза, мг/кг	Курсовая доза, мг/кг	ТРО, % (дни после окончания введения)					УПЖ, %
		1	8–9	15–16	22	30	
1	5	72 <sup>1</sup>	71 <sup>1</sup>	62 <sup>1</sup>	54 <sup>1</sup>	61 <sup>1</sup>	28
10	50	86 <sup>1</sup>	81 <sup>1</sup>	76 <sup>1</sup>	68 <sup>1</sup>	74 <sup>1</sup>	48 <sup>1</sup>
50	250	83 <sup>1</sup>	80 <sup>1</sup>	70 <sup>1</sup>	53 <sup>1</sup>	-	49 <sup>1</sup>
120	600	65 <sup>1</sup>	70 <sup>1</sup>	62 <sup>1</sup>	60 <sup>1</sup>	68 <sup>1</sup>	21

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

Таблица 57 – Противоопухолевая активность таблеток цифетрилина на аденокарциноме молочной железы Са755

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

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

Из данных, представленных в Таблице 57, видно, что на аденокарциноме молочной железы Са755 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. Терапевтическая эффективность цифетрилина в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг статистически не различалась, но была ниже, чем в дозе 120 мг/кг. ЛС в дозе 120 мг/кг оказывало высокий терапевтический эффект непосредственно после окончания введения – ТРО составило 86%, на 15 день ТРО – 58%, а УПЖ – 53%.

Следует отметить, что в группах введения цифетрилина гибели животных не наблюдали ни в одном опыте.

Изучение эффективности цифетрилина на аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ показало, что в дозе 10 мг/кг ТРО в течение 9 дней несколько превосходит терапевтическое действие ЛС в дозе 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%, тогда как в дозе 10 мг/кг УПЖ составляло всего 13% (Таблица 58).

Таблица 58 – 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	
1	5	62 <sup>1</sup>	58 <sup>1</sup>	61 <sup>1</sup>	58 <sup>1</sup>	57 <sup>1</sup>	43*
10	50	79 <sup>1</sup>	63 <sup>1</sup>	58 <sup>1</sup>	52 <sup>1</sup>	51 <sup>1</sup>	13

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

В исследовании на меланоме В16 наблюдали небольшие различия активности ЛС в дозах 10 мг/кг и 1 мг/кг в течение всего срока наблюдения по ТРО (77–63–62% и 63–59–56%, соответственно) и УПЖ 18% и 19%, соответственно (Таблица 59).

Таблица 59 – Противоопухолевая активность цифетрилина при ежедневном пятикратном введении на меланоме В16

Ежедневная доза (мг/кг)	Курсовая доза (мг/кг)	ТРО,% (дни после окончания введения)				УПЖ, %
		1	8–9	17	22	
1	5	63 <sup>1</sup>	59 <sup>1</sup>	56 <sup>1</sup>	–	18
10	50	77 <sup>1</sup>	63 <sup>1</sup>	62 <sup>1</sup>	62 <sup>1</sup>	19

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

При выборе оптимального режима применения цифетрилина изучено несколько режимов введения в дозах 1 и 10 мг/кг. Показано, что наиболее эффективным является ежедневное пероральное введение ЛС в течение 5 дней.

При таком режиме введения противоопухолевая активность цифетрилина в дозе 10 мг/кг на опухолях РШМ5 и Ca755 проявлялась и как высокое торможение роста опухолей (90%=>67% и 79%=>78%, соответственно) и как значительное увеличение продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными животными (55% и 59%, соответственно) (Таблица 60).

Таблица 60 – Выбор оптимального режима введения цифетрилина

Опухоль	Доза (мг/кг)	Суммарная доза (мг/кг)	ТРО, % (дни после окончания введения)				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	50	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

Другие режимы введения цифетрилина (2 курса ежедневного перорального введения в течение 5 дней с интервалом 7 дней и 3 курса однократного введения с интервалом 7 дней), были менее эффективными как по критерию ТРО, так по критерию УПЖ.

Обычно НЭО диагностируются довольно поздно, и у подавляющего большинства пациентов в момент постановки диагноза обнаруживается распространенный процесс, который характеризуется наличием метастазов [150]. Таким образом, исследование действия цифетрилина на развившуюся опухоль и выявление антиметастатического эффекта ЛС является актуальным [124].

Данные, представленные в Таблице 61, свидетельствуют о выраженной противоопухолевой эффективности цифетрилина в дозе 10 мг/кг в отношении развившейся опухоли РШМ5. Объем, равного приблизительно 500 мм<sup>3</sup>, опухоль достигала на двенадцатый день после перевивки и с этого дня начинали введение

ЛС. Противоопухолевый эффект цифетрилина в дозе 10 мг/кг был достаточно высоким: ТРО = 79–76% в течение 20 дней, а по критерию УПЖ = 20%.

Таблица 61 – Противоопухолевое действие цифетрилина на развившуюся опухоль РШМ5

Группа	Доза (мг/кг)	Объем опухоли, мм <sup>3</sup>				
		ТРО, % (дни после перевивки опухоли)				
		12	17	23	30	37
Контроль	–	543 ± 42	1618 ± 56	3921 ± 87	6803 ± 1001	9752 ± 2015
Цифетрилин	10	<u>489 ± 24</u> -	<u>343 ± 18</u> <b>79<sup>1</sup></b>	<u>953 ± 65</u> <b>76<sup>1</sup></b>	<u>2032 ± 179</u> <b>70<sup>1</sup></b>	<u>2375 ± 350</u> <b>76<sup>1</sup></b>
	1	<u>478 ± 25</u> 12	<u>307 ± 22</u> <b>81<sup>1</sup></b>	<u>1304 ± 77</u> <b>67<sup>1</sup></b>	<u>2456 ± 256</u> <b>64<sup>1</sup></b>	<u>4331 ± 903</u> <b>56<sup>1</sup></b>

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

Экспериментальное изучение антиметастатической активности ЛС проводили на общепринятой модели спонтанного метастазирования – эпидермоидной карциноме легкого Lewis, применяя цифетрилин самостоятельно и в комбинации с хирургическим удалением опухоли [95].

Критерием оценки антиметастатической активности служило торможение роста метастазов (ТРМ, %) в легких, которое вычисляли по формуле (6).

Данные, представленные в Таблице 62, показывают, что цифетрилин в монотерапии без удаления первичной опухоли не проявляет антиметастатического действия. Хирургическое удаление первичной опухоли тормозит развитие метастазов в легких на 53% (p < 0,05).

Таблица 62 – Влияние цифетрилина на метастазирование LLC в легкие

Группа	Масса тела, г		Масса легких с метастазами, мг	ТРМ, %
	исходная	после выведения из эксперимента		
Контроль	22,4 ± 0,7	29,0 ± 2,7	592,0 ± 194,2	–
Цифетрилин	22,2 ± 0,4	27,0 ± 2,2	708,6 ± 228,8	20 <sup>1</sup>
Хирургическое удаление опухоли	22,1 ± 1,1	27,0 ± 2,7	277,2 ± 124,1	53 <sup>1</sup>
Комбинированное воздействие	22,1 ± 1,2	25,4 ± 1,5	233,0 ± 61,1	61 <sup>1</sup>

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



При ежедневном пероральном введении цифетрилина в течение 10 дней в дозе 10 мг/кг после удаления первичной опухоли LLC выявлено ТРМ в легких на 61% ( $p < 0,05$ ).

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Определен уровень экспрессии рецепторов к соматостатину SSTR1,2,5 в клетках экспериментальных опухолей животных – аденокарциномы молочной железы Ca755 и аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ. Показано, что исследованные опухолевые модели экспрессируют, в основном, SSTR1, SSTR2 и SSTR5 с высокой или умеренной степенью интенсивности. Показано изменение уровня экспрессии рецепторов к соматостатину после введения цифетрилина – уровень экспрессии SSTR1 и SSTR2 уменьшался после введения цифетрилина, а уровень SSTR5 значительно увеличивался. Полученные данные позволяют считать указанные перевиваемые опухоли мышей релевантными моделями для доклинического исследования цифетрилина и других аналогов соматостатина.

2. Установлено, что противоопухолевая активность цифетрилина наиболее полно проявляется при пероральном введении экспериментальным животным – ТРО в дозе 10 мг/кг непосредственно после окончания лечения составило 90%. Статистически значимый терапевтический эффект сохранялся в течение 22 дней, а продолжительность жизни мышей увеличилась на 55%.

3. С использованием подхода Качество путем разработки (Quality by Design) проведена фармацевтическая разработка аналога соматостатина цифетрилина:

- установлен целевой профиль качества таблеток цифетрилина 6 мг;
- определены фармацевтико-технологические свойства АФС цифетрилин;
- 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.

4. Оценка рисков влияния отдельных стадий технологического процесса на CQAs таблеток цифетрилина показала, что наибольшее влияние на качество оказывают стадии ТП-4. Получение массы для прессования и ТП-5. Прессование.

5. Определены контрольные точки технологического процесса и допустимые пределы контролируемых параметров. Валидация основных стадий ТП получения таблеток показала его воспроизводимость и соответствие полученных таблеток требованиям ГФ XIV и спецификации.

6. Изучение противоопухолевой активности таблеток цифетрилина показало, что наиболее эффективным является ежедневное пероральное введение лекарственного средства в течение 5 дней (ТРО в дозе 10 мг/кг на опухолях РШМ5 и Са755 90–67% и 79–78% в течение 14 дней, УПЖ – 55% и 59%, соответственно). Выявлена выраженная противоопухолевая эффективность цифетрилина в дозе 10 мг/кг в отношении развившейся опухоли РШМ5 (ТРО = 79–76% в течение 20 дней) и антиметастатическая активность ЛС после удаления первичной опухоли LLC – ТРМ в легких на 61% ( $p < 0,05$ ).

## ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ЦИФЕТРИЛИН ТАБЛЕТКИ 6 МГ

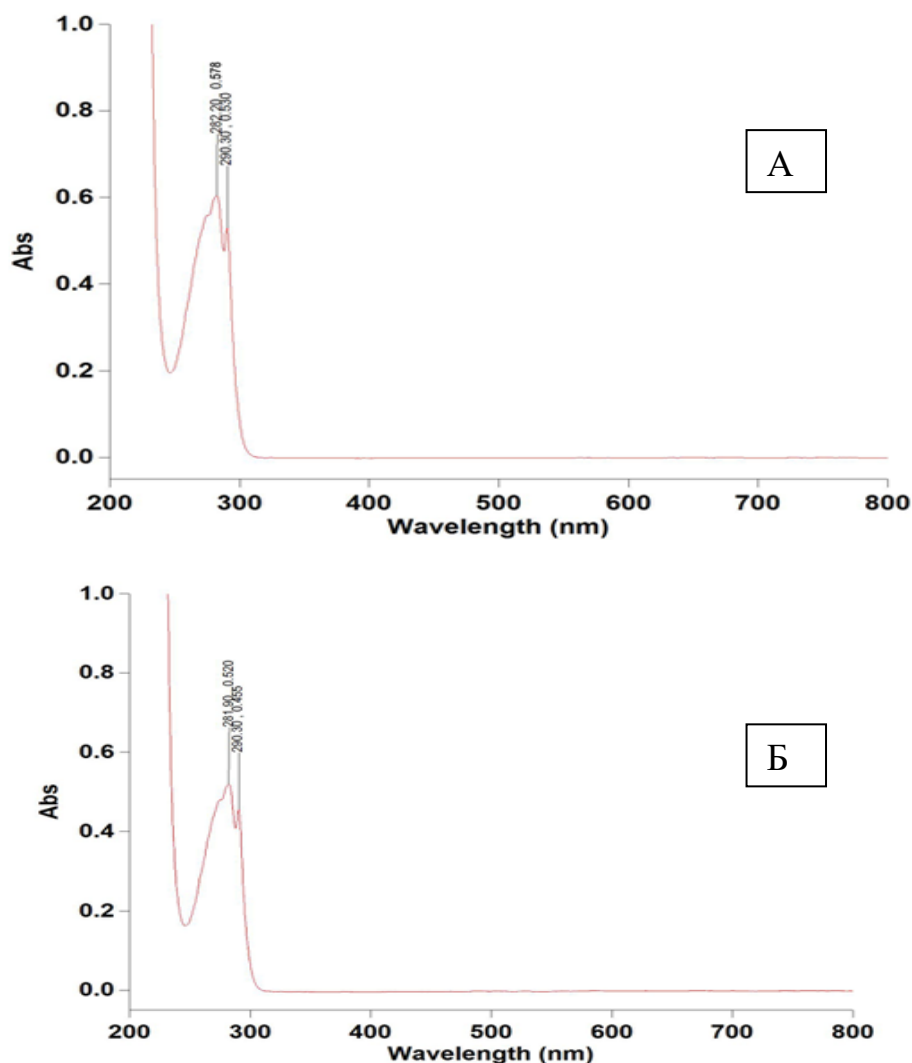
Для контроля качества лекарственной формы цифетрилина использовали разработанные нами методики и методы, описанные в ГФ XIV [27] (Таблица 4).

Химико-фармацевтические исследования выполняли на образцах таблеток цифетрилина 6 мг, полученных в лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Таблетки цифетрилина 6 мг – круглые двояковыпуклые таблетки белого цвета, с глянцевой поверхностью и ровными, без сколов краями [131; 353; 354].

Для подтверждения подлинности сравнивали электронные спектры поглощения растворов лекарственной формы и стандартного образца (АФС цифетрилина) в спирте этиловом 95%-ом, приготовленных для количественного определения. Ультрафиолетовые спектры поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца в области от 250 до 350 нм имели максимумы поглощения при одних и тех же длинах волн:  $(274\pm 2)$  нм,  $(282\pm 2)$  нм и  $(290\pm 4)$  нм (Рисунок 51) [132; 133; 323].

Подлинность таблеток цифетрилина также определяли хроматографическими методами (ТСХ и ВЭЖХ) [51; 132; 133; 263; 297]. При этом использовали методику ТСХ-анализа, разработанную для определения подлинности в АФС (*ГЛАВА 5, 5.1 Разработка методик определения подлинности цифетрилина*). Для приготовления испытуемого раствора таблетку цифетрилина растирали в агатовой ступке и прибавляли 2 мл хлороформа, перемешивали (концентрация цифетрилина 3 мг/мл). В качестве стандартного образца использовали раствор АФС цифетрилин в хлороформе (3 мг/мл). А определение подлинности методом ВЭЖХ проводили одновременно с определением родственных примесей.



А – 0,008 % раствор циметрилина в спирте этиловом 95% (относительно спирта этилового 95%); Б – раствор таблеток циметрилина (0,008 %) в спирте этиловом 95% (относительно раствора ВВ)

Рисунок 51 – Ультрафиолетовые спектры поглощения растворов циметрилина

*Однородность массы и распадаемость* определяли в соответствии с ГФ XIV [27]. Таблетки циметрилина всех опытных партий соответствовали требованиям ГФ XIV по данным показателям.

При определении *родственных примесей* в таблетках циметрилина использовали методику, разработанную для количественного определения и определения родственных примесей в АФС. Для приготовления испытуемого раствора таблетку растирали и помещали во флакон для автосамплера вместимостью 4 мл, прибавляли 3 мл ПФ, перемешивали с помощью шейкера в

течение 2 мин. Полученную суспензию центрифугировали при скорости вращения ротора 2000 об/мин в течение 2 мин. 200 мкл супернатанта переносили во флакон для хроматографирования, прибавляли 600 мкл ПФ, перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Далее поступали, как описано в *Методике определения родственных примесей в АФС цифетрилин*.

Содержание любой неидентифицированной примеси во всех сериях таблеток цифетрилина не превышало 1,0%; суммарное содержание примесей – не более 3,0% (Рисунок 52, Таблица 71).

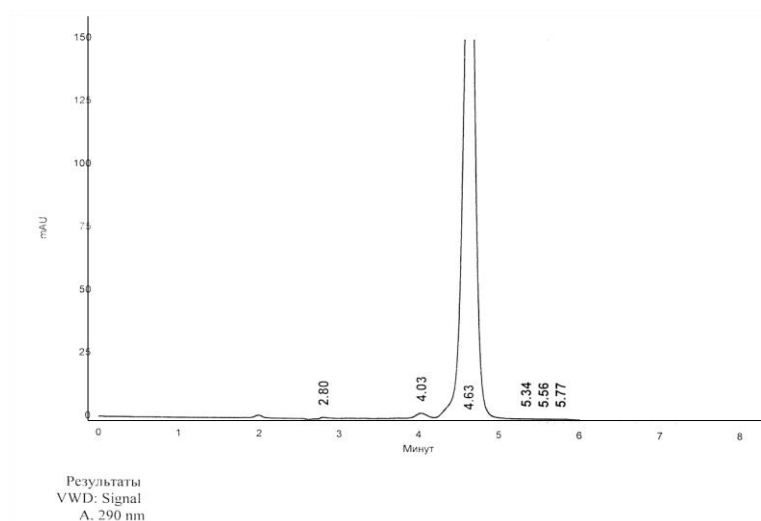


Рисунок 52 – Хроматограмма таблеток цифетрилина 6 мг

### 7.1 Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в таблетках

Как указано в ГЛАВЕ 5, раствор цифетрилина в 95% этиловом спирте имеет характерный спектр поглощения в области от 250 до 350 нм с максимумами поглощения при  $(274 \pm 2)$  нм,  $(282 \pm 2)$  нм и  $(290 \pm 4)$  нм и минимумами при  $(248 \pm 2)$  нм,  $(266 \pm 2)$  нм и  $(287 \pm 2)$  нм (Рисунок 30). Аналитическое значение имеет максимум при длине волны  $(282 \pm 2)$  нм, так как удельный показатель поглощения при данной длине волны имеет наибольшее значение и растворитель прозрачен [131; 132; 133; 323].

Предварительно исследовали зависимость интенсивности поглощения цифетрилина от его концентрации в растворах. Для этого готовили спиртовые растворы с известными концентрациями цифетрилина, измеряли оптическую плотность полученных растворов (Таблица 63) и строили график зависимости оптической плотности от концентрации раствора.

Таблица 63 – Зависимость оптической плотности от концентрации растворов цифетрилина в спирте этиловом 95%

Концентрация раствора цифетрилина, мг/мл	Оптическая плотность раствора
0,02	0,112
0,03	0,179
0,05	0,287
0,07	0,412
0,10	0,563
0,15	0,804
0,20	1,114

Построенная зависимость была линейной и проходила через начало координат (Рисунок 53).

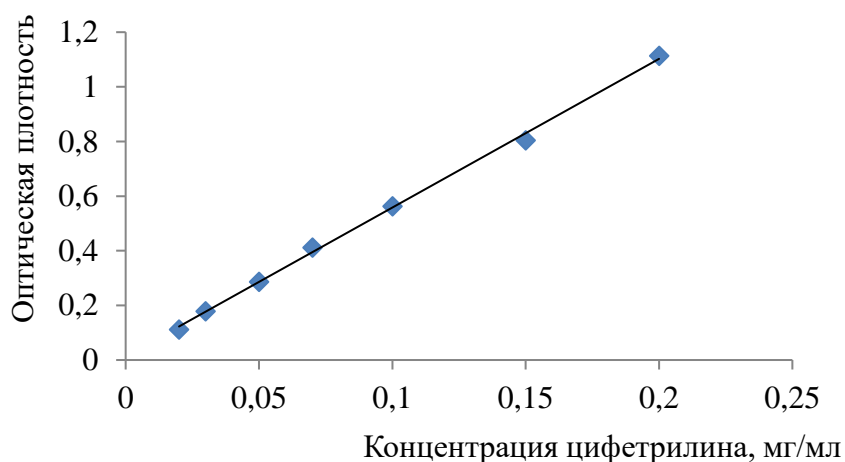
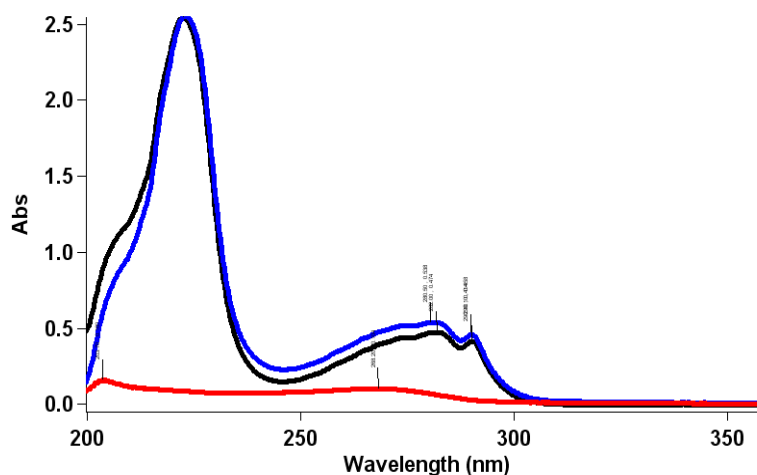


Рисунок 53 – Зависимость оптической плотности от концентрации растворов цифетрилина в 95% этиловом спирте

Таким образом, показано, для растворов цифетрилина соблюдается закон Бугера-Ламберта-Бера в концентрациях от 0,02 мг/мл до 0,20 мг/мл. Для снижения систематических и случайных ошибок в методику спектрофотометрического

анализа ЛФ введен способ расчета по СО, в качестве которого использовали стандартизованную АФС цифетрилина.

Таблетки цифетрилина, кроме 6 мг основного вещества, содержат значительное количество ВВ (Таблица 48). При изучении влияния ВВ на спектральные характеристики цифетрилина показано, что они не влияют на положение максимумов полос поглощения активного вещества (Рисунок 54).



— цифетрилин; — модельная смесь: цифетрилин + ВВ; — ВВ

Рисунок 54 – Ультрафиолетовые спектры поглощения спиртовых растворов цифетрилина, ВВ и модельной смеси цифетрилин + ВВ

Однако раствор ВВ в 95% этиловом спирте в рабочей концентрации имеет собственное поглощение (около 0,08 единиц оптической плотности) и влияет на величину оптической плотности раствора ЛФ (Рисунок 54). Поэтому в качестве раствора сравнения использовали раствор ВВ соответствующей концентрации.

### **Методика**

*Испытуемый раствор.* Около 106 мг (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 95% и перемешивают. Полученную суспензию фильтруют через бумажный фильтр типа «синяя лента» в мерную колбу вместимостью 100 мл, фильтр промывают 2 раза по 5 мл спиртом этиловым 95% и доводят объём тем же растворителем до метки, перемешивают.

*Раствор сравнения.* Около 100 мг (точная навеска) смеси ВВ, эквивалентной составу 1 таблетки цифетрилина, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 95% и перемешивают. Далее поступают как при приготовлении раствора СО со слов «...Полученную суспензию фильтруют через бумажный фильтр ...».

*Раствор стандартного образца.* Около 6 мг (точная навеска) СО цифетрилина (ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» Минздрава России) и 100 мг смеси ВВ (точная навеска) помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 95%, перемешивают. Полученную суспензию фильтруют через бумажный фильтр типа «синяя лента» в мерную колбу вместимостью 100 мл, фильтр промывают 2 раза по 5 мл спиртом этиловым 95% и доводят объём в колбе тем же растворителем до метки, перемешивают.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют относительно раствора сравнения на спектрофотометре в максимуме при длине волны  $(282 \pm 2)$  нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца относительно раствора сравнения.

