

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

На правах рукописи



Павлов Алексей Никитич

**Разработка состава и технологии получения назальных капель с
пролонгированным высвобождением для лечения болезни Паркинсона**

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель
доктор фармацевтических наук, доцент
Бркич Галина Эдуардовна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Принципы фармакотерапии болезни Паркинсона.....	14
1.2 Лекарственные формы 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина или L-ДОФА	17
1.3 Назальный способ введения лекарственных средств для системного действия.....	19
1.4 Использование L-ДОФА в полимерной форме.....	25
1.5 Применение полилактидов для создания систем доставки лекарственных средств	28
1.6 Современные представления о способах ориентированной интраназальной доставки лекарственных средств.....	31
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	36
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1 Объекты исследования	37
2.2 Вспомогательные вещества.....	38
2.3 Методы исследования.....	42
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ.....	52
3.1 Дизайн исследования	52
3.2 Изучение физико-химических характеристик активной фармацевтической субстанции ДОФА-ПК.....	56
3.3 Разработка модельного назального секрета	59
3.4 Разработка модельной системы для выбора состава лекарственной формы....	61
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	65
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДЛЯ НАЗАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ	67
4.1 Модельные интраназальные композиции и технология их получения.....	67
4.2 Выбор оптимального состава назальных композиций при помощи разработанной модельной системы.....	73

4.3 Оценка совместимости компонентов лекарственного средства	78
4.4 Разработка методики высвобождения активной фармацевтической субстанции ДОФА-ПК in vitro	82
4.5 Оценка стабильности для определения оптимального состава.....	89
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	92
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДОФАМИНИН	94
5.1 Разработка проекта опытно-промышленного регламента производства лекарственного средства Дофаминин	95
5.1.1 Характеристика готового продукта.....	95
5.1.2 Характеристика назальных капель на основе ДОФА-ПК.....	96
5.1.3 Технологическая схема производства.....	97
5.1.4 Аппаратурная схема производства и спецификация оборудования	99
5.1.5 Изложение основных работ и процессов стадий производства	106
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	124
ГЛАВА 6. СТРАТЕГИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РАЗРАБАТЫВАЕМОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА	125
6.1 Оценка химико-фармацевтических свойств активной фармацевтической субстанции ДОФА-ПК для разработки методики контроля качества.....	126
6.2 Разработка методики подлинности и количественного определения активной фармацевтической субстанции ДОФА- ПК в лекарственном средстве Дофаминин	127
6.3 Валидация методики контроля качества.....	133
6.4 Изучение условий хранения и стабильности лекарственного средства Дофаминин.....	148
6.5 Разработка проекта нормативного документа по качеству лекарственного средства Дофаминин	175
6.6 Выбор упаковки лекарственного средства Дофаминин.....	178
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	180
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	182

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	184
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	185
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	211
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	211
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	212
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	217
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	218
ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....	219

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Программа фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы), утвержденная распоряжением Правительства от 31.12.2020 № 3684-р предполагает разработку оригинальных по структуре и механизму действия лекарственных средств (ЛС) для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Нейродегенеративные заболевания – группа относительно медленно развивающихся заболеваний с преимущественным поражением серого вещества центральной нервной системы. К ним относится болезнь Паркинсона (БП) – хроническое прогрессирующее заболевание головного мозга, преимущественно связанное с дегенерацией дофаминергических нейронов черной субстанции. На сегодняшний день для фармакотерапии паркинсонизма применяют холинолитические средства, производные аминоадамантана, ДОФА-содержащие средства (ДСС), ингибиторы моноаминоксидазы (МАО) типа В, ингибиторы катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ) и агонисты дофаминовых рецепторов. «Золотым стандартом» терапии болезни Паркинсона на протяжении многих лет остаются ДОФА-содержащие лекарственные средства. Леводопа включена в Перечень лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций для медицинского применения, производство которых рекомендуется обеспечить в Евразийском экономическом союзе до конца 2024 года.

L-ДОФА или Леводопа эффективна в отношении всех трех основных симптомов БП: гипокинезии, тремора, ригидности. Недостатки применения стандартных форм L-ДОФА обусловлены резкими колебаниями содержания препарата в крови после приема, что с развитием болезни способствует «пульсирующей» стимуляции дофаминовых рецепторов, на фоне которой развивается клиническая картина двухфазного эффекта: оп-эффект на пике дозы субъективно воспринимающийся как исчезновение симптомов заболевания и

off-эффект, когда при снижении уровня дофаминовой стимуляции отмечаются наиболее сильные клинические проявления болезни. Развитие этих нарушений определяется, в том числе, нарушением функций хранения и высвобождения дофамина и нарушением рецепторного аппарата клеток-мишеней, а именно, снижением чувствительности рецепторов к дофамину или снижением их плотности. Это приводит к необходимости многократного введения лекарственного препарата (ЛП) для поддержания постоянного уровня L-ДОФА в крови. При пероральном приеме возникают сложности, связанные с низкой биодоступностью, а также «преждевременным» биохимическим превращением предшественника в дофамин на периферии, приводящее к снижению доступности препарата для мозга и к необходимости использования препаратов-ингибиторов периферического метаболизма L-ДОФА, что сопровождается значительными побочными эффектами при хроническом введении.

В связи с этим, актуальной задачей является повышение биодоступности L-ДОФА, используя ЛС в пролонгированной форме в составе полимера с регулируемым высвобождением и использованием назального пути введения. Назальная доставка ЛС рассматривается как актуальная альтернатива пероральному приему, поскольку назальная полость легкодоступна, обильно васкуляризирована, хорошо проницаема, имеет большую площадь поверхности, что способствует хорошей всасываемости и увеличению биодоступности.

Основной сложностью при этом является низкая растворимость L-ДОФА в воде и быстрая скорость его метаболизма на периферии. Подходом к устранению перечисленных недостатков является включение действующего вещества в биodeградируемый и нетоксичный сополимер молочной и гликолевой кислот. Предлагаемые подходы, а именно, создание ЛС с контролируемым временем деградации на основе биodeградируемого сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) и использование назального пути введения, приведет к снижению терапевтической дозы препарата, снижению побочных эффектов и увеличению эффективности терапии за счет контролируемого высвобождения, оптимизации биораспределения и более щадящего, фармакологического действия.

Степень ее разработанности

В настоящее время в мире не существует зарубежных и российских объектов исследований аналогичных разрабатываемым технологиям, не зарегистрировано заявок, в которых бы рассматривались перспективы потенциального использования активной фармацевтической субстанции (АФС) 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина (Леводопа) в форме наночастиц с полилактидгликолидами (ДОФА-ПК) и применяемым в виде назальной формы, не зарегистрированы лекарственные препараты в виде данной лекарственной формы, что доказывает актуальность выполняемого исследования.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является научно-обоснованная разработка состава и технологии получения лекарственного препарата на основе ДОФА-ПК для лечения болезни Паркинсона.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Проанализировать уровень разработок ЛС, ориентированных на лечение болезни Паркинсона и направления в создании ЛП на основе полимерных композиций, и предложить дизайн исследования для разработки интраназальной ЛФ.
2. Научно обосновать и разработать состав ЛС Дофаминин, на основе АФС ДОФА-ПК.
3. Разработать технологию получения интраназальной ЛФ для лечения болезни Паркинсона.
4. Разработать методики контроля качества ЛС Дофаминин на основе АФС ДОФА-ПК.
5. Провести исследования стабильности АФС ДОФА-ПК и ЛС Дофаминин.
6. Разработать проекты опытно-промышленного регламента и нормативного документа по качеству на ЛС Дофаминин.

Научная новизна

В данной работе представлены результаты разработки ЛС Дофаминин, на основе АФС ДОФА-ПК, представляющей собой интраназальную ЛФ для лечения болезни Паркинсона. Определен целевой профиль качества, изучаемого ЛС в части, касающейся качества и безопасности, с учетом пути введения, лекарственной формы, биодоступности, дозировки и стабильности; определены критические характеристики качества.

Изучены физико-химические, биофармацевтические и технологические характеристики АФС ДОФА-ПК, необходимые для разработки ЛС Дофаминин. Проведена фармацевтическая разработка (ФР): выбран состав, разработана технология получения, разработаны методики контроля качества, изучена стабильность ЛС Дофаминин, на основе АФС ДОФА-ПК. Разработан проект нормативного документа по качеству (НД) и опытно-промышленный регламент (ОПР) на ЛС Дофаминин.

Получен патент РФ № RU № 2697411 «Композиция для лечения болезни Паркинсона» (2019 г.).

Теоретическая и практическая значимость работы

Заключается в разработке и изучении ЛС Дофаминин, на основе АФС ДОФА-ПК. В ходе исследования получены практические данные по биофармацевтическим, физико-химическим и технологическим свойствам АФС ДОФА-ПК, оценена его стабильность. Полученные данные могут быть использованы при составлении регистрационного досье на проектируемый ЛП. Предложен состав и технология получения ЛС Дофаминин, удовлетворяющие основным регуляторным требованиям. Результаты представляют собой данные ФР и являются основой для дальнейшего масштабирования, оптимизации и изучения характеристик проектируемого ЛП с целью его потенциального вывода на фармацевтический рынок. Теоретическая значимость работы заключается в разработке и реализации подхода по проектированию стабильной назальной

дозированной ЛФ на основе расширенного метода фармацевтической разработки, оценку совместимости.

Результаты исследований вошли в комплексный отчет о проделанной работе Государственного контракта от 11 июня 2015 г. № 14.N08.12.0038 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования лекарственного средства на основе 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина (леводопа) и полилактидгликолидов для лечения болезни Паркинсона».

Методология и методы исследования

Методология работы базируется на выборе цели и объекта исследования, обозначения решаемой проблемы, направленной на лечение болезни Паркинсона, а также выборе подходов, средств и методов, определяющих наилучший результат получения эффективного и безопасного ЛС для медицинского применения.

Методологическую основу исследования составили работы зарубежных, советских и российских ученых в области фармацевтической технологии и фармацевтического анализа, в частности, в вопросах разработки ЛП, лекарственных форм и биофармации: В.В. Береговых, А.П. Мешковского, Н.В. Пятигорской, К.В. Алексеева, И.И. Краснюка, С.А. Кедика, Н.Б. Деминой, Н.Д. Бунятян, А.И. Сливкина, С.Н. Суслиной, Е.И. Саканян, и др.

В ходе выполнения работы были использованы физические, физико-химические, химические методы и фармацевтико-технологические испытания на ЛФ, описанные в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) и Фармакопее ЕАЭС (ФЕАЭС).

Личный вклад

Автором на разных этапах теоретических и экспериментальных исследований, разработана и усовершенствована технология получения активной фармацевтической субстанции ДОФА-ПК, проведены исследования физико-

химических и технологических характеристик фармацевтической субстанции, проведена разработка состава и технологии получения оригинального ЛС Дофаминин. Установлен целевой профиль качества, представляющий собой проспективное резюме характеристик качества будущего лекарственного средства, которые должны быть достигнуты, чтобы обеспечить желаемое качество, принимая во внимание безопасность и эффективность. Личный вклад автора является определяющим и состоит в непосредственном участии на всех этапах выполнения и оформления диссертационной работы.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты исследований по выбору и обоснованию вспомогательных веществ (ВВ) для получения ЛС Дофаминин.
2. Результаты исследования по определению пространства проектных параметров при разработке технологии производства интраназальной ЛФ для лечения болезни Паркинсона.
3. Результаты по разработке методик контроля качества АФС ДОФА-ПК и ЛС Дофаминин.
4. Результаты изучения стабильности ЛС Дофаминин.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств, конкретно пунктам 2, 3, 4.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена необходимым объемом экспериментального материала, однородностью выборки объектов эксперимента, применением современных методов исследования, сертифицированного и поверенного оборудования, валидацией разработанных методик, применением методов математической статистики, теоретическим обоснованием полученных

экспериментальных данных.

Основные положения работы и результаты диссертационного исследования доложены на конференциях: Scientific Research Of The SCO Countries: Synergy And Integration (08.09.2023 г., Пекин, Китай); XXXII Международной научно-практической конференции «Фундаментальная наука и технологии - перспективные разработки» (21-22.08.2023 г., Бангалор, Индия); II Международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (04-06.10.2023 г., Томск, РФ).

Апробация результатов диссертации состоялась на межкафедральной конференции кафедры промышленной фармации и кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования, кафедры фармацевтической технологии Института фармации имени А.П. Нелюбина, Центра фармацевтических технологий, Центра доклинических исследований, Центра фармацевтической разработки и инновационных лекарственных форм Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 11 от 27.11.2023 г.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования вошли в работу и в учебный процесс кафедры промышленной фармации Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)) (Акт № 15.20-03 от 20.10.2023 г.), внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтического анализа ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Акт № 45/В от 03.10.2023 г.).

В результате проведенных экспериментальных исследований разработаны состав, технология получения, методики анализа АФС ДОФА–ПК и ЛС Дофаминин. Проведена апробация технологии получения и методик контроля качества АФС ДОФА–ПК, ЛС Дофаминин на ООО «Тульская фармацевтическая

фабрика» (Акт №15/09 от 12.09.2023 г., Акт №16/09 от 12.09.2023 г.), АО «Институт фармацевтических технологий» (Акт от 07.11.2023 г.). Результаты исследований вошли в комплексный отчет о проделанной работе Государственного контракта от 11 июня 2015 г. № 14.N08.12.0038 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования лекарственного средства на основе 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина (леводопа) и полилактидгликолидов для лечения болезни Паркинсона».

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в рамках Государственного контракта от 11 июня 2015 г. № 14. №08.12.0038 по теме «Доклинические исследования лекарственного средства на основе 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина (леводопа) и полилактидгликолидов для лечения болезни Паркинсона» ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и является фрагментом исследования по теме «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01201261653).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 2 оригинальные научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed,

MatchSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer, 4 иные статьи по результатам диссертационного исследования, 6 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 2 зарубежных конференций), 1 патент на изобретение Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 233 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, списка литературы, приложений. Работа иллюстрирована 71 таблицей и 28 рисунками. Список литературы включает 196 источников, из них 117 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Принципы фармакотерапии болезни Паркинсона

Нейродегенеративные заболевания – группа относительно медленно развивающихся заболеваний с преимущественным поражением серого вещества центральной нервной системы. Причинами возникновения нейродегенеративных заболеваний человека, характеризующихся недостаточной выработкой дофамина структурами мозга и сопровождающихся паркинсоноподобными проявлениями (вторичный паркинсонизм), могут быть вирусная инфекция, опухоль, механические повреждения нейронов черного тела (травмы), воздействие факторов окружающей среды [121].

К числу нейродегенеративных заболеваний относится БП – хроническое прогрессирующее заболевание головного мозга, преимущественно связанное с дегенерацией дофаминергических нейронов черной субстанции, одном из подкорковых отделов мозга, участвующем в координации двигательной активности и формировании эмоциональной реакции [5, 139, 163].

Независимо от причины возникновения паркинсонизм относится к числу заболеваний, связанных с нейромедиаторным обменом, обусловленным сниженной активностью дофаминергической nigростриатной системы. Недостаточность продукции дофамина в базальных ганглиях (стриатуме) приводит к дисбалансу нейромедиаторов в ЦНС [172].

Снижение дофаминового тормозного контроля обуславливает повышение активности других нейромедиаторов – глутамата, ацетилхолина и т. д., что и приводит к возникновению специфических двигательных нарушений (наиболее характерна триада – акинезия, ригидность, тремор). ЦНС хорошо адаптируется к небольшому дофаминдефициту, и клинические признаки паркинсонизма проявляются только при потере не менее чем 70 % дофамина, т. е. при серьезных изменениях [5, 139].

Дофаминдефицит обуславливает гиперактивацию глутаматных влияний,

усиление кальциевого тока в сами дофаминпродуцирующие нейроны, что, в свою очередь, вследствие накопления кальция способствует их гибели. Нарушаются интегративные взаимоотношения между различными структурами коры, подкорковых образований и ствола мозга, отмечается дисбаланс нейромедиаторов, расстройство механизмов их взаимоконтроля. Морфологические изменения отмечаются в различных отделах головного мозга: нигростриатуме, бледном шаре, ядре среднего мозга, таламусе, голубом пятне. Значительный вклад в этот патологический процесс вносит также окислительный стресс [5].

Основными задачами лечения больных паркинсонизмом являются компенсация дофаминового дефицита и его последствий (коррекция нарушенных взаимоотношений нейромедиаторов), замедление прогрессирования заболевания (сохранение и защита дофаминовых нейронов), активация восстановительных процессов и стимуляция синтеза дофамина [53].

Стратегия лечения БП включает:

- заместительную дофаминергическую терапию;
- максимальное использование имеющихся ресурсов дофаминергической системы: стимуляция синтеза дофамина, усиление дофаминовой трансмиссии на рецепторном уровне, активация механизма обратного захвата, угнетение ферментов, разрушающих дофамин в синапсах;
 - активация нейропротекции и нейротрофики сохранившихся дофаминовых нейронов;
 - устранение последствий нейромедиаторного дисбаланса – ликвидацию или подавление генератора патологически усиленного возбуждения в хвостатых ядрах и патологических систем паркинсонического синдрома в стриатуме [2].

Эти требования диктуют следующие особенности терапии при паркинсонизме: она должна быть комплексной, последовательной, долговременной (пожизненной) [60].

К числу таких ЛС относят дофаминовые агонисты (эрголиновые – бромокриптин, неэрголиновые – прамипексол), ингибиторы МАО-В, ингибиторы КОМТ, адамантаны, апоморфин [85, 112].

Недостаток применения этих ЛП заключается в том, что прогрессирование болезни не останавливается, а их продолжительное назначение приводит к возникновению ряда побочных эффектов, которые препятствуют проведению эффективной фармакотерапии и сами по себе требуют фармакологической коррекции.

«Золотым стандартом» терапии болезни Паркинсона на протяжении многих лет остаются ДОФА-содержащие средства [96, 124]. 3,4-дигидрокси-L-фенилаланин, или L-ДОФА – биологически активное соединение является непосредственным метаболическим предшественником дофамина. Это биологически активное соединение способно, в отличие от дофамина проникать через гематоэнцефалический барьер и компенсировать дефицит дофамина в мозге, лежащий в основе многих клинических проявлений БП, обусловленных деградацией дофаминэргических нейронов черной субстанции [183].

Леводопа захватывается окончаниями сохранившихся дофаминэргических нигростриарных нейронов и подвергаясь в них декарбоксилированию, превращается в дофамин, который выделяется в синаптическую щель, стимулирует дофаминовые рецепторы, поддерживая адекватное функциональное состояние нейронов полосатого тела и других базальных ганглиев [22]. Эффективность Леводопа в отношении выработки дофамина и его биологическая доступность намного выше по сравнению с другими предшественниками дофамина - фенилаланином и тирозином [157].

Леводопа эффективна в отношении всех трех основных симптомов БП: гипокинезии, тремора, ригидности. Важное значение имеет такая особенность L-ДОФА, как обеспечение наиболее гарантированного эффекта при БП – оказывает лечебное действие более чем у 95 % пациентов.