Содержание цифетрилина в таблетке в миллиграммах ( $X$ , мг) рассчитывают по формуле (14):

$$X = \frac{A \times a_0 \times G \times P}{A_0 \times a \times 100} \quad (14)$$

где:  $A$  – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_0$  – оптическая плотность раствора СО;

$a$  – навеска испытуемого образца, мг;

$a_0$  – навеска СО, мг;

$G$  – средняя масса таблетки, мг;

$P$  – содержание цифетрилина в стандартном образце, %.

Содержание  $C_{52}H_{69}N_7O_{12}S$  (цифетрилина) в одной таблетке всех изученных серий, вычисленное по формуле (14), составило от 5,4 до 6,6 мг (Таблица 70).



Валидацию методики количественного определения цифетрилина в таблетках проводили на образцах ЛС и модельных смесях. При этом исследовали следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, прецизионность (повторяемость (сходимость) и внутрилабораторная прецизионность), правильность [27; 97; 136; 233].

Как сказано выше, ВВ не влияют на положение максимумов полос поглощения активного вещества (Рисунок 54), что определяет специфичность разработанной методики.

В качестве диапазона применения при валидации по критериям линейность и правильность рассматривали аналитическую область от 70% до 130% от номинального.

Линейность предложенной методики проверяли экспериментально измерением аналитического сигнала (оптической плотности) для 7 проб с различным содержанием цифетрилина в пределах аналитической области методики (Таблица 64).

Таблица 64 – Результаты определения параметров линейной зависимости количественного определения цифетрилина

Содержание цифетрилина в пробе, мг	% от номинального содержания	Оптическая плотность <sup>1</sup>	Параметры линейной зависимости		
4,20	70	0,241	Угловой коэффициент линейной зависимости $b = 0,0603$ Свободный член линейной зависимости $a = -0,0199$ Коэффициент корреляции $r = 0,998$ $y = 0,0603 \cdot x - 0,0199$		
4,80	80	0,265			
5,40	90	0,308			
6,00	100	0,337			
6,60	110	0,372			
7,20	120	0,408			
7,80	130	0,462			
$\bar{x}$	$s_0^2$	$S_a$	$S_b$	$\Delta a$	$\Delta b$
6,0 мг	0,1823	0,0589	0,9631	0,1444	2,3596

Примечание – <sup>1</sup>Среднее значение из трех определений

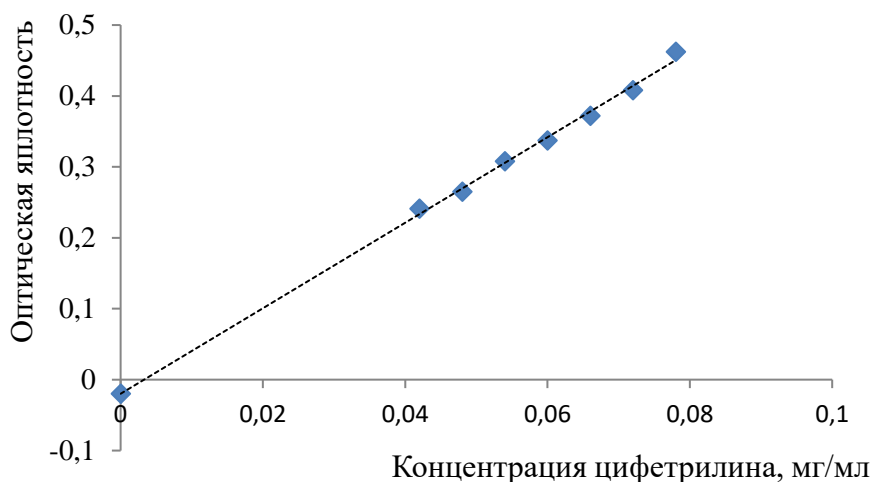


Рисунок 55 – Линейная зависимость оптической плотности от содержания цифетрилина в модельной смеси

На основе полученных данных определяли параметры линейной зависимости вида  $y = b \cdot x + a$  и коэффициент корреляции и строили график зависимости оптической плотности от содержания цифетрилина в пробе.

Из данных, представленных в Таблице 64 и на Рисунке 55, видно, что результаты количественного определения цифетрилина в ЛФ хорошо описываются линейной зависимостью по уравнению  $y = 0,0603 x - 0,0199$ .

Коэффициент корреляции  $r$  равен  $0,9980$ , то есть соответствует условию  $|r| \geq 0,99$ ;  $|a| < \Delta a$ , что позволяет утверждать, что линейная зависимость между  $x$  (содержание цифетрилина в тестируемом растворе, мг/мл) и  $y$  (оптическая плотность спиртового раствора цифетрилина) не является случайной.

Прецизионность исследовали на однородных образцах как повторяемость (сходимость) и внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность (*ГЛАВА 2, 2.3.2 Валидация аналитических методик*).

Для определения повторяемости (сходимости) методики одним аналитиком в короткий промежуток времени выполнено 9 параллельных определений количественного содержания цифетрилина в таблетках. Испытания проводили в одной лаборатории, с использованием одного и того же спектрофотометра и с одними и теми же растворителями. Полученные результаты и метрологические характеристики среднего результата приведены в Таблице 65.

Среднее значение содержания цифетрилина ( $\bar{x}$ , мг) в изученной серии таблеток цифетрилина составило 5,98 мг, что находится в пределах установленной нормы (5,40–6,60 мг). Относительная ошибка среднего результата составила 1,37%. При доверительной вероятности  $P = 95\%$  для проанализированных образцов цифетрилина доверительный интервал результата отдельного определения  $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$  составил (5,98  $\pm$  0,08) мг. Вычисленное значение критерия Стьюдента равно  $t(p,f) = 0,56$ , что меньше табличного (табличное значение критерия Стьюдента при 95 %-ной доверительной вероятности и степени свободы  $f = 8$  равно 2,31, т.е.  $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}} (95 \%, 8)$ , коэффициент вариации – 0,59%. То есть результаты, полученные по разработанной методике, не отягощены систематической ошибкой и являются повторяемыми (сходимыми).

Таблица 65 – Результаты исследования повторяемости (сходимости) аналитической методики количественного определения цифетрилина в таблетках

		Цифетрилин								
Опыт		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Найдено цифетрилина, мг		6,05	5,90	5,85	6,13	6,08	5,88	5,97	6,10	5,89
Метрологические характеристики среднего результата										
$\bar{x}$	s	$s^2$	$s\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	t(P,f) табл.	t(P,f) вычисл.	$\bar{\varepsilon}, \%$		
5,98	0,1068	0,0114	0,0356	0,08	5,98 $\pm$ 0,08	2,31	0,56	1,37		

Примечание –  $n=9$ ,  $f=8$ ,  $P=95\%$

При исследовании промежуточной прецизионности анализ производили два сотрудника в разные дни. Каждый исполнитель проанализировал по 9 образцов одной серии. Полученные данные и результаты их статистической обработки приведены в Таблице 66.

Таблица 66 – Метрологические характеристики оценки внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики количественного определения цифетрилина в таблетках

	Найдено цифетрилина, мг								
Опыт	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Аналитик 1	6,05	5,90	5,85	6,13	6,08	5,88	5,97	6,10	5,89
Аналитик 2	5,91	6,10	5,97	6,03	5,94	5,91	6,06	5,84	6,05
Метрологические характеристики среднего результата									
$\bar{x}$	s	$s^2$	$s\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	t(P,f) табл.	t(P,f) вычисл.	$\bar{\epsilon}, \%$	
5,98	0,1068	0,0114	0,0356	0,08	$5,98 \pm 0,08$	2,31	0,56	1,37	
5,98	0,0861	0,0074	0,0287	0,07	$5,98 \pm 0,07$		0,70	1,11	

Примечание – n=9, f=8, P=95%

Из данных, представленных в Таблице 66, видно, что различия между средними значениями результатов 1-го и 2-го сотрудников незначительны, а относительная ошибка среднего результата 1,37% и 1,11%, соответственно. Вычисленные значения критерия Стьюдента составило  $t(p,f) = 0,56$  и  $0,70$ , соответственно, что меньше табличного значения  $t(P,f) = 2,31$ . Таким образом, результаты, полученные каждым сотрудником, не отягощены систематической ошибкой.

Рассчитанный критерий Фишера F равен 0,56, что значительно меньше табличного значения  $F(P, f, f)_{\text{табл.}} = 6,03$ , то есть различие  $s_1^2$  и  $s_2^2$  не может быть признано значимым и не является статистически достоверным. Гипотеза  $x_1 = x_2$  может быть признана верной, поскольку вычисленный критерий Стьюдента  $t = 0,905$ , что меньше  $t = 0,905 < t(95\%; 16) = 2,12$  и  $t = 0,905 < t(99\%; 16) = 2,92$ .

Исходя из вышесказанного, методика количественного определения цифетрилина в таблетках методом УФ-спектрометрии может считаться валидированной по критерию промежуточная прецизионность.

Правильность разработанной методики подтверждали, анализируя модельные смеси с известным содержанием цифетрилина в трипликатах на трех уровнях концентраций. Для этого специального готовили модельные смеси, содержащие 70%, 100% и 130% цифетрилина от его номинального содержания в

таблетках. На каждом уровне проводили по 3 определения. Оценку правильности методики проводили, рассчитывая открываемость (соотношение полученного результата и ожидаемого значения величины, выраженное в %). Полученные данные и метрологические характеристики приведены в Таблице 67.

Анализ данных, представленных в Таблице 67, показывает, что методика количественного определения цифетрилина в таблетках может считаться правильной, поскольку средние значения результатов в трипликатах близки к истинному и лежат внутри доверительного интервала ( $99,28 \pm 1,63$ ) %.

Таблица 67 – Результаты оценки правильности методики количественного определения цифетрилина в таблетках

Опыт	Цифетрилин								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Содержание от номинального, %	70			100			130		
Содержание цифетрилина в анализируемой пробе, мг	4,25	4,59	4,42	6,15	6,04	5,92	8,03	7,88	8,28
Найдено цифетрилина, мг	4,36	4,49	4,36	6,07	5,83	5,96	7,88	8,06	8,09
Открываемость, %	102,65	97,84	98,72	98,86	96,62	100,68	98,12	102,27	97,76
Среднее значение в трипликате	99,74			99,72			99,38		
Метрологические характеристики среднего результата									
$\bar{x}$	s	$s^2$	$s\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	t(P,f) табл.	t(P,f) вычисл.	$\bar{\epsilon}, \%$	
99,28	2,1081	4,4440	0,7027	1,62	$99,28 \pm 1,62$	2,31	1,02	1,63	

Примечание – n=9, f=8, P=95%

Численное значение критерия Стьюдента, рассчитанное по результатам анализа выборки, составляет 1,02, то есть  $t_{\text{вычисл.}} < t_{\text{табл.}}(P,f)$ , а относительная ошибка среднего результата  $\bar{\epsilon}$  составляет 1,63%.

Предел обнаружения и предел количественного определения, рассчитанные по формулам (2) и (3), составили 3,23 мкг/мл и 9,77 мкг/мл для По и ПКО, соответственно.

В Таблице 68 приведен отчет о валидации методики количественного определения цифетрилина в таблетках.

Таблица 68 – Отчет о валидации методики количественного определения цифетрилина в таблетках 6 мг

Валидационная характеристика	Установленный критерий	Результат
Специфичность	ВВ, входящие в состав ЛФ не должны влиять на положение и оптическую плотность максимумов в УФ-спектре цифетрилина	Результаты соответствуют установленным критериям
Линейность	Коэффициент корреляции не менее 0,990	$y = 0,0603x - 0,0199$ $r = 0,998$
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% Значения, принимаемые за истинные, должны лежать внутри доверительного интервала	относительная ошибка среднего результата 1,6%
		Результаты лежат внутри доверительного интервала ( $99,28 \pm 1,62$ )%

Методику, разработанную для количественного определения цифетрилина, использовали для определения *однородности дозирования* цифетрилина в таблетках 6 мг. Определение проводили из 10 таблеток порознь, полученные результаты выражали в процентах от номинального содержания цифетрилина в таблетке и устанавливали соответствие требованиям ОФС.1.4.2.0008.18.

### **Методика**

*Испытуемый раствор.* К таблетке прибавляют 25 мл этанола 95% и интенсивно встряхивают в течение 8–10 мин. Полученную суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до

метки спиртом этиловым 95%, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр типа «синяя лента» в коническую колбу.

*Приготовление раствора СО цифетрилина, раствора сравнения* проводят как описано в Методике количественного определения цифетрилина в таблетках 6 мг (ГЛАВА 7, 7.1 Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в таблетках).

Содержание цифетрилина в таблетке в процентах от номинального содержания (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times P}{A_0 \times 6} \quad (15)$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора СО;

a<sub>0</sub> – навеска СО, мг;

P – содержание цифетрилина в СО, %;

6 – номинальное содержание цифетрилина в таблетке, мг.

Однородность дозирования C<sub>52</sub>H<sub>69</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>S (цифетрилина) в таблетках 6 мг соответствовала требованиям ГФ XIV [27] (Таблица 69).

Таблица 69 – Определение однородности дозирования таблеток цифетрилина с. 021115

Таблетка	Оптическая плотность испытуемого раствора	Масса таблетки, мг	Найдено цифетрилина		Показатели приемлемости
			мг	X, %	
1	0,343	106,0	5,97	99,54	f = n-1 = 9 k = 2,4 $\bar{X}$ = 96,8% S = 4,37 M = 98,5 AV = 12 ≤ 15
2	0,353	104,1	6,04	100,61	
3	0,338	101,3	5,62	93,74	
4	0,342	101,4	5,70	94,94	
5	0,347	97,6	5,56	92,72	
6	0,343	106,6	6,06	100,10	
7	0,315	106,5	5,51	91,85	
8	0,319	100,5	5,41	90,25	
9	0,346	108,6	6,17	102,87	
10	0,341	105,9	6,08	101,39	

При валидации методики количественного определения цифетрилина в таблетках аналитическая область расширена до диапазона от 70 до 130% от номинального значения. Показано, что методика обеспечена приемлемой правильностью и линейностью в данном экстремальном диапазоне, что позволяет считать ее валидированной для использования в тесте «однородность дозирования».

Анализ лабораторных образцов, модельных смесей и серий лекарственного средства, наработанных для доклинических исследований, позволил разработать проект нормативного документа по качеству таблеток цифетрилина 6 мг (Приложение Д).

В Таблице 70 приведена разработанная спецификация на ЛС цифетрилин таблетки 6 мг, а в Таблице 71 – результаты контроля качества 3 серий таблеток цифетрилина, полученных по разработанной технологии.



Таблица 70 – Спецификация на цифетрилин таблетки 6 мг

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Круглые двояковыпуклые таблетки белого цвета
Подлинность	Спектрофотометрия	УФ-спектры испытуемого раствора и раствора стандартного образца цифетрилина в области от 250 до 350 нм должны иметь максимумы поглощения при одних и тех же длинах волн
	ВЭЖХ	Время удерживания цифетрилина 4,5–4,7 мин и совпадает с временем удерживания СО
	ТСХ	На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться одно пятно по положению, совокупности величины и интенсивности окраски соответствующее пятну в пробе стандартного образца
Средняя масса и однородность массы	ГФ XIV	От 95 до 116 мг Отклонение от средней массы $\pm 7,5 \%$
Распадаемость	ГФ XIV	Не более 15 минут
Родственные примеси	ВЭЖХ	Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,0 % Сумма примесей – не более 3,0 %
Микробиологическая чистота	ГФ XIV	Категория 3А
Однородность дозирования	ГФ XIV	$AV \leq L1 (15\%); L2 \leq 25\%$
Количественное определение	Спектрофотометрия	От 5,4 до 6,6 мг
Упаковка	По 100 таблеток в банки пластиковые цилиндрической формы из полиэтилена высокой плотности с горловиной с винтовой резьбой, укупоренные навинчиваемыми пластиковыми крышками. По 10 таблеток в блистерную упаковку из фольги алюминиевой и плёнки ПВХ. По 1 банке или по 5 блистеров с препаратом вместе с инструкцией по применению помещают в картонную пачку.	
Маркировка	В соответствии с НД	
Хранение	В сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С	
Срок годности	2 года	

Таблица 71 – Показатели качества ЛС цифетрилин таблетки 6 мг согласно требованиям проекта НД

Показатель	Нормы по НД	011114	021114	031214
Описание	Круглые двояковыпуклые таблетки белого цвета	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Подлинность	Спектрофотометрия	Положительная	Положительная	Положительная
	ВЭЖХ	Положительная	Положительная	Положительная
	ТСХ	Положительная	Положительная	Положительная
Средняя масса и однородность массы	От 95 до 116 мг	104	98	101
	Отклонение от средней массы $\pm 7,5\%$	$\pm 10$	$\pm 8$	$\pm 8$
Распадаемость	Не более 15 минут	10	8	8
Родственные примеси, %	Любой единичной неидентифицированной примеси - не более 1,0	0,3;1,0	0,4;1,0; 0,8	0,4; 0,9; 0,8
	суммы примесей - не более 3,0	1,3	2,2	2,1
Однородность дозирования	$AV \leq L1 (15\%); L2 \leq 25\%$	14,2	10,8	10,6
Количественное определение, %	От 5,4 до 6,6 мг	5,7	6,0	5,9

Примечание – Все протестированные серии АФС соответствовали требованиям НД по показателю Микробиологическая чистота

## 7.2 Изучение условий хранения и стабильности таблеток цифетрилина 6 мг

Оценку стабильности таблеток цифетрилина проводили по результатам контроля качества ЛС серий 021112, 031112 и 030313, произведенных ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для определения срока годности. Образцы каждой серии хранили в первичной упаковке:

- пластиковой банке цилиндрической формы из полиэтилена высокой плотности вместимостью 20 мл с горловиной с винтовой резьбой, укупоренной навинчиваемой пластиковой крышкой
- или в блистерной упаковке из фольги алюминиевой и плёнки ПВХ.

Рекомендуемые условия хранения – в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C.

Исследование стабильности проводили в естественных условиях при температуре от 2 до 8°C и контролируемой относительной влажности  $60\% \pm 5\%$ .

Контроль качества таблеток проводили по выбранным критериям: внешний вид, подлинность, распадаемость, родственные примеси, количественное определение. Данные, представленные в Таблицах 72 и 73, свидетельствуют о том, что ЛС цифетрилин таблетки 6 мг в заявленных видах упаковки и условиях выдерживает хранение (остается практически без изменений) в течение двух с половиной лет.

Таблица 72 – Результаты исследования стабильности ЛС цифетрилин таблетки 6 мг

Упаковка – Банки пластиковые с горловиной с винтовой резьбой и навинчивающейся крышкой

Условия хранения – В сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С

№ серии	Дата анализа	Описание	Подлинность	Распадаемость, мин	Родственные примеси, %		Количественное определение, мг	Срок хранения
Нормы по проекту ФСП					Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,0 Сумма примесей – не более 3,0	единичная		
021112	11.2012	Соответствует	Соответствует	8	0,6; 0,9; 1,0	2,5	6,4	Входной контроль
	02.2013	То же	То же	8	0,6; 0,8; 0,9	2,3	6,4	3 месяца
	05.2013	- « -	- « -	8	0,5; 0,9; 1,0	2,4	6,5	6 месяцев
	08.2013	- « -	- « -	7	0,6; 0,8; 1,0	2,4	6,4	9 месяцев
	11.2013	- « -	- « -	7	0,6; 0,9; 1,0	2,5	6,3	1 год
	05.2014	- « -	- « -	8	0,6; 0,8; 1,0	2,4	6,4	1 год 6 месяцев
	11.2014	- « -	- « -	8	0,5; 0,9; 1,0	2,4	6,3	2 года
	05.2015	- « -	- « -	8	0,6; 0,9; 0,9	2,4	6,4	2 года 6 месяцев
031112	11.2012	Соответствует	Соответствует	9	0,8; 0,9; 1,0	2,7	6,0	Входной контроль
	02.2013	То же	То же	8	0,8; 0,9; 0,9	2,6	5,9	3 месяца
	05.2013	- « -	- « -	8	0,8; 0,8; 1,0	2,6	6,0	6 месяцев
	08.2013	- « -	- « -	8	0,8; 0,8; 1,0	2,6	5,9	9 месяцев
	11.2013	- « -	- « -	8	0,8; 0,9; 1,0	2,7	5,9	1 год
	05.2014	- « -	- « -	9	0,8; 0,9; 1,0	2,7	5,9	1 год 6 месяцев

Продолжение Таблицы 72

№ серии	Дата анализа	Описание	Подлинность	Распадаемость, мин	Родственные примеси, %		Количественное определение, мг	Срок хранения
Нормы по проекту ФСП		Круглые двояковыпуклые таблетки белого цвета	1.УФ-спектрометрия 2. ТСХ 3. ВЭЖХ	Не более 15	Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,0 Сумма примесей – не более 3,0		От 5,4 до 6,6	
					единичная	сумма		
031112	11.2014	Соответствует	Соответствует	8	0,9; 0,9; 1,0	2,8	5,8	2 года
	05.2015	То же	То же	8	0,8; 0,9; 1,0	2,7	5,9	2 года 6 месяцев
030313	03.2013	Соответствует	Соответствует	7	0,7; 0,9; 0,9	2,5	5,5	Входной контроль
	06.2013	То же	То же	7	0,6; 0,8; 0,9	2,3	5,6	3 месяца
	09.2013	- « -	- « -	7	0,7; 0,8; 0,9	2,4	5,5	6 месяцев
	12.2013	- « -	- « -	8	0,7; 0,8; 0,9	2,4	5,6	9 месяцев
	03.2014	- « -	- « -	8	0,8; 0,8; 0,9	2,5	5,5	1 год
	09.2014	- « -	- « -	7	0,7; 0,9; 0,9	2,5	5,6	1 год 6 месяцев
	03.2015	- « -	- « -	7	0,7; 0,8; 0,9	2,4	5,4	2 года
09.2015	- « -	- « -	8	0,7; 0,8; 0,9	2,4	5,5	2 года 6 месяцев	

Примечание – По показателям «Средняя масса и однородность по массе» и «Однородность дозирования», «Микробиологическая чистота» все серии ЛС соответствовали требованиям проекта ФСП

Таблица 73 – Результаты исследования стабильности ЛС цифетрилин таблетки 6 мг

Упаковка – Блистерная упаковка из фольги алюминиевой и плёнки ПВХ

Условия хранения – В сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С

№ серии	Дата анализа	Описание	Подлинность	Распадаемость, мин	Родственные примеси, %		Количественное определение, мг	Срок хранения
Нормы по проекту ФСП					Любая неидентифицированная примесь – не более 1,0 Сумма примесей – не более 3,0	единичная сумма		
021112	11.2012	Соответствует	Соответствует	8	0,5; 0,9; 1,0	2,4	6,3	Входной контроль
	02.2013	То же	То же	8	0,6; 0,9; 1,0	2,5	6,4	3 месяца
	05.2013	- « -	- « -	8	0,6; 0,9; 0,9	2,4	6,3	6 месяцев
	08.2013	- « -	- « -	8	0,6; 0,8; 0,9	2,3	6,4	9 месяцев
	11.2013	- « -	- « -	7	0,6; 0,9; 1,0	2,5	6,5	1 год
	05.2014	- « -	- « -	8	0,6; 0,8; 1,0	2,4	6,4	1 год 6 месяцев
	11.2014	- « -	- « -	8	0,5; 0,9; 1,0	2,4	6,5	2 года
	05.2015	- « -	- « -	7	0,6; 0,9; 1,0	2,5	6,4	2 года 6 месяцев
031112	11.2012	Соответствует	Соответствует	9	0,8; 0,9; 1,0	2,7	5,8	Входной контроль
	02.2013	То же	То же	8	0,7; 0,9; 1,0	2,6	5,8	3 месяца
	05.2013	- « -	- « -	8	0,8; 0,9; 1,0	2,7	6,0	6 месяцев
	08.2013	- « -	- « -	9	0,8; 0,9; 1,0	2,7	5,9	9 месяцев
	12.2013	- « -	- « -	8	0,9; 0,9; 1,0	2,8	5,9	1 год

Продолжение Таблицы 73

№ серии	Дата анализа	Описание	Подлинность	Распадаемость, мин	Родственные примеси, %		Количественное определение, мг	Срок хранения
Нормы по проекту ФСП		Круглые двояковыпуклые таблетки белого цвета	1.УФ-спектрометрия 2. ТСХ 3. ВЭЖХ	Не более 15	Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,0 Сумма примесей – не более 3,0			
031112	06.2014	- « -	- « -	9	0,8; 0,9; 1,0	2,7	5,8	1 год 6 месяцев
	12.2014	- « -	- « -	8	0,8; 0,9; 1,0	2,7	6,1	2 года
	06.2015	- « -	- « -	9	0,8; 0,8; 1,0	2,6	5,9	2 года 6 месяцев
030315	03.2015	Соответствует	Соответствует	8	0,7; 0,9; 0,9	2,5	5,5	Входной контроль
	06.2015	То же	То же	8	0,8; 0,9; 0,9	2,6	5,4	3 месяца
	09.2015	- « -	- « -	7	0,7; 0,9; 0,9	2,5	5,5	6 месяцев
	03.2016	- « -	- « -	8	0,8; 0,9; 0,9	2,6		3 месяца
	03.2016	- « -	- « -	7	0,7; 0,8; 1,0	2,5	5,4	1 год
	09.2016	- « -	- « -	8	0,7; 0,8; 0,9	2,4	5,6	1 год 6 месяцев
	03.2017	- « -	- « -	7	0,8; 0,8; 0,9	2,5	5,4	2 года
09.2017	- « -	- « -	7	0,7; 0,8; 0,9	2,4	5,5	2 года 6 месяцев	

Примечание – По показателям «Средняя масса и однородность по массе» и «Однородность дозирования», «Микробиологическая чистота» все серии ЛС соответствовали требованиям проекта ФСП

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7

1. Разработаны методики контроля качества таблеток цифетрилина. Показана возможность определения подлинности цифетрилина методами УФ-спектрометрии и хроматографическими методами (ТСХ и ВЭЖХ) и установлена приемлемость разработанных методик по критериям специфичность и предел обнаружения: методики позволяют определять цифетрилин в лекарственной форме в присутствии вспомогательных веществ.

2. Для количественного определения цифетрилина в лекарственной форме разработана методика прямого спектрофотометрического определения. Валидация подтвердила специфичность методики – показано, что вспомогательные вещества не влияют на спектральные характеристики цифетрилина.

3. Линейность определена экспериментально – установлено, что результаты количественного определения цифетрилина в лекарственной форме описываются линейной зависимостью по уравнению  $y = 0,0603 x - 0,0199$ , а коэффициент корреляции  $r$  равен  $0,9980$ , то есть соответствует условию  $|r| \geq 0,99$ .

4. Среднее значение содержания цифетрилина в изученных образцах таблеток составило 5,98 мг, что находится в пределах нормы, установленной в спецификации (5,40–6,60 мг), а относительная ошибка среднего результата не превышала 2,0%.

5. Статистический анализ полученных данных показал, что методика количественного определения цифетрилина в таблетках может считаться правильной, поскольку средние значения результатов в трипликатах близки к истинному и лежат внутри доверительного интервала ( $99,28 \pm 1,63$ ) %.

6. Диапазон концентраций (70–130%), использованный при определении валидационных характеристик, подтвердил возможность применения методики количественного определения в тесте «Однородность дозирования».



7. При изучении условий хранения и стабильности таблеток цифетрилина в двух видах упаковки показано, что качество лекарственного средства не изменяется в течение 30 месяцев при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C.

## ГЛАВА 8. РАЗРАБОТКА ТАБЛЕТОК ЦИФЕТРИЛИНА НОВОГО СОСТАВА

### 8.1 Разработка технологии получения таблеток цифетрилина 60 мг

Клинические исследования безопасности и переносимости таблеток цифетрилина показали, что количество активного вещества в одной таблетке слишком мало и для достижения необходимой разовой дозы ЛС требуется прием большого количества таблеток (Приложение Е). Даже пациентам 1-ой когорты (стартовая доза 0,5 мг/кг) приходилось принимать от 5 до 7 таблеток одновременно. Пациенты 4-ой когорты (4 мг/кг) с высокой массой тела получали до 60 таблеток ежедневно. Кроме того, содержание в качестве ВВ значительного количества лактозы приводило к выраженным нежелательным явлениям реакциям у пациентов с гиполактазией. Вышесказанное потребовало разработки таблетированной ЛФ цифетрилина с увеличенной дозой активного вещества [120].

На первом этапе исследований предприняли попытку получить таблетки цифетрилина при прямом прессовании субстанции без использования ВВ. АФС цифетрилина хорошо прессовалась, но полученные при этом таблетки не соответствовали требованиям ГФ XIV по показателю «Распадаемость».

На следующем этапе модифицировали выбранный ранее состав таблеток (Таблица 48), увеличив в 10 раз количество цифетрилина и исключив из состава лактозу. Таблетки получали по методике, описанной в 6.2.3 *Изучение возможности использования влажного гранулирования для получения таблеток цифетрилина*. При этом получили таблетки, также не соответствующие требованиям ГФ XIV по показателю «Распадаемость» (Таблица 73, МСМ-1).

Пропорциональное увеличение количества всех ингредиентов таблетки до средней массы 250 мг (МСМ-2 и МСМ-3) не повлияло на распадаемость и прочность таблеток – они также не соответствовали требованиям ГФ XIV [27].

Для получения таблеток, соответствующих требованиям общей статьи «Таблетки» [27], их состав был полностью изменен. При этом не только увеличили количество АФС, но и ввели новые ВВ – лимонную кислоту и карбонат магния для увеличения распадаемости таблеток [36; 218; 366].

### **Методика получения модельных смесей МСМ-3 – МСМ- 8**

Рассчитанное для получения 20 таблеток количество крахмала картофельного помещали в реактор и растирали. Затем, тщательно перемешивая, постепенно добавляли остальные ингредиенты смеси. Добавляли цифетрилин (с учетом количественного содержания АВ и влаги), растирали и тщательно перемешивали, обрабатывали опудривающей смесью. Полученную массу прессовали на однопуансонном эксцентриковом таблеточном прессе Erweka (Германия) по 250 мг.

Из данных, представленных в Таблице 74, видно, что таблетки, приготовленные по прописи МСМ-4, имели хороший внешний вид, обладали удовлетворительной прочностью на раздавливание, равной 39,69 Н, и распадались в течение 3–5 минут.

Таблица 74 – Составы модельных смесей для прессования и основные фармацевтико-технологические характеристики получаемых таблеток

Ингредиенты, мг/таб	Модельная смесь (МСМ)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Цифетрилин	60	50	60	60	60	60	60	60
Лактоза моногидрат	–	120	50	–	–	50	–	15
МКЦ	5	10	–	–	–	–	–	–
Лимонная кислота	–	–	–	60	30	–	10	5
Карбонат магния	–	–	–	40	20	20	10	5
Крахмал картофельный	34	60	130	90	140	120	140	140
Повидон	5	10	–	–	–	–	–	–
Опудривающая смесь <sup>1</sup>	–	–	10	10	10	10	25	25
Описание	Таблетки белого цвета с глянцевой поверхностью и ровными, без сколов краями							
Прочность, Н	–	–	71,49	39,72	39,69	–	23,83	55,6
Распадаемость, мин	> 15	> 15	> 15	5	5	5	5	5

Примечание – <sup>1</sup>Опудривающая смесь: крахмал, стеарат магния и тальк

Последующая корректировка прописи МСМ была направлена на определение наименьших количеств ВВ, необходимых для удовлетворительной распадаемости и влияющих на стабильность и прочность таблетки. При уменьшении в 2 раза количества карбоната магния и лимонной кислоты в МСМ-5 прочность и распадаемость таблеток практически не изменились. Исключение из состава таблеток лимонной кислоты в МСМ-6 значительно повлияло на качество таблеток, которые распались за 5 минут на конгломераты (хлопья).

Таблетки, полученные по прописи МСМ-7, включали в состав минимальное количество карбоната магния и лимонной кислоты: таблетки распались за 5 минут, прочность – 23,83 Н.

Для увеличения прочности таблетки в пропись МСМ-8 добавили лактозу, пропорционально уменьшив содержание лимонной кислоты и магния карбоната. Введение в состав модельной смеси лактозы позволило добиться оптимального соотношения распадаемости таблеток и их прочности на раздавливание. Фармацевтико-технологические характеристики МСМ-8 и полученных из нее таблеток приведены в Таблице 75.

Таблица 75 – Фармацевтико-технологические характеристики МСМ-8 и полученных из нее таблеток

МСМ-8				
Насыпная плотность, г/мл		Сыпучесть, г/с		Угол естественного откоса, °
0,498		7,05 ± 0,02		38,9
Таблетки (МСМ-8)				
Распадаемость, мин	Прочность на раздавливание, Н	Прочность на истирание, %	Средняя масса, мг и однородность массы, %	Количественное определение, мг
5,5	55,6 ± 0,13	99	245; ± 1,1	60,56

По прописи МСМ-8 наработали таблетки следующего состава [93]:

*Активное вещество*

Цифетрилин	60 мг
------------	-------

*Вспомогательные вещества*

Крахмал картофельный	140 мг
Лимонная кислота	5 мг
Магния карбонат основной	5 мг
Лактоза моногидрат	15 мг
Опудривающая смесь:	25 мг
30% – тальк, 10% – магния стеарат, 60% – крахмал	
Номинальная масса таблетки	250 мг

**8.2 Разработка методик контроля качества таблеток цифетрилина 60 мг**

Оценку качества полученных таблеток нового состава проводили по разработанным ранее методикам (*ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ЦИФЕТРИЛИН ТАБЛЕТКИ 6 мг*) и в соответствии с требованиями ГФ XIV издания [27; 131].

Образцы изученных серий ЛФ цифетрилина 60 мг представляли собой белые круглые таблетки двояковыпуклой формы с ровными, без сколов, краями.

Для определения подлинности цифетрилина в таблетках 60 мг использовали методы спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии:

- УФ-спектры испытуемого раствора и раствора СО образца цифетрилина, приготовленных для количественного определения, в области от 250 до 350 нм имели максимумы поглощения при одних и тех же длинах волн;
- при просмотре хроматограммы в УФ-свете в пробе испытуемого раствора обнаруживали одно пятно сине-фиолетового цвета по положению, совокупности величины и интенсивности окраски соответствующее пятну цифетрилина в пробе стандартного образца.

*Однородность массы и Распадаемость* оценивали в соответствии с требованиями ГФ XIV [27]. Поскольку номинальная масса таблетки составляет

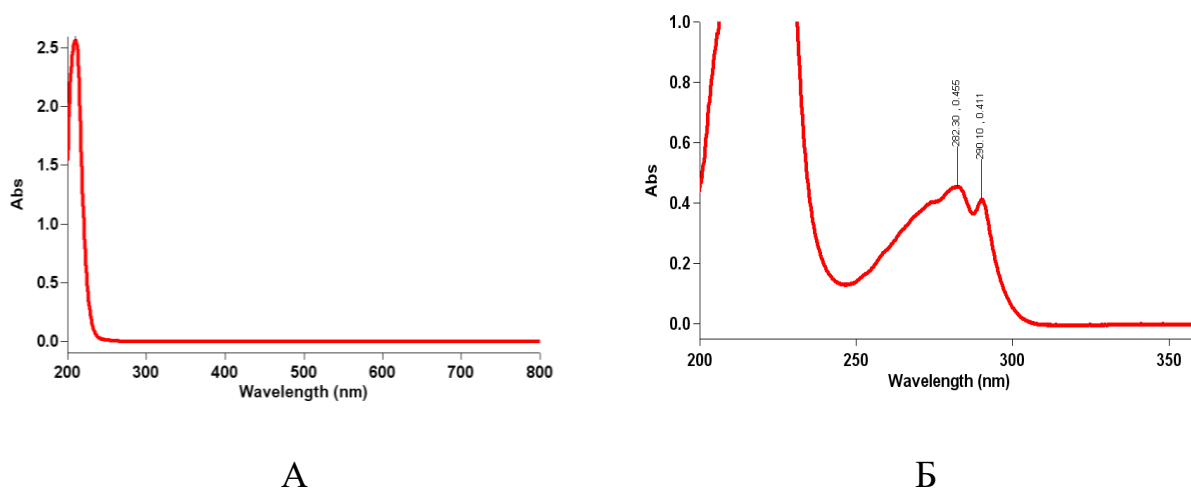
250 мг, допустимое отклонение массы отдельной таблетки от средней массы не должно превышать 5 %. Изученные серии ЛФ цифетрилина удовлетворяли указанным выше требованиям: отклонение от средней массы не превышало 1%, 2% и 1% для серий 010218, 020318 и 031218, соответственно. Время распадаемости таблеток исследованных серий не превышало 15 минут и составило 9, 10 и 8 минут для серий 010218, 020318 и 031218, соответственно (Таблица 76).

Определение *родственных примесей* проводили методом ВЭЖХ на аналитическом жидкостном хроматографе по разработанной ранее методике. Содержание любой неидентифицированной примеси в изученных сериях таблеток не превышало 1,0%, а суммарное содержание примесей – 3,0%. Для приготовления *испытуемого раствора* таблетку растирали в ступке и помещали в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 30 мл ПФ и перемешивали с помощью шейкера в течение 2 мин. Около 3 мл полученной суспензии помещали во флакон для автосамплера вместимостью 4 мл, центрифугировали при скорости вращения ротора 2000 об/мин в течение 2 мин. 200 мкл надосадочной жидкости переносили во флакон для хроматографирования и прибавляли 600 мкл ПФ, перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным. Далее поступали, как описано в *Методике определения родственных примесей в АФС цифетрилин*.

Для **количественного определения** содержания цифетрилина в ЛФ нового состава разработали методику спектрофотометрического определения вещества с использованием СО. В качестве СО использовали АФС, из которой получены серии испытуемой ЛФ.

Следует отметить, что ВВ, входящие в ЛФ нового состава мало растворимы в спирте этиловом 95%, что существенно затрудняет проведение анализа. Для увеличения прозрачности испытуемого раствора и раствора сравнения к навескам растертых таблеток прибавляли 5 мл воды, а затем – необходимое количество спирта этилового 95% (комбинированный растворитель). Установлено, что раствор ВВ таблеток цифетрилина нового состава в области от 250 нм до 350 нм

не имеет собственного поглощения (Рисунок 56, А) и, следовательно, ВВ не будут влиять на спектральные характеристики АВ (Рисунок 56, Б).



А - раствор ВВ таблеток цифетрилина нового состава; Б – раствор цифетрилина в спирте этиловом 95% (0,008 мг/мл)

Рисунок 56 – Электронный спектр поглощения раствора цифетрилина в спирте этиловом 95 %

### **Методика**

*Испытуемый раствор.* Около 250 мг (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 5 мл воды очищенной, перемешивают. К полученной суспензии прибавляют около 20 мл этилового спирта 95%, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём этиловым спиртом 95% до метки, перемешивают. Колбу помещают на 3 мин в ультразвуковую ванну, а затем выдерживают 30 мин при комнатной температуре. 5 мл надосадочной жидкости помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём этиловым спиртом 95% до метки, перемешивают.

*Смесь ВВ.* 560 мг крахмала картофельного, 20 мг магния карбоната, 20 мг лимонной кислоты, 60 мг лактозы моногидрата, 100 мг опудривающей смеси (30 мг талька, 10 мг магния стеарата и 60 мг крахмала картофельного) помещают в фарфоровую ступку и растирают.

*Раствор сравнения.* Около 190 мг (точная навеска) смеси ВВ помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 5 мл воды очищенной, перемешивают. Далее поступают, как описано при приготовлении испытуемого раствора со слов «...к полученной суспензии прибавляют...».

*Раствор стандартного образца.* Около 6 мг (точная навеска) СО цифетрилина и 10 мл надосадочной жидкости (см. приготовление раствора сравнения) помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют около 20 мл этилового спирта 95%, перемешивают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём этиловым спиртом 95% до метки, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора относительно раствора сравнения на спектрофотометре в максимуме при длине волны  $(282 \pm 2)$  нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца относительно раствора сравнения.

Содержание цифетрилина в таблетке в миллиграммах (X, мг) рассчитывают по формуле (16):

$$X = \frac{A \times a_0 \times G \times P \times 100 \times 50}{A_0 \times a \times 5 \times 100 \times 100} = \frac{A \times a_0 \times G \times P}{A_0 \times a \times 10} \quad (16)$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_0$  – оптическая плотность раствора стандартного образца;

a – навеска испытуемого образца, мг;

$a_0$  – навеска стандартного образца, мг;

G – средняя масса таблетки, мг;

P – содержание цифетрилина в стандартном образце, %.

Содержание  $C_{52}H_{69}N_7O_{12}S$  (цифетрилина) в одной таблетке укладывалось в пределы от 56 до 64 мг.

Анализ лабораторных образцов, модельных смесей и серий лекарственного средства, наработанных для доклинических исследований, позволил разработать проект нормативного документа по качеству таблеток цифетрилина 60 мг.



Данные контроля качества трех серий таблеток цифетрилина 60 мг, представленные в Таблице 76, свидетельствуют о том, что ЛС соответствует разработанной спецификации.

Таблица 76 – Основные показатели качества ЛС цифетрилин таблетки 60 мг

Показатель	Нормы по проекту НД	Серия		
		010218	020318	031218
Описание	Круглые двойковыпуклые таблетки белого цвета	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Подлинность	1. УФ-спектрометрия 2. ТСХ 3. ВЭЖХ	Положительная	Положительная	Положительная
Средняя масса, мг; однородность массы, %	От 237 до 265; Отклонение массы от средней $\pm 5$	247; $\pm 1$	245; $\pm 2$	245; $\pm 1$
Распадаемость, мин	Не более 15	9	10	8
Родственные примеси, %	Любая единичная неидентифицирован ная примесь – не более 1,0	0,3; 1,0	0,8; 1,0	0,8; 1,0
	Сумма примесей – не более 3,0	1,3	1,8	1,8
Количественное определение, мг	От 57,0 до 63,0	62,5 $\pm$ 3,4	60,6 $\pm$ 2,2	61,6 $\pm$ 3,1

### 8.3 Изучение условий хранения и стабильности таблеток цифетрилина 60 мг

Изучение стабильности таблеток цифетрилина 60 мг проводили по результатам контроля качества ЛС серий 010218, 020318 и 031218, произведенных ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для определения срока годности. Образцы таблеток хранили в первичной упаковке – пластиковой банке цилиндрической формы из полиэтилена высокой плотности вместимостью 20 мл с горловиной с винтовой резьбой, укупоренной навинчиваемой пластиковой крышкой. Исследование стабильности проводили в

естественных условиях при температуре от 2 до 8°C и контролируемой относительной влажности  $60\% \pm 5\%$ .

Контроль качества таблеток проводили по выбранным критериям: внешний вид, подлинность, распадаемость, родственные примеси, количественное определение. Данные, представленные в Таблице 77, свидетельствуют о том, что качество ЛС цифетрилин таблетки 6 мг в заявленной упаковке и условиях остается без изменений в течение полутора лет.

Таблица 77 – Результаты исследования стабильности ЛС цифетрилин таблетки 60 мг

Упаковка – Банки пластиковые с горловиной с винтовой резьбой и навинчивающейся крышкой

Условия хранения – В сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C

№ серии	Дата анализа	Описание	Подлинность	Распадаемость, мин	Родственные примеси, %		Количественное определение, мг	Срок хранения
Нормы по проекту ФСП					Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,0 Сумма примесей – не более 3,0	сумма		
010218	02.2018	Соответствует	Соответствует	9	0,3; 1,0	1,3	62,5	Входной контроль
	05.2018	То же	То же	9	0,4; 1,0	1,4	62,3	3 месяца
	08.2018	- « -	- « -	8	0,3; 0,9	1,3	62,0	6 месяцев
	11.2018	- « -	- « -	9	0,3; 1,1	1,4	62,4	9 месяцев
	02.2019	- « -	- « -	9	0,4; 1,0	1,4	62,3	1 год
	06.2019	- « -	- « -	8	0,4; 1,1	1,5	62,4	1 год 6 месяцев
020318	03.2018	Соответствует	Соответствует	10	1,0; 0,8	1,8	60,6	Входной контроль
	06.2018	То же	То же	9	1,0; 0,9	1,9	60,7	3 месяца
	09.2018	- « -	- « -	10	1,0; 0,9	1,9	60,5	6 месяцев
	12.2018	- « -	- « -	9	0,9; 0,9	1,8	60,8	9 месяцев
	03.2019	- « -	- « -	9	1,0; 0,9	1,9	60,2	1 год
	06.2019	- « -	- « -	10	0,9; 0,9	1,8	60,7	1 год 6 месяцев

Продолжение Таблицы 77

№ серии	Дата анализа	Описание	Подлинность	Распадаемость, мин	Родственные примеси, %		Количественное определение, мг	Срок хранения
Нормы по проекту ФСП					Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,0 Сумма примесей – не более 3,0			
			Круглые двояковыпуклые таблетки белого цвета	1.УФ-спектрометрия 2. ТСХ 3. ВЭЖХ	Не более 15	единичная	сумма	
031218	12.2018	Соответствует	Соответствует	8	0,8; 1,0	1,8	61,6	Входной контроль
	03.2019	То же	То же	8	0,8; 1,0	1,8	62,1	3 месяца
	06.2019	- « -	- « -	9	0,9; 1,0	1,9	61,9	6 месяцев
	09.2019	- « -	- « -	8	0,7; 0,9	1,6	61,8	9 месяцев
	12.2019	- « -	- « -	8	0,7; 1,0	1,7	61,6	1 год
	06.2020	- « -	- « -	9	0,9; 1,0	1,9	61,7	1 год 6 месяцев

Примечание – По показателям «Средняя масса и однородность по массе», «Микробиологическая чистота» все серии ЛС соответствовали требованиям проекта ФСП

#### 8.4 Оценка противоопухолевой активности таблеток цифетрилина 60 мг

Изучение противоопухолевой активности таблеток цифетрилина нового состава в сравнении с АФС проводили на аденокарциноме молочной железы Ca755.