Соответственно положительная реакция на препараты L-ДОФА - важный критерий диагностики этого заболевания, остается почти неизменной [157].

1.2 Лекарственные формы 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина или L-ДОФА

Учитывая особенности назначения L-ДОФА в медикаментозной терапии, разрабатывались различные ЛФ этого лекарственного средства, отраженные в патентах [140, 141, 152, 174, 193]:

- пероральные – таблетки, капсулы;
- сублингвальные – таблетки;
- инъекционные – в виде инъекций, инфузий;
- трансдермальные – пластыри;
- ректальные – суппозитории;
- помповые системы.

Оценивая эффективность упомянутых лекарственных форм L-ДОФА, следует обратить внимание на особенности фармакокинетики [131, 178].

При применении стандартных форм L-ДОФА отмечаются резкие колебания содержания ЛС в крови после приема, что с развитием болезни способствует «пульсирующей» стимуляции дофаминовых рецепторов, на фоне которой развивается клиническая картина двухфазного эффекта: on-эффект на пике дозы субъективно воспринимающийся как исчезновение симптомов заболевания и off-эффект, когда при снижении уровня дофаминовой стимуляции отмечаются наиболее сильные клинические проявления болезни.

Это приводит к необходимости многократного введения ЛС (2-3 раза в сутки) для поддержания постоянного уровня L-ДОФА в крови [84].

В литературе описаны пероральные пролонгированные формы L-ДОФА, позволяющие повысить уровень биодоступности [97].

Препараты с пролонгированным высвобождением L-ДОФА (в сочетании с карбидопой) изготавливаются с использованием растворимой полимерной матрицы и обеспечивают более устойчивую концентрацию L-ДОФА /карбидопы в плазме, чем стандартные ЛФ, однако характеризуются меньшей биодоступностью (71 против 99 %), более продолжительным временем достижения максимальной концентрации (2,3 против 1,1 ч) и отсроченным началом действия (2,2 против

1,1 ч) [146]. По сравнению с препаратами с немедленным высвобождением, формы с пролонгированным высвобождением обеспечивают сопоставимый клинический эффект при меньшей кратности приёма. Это обстоятельство обуславливает необходимость применения более высоких суточных доз по сравнению со стандартными ЛФ [186].

Препараты L-ДОФА /бенсеразида с пролонгированным высвобождением основаны на «гидродинамически сбалансированной системе» – ГСС (HBS – hydrodynamically balanced system): капсулы имеют желатиновую оболочку, которая при контакте с желудочным соком постепенно растворяется. Достигнув желудка, капсулы превращаются в слизистую субстанцию, длительно задерживающуюся в желудке и высвобождающую активное вещество с постоянной скоростью [158].

Избежать недостатков перорального введения L-ДОФА, в том числе – прохождения препарата через печень, где Леводопа подвергается метаболизму и теряет терапевтическую активность, возможно при изменении пути введения [29]. Внутривенное введение лишено недостатков перорального, связанных с всасыванием в ЖКТ, однако практически неприменимо для ежедневного использования из-за сложности медицинской процедуры [83].

В литературе описано применение микросфер или наночастиц, которые улучшают абсорбцию препарата на периферии и его прохождение через ГЭБ. Применение биodeградируемых микросфер с Леводопой и бенсеразидом улучшает двигательные функции и уменьшает выраженность дискинезий [142].

При исследовании трансдермального пути введения было обнаружено, что Леводопа же сама по себе не проникает через кожу, хотя применение церуленина в сочетании с хлоридом кальция растворённых в смеси из пропиленгликоля и этанола может повысить проницаемость кожи для этого препарата. [94]. Такая ЛФ может служить неинвазивным подходом к непрерывной доставке L-ДОФА в организм человека; вместе с тем остаётся ряд затруднений, обусловленных размером пластыря и возможными местными кожными реакциями [184].

На сегодняшний день в лечении ранних стадий БП доминирует концепция постоянной дофаминэргической стимуляции, которая возникла из идеи

использования постоянной подкожной или внутривенной инфузии L-ДОФА.

Концепция в последующем распространилась и на лечение пероральными ЛС [153].

В связи с вышеперечисленным, актуальной задачей фармацевтической технологии является создание ЛС, обеспечивающего повышение уровня биодоступности L-ДОФА, путем использования пролонгированной формы действующего вещества в составе полимера с регулируемым высвобождением.

1.3 Назальный способ введения лекарственных средств для системного действия

Слизистая оболочка носа покрыта псевдомногослойным эпителием, состоящим из мерцательных, бокаловидных, а также коротких и длинных вставочных эпителиоцитов. Мерцательная клетка на своем свободном конце имеет многочисленные реснички. Реснитчатые клетки имеют по 250 – 300 ресничек длиной 7 и высотой 0,3 микрона. Каждая ресничка состоит из 9 пар микротрубочек, расположенных в виде кольца и окружающих две непарные центральные микротрубочки. Движение ресничек мерцательного эпителия слизистой оболочки носа осуществляется посредством скольжения микротрубочек.

Движение ресничек строго направлено от преддверия полости носа в сторону носоглотки. В самых нижних отделах носа, на передних концах нижних носовых раковин ток слизи направлен извне. Частота биения ресничек 10-15 взмахов в минуту. Частица, попавшая на поверхность слизистой, проходит путь от передних отделов носа до носоглотки за 5-20 минут [132].

Мукоцилиарный клиренс обеспечивается назальным секретом. Назальный секрет состоит из двух слоев: менее вязкая перцепиальная жидкость, имеющая свойства золя (толщиной 7-10 мкм), и более вязкий поверхностный слой, имеющий свойства геля (толщиной 0,5-2 мкм) [194].

Источник секрета, покрывающего эпителий полости носа, – слизистые железы слизистой оболочки носа, бокаловидные клетки, трансудация из субэпителиальных капилляров, слезных желез, секрет специализированных

Боумановых желез из ольфакторной зоны носа. Общий объем выделяемого секрета за сутки колеблется от 0,1 до 1-2 л. Большая часть выделяемого секрета расходуется на увлажнение вдыхаемого воздуха, остальная – увлажнение слизистой. Секрет слизистой в норме состоит на 95 % из воды, остальные ингредиенты секрета – белки, мукогликопротеиды, нуклеиновые кислоты, фосфолипиды [16].

Величина рН носового секрета в норме составляет $7,4 \pm 0,3$ (при измерении вне полости носа), а непосредственно в полости носа, по данным различных авторов, колеблется в интервале 4,6-6,5 [15, 46].

Вязкость носового секрета составляет, в среднем, $1,17 \pm 0,1$, и обусловлена наличием в составе мукогликопротеидов и сахаров (80 % сухого вещества). Мукогликопротеиды образуют значительное количество дисульфидных мостиков, водородных и ионных связей. Высокомолекулярные молекулы слизи образуют упорядоченную структуру слизи и ее физические свойства: вязкость и эластичность [43, 44].

Чтобы преодолеть короткое время пребывания лекарств в полости носа в результате мукоцилиарного клиренса, в состав ЛФ следует вносить различные мукоадгезивные наполнители (например, хитозаны, лектины, тиомеры, полоксамер или гиалуронат натрия) и полимерные композиции, чтобы увеличить время контакта со слизистой оболочкой носа, тем самым увеличивая вероятность всасывания АФС [136, 98].

Направленная доставка соединений в мозг - важнейшая проблема, принципиальная как с точки зрения фундаментальной науки, так и с точки зрения применения в медицине. В последние годы показано, что в носовой полости может происходить активное всасывание ряда лекарственных веществ, которые подвергаются расщеплению в желудочно-кишечном тракте [17].

Площадь слизистой оболочки носовой полости человека составляет около 150 см^2 и хорошо снабжена кровеносными сосудами, что обеспечивает быструю абсорбцию большинства лекарств и создает их высокую концентрацию в крови. Назальная доставка лекарств рассматривается как актуальная альтернатива пероральному приему, поскольку назальная полость легкодоступна, обильно

васкуляризирована, ЛС попадают в кровоток, избегая первичного прохождения через печень [101].

Введение неинвазивно, а биодоступное вещество быстро всасывается и начинает действовать уже через несколько минут, что актуально при экстренной помощи, легко использовать самому пациенту или тем, кто осуществляет за ним уход.

В таблице 1.1 представлены значения биодоступности ЛС, зарегистрированных на территории РФ.

Таблица 1.1 – Биодоступность ЛС при интраназальном введении [15]

АФС	Показание к применению	Биодоступность, %
Азеластин	Местное противоаллергическое средство	40
Будесонид	Местный глюкокортикоид	34
Фентанил	Опиатный анальгетик	80 – 90
Суматриптан	Средство против мигрени	16
Кальцитонин	Минерализация костной ткани, полипептид, содержащий 32 аминокислоты	3
Десмопресин	Антидиуретическое и антигемофилическое средство, циклический нонапептид	10 – 20
Инсулин	Противодиабетическое средство	12 – 15

В настоящее время для интраназального введения ЛС чаще всего используются специальные распылители-дозаторы, при этом одновременно решается вопрос дозировки ЛС, так как при каждом нажатии высвобождается строго определенное количество активного вещества [9, 27].

Основными разработчиками интраназальных форм ЛС являются фирмы Nastech (США) и California Biotechnology Inc. (США). Фирма Nastech имеет более 20 ЛС интраназального применения, разрешенных FDA [115]. Фирма California Biotechnology Inc. разработала специальную систему интраназальной доставки действующих веществ, Nazdel, содержащую тауро-24,25-дигидрофузидат для повышения проницаемости слизистых оболочек носовой полости [159].

Исследователи датской Королевской школы фармации разработали новую форму интраназальной доставки ЛС - биоадгезивные микросферы, которая обеспечивает длительный контакт ЛС со слизистой носовой полости, пролонгируя тем самым форму ЛС. Микросферы имеют размер 40-60 мкм, иначе они легко

удаляются. Действующие вещества, находящиеся в микросферах, также защищены от ферментативного разрушения в носовой полости [132].

При интраназальном введении 2 мг лоразепама здоровым добровольцам было показано, что биодоступность ЛП соответствует таковой при внутримышечном введении ($77,7 \pm 11,1$ %). При этом интраназальное введение приводит к более быстрому поступлению в системный кровоток и достижению максимальной концентрации [133].

Выявлено, что интраназальное введение кортикостероидов позволяет снизить дозу ЛС, необходимую для введения больным с аллергическими заболеваниями, и соответственно уменьшить число неблагоприятных реакций при проведении терапии [100]. В частности, при длительном применении пропионата беклометазона, вводимого традиционным образом, наблюдается отставание детей в росте. Между тем, при интраназальном использовании аэрозоля пропионата беклометазона в течение одного года не было обнаружено достоверных изменений в росте и развитии детей [120].

Сходные данные были получены и при изучении интраназальной формы триамцинолона [94, 127, 171].

В 60-70 годах прошлого столетия, на заре использования L-ДОФА, был описан целый спектр побочных эффектов этого препарата, вызванный, главным образом, стимуляцией периферических рецепторов к дофамину. С 1985 г в клинической практике используются препараты L-ДОФА, содержащие ингибитор фермента периферической ДОФА-декарбоксилазы (карбидопу или бензеразид), которые препятствуют превращению L-ДОФА в дофамин за пределами нервной ткани [113, 139].

Ингибиторы ДОФА-декарбоксилазы, в отличие от L-ДОФА, не проходят сквозь гематоэнцефалический барьер, благодаря чему большая часть L-ДОФА не метаболизируется на периферии, а поступает в ткани мозга. Благодаря этому в 5 раз увеличивается биологическая доступность L-ДОФА [111]. Сочетание L-ДОФА и карбидопы (или её аналогов) позволило значительно снизить уровень побочных эффектов.

К недостаткам препаратов L-ДОФА, которые были отмечены в клинической практике при лечении БП относят:

- низкую биодоступность - примерно 12 % от общего количества препарата;
- постепенное снижение терапевтического эффекта по мере лечения за счет снижения чувствительности рецепторов (десенсбилизация) и необходимость увеличивать дозу препарата;
- колебания степени абсорбции препарата в желудочно-кишечном тракте, особенно при нарушении моторных функций кишечника;
- короткий период полураспада в плазме крови.

Два последних пункта акцентируют внимание на недостатках, которые приводят к тому, что пациенты получают «пульсирующую» стимуляцию дофаминовых рецепторов, на фоне которой развивается клиническая картина двухфазного эффекта [42, 81].

Одной из важных проблем, с которой сталкиваются клиницисты при длительном применении L-ДОФА для лечения БП, являются неизбежное нарушение механизмов контроля двигательной активности (развитие моторных флюктуаций и дискинезий) [163]. Развитие этих нарушений определяется многими факторами:

- прогрессирующая дегенерация дофамин-синтезирующих нейронов, утрата ими способности захватывать L-ДОФА и синтезировать дофамин, нарушение функций хранения и высвобождения дофамина [192];
- нарушение рецепторного аппарата клеток-мишеней - снижение чувствительности рецепторов к дофамину или снижение их плотности (по типу down-regulation);
- значительные колебания уровня L-ДОФА в плазме.

Таким образом, развитие моторных флюктуаций и дискинезий на фоне приема препаратов L-ДОФА является следствием длительного приема (кумулятивной дозы), и результатом дегенеративных процессов в нервной системе по мере развития болезни [92]. L-ДОФА восполняет дефицит дофамина, очевидно,

что на фоне гибели 60-80 % дофаминэргических нейронов ЛС не может полностью вернуть утраченные функции дофаминовой системы (восстановить пути метаболизма и рецепторный аппарат), т.е. не может восстановить нормальный физиологический уровень дофаминэргической иннервации нейронов [29, 168].

Прием L-ДОФА в составе существующих ЛП в течение многих лет изменяет клиническую картину БП, из-за чего данное нейродегенеративное заболевание приобретает иной характер - примерно у 50 % пациентов развивается моторные флюктуации в виде дискинезий и гиперкинетических нарушений [175, 143, 176].

Решением перечисленных проблем является снижение эффективной терапевтической дозы за счет повышения биодоступности L-ДОФА, что можно достичь, используя ЛС в пролонгированной форме с регулируемым высвобождением и назальный путь введения.

Назальное применение ЛС через слизистую носа обладает следующими преимуществами:

- богатые сосудистые сплетения полости носа предусматривают прямой проход в поток крови ЛС, которые легко проникают слизистые оболочки [181];

- абсорбция ЛС непосредственно в поток крови позволяет избегать попадания ЛС в желудочно-кишечный тракт и первого печеночного метаболизма (разрушение веществ ферментами печени), позволяя ЛС быть экономически более эффективным, быстрым и предсказуемо более биодоступным, чем если оно вводится перорально;

- биодоступность многих ЛС при назальном применении, по скорости поглощения и концентрации в плазме крови, сопоставима с внутривенным введением, и обычно лучше, чем подкожное или внутримышечное;

- простота, удобство и безопасность, так как введение практически безболезненное и не требует технологии стерилизации, катетеров внутривенного введения и других инвазивных устройств;

- при назальном введении возможно быстрое достижение терапевтического уровня ЛС в головном и спинном мозге. Учитывая механизмы доставки молекул

ЛС из назальной области в мозг, концентрация в тканях мозга может превышать его концентрацию в плазме [95, 182];

– высокая эффективность назального введения дофамина подтверждена экспериментально и у животных с 6-гидроксидофамин (6-ОНДА) индуцированной односторонней моделью БП облегчало симптомы болезни.

В то же время, период полужизни L-ДОФА при назальном введении составлял менее 30 минут, как в крови, так и в тканях мозга [165]. Основной сложностью при этом является низкая растворимость L-ДОФА в воде и быстрая скорость его метаболизма на периферии [79, 127].

Подходом к устранению перечисленных недостатков является упаковка ЛП в биodeградируемый и нетоксичный сополимер молочной и гликолевой кислот.

На сегодняшний день в лечении ранних стадий БП доминирует концепция постоянной дофаминэргической стимуляции, которая возникла из идеи использования постоянной подкожной или внутривенной инфузии апоморфина, лизурида или L-ДОФА [106, 85]. Концепция в последующем распространилась и на лечение пероральными ЛП.

В связи с этим, другим подходом к снижению возможных побочных эффектов и увеличению эффективности дофаминэргической терапии является создание ЛС с пролонгированным высвобождением.

1.4 Использование L-ДОФА в полимерной форме

Известно, что при пероральном введении дофамин не проявляет терапевтическое действие у людей с БП, что связано с низкой проницаемостью через мембраны эпителиальных клеток [20, 30]. Несколько лучше обстоит дело в случае L-ДОФА.

Попав в капилляры и далее в кровяное русло, действующие вещества подвергаются разрушающему действию ферментов. Далее они встречаются на своём пути новый барьер – печень, где также происходит их дальнейшее разрушение [106]. В результате этих процессов, часто больше 50 % действующих веществ теряется, не достигая клеток - мишеней.

Ранее [123] была показана перспективность использования липосом (фосфолипидных пузырьков) для защиты L-ДОФА от деструктивного действия ферментов. Эти микросферы (размером от 25 нм до 1 мкм) служили своеобразным контейнером для ЛС, защищая его от преждевременного декарбоксилирования и не допуская быстрого падения концентрации активного вещества в крови, в результате чего была повышена эффективность действия ЛП L-ДОФА более чем в 10 раз [89, 179].

Большая активность липосомального L-ДОФА объяснялась также лёгкостью проникновения этой ЛФ через гематоэнцефалический барьер [47, 73, 45]. Этими опытами была показана принципиальная перспективность использования L-ДОФА в виде наносомальной ЛФ [86, 158].

Липосомальные формы некоторых ЛП, в последнее время, допущены к применению в медицинской практике (“Фосфоглиф” “Доксорубицин” Амфотек (Sequus Pharmaceuticals, липидосвязанный амфотерицин В, одобрен FDA в 1996 г.), имея неоспоримые преимущества, по сравнению с традиционными ЛФ, содержат ряд существенных недостатков, которые ограничивают их использование. К существенным недостаткам следует отнести высокую стоимость используемых фосфолипидов, а также их низкую стабильность при хранении [1].

Следует также отметить, что использование липосомальных лекарственных форм, обеспечивает также пролонгированность действия ЛП и снижение их токсичности [3, 55].

Однако эти эффекты значительно ниже по сравнению с полимерсодержащими наносомальными формами, которые всё больше находят применение при создании новых ЛС.

Преимущества подобных ЛФ очевидны:

– контролируемое высвобождение действующего вещества позволяет уменьшить его дозу и существенно снизить вероятность развития побочных эффектов и их тяжесть [4];

– наноформы ЛС способствуют преодолению множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), связанной с работой МЛУ-транспортеров:

при проникновении нанокапсул в клетку, инкапсулированное действующее вещество не становится субстратом для МЛУ-транспортёров (в частности, гликопротеина Р) [112];

– снижение частоты приема значительно повышает приверженность пациента лечению, т.к. известно, что многие терапевтические рекомендации не выполняются, либо режим приема ЛС нарушается, что ведет к неэффективности терапии и развитию лекарственной устойчивости [21].