Данные, представленные в Таблице 78, свидетельствуют о том, что таблетки цифетрилина 60 мг в изученных дозах демонстрировали высокий противоопухолевый эффект сразу после окончания введения ЛС. При этом противоопухолевый эффект постепенно снижался, но оставался значимым до 12 дня после окончания введения ЛС – 71% и 75% ТРО и соответствовал результатам, полученным при введении АФС (91–76%, соответственно). Следует отметить, что на Ca755 статистически значимый противоопухолевый эффект АФС сохранялся и на 16 день после окончания введения ЛС (ТРО = 77%), тогда как для таблеток через две недели после окончания введения ЛС он значительно снижался до 41% и 51%, соответственно.

Таблица 78 – Противоопухолевая активность таблеток цифетрилина нового состава на Ca755 мышей при ежедневном пероральном введении в течение 5 дней

Группа	Доза, мг/кг	ТРО, % (дни после окончания введения ЛС)				
		1	4	8	12	16
Таблетки 60 мг	50	96 <sup>1</sup>	79 <sup>1</sup>	86 <sup>1</sup>	71 <sup>1</sup>	41
	100	97	96	87	75	51
Цифетрилин, АФС	50	91	84	78	76	77

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

#### ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 8

1. Разработаны таблетки цифетрилина нового состава: количество цифетрилина увеличено в 10 раз (до 60 мг/таблетка). Введение в состав таблеток новых вспомогательных веществ – карбоната магния и лимонной кислоты, а также незначительного количества лактозы – позволило добиться оптимального

соотношения распадаемости таблеток (5,5 мин) и их прочности на раздавливание ( $55,6 \pm 0,13\text{Н}$ ).

Установлено, что прямое прессование позволяет получать таблетки цифетрилина 60 мг, соответствующие требованиям ГФ XIV и спецификации.

2. Показано, что разработанные ранее методики контроля качества таблеток цифетрилина могут использоваться для стандартизации таблеток цифетрилина 60 мг при изменении условий пробоподготовки.

3. При изучении условий хранения и стабильности таблеток цифетрилина нового состава показано, что качество лекарственного средства остается неизменным в течение 18 месяцев (срок наблюдения) при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C.

4. Установлено, что противоопухолевая активность таблеток цифетрилина нового состава (ТРО=96–71% в течение 12 дней) не отличается от эффективности разработанных и изученных ранее таблеток цифетрилина 6 мг.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Итоги выполненного исследования.** 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 волюметрического 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

мультиядерной 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.

**Практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.** 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.

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.

## ОБЩИЕ 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%.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АВ – активное вещество

АПММ – 3-( $\alpha$ -L-арабинопиранозил-1)-1-метилмочевина

АС – аналог соматостатина

АТФ – аденозинтрифосфат

АФС – активная фармацевтическая субстанция

ВВ – вспомогательные вещества

в/бр – внутривенно

в/в – внутривенно

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ВР (в технологическом процесс, регламенте) – вспомогательные работы

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ XIV – Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЕС – Европейский Союз

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИГХ – иммуногистохимический анализ

КИ – клинические исследования

ЛВ – лекарственное вещество

лк – люкс, единица измерения освещённости

ЛМ – лактозы моногидрат

ЛП – лекарственный препарат

ЛС – лекарственное средство

ЛФ – лекарственная форма

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза

М.м. – молекулярная масса

МНН – международное непатентованное название

МС – модельная смесь

МСМ – модельная смесь модифицированная (с увеличенным содержанием цифетрилина)

МЛк – масса легкого в контроле

МЛо – масса легкого в опыте

МЛФ – модель лекарственной формы

МРЛ – мелкоклеточный рак легкого

НД – нормативная документация, нормативный документ по качеству

НММ – нитрозометилмочевина

НЭО – нейроэндокринные опухоли

ОПР – опытно-промышленный регламент

ОФС – общая фармакопейная статья

ПВ – повидон

ПЖ – поджелудочная железа

ПКО - предел количественного определения

ПО – предел обнаружения

ПЭГ - полиэтиленгликоль

РЛ –рак легкого

РНК – рибонуклеиновая кислота

РШМ5 – рак шейки матки (экспериментальная опухоль мышей)

СО – стандартный образец

СП – смесь для прессования

СТГ – соматотропный гормон

ТП – технологический процесс

ТРО – торможение роста опухолей

УПЖ – увеличение продолжительности жизни

УФ — ультрафиолетовая спектроскопия

ЦНС – центральная нервная система

ФС – Фармакопейная статья

ФСП – Фармакопейная статья предприятия

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ASHP – American Society of Hospital Pharmacists, Американское общество клинических фармацевтов

C-KIT – фактор роста стволовых клеток

CQA – Critical Quality Attribute, критичный показатель для качества продукта

FDA – Food and Drug Administration, Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США

GSPQ – N-пальмитоил-N-монометил-N,N-диметил-N,N,N-триметил-6-O-гликохитозан

Glu– глюкоза

GLUT – транспортер глюкозы

GMP – Good Manufacturing Practice, Надлежащая Производственная Практика

HD – hazardous drug, опасное лекарственное средство

H&E – гематоксилин –эозин Майера (для окрашивания)

IACR – International Agency for research of cancer World Health Organization, Международное агентство по изучению рака Всемирной организации здравоохранения

ICH – International Conference on Harmonization, международная конференция по гармонизации

IGF – инсулиноподобный фактор роста

LAR – депо-форма аналога соматостатина

L1210 – лимфолейкоз мышей

LLC – Lewis lung carcinoma

LSL – Lower Specification Limit, наименьшее предельное значение показателя качества

MGMT– метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза

mTOR – мишень связывания рапамицина

NAD<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотид



NF- $\kappa$ B – ядерный фактор, усилитель каппа-легкой цепи активированных В-клеток – белковый комплекс, контролирующий транскрипцию ДНК, продукцию цитокинов и выживаемость клеток

QA – критичный показатель качества

QbD – Quality-by-Design, качество путем разработки

QTPP – Quality Target Product Profile, целевой профиль качества продукта

PARP - polyADP-ribose polymerase, поли(АДФ-рибозы)полимераза

PBS - Phosphate buffered saline, натрий-фосфатный буфер

per os - пероральный путь введения

PDGF – platelet-derived growth factor, тромбоцитарный фактор роста

PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста

PLGA – poly(lactic-co-glycolic acid), сополимер молочной и гликолевой кислот

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia, Европейская Фармакопея

RAMM – The Risk Analysis and Mitigation Matrix, метод матрицы анализа и снижения рисков

RPN – Risk priority number, приоритет уровня риска

RT – Retention time, время удерживания

sc – subcutaneous, подкожно

SEER - Surveillance, Epidemiology and End Results, база данных по эпидемиологическому надзору США

SSTR1-5 – somatostatin receptors, рецепторы к соматостатину

STZ – стрептозотоцин

TKI – ингибитор тирозинкиназы

VEGF – vascular endothelial growth factor, васкулярный эндотелиальный фактор роста

USL – Upper Specification Limit), наибольшее предельное значение показателя качества

WHO – World Health Organisation, Всемирная Организация Здравоохранения

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Афанасьева, Д.А. Липосомальная араноза не индуцирует аутофагию / Д.А. Афанасьева, М.А. Барышникова, Ю.А. Хоченкова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14. – №1. – С. 15–18.
2. Багрова, С.Г. Производные нитрозомочевины в лечении больных нейроэндокринными опухолями. Клинический случай успешного лечения больной диссеминированной высокодифференцированной нейроэндокринной опухолью поджелудочной железы с выраженными карциноидным синдромом в четвертой линии терапии / С.Г. Багрова, Г.С. Емельянова, В.А. Горбунова и др. // Медицинский алфавит. – 2020. – № 20. – С. 38–41.
3. Барышников, А.Ю. 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.: Литтерра, 2015. – Гл. 21. – С. 95–101.
4. Барышникова, М.А. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитрозоалкилмочевин / М.А. Барышникова, Б. Альбассит, Н.С. Сапрыкина Н.С. и др. // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12. № 2. – С. 8
5. Барышникова, М.А. Роль CD95/Fas рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами / М.А. Барышникова, Н.В. Грищенко, О.С.Бурова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13. – № 3. – С. 3–8.
6. Береговых, В.В. Применение подхода, основанного на рисках, для определения критических факторов при переносе технологии в производстве лекарственных средств / В.В. Береговых, О.Р. Спицкий // Вестник РАМН. – 2014. – №9–10. – С. 117–122.
7. Борисова, Л.М. Цитотоксические аналоги цифетрилина (сообщение II) / Л.М. Борисова, М.П. Киселева, В.Н. Осипов, Л.П. Сушина, С.В.

- Устинкина, Л.И. Смирнова, З.С. Шпрах // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16. – №2. – С. 23–29.
8. Бухарова, И.К. Чувствительность к аранозе некоторых гетеротрансплантатов опухолей человека у бестимусных мышей и крыс / И.К. Бухарова, Е.С. Ревазова, Л.В. Мороз // Химиотерапия опухолей в СССР. – 1986. – № 45. – С. 164–167.
  9. Бюлер, Ф. Коллидон: поливинилпирролидон для фармацевтической промышленности / Ф. Бюлер; пер. с англ. под ред. К.В. Алексева. – Ludwigshafen: BASF. – 2001. – 310 с.
  10. Валидация аналитических методик для производителей лекарств / под ред. В.В. Береговых. – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.
  11. 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.
  12. Воскобойникова, И.В. Применение супердезинтегрантов в твердых дозированных лекарственных формах / И.В. Воскобойникова, С.Б. Авакян, Т.А. Сокольская и др. // Фармация. – 2005. – № 2. – С. 35–37.
  13. Гафтон, И.Г. Нейроэндокринные опухоли желудочно–кишечного тракта: современное состояние проблемы / И.Г. Гафтон, В.В. Семиглазов, Д.Е. Мацко и др. // Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2016. – Т. 27. – № 2. – С. 17–32.
  14. Гигиенические нормативы ГН 2.2.5.686-98 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны. Гигиенические нормативы» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>.
  15. Горбачева, Л.Б. Возможные механизмы лекарственной устойчивости к N-нитрозомочевинам (обзор) / Л.Б. Горбачева, Г.В. Кукушкина // Хим-фарм журнал. – 1987. – Т.21. – № 4. – С. 390–398.

16. Горбунова, В.А. Новые противоопухолевые препараты, созданные в России / В.А. Горбунова, Е.В. Артамонова, С.Г. Багрова и др.; под ред. В.А. Горбуновой // Этюды химиотерапии (пять лет спустя). – М.: Литтерра, 2006. – С. 54–82.
17. Горбунова, В.А. Араноза – новый отечественный противоопухолевый препарат / В.А. Горбунова, Н.Ф. Орел, О.В. Семина и др. // Вопросы онкологии. – 2001. – Т. 47. – № 6. – С. 672–67.
18. Горбунова, В.А. Высокодифференцированные нейроэндокринные опухоли (карциноиды) и нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы / В.А. Горбунова, Н.Ф. Орел, Г.Н. Егоров, А.Е. Кузьминов; под ред. В.А. Горбуновой. – М.: Литтерра. – 2007. – 104 с.
19. Горбунова, В.А. Применение Аранозы при нейроэндокринных опухолях / В.А. Горбунова, Н.Ф. Орел, А.Е. Кузьминов // Современная онкология. – 2009. – Т. 11. – № 3. – С. 58–62.
20. Горбунова, В.А. Нитруллин – новый оригинальный отечественный препарат из группы нитрозомочевины / В.А. Горбунова, Н.Ф. Орел, О.В. Семина и др. // Вопросы онкологии. – 2001. – Т. 47. – № 6. – С. 680–683.
21. Горбунова, В.А. Лизомустин – отечественный препарат из группы производных нитрозомочевины в лечении меланомы кожи / В.А. Горбунова, Л.В. Манзюк, Л.В. Демидов, Г.Ю. Харкевич // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т.13. – № 1. – С. 55–56.
22. Горбунова, В.А. Новые противоопухолевые препараты, созданные в России / В.А. Горбунова, Г.Н. Егоров, Н.С. Бесова; под ред. В.А. Горбуновой // Этюды химиотерапии. – М.: Литтерра, 2000. – С. 22–47.
23. ГОСТ Р ИСО 13408-6-2009 Асептическое производство медицинской продукции. Часть 6. Изолирующие системы. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>
24. ГОСТ Р 50779.44-2001 Статистические методы. Показатели возможностей процессов. Основные методы расчета. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>.

25. ГОСТ Р 56700-2015 Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические фармакологические исследования безопасности. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>
26. ГОСТ Р 56701-2015 Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>.
27. Государственная Фармакопея XIV. – М., 2017.
28. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [www.grls.rosminzdrav.ru](http://www.grls.rosminzdrav.ru).
29. Грищенко, Н.В. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины / Н.В. Грищенко, Б. Альбассит, М.А. Барышникова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13. – № 1. – С. 49–54.
30. Гуревич, Л.Е. Иммуногистохимическое определение экспрессии рецепторов к соматостатину 1, 2А, 3 и 5-го типов в нейроэндокринных опухолях различной локализации и степени злокачественности / Л.Е. Гуревич, Н.А. Корсакова, И.А. Воронкова и др. // Альманах клинической медицины. – 2016. – Т. 44. – №4. – С. 378–390.
31. Гуторов, С.Л. Некоторые аспекты клиники и лечения карциноида / С.Л. Гуторов // Трудный пациент. – 2006. – Т. 4. – № 1. – С. 18–23.
32. Делекторская, В.В. Нейроэндокринные опухоли пищеварительной системы: морфологические и молекулярные особенности / В.В. Делекторская // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т.2. – №1. – С. 52–60.
33. Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях / пер. с англ. под ред. М.С. Красильщиковой, И.В. Белозерцевой [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим обращения: <http://www.bio.msu.ru>.

34. Егоров, Г.Н. Роль аранозы в лечении диссеминированной меланомы / Г.Н. Егоров, В.А. Горбунова, Л.В. Манзюк и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т.3. – №4. – С. 41–45.
35. Емельянова, Г.С. Перспективы использования бевацизумаба при НЭО. Клинический случай / Г.С. Емельянова, Н. Ф. Орел, В. А. Горбунова и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Т. 16. – № 6. – С. 100–104.
36. Емшанова, С.В. Методические подходы к выбору вспомогательных веществ для получения таблетированных препаратов методом прямого прессования / С.В. Емшанова // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42. – № 2. – С. 38–43.
37. Зимакова, Н.И. Доклиническое изучение фармакокинетики лекарственной формы аналога гипоталамического гормона соматостатина (АГГ) / Н.И. Зимакова, Е.Ю. Колесникова, А.П. Будько и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. –Т. 11. – № 3. – С.33–38.
38. Зимакова, Н.И. Исследование фармакокинетики лизомустина в эксперименте и клинике / Н.И. Зимакова // Экспериментальная онкология на рубеже веков / под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. – М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. – С. 163–180.
39. Игнатьева, Е.В. Разработка и валидация методики количественного определения димерного макроциклического таннина в лекарственной форме / Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева, З.С. Шпрах и др. // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9. – №4. – С. 93–98.
40. Имянитов, Е.Н. Ангиогенез как мишень для противоопухолевой терапии / Е.Н. Имянитов // Современная онкология. – 2014. – Т.16. – № 2. – С. 28–33.
41. Клеянкина, В.В. Сравнительное исследование на мышцах эмбриотоксических свойств четырёх нитрозомочевин: НММ, ДМНМ, стрептозотоцина и аранозы / В.В. Клеянкина // Химиотерапия опухолей в СССР. – 1979. – № 30. – С. 107–111.

42. Клеянкина, В.В. Отдаленные последствия применения нитрозометилмочевины, диметилнитрозомочевины, стрептозотоцина и аранозы у беспородных крыс / В.В. Клеянкина, И.К. Бухарова, С.Ф. Юшков // Химиотерапия опухолей в СССР. – 1980. – № 32. – С. 140–145.
43. Ключкова, Т.И. Организация, масштабирование и оптимизация производства лиофилизированных препаратов / Т.И. Ключкова, З.С.Шпрах // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5. – № 3. – С. 115–122.
44. Ключкова, Т.И. Исследования по оптимизации производства и стандартизации лиофилизированных препаратов на примере противоопухолевых лекарственных средств / Т.И. Ключкова // Автореферат дисс. ... доктора фармацевтических наук: 15.00.01 / Моск. мед. акад. им. И.М. Сеченова. – Москва, 2005. – 48 с.
45. Ковалева, М.А. Рекомендации по проведению тестирования диабетогенной активности стрептозотоцина / М.А. Ковалева, Е.В. Шекунова, В.А.Кашкин и др. // Лабораторные животные для научных исследований. – 2018. – № 3. – С. 90–95.
46. Козеев, С.Г. Разработка наноструктурированной липосомальной формы аранозы / С.Г. Козеев, М.А. Барышникова, С.А. Полозкова, Н.А. Оборотова // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11. – № 2. – С. 24.
47. Козлов, А.М. Принципиальная возможность сочетанного применения препаратов одного механизма действия на примере класса алкилнитрозомочевин Н.М. Перетолчина, Г.Н. Егоров, В.А Горбунова // Этюды химиотерапии (пять лет спустя); под ред. В.А. Горбуновой. – М.: Литтерра, 2006. – С. 302–307.
48. Коняева, О.И. Предклиническое токсикологическое изучение аналога гипоталамического гормона цифетрилина / 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.

49. Кукушкина, Г.В. Нарушения в синтезе и структуре ДНК клеток лейкоза L 1210 мышей, чувствительных и резистентных к 1-метил-1-нитрозомочевине и 1,3-бис (2-хлорэтил)-1-нитрозомочевине / Г.В. Кукушкина, Н.М. Перетолчина, Е.А. Миненкова и др. // Биохимия. – 1984. – Т. 49. – № 7. – С. 1189–1198.
50. Ланцова, А.В. Разработка и изучение стерически стабилизированной липосомальной формы лизомустина / А.В. Ланцова, А.П. Полозкова, Н.М. Перетолчина и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3. – № 4. – С. 19–23.
51. Ларькина, М.С. Валидация ВЭЖХ методики анализа нового производного октреотида для диагностики нейроэндокринных опухолей / М.С. Ларькина, С.В. Кривошеков, Е.В. Подрезова и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т.53. – № 9. – С. 46–51.
52. Левит, Г.Л. N-алкилнитрозокарбамоилпроизводные аминокислот. Синтез, свойства и противоопухолевая активность (обзор) / Г.Л. Левит, Л.Б. Радина, В.П. Краснов // Хим-фарм журнал. – 1995. – Т. 29. – № 8. – С. 10–17.
53. Левит, Г.Л. N<sup>o</sup>-алкилнитрозокарбамоил- $\alpha,\omega$ -диаминокарбоновые кислоты. I. Синтез и противоопухолевая активность N<sup>o</sup>-метилнитрозокарбамоил- $\alpha,\omega$ -диаминокарбоновых кислот / Г.Л. Левит, Л.Б. Радина, В.П. Краснов и др. // Хим-фарм журнал. – 1996. – Т. 30. – № 2. – С. 7–10.
54. Левит, Г.Л. N<sup>o</sup>-алкилнитрозокарбамоил- $\alpha,\omega$ -диаминокарбоновые кислоты. II. Синтез и противоопухолевая активность нитрозопроизводных N<sup>o</sup>-(2-хлорэтил)карбамоил- $\alpha,\omega$ -диаминокарбоновых кислот / Г.Л. Левит, Л.Б. Радина, В.П. Краснов и др. // Хим-фарм журнал. – 1996. – Т. 30. – № 4. – С.15–17.
55. Левит, Г.Л. N<sup>o</sup>-алкилнитрозокарбамоил- $\alpha,\omega$ -диаминокарбоновые кислоты. III. Синтез и противоопухолевая активность N<sup>e</sup>-нитрозо-N<sup>e</sup>-[N<sup>'</sup>-(2-хлорэтил)-карбамоил]-L-лизина и N<sup>e</sup>-[N<sup>'</sup>-(2-хлорэтил)-N<sup>'</sup>-нитрозокарбамоил]-L-лизина / Г.Л. Левит, Л.Б. Радина, В.П. Краснов и др. // Хим-фарм журнал. – 1996. – Т. 30. – № 5. – С.23–25.



56. Лесная, Н.А. Эффективность и переносимость тройной комбинации с включением этопозида, цисплатина и аранозы при лечении эпидермоидной карциномы легкого Льюис у мышей / Н.А. Лесная, В.С.Покровский, В.И. Романенко и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8. – № 2. – С. 69–74.
57. Манзюк, Л.В. Лизомустин – результаты клинических исследований / Л.В. Манзюк, В.А. Горбунова, С.А. Жарков, А.Ю.Барышников // Экспериментальная онкология на рубеже веков / под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. – М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. – С. 181–200.
58. Маркович, А.А. Нейроэндокринные опухоли желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы. Принципы системной терапии (опыт лечения) / А.А. Маркович, Н.Ф. Орел, С.А. Полозкова, В.А. Горбунова // Современная онкология. – 2011. – Т. 13. – № 3. – С. 37–44.
59. Методические указания по спектрофотометрическому измерению концентраций аранозы (3(а-Z-арабинопиранозил-1)-метил-1-нитрозомочевина) в воздухе рабочей зоны. МУК 4.1.195-96 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru>.
60. Митькина, Л.И. Лекарственные средства для парентерального применения / Л.И. Митькина, З.С. Шпрах, Е.Л. Ковалева // Фармация. – 2011. – №1. – С. 3–5.
61. 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.
62. Михеевич, Е.И. Механизм цитостатического действия нового аналога соматостатина цифетрилина на культивируемые *in vitro* клетки рака молочной железы MCF-7 / Е.И. Михеевич, М.А. Красильников // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154. – № 11. – С. 629–632.

63. Михайлова, Л.М. Токсикология новых отечественных противоопухолевых препаратов (экспериментальное исследование) / Л.М. Михайлова // Автореферат дисс. ... доктора биологических наук: 14.01.12. / РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – Москва, 1995. – 48 с.
64. Моисеев, С.В. Использование метода ЯМР-спектроскопии в фармакопейном анализе / С.В. Моисеев, В.И. Крылов, Н.Е. Кузьмина и др. // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2016. – № 2. – С.53–57.
65. Можейко, Л.А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета. Часть II. Хирургический, стрептозотоциновый и дитизоновый диабет / Л.А. Можейко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2013. – № 4. – С. 5–10.
66. 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.
67. Муханов, В.И. Внутримолекулярное карбонилирование при щелочном разложении 3-гликопиранозил-1-метил-1-нитрозомочевин / В.И. Муханов, И.Л. Кустова, И.В. Ярцева и др. // Биоорганическая химия. – 1981. – Т. 10. – № 10. – С.1385–1394.
68. 65 Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>.
69. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>.