Согласно экспертным оценкам, в ближайшие годы ожидается значительный рост рынка нанофармакологии [123]. Для применения в фармакологии и медицине наночастицы отбираются по функциональным параметрам: возможности биodeградации, биосовместимости, конъюгации, способности к комплексообразованию [6, 8].

Выделяют два типа ЛС, основанных на применении наночастиц:

– наночастицы, состоящие только из терапевтических молекул (сами наночастицы являются терапевтическими молекулами) (например, наночастицы, созданные по технологии NanoCrystal [10];

– терапевтические молекулы связаны с транспортными наночастицами (наночастицы являются переносчиками терапевтических молекул) [180].

В общем случае за счет контролируемого размера и структуры наночастиц можно достичь необходимой фармакокинетики действующего вещества [85, 86]. При этом наиболее оптимальным вариантом является поддержание неизменной концентрации вещества в месте доставки. Подобные параметры могут быть достигнуты с помощью наночастиц, ЛС в которых инкапсулировано в полимерный матрикс [122].

Роль полимеров в системах доставки ЛС многогранна – от поддержания физико-химической стабильности действующих веществ до регуляции их высвобождения и адресной доставки. Основные требования к полимерам, применяемым в медицине, – биосовместимость, нетоксичность, апиrogenность, отсутствие канцерогенных и гемолитических свойств, возможность стерилизации [149].

Полимеры, используемые для создания биodeградирующих микро- и наноструктур разделяют на синтетические: полиэфиры (в т.ч. полилактиды, PLGA), полиангидриды, полифосфазены, полиалкилцианакрилат, и т.д.; и натуральные полимеры: альбумин, коллаген, желатин, альгинаты, полисахариды, хитозан, и т.д. [129]. Среди основных проблем, связанных с созданием биodeградирующих микро- и наноформ ЛС можно выделить:

- необходимость индивидуального подбора метода инкапсуляции с учетом его физико-химических свойств;
- «сохранность» действующего вещества в капсуле, как при хранении, так и при высвобождении и деградации капсулы;
- кинетика высвобождения действующего вещества – проблема первичного массового высвобождения при попадании в организм;
- возможная токсичность наночастиц.

1.5 Применение полилактидов для создания систем доставки лекарственных средств

Термин полилактиды включает в себя не только поли(L-лактид) (PLLA) и поли(DL-лактид), но также поли(гликолид) (PGA) и значимые сополимеры, такие как поли(лактид-ко-гликолид) (PLGA) [89]. Начало биомедицинского применения полилактидов (в частности, PLA) датируется 60-ми годами прошлого века [117]. В ответ на введение подобных материалов отмечаются минимальные локальные воспалительные реакции, снижающиеся с течением времени. Токсических эффектов, связанных с этими полимерами не отмечено.

Биodeградация полилактидов (Рисунок 1.1), в большинстве случаев, осуществляется неэнзиматически, с образованием молочной и гликолевой кислот, гидрофильных, хорошо растворимых и быстро включающихся в метаболизм [107]. Было показано, что время деградации PLGA зависит от соотношения мономеров (молочной и гликолевой кислот), используемых при производстве полимера: чем выше содержание гликолида, тем быстрее происходит деградация [36]. Исключением из этого правила является сополимер с равным соотношением

компонентов (50: 50), скорость деградации которого максимальна, как *in vitro*, так и *in vivo* [31, 118].

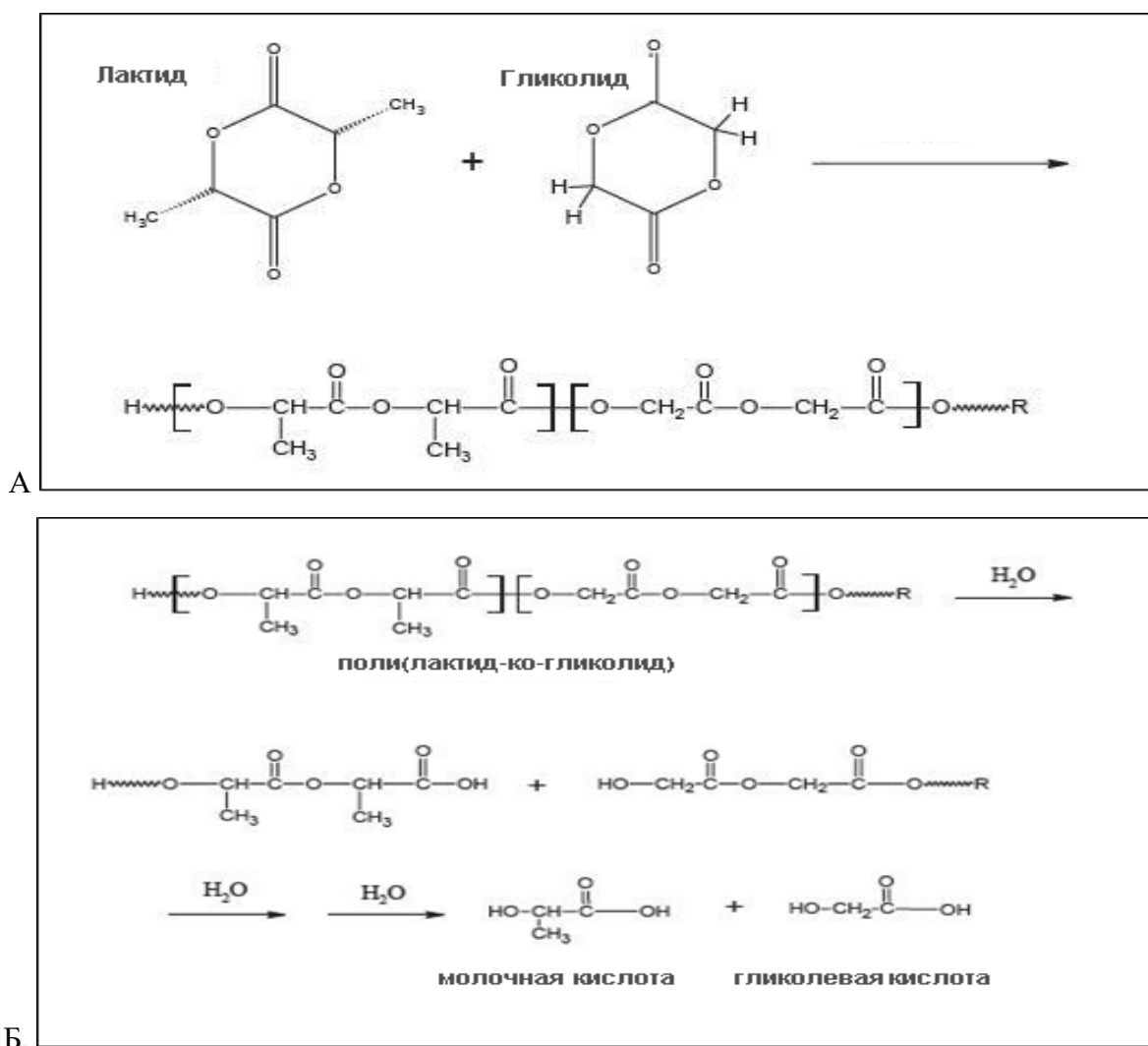


Рисунок 1.1 – Полилактиды (А – Синтез PLGA; Б – Деградация PLGA) [111]

Среди прочих факторов, влияющих на скорость деградации, выделяют степень упорядоченности структуры (полукристаллическая или аморфная), эффект концевой группы (эфирная, гидроксильная, карбоксильная), молекулярный вес (M_w), геометрию полученного продукта, pH и температуру среды, в которой происходит деградация [111, 154].

В большинстве случаев для систем, основанных на PLGA, характерна массовая деградация полимерного матрикса путем случайных расщеплений по

механизму автокаталитического типа [32]. При этом исходная форма и масса продукта сохраняются до того момента, когда деградирует практически 90 % полимера [161].

Возможность создания частиц с контролируемым временем деградации привели к разработке значительного числа систем доставки ЛС, основанных на PLGA [49].

Использование полилактидов в качестве материалов для медицинского и фармакологического применения одобрено как FDA, так и ВОЗ [115, 80]. Таким образом, получение полимерной формы L-ДОФА на основе биodeградирующего полимера (PLGA), является современным, полностью оправданным направлением исследования и позволяет получить ЛФ, обладающую большей эффективностью действия при пониженной токсичности, с меньшими побочными эффектами и обладающую определённой пролонгацией действия [50].

Необходимо также учитывать, что ЛП L-ДОФА, полученные на основе сополимера молочной и гликолевой кислот и модифицированные поливиниловым спиртом способны дольше циркулировать в кровотоке и обеспечивать поддержание терапевтической концентрации ЛС в течение длительного времени [39, 88].

Полимерные формы ЛС являются композитными материалами и состоят из полимера–носителя, самой АФС, стабилизатора эмульсии (модификатора поверхности) и криопротектора [167, 177].

В связи с этим, среди основных проблем, связанных с созданием ЛФ на основе полимеров в виде микро- или наночастиц можно выделить необходимость индивидуального подбора состава и метода инкапсуляции для каждого действующего вещества с учётом его физико-химических свойств [137, 105]. При таком подборе состава и метода получения полимерной композиции необходимо добиться максимально возможного содержания АФС в разрабатываемом ЛС и степени его включения в полимерную матрицу [37, 38].

Выбранный метод получения полимерных частиц с включённым ЛС должен также отличаться технологичностью и обеспечивать заданный их размер [41]. В

связи с изложенным, методы, используемые для скрининга полученных экспериментальных образцов полимерных ЛС на основе L-ДОФА, должны обеспечивать получение данных по указанным выше параметрам, а именно содержанию ЛС в полимерных частицах, их размерам и способности образовывать стабильные коллоидные растворы в водных средах [40].

Подбор оптимального состава композиции и технологических параметров её получения осуществляется по принятой, для такого рода работ, схеме: выбирается тип полимера для получения частиц, выбирается тип поверхностно активного вещества (ПАВ), подбирается массовое соотношение полимера и ПАВ, подбирается оптимальная концентрация стабилизатора эмульсии и оптимальные условия технологического процесса.

1.6 Современные представления о способах ориентированной интраназальной доставки лекарственных средств

В целом, эффективная доставка интраназальных ЛС в ЦНС у человека может быть достигнута путем выбора правильной комбинации устройства для назальной доставки, ее объема (количество действующего вещества в дозе), а также рекомендации фиксации положения головы под необходимым углом для воздействия на определенные области полости носа. Что касается выбора устройства для доставки состава ЛФ, то в клинических исследованиях цельновирусной жидкой вакциной против гриппа без адьюванта иммунный ответ был более выражен при использовании устройства с приводом дыхания и назальных капель, чем при выборе назального спрея [125].

В другом исследовании [156] протестировали носовые полости и системы доставки аэрозолей, используя анатомическую модель носа 60-летнего здорового мужчины, реконструированную по изображениям компьютерной томографии.

Авторы подробно сравнили аэрозольную назальную доставку и двунаправленные системы с приводом дыхания, используя подход вычислительной динамики движения жидкости и частиц.

Результаты показали, что подход к доставке лекарств с помощью дыхания

может обеспечить более эффективную обонятельную абсорбцию, чем традиционный подход с аэрозолем [119].

В другом исследовании аэрозольное устройство «Optinose» использовалось для изучения взаимосвязи между введением пептида окситоцина и дозовым терапевтическим ответом. Результаты показали, что для доставки через нос непосредственно в ЦНС требуется более низкая доза при использовании с дыхательным приводом, по сравнению с аэрозольным устройством введения [135]. Более низкие дозы были более эффективны в возникновении когнитивной реакции [147, 164].

Расширяются исследования назальных устройств для введения ЛС в полость носа с учетом требуемых соблюдения режимов дозирования [188, 189, 190]. Устройства для назальной доставки, такие как ингаляторы сухого порошка, устройства для двунаправленной доставки, дозирующие спрей-насосы, назальные двунаправленные спреи, аэрозоли различной формы дозирования уже зарегистрированы в мире для лечения различных заболеваний: Zomig®, Astelin®, Narcan®, Dymista®, Advancia®, Onzetra® [104, 116].

Исследовательский интерес к системам системной интраназальной доставки ЛС продолжает быстро расти в попытках разработать составы, которые напрямую достигают ЦНС в терапевтических концентрациях [162, 109, 90, 187]. Большинство исследований ограничиваются доклиническими исследованиями, главным образом из-за отсутствия адекватных клинических данных. Большинство доступных количественных и качественных данных в литературе, посвященных профилям распределения, создаваемым обычными назальными составами/устройствами, сообщают об ограниченной фармакокинетики из назальной области [149, 148].

Потенциальные ограничения могут возникать из-за узкого пространства преимущественного места всасывания интраназальных действующих веществ для оказания системного применения обонятельной щели (шириной 1-2 мм), которая спрятана глубоко в носовых ходах над основными дыхательными путями, и охватывается лишь небольшой частью воздушного потока [130].

Приведенные выше примеры показывают важность выбора подходящего

устройства для назальной доставки для эффективной доставки лекарственного средства в ЦНС.

Для разработки подходящей системной интраназальной доставки ЛС, необходимо решить задачи, связанные с составом ЛФ и устройством дозирования. В тоже время необходимо учитывать физиологические ограничения, которые определяют всасывание ЛС в полость носа [117, 173]. Так, ограниченное время назального пребывания на слизистой действующих веществ из-за мукоцилиарного клиренса требует использования безвредных наполнителей в составе – усилителей адсорбции и мукоадгезивных агентов [126, 191].

Несмотря на разрабатываемые системы дозирования ЛС, авторами исследований, представленных в открытых информационных источниках (Pubchem, Pubmed, Scopus), прослеживаются тенденции по предпочтению выбора в качестве ЛФ назальные капли для направленной доставки АФС непосредственно в ЦНС, вследствие большей текучести и распределения ЛФ в обонятельной области.

Спреи в качестве системы доставки представляют потенциальный интерес разработчиков для локального применения в терапии слизистой, мукоцилиарного клиренса и воздействия на пазухи носа.

В таблице 1.2 представлено краткое описание некоторых систем для назальной доставки ЛС с описанием преимуществ и ограничений применения.

Таблица 1.2 – Примеры устройств для назальной доставки ЛС с описанием преимуществ и ограничений применения

Система доставки	Описание	Область распыления	Агрегатное состояние ЛФ	Ссылка
Назальные капли	<p>Поставляется со стеклянной пипеткой, пипеткой или дозирующим устройством, встроенным во флакон. Клиренс со слизистой протекает быстрее, чем у назальных спреев. На терапевтическую эффективность может влиять техника введения пациенту</p>	<p>Распределение ЛФ происходит на большей площади, чем у назальных спреев. Больше концентрируются в обонятельной области по сравнению с использованием назальных спреев, что увеличивает биодоступность для АФС с направлением всасывания непосредственно в ЦНС</p>	Жидкое, гелеобразное	[116, 166, 169]
Дозированные помповые спреи	<p>Доставляет от 25 до 200 мкл на дозовое распыление. Относительно прост в использовании для пациентов. Воспроизводимые доставляемые дозы Увеличивает стоимость ЛС в несколько раз. На эффективность может влиять техника введения пациенту. Консерванты в составе необходимы для стабильности</p>	<p>Распределение ЛФ из помповых спреев в основном происходят в передних отделах полости носа, включая преддверие и область носового клапана. Низкое достижение областей, соответствующих обонятельной области, что влечет низкую абсорбцию системных АФС</p>	Жидкое	[103, 185, 138]

Продолжение таблицы 1.2

Аэрозоли	Аэрозольные частицы потенциально могут быть направлены в обонятельную область, но их осаждение в этой области затруднено сложной комбинацией факторов, которые включают физико-химические свойства ЛП, устройства доставки и способ его использования.	Для прогнозирования биодоступности и биоэквивалентности назального продукта Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) рекомендует тщательно определить физические характеристики аэрозолей, высвобождаемых устройством, такие как, распределение капель по размерам, вязкость и геометрию шлейфа. Хотя оценка физико-химических свойств ЛФ в аэрозоле важна для назальных устройств, само по себе оно не может точно предсказать <i>in vitro</i> региональное осаждение аэрозолей в полости носа и дальнейшее преобразование в измерения <i>in vivo</i> . Наличие пропеллента в составе может вызывать раздражение слизистой при длительном применении	Жидкое	[115, 150]
Устройство Optinose®	Устройство двунаправленной доставки Состоит из: уплотняющей носовой части, мундштука конической формы, насоса-распылителя и дополнительного механизма, активируемого дыханием, для создания капель необходимого размера (для жидкого агрегатного состояния ЛФ)	Непосредственно доставляет ЛС в обонятельную область, с резорбтивным действием. Способно обеспечить надежное дозирование	Жидкое и твердое (порошок/пудра)	[156]

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Проанализирован уровень разработок ЛС, ориентированных на лечение болезни Паркинсона и направления в создании ЛФ на основе полимерных композиций, затрагивающий научно-техническую проблему в рамках исследования, включая подходы к оценке фармакологических, фармакокинетических исследований ЛС на основе L-ДОФА.

2. Патентные исследования показали значительный уровень изобретательской активности в области технологии получения наночастиц с различными биологически активными веществами, а также фармацевтических композиций и технологии получения ЛП с наночастицами биологически активных веществ. В настоящее время в мире не существует зарубежных и российских объектов исследований аналогичных разрабатываемым технологиям, не зарегистрировано заявок, в которых бы рассматривались перспективы потенциального использования 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина в форме наночастиц с полилактидгликолидами и применяемым в виде назальной формы, что доказывает актуальность выполняемого исследования.

3. Для ФР разрабатываемого ЛС был определен назальный способ доставки АФС, включенной в полимерную композицию. Назальная доставка ЛС рассматривается как актуальная альтернатива пероральному приему, поскольку назальная полость легкодоступна, обильно васкуляризирована, хорошо проницаема, имеет большую площадь поверхности, что способствует всасываемости и увеличению биодоступности.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Диссертационная работа выполнена в рамках Государственного контракта от 11 июня 2015 г. № 14.N08.12.0038 по теме «Доклинические исследования лекарственного средства на основе 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина (леводопа) и полилактидгликолидов для лечения болезни Паркинсона» ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

В экспериментальных исследованиях была использована АФС L-ДОФА – химическое название - (2S)-2-амино-3-(3,4-дигидроксифенил) пропановая кислота USP-NF; НД фирмы «Sigma Aldrich» (США).

Содержание: от 99,00 % до 101,00 % (в пересчете на сухое вещество) (Рисунок 2.1).

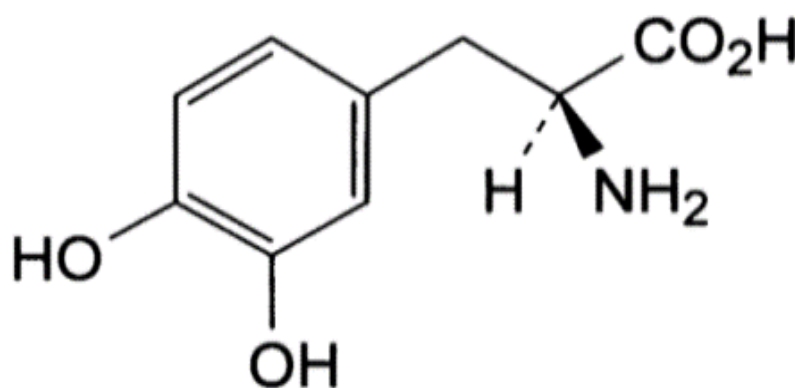


Рисунок 2.1- Структурная формула L-ДОФА

Эмпирическая формула - C₉H₁₁NO₄

Молекулярная масса - 197,19

Молекула L-ДОФА имеет относительно небольшие размеры, обладает высокой полярностью и содержит в своем составе amino- и карбоксильную группы.

Спецификация на L-ДОФА представлена в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Спецификация на L-ДОФА

Наименование показателя качества	Значение
Описание	Аморфный лиофилизированный порошок белого или бежевого цвета, гигроскопичен, фоточувствителен, без запаха
Растворимость	Растворим в диметилсульфоксиде и в диметилформамиде, плохо растворим в эфире, гексане, спирте 96 %; с водой образует суспензию
Подлинность	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора совпадает со временем удерживания пика L-ДОФА на хроматограмме стандартного раствора (ВЭЖХ)
Количественное определение	99,00 %
Родственные примеси	Любая единичная примесь – не более 0,1 %; сумма примесей – не более 1,5 % (ВЭЖХ)
Размер частиц	Средний диаметр частиц основной фракции – не более 500 нм
Седиментационная устойчивость	При встряхивании АФС в воде (15 мг/10 мл) образуется гомогенная, не содержащая агломератов, суспензия, устойчивая в течение не менее 15 мин
pH раствора	От 4,5 до 7,0
Вода	Не более 1 %
Остаточные органические растворители	Хлороформ – не более 40 ppm
Информация о хранении	Температура хранения от 2 до 8 °С. Срок хранения 2 года

2.2 Вспомогательные вещества

Для определения критерий качества и требований к ВВ для разработки ЛФ использовали справочник вспомогательных веществ, используемых при производстве ЛС ЕАЭС [76].

Полимер PLGA 50/50. LACTEL® «Absorbable polymers international» (США) растворим в органических растворителях (хлороформ, ацетон, этилацетат, дихлорметан, ацетон и этилацетат) и нерастворим в воде; разбухает в разной степени в зависимости от молекулярной массы и от их состава [83].

Вода очищенная (ФС.2.2.0020.18). Получали на аквадистилляторе ДЭ-4 модель 737 (РФ), для хроматографических растворов на установке Milli-Q Water Purification Sistem (Millipore, USA).

Масло оливковое (ООО «ЭволГолдОпт», Россия) состоит, в основном, из смешанных триглицеридов эфиров олеиновой кислоты, миристиновой, пальмитиновой кислоты и других жирных кислот, в том числе линолевой и стеариновой.

Масло подсолнечное (ГК «Сигма», Россия) состоит из смешанных триглицеридов эфиров жирных кислот стеариновой 1,6-4,6 %, пальмитиновая 3,5-6,4 %, миристиновой до 0,1 %, арахидиновой 0,7-0,9 %, олеиновая 24-40 %, линолевой 46-62 %, линоленовой до 1 %.

Бензиловый спирт («Экос», CAS № 100-51-6, Китай) – бесцветная жидкость со слабым приятным запахом; имеет обозначение E1519, как пищевая добавка.

Динатрия эдетат («Экротхим», Россия) – представляет собой белый кристаллический порошок или кристаллы белого цвета, хорошо растворимые в воде и щелочах, очень малорастворимые в спирте. Образует очень устойчивые комплексные соединения с большинством катионов, делает нерастворимые соли металлов растворимыми. Температура плавления 110 °С. Температура разложения 255 °С, рН 1 % водного раствора 4,0-4,5, рН с массовой долей 5 % 4-5,5. Растворимость в воде при температуре 20 °С составляет 100 г/л при температуре 80°С – 230 г/л. Молекулярная масса: 372,23 г/моль.

Хлористоводородная кислота (ОАО «Уральский завод химических реактивов», Россия) – одноосновная кислота, использовалась для создания надлежащего значения рН.

Сорбитол («Химфарм продукт», CAS № 50-70-4, Россия) – шестиатомный спирт, обладающий сладковатым привкусом. Химическая формула – C₆H₁₄O₆. Код АТХ: А06AD18: обладает желчегонным, дезинтоксикационным и спазмолитическим действием. Зарегистрирован, как пищевая добавка E420. Состоит из белых кристаллов, достаточно твердых, без запаха. Используется в фармацевтической технологии, как структурообразователь, консервант, повышает вязкость растворов, способен удерживать воду.

Натрия цитрат (ООО «ПРОФСНАБ», Россия) – натриевая соль лимонной кислоты Na₃C₆H₅O₇. Код АТХ: В05СВ02: применяется в медицине как

антикоагулянт, уменьшает кислотность при периферических почечных ацидозах, и также как регулятор осмоса. Зарегистрирован, как пищевая добавка E331. Представляет собой белый порошок с довольно характерным кисловато-соленым вкусом, хорошо растворим в воде.

Метилгидроксипропилцеллюлоза (MECELLOSE® FMC-23021, производства Lotte Fine Chemicals, Корея) – смешанный эфир на основе метилцеллюлозы, содержащий в элементарном звене макромолекулы целлюлозы наряду с метоксильными гидроксипропильные группы. Представляет собой белое или слегка желтоватое порошкообразное или гранулированное вещество без запаха и вкуса. Основные физико-химические свойства эфира: плотность 1290-1310 кг/м³; насыпная плотность 283-499 кг/м³; температура плавления 240-260 °С; температура обугливания 300-305 °С; температура желатинизации водных растворов 65-90 °С. Растворима в воде, слабых кислотах [75].

Натрия дигидрофосфата (моно, дигидрат, додекагидрат) (ООО «ПРОФСНАБ», Россия) – химическая формула NaH_2PO_4 , неорганическое соединение, кислая соль натрия и ортофосфорной кислоты, бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в воде. Кристаллогидрат. Обладает свойствами буфера.

Глицерол (глицерин) (ООО «Химбаза», ЧДА, Россия) – простейший трёхатомный спирт. Химическое наименование – 1,2,3-тригидроксипропан. Химическая формула: $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{OH}$. Эмпирическая формула: $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$. При комнатной температуре – вязкая, сладкая на вкус, бесцветная прозрачная жидкость. Температура плавления – 17,8 °С. Температура кипения – 290 °С. Как пищевая добавка, имеет код E422, используется как влагоудерживающий агент, загуститель.

Кислоты лимонной моногидрат $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (ООО «Химбаза», ХЧ, CAS № 5949-29-1) – трёхосновная карбоновая кислота. Применяется как регулятор кислотности, антиоксидант и консервант (E330) и в качестве компонента буферных растворов.

Гипромеллоза (Sigma-Aldrich, Германия) – белый или желтоватый порошок, без запаха и вкуса, растворяется в холодной воде в водных растворах

спиртов, таких как этанол и изопропанол, с содержанием воды в соотношении более 1: 1, но не растворяется в чистых спиртах. Используется в медицине как средство для местного применения в офтальмологии (средство увлажнения роговицы глаза). Является протектором эпителия роговицы, оказывает смазывающее и смягчающее действие, обладает высокой вязкостью, что увеличивает продолжительность контакта раствора с роговицей (АТХ код: S01K A02, S01KA). В фармацевтической промышленности используется, как связывающее вещество, пленкообразователь, влагоудерживающий агент.

Цетиловый спирт («Химфарм продукт», Россия) – одноатомный спирт состава $C_{16}H_{33}OH$. Относится к жирным спиртам. Представляет собой твердое вещество. Температура плавления равна $54,6\text{ }^{\circ}C$. Температура кипения – $270\text{ }^{\circ}C$. Не имеет запаха, цвет кристаллов белый. Не растворим в воде, но растворим в эфирах и спиртах. Обладает смягчающим, увлажняющим, эмульгирующим действием, является загустителем.

Полисорбат 80 – твин 80 (Sigma-Aldrich, Германия), неионогенное ПАВ со степенью оксиэтилирования 80, является эмульгатором и солюбилизатором жиров в составе мягких ЛФ. Хорошо растворим в воде и этаноле (спирте). Не растворяется в минеральном масле и жидком парафине.

Парафин жидкий или вазелиновое масло (ООО «Компания Эльग्रupp», Индия) – преимущественно нормального строения состава от $C_{18}H_{38}$ до $C_{35}H_{72}$. Температура плавления от 45 до $65\text{ }^{\circ}C$; плотность $0,880 - 0,915\text{ г/см}^3$ ($15\text{ }^{\circ}C$). Представляет собой смесь жидких углеводородов нефтяного дистиллята, получается в процессе очистки нефтяных фракций серной кислотой.

Применяется в различных отраслях, в том числе при производстве таких мягких лекарственных форм, как мази, кремы. Является одним из основных компонентов большинства увлажняющих средств. При нанесении создает защитный барьер, сохраняя необходимый уровень влаги в коже.

Парафин белый мягкий (Вазелин) (ООО «Компания Эльग्रupp», Россия) – белое или бесцветное вещество мягкой консистенции, получаемое от нефти, угля или битуминозного сланца. Состоит из смеси молекул углеводорода, содержащих

между двадцатью и сорока атомами углерода. Применяется как основа для мазей, сгущающее вещество при получении паст, мазей, кремов. Положительными качествами является его стойкость, отсутствие запаха и цвета, устойчивость к окислению.

2.3 Методы исследования

Условия проведения методов исследования были гармонизированы в соответствии с требованиями ФЕАЭС [76] и ГФ РФ [12, 13].

Растворимость изучали в соответствии с **ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость»**. Испытания проводили при фиксированном значении температуры 20 ± 2 °С. Вещество считают растворившимся, если в растворе при наблюдении в проходящем свете не обнаруживаются частицы вещества в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0005.

Определение рН суспензии проводили в соответствии с ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия» [12, 13]. Около 200 мг (точная навеска) анализируемой композиции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Измерение проводят на рН-метре Mettler Toledo (США).

Определение размеров частиц проводили методом динамического светорассеяния. Для анализа использовали субмикронный лазерный спектрометр Coulter N4MD фирмы Coulter Electronics (США) и анализатор Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, Великобритания).

В стеклянном пузырьке вместимостью 10 мл взвешивали 0,9-1,1 мг анализируемой композиции. Добавляли 5,5-5,5 мл дистиллированной воды. Заткнув пробкой, взбалтывали смесь до получения однородного коллоидного раствора (примерно 1 мин) и оставляли его стоять на 3-5 мин. Отбирали пипеткой 1,5 мл полученного рабочего раствора и переносили в специальную кварцевую кювету. Проводили измерения без предварительного озвучивания образца. Измерения осуществляли с использованием стандартизованного протокола измерения при 25 °С. Результаты в графической и табличной форме сохраняли в

электронном виде. Норма: не менее 90 % основной фракции частиц должны быть размером не более 500 нм.

Содержание воды изучали в соответствии с требованиями ФЕАЭС. В норме содержание воды в испытуемом образце не должно превышать 1 %. Содержание воды в испытуемом образце определяли согласно 2.1.5.12. Вода: полумикрометодом (Метод К. Фишера) по количественной реакции воды с серы диоксидом и йодом в безводной среде метанола. Испытание проводили согласно фармакопейным требованиям и технологической инструкции к автоматическому титратору.

Остаточные органические растворители (метод ГЖХ).

Раствор внутреннего стандарта. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 180 мл диметилформамида (фирмы Burdick and Jackson, очищенный через стекловолокно или аналогичный), с помощью микрошприца вносили 100 мкл этилацетата. Закрывали колбу крышкой и перемешивали до получения прозрачного раствора, доводили объём до метки добавлением диметилформамида и перемешивали.

Стандартный раствор. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 80 мл внутреннего стандарта, с помощью микрошприца вносили 10 мкл хлороформа (Sigma, для ВЭЖХ), доводили объём до метки добавлением внутреннего стандарта и перемешивали.

Испытуемый раствор. Около 100 мг (точная навеска) полимерной композиции помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объём раствора раствором внутреннего стандарта до метки и перемешивали. Раствор готовили в 2 повторностях.

Условия хроматографирования. Прибор - Hewlett-Packard 5890, серия II или аналогичный; колонка - стеклянная 6 м × 2 мм, 1 % SP – 1000 на Carborak B (60/80 меш); детектор - пламенно-ионизационный; газ-носитель - гелий; скорость газ-носителя - 30 мл/мин; скорость водорода - 30 мл/мин; скорость воздуха - 300 мл/мин; температура колонки -50 °С, выдержка 6 мин, повышение температуры со скоростью 20 °С/мин до 200 °С, выдержка - 18 мин; температура инжектора -

225 °С; температура детектора – 225 °С; объём пробы – 2 мкл. В приведенных условиях время удерживания хлороформа около 6 мин, время удерживания N, N-диметилформамида около 14 мин.

Методика. Хроматографировали N, N-диметилформамид, стандартный (3 раза) и испытуемые растворы. Содержание хлороформа (X), в процентах, рассчитывали по формуле:

$$X = A_u \times V_s \times \rho_s \times 2 \times 100 / A_s \times 1000 \times 100 \times W = A_u \times V_s \times \rho_s / A_s \times W \times 500,$$

где A_u – отношение площади пика хлороформа к площади пика этилацетата (внутренний стандарт) на хроматограмме испытуемого раствора;

A_s – отношение площади пика хлороформа к площади пика этилацетата (внутренний стандарт) на хроматограмме стандартного раствора;

W – навеска субстанции, в граммах;

V_s – объём хлороформа, взятый для приготовления стандартного раствора, в микролитрах;

ρ_s – плотность хлороформа, взятого для приготовления стандартного раствора, в грамм/миллилитр;

P – чистота хлороформа, в %.

Норма: хлороформа – не более 0,05 %.

Проведение качественного и количественного определения (метод ВЭЖХ).

Определение подлинности проводят одновременно с количественным определением. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора L-ДОФА. Содержание действующего вещества (L-ДОФА) в ЛС должно быть не менее 4,0 % и не более 6,0 %.

Реактивы

Ацетонитрил для хроматографии; фосфорная кислота; калия фосфат однозамещенный; вода для хроматографии; диметилсульфоксид (х.ч.); 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты.

Стандартный образец L-ДОФА (EP) или другой, аттестованный в надлежащем порядке.

Подвижная фаза

Раствор А: 1,36 г калия фосфата однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл воды, устанавливают рН 3,0 с помощью фосфорной кислоты, доводят водой объем до метки и перемешивают.

Раствор В: Ацетонитрил.

Испытуемый раствор

Около 0,10 г (точная навеска) ЛС помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл диметилсульфоксида, перемешивают до растворения, затем доводят объем раствора до метки 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты и фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Стандартный раствор

Около 0,005 г (точная навеска) стандарта L-ДОФА помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл диметилсульфоксида, перемешивают и доводят объем до метки 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты.

Хроматографировали по 10 мкл стандартного и испытуемого раствора 5 раз. Содержание АФС L-ДОФА (X) в ЛС в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times a_0 \times 10 \times P}{S_0 \times 10 \times a_1 \times 100} = \frac{S_1 \times a_0 \times P}{S_0 \times a_1 \times 100},$$

- где: S_1 площадь пика L-ДОФА на хроматограмме испытуемого раствора;
 S_0 площадь пика L-ДОФА на хроматограмме стандартного раствора L-ДОФА;
 a_1 навеска ЛС, используемая для приготовления испытуемого раствора, в миллиграммах;
 a_0 навеска СО L-ДОФА, в миллиграммах;
 P содержание действующего вещества в СО L-ДОФА, в процентах.

Кислотное число определяли в соответствии с ОФС.1.2.3.0004. Норма: не более 0,5.

Методика. Около 10 г (точная навеска) испытуемого ЛС, помещают в колбу с обратным холодильником вместимостью 250 мл и растворяют в 50 мл смеси равных объемов спирта 96 % и эфира, предварительно нейтрализованных

0,1 М раствором натрия гидроксида в присутствии 0,5 мл фенолфталеина раствора 1 %, нагревая на водяной бане до полного растворения.

Прибавляют 1 мл фенолфталеина раствора 1 % и титруют потенциометрически раствором 0,1 М натрия гидроксида до появления бледно-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с.

Кислотное число (I_A) вычисляют по формуле:

$$I_A = \frac{V \times 5,610}{a},$$

где: V – объем натрия гидроксида раствора 0,1 М, израсходованный на титрование, мл;

a – навеска испытуемого препарата, г;

5,610 – количество калия гидроксида, соответствующее 1 мл раствора 0,1 М натрия гидроксида, мг.

Перекисное число определяют в соответствии с ОФС.1.2.3.0007.15.

Норма: не более 10,0.

Методика. Около 5 г (точная навеска) испытуемого лекарственного препарата, помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл. Прибавляют 50 мл смеси уксусной кислоты ледяной и триметилпентана (3:2), встряхивают до растворения, прибавляют 0,5 мл насыщенного раствора калия йодида и закрывают колбу пробкой.

Встряхивают точно в течение 1 мин, затем прибавляют 30 мл воды и титруют 0,01 М раствором натрия тиосульфата, прибавляя титрант медленно при постоянном энергичном встряхивании до светло-желтой окраски раствора.

Затем прибавляют 0,5 мл 0,5 % раствора крахмала и продолжают титрование при постоянном встряхивании до обесцвечивания раствора.

Перекисное число (I_p) вычисляют по формуле:

$$I_p = \frac{10 \times (V - V_0) \times c}{a},$$

где: V – объем 0,01 М раствора натрия тиосульфата, израсходованный на

титрование в основном опыте, в миллилитрах;

V_0 – объем 0,01 М раствора натрия тиосульфата, израсходованный в контрольном опыте, в миллилитрах;

a – навеска ЛС, в граммах;

c – молярная концентрация раствора натрия тиосульфата.

Примечание. Приготовление раствора крахмала. 1,0 г растворимого крахмала растирают с 5 мл воды и выливают смесь в 100 мл кипящей воды, содержащей 10 мг ртути (II) йодида.

Доза и однородность дозирования капель для приема внутрь проводили в соответствии с ОФС.1.4.1.0027.

Методика. Расчет проводили на одну каплю. Одну каплю, с помощью дозирующего устройства помещали в мерный цилиндр на 5 мл. Скорость капания не должна превышать 2 кап/сек. Полученную жидкость взвешивали на аналитических весах, затем прибавляли ещё одну каплю и вновь взвешивали; повторное прибавление с последующим взвешиванием проводили 100 раз. Определили среднюю массу одной капли.

Масса ни одной капли не должна отклоняться более чем на 10 % от средней массы. Суммарная масса 10 капель не должна отличаться более чем на 15 % от номинальной массы 10 капель. Измеренные объём 100 капель не должен отличаться более чем на 15 % от номинального объёма 100 капель.

Родственные примеси определяли методом ВЭЖХ.

Требуемое значение: содержание любой единичной примеси – не более 0,1 %; сумма примесей – не более 1,5 %. Площадь дополнительных пиков, не считая пиков растворителя, полимера и стабилизатора эмульсии, не должна превышать 2 % от площади основного пика.