70. Нейроэндокринные опухоли. Общие принципы диагностики и лечения. Руководство / В.А. Горбунова, Т.Р. Алексеева, Д.Г. Бельцевич / под ред. В.А. Горбуновой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. – 600 с.
71. Николаева, Л.Л. Лиофилизация как способ стабилизации лекарственных препаратов (обзор) / Л.Л. Николаева, И.Д. Гулякин, О.Л. Орлова и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51. – № 4. – С. 54–59.
72. Номенклатура лекарственных форм [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.eurasiancommission.org>.
73. Оборотова, Н.А. Разработка инъекционных лекарственных форм цитостатиков с использованием растворимого поливинилпирролидона / Н.А. Оборотова, З.С. Шпрах, В.Л. Багирова и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35. – № 5. – С. 39–43.
74. 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.
75. Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03 ноября 2016 г. № 81. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.eurasiancommission.org>.
76. Одинцова, А.С. Использование сунитиниба при нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы: опыт отделения химиотерапии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ / А.С. Одинцова, В.А. Горбунова, Н.Ф. Орел и др. // Фарматека. – 2016. – Т. 17. – № 330. – С. 44–48.
77. 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.

78. 74. Осипов, В.Н. Цитотоксические аналоги цифетрилина (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.
79. Перегородиев, И.Н. Современный подход к лечению нейроэндокринных опухолей желудка / И.Н. Перегородиев, В.Ю. Бохан, И.С. Стилиди, В.В. Делекторская // Российский онкологический журнал. – 2016. –Т. 3. – № 21. – С. 165–168.
80. Перетолчина, Н.М. Араноза – новый отечественный противоопухолевый препарат из группы нитрозомочевины / Н.М. Перетолчина, О.В. Семина // Экспериментальная онкология на рубеже веков / под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. – М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. – С. 199–211.
81. Перетолчина, Н.М. Сравнительное исследование противоопухолевой активности производных нитрозоуреидо- $\alpha$ -аминокислот / Н.М. Перетолчина, Г.Н. Платонова // Химиотерапия опухолей в СССР. – 1980. – № 32. – С. 43–49.
82. Перетолчина, Н.М. Противоопухолевая активность нового противоопухолевого препарата нитруллин (сравнение с другими нитрозоалкилмочевинами) / Н.М. Перетолчина // Химиотерапия опухолей в СССР. – 1982. – № 36. – С. 228–231.
83. Перетолчина, Н.М. Доклиническое изучение противоопухолевой активности и механизма действия лизомустина / Н.М. Перетолчина, Г.К. Герасимова, А.К.Белоусова, А.Ю. Барышников // Экспериментальная онкология на рубеже веков / под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. – М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. – С. 147–160.
84. Писарев, В.Б. Механизмы токсического действия стрептозотоцина на бета-клетки островков Лангерганса / В.Б.Писарев, Г.Л. Снигур, А.А. Спасов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – № 12. – С. 700–702.

85. Покровский, В.С. Эффективность комбинаций аранозы с цисплатином и ингибиторами топоизомераз на подкожных гетеротрансплантатах рака легкого человека / В.С. Покровский, Н.А. Лесная, Н.В. Андропова, Е.М. Трещалина // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2010. – Т. 21. – № 1. – С. 35–39.
86. Покровский, В.С. Результаты доклинического изучения эффективности и переносимости комбинации топотекан + араноза на модели карциномы легкого Льюис / В.С. Покровский, Н.А. Лесная, В.И. Романенко, Е.М. Трещалина // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – № 1. – С. 159.
87. Полозкова, С.А. Араноза в монорежиме и в комбинации с капецитабином в лечении распространенных нейроэндокринных опухолей: предварительные результаты клинического исследования / С.А. Полозкова, Н.Ф. Орел, А.А. Маркович, В.А. Горбунова // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2011. – Т.22. – № 4. – С. 60–66.
88. Полозкова, С.А. Экспрессия MGMT в опухолевой ткани при лечении пациентов с нейроэндокринными опухолями режимами на основе аранозы / С.А. Полозкова, Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12. – № 4. – С. 21–26.
89. Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>.
90. Приказ Минздрава России от 1 апреля 2016 г. № 199н Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>.
91. Проїнова, В. А. Гигиеническое нормирование противоопухолевых цитостатиков в воде водных объектов / В. А. Проїнова, Г. И. Рожнов // Материалы Пленума «Угрозы здоровью человека: современные гигиенические проблемы и пути их решения». – М., 2002. – С. 186–188.

92. Промышленная фармация. Путь создания продукта: монография / Ж.И. Аладышева, В.В. Береговых, Н.Б. Демина [и др.]; под ред. А.Л. Хохлова и Н.В. Пятигорской. – М.: 2019. – 394 с.
93. Противоопухолевое лекарственное средство для перорального применения / А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Л.И. Смирнова, С.В. Устинкина, З.С. Шпрах, Е.В. Игнатъева, 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. и др. Патент на изобретение RU 2748989 С1. 06.08.2020.
94. Райхлин, Н.Т. Рецепторы соматостатина и его аналоги в диагностике и лечении опухолей человека / Н.Т. Райхлин, Е.А. Смирнова, В.В. Делекторская // Вопросы онкологии. – 2010. – Т. 56. – № 1. – С.7–13.
95. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева; 2-изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
96. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова.– М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
97. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>.
98. Руководство по валидации процесса производства лекарственных препаратов для медицинского применения. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru>.
99. Руководство по трансферу технологий и (или) аналитических методик при производстве лекарственных средств (Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии №11 от 08 июня 2021 г.). [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmvestnik.ru/documents/11-ot-08-06-2021.html>.
100. 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.
101. 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. Мусяк, М.А. Барышникова, В.М. Бухман, З.С. Шпрах, М.М. Давыдов // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15. – № 2. – С. 24–31.
102. 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. Мусяк, М.А. Барышникова, В.М. Бухман, З.С. Шпрах // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16. – № 4. – С. 55–60.
103. Смирнова, А.П. Синтез и противоопухолевая активность цифетрилина при пероральном введении / А.П. Смирнова, Л.П. Сушинина, 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.
104. Смирнова, А.П. Цифетрелин: оптимизация и масштабирование синтеза / А.П. Смирнова, Л.П. Сушинина, С.В. Устинкина, В.Н. Осипов, Л.И. Смирнова, А.П. Будько, З.С. Шпрах, И.В. Ярцева, Е.В. Игнатьева // Материалы X Всероссийской научной конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». – Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10. – №1. – С. 57.
105. Соколова, И.С. Различная чувствительность синтеза ДНК в нормальных и опухолевых клетках к действию некоторых N-алкил-N-нитрозомочевин / Соколова, И.С., Кукушкина Г.В., Горбачева Л.Б. // ДАН СССР.–Т. 245. – № 1. – С.260.

106. Спицкий, О.Р. Использование матрицы анализа и снижения рисков (РАММ) в управлении рисками для качества по GMP / О.Р. Спицкий // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2012. – № 6. – С. 24–28.
107. Способ получения 3-(1-*l*-арабинопиранозил)-1-метил-1-нитрозомочевины (аранозы) – противоопухолевого препарата / М.Н. Преображенская, Т.Д. Миникер, И.В. Ярцева и др. Патент на изобретение RU 1711456 А1. 27.02.1990.
108. Способ получения N<sup>δ</sup>-нитрозо-N<sup>δ</sup>-[(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.
109. Способ количественного определения аранозы / Р.А. Дубинский, М.С. Гойзман, М.Н. Преображенская и др. Патент на изобретение RU 1593406 А1. 16.06.1988.
110. 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 RU 2703533 С1. 21.10.2018.
111. 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 RU 2254139 С1. 20.06.2005.
112. Теоретические и практические основы лиофилизации лекарственных препаратов: монография / К. В. Алексеев, Е. В. Блынская, С. В. Тишков. – М.: 2019. – 219 с.
113. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно–практическое руководство для фармацевтической отрасли / под ред. С.Н. Быковского, И.А. Василенко, Н.Б. Деминой и др. – М.: Изд-во «Перо», 2015. – 471 с.
114. Харкевич, Г.Ю. Отечественные препараты класса производных нитрозомочевины в лечении меланомы кожи / Г.Ю. Харкевич, Г.Н. Егоров,



- Л.В. Манзюк, Л.В. Демидов // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3. – № 1. – С. 72–76.
115. Харкевич, Г.Ю. Отечественный противоопухолевый препарат Араноза в лечении пациентов с метастатической меланомой кожи – результаты проспективного рандомизированного исследования / Г.Ю. Харкевич, К.В. Орлова, И.В. Тимофеев, Л.В. Демидов // Фарматека. – 2017. – № 8. – С. 66–70.
116. Хоченков, Д.А. Новый механизм действия аранозы – блокада неоангиогенеза / Д.А. Хоченков, Н.С. Сапрыкина, М.А. Барышникова [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2015. – Т.26. – № 3. – С.71–75.
117. Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [Электронный ресурс] – Режим доступа: [www.consultant.ru](http://www.consultant.ru).
118. Шашкина, Л.Ф. Араноза – риск для фармацевтического и медицинского персонала / Л.Ф. Шашкина, М.И. Голубева, Г.И. Рожнов и др. // 5-й Рос. нац. конгр. "Человек и лекарство". – М., 1998. – С. 673.
119. Шадрина, А.В. Биофармацевтические исследования липосомального лизомустина / А.В. Шадрина, Н.М. Перетолчина, А.П. Полозкова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3. – № 1. – С. 49–53.
120. 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.
121. 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.
122. 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.
123. 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.
124. Шпрах, З.С. Доклиническое изучение противоопухолевой активности Цифетрилина 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.
125. Шпрах, З.С. Использование изоляторов в производстве противоопухолевых лекарственных средств для инъекций (на примере реконструкции с техническим перевооружением опытно-наработочной 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.
126. 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.
127. Шпрах, З.С. Определение подлинности аналога гипоталамического гормона методом спектроскопии ЯМР / З.С. Шпрах, М.И. Кодесс, Г.Л. Левит и др. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике». – Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13. – № 1. – С. 140.
128. Шпрах, З.С. Основные принципы проектирования производства противоопухолевых лекарственных средств для инъекций (на примере

- реконструкции с техническим перевооружением опытно-наработочной 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.
129. Шпрах, З.С. Основные принципы разработки проекта реконструкции с техническим перевооружением и организации производства противоопухолевых лекарственных средств для инъекций в опытно-наработочной лаборатории ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН / З.С. Шпрах // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т.4. – № 3. – С.14–19.
130. Шпрах, З.С. Разработка и валидация методики количественного определения аранозы в лекарственной форме / З.С.Шпрах, Е.В. Игнатъева, И.В. Ярцева // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17. – №2. – С. 57–62.
131. Шпрах, З.С. Разработка и валидация методики количественного определения цифетрелина в таблетках /З.С. Шпрах, Е.В. Игнатъева, И.В. Ярцева и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15. – №3. – С. 55–61.
132. Шпрах, З.С. Синтез и химико-фармацевтические характеристики аналога соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью / З.С. Шпрах, И.В. Ярцева, Е.В. Игнатъева и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т. 48. – № 3. – С.19–22.
133. Шпрах, З.С. Цифетрелин – разработка проекта ФСП на субстанцию / З.С. Шпрах, Л.И. Смирнова, А.П. Смирнова и др. // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». – Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9. – №2. – С. 84.
134. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / Под ред. З.П. Софьиной, А.Б.Сыркина и др. – М.: Медицина, 1980. – 295 с.
135. Эпштейн, Н.А. О требованиях к пригодности хроматографической системы при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом

- ВЭЖХ / Н.А. Эпштейн, С.В. Емшанова //Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42. – № 11. – С. 34–40.
136. Ярцева, И.В. Валидация методики количественного определения цифетрилина в лекарственной форме / И.В. Ярцева, Е.В. Игнатьева, 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.
137. Abdel-Rahman, O. Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway and neuroendocrine neoplasms (NENs): prognostic and therapeutic considerations / O. Abdel-Rahman // Tumour Biol. – 2014. – Vol. 35. – No. 11. – P. 10615–10625.
138. Abrams, T.J. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer / T.J. Abrams, L.B. Lee, L.J. Murray et al. // Mol Cancer Ther. – 2003. – Vol. 2. – No. 5. – P. 471–478.
139. Adelman, D.T. Evaluation of long-acting somatostatin analog injection devices by nurses: a quantitative study / D.T. Adelman, A. Burgess, P.R. Davies // Med Devices (Auckl). – 2012. – Vol. 5. – P. 103–109.
140. Adelman, D.T. Co-Creation of a Lanreotide Autogel/Depot Syringe for the Treatment of Acromegaly and Neuroendocrine Tumours Through Collaborative Human Factor Studies / D.T. Adelman, D. Van Genechten, C.M. Megret et al. // Adv Ther. – 2019. – Vol. 36. – No. 12. – P. 103–109.
141. Ampofo, E. Regulatory Mechanisms of Somatostatin Expression / E. Ampolo, L. Nalbach, M.D. Menger, M.W. Laschke // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21. – No. 11. – P. 4170.
142. Anderson, R.W. Handling cytotoxic drugs – health and safety hazards / R.W. Anderson // Hospital pharmacy and the patient / Eds T. Bradley. – Dordrecht: Springer, 1983. – P. 59–73.
143. Anderson, R.W. Risk of handling injectable antineoplastic agents / R.W. Anderson, W.H. Jr. Puckett, W.J. Dana et al. // Am J Hosp Pharm. – 1982. – Vol. 39. – No. 11. – P. 1881–1887.

144. Andrews, G.P. *Advances in Solid Dosage Form Manufacturing Technology* / G.P. Andrews // *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. – 2007. – Vol. 365. – No. 1861. – P. 2935–2949.
145. Anthony, L. From somatostatin to octreotide LAR: evolution of a somatostatin analogue / L. Anthony, P.U. Freda // *Curr Med Res Opin*. – 2009. – Vol. 25. – No. 12. – P. 2989–2999.
146. Arnold, R. *Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: Chemotherapy* / R. Arnold, A. Rinke, Ch. Schmidt, L. Hofbauer // *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. – 2005. – Vol. 19. – No. 4. – P. 649–656.
147. ASHP technical assistance bulletin on handling cytotoxic drugs in hospitals / *Am J Hosp Pharm*. – 1990. – Vol. 47. – No. 5. – P. 1033–1049.
148. Athmakur, H. Carmustine loaded lactoferrin nanoparticles demonstrates an enhanced antiproliferative activity against glioblastoma in vitro / H. Athmakur, A. Kondapi // *Int J Appl Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 10. – No. 6. – P. 234–241.
149. Bak, A. Physicochemical and formulation developability assessment for therapeutic peptide delivery – a primer / A. Bak, D. Leung, S.E. Barrett et al. // *AAPS J*. – 2015. – Vol. 17. – No. 1. – P. 144–155.
150. Basu, B. Systemic therapy for neuroendocrine tumours of gastroenteropancreatic origin / B. Basu, B. Sirohi, P. Corrie // *Endocr Relat Cancer*. – 2010. – Vol. 17. – No. 1. – P. 75–90.
151. Basuroy, R. A multimodal approach to the management of neuroendocrine tumour liver metastases / R. Basuroy, R. Srirajaskanthan, J.K. Ramage // *Int J Hepatol*. – 2012. – Special issue. – 13 p.
152. Beauchesne, P. Fotemustine: a third-generation nitrosourea for the treatment of recurrent malignant gliomas / P. Beauchesne // *Cancers (Basel)*. – 2012. – Vol. 4. – No. 1. – P. 77–87.
153. Bernabeu-Martínez, M.A. Guidelines for safe handling of hazardous drugs: A systematic review / M.A. Bernabeu-Martínez, M.M. Ramos, J.M. Santos Gago et al. // *PLoS ONE*. – 2018. – Vol. 13. – No. 5. – e0197172.

154. Bethune, C. Lipid association increases the potency against primary medulloblastoma cells and systemic exposure of 1-(2-Chloroethyl)-3-Cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) in rats / C. Bethune, A. Blum, J.R. Geyer et al. // *Pharm Res.* – 1999. – Vol. 16. – No. 6. – P. 896–903.
155. Bethune, C.R. Lipid association improves the therapeutic index of lomustine [1-(2-Chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea] to suppress 36B-10 tumor growth in rats / C. Bethune, R.J. Geyer, A.M. Spence, R.J. Ho // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – No. 9. – P. 3669–3674.
156. Bi, Y. T7 peptide-functionalized PEG-PLGA micelles loaded with carmustine for targeting therapy of glioma / Y. Bi, L. Liu, Y. Lu et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2016. – Vol. 8. – No. 41. – P. 27465–27473.
157. Bissler, J.J. Everolimus therapy for angiomyolipoma in patients with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangiomyomatosis: results from EXIST-2 / J.J. Bissler, J.C. Kingswood, E. Radzikowska et al. // *J Clin Oncol.* – 2012. – Vol. 30. – No. 5 (Suppl). – P. 356–356.
158. Blumenthal, G.M. FDA approval summary: sunitinib for the treatment of progressive well-differentiated locally advanced or metastatic pancreatic neuroendocrine tumors / G.M. Blumenthal, P. Cortazar, J.J. Zhang et al. // *Oncologist.* – 2012. – Vol. 17. – No. 8. – P. 1108–1113.
159. Bodell, W.J. Levels and distribution of BCNU in GBM tumors following intratumoral injection of DTI-015 (BCNU-ethanol) / W.J. Bodell, A.P. Bodell, D.D.B. Giannini // *Neuro-Oncology.* – 2007. – Vol. 9. – No. 1. – P. 12–19.
160. Boer De, A.H. Studies on tableting properties of lactose. Part III. The consolidation behaviour of sieve fractions of crystalline alpha-lactose monohydrate / De A.H. Boer, H. Vromans, C.F. Lerk // *Pharm. Weekbl Sci.* – 1986. – Vol. 8. – No. 2. – P. 145–150.
161. Bolzan, A.D. Genotoxicity of Streptozotocin / A.D. Bolzan, M.S. Bianchi // *Mutat Res.* – 2002. – Vol. 512. – No. 2–3. – P. 121–134.

162. Borga, C. Treatment personalization in gastrointestinal neuroendocrine tumors / C. Borga, G. Businello, S. Murgioni et al. // *Curr Treat Options in Oncol.* – 2021. – Vol. 22. – No. 29. – P. 1–14.
163. Borie, R. Activation of somatostatin receptors attenuates pulmonary fibrosis / R. Borie, A. Fabre, F. Prost et al. // *Thorax.* – 2008. – Vol. 63. – No. 3. – P. 251–258.
164. Boscaro, M. Treatment of pituitary-dependent Cushing's disease with the multireceptor ligand somatostatin analog pasireotide (SOM230): a multicenter, phase II trial / M. Boscaro, W.H. Ludlam, B. Atkinson et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2009. – Vol. 94. – No. 1. – P. 115–122.
165. Bota, D.A. Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel) wafers in the treatment of malignant gliomas / D.A. Bota, A. Desjardins, J.A. Quinn et al. // *Ther Clin Risk Manag.* – 2007. – Vol. 3. – No. 5. – P. 707–715.
166. Bousquet, C. Current scientific rationale for the use of somatostatin analogs and mTOR inhibitors in neuroendocrine tumor therapy / C. Bousquet, C. Lasfargues, M. Chalabi et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol. 97. – No. 3. – P. 727–737.
167. Boussaha, T. Digestive neuroendocrine tumors (DNET): the era of targeted therapies / T. Boussaha, P. Rougier, J. Taieb, C. Lepere et al. // *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 37. – No. 2. – P. 134–141.
168. Boyce, M. Gastric neuroendocrine tumors: prevalence in Europe, USA, and Japan, and rationale for treatment with a gastrin/CCK2 receptor antagonist / M. Boyce, L. Thomsen // *Scand J Gastroenterol.* – 2015. – Vol. 50. – No. 5. – P. 550–559.
169. Brem, H. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas / H. Brem, S. Piantadosi, P.C. Burger et al. // *Lancet.* – 1995. – Vol. 345. – No. 8956. – P. 1008–1012.
170. Brentjens, R. Islet cell tumors of the pancreas: the medical oncologist's perspective / R. Brentjens, L. Saltz // *Surgical Clinics of North America.* – 2001. – Vol. 81. – No. 3. – P. 527–542.

171. Bruns, C. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile / C. Bruns, I. Lewis, U. Briner et al. // *Eur J Endocrinol.* – 2002. – Vol. 146. – No. 5. – P. 707–716.
172. Builders, P.F. Pharmaceutical applications of native starch in conventional drug delivery / P.F. Builders, M.I.Arhewoh // *Starch.* – 2016. – Vol. 68. – No. 9-10. – P. 864–873.
173. 166 Capozzi, M. Antiangiogenic Therapy in Pancreatic Neuroendocrine Tumors / M. Capozzi, C. Von Arx, C. DE Divitiis et al. // *Anticancer Research.* – 2016. – Vol. 36. – No. 10. – P. 5025–5030.
174. Catena, L. Mammalian target of rapamycin expression in poorly differentiated endocrine carcinoma: clinical and therapeutic future challenges / L. Catena, E. Bajetta, M. Milione et al. // *Target Oncol.* – 2011. – Vol. 6. – No. 2. – P. 65–68.
175. Cescato, R. Agonist-biased signaling at the sst2A receptor: the multi-somatostatin analogs KE108 and SOM230 activate and antagonize distinct signaling pathways / R. Cescato, K.A. Loesch, B. Waser et al. // *Mol Endocrinol.* –2010. – Vol. 24. – No. 1. – P. 240–249.
176. Chan, J.A. Prospective study of bevacizumab plus temozolomide in patients with advanced neuroendocrine tumors / J.A. Chan, K. Stuart, C.C. Earle et al. // *J Clin Oncol.* – 2012. – Vol. 30. – No. 24. – P.2963–2968.
177. Chieffo, C. Efficacy and safety of an octreotide implant in the treatment of patients with acromegaly / C. Chieffo, D. Cook, Q. Xiang, L.A. Frohman et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2013. – Vol. 98. – No. 10. – P. 4047–4054.
178. Cingarlini, S. Profiling mTOR pathway in neuroendocrine tumors / S. Cingarlini, M. Bonomi, V. Corbo // *Target Oncol.* – 2012. – Vol.7. – No. 3. – P. 183–188.
179. Couvelard, A. Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression / A. Couvelard, D. O'Toole, H. Turley et al. // *Br J Cancer.* – 2005. – Vol. 92. – No. 1. – P. 94–101.



180. Crabtree, J.S. Clinical and preclinical advances in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor therapy / J.S. Crabtree // *Front Endocrinol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 341.
181. Cueto, A. Neuroendocrine tumors of the lung: hystological classification, diagnosis, traditional and new therapeutic approaches / A. Cueto // *Curr Med Chem.* – 2014.– Vol. 21. – No. 9. – P. 1107–1116.
182. D'Alpino, P.R. Outcomes of patients treated with capecitabine and temozolamide for advanced pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs) and non-PNETs / P.R. D'Alpino, K.L. Noonan, P. Pavlovich et al. // *J Gastrointest Oncol.* – 2014. – Vol.5. – No. 4. – P. 247–252.
183. Dang, W. Morphological characterization of polyanhydride biodegradable implant gliadel during in vitro and in vivo erosion using scanning electron microscopy / W. Dang, T. Daviau, H. Brem // *Pharm Res.* – 1996. – Vol. 13. – No. 5. – P. 683–691.
184. Dasari, A. Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the United States / A. Dasari, C. Shen, D. Halperin et al. // *JAMA Oncol.* – 2017. – Vol. 10. – No. 3. – P. 1335–1342.
185. Dasgupta, P. Lipophilization of somatostatin analog RC-160 with long chain fatty acid improves its antiproliferative and antiangiogenic activity *in vitro* / P. Dasgupta, R. Mukherjee // *Br J Pharmacol.* – 2000. – Vol. 129. – No. 1. – P. 101–109.
186. *Developing Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice* / Edited by Y. Qiu, Y. Chen, G. G. Z. Zhang et al. – NY.: Elsevier Inc., 2009. – P.117–118
187. Dilz, L.M. Streptozocin/5-fluorouracil chemotherapy is associated with durable response in patients with advanced pancreatic neuroendocrine tumours / L.M. Dilz, T. Denecke, I.G. Steffen et al. // *Eur J Cancer.* – 2015. – Vol. 51. – No. 10. – P. 1253–1262.
188. 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 // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 12. – No. 6. – P. 65–68.
189. Domb, A.J. Preparation and characterization of carmustine-loaded polyanhydride wafers for treating brain tumors / A.J. Domb, Z.H. Israel, O. Elmalak et al. // *Pharm Res*. – 1999. – Vol. 16. – No. 5. – P. 762–765.
190. Dorkoosh, F.A. Peroral absorption of octreotide in pigs formulated in delivery systems on the basis of superporous hydrogel polymers / F.A. Dorkoosh, J.C. Verhoef, J.H. Verheijden et al. // *Pharm Res*. – 2002. – Vol.19. – No. 10. – P. 1532–1536.
191. EDQM Standard Terms database [Electronic source] – Available at: <https://standardterms.edqm.eu>.
192. Elder, D.P. Pharmaceutical excipients – Quality, regulatory and biopharmaceutical considerations // D.P. Elder, M. Kuentz, R. Holm // *Eur J Pharm Sci*. – 2016. – No. 87. – P. 88–99.
193. Eriksson, B. Consensus guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine tumors well-differentiated jejunal-ileal tumor/carcinoma / B. Eriksson, G. Klöppel, E. Krenning et al. // *Neuroendocrinology*. – 2008. – Vol. 87. – No. 1. – P. 8–19.
194. Estey, T. BSA degradation under acidic conditions: a model for protein instability during release from PLGA delivery systems / T. Estey, J. Kang, S.P. Schwendeman et al. // *J Pharm Sci*. – 2006. – Vol. 95. – No. 7. – P. 1626–1639.
195. Esther, G.-A. M. Three weeks release BCNU loaded hydrophilic-PLGA microspheres for interstitial chemotherapy: development and activity against human glioblastoma cells / G.-A. M. Esther, I. González-Alvarez, L. Gutiérrez-Paúls et al. // *J Microencapsul*. – 2008. – Vol. 25. – No. 8. – P. 561–568.
196. Etuk, E.U. Animals for studying diabetes mellitus / E.U. Etuk // *Agric J Biol J N Am*. – 2010. – No. 1(2). – P. 130–134.
197. *European Pharmacopoeia, Tenth Edition*. – 2019.

198. Faggiano, A. The safety of available treatments options for neuroendocrine tumors / A. Faggiano, F. Lo Calzo, G. Pizza et al. // *Expert Opin Drug Saf.* – 2017. – Vol. 16. – No. 10. – P. 1149–1161.
199. Faivre, S. Sunitinib in pancreatic neuroendocrine tumors: updated progression-free survival and final overall survival from a phase III randomized study / S. Faivre, P. Niccoli, D. Castellano et al. // *Ann Oncol.* – 2017. – Vol. 28. – No. 2. – P. 339–343.
200. Faivre, S. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development / S. Faivre, G. Demetri, W. Sargent et al. // *Nat Rev Drug Discov.* – 2007. – Vol. 6. – No. 9. – P. 734–745.
201. Feelders, R.A. Pasireotide alone or with cabergoline and ketoconazole in Cushing's disease / R.A. Feelders, C. de Bruin, A.M. Pereira et al. // *N Engl J Med.* – 2010. – Vol. 362. – No. 19. – P. 1846–1848.
202. Fendrich, V. Surgical management of pancreatic endocrine tumors / V. Fendrich // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 6. – No. 7. – P. 419–428.
203. Fisusi, F.A. Lomustine nanoparticles enable both bone marrow sparing and high brain drug levels - a strategy for brain cancer treatments / F.A. Fisusi, A. Siew, K.W. Chooi et al. // *Pharmaceut. Res.* – 2016. – Vol. 33. – No. 5. – P. 1289–1303.
204. Fleming, A.B. Pharmacokinetics of the carmustine implant / A.B. Fleming, W.M. Saltzman // *Clin Pharmacokinet.* – 2002. – Vol. 41. – No. 6. – P. 403–419.
205. Fotemustine solid lipid nanoparticle and preparation method thereof. Patent CN101606907 B, China. 11.05.2011.
206. Francis, L. Containment Considerations for Toxic and Potent Aseptic Liquid Filling Pharm./ L. Francis // *Pharm Eng.* – 2007. – Vol. 27. – No. 3. – P. 1127–1128.
207. Fransman, W. Leukemia from dermal exposure to cyclophosphamide among nurses in the Netherlands: quantitative assessment of the risk / W. Fransman, W. Kager, T. Meijster et al. // *Ann Occup Hyg.* – 2014. – № 5858. – P. 271–282.

208. Fransman, W. Nurses with dermal exposure to antineoplastic drugs: reproductive outcomes / W. Fransman, N. Roeleveld, S. Peelen et al. // *Epidemiology*. – 2007. – No.18. – P. 112–119.
209. *Freeze Drying of Pharmaceutical Products*. 1st Edition / Edited by D. Fissore, R. Pisano, A. Barresi. – Fl.: CRC Press, 2021. – 212 p.
210. Frilling, A. Neuroendocrine tumor disease: an evolving landscape / A. Frilling, G. Akerström, M. Falconi et al. // *Endocrine-Related Cancer*. – 2012. – Vol.18. – No. 5. – P. 163–185.
211. Furman, B.L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats / B.L. Furman // *Curr Protoc Pharmacol*. – 2015. – Vol.70. – No. 1. – P. 5.47.1–5.47.20.
212. Gadelha, M.R. A subcutaneous octreotide hydrogel implant for the treatment of acromegaly / M.R. Gadelha, C. Chieffo, S.A. Bai et al. // *Endocr Pract*. – 2012. – Vol. 18. – No. 6. – P. 870–881.
213. Gaikwad, S.S. Review on Tablet in Tablet techniques / S.S. Gaikwad, S.J. Kshirsagar // *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci*. – 2020. – Vol. 9. – No. 1. – P. 1–7.
214. Geis, C. Ideal neuroendocrine tumors show elevated activation of mammalian target of rapamycin complex / C. Geis, V. Fendrich, P. Rexin et al. // *J Surg Res*. – 2014. – Vol. 194. – No. 2. – P. 388–393
215. Gnewuch, C.T. A critical appraisal of the evolution of N-nitrosoureas as anticancer drugs / C.T. Gnewuch, G. Sosnovsky // *Chem Rev*. – 1997. – Vol. 97. – No. 3. – P.829–1013.
216. Gobeaux, F. Structural role of counterions adsorbed on self-assembled peptide nanotubes / F. Gobeaux, N. Fay, C. Tarabout et al. // *J Am Chem Soc*. – 2012. – Vol.134. – No. 1. – P. 723–733.
217. Gobeaux, F. Experimental observation of double-walled peptide nanotubes and monodispersity modeling of the number of walls / F. Gobeaux, N. Fay, C. Tarabout et al. // *Langmuir*. – 2013. – Vol. 29. – No. 8. – P. 2739–2745.
218. Gohel, M. A review of co-processed directly compressible excipients / M. Gohel, P.D. Jogani // *J Pharm Pharmaceut Sci*. – 2005. Vol 8. –No. 1. – P. 76–93

219. Golor, G. A first-in-man study to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of pasireotide (SOM230), a multireceptor-targeted somatostatin analog, in healthy volunteers / G. Golor, K. Hu, M. Ruffin et al. // *Drug Des Devel Ther.* – 2012. – No. 6. – P.71–79.
220. Gomes-Porras, M. Somatostatin Analogs in Clinical Practice: a Review / M. Gomes-Porras, J. Cárdenas-Salas, C. Álvarez-Escolá // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21. – No. 5. – P. 1682 – 1709.
221. Graham, M.L. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources / M.L. Graham, J.L. Janecek, J.A. Kittredge et al. // *Comp Med.* – 2011. – Vol. 61. – No. 4. – P. 356–360.
222. Günther, T. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature / T. Günther, G. Tulipano, P. Dournaud et al. // *Pharmacol Rev.* – 2018. – Vol. 70. – No. 4. – P. 763–835.
223. Haider, R. Streptozotocin-induced cytotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 Cells / R. Haider, J. Annie // *Int J Mol Sci.* – 2012. – Vol. 13. – No. 5. – P. 5751–5767.
224. Hamstra, D.A. Intratumoral injection of BCNU in ethanol (DTI-015) results in enhanced delivery to tumor - a pharmacokinetic study / D.A. Hamstra, B.A. Moffat, D.E. Hall et al. // *Journal of Neuro-Oncology.* – 2005. – Vol. 73. – No. 3. – P. 225–238.
225. Harris, DC. *Quantitative Chemical Analysis*, 7th ed. – NY.: W. H. Freeman and Co., Inc., 2007. – 828 p.
226. Hassenbusch, S.J. Stereotactic injection of DTI-015 into recurrent malignant gliomas: phase I/II trial / S. J. Hassenbusch, E.M. Nardone, V.A. Levin et al. // *Neoplasia.* – 2003. – Vol. 5. – No. 1. — P. 9–16.
227. Hauso, O. Neuroendocrine tumor epidemiology: contrasting Norway and North America / O. Hauso, B.L. Gustafsson, M. Kidd et al. // *Cancer.* – 2008. – Vol. 113. – No. 10. – P. 2655–2664.

228. Hofland, L.J. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2A in human somatostatin receptor positive tumors / L.J. Hofland, Q. Liu, P.M. Van Koetsveld et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1999. – Vol. 84. – No. 2. – P. 775–780.
229. Hofland, L.J. Pre-clinical and clinical experiences with novel somatostatin ligands: advantages, disadvantages and new prospects / L.J. Hofland, J. van der Hoek, R. Feelders et al. // *J Endocrinol Invest.* – 2005. – Vol.28. – No. 11 (Suppl Inter). – P. 36–42.
230. ICH Pharmaceutical Development Q8 (R2). Part I: Pharmaceutical Development and Part II: annex to pharmaceutical development. [Electronic source]. – Available at: <https://www.ich.org>.
231. ICH Quality Risk Management Q9. [Electronic source]. – Available at: <https://www.ich.org>.
232. ICH Pharmaceutical Development Q10. Pharmaceutical Quality System. [Electronic source]. – Available at: <https://www.ich.org>.
233. ICH Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [Электронный ресурс]. – Available at: <https://www.ich.org>.
234. Isberg, E.A. Advanced Aseptic Processing: RABS and Isolator Operations / E.A. Isberg // *Pharmaceutical Engineering.* – 2007. – Vol. 27. – No. 1. – P. 1–4.
235. Jenab-Wolcott, J. Bevacizumab: current indications and future development for management of solid tumors / J. Jenab-Wolcott // *Expert Opin Biol Ther.* – 2009. – Vol. 9. – No. 4. – P. 507–517.
236. Jenkinson, M.D. Phase II trial of intratumoral BCNU injection and radiotherapy on untreated adult malignant glioma / M.D. Jenkinson, T.S. Smith, B. Haylock et al. // *Journal of Neuro-Oncology.* – 2010. – Vol. 99. – No. 1. – P.103–113.
237. Kaltsas, G.A. Treatment of advanced neuroendocrine tumours using combination chemotherapy with lomustine and 5-fluorouracil / G.A. Kaltsas, J.J. Mukherjee, A. Isidori et al. // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 2002. – Vol. 57. – No. 2. – P. 169–183.

238. Kaltsas, G.A. The Diagnosis and Medical Management of Advanced Neuroendocrine Tumors / G.A. Kaltsas, G.M. Besser, A.B. Grossman // *Endocrin. Rev.* – 2004. – Vol. 25. – No. 3. – P. 458–511.
239. Kantelhardt, S.R. Specific visualization of glioma cells in living low-grade tumor tissue / S.R. Kantelhardt, W. Caarls, A.H. de Vries et al. // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. – No. 6. – P. 11323.
240. Kawasaki, H. Recent Development of Optimization of Lyophilization Process" / H. Kawasaki, T. Shimanouchi, Yu. Kimura // *Journal of Chemistry.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 1–14.
241. Kim, G.Y. Resorbable polymer microchips releasing BCNU inhibit tumor growth in the rat 9L flank model / G.Y. Kim, B.M. Tyler, M.M. Tupper et al. // *J Control Release.* – 2007. – Vol. 123. – No. 2. – P. 172–178.
242. Kleiner, L.W. Evolution of implantable and insertable drug delivery systems / L.W. Kleiner, J.C. Wright, Y. Wang // *J Control Release.* – 2014. – No. 181. – P. 1–10.
243. Kloppel, G. Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms / G. Kloppel // *Endocr Relat Cancer.* – 2011. – Vol. 18 (Suppl. 1). – P. 1–16.
244. Kloppel, G. The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement / G. Kloppel, G. Rindi, A. Perren et al. // *Virchows Arch.* – 2010. – Vol. 456. – No. 6. – P. 595–597.
245. Konrad, R.J. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase / R.J. Konrad, I. Mikolaenko, J.F Tolar et al. // *Biochem J.* – 2001. – Vol. 356. – Pt. 1. – P. 31–41.
246. Koumarianou, A. Bevacizumab Plus Temozolomide: A Novel Treatment Option for Advanced Neuroendocrine Tumors? / A. Koumarianou, G. Kaltsas // *J Clin Oncol.* – 2013. – Vol. 31. – No. 7. – P. 975–976.

247. Koumarianou, A. Bevacizumab Plus Temozolomide: A Novel Treatment Option for Advanced Neuroendocrine Tumors? / A. Koumarianou, G. Kaltsas // *J Clin Oncol.* – 2013. – Vol. 31. – No. 7. – P. 975–976.
248. Krentz, A.J. Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes / A.J. Krentz // *Diab Obes Metab.* – 2003. – Vol.5 (Suppl 1). – P. S19–S21.
249. Kromhout, H. Postulating a dermal pathway for exposure to antineoplastic drugs among hospital workers: applying a conceptual model to the results of three workplace surveys / H. Kromhout, F. Hoek, R. Uitterhoeve // *Ann Occup Hyg.* – 2000. – No. 7(44). – P. 551–560.
250. Kulke, M.H. Future directions in the treatment of neuroendocrine tumors: consensus report of the National Cancer Institute neuroendocrine tumor clinical trials planning meeting / M.N. Kulke, L.L. Siu, J.E. Tepper et al. // *J Clin Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – No. 7. – P. 934–943.
251. Kouvaraki, M.A. Fluorouracil, doxorubicin, and streptozocin in the treatment of patients with locally advanced and metastatic pancreatic endocrine carcinomas / M.A. Kouvaraki, J.A. Ajani, P. Hoff et al. // *J Clin Oncol.* – 2004. – Vol. 22. – No. 23. – P. 4762–4771.
252. Kumar, M. Antiangiogenic effect of somatostatin receptor subtype 2 on pancreatic cancer cell line: inhibition of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 expression in vitro / M. Kumar, Z.R. Liu, L. Thapa et al. // *World J Gastroenterol.* – 2004. – Vol.10. – No. 3. – P. 393–399.
253. Kvols, L.K. Pasireotide (SOM230) shows efficacy and tolerability in the treatment of patients with advanced neuroendocrine tumors refractory or resistant to octreotide LAR: results from a phase II study / L.K. Kvols, K.E. Oberg, T.M. O'Dorisio et al. // *Endocr Relat Cancer.* – 2012. – Vol. 19. – No. 5. – P. 657–666.
254. Laklai, H. Thrombospondin-1 is a critical effector of oncosuppressive activity of sst2 somatostatin receptor on pancreatic cancer / H. Laklai, S. Laval, L. Dumartin et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2009. – Vol. 106. – No. 42. – P. 17769–17774.



255. Lane, H.A. MTOR inhibitor RAD001 (Everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor / H.A. Lane, J.M. Wood, P.M. McSheehy et al. // *Clin Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15. – No. 5. – P. 1612–1622.
256. Lawrence, B. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors / B. Lawrence, B.I. Gustafsson, A. Chan et al. // *Endocrinol Metab Clin North Am.* – 2011. – Vol. 11. – No. 1. – P. 1–18.
257. Lee, J.H. Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus / J.H. Lee, S.H. Yang, J.M. Oh, M.G. Lee // *J Pharm Pharmacol.* – 2010. – Vol. 62. – No. 1. – P. 1–23.
258. Lemoine, A. Metabolism of the chloroethylnitrosoureas / A. Lemoine, C. Lucas, R.M. Ings // *Xenobiotica.* – 1991. – Vol. 21. – No. 6. – P. 775–791.
259. Lenzen, S. The mechanism of alloxan and streptozotocin diabetes / S. Lenzen // *Diabetologia.* – 2008. – Vol. 51. – No. 2. – P. 216–226.
260. Levin, V.A. Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability / V.A. Levin // *J. Med. Chem.* – 1980. – Vol 23. – No. 6. – P. 682–684.
261. Leung, R. Advances in the systemic treatment of neuroendocrine tumors in the era of molecular therapy / R. Leung, B. Lang, H. Wong et al. // *Anticancer Agents Med Chem.* – 2013. – Vol. 13. – No. 3. – P. 382–388.
262. Lewis, A.L. Formulation strategies for sustained release of proteins / A.L. Lewis, L. Illum // *Ther Deliv.* – 2010. – Vol. 1. – No. 3. – P. 457–479.
263. Li, Q. Analysis of impurities in octreotide acetate and its injection / Q. Li; Q. Mei; Yi. Liu // *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis.* – 2017. – Vol. 37. – No. 3. – P. 492–501.
264. Li, Y. In vivo delivery of BCNU from a MEMS device to a tumor model / Y. Li, H.L. Ho Duc, B. Tyler et al. // *J Control Release.* – 2005. – Vol. 106. – No. 1–2. – P. 138–145.

265. Lin, S.H. Carmustine wafers: localized delivery of chemotherapeutic agents in CNS malignancies / S.H. Lin, L.R. Kleinberg // *Expert Rev Anticancer Ther.* – 2008. – Vol. 8. – No. 3. – P. 343–359.
266. Lokiec, F. Study of the clinical pharmacokinetics of fotemustine in various tumor indications / F. Lokiec, K. Beerblock, P. Deloffre et al. // *Bull Cancer.* – 1989. – Vol. 76. – No. 10. – P. 1063–1069.
267. Lombardi, G. Efficacy of the new long-acting formulation of lanreotide (lanreotide Autogel) in somatostatin analog-naïve patients with acromegaly / G. Lombardi, F. Minuto, G. Tamburrano et al. // *J Endocrinol Invest.* – 2009. – Vol. 32. – No. 3. – P.297–303.
268. Ludlum, D.B. Development of the Nitrosoureas / D.B. Ludlum // *Cancer Therapeutics. Cancer Drug Discovery and Development* / Eds B.A. Teicher. – NJ: Humana Press, Totowa. – 1997. – C. 81–92.
269. Ludvigsen, E. Expression and Distribution of Somatostatin Receptor Subtypes in the Pancreatic Islets of Mice and Rats / E. Ludvigsen, R. Olsson, M. Stridsberg et al. // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* – 2004. – Vol. 52. – No. 3. – P. 391–400.
270. Ludvigsen, E. Somatostatin Receptor Expression and Biological Functions in Endocrine Pancreatic Cells / E. Ludvigsen // *Ups J Med Sci.* – 2007. – Vol. 112. – No.1. – P. 1–20.
271. Maggio, E.T. Oral delivery of octreotide acetate in Intravail® improves uptake, half-life, and bioavailability over subcutaneous administration in male Swiss webster mice / E.T. Maggio, P. Grasso // *Regul Pept.* – 2011. – Vol. 167. – No. 2–3. – P. 233–238.
272. Marais, An. F. Effect of compression force, humidity and disintegrant concentration on the disintegration and dissolution of directly compressed furosemide tablets using croscarmellose sodium as disintegrant / An.F. Marais, M. Song, M.M. de Villiers // *Trop J Pharm Res.* – 2003. – Vol. 2. – No. 1. – P.125–135.

273. Massironi, S. Somatostatin analogs for gastric carcinoids: For many, but not all. / S. Massironi, A. Zilli, D. Conte // World J Gastroenterol. – 2015. – Vol. 21. – No. 22. – P. 6785–6793.
274. Mehrotra, A. Lomustine loaded chitosan nanoparticles: characterization and in-vitro cytotoxicity on human lung cancer cell line L132 / A. Mehrotra, R.C. Nagarwal, J.K. Pandit // Chem and Pharm Bull. – 2011. – Vol. 59. – No. 3. – P. 315–320.
275. Mehrotra, A. Preparation and characterization and biodistribution studies of lomustine loaded PLGA nanoparticles by interfacial deposition method / A. Mehrotra, J.K. Pandit // J Nanomed Nanotechnol. – 2015. – Vol. 6. – No. 6. – P. 328–339.
276. Melmed, S. Safety and Efficacy of Oral Octreotide in Acromegaly: Results of a Multicenter Phase III Trial / S. Melmed, V. Popovic, M. Bidlingmaier et al. // J Clin Endocrinol Metab. – 2015. – Vol. 100. – No. 4. – P. 1699–1708.
277. Mendel, D.B. *In vivo* antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship / T.J. Abrams, A.D. Laird, X. Xin et al. // Clin Cancer Res. – 2003. – Vol. 9. – No. 1. – P. 327–337.
278. Merwe, J. The Role of Functional Excipients in Solid Oral Dosage Forms to Overcome Poor Drug Dissolution and bioavailability / J. van der Merwe, J. Steenekamp, D. Steyn, J. Hamman // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 12. – No. 5. – P. 393
279. Meulemans, A. Permeability of two nitrosoureas, carmustine and fotemustine in rat cortex / A. Meulemans, B. Giroux, P. Hannoun et al. // Chemotherapy. – 1989. – Vol. 35. – No. 5. – P. 313–319.
280. Meulemans, A. Comparative diffusion study of two nitrosoureas: carmustine and fotemustine in normal rat brain, human and rat brain biopsies / A. Meulemans, B. Giroux, P. Hannoun et al. // Chemotherapy. – 1991. – Vol. 37. – No. 2. – P. 86–92.