Подвижная фаза

Раствор А: 1,36 г калия фосфата однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл воды, устанавливают рН 3,0 фосфорной кислотой концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр типа Миллипор (HNWP) с размером пор 0,45 мкм.

Раствор Б: Ацетонитрил.

Хроматографические условия: Колонка: ZORBAX SB-C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм; температура колонки: 30 °С; детектор масс-спектрометрический; скорость потока: 0,8 мл/мин; объем пробы: 10 мкл; температура пробы: 4 °С.

Растворитель: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты.

Время удерживания пика Д-ДОФА - около 8 минут.

Испытуемый раствор

Около 0,10 г (точная навеска) АФС помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 10 мл диметилсульфоксида, перемешивали до растворения, затем доводили объем раствора до метки 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Относительное время удерживания пиков: примесь А - около 0,8; L-ДОФА – 1,0; примеси В - около 1,5; примеси С - около 3,1.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика примеси А не должна превышать площадь пика L-ДОФА на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,1 %); площадь пика примеси В, умноженная на фактор коррекции 2,2, не должна превышать пятикратную площадь пика L-ДОФА на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %); площадь пика примеси С не должна превышать удвоенную площадь пика L-ДОФА на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,20 %); площадь пика любой единичной неидентифицированной примеси не должна превышать половину площади пика L-ДОФА на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,05 %); сумма площадей пиков всех примесей не должна превышать десятикратную площадь пика L-ДОФА на хроматограмме раствора сравнения (не более 3,0 %).

Масса (Объем) содержимого упаковки проводили в соответствии с ОФС.1.4.2.0007.

Методика. Отбирали 10 заполненных упаковок лекарственного средства. Тщательно промывали и высушивали внешнюю поверхность каждой упаковки и взвешивали упаковки по отдельности. Количественно удалили содержимое из каждой упаковки и промыли все части упаковки гексаном.

Высушили и снова взвесили каждую упаковку вместе с соответствующими деталями. По разности масс вычислили массу содержимого упаковки. Требуемое значение показателя качества. Масса содержимого упаковки должна быть не менее 90% от указанной на этикетке.

Седиментационная устойчивость. Проводили в соответствии с ОФС.1.4.1.0014.

Методика. 15 мг субстанции суспендируют в 10 мл воды энергично встряхивая в течение 1 мин. Полученную суспензию оценивают визуально на однородность.

Требуемое значение показателя качества. Не должно наблюдаться признаков седиментации и образования агломератов в течение 2-3 мин.

Показатель вязкости определяли в соответствии с требованиями и рекомендациями ФЕАЭС на лабораторном вискозиметре (анализаторе вязкости) SV-10, AnD (Япония).

Исследование высвобождения in vitro. Целлюлозная мембрана (плоская ширина 25 мм) с отсечением по молекулярной массе (MWCO) 14 кДа (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) была приготовлена перед исследованием в соответствии с протоколом, предоставленным производителем. В диализный мешок помещали 5,0 мл испытуемые составы, разбавленная акцепторной жидкостью в соотношении 1 + 1.

Мешок для диализа помещали в стеклянный стакан, содержащий 70,0 мл акцепторной среды, и инкубировали при $37 \pm 0,5$ °С в бане с механическим встряхиванием (150 циклов/мин). В заданные моменты времени отбирали 2,0 мл высвобождающей среды и заменяли ее свежей жидкостью. Площадь диффузионной поверхности поддерживалась постоянной (18 см²) с использованием мембран одинаковой длины и ширины для всех испытаний.

Акцепторной средой для оценки высвобождения служил фосфатно-солевой буферный раствор pH $6,8 \pm 0,1$. Экспериментом сравнения служило высвобождение АФС ДОФА–ПК.

Приготовление раствора сравнения АФС ДОФА–ПК. В стеклянную ёмкость

вместимостью 100 мл с герметичной крышкой помещали $(25 \pm 0,01)$ мг (точная навеска) полимерной композиции ДОФА–ПК и $(50 \pm 0,5)$ мл акцепторной среды, нагретой предварительно до 37°C .

Отбор проб проводили через 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 240 и 360 мин после начала инкубации. Пробы акцепторных сред, удаленные через определенные промежутки времени, заменяли равным количеством таких же свежих акцепторных сред. Пробы отбирали с помощью пипетки по $(1,1 \pm 0,6)$ мкл в пластиковые пробирки типа Эппендорф не останавливая встряхивание. После взятия пробы пробирки помещали в ротор центрифуги Biofuge A (Heraeus Sepatech, Германия). Супернатант дополнительно фильтровали через мембранный фильтр с размером пор $0,22$ мкм. Анализ содержания L-ДОФА в пробах проводили методом ВЭЖХ. За 100 % принимали количество (масс.) L-ДОФА. Исследования проводились в двух повторностях.

Оценка совместимости компонентов ЛС. Было проведено исследование методом ВЭЖХ на выявление родственных примесей после их получения и через шесть месяцев при хранении образцов в климатической камере при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и относительной влажности $60 \pm 5\%$.

Для чистоты эксперимента и оценки совместимости ВВ с действующим веществом ЛС, в климатическую камеру были помещены стандартные образцы в полилактидгликолиде.

Микробиологические исследования проводили на лабораторном планшете в соответствии с требованиями ФЕАЭС [76].

Для сравнительного анализа профилей высвобождения АФС в исследованиях *in vitro* был рассчитан фактор сходимости (f_2) по следующей формуле:

$$f_2 = 50 \times \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [(\bar{R}_t - T_t)^2]}{n}}} \right] .$$

где n – число временных точек; (\bar{R}_t) , % – среднее количество растворившегося на момент t (после начала исследования) действующего

вещества из препарата сравнения; средства T_t , % – среднее количество растворившегося на момент t (после начала исследования) действующего вещества из исследуемого препарата.

Для построения пространства проектных параметров часто требуется оценить параметры некоторой системы, то есть построить её математическую модель и найти численные значения параметров этой модели.

В качестве исходных данных для построения модели служили результаты экспериментального исследования по изучению скорости стекания образцов на разработанной модельной системе. Пространство проектных параметров является описанием условий проведения измерений, то есть значения входных параметров (факторов) с некоторой зависимостью – откликом функции.

Для удобства естественные переменные масштабировали так, что среднее значение переменных, обозначаемых $X_1, X_2 \dots X_n$, равняется нулю, стандартное отклонение -1.

Двухфакторная модель главных эффектов описывалась уравнением:

$$y = \beta_0 + \beta_1 \times X_1 + \beta_2 \times X_2 + Z,$$

где β_1 и β_2 – коэффициенты для каждого фактора; β_0 – свободный член уравнения (общий отрезок, отсекаемый кривой на оси ординат)

В системе уравнений использовались коэффициенты модели β_1 и β_2 , отражающие значения скоростей стекания образцов. Затем были рассчитаны степени влияния параметров на значение функции в окрестностях точки β_0 . С помощью матрицы эксперимента была решена система уравнений с построением пространства проектных параметров.

Валидация аналитических методик контроля качественного и количественного определения была статистически обработана с применением ПО Microsoft Excel.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

3.1 Дизайн исследования

Для разработки состава и технологии получения назальных капель с пролонгированным высвобождением для лечения болезни Паркинсона и последующим проведением доклинических исследований для подтверждения его специфической эффективности и безопасности, необходимо было составить дизайн исследования (Рисунок 3.1). Фармацевтическая разработка ЛС представляла собой поэтапный последовательный процесс, заключающийся в изучении необходимых физико-химических свойств АФС, разработке модельной системы поверхности назального эпителия *in vitro*, разработке методики высвобождения ЛС *in vitro*, оценке совместимости компонентов, изучении показателей качества ЛФ, а также исследовании стабильности.

Установлен целевой профиль качества [7], представляющий собой проспективное резюме характеристик качества будущего ЛС, которые должны быть достигнуты, чтобы обеспечить желаемое качество, принимая во внимание его безопасность и эффективность (Рисунок 3.2).

Разрабатываемое лекарственное средство должно удовлетворять следующим требованиям:

– структура - фармацевтическая композиция, содержащая в качестве действующего вещества аминокислоту (3,4-дигидрокси-L-фенилаланин, леводопа, L-ДОФА), полимерную матрицу на основе биodeградируемого сополимера молочной/гликолевой кислот (полилактидгликолид, PLGA), ВВ;

– способ доставки - пролонгированное высвобождение Леводопы из полимерной матрицы, способствующее стабильному длительному поддержанию терапевтической дозы в органе-мишени за счет увеличения доступности ЛС;

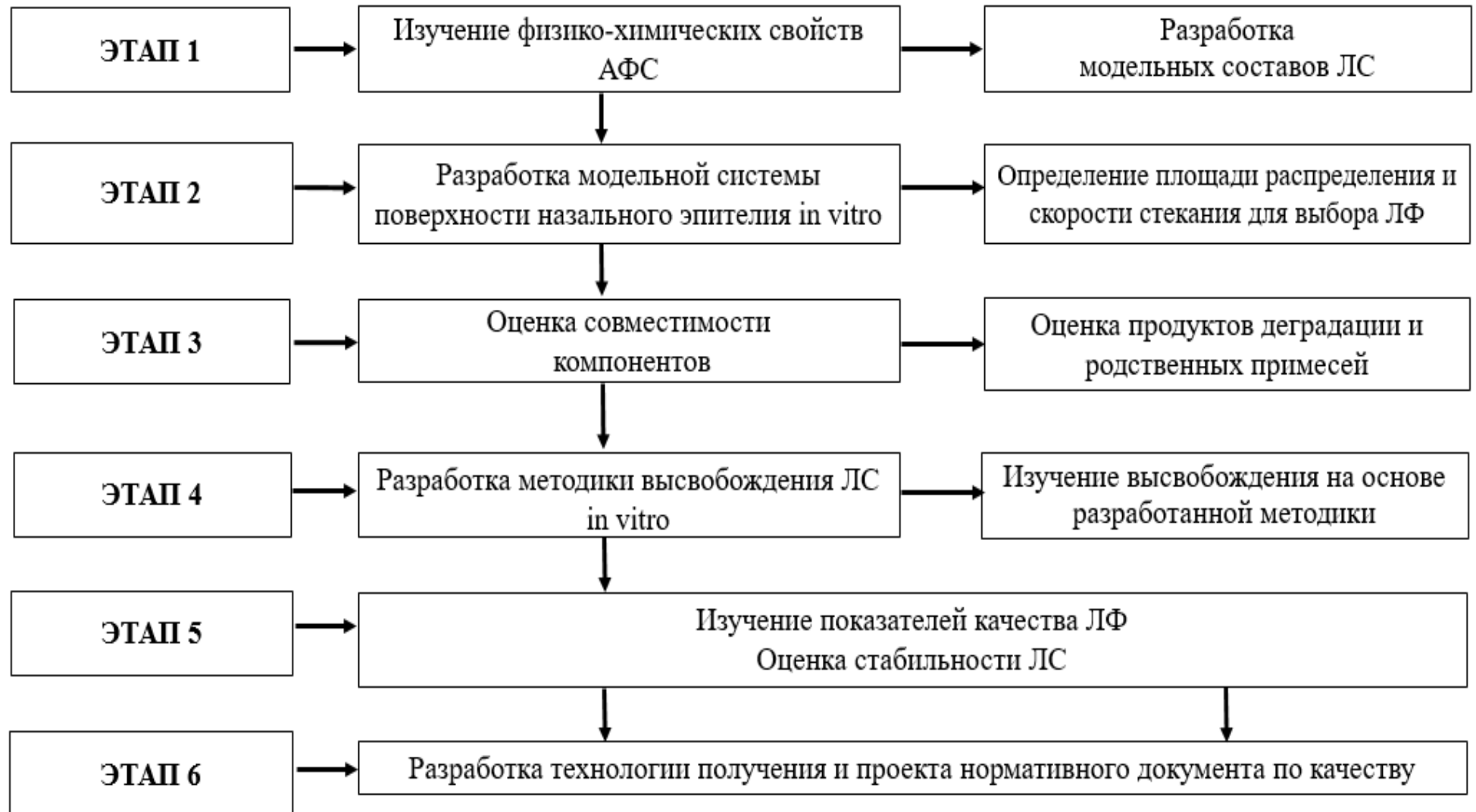


Рисунок 3.1 – Дизайн исследования

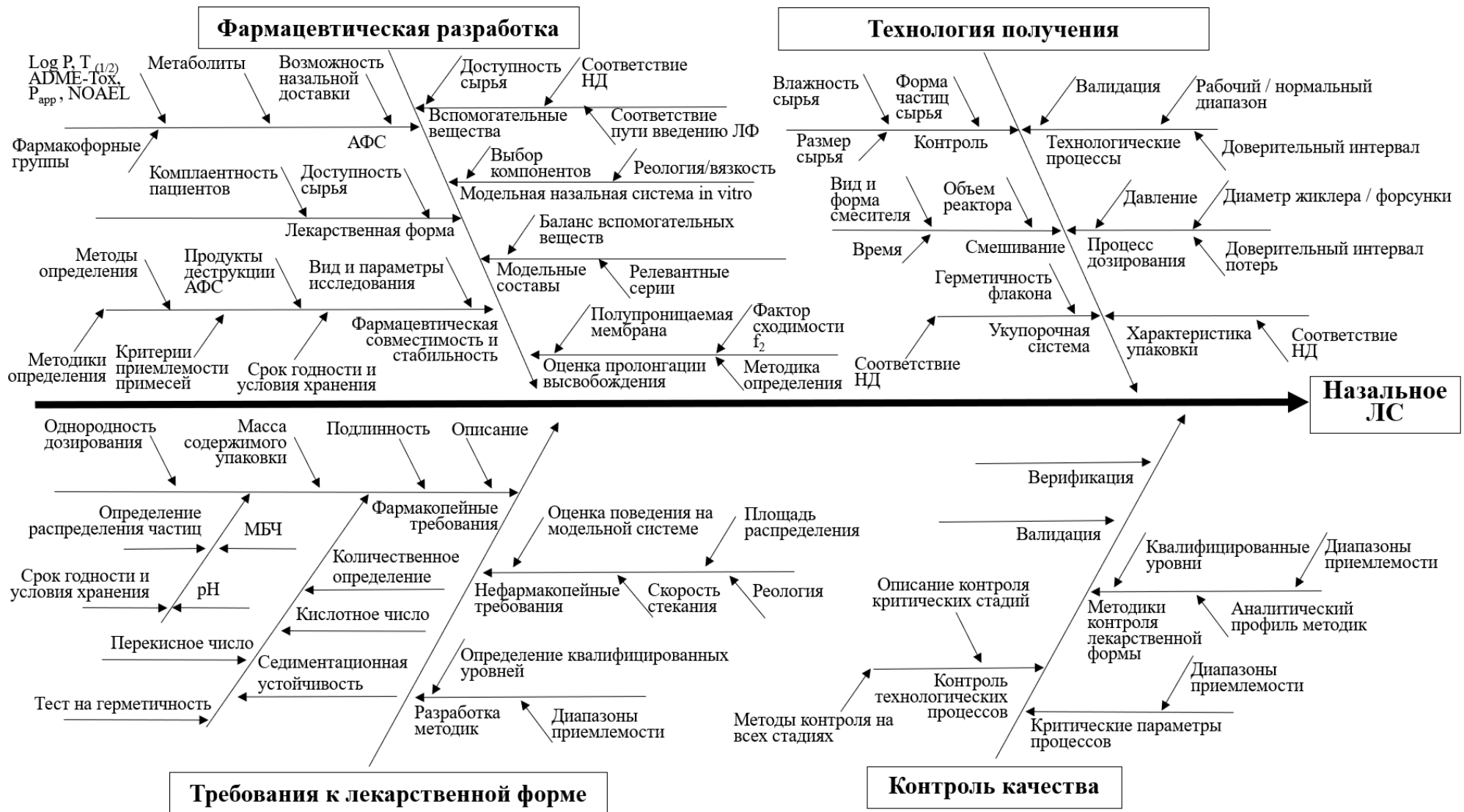


Рисунок 3.2 – Целевой профиль качества назального ЛС

– эффективность в отношении основных симптомов заболевания: уменьшение или отсутствие симптомов заболевания, а также снижение побочного действия в виде двухфазного «on-off»-эффекта;

– путь введения: назальный;

– уровень ЛД 50 (доза, при которой погибает не более 50 % животных) - не должна превосходить значения исходной субстанции, более 2000 г/кг;

– безопасность: прогнозируемое соотношение эффективности и токсичности должно быть положительным.

Направление выбора вспомогательных веществ при разработке лекарственной формы для назального применения был обусловлен следующими факторами:

– свойствами вводимого фармакологически активного компонента;

– физико-химическими параметрами слизистой носа и назального секрета;

– физико – химическими и технологическими свойствами ВВ.

Помимо физико-химических свойств ЛС (таких как растворимость, молекулярная масса, липофильность, рКа и т. д.), на всасывание через слизистую оболочку носа влияют свойства полости носа. Из-за ограниченного объема можно применять только малые дозы (1–200 мкл) [3, 28].

Более того, респираторный эпителий носа состоит из столбчатых клеток, покрытых ресничками, которые скоординировано перемещаются, чтобы продвигать слизь с поверхности эпителия по направлению к глотке.

Данное физиологическое явление в строении мукоцилиарного клиренса носового эпителия диктует необходимость в проведении многоуровневых экспериментальных исследований как физико-химического, так и биофармацевтического профиля для разработки назальной ЛФ.

3.2 Изучение физико-химических характеристик активной фармацевтической субстанции ДОФА-ПК

Исследования показателей качества АФС ДОФА -ПК и разрабатываемого ЛС Дофаминин проводились в Центре фармацевтических технологий совместно с Лабораторией фармакокинетики и метаболомного анализа и Центром доклинических исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Для проведения исследований была наработана серия № 10022020 полимерной композиции АФС ДОФА-ПК в соответствии с технологией получения, представленной в главе 5.

Состав полимерной композиции АФС ДОФА-ПК представлен в таблице 3.1

Таблица 3.1 – Состав АФС ДОФА-ПК на 100,00 г.

Наименование компонента	Нормативные требования	Содержание, г
ДЕЙСТВУЮЩЕЕ ВЕЩЕСТВО		
Леводопа (L-ДОФА) (2S)-2-Амино-3-(3,4-дигидроксифенил)пропановая кислота	USP-NF; НД фирмы «Sigma Aldrich» (США)	10,00
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА		
Сополимер PLGA 50/50	USP-NF; НД фирмы LACTEL® «Absorbable polymers international» (США)	80,00
Поливиниловый спирт	НД фирмы «Sigma Aldrich» (США)	1,80
D-Маннитол	НД фирмы «Fluka» (США)	8,20
Итого:		100,00

На основании проведенных экспериментальных исследований наработанных образцов полимерной композиции АФС ДОФА-ПК были определены значения показателей качества, которые отражены таблице 3.2.