281. Meyerhof, W. The elucidation of somatostatin receptor functions: a current view / W. Meyerhof // *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* – 1998. – No. 133. – P. 55–108.
282. Mirvis, E. Role of interferon-alpha in patients with neuroendocrine tumors: a retrospective study / E. Mirvis, D. Mandair, J. Garcia-Hernandez et al. // *Anticancer Res.* – 2014. – Vol. 34. – No. 11. – P. 6601–6607.
283. Modlin, I.M. Molecular strategies in the management of bronchopulmonary and thymic neuroendocrine neoplasms / I.M. Modlin, M. Kidd, P.L. Filosso et al. // *J Thorac Dis.* – 2017. – Vol. 9 (Suppl 15). – P. 1458–1473.
284. Modlin, I. Priorities for improving the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors / I. Modlin, S.F. Moss, D.C. Chung et al. // *J Natl Cancer Inst.* – 2008. – Vol. 100. – No. 18. – P. 1282–1289.
285. Modlin, I. Current status of gastrointestinal carcinoids / I. Modlin, M. Kidd, I. Latich et al. // *Gastroenterology.* – 2005. – Vol. 128. – No. 6. – P. 1717–1751.
286. Modlin, I.M. The archaic distinction between functioning and nonfunctioning neuroendocrine neoplasms is no longer clinically relevant / I.M. Modlin, S.F. Moss, B.I. Gustafsson et al. // *Langenbecks Arch Surg.* – 2011. – Vol. 396. – No. 8. – P. 1145–1156.
287. Modlin, I.M. Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours / I.M. Modlin, M. Pavel, M. Kidd, B.L. Gustafsson et al. // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2010. – Vol. 31. – No. 2. – P. 169–188.
288. Moertel, C.G. Streptozocin alone compared with streptozocin plus fluorouracil in the treatment of advanced islet-cell carcinoma / C.G. Moertel, J.A. Hanley, L.A. Johnson // *N Engl J Med.* – 1980. – Vol. 303. – No. 21. – P. 1189–1194.
289. Moertel, C.G. Streptozocin-doxorubicin, streptozocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma / C.G. Moertel, M. Lefkopoulo, S. Lipsitz et al. // *N Engl J Med.* – 1992. – Vol. 326. – No. 8. – P. 519–523.
290. Moody, C.L. The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs / C.L. Moody, R.T. Wheelhouse // *Pharmaceuticals.* – 2014. – Vol. 7. – No. 7. – P. 797–838.

291. Muller, F.S. Modified celluloses as multifunctional excipients in rapidly dissolving immediate release tablets / F.S. Muller // Doctoral Thesis. - Basel, 2008. – Available at: [http://edoc.unibas.ch/diss/DissB\\_8566](http://edoc.unibas.ch/diss/DissB_8566).
292. Murata, M. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin / M. Murata, A. Takahashi, I. Saito, S. Kawanishi // *Biochem Pharmacol.* – 1999. – Vol. 57. – No. 8. – P. 881–887.
293. 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» – Ekaterinburg, 2019. – P.80.
294. National Toxicology Program (NTP). Report on Carcinogens, 2016. [Electronic source]. – Available at: <https://ntp.niehs.nih.gov>.
295. Nikolin, B. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses / B. Nikolin, B. Imamović, S. Medanhodžić-Vuk, M. Sober. *Bosn J Basic Med Sci.* – 2004. – Vol. 4. – No. 2. – P. 5–9.
296. Nikula, E. Chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling cytostatic agents / E. Nikula // *Scand J Work Environ Health.* – 1984. – Vol. 10. – No. 2. – P. 71–74.
297. Neuroendocrine Tumors: Statistics [Electronic source]. – Available at: <https://www.cancer.net>.
298. NIOSH Alert: preventing occupational exposure to antineoplastic and other hazardous drugs in health care settings [Electronic source]. – 2004. – Available at: <https://www.cdc.gov>.
299. Nokhodchi, A. An Overview of the Effect of Moisture on Compaction and Compression / A. Nokhodchi // *Pharmaceutical Technology.* – 2005. – Vol. 29. – No. 1. – P. 46–66.
300. Norman, P. Vapreotide (Debipharm) / P. Norman // *I Drugs.* – 2000. – Vol. 3. – No. 11. – P. 1358–1372.

301. Norppa, H. Increased sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs / H. Norppa, M. Sorsa, H. Vainio [et al] // *Scand J Work Environ Health*. – 1980. – Vol. 6. – No. 4. – P. 299–301.
302. Öberg, K. Chemotherapy and biotherapy in the treatment of neuroendocrine tumours / K. Öberg // *Ann Oncol*. – 2001. – Vol. 12 (Suppl 2). – P. 111–114.
303. Öberg, K. Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system / K. Öberg, L. Kvols, M. Caplin et al. // *Ann Oncol*. – 2004. – Vol. 15. – No. 6. – P. 966–973.
304. Öberg, K. Gastrointestinal neuroendocrine tumors / K. Öberg // *Ann of Oncol*. – 2010. – Vol. 21 (Suppl.7). – P. 72–80.
305. Öberg, K. Interferon in the management of neuroendocrine GEP-tumors: a review / K. Öberg // *Digestion*. – 2000. – Vol. 62 (Suppl 1). – P. 92–97.
306. Öberg K. ICHand future medical therapy options / K. Öberg // *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. – 2012. – Vol. 24. – No. 4. – P. 282–293.
307. Öberg, K. Neuroendocrine gastro-entero-pancreatic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / K. Öberg, U. Knigge, D. Kwekkeboom, A. Perren // *Ann of Oncol*. – 2012. – Vol. 23 (Suppl 7). – P. 124–130.
308. Öberg, K. Neuroendocrine tumours in 2012: Insights into signalling pathways could individualize therapy / K. Öberg // *Nat. Rev. Endocrinol*. – 2013. – Vol. 9. – No. 2. – P.70–72.
309. Öberg K. Somatostatin analogues in acromegaly and gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: past, present and future / K. Öberg, St.W.J. Lamberts // *Endocrine-Related Cancer*. –2016. – Vol. **23**. – No. 12. – P. R551–R566.
310. Octreotide Implant having a release agent / P. Kuzma, S. Decker, H. Quandt U.S. Patent 8383577 B2, 11.07.2008.
311. O'Driscoll, B.R. Active lung fibrosis up to 17 years after chemotherapy with carmustine (BCNU) in childhood / B.R. O'Driscoll, P.S Hasleton, P.M. Taylor et al. // *N Engl J Med*. – 1990. – Vol. 323. – No. 6. – P. 378–382.

312. Olivi, A. Dose escalation of carmustine in surgically implanted polymers in patients with recurrent malignant glioma: new approaches to brain tumor therapy CNS consortium trial / A. Olivi, S.A. Grossman, S. Tatter et al. // *J Clin Oncol.* – 2003. – Vol. 21. – No. 9. – P.1845–1849.
313. Oronsky, B. Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas / B. Oronsky, P.C. Ma, D. Morgensztern, C.A. Carter et al. // *Neoplasia.* – 2017. – Vol. 19. – No. 12. – P. 991–1002.
314. Pandit, A. Self-assembly of the octapeptide lanreotide and lanreotide-based derivatives: the role of the aromatic residues / A. Pandit, N. Fay, L. Bordes et al. // *J Pept Sci.* – 2008. – Vol. 14. – No. 1 – P. 66–75.
315. Patel, P. Molecular challenges of neuroendocrine tumors / P. Patel, Galoian K. // *Oncol Lett.* – 2018. – Vol. 15. – No. 3. – P. 2715–2725.
316. Patel, Y. C. Somatostatin and its receptor family / Y.C. Patel // *Front Neuroendocrinol.* – 1999. – Vol. 20. – No. 3. – P. 157–198.
317. Paul, S. Comparative analyses of flow and compaction properties of diverse mannitol and lactose grades / S. Paul, S.Y. Chang, J. Dun // *Int J of Pharm.* – 2018. – Vol. 546. – No.1–2. – P. 39–49.
318. Pavel, M. ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site / M. Pavel, D. O'Toole, F. Costa et al. // *Neuroendocrinology.* – 2016. – Vol.103. – No. 1. – P.172–185.
319. Pelosi, G. Peptide receptors in neuroendocrine tumors of the lung as potential tools for radionuclide diagnosis and therapy / G. Pelosi, M. Volante, M. Papotti et al. // *Q J Nucl Med Mol Imaging.* – 2006. – Vol. 50. – No. 4. – P. 272–287.
320. Perevodchikova, N.I. Aranoza - a new nitrosourea derivative with antitumor action. Phase I-II Trials / N.I. Perevodchikova, V.A. Gorbunova, N.F. Orel [et al] // *International Journal of Experimental and Clinical Chemotherapy.* – 1992. – Vol. 5. – No. 4 – P. 231–236.
321. Petersenn, S. Pasireotide (SOM230) demonstrates efficacy and safety in patients with acromegaly: a randomized, multicenter, phase II trial / S. Petersenn, J.

- Schopohl, A. Barkan et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2010. – Vol. 95. – No. 6. – P. 278–2789.
322. Pharmaceutical compositions and related methods of delivery / P. Salama, R. Mamluk, K. Marom et al. Patent U. S. 2017112938A1. 27.04.2017.
323. Picollo, M. UV-Vis spectroscopy / M. Picollo, M. Aceto, T. Vitorino // *Physical Sciences Reviews.* – 2019. – Vol. 4. – No. 4. – P. 2018–0008.
324. Piepper, A.A. Poly(ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death / A.A. Piepper, A. Verma, J. Zhang et al. // *Trends Pharmacol Sci.* – 1999. – Vol. 20. – No. 4. – P. 171–181.
325. Pouget, E. Hierarchical architectures by synergy between dynamical template self-assembly and biomineralization / E. Pouget, E. Dujardin, A. Cavalier et al. // *Nat Mater.* – 2007. – Vol. 6. – No. 6. – P. 434–439.
326. Pouget, E. Elucidation of the self-assembly pathway of lanreotide octapeptide into beta-sheet nanotubes: role of two stable intermediates / E. Pouget, N. Fay, E. Dujardin et al. // *J Am Chem Soc.* – 2010. – Vol. 132. – No. 12. – P. 4230–4241.
327. Povoski, S.P. Induction of diabetes mellitus in Syrian golden hamsters using stored equilibrium solutions of Streptozotocin / S.P. Povoski, P.J McCullough, W. Zhou, R.H.Jr. Bell et al. // *Lab Animal Sci.* – 1993. – Vol. 43. – No. 4. – P. 310–314.
328. Process for preparing vapreotide / V.R. Palle, M.R. Challa. Patent U.S. 0111930A1, 17.05.2007.
329. Public health service policy on humane care and use of laboratory animals. U.S. Department of Health and Human Services – National Institutes of Health, Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) [Electronic source]. – 2015. – Available at: <https://grants.nih.gov>.
330. Pyronnet, S. Antitumor effects of somatostatin / S. Pyronnet, C. Bousquet, S. Najib et al. // *Mol Cell Endocrinol.* – 2008. – Vol. 286. – No. 1–2. – P. 230–237.
331. Qian, L. Cationic core-shell nanoparticles with carmustine contained within O(6)-benzylguanine shell for glioma therapy / L. Qian, J. Zheng, K. Wang et al. // *Biomaterials.* – 2013. – Vol. 34. – No. 35. – P. 8968–8978.



332. Ramanathan, R.K. Phase II trial of dacarbazine (DTIC) in advanced pancreatic islet cell carcinoma. Study of the Eastern Cooperative Oncology Group-E6282 / R.K. Ramanathan, A. Cnaan, R.G. Hahn et al. // *Ann Oncol.* – 2001. – Vol. 12. – No. 8. – P. 1139–1143.
333. Rayaprolu, B.M. Excipients in parenteral formulations: selection considerations and effective utilization with small molecules and biologics / B.M. Rayaprolu, J.J. Strawser, G. Anyarambhatla // *Drug Dev Ind Pharm.* – 2018. – Vol. 44. – No. 10. – P. 1565–1571.
334. Remes, S.M. Immunohistochemical Expression of Somatostatin Receptor Subtypes in a Panel of Neuroendocrine Neoplasias / S.M. Remes, H.L. Leijon, T.J. Vesterinen et al. // *J Histochem Cytochem.* – 2019. – Vol. 67. – No. 10. – P.735-743.
335. Rossi, A. Focus on Fotemustine / A. Rossi, L. Rossi, A. Laudisi et al. // *Journal of experimental and clinical cancer research.* – 2007. – Vol. 25. – No. 4. – P. 461–468.
336. Rougier, P. Chemotherapy in the treatment of neuroendocrine malignant tumors / P. Rougier, E. Mitry // *Digestion.* – 2000. – Vol. 62 (Suppl 1). – P. 73–78.
337. Roy, S. A systemic approach on understanding the role of moisture in pharmaceutical product degradation and its prevention: challenges and perspectives / S. Roy, S. Siddique, Shr. Majumder // *Biomedical Research.* – 2018. – Vol. 17. – No. 29. – P. 3336–3343.
338. Rubin, J. Octreotide acetate long-acting formulation versus open-label subcutaneous octreotide acetate in malignant carcinoid syndrome / J. Rubin, J. Ajani, W. Schirmer et al. // *J Clin Oncol.* – 1999. – Vol. 17. – No. 2. – P. 600–606.
339. Ruscica, M. Somatostatin, somatostatin analogs and somatostatin receptor dynamics in the biology of cancer progression / M. Ruscica, M. Arvigo, L. Steffani et al. // *Curr Mol Med.* – 2013. – Vol. 13. – No. 4. – P. 555–571.

340. Sanarova, E. Development of a Liposomal Dosage Form for a New Somatostatin Analogue / E. Sanarova, A. Lantsova, N. Oborotova et al. // Indian J Pharm Sci. – 2019. – Vol. 81. – No. 1. – P.146–149.
341. Schmid, H.A. Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications / H.A.Schmid // Mol Cell Endocrinol. – 2008. – Vol. 286. – No. 1–2. – P. 69–74.
342. Schmida, H.A. Monoclonal antibodies against the human somatostatin receptor subtypes 1–5: development and immunohistochemical application in neuroendocrine tumors / H.A. Schmida, C. Lambertini, H.H. van Vugt et al. // Neuroendocrinology. – 2012. – Vol. 95. – No. 3. – P. 232–247.
343. Schrader, J. Extended cycle streptozotocin/5-FU chemotherapy for maintenance therapy in pancreatic neuroendocrine tumors / J. Schrader, F.O. Henes, M.Blaeker et al. // Endocrine. – 2019. – No. 65. – P. 460–467.
344. Scoazec, J.Y. Angiogenesis in neuroendocrine tumors: therapeutic applications / J.Y. Scoazec // Neuroendocrinolog. – 2013. – Vol. 97. – No. 1. – P. 45–56.
345. Serri, O. Octreotide inhibits insulin-like growth factor I hepatic gene expression in the hypophysectomized rat: evidence for a direct and indirect mechanism of action / O. Serri, P. Brazeau, Z. Kachra, B. Posner // Endocrinol. – 1992. – Vol. 130. – No. 4. – P. 1816–1821.
346. Shaji, J. Protein and Peptide Drug Delivery: Oral Approaches / J.Shaji , V. Patole // Indian J Pharm Sci. – 2008. – Vol. 70. – No. 3. – P. 269–277.
347. Shanmugam, S. Granulation techniques and technologies: Recent progresses / S. Shanmugam // Bioimpacts. – 2015. – Vol. 5. – No.1. – P.55–63.
348. Shapira-Furman, T. Biodegradable wafers releasing Temozolomide and Carmustine for the treatment of brain cancer / T. Shapira-Furman, N. Gorelick et al. // Journal of Controlled Release. – 2019. – Vol. 295. – No. 10. – P. 93–101.
349. Shapiro, W.R. A randomized comparison of intra-arterial *versus* intravenous BCNU, with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma /W.R. Shapiro, S.B. Green, P.C. Burger et al. // J Neurosurg. – 1992. – Vol. 76. – No. 5 – P. 772–781.

350. Sharma, S. Experimental Models of Diabetes / S.Sharma, J. Dwivedi, S. Swapnil // Int J Res Ayurveda and Pharm. – 2010. – Vol. 1. – No. 2. – P. 292–301.
351. 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.
352. Shprakh, Z. Development and validation of HPLC method for analysis of indolocarbazole derivative LCS-1269 / Z. Shprakh, A. Budko, D. Kozin et al. // Pharmacia. – 2021. – Vol. 68. – No. 2. – P.427–431.
353. 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.
354. 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.
355. Shprakh, Z. New somatostatin analogue interacts with receptors of experimental tumour models / Z. Shprakh, V. Delektorskaya, I. Kubasova et al. // FEBSOpenBIO. – 2021. – Vol.11. – No. S1. – P. 216/
356. 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.
357. Shprakh, Z. Somatostatin analogue: One substance and two formulations / Z. Shprakh // 22nd International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Formulations // J Formul Sci Bioavailab. – 2019. – Vol. 3 – P. 48.
358. 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.
359. Siepmann, J. Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory / J. Siepmann, N. Faisant, J. Akiki et al. // J Control Release. – 2004. – Vol. 96. – No. 1. – P. 123–134.

360. Singh, S. Efficacy and safety of everolimus in advanced, progressive, nonfunctional neuroendocrine tumors (NET) of the gastrointestinal (GI) tract and unknown primary: a subgroup analysis of the phase III RADIANT-4 trial / S. Singh, C. Carnaghi, R. Buzzoni et al. // *J Clin Oncol.* – 2016. – Vol. 34 (Suppl 4). – P. 315.
361. Somatuline-Product-Monograph [Electronic source] – Available at: <https://www.ipsen.ca>.
362. Stevenson, R. Novel agents in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors / R. Stevenson, S. Libutti, M. Saif // *JOP.* – 2013. – Vol. 14. – No. 2. – P. 152–154.
363. Strosberg, J.R. First-line chemotherapy with capecitabine and temozolomide in patients with metastatic pancreatic endocrine carcinomas / J.R. Strosberg, R.L. Fine, J. Choi et al. // *Cancer.* – 2011. – Vol. 117. – No. 2. – P. 268–275.
364. Stueven, A.K. Somatostatin Analogues in the Treatment of Neuroendocrine Tumors: Past, Present and Future / A.K. Stueven, A. Kayser, C. Wetz et al. // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20. – No. 12. – P. 3049.
365. Sugiki, T. Current NMR Techniques for Structure-Based Drug Discovery // T. Sugiki, K. Furuita, T. Fujiwara, C. Kojima // *Molecules.* – 2018. Vol. 23. – No. 1. – P. 148.
366. Sulaiman, T. Review: Excipients for tablet manufacturing with direct compression method / T. Sulaiman, S. Sulaiman // *Journal of Pharmaceutical And Sciences.* – 2020. – Vol. 3. – No. 2. – P. 64–76
367. Sun, Y. Improved controlled release study of lomustine / Y. Sun, H. Zhou, Q. Zhang, X. Wu // *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology.* – 2000. – Vol. 28. – No. 2. – P. 173–180.
368. Sun, Y. The toxicological study of CCNU controlled release film in vivo / Y. Sun, L. Xu, Q. Zhang et al. // *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology.* – 2004. – Vol. 32. – No. 4. – P.593–598.
369. Susini, C. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents / C. Susini, L. Buscail // *Ann Oncol.* – 2006. – Vol. 17. – No. 12. – P. 733–742.

370. Taal, B.G. Epidemiology of neuroendocrine tumours / B.G. Taal, O. Visser // *Neuroendocrinology*. – 2004. – Vol. 80 (Suppl. 1). – P. 3–7.
371. Technology Transfer. Good Practice Guide. Third Edition // Published by International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE). – 2018. – 152 p.
372. Thanou, M. Intestinal absorption of octreotide: N-trimethyl chitosan chloride (TMC) ameliorates the permeability and absorption properties of the somatostatin analogue in vitro and in vivo / M. Thanou, J.C. Verhoef, P. Marbach, H.E. Junginger // *J Pharm Sci*. – 2000. – Vol. 89. – No. 7. – P. 951–957.
373. Thanou, M. Intestinal absorption of octreotide using trimethyl chitosan chloride: studies in pig / M. Thanou, J.C. Verhoef, J.H. Verheijden, H.E. Junginger // *Pharm Res*. — 2001. — Vol. 18. — No. 6. — P. 823—828.
374. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. EudraLex. V. 4. EU Guidelines for Good Manufacturing Practices for Medicinal Products for Human and Veterinary Use [Electronic source]. – Available at: <http://ec.europa.eu>.
375. Thin-Layer Chromatography. In: Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis, 1 st Edition / Edited by S.H. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, K. Rasmussen. – NY.: John Wiley & Sons, Ltd., 2012. – Ch.12. – P. 163–172.
376. Thin Layer Chromatography in Drug Analysis (Chromatographic Science Series), 1st Edition / Edited by L. Komsta, M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma. – NY.: CRC Press, 2013. – 1067 p.
377. Thundimadathil, J. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects / J. Thundimadathil // *J Amino Acids*. – 2012. – Vol. 1. – ID 967347. – P. 1–13.
378. Tiberg, F. Phase behavior, functions, and medical applications of soy phosphatidylcholine and diglyceride lipid compositions / F. Tiberg, M. Johnsson, M. Jankunec, J. Barauskas // *Chem Lett*. – 2012. – Vol. 41. – No. 10. – P. 1090–1092.
379. Tiberg, F. Drug delivery applications of non-lamellar liquid crystalline phases and nanoparticles / F. Tiberg, M. Johnsson // *J Drug Del Sci Tech*. – 2011. – Vol. 21. – No. 1. – P. 101–109.

380. Tiberg, F. Octreotide s.c. depot provides sustained octreotide bioavailability and similar IGF-1 suppression to octreotide LAR in healthy volunteers / F. Tiberg, J. Roberts, C. Cervin et al. // *Br J Clin Pharmacol.* – 2015. – Vol. 80. – No. 3. – P. 460–472.
381. Troconiz, I.F. Population pharmacokinetic analysis of lanreotide Autogel in healthy subjects: evidence for injection interval of up to 2 months / I.F. Troconiz, J.M. Cendrós, C. Peraire et al. // *Clin Pharmacokinet.* – 2009. – Vol. 48. – No. 1. – P. 51–62.
382. Turk, J. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets / J. Turk, J.A. Corbett, S. Ramanadham et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1993. – Vol. 197. – No. 3. – P. 1458–1464.
383. Tuvia, S. Octreolin a safe oral alternative for parenteral octreotide treatment / S. Tuvia, P. Salama, I. Weinshtein et al. // *Growth Horm. IGF Res.* – 2010. – Vol.20 (Suppl 1). – P. 835–836.
384. Tuvia, S. Oral octreotide absorption in human subjects: comparable pharmacokinetics to parenteral octreotide and effective growth hormone suppression / S. Tuvia, J. Atsmon, S.L. Teichman et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol. 97. – No. 7. – P. 2362–2369.
385. Tyler, B.M. Treatment of Brain Tumors / B.M. Tyler, G.Pradill, U. Hadelsberg et al. // *Focal Controlled Drug Delivery. Advances in Delivery Science and Technology* / Eds A. Domb, W. Khan. – Boston, MA: Springer, 2014. – P. 169–194.
386. Turner, N.C. Chemotherapy with 5-fluorouracil, cisplatin and streptozocin for neuroendocrine tumours / N.C. Turner, S.J. Strauss, D. Sarker et al. // *Br J Cancer.* – 2010. – Vol. 102. – No. 7. – P. 1106–1112.
387. Unger, N. Differential expression of somatostatin receptor subtype 1-5 proteins in numerous human normal tissues / N. Unger, B. Ueberberg, S. Schulz et al // *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* – 2012. – Vol. 120. – No. 8. – P. 482–489.