Графическое изображение распределения размеров частиц приведено на рисунке 3.3. Родственные примеси представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.2 – Результаты значений показателей качества АФС ДОФА-ПК

Показатель	Метод	Нормативное значение
Описание	Органолептический Визуальный ГФ РФ	Аморфный лиофилизированный порошок белого или светло-белого цвета, гигроскопичен, фоточувствителен, без запаха
Растворимость	ГФ РФ ФЕАЭС	Растворим в диметилсульфоксиде и в диметилформамиде, плохо растворим в эфире, гексане, спирте 96 %; с водой образует суспензию
Подлинность (2S)-2-Амино-3-(3,4-дигидроксифенил)-пропановая кислота 3,4-дигидрокси-L-фенилаланин (L-ДОФА)	А. ВЭЖХ ОФС.1.2.1.2.0005 ФЕАЭС	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца L-ДОФА
Сополимер молочной и гликолевой кислот 50/50 (PLGA 50/50)	В. ИК-спектроскопия ГФ РФ ОФС.1.2.1.1.0002 ФЕАЭС	ИК-спектр испытуемой субстанции по положению полос поглощения должен соответствовать ИК-спектру стандартного образца сополимера PLGA 50/50
Размер частиц	Метод лазерной дифракции света ОФС.1.2.1.0008	В суспензии (0,2 мг/мл) не менее 90% основной фракции частиц должны быть размером не более 500 нм
Седиментационная устойчивость	ГФ РФ ОФС.1.4.1.0014	При встряхивании АФС в воде (15 мг/10 мл) образуется гомогенная, не содержащая агломератов, суспензия, устойчивая в течение не менее 15 мин
pH	ГФ РФ	От 4,5 до 7,0 (0,1 % суспензия)
Родственные примеси	ВЭЖХ ОФС.1.2.1.2.0005 ФЕАЭС	Любая единичная примесь – не более 0,1 %; сумма примесей – не более 1,5 %
Вода	ФЕАЭС, полумикрометод	Не более 1,0 %
Остаточные органические растворители	ГФ РФ ОФС.1.1.0008 ОФС.1.2.1.2.0004 ФЕАЭС	Хлороформ – не более 40 ppm
Микробиологическая чистота	ФЕАЭС	Категория 2.2
Количественное определение	ВЭЖХ ОФС.1.2.1.2.0005 ФЕАЭС	Не менее 9,0 % и не более 10,0 % L-ДОФА в пересчете на безводное и свободное от органического растворителя вещество
Упаковка	По 100 г в стеклянные или пластиковые контейнеры темного цвета с навинчивающимися крышками вместимостью 500 мл	
Маркировка	В соответствии с требованием НД	
Хранение	В сухом защищенном от света месте при температуре при температуре от 2 до 8 °С °С	

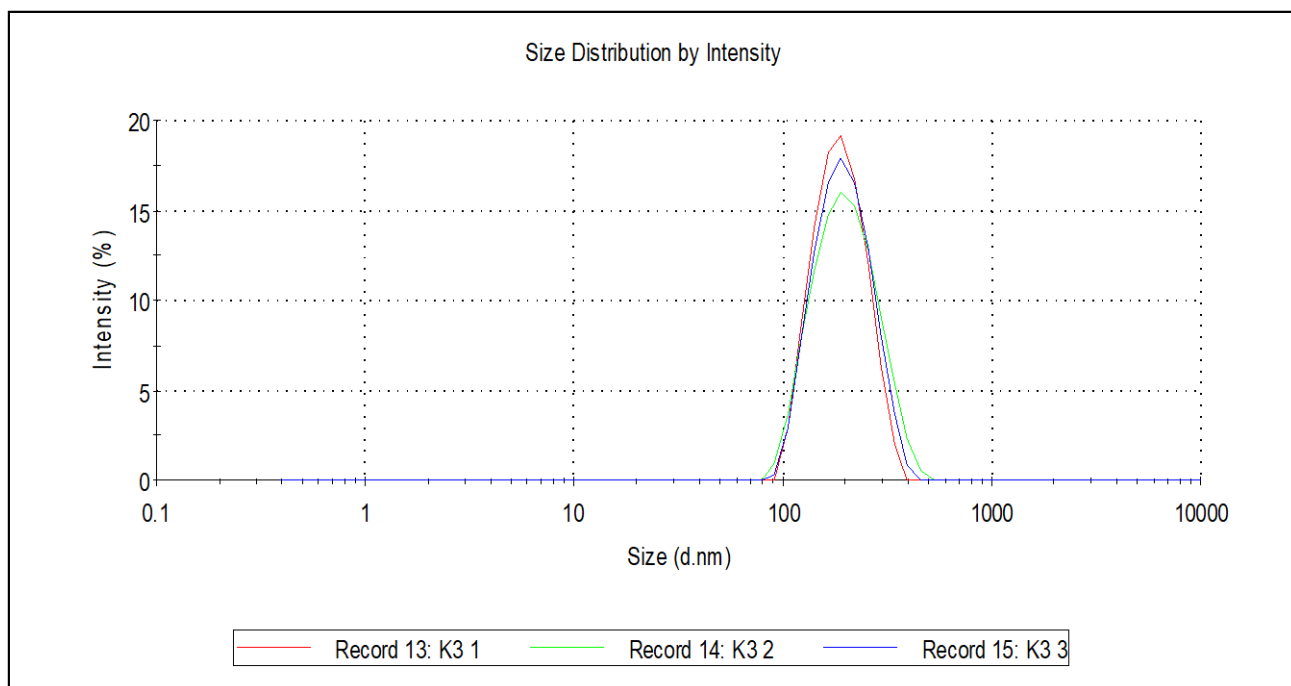


Рисунок 3.3 – Распределение размеров частиц по интенсивности светорассеяния образца (раствор в воде 0,2 мг/мл)

Таблица 3.3 – Родственные примеси АФС

Примесь	Химическое название	Структурная формула
A	(2S)-2-амино-3-(2,4,5-тригидроксифенил) пропановая кислота	
B	(2S)-2-амино-3-(4-гидроксифенил) пропановая кислота (L-тирозин)	
C	(2RS)-2-амино-3-(4-гидрокси-3-метоксифенил) пропановая кислота (3-метокси-L-тирозин)	
D	3,4-дигидрокси-D-фенилаланин (D-допа)	

Согласно спецификации на АФС ДОФА-ПК единичная не идентифицированная примесь составляет не более 0,1 %, сумма примесей – не более 1,5 %. Площадь дополнительных пиков, не считая пиков растворителя, полимера и стабилизатора эмульсии, не должна превышать 2 % от площади основного пика.

3.3 Разработка модельного назального секрета

Исходя из свойств системы «назальная слизистая/назальный секрет», для моделирования поведения разрабатываемого лекарственного средства необходимо было провести разработку подложки (слизистая) и среды (назальный секрет) из искусственных материалов.

Поведение лекарственного средства в такой системе будет характеризоваться следующими параметрами:

- площадью распределения по поверхности;
- способности удерживаться на поверхности, расположенной под наклоном, и зависеть от физико-химических характеристик двух основных функционально-морфологических единиц – слизистой оболочки и назального секрета.

В силу крайне малого количества назального секрета, не представлялось возможным провести изучение поведения назальных лекарственных средств непосредственно *in vivo*, поэтому было необходимо создать искусственный назальный секрет, обладающий свойствами нативного по таким показателям, как: величина pH, вязкость отделяемого, смешивание/растворимость в назальном секрете гидрофильных и липофильных веществ, адгезивные свойства назального секрета по отношению к слизистой, определяемые временем стекания по искусственной наклонной поверхности слизистой носа.

На основании этих показателей проведена разработка искусственного модельного отделяемого и подбор поверхности, имитирующей по отношению к отделяемому, нативную слизистую оболочку.

При выборе веществ, используемых в разработке модельного отделяемого, учитывались следующие критерии:

– реологические параметры модельной жидкости должны быть стандартными и максимально близки таковым, установленным для назального секрета;

– вещества, необходимые для создания модельной жидкости должны быть относительно доступным (наличие на отечественном рынке химических веществ, относительная дешевизна);

– вещества должны быть безопасными;

– процесс создания модельного отделяемого должен быть воспроизводимым (простота приготовления, возможность многократного использования).

Изучение литературы и предварительные исследования показали, что наиболее подходящими веществами, сочетающими в себе реологические характеристики назальной слизи и удовлетворяющими вышеперечисленным требованиям, являются водные растворы производных целлюлозы.

Для разработки были использованы растворы оксиэтилцеллюлозы, метилцеллюлозы, натриевой соли поликарбоксиметилового эфира целлюлозы, натриевой соли гидрированной формы поликарбоксиметилового эфира целлюлозы.

Растворы с концентрациями 0,5-6 % были исследованы по показателю вязкости на вискозиметре. Была проведена оценка вязкости исследуемых растворов от их концентрации (Таблица 3.4).

В соответствии с реологическими показателями назального секрета были выбраны растворы с вязкостью в интервале значений от $1,10 \pm 0,1$ до $1,5 \pm 0,1$ Па \times с.

Анализируя данные, видно, что предъявляемым требованиям удовлетворяли **следующие композиции:**

– раствор оксиэтилцеллюлозы 4 %;

– раствор натрий карбоксиметилцеллюлозы 3 %;

– раствор метилцеллюлозы 2 %.

Таблица 3.4 – Значения вязкости и концентрации исследуемых растворов

Наименование	Значения концентрации, %	Значения вязкости, Па×с
Растворы оксиэтилцеллюлозы	1,0 ± 0,1	< 0,1
	2,5 ± 0,1	< 0,1
	3,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
	4,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1
	5,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1
Растворы метилцеллюлозы	1,0 ± 0,1	< 0,1
	1,5 ± 0,1	< 0,1
	2,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1
	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1
	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2
Растворы натрий карбоксиметилцеллюлозы	1,0 ± 0,1	< 0,1
	2,0 ± 0,1	< 0,1
	2,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	3,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1
	4,0 ± 0,1	3,1 ± 0,2
Растворы гидратированной натрий карбоксиметилцеллюлозы	1,8 ± 0,1	< 0,1
	2,0 ± 0,1	< 0,1
	2,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
	3,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1
	5,0 ± 0,1	4,2 ± 0,1

3.4 Разработка модельной системы для выбора состава лекарственной формы

Для разработки модельной поверхности *in vitro*, имитирующей слизистую, были выбраны композиции на основе акриламида. Полиакриламидные гели относительно просты в приготовлении, доступны, а их физико-химические характеристики позволяют получать поверхности с заданными свойствами. Полиакриламидный гель, являясь инертной поддерживающей средой, наиболее широко используемый в биохимии при разделении различных биологических веществ методом электрофореза. Он образуется за счет процесса полимеризации акриламида, поперечно сшиваемого каким-либо агентом - обычно N, N'-метиленабисакриламидом (сокращенно *бис*-акриламид).

В ходе реакции происходит винильная полимеризация, приводящая к формированию геля с хаотически свернутой структурой, нерастворимого в воде и многих других растворителях.

Соотношение между сшивающим агентом и акриламидом определяет механические и физические свойства получаемого полимера, при этом одновременное увеличение содержания обоих компонентов приводит к образованию гелей с повышенной жесткостью и хрупкостью, а одновременное снижение - к возрастанию мягкости и эластичности. Это, соответственно, отражается на изменении показателей адгезии и растекания, наносимых на поверхность геля различных жидкостей.

Были получены гели полиакриламида из растворов, содержащих как различные соотношения мономеров, так и различные количества мономеров при их одинаковых соотношениях (Таблица 3.5). Акриламид и *бис*-акриламид в необходимых количествах помещали в измерительный цилиндр на 50 мл, добавляли воду очищенную (20 °С) и перемешивали до полного растворения веществ. К полученному раствору добавляли систему катализаторов (перекись водорода - сульфат железа (II) - аскорбиновая кислота). Смесь быстро перемешивали и выливали на поверхность стекла.

Таблица 3.5 – Количество акриламида и бис-акриламида, используемые при получении полиакриламидного геля

Количество мономеров, %														
Серия	I		II		III		IV		V		VI		VII	
	№	бАА	АА	бАА	АА	бАА	АА	бАА	АА	бАА	АА	бАА	АА	бАА
1	1	10	1	20	1	30	1	40	1	50	1	60	1	70
2	0,5	10	0,5	20	0,5	30	0,5	40	0,5	50	0,5	60	0,5	70
3	0,25	10	0,25	20	0,25	30	0,25	40	0,25	50	0,25	60	0,25	70
4	0,1	10	0,1	20	0,1	30	0,1	40	0,1	50	0,1	60	0,1	70
5	0,05	10	0,05	20	0,05	30	0,05	40	0,05	50	0,05	60	0,05	70
6	0,025	10	0,025	20	0,025	30	0,025	40	0,025	50	0,025	60	0,025	70

Примечание: бАА - *бис*-акриламид, АА - акриламид

Реакция полимеризации идет в среднем в течение 10-30 секунд с выделением тепла, и с образованием ровной пленки полимера. При одновременном повышенном содержании полимеров скорость протекания реакции, количество выделяемого тепла зависели от соотношения мономеров.

Реакция с равномерным повышенным содержанием акриламида и *бис*-акриламида (позиции 5/V-VII, 6/V-VII в таблице 3.5) протекала очень быстро с выделением большого количества энергии (закипание раствора). Образуется твердая, хрупкая пленка полимера с неоднородной (вследствие пузырьков воздуха, образующихся при кипении жидкости) поверхностью. При одновременном уменьшении содержания обоих мономеров интенсивность реакции уменьшается. Если содержание полимеров минимально (позиции 2/III-I, 1/III-I в таблице 3.5) реакция не протекала вовсе, или образовывался полимер с подвижной (текучей) структурой.

Подбирая соотношения мономеров, удалось достичь равномерного протекания реакции, приводившей к образованию полимера с ровной однородной поверхностью. Получаемые поверхности оценивались по времени удержания модельной жидкости. Изменяя абсолютное содержание мономеров при неизменных относительных, были получены поверхности, визуальное реологическое поведение которых приближалось к нативной слизистой.

Максимальное визуальное соответствие биологической структуре *in vivo* наблюдалось у модельной поверхности, полученной на основе полиакриламидного геля с содержанием 20 % акриламида и 0,25 % *бис*-акриламида (серия 3/II, таблица 3.5). За норму принималась скорость продвижения материала по слизистой, соответствующей от 3,1 до 7,0 мм/мин согласно данным методики (Патент РФ № 2451486 «Способ определения скорости назального мукоцилиарного транспорта»), однако, в соответствии с заявленной методикой учитывалось только скорость передвижения частиц, без конкретизации локализации поверхности.

При разработке ЛФ этот факт имеет принципиальное значение, потому что диктует способ нанесения на слизистую: по нижней стенке (дно полости носа), или

по верхней стенке полости носа. На поверхность пленки в чашке Петри наносили раствор выбранных модельных жидкостей. Модельные системы накрывали крышками, создавая условия влажности. Учитывая, что угол наклона поверхности слизистой носа по нижней стенке составляет около $10^\circ - 20^\circ$ к горизонтальной поверхности, а по верхней стенке полости носа доходит до 70° , было изучено поведение модельной жидкости на модельной поверхности под различными углами наклона поверхности (Таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Поведение модельной жидкости на модельной поверхности слизистой носа

Модельные жидкости	Скорость стекания растворов целлюлозы (мм/мин) при углах наклона модельной поверхности из полиакриламида (градусы)						
	10°	20°	30°	40°	50°	60°	70°
1	$0,21 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,01$	$0,94 \pm 0,01$	$1,48 \pm 0,02$	$2,1 \pm 0,02$	$2,73 \pm 0,03$	$3,92 \pm 0,04$
2	$0,25 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,01$	$1,25 \pm 0,01$	$1,58 \pm 0,01$	$2,02 \pm 0,01$	$3,48 \pm 0,01$
3	$0,16 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,04$	$1,46 \pm 0,05$	$2,12 \pm 0,05$	$3,23 \pm 0,06$

Примечание: 1 – Раствор оксиэтилцеллюлозы 4 %; 2 – Раствор метилцеллюлозы 2 %; 3 – Раствор натрий карбоксиметилцеллюлозы 3 %

Анализируя полученные данные, можно отметить, что поведение всех выбранных моделей на подложке практически одинаково, модель отвечает заявленным значениям скорости стекания.

В соответствии с дизайном эксперимента было исследовано поведение структур модельных жидкостей на поверхности при нанесении липофильных и гидрофильных соединений (вода и масло оливковое). Стабильное поведение раствора оксиэтилцеллюлозы послужило выбором ее в качестве модельной жидкости для разработки состава лекарственной формы на следующем этапе. Добавление масла оливкового в соотношении 1: 20 – 1: 5 приводило к образованию устойчивой эмульсионной системы с размером капель от 100 до 300 мкм [8].

При увеличении концентрации масла размер капель эмульсии увеличивался, и в отсутствии перемешивания наблюдалось разделение фаз, что можно расценить

как моделирование проницаемости масляного раствора через модельную мембрану. На основании проведенных исследований, можно предположить, что применение различных композиций модельных составов ЛС с использованием воды очищенной, будет приводить к уменьшению вязкости системы, и, в конечном итоге, более быстрой эвакуации со слизистого носа. В дальнейшем подбор ВВ при выборе оптимального состава ЛФ осуществлялся с помощью разработанной системы, в качестве модельной жидкости которой служил раствор оксиэтилцеллюлозы 4 %.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Был разработан дизайн исследования, представляющий собой поэтапный последовательный процесс, заключающийся в изучении необходимых физико-химических характеристик АФС ДОФА-ПК, разработке модельной системы поверхности назального эпителия *in vitro*, методики высвобождения ЛС *in vitro*, оценке совместимости компонентов, изучении показателей качества ЛФ, а также исследовании стабильности. Установлен целевой профиль качества, представляющий собой перспективное резюме характеристик качества будущего ЛС, которые должны быть достигнуты, чтобы обеспечить желаемое качество, принимая во внимание безопасность и эффективность.

2. Были определены основные требования, которыми должно обладать разрабатываемое ЛС – структура, способ доставки, эффективность в отношении основных симптомов заболевания, путь введения, уровень ЛД50, безопасность. Изучены физико-химические характеристики полимерной композиции ДОФА–ПК и определены показатели качества. Исходя из свойств системы «назальная слизистая/назальный секрет», для моделирования поведения разрабатываемого ЛС была разработана модельная поверхность (слизистая) и модельная жидкость (назальный секрет) из искусственных материалов.

3. Для разработки модельной жидкости была выбрана композиция раствора оксиэтилцеллюлозы 4 %, которая удовлетворяла предъявляемым требованиям.

4. Для разработки модельной поверхности *in vitro*, имитирующей слизистую, были выбраны композиции на основе акриламида. Полиакриламидные гели относительно просты в приготовлении, доступны, а их физико-химические характеристики позволили получать поверхности с необходимыми структурно-механическими свойствами. Максимальное визуальное соответствие биологической структуре *in vivo* наблюдалось у модельной поверхности, полученной на основе полиакриламидного геля с содержанием 20 % акриламида и 0,25 % *бис*-акриламида.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДЛЯ НАЗАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

В предварительных исследованиях фармакокинетики было установлено, что у АФС, представляющей собой 3,4-дигидрокси-L-фенилаланин в полилактидгликолиде 50/50, за счет изменения всасывания действующего вещества, доклиническая терапевтическая эффективность наблюдалась, начиная с дозы 0,25 г в сутки. Результаты доклинических исследований представлены в Приложении Д. На основании этих данных был осуществлен пересчет дозы для разработки интраназальных составов, что соответствовало 5,00 г АФС ДОФА–ПК на 10,00 г ЛФ.

Были наработаны образцы полимерной композиции АФС ДОФА-ПК в соответствии с разработанной технологией получения, представленной в главе 5, для определения составов следующих ЛФ, применяемых в назальной доставке:

- назальные капли с водой очищенной и маслами в качестве дисперсионной среды;
- гели назальные.

4.1 Модельные интраназальные композиции и технология их получения

Исследована возможность создания назальных капель с использованием воды очищенной и масла оливкового, а также иных вспомогательных веществ (стабилизаторов, умягчителей, эмульгаторов и пр.), применяемых для получения устойчивых дисперсных систем. Предложенные составы ЛС отражены в таблицах 4.1 и 4.2.

Для уточнения влияния вспомогательных веществ на седиментационную стабильность полученных комбинированных капель и для выявления их структурных характеров на модельной слизистой, состав К-2 комб был получен в вариантах, представленных в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Составы ЛС с дисперсионной средой – вода очищенная

Образец	АФС	Кол-во, г	Вспомогательные вещества	Кол-во, г
Вода очищенная, как дисперсионная среда				
К-1 водн.	АФС ДОФА-ПК полимерные частицы с 3,4- дигидрокси-L- фенилаланином (L-ДОФА) в полилактидглико лиде 50/50	5,000	Вода очищенная	До 10,000
К-2 водн.		5,000	Сорбитол 70 %	0,020
			Натрия хлорид	0,004
			Натрия дигидрофосфата дигидрат	0,004
			Динатрия гидрофосфата дигидрат	0,003
			Динатрия эдетат	0,001
			Вода очищенная	До 10,000
К-3 водн.		5,000	Бензиловый спирт	0,100
			Сорбитол 70 %	0,020
			Гипромеллоза	0,500
			Вода очищенная	До 10,000
К-4 водн.		5,000	Бензиловый спирт	0,100
			Сорбитол 70 %	0,020
			Динатрия эдетат	0,001
			Хлористоводородная кислота	0,003
			Натрия цитрат	0,004
			Метилгидроксипропилцеллюлоза	0,500
	Вода очищенная		До 10,000	

Технология получения назальных капель с водной дисперсионной средой

Для получения образца К-1 водн. (на 100 мл) полимерные частицы АФС в количестве 5,0 отвешивали на весах с точностью 0,01 г и помещали в подставку, добавляли воду очищенную до 100 мл. Взбалтывали до получения однородной смеси. Образовывался коллоидный раствор, устойчивый в течение 15-20 мин.

Далее происходило частичное разделение системы, и часть частиц оседала на дно сосуда. Для обеспечения стабильности данной группе водных образцов, был сделан вывод о необходимости введения загустителей в состав капель, таких как производные целлюлозы, сорбитола. Образцы К-2 водн., К-3 водн. и К-4 водн. готовили также в расчете на 100 мл.

Полимерные частицы АФС в количестве 5,0 отвешивали на весах с точностью 0,01 г, помещали в подставку. Предварительно готовили растворы гипромеллозы и метилгидроксипропилцеллюлозы различной концентрации от 0,5 % до 5 %, с шагом концентрации в 0,5 %. Сорбитол использовали в виде 70 % водного раствора, готовый образец.

В части воды очищенной, в зависимости от прописи, растворяли рассчитанное количество динатрия эдетата, натрия цитрата, натрия дигидрофосфата дигидрата, динатрия гидрофосфата дигидрата.

К отвешенным в подставку полимерным частицам добавляли оставшуюся воду, взбалтывали, добавляли растворы целлюлозы, и в последнюю очередь добавляли растворы солей. При использовании 2-5 % растворов гипромеллозы и метилгидроксипропилцеллюлозы получали устойчивую взвесь (суспензию), не расслаивающуюся при температуре 4 °С (температура хранения полимерных частиц с 3,4-дигидрокси-L-фенилаланином (L-ДОФА) в полилактидгликолиде 50/50) в течение 14 дней (срок наблюдения)).

Технология получения назальных капель с масляной дисперсионной средой.

Для получения образца К-1 масл. и образца К-2 масл. (на 100 мл) полимерные частицы АФС в количестве 5,0 отвешивали на весах с точностью 0,01 г, помещали в подставку, добавляли масло оливковое/подсолнечное в количестве 50,0 г. Взбалтывали до получения однородной смеси. Образовывалась суспензия, устойчивая в течение 60-90 мин. Далее происходило частичное разделение системы, и часть частиц оседала на дно сосуда.

При оценке стабильности данного образца и пригодности его к использованию, был сделан вывод о необходимости введения поверхностно - активных веществ в состав капель, таких как твин-80. Образцы К -3 масл. и К-4 масл. получали аналогичным образом с введением в состав твина - 80. Это позволило увеличить время седиментации частиц до 10 дней при температуре +4 °С (время наблюдения).

Таблица 4.2 – Составы ЛС с маслами растительными и комбинированными системами

Образец	АФС	Кол-во, г	ВВ	Кол-во, г
Масла растительные, как дисперсионная среда				
К-1 масл.	АФС ДОФА-ПК полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L- фенилаланином (L- ДОФА) в полилактидгликолиде 50/50	5,000	Масло оливковое	До 10,000
К-2 масл.		5,000	Масло подсолнечное	До 10,000
К-3 масл.		5,000	Твин 80	0,100
			Масло оливковое	До 10,000
К-4 масл.	5,000	Твин 80	0,100	
		Масло подсолнечное	До 10,000	
Комбинированные системы, как дисперсионная среда				
К-1 комб. 1	АФС ДОФА-ПК полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L- фенилаланином (L- ДОФА) в полилактидгликолиде 50/50	5,000	Масло оливковое	0,500- 2,500
			Твин 80	0,005-0,020
			Пропиленгликоль	0,050-0,500
			Сорбитол 70 %	0,020
			Вода очищенная	2,200-4,430
К-2 комб. 1	АФС ДОФА-ПК полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L- фенилаланином (L- ДОФА) в полилактидгликолиде 50/50	5,000	Масло оливковое	0,500
			Цетиловый спирт	0,005
			Твин 80	0,005
			Парафин жидкий	0,050
			Вода очищенная	4,350
К-2 комб. 2		5,000	Масло оливковое	1,000
			Цетиловый спирт	0,010
			Твин 80	0,010
			Парафин жидкий	0,100
			Вода очищенная	3,880
К-2 комб. 3	5,000	Масло оливковое	1,500	
		Цетиловый спирт	0,010	
		Твин 80	0,020	
		Парафин жидкий	0,200	
		Вода очищенная	3,270	
К-2 комб. 4	АФС ДОФА-ПК полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L- фенилаланином (L- ДОФА) в полилактидгликолиде 50/50	5,000	Масло оливковое	2,000
			Цетиловый спирт	0,010
			Твин 80	0,020
			Парафин жидкий	0,300
			Вода очищенная	2,670
К-2 комб. 5		5,000	Масло оливковое	2,000
			Цетиловый спирт	0,010
			Твин 80	0,020
			Парафин жидкий	0,400
			Вода очищенная	2,570

Для получения назальных капель с комбинированной дисперсионной средой (образец К-1 комб.) полимерные частицы АФС в количестве 5,0 отвешивали на весах с точностью 0,01 г, помещали в подставку, добавляли твин-80, встряхивали, для равномерного распределения твина. Добавляли масло оливковое в рассчитанном количестве и опять встряхивали, образовывалась концентрированная суспензия (паста). В ступке помещали пропиленгликоль, сорбитол, рассчитанное количество воды. Растирали до получения однородной смеси.

Полученную жидкость добавляли к масляной пасте по частям, при постоянном встряхивании. Образовывалась суспензионно – эмульсионная система, наблюдаемая, в том числе и под микроскопом. Следует отметить, что стабильность образовавшейся системы в значительной степени зависит от концентрации вспомогательных веществ. Образцы К-2 комб. получали также в расчете на 100 мл, однако, учитывая значительный объем липофильной фазы, ее получали отдельно.

В подогретую до 50-60 °С ступку помещали цетиловый спирт, и отвешенные количества масла оливкового и жидкого парафина (вазелина), смесь тщательно растирали, до однородной массы. В полученную смесь вносили смоченные твином-80 полилактидные частицы, перемешивали и постепенно добавляли воду очищенную. Все полученные образцы отличались седиментационной устойчивостью в течение 10 дней (срок наблюдения).

Технология получения назальных гелей связана со сложностью точного дозирования. Они упаковываются в тубы с удлиненным наконечником и дозируются при непосредственном выдавливании из тубы.

Для интраназальных гелей системного применения для соблюдения однородности дозирования следует рассматривать однодозовую упаковку – тубу, заполненную разовой дозой ЛС, с удлиненным наконечником с целью введения в носовую полость на слизистую.

Принимая во внимание реологические свойства гелей, были разработаны составы на основе гипромеллозы в концентрации 3-5 % (Таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Составы ЛС гель назальный

Образец	АФС	Кол-во, г	Вспомогательные вещества	Кол-во, г
Г-1 гель (3 %)	АФС ДОФА-ПК полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L- фенилаланином (L- ДОФА) в полилактидгликолиде 50/50	5,000	Натрия гидрофосфат безводный	0,010
			Лимонная кислота моногидрат	0,020
			Сорбитол 70 %	0,100
			Масло оливковое	2,000
			Твин-80	0,010
			Гипромеллоза	0,090
			Вода очищенная	2,770
Г- 2 гель (4 %)		5,000	Натрия гидрофосфат безводный	0,010
			Лимонная кислота моногидрат	0,020
			Сорбитол 70 %	0,100
			Масло оливковое	2,000
			Твин-80	0,010
			Гипромеллоза	0,120
	Вода очищенная		2,740	
Г - 3 гель (4 %)	5,000	Натрия гидрофосфат безводный	0,010	
		Лимонная кислота моногидрат	0,020	
		Сорбитол 70 %	0,100	
		Масло оливковое	2,000	
		Твин-80	0,010	
		Гипромеллоза	0,140	
		Вода очищенная	2,720	

Для получения образца К-1 гель (на 100 мл) полимерные частицы АФС в количестве 5,0 отвешивали на весах с точностью 0,01 г, помещали в ступку, добавляли твин-80, аккуратно скребком перемешивали, не допуская растирания частиц. Добавляли масло оливковое в рассчитанном количестве и опять перемешивали скребком, образовывалась концентрированная суспензия (паста).

В другую ступку получали 3-5 % раствор гипромеллозы, в который вводили в следующей последовательности: натрия гидрофосфат безводный, сорбитол, лимонной кислоты моногидрат. Растирали до получения однородной смеси. Полученную массу добавляли к масляной пасте по частям, при постоянном перемешивании. Образовывалась стабильная система, гетерогенность которой можно было наблюдать под микроскопом.

4.2 Выбор оптимального состава назальных композиций при помощи разработанной модельной системы

С целью определения наиболее рациональных составов разработанных назальных композиций с полимерными частицами 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина (L-ДОФА) в полилактидгликолиде 50/50 для терапии болезни Паркинсона, была проведена оценка их поведения на модельной системе *in vitro*.

Оценка проводилась по показателям площади распределения и степени адгезии на модельной поверхности. Исследование адгезивных свойств разработанных составов лекарственных средств оценивали по скорости стекания образца по наклонной поверхности модельной подложки, смоченной модельной средой.

Для определения площади распределения, исследуемый образец в количестве 5,0 мл (5,0 г), что составляло, в пересчете на Леводопу, дозу вводимого лекарственного средства, и окрашенное, как описано выше, помещали на предварительно нагретую до 37 °С поверхность модельной слизистой, расположенную в чашке Петри, накрывали крышкой и термостатировали при данной температуре в течение 15 мин (время возможного нахождения на слизистой), отмечая площадь распределения для каждого образца (Таблица 4.4).

Площадь распределения S (см²) определяли, используя миллиметровую бумагу. Для более точного визуального определения в образцы капель, в зависимости от состава был введен 0,001 % метиленового синего (капли на водной основе) или капля Судана III.

Исследуемый образец в количестве 5,0 г, что составляло, в пересчете на Леводопу дозу вводимого действующего вещества, наносили на линию старта предварительно нагретой до 37 °С подложки (поверхность в чашке Петри). Подложку поднимали под углами 10° и 70° и по истечении 30 секунд измеряли путь, пройденный передней границей капли жидкости.

Результаты эксперимента представлены в таблице 4.5.

Скорость стекания v (мм/мин) рассчитывали по формуле:

$$v = \frac{L}{\tau}$$

где: L - путь, пройденный каплей жидкости, мм;

τ - время стекания, с.

Для дальнейшего выбора оптимального состава лекарственного средства было построено пространство проектных параметров на основании установленных значений скоростей стекания образцов на модельной системе.

Функция отклика была вычислена с помощью построения матрицы и хода расчета, которые представлены в главе 2.

Функция отклика имела вид:

$$F(x) = 7,95 + 2,5 \times X_1 + 0,25 \times X_2,$$

где:

X_1 – значение скорости стекания образца под углом 10° ;

X_2 – значение скорости стекания образца под углом 70° ;

2,5 – вес фактора влияния на стекание образца под углом 10° ;

0,25 – вес фактора влияния на стекание образца под углом 70° ;

7,95 – свободный коэффициент влияния на систему.

График поверхности суммарной скорости стекания составов лекарственного средства под различным углом представлен на рисунке 4.1.

Скорость продвижения материала по слизистой в норме имеет значение от 3,1 до 7,1 мм/мин.

Все исследованные образцы имели значение скорости стекания под углом 70° выше 3,1 мм/мин, однако образцы К -1 водн., К- 2 водн., К-1 масл. по результатам проведенного эксперимента имели высокие кинематические показатели движения.

Подобное их поведение в условиях *in vivo* может существенно ограничить необходимый период их пребывания на слизистой, а, следовательно, являться причиной низких показателей биодоступности ЛС.

Таблица 4.4 – Адгезивные свойства разработанных назальных ЛС

№	Исследуемый образец	Скорость стекания по смоченной модельной средой подложке мм/с	
		угол 10°	угол 70°
1	Образец К-1 водн.	0,62 ± 0,05	9,53 ± 0,17
2	Образец К-2 водн.	0,54 ± 0,05	8,73 ± 0,11
3	Образец К-3 водн. 1 % гипромеллозы	0,42 ± 0,08	6,87 ± 0,19
4	Образец К-4 водн. 1 % метилгидроксипропилцеллюлозы	0,42 ± 0,04	6,67 ± 0,17
5	Образец К-1 масл.	0,38 ± 0,07	7,82 ± 0,16
6	Образец К-2 масл.	0,36 ± 0,09	6,94 ± 0,18
7	Образец К-3 масл.	0,35 ± 0,05	6,53 ± 0,17
8	Образец К-4 масл.	0,33 ± 0,05	6,35 ± 0,11
9	Образец К-1 комб. 1	0,39 ± 0,08	6,27 ± 0,19
10	Образец К-2 комб. 1	0,39 ± 0,04	6,37 ± 0,17
11	Образец К-2 комб. 2	0,37 ± 0,07	6,52 ± 0,16
12	Образец К-2 комб. 3	0,36 ± 0,09	6,84 ± 0,18
13	Образец К-2 комб. 4	0,32 ± 0,05	6,63 ± 0,17
14	Образец К-2 комб. 5	0,33 ± 0,05	6,13 ± 0,11
15	Образец Г-1 гель 3 % гипромеллозы	0,22 ± 0,05	5,63 ± 0,17
16	Образец Г-2 гель 4 % гипромеллозы	0,23 ± 0,05	5,73 ± 0,11
17	Образец Г-3 гель 5 % гипромеллозы	0,25 ± 0,08	5,75 ± 0,19

Таблица 4.5 – Значения площадей распределения разработанных назальных ЛС через 15 мин

№	Исследуемый образец	Площадь в см ²
1	Образец К-1 водн.	14,8 ± 0,5
2	Образец К-2 водн.	14,2 ± 0,7
3	Образец К-3 водн. 1 % гипромеллозы	10,0 ± 0,3
4	Образец К-4 водн. 1 % метилгидроксипропилцеллюлозы	10,0 ± 0,6
5	Образец К-1 масл.	9,7 ± 0,6
6	Образец К-2 масл.	9,4 ± 0,4
7	Образец К-3 масл.	9,6 ± 0,7
8	Образец К-4 масл.	9,6 ± 0,8
9	Образец К-1 комб. 1	9,1 ± 0,6
10	Образец К-2 комб. 1	9,3 ± 0,8
11	Образец К-2 комб. 2	9,5 ± 0,9
12	Образец К-2 комб. 3	9,3 ± 0,7
13	Образец К-2 комб. 4	9,4 ± 0,4
14	Образец К-2 комб. 5	9,0 ± 0,5
15	Образец Г-1 гель 3 % гипромеллозы	7,4 ± 0,3
16	Образец Г-2 гель 4 % гипромеллозы	7,1 ± 0,3
17	Образец Г-3 гель 5 % гипромеллозы	7,2 ± 0,6

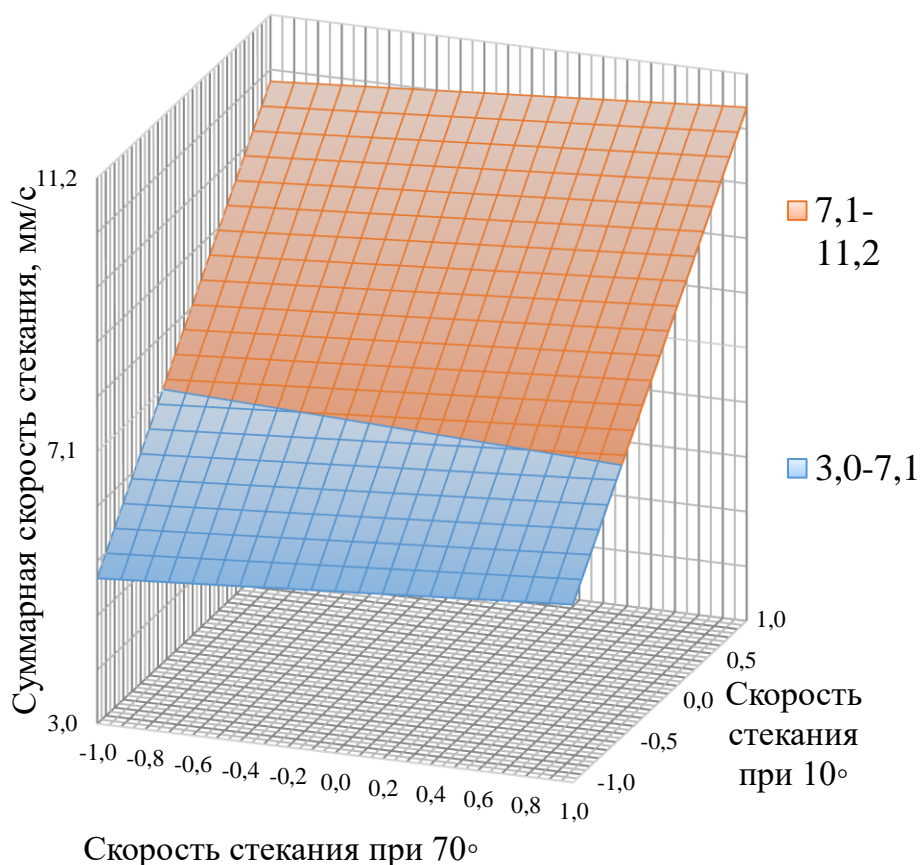


Рисунок 4.1 – График поверхности суммарной скорости стекания составов лекарственного средства под различным углом

Принимая во внимание данный интервал значения физиологического показателя мукоцилиарного транспорта, образцы лекарственного средства К-1 водн., К-2 водн., К-1 масл., не использовались в дальнейших исследованиях.