388. USP Novel Excipients Survey: Stakeholders' Views on the Current State of Excipient Innovation / T. Mitchell, M. Rashed, C. Sheehan et al. // *Pharmaceutical Technology*. – Vol. 44. – No. 6. – P. 38–43.
389. Valery, C. Self-association process of a peptide in solution: from beta-sheet filaments to large embedded nanotubes / C. Valery, F. Artzner, B. Robert et al. // *Biophys J*. – 2004. – Vol. 86. – No. 4. – P. 2484–2501.
390. Valery, C. Molecular origin of the self-assembly of lanreotide into nanotubes: a mutational approach / C. Valery, E. Pouget, A. Pandit et al. // *Biophys J*. – 2008. – Vol. 94. – No. 5. – P. 1782–1795.
391. Vapreotide: BMY 41606, RC 160, Sanvar® // *Drugs R. D.* – 2003. – Vol. 4. – No. 5. – P. 326–330.
392. 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.
393. Ventura-Sobrevilla, J. Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice / J. Ventura-Sobrevilla, V.D. Boone-Villa, C.N. Aguilar et al. // *Proc West Pharmacol Soc.* – 2011. – No. 54. – P. 5–9.
394. Vinik, A. Clinical presentation and diagnosis of neuroendocrine tumors / A. Vinik, C. Chaya // *Hematol Oncol Clin North Am.* – 2016. – Vol. 30. – No. 1. – P. 21–48.
395. Vivek, K.S. Streptozotocin: an experimental tool in diabetes and alzheimer's disease (a review) / K.S. Vivek // *Int J Pharma Res Dev.* – 2010. – Vol. 2. – No. 1. – P. 1–7.
396. Wait, S.D. Polymeric drug delivery for the treatment of glioblastoma / S.D. Wait, R.S. Prabhu, S.H. Burri et al. // *Neuro-Oncology*. – 2015. – Vol. 17 (Suppl 2). – P. ii9–ii23.
397. Waksvik, H. Chromosome analyses of nurses handling cytostatic agents / H. Waksvik, O. Klepp, A. Brøgger // *Cancer Treat Rep.* – 1981. – Vol. 65. – No. 7–8. – P. 607–610.

398. Watts, C. Risk Analysis and Mitigation Matrix (RAMM) – A Risk Tool for Quality Management / A. Brindle, S. Davy, D. Tiffany // *Pharmaceutical engineering*. – 2012. – No. 1(32). – P.26–35.
399. Weckbecker, G. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects / G. Weckbecker, I. Lewis, R. Albert et al. // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2003. – Vol. 12. – No. 2. – P. 999–1017.
400. Weingart, J. Phase I trial of polifeprosan 20 with carmustine implant plus continuous infusion of intravenous O6-benzylguanine in adults with recurrent malignant glioma: new approaches to brain tumor therapy CNS consortium trial / J. Weingart, S.A. Grossman, K.A. Carson et al. // *J Clin Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – No. 4. – P. 399–404.
401. Weiss, R.B. Streptozotocin. A review of its pharmacology, efficacy and toxicity / R.B. Weiss // *Cancer Treat Rep.* – 1982. – Vol.66. – No. 3. – P. 427–438.
402. Welin, S. Clinical effect of temozolomide-based chemotherapy in poorly differentiated endocrine carcinoma after progression on first-line chemotherapy / S. Welin, H. Sorbye, S. Sebjornsen et al. // *Cancer*. – 2011. – Vol. 117. – No. 20. – P. 4617–4622.
403. WHO good manufacturing practices for pharmaceutical products containing hazardous substances / WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Forty-fourth report. Technical Report Series. – 2010. – No. 957. – Annex 3.
404. WHO guidelines on transfer of technology in pharmaceutical manufacturing / WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Forty-fifth report. Technical Report Series. – 2011. – No. 961. – Annex 7.
405. Wiley, P.F. Streptozotocin: structure and chemistry / P.F. Wiley, R.H. Ross, K. Heinz et al. // *J Org Chem.* – 1979. – Vol. 44. – No. 1. – P. 9–16.
406. Witek, P. Patient satisfaction and preferences of lanreotide Autogel treatment in acromegaly / P. Witek, S. Mucha, M. Ruchata // *Endokrynol Pol.* – 2016. – Vol. 67. – No. 6. – P. 572–579.



407. Wolin, E. M. Challenges in the diagnosis and management of well-differentiated neuroendocrine tumors of the lung (typical and atypical carcinoid): Current status and future considerations / E.M. Wolin // *The Oncologist*. – 2015. – Vol. 20. – No.10. – P. 1123–1131.
408. Wolin, E.M. Lanreotide depot: an antineoplastic treatment of carcinoid or neuroendocrine / E.M. Wolin, A. Manon, C. Chassaing et al. // *J Gastrointest Cancer*. – 2016. – Vol. 47. – No. 4. – P. 366–374.
409. Wolin, E.M. The expanding role of somatostatin analogs in the management of neuroendocrine tumors / E.M. Wolin // *Gastrointest Cancer Res*. – 2012. – Vol. 5. – No. 5. – P. 161–168.
410. Woltering, E.A. Somatostatin analogs: angiogenesis inhibitors with novel mechanisms of action / E.A. Woltering, J.C. Watson, R.C. Alperin-Lea et al. // *Invest New Drugs*. – 1997. – Vol. 15. – No. 1. – P. 77–86.
411. Wunsch, I. The influence of particle size on the application of compression and compaction models for tableting / I. Wunsch, Finke J.H., John E. et al. // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 599. No. 120424.
412. Worku, Z. A. Modelling and understanding powder flow properties and compactability of selected active pharmaceutical ingredients, excipients and physical mixtures from critical material properties / Z.A. Worku, D. Kumar, J.V. Gomes // *Int J Pharm*. – 2017. – Vol. 531. – No.1. – P.191–204.
413. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects // *JAMA*. – 2013. – Vol. 310. – No. 20. – P. 2191–2194.
414. Yakusheva, A. From Octreotide to Shorter Analogues: synthesis, Radiolabeling, Stability / A. Yakusheva, B. Egorova, E. Matazova et al. // *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. – 2019. – Vol.62. – No. 11. – P. 718–728.
415. Yamamoto, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets / H. Yamamoto, Y. Uchigata, H. Okamoto // *Nature*. – 1981. – Vol. 294. – No. 5838. – P. 284–286.

416. Yao, J-C. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States / J-C. Yao, M. Hassan, A. Phan et al. // *J Clin Oncol.* – 2008. – Vol. 26. – No. 18. – P. 3063–3072.
417. Yao, J.C. Targeted therapies in neuroendocrine tumors (NET): clinical trial challenges and lessons learned / J.C. Yao, D.R. Lagunes, M.H. Kulke // *Oncologist.* – 2013. – Vol. 18. – No. 5. – P. 525–532.
418. Yao, J.C. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors / J.C. Yao, M.H. Shah, T. Ito et al. // *N Engl J Med.* – 2011. – Vol. 364. – No. 6. – P. 514–523.
419. Yao, J.C. Targeting vascular endothelial growth factor in advanced carcinoid tumor: a random assignment phase II study of depot octreotide with bevacizumab and pegylated interferon alpha-2b / J.C. Yao, A. Phan, P.M. Hoff et al. // *J Clin Oncol.* – 2008. – Vol. 26. – No. 8. – P. 1316–1323.
420. Yimam, M.A. Effects of lipid association on lomustine (CCNU) administered intracerebrally to syngeneic 36B-10 rat brain tumors / M.A. Yimam, T. Bui, R.J. Ho // *Cancer Lett.* – 2006. – Vol. 244. – No. 2. – P. 211–219.
421. Zhou, C.F. mTOR activation in well differentiated pancreatic neuroendocrine tumors: a retrospective study on 34 cases / C.F. Zhou, J. Ji, F. Yuan et al. // *Hepato-gastroenterology.* – 2011. – Vol. 58. – No. 112. – P. 2140–2143.
422. Zimmerman, P.F. Recommendations for the safe handling of injectable antineoplastic drug products / P.F. Zimmerman, R.K. Larsen, E.W. Barkley, J.F. Gallelli // *Am J Hosp Pharm.* – 1981. – Vol. 38. – No. 11. – P. 1693–1695.

## Приложение А. Патенты на изобретения

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**  
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ  
№ 2254139

**СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ  
ДЕЙСТВИЕМ**

Патентообладатель(ли): *Российский онкологический научный  
центр им. Н.Н. Блохина РАМН (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2003133225  
Приоритет изобретения 14 ноября 2003 г.  
Зарегистрировано в Государственном реестре  
изобретений Российской Федерации 20 июня 2005 г.  
Срок действия патента истекает 14 ноября 2023 г.

*Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной  
собственности, патентам и товарным знакам*



  
Б.П. Симонов

Автор(ы): *Смирнова Людмила Ивановна (RU), Устинкина Светлана Витальевна (RU), Смирнова Алла Павловна (RU), Орлова Ольга Львовна (RU), Оборотова Наталья Александровна (RU), Смирнова Зоя Сергеевна (RU), Кубасова Ирина Юрьевна (RU), Шпрах Зоя Сергеевна (RU)*



## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2601753

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ N<sup>o</sup>-НИТРОЗО-N<sup>o</sup>-[(2-ХЛОРЕТИЛ)КАРБАМОИЛ]-L-ОРНИТИНА

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015130352

Приоритет изобретения **23 июля 2015 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **14 октября 2016 г.**

Срок действия патента истекает **23 июля 2035 г.**

*Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности*

*Г.П. Ивлиев*



Автор(ы): *Краснов Виктор Павлович (RU), Левит Галина Львовна (RU), Мусяк Вера Васильевна (RU), Матвеева Татьяна Викторовна (RU), Тумашов Андрей Артурович (RU), Шпрах Зоя Сергеевна (RU), Чарушин Валерий Николаевич (RU)*

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2703533

**Средство для лечения гормонозависимых опухолей и способ его получения**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018133108

Приоритет изобретения 18 сентября 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 21 октября 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 18 сентября 2038 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев



Авторы: *Дмитриева Мария Вячеславовна (RU), Санарова Екатерина Викторовна (RU), Смирнова Людмила Ивановна (RU), Оборотова Наталия Александровна (RU), Полозкова Алевтина Павловна (RU), Орлова Ольга Львовна (RU), Шпрах Зоя Сергеевна (RU), Устинкина Светлана Витальевна (RU), Ланцова Анна Владимировна (RU), Борисова Лариса Михайловна (RU), Киселева Марина Петровна (RU), Николаева Людмила Леонидовна (RU), Кульбачевская Наталия Юрьевна (RU), Коняева Ольга Ивановна (RU), Гусев Дмитрий Васильевич (RU)*



## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2748989

**Противоопухолевое лекарственное средство для  
перорального применения**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2020126556

Приоритет изобретения **06 августа 2020 г.**

Дата государственной регистрации  
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **02 июня 2021 г.**

Срок действия исключительного права  
на изобретение истекает **06 августа 2040 г.**

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

*Г.П. Ильев*



Авторы: *Полозкова Алевтина Павловна (RU), Орлова Ольга Львовна (RU), Смирнова Людмила Ивановна (RU), Устинкина Светлана Витальевна (RU), Шпрах Зоя Сергеевна (RU), Игнатьева Елена Владимировна (RU), Борисова Лариса Михайловна (RU), Киселева Марина Петровна (RU), Дмитриева Мария Вячеславовна (RU), Николаева Людмила Леонидовна (RU), Ланцова Анна Владимировна (RU), Голубева Ирина Сергеевна (RU), Оборотова Наталия Александровна (RU), Санарова Екатерина Викторовна (RU), Кульбачевская Наталия Юрьевна (RU), Коняева Ольга Ивановна (RU), Ермакова Надежда Павловна (RU), Гусев Дмитрий Васильевич (RU), Косоруков Вячеслав Станиславович (RU)*

**Приложение Б. Акт о внедрении результатов научно-исследовательской  
работы в учебный процесс**

УТВЕРЖДАЮ  
Проректор по учебной работе  
ФГАОУ ВО Первый МГМУ  
им. И.М. Сеченова Минздрава России  
(Сеченовский Университет)

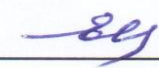
\_\_\_\_\_ Литвинова Т.М.  
\_\_\_\_\_ 20\_\_ г.



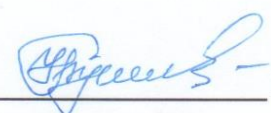
**АКТ**

о внедрении результатов диссертации Шпрах Зои Сергеевны  
в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии и фармакологии  
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)  
Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные  
положения, выводы и рекомендации докторской диссертации  
Шпрах Зои Сергеевны  
на тему «Теоретические и экспериментальные основы создания лекарственных  
средств для лечения нейроэндокринных опухолей»  
внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии и фармакологии  
при изучении дисциплины фармацевтическая технология,  
читаемой слушателям циклов повышения квалификации по направлению подготовки  
(специальности) 33.08.01 Фармацевтическая технология


Директор Института профессионального образования  
д.м.н., профессор

\_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_ Е.В. Ших

Заведующий кафедрой  
фармацевтической технологии и фармакологии  
д.фарм.н.

\_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_ Н.Д. Бунтян

Начальник Учебного управления

\_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_ Л.Ю. Юдина

## Приложение В. Акты о внедрении (использовании) результатов научной и инновационной деятельности

федеральное государственное бюджетное учреждение  
**«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
 имени Н.Н. Блохина»**  
 Министерства здравоохранения Российской Федерации  
 (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)

115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24;  
 Тел. +7 (499) 324-24-24; e-mail: info@ronc.ru; http://www.ronc.ru  
 ОГРН 1037739447525, ИНН/КПП 7724075162/772401001, ОКПО 01897624

Federal State Budgetary Institution  
**«N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology»**  
 of the Ministry of Health of the Russian Federation  
 (N.N. Blokhin NMRCO)

115478 Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russia  
 Phone: +7 (499) 324-24-24; e-mail: info@ronc.ru; http://www.ronc.ru

№ \_\_\_\_\_  
 « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_ г.

### АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящий акт составлен в том, что основные научные положения, выводы и рекомендации докторской диссертации **Шпрах Зои Сергеевны** на тему «Теоретические и экспериментальные основы создания лекарственных средств для лечения нейроэндокринных опухолей», в том числе основные технологические стадии и валидированные методики контроля качества лекарственных средств

- Араноза (активная фармацевтическая субстанция, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций);
- цифетрилин (цифетрилин таблетки 6 мг, цифетрилин таблетки 60 мг) апробированы и используются при получении и контроле качества в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Директор Научно-исследовательского  
 Института экспериментальной диагностики и терапии опухолей  
 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
 к.б.н.



\_\_\_\_\_  
 В.С. Косоруков

**«КОМПАНИЯ» «ДЕКО»**

Общество с ограниченной ответственностью

ИНН / КПП 7731205648 / 771601001  
129344 г.Москва, ул.Енисейская д.3, корп.4  
ОКПО 42420561, ОГРН 1027739254960

Исх. №59

28.06.2021

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ****результатов диссертационного исследования**

Настоящий акт составлен в том, что ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО» использует результаты диссертационного исследования Шпрах Зои Сергеевны на тему «Теоретические и экспериментальные основы создания лекарственных средств для лечения нейроэндокринных опухолей» при производстве и контроле качества лекарственного препарата Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г.

Генеральный директор

ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО»



В.И. Гребеньков

МП

**Приложение Г. Опытно-промышленные регламенты**

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
РОССИЙСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
ИМЕНИ Н.Н. БЛОХИНА**

Для служебного пользования. Экз. № 1**«УТВЕРЖДАЮ»****Заместитель Директора  
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина»  
РАМН по научной работе,  
академикРАН, профессор**

М.Р.Личиницер

**О П Ы Т Н О - П Р О М Ы Ш Л Е Н Н Ы Й Р Е Г Л А М Е Н Т**

на производство лекарственного средства

**АРАНОЗА**

лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г

**ОПР 01897624-05-13**Срок действия регламента до «20» ноября 2018 г.**ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН:  
КОНФИДЕНЦИАЛЬНО**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«РОССИЙСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
ИМЕНИ Н.Н. БЛОХИНА»

Для служебного пользования. Экз. № 1



«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора  
ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» по научной работе,  
профессор

А.Ю.Барышников

« 12 » 12 2014 г.

**ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ**

НА ПРОИЗВОДСТВО АНАЛОГА ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ГОРМОНА

**ТАБЛЕТКИ 6 мг**

**ОПР 01897624-06-14**

Срок действия регламента до « 12 » 12 2017 г.

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»:

**КОНФИДЕНЦИАЛЬНО**

**Приложение Д. НД по контролю качества лекарственных средств**

Р N000449/01-290708

СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**

ООО ФИРМА «ГЛЕС»

**АРАНОЗА**

Субстанция

МНН или группировочное название - отсутствуют

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ - ООО ФИРМА «ГЛЕС»

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА - ООО ФИРМА «ГЛЕС»

ЗАЯВИТЕЛЬ (в ФГУ «НЦ ЭСМП») - ООО ФИРМА «ГЛЕС»

0655-07..



## МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № Р N000449/02-2003

Дата регистрации « 14 » мая 2009 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н.Блохина» Российской академии медицинских наук

Научно-производственный филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский онкологический научный центр имени Н.Н.Блохина» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, филиал «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН)

115478 Москва, Каширское ш., 24

(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение, адрес)

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**42-0105-0656-00

(номер)

**Араноза**

торговое наименование лекарственного препарата

3-( $\alpha$ -L-арабинопиранозил-1)-1-метил-1-нитрозомочевина

международное непатентованное или химическое наименование

Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г

лекарственная форма, дозировка

**ПРОИЗВОДИТЕЛЬ****ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН (Филиал «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН), Россия****ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)****ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН (Филиал «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН), Россия****УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)****ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН (Филиал «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН), Россия****ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА****ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН (Филиал «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН), Россия**

## МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № \_\_\_\_\_

Дата регистрации « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»  
(ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»)

Научно-производственный филиал Федерального государственного  
бюджетного научного учреждения «Российский онкологический  
научный центр имени Н.Н. Блохина»  
(ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Филиал «Научкопрофи»  
ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»)  
115478 Москва, Каширское ш., 24

(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное  
удостоверение, адрес)

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**

(номер)

**Цифетрилин**

торговое наименование лекарственного препарата

Метилловый эфир N<sup>α</sup>-трет-бутилоксикарбонил-S-  
тетрагидропиранилцистеинилфенилаланил-D-триптофил-  
N<sup>ε</sup>-карбобензоксизилтреонина

международное непатентованное или химическое наименование

субстанция - порошок

лекарственная форма, дозировка

**ПРОИЗВОДИТЕЛЬ**

**ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» (Филиал «Научкопрофи» ФГБНУ  
«РОНЦ им. Н.Н.Блохина»), Россия**

**ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)**

**ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» (Филиал «Научкопрофи» ФГБНУ  
«РОНЦ им. Н.Н.Блохина»), Россия**

**УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)**

**ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» (Филиал «Научкопрофи» ФГБНУ  
«РОНЦ им. Н.Н.Блохина»), Россия**

**ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

**ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» (Филиал «Научкопрофи»  
ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина»), Россия**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Регистрационное удостоверение № \_\_\_\_\_**

**Дата регистрации « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»  
(ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»)

Научно-производственный филиал Федерального государственного  
бюджетного научного учреждения «Российский онкологический  
научный центр имени Н.Н. Блохина»

(ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Филиал «Наукопрофи»  
ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»)

115478 Москва, Каширское ш., 24

---

(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное  
удостоверение, адрес)

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**

\_\_\_\_\_ (номер)

Цифетрилин

торговое наименование лекарственного препарата

Метилловый эфир N<sup>3</sup>-трет-бутилоксикарбонил-S-  
тетрагидропиранилицистеинилфенилаланил- D-триптофил-N<sup>6</sup>-  
карбобензоксипизитреонина

\_\_\_\_\_ международное непатентованное или химическое наименование

Таблетки 6 мг

лекарственная форма, дозировка

**ПРОИЗВОДИТЕЛЬ**

**ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» (Филиал «Наукопрофи» ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»), Россия**

**ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)**

**ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» (Филиал «Наукопрофи» ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»), Россия**

**УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)**

**ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» (Филиал «Наукопрофи» ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»), Россия**

**ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

**ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» (Филиал «Наукопрофи» ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»), Россия**

**Приложение Е. Разрешения на клинические исследования  
лекарственных препаратов для лечения НЭО**



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**РАЗРЕШЕНИЕ № 546**  
**на проведение клинических исследований**  
**от 2 октября 2014 г.**

Настоящим разрешается проведение клинических исследований  
**Араноза**  
(наименование лекарственного препарата)

Организация, осуществляющая организацию проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения:

**разработчик лекарственного препарата ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН (производство Филиал «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН), Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24.**

Лекарственная форма и дозировка лекарственного препарата для медицинского применения: **лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения 0,5 г (флаконы).**

Наименование протокола клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **№ А-НЭО-03-13 «Перспективное открытое многоцентровое исследование эффективности и токсичности препарата Араноза в монорежиме в качестве терапии первой линии у пациентов с распространенными нейроэндокринными опухолями».**

Цель клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **оценка эффективности и токсичности препарата Араноза в качестве терапии первой линии у пациентов с распространенными нейроэндокринными опухолями.**

Сроки проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **с 02.10.2014 по 30.06.2015 г.**

Количество пациентов, принимающих участие в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения: **60 пациентов.**

Перечень медицинских организаций, в которых будет проводиться клиническое исследование лекарственного препарата для медицинского применения: **согласно приложению №1 на 1 л.**

Данное разрешение действительно в течение всего срока проведения  
клинических исследований.

002381



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**РАЗРЕШЕНИЕ № 606**  
**на проведение клинических исследований**  
**от 23 октября 2015 г.**

Настоящим разрешается проведение клинических исследований  
**Цифетрилин**  
(наименование лекарственного препарата)

Организация, осуществляющая организацию проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения:

**ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН (производство Филиал «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН), Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24.**

Лекарственная форма и дозировка лекарственного препарата для медицинского применения: **таблетки 6 мг.**

Наименование протокола клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **№ Ц-НЭО-05-15 «Моноцентровое открытое нерандомизированное клиническое исследование по изучению безопасности и переносимости препарата Цифетрилин у пациентов с диссеминированными нейроэндокринными опухолями».**

Цель клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **изучение безопасности и переносимости препарата Цифетрилин у пациентов с диссеминированными нейроэндокринными опухолями.**

Сроки проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **с 26.10.2015 по 30.06.2016 г.**

Количество пациентов, принимающих участие в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения: **12 пациентов.**

Перечень медицинских организаций, в которых будет проводиться клиническое исследование лекарственного препарата для медицинского применения: **согласно приложению №1 на 1 л.**

Данное разрешение действительно в течение всего срока проведения клинических исследований.

003477