Анализируя результаты проведенного эксперимента по определению значений площадей распределения разработанных назальных образцов лекарственных средств, можно отметить, что назальные капли на водной основе, без включения производных целлюлозы распределяются по модельной поверхности, и, обладая низкими адгезионными свойствами не могут обеспечить точность дозирования за счет вытекания из носовых полостей.

Назальные капли на масляной основе распределялись (Образец К-1 масл.) крайне неравномерно. Учитывая результаты проведенных экспериментов, для

дальнейших исследований были отобраны образцы, которые представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Отобранные составы ЛС для дальнейших исследований

Образец	АФС	Кол-во, г	ВВ	Кол-во, г
К-3 водн	АФС ДОФА-ПК полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L-фенилаланином (L-ДОФА) в полилактидгликолид е 50/50	5,000	Бензиловый спирт	0,100
			Сорбитол 70 %	0,020
			Гипромеллоза	0,500
			Вода очищенная	До 10,000
К- 4 водн		5,000	Бензиловый спирт	0,100
			Сорбитол 70 %	0,020
			Динатрия эдетат	0,001
			Хлористоводородная кислота	0,003
			Натрия цитрат	0,004
			Метилгидроксипропилцеллюлоза	0,500
			Вода очищенная	До 10,000
К- 2 масл.		5,000	Масло подсолнечное	До 10,000
К-3 масл.	5,000	Твин 80	0,100	
		Масло оливковое	До 10,000	
К-4 масл.	5,000	Твин 80	0,100	
		Масло подсолнечное	До 10,000	
К-1 комб.	АФС ДОФА-ПК полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L-фенилаланином (L-ДОФА) в полилактидгликолид е 50/50	5,000	Масло оливковое	0,500- 2,500
			Твин 80	0,005-0,020
			Пропиленгликоль	0,050-0,500
			Сорбитол 70 %	0,020
			Вода очищенная	2,200-4,430
К- 2 комб.1		5,000	Масло оливковое	0,500
			Цетиловый спирт	0,005
			Твин 80	0,005
			Парафин жидкий	0,050
			Вода очищенная	4,350
К- 2 комб.2		5,000	Масло оливковое	1,000
			Цетиловый спирт	0,010
			Твин 80	0,010
			Парафин жидкий	0,100
			Вода очищенная	3,880
К- 2 комб.3	5,000	Масло оливковое	1,500	
		Цетиловый спирт	0,010	
		Твин 80	0,020	
		Парафин жидкий	0,200	
			Вода очищенная	3,270

Продолжение таблицы 4.6

К- 2 комб.4	АФС ДОФА-ПК полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L- фенилаланином (L- ДОФА) в полилактидгликолиде 50/50	5,000	Масло оливковое	2,000
			Цетиловый спирт	0,010
			Твин 80	0,020
			Парафин жидкий	0,300
			Вода очищенная	2,670
К- 2 комб.5	АФС ДОФА-ПК полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L- фенилаланином (L- ДОФА) в полилактидгликолиде 50/50	5,000	Масло оливковое	2,000
			Цетиловый спирт	0,010
			Твин 80	0,020
			Парафин жидкий	0,400
			Вода очищенная	2,570

Реализация данных функциональных свойств ограничены у образцов Г-1 гель 3 % гипромеллозы, Г-1 гель 4 % гипромеллозы, Г-1 гель 5 % гипромеллозы. Более того, они имели низкие значения площади распределения, что также послужило причинами исключения этих образцов из дальнейших экспериментов.

Все наработанные образцы ЛС с полимерными частицами с АФС ДОФА-ПК в полилактидгликолиде 50/50 – 5,0 расфасовывались в полимерные контейнеры из химически инертного пластика.

4.3 Оценка совместимости компонентов лекарственного средства

Совместимость компонентов рецептуры ЛС имеет решающее значение для безопасности и качества разрабатываемого продукта. Для выявления возможной несовместимости компонентов и оценки стабильности состава был проведено исследование ВЭЖХ при получении и через шесть месяцев при хранении образцов в климатической камере при температуре 25 ± 2 °С и относительной влажности 60 ± 5 %. Для чистоты эксперимента и оценки совместимости вспомогательных веществ с действующим веществом ЛС, в климатическую камеру были помещены образцы АФС.

Критериями несовместимости ВВ с полимерными частицами с 3,4-дигидрокси-L-фенилаланином (АФС ДОФА-ПК) в полилактидгликолиде образца являлось визуальное изменение цвета, расслоение, выпадение осадка, увеличение значений родственных и появление новых примесей, идентификацию которых устанавливали с помощью ВЭЖХ. Образцы в количестве 5,00 г, по

6 единиц каждого состава ЛС, хранились в банках из полиэтилена высокой плотности, укупоренных крышкой из полиэтилена высокой плотности. Согласно спецификации на АФС ДОФА–ПК единичная не идентифицированная примесь составляет не более 0,1 %, сумма примесей – не более 1,5 %. Площадь дополнительных пиков, не считая пиков растворителя, полимера и стабилизатора эмульсии, не должна превышать 2 % от площади основного пика. Родственные примеси АФС представлены в таблице 3.3 главы 3.

В начале исследования и по истечении 3 месяцев 6 образцов каждого наименования ЛС были проанализированы согласно методике определения родственных примесей, представленной в главе 2.

Полученные результаты содержания родственных примесей каждого наименования ЛС было решено проанализировать как среднее значение между 6 образцами. В таблице 4.7 приведены результаты идентификации примесей для исследуемых образцов, проанализированных после получения и 6 месяцев хранения.

Представленные результаты ВЭЖХ демонстрируют, что по истечении 3 месяцев хранения в климатической камере при температуре 25 ± 2 °С и относительной влажности 60 ± 5 % у образцов с водной дисперсионной средой наблюдался выход за пределы значений показателя суммы всех родственных примесей, что не соответствует требованиям спецификации на АФС. Подобные явление наблюдалось и у комбинированных образцов лекарственного средства. Более того, на хроматограммах были зафиксированы новые единичные не идентифицированные примеси, которые вероятно связаны с деструкцией фармацевтической субстанции в присутствии неинертных по отношению к ее химической структуре вспомогательных веществ.

Следует отметить, что в присутствии ВВ как у образцов с водной дисперсионной средой, так и комбинированного характера родственные примеси образовывались в меньшем количестве по сравнению с образцом АФС, что свидетельствует о верном направлении подбора вспомогательных веществ для повышения стабильности АФС.

По результатам анализа у образцов с масляной дисперсионной средой (К-2 масл., К-3 масл., К-4 масл.) значения суммы родственных примесей по истечении 3 месяцев соответствовало требованиям спецификации на АФС и не превышало порог квалификации НД.

Для дальнейших исследований были отобраны те образцы лекарственного средства, в процессе хранения которых значение суммы всех родственных примесей не превышало 3 %.

Таблица 4.7 – Результаты идентификации примесей для исследуемых образцов

Примеси, %												
Среднее значение родственных примесей L-ДОФА, после получения ЛФ												
Примесь	К – 3 водн.	К – 4 водн.	К – 2 масл.	К – 3 масл.	К – 4 масл.	К – 1 комб.	2 комб. 1	2 комб. 2	2 комб. 3	2 комб. 4	2 комб. 5	АФС
A	0,32	0,20	0,31	0,29	0,38	0,21	0,23	0,19	0,31	0,36	0,32	0,35
B	0,43	0,35	0,32	0,34	0,31	0,23	0,31	0,27	0,27	0,21	0,27	0,31
C	0,29	0,34	0,31	0,27	0,48	0,42	0,41	0,39	0,32	0,29	0,23	0,33
D	0,26	0,33	0,28	0,26	0,21	0,25	0,24	0,24	0,27	0,30	0,31	0,25
Сумма	1,30	1,22	1,22	1,16	1,38	1,11	1,19	1,09	1,17	1,16	1,13	1,08
Среднее значение родственных примесей L-ДОФА, после 3 месяцев хранения при температуре 25±2 °С и относительной влажности 60±5 %												
A	1,16	0,86	0,25	0,29	0,40	1,36	0,99	1,30	1,27	1,13	1,14	0,66
B	0,66	0,86	0,39	0,30	0,36	0,78	0,84	0,90	0,89	1,04	1,12	0,45
C	0,76	0,89	0,31	0,28	0,30	0,57	0,72	0,87	0,85	1,02	0,96	0,53
D	0,62	1,49	0,40	0,43	0,21	0,32	0,58	0,62	0,74	0,85	0,75	0,36
Сумма	3,20	4,10	1,35	1,30	1,27	3,03	3,13	3,69	3,75	4,04	3,97	2,00
Новые неидентифицированные примеси, образовавшиеся в процессе хранения												
Единичные	0,10	0,07	-	-	-	0,07	0,05	0,06	0,03	-	-	-

4.4 Разработка методики высвобождения активной фармацевтической субстанции ДОФА-ПК *in vitro*

Исследование высвобождения *in vitro* из назальных составов проводится с использованием фармакопейных и нефармакопейных методов. Среди используемых фармакопейных методов, упоминаемых в литературных источниках – вращающаяся корзинка, лопастная мешалка, проточная ячейка [195].

Нефармакопейные методы оценки высвобождения назальных ЛС в основном используются для исследования высвобождения *in vitro* из гелей [182], микро-наночастиц [180], наноэмульсий, липосом [190], мицеллярных растворов и суспензионных растворов и наноструктурированных липидных носителей [185], представляя собой технически «модифицированные» условия проведения фармакопейных тестов растворения с оценкой диффузии при помощи диализного мешка или мембраны.

Из-за различий в «конструкции» состава назальной ЛФ невозможно использовать единую тест-систему для изучения свойств высвобождения АФС из назальных систем, поэтому достаточно часто в литературных данных встречается различное оборудование, процедуры и методы в зависимости от характеристик состава лекарственной формы, в каждом конкретном случае [23].

Следует отметить, что выбор метода исследования высвобождения *in vitro* имеет большое значение для упрощения и ускорения проведения доклинических исследований.

Система диффузионных ячеек Франца является официальным фармакопейным методом, в первую очередь для исследования диффузии трансдермальных препаратов, но это один из наиболее часто используемых методов для исследования интраназальных лекарственных форм в литературе [181].

Тест на мембранном высвобождении принципиально отличается от немембранного теста, поскольку проникновение АФС в акцепторную среду ограничивается не только ее высвобождением из состава и растворением в

акцепторной жидкости, но и диффузией вещества через полупроницаемую мембрану. Применяемая мембрана удерживает АФС в донорском отсеке, но позволяет переносить растворенные/высвобождаемые молекулы в акцепторную среду постепенно, что практически приближает моделируемый процесс к условиям *in vivo*.

На наш взгляд, на современном этапе исследований метод с мембраной следует признать наиболее целесообразны для оценки высвобождения АФС для назальной ЛФ, тогда как методы, основанные на непосредственном введении ЛФ в акцепторную среду (вращающаяся корзинка, лопастная мешалка и проточная ячейка), могут играть лишь вспомогательную роль в подтверждении или верификации полученных результатов, в основном при корреляции количества действующего вещества, при «взрывном» эффекте высвобождения (эффекта быстрого высвобождения значительной фракции АФС), с количеством АФС, определяемым в интерфазе.

Основным фактором выбора мембраны, определяющим ход процесса, является так называемое отсечение по молекулярной массе (с англ. Molecular weight cut-off (MWCO)). В соответствии с декларацией производителя мембраны, MWCO обозначает молекулярную массу, ниже которой молекулы могут свободно перемещаться через мембрану [138].

Не существует рекомендаций по выбору этого параметра мембраны в зависимости от молекулярной массы испытуемого вещества. В научной литературе есть некоторые данные, основанные больше на собственном опыте исследователей. Например, в исследовании [195] рекомендуют, чтобы точка отсечения примерно в 100 раз превышала молекулярную массу АФС.

На основании анализа литературных источников можно сделать вывод, что обычно используемая MWCO в 12 - 70 раз превышает молекулярную массу испытуемого вещества [195].

Молекулярная масса АФС, по сравнению с MWCO диализной мембраны, которая была использована в наших исследованиях (14 кДа), соответствует 40-кратному уменьшению по отношению к точке отсечения по молекулярной массе.

Исходя из этого, можно было ожидать свободное движение испытуемой АФС через диффузионную мембрану. В диализный мешок помещали 5,0 мл следующих испытуемые составы: К-2 масл., К-3 масл., К-4 масл., разбавленные акцепторной жидкостью в соотношении 1 + 1.

Мешок для диализа помещали в стеклянный стакан, содержащий 70,0 мл акцепторной среды, и инкубировали при $37 \pm 0,5$ °С в бане с механическим встряхиванием (150 циклов/мин). В заданные моменты времени отбирали 2,0 мл высвобождающей среды и заменяли ее свежей жидкостью.

Площадь диффузионной поверхности поддерживалась постоянной (18 см^2) с использованием мембран одинаковой длины и ширины для всех испытаний.

Стакан с диализным мешком, использованным в экспериментальном исследовании, представлен на рисунке 4.2.

На рисунке 4.3 графически отображены средние значения результатов профилей высвобождения образцов ЛС и АФС в условиях *in vitro*.



Рисунок 4.2 – Стакан с диализным мешком для испытания

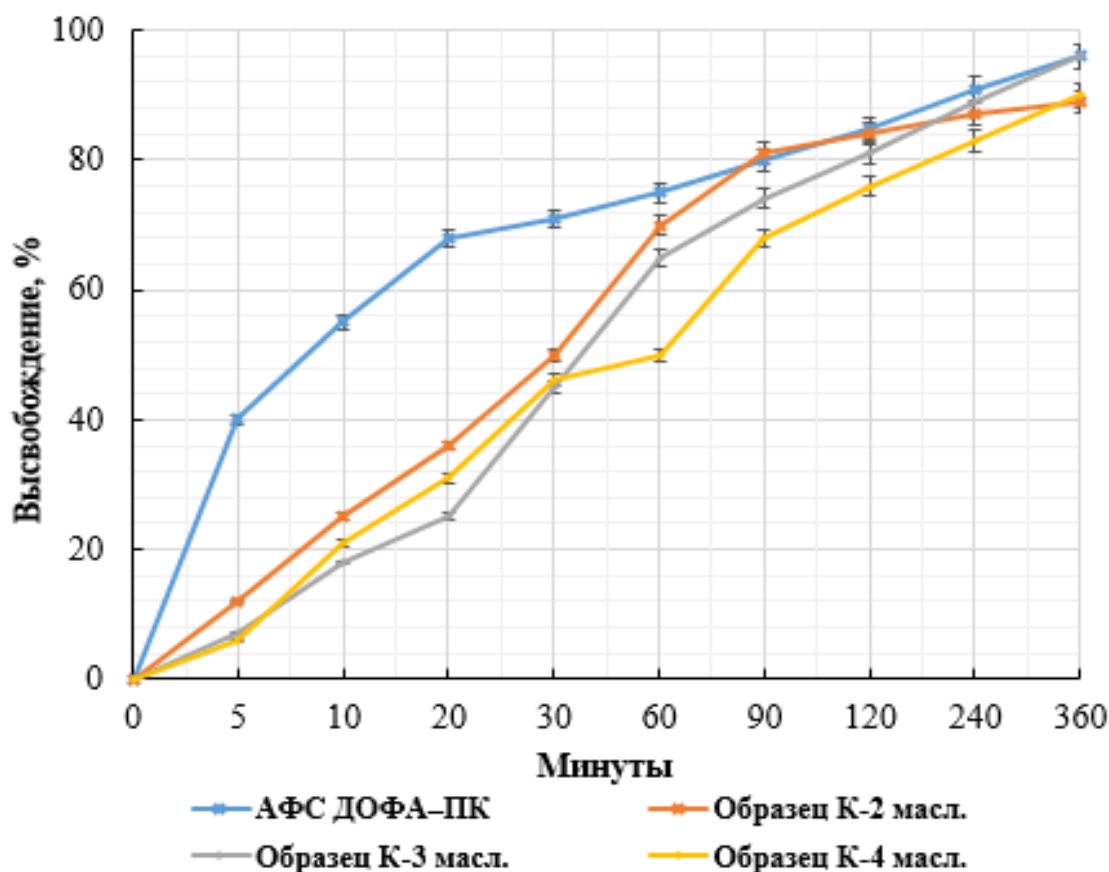


Рисунок 4.3 – Среднее значения результатов профилей высвобождения образцов ЛС и АФС в условиях *in vitro*

В экспериментальных моделях оценки высвобождения с мембраной особое значение имеет также осмотическое давление с обеих сторон мембраны. В донорском отделении это давление должно быть равно давлению в приемном отделении или превышать его, что препятствует течению среды в направлении, соответствующем перепаду давления, но противоположном направлению диффузии/выделения АФС. Такой поток может мешать и замедлять проникновение АФС в акцепторное отделение.

Для статистической оценки профилей высвобождения был рассчитан фактор сходимости (f_2) [69] для каждого образца ЛС по отношению к результатам высвобождения моно компонентной АФС (ДОФА-ПК) согласно формуле, представленной в главе 2.

Результаты статистической оценки представлены в таблицах 4.8.- 4.10.

Таблица 4.8 – Статистическая обработка сравнения профилей высвобождения для образца ЛС К-2 масл. и АФС ДОФА-ПК

Образец К-2 масл.									
Точки отбора проб, мин	5	10	20	30	60	90	120	240	360
Высвобождение, % (1)	12,12	25,14	36,23	50,28	70,94	81,32	82,32	85,32	89,54
Высвобождение, % (2)	13,20	26,32	37,23	49,85	68,36	80,20	84,06	86,71	88,32
Среднее значение	12,66	25,73	36,73	50,07	69,65	80,76	83,19	86,02	88,93
АФС ДОФА-ПК									
Высвобождение, % (1)	40,13	55,36	68,34	71,18	75,54	80,95	85,47	91,69	96,87
Высвобождение, % (2)	39,36	55,12	65,32	69,42	75,50	81,32	82,38	90,02	94,23
Среднее значение	39,75	55,24	66,83	70,30	75,52	81,14	83,93	90,86	95,55
Метрологические характеристики									
Стандартное отклонение	15,6469	17,0447	17,4267	11,7060	3,5489	0,5279	1,5086	2,9317	4,0022
RSD, %	59,7153	42,1013	33,6553	19,4510	4,8894	0,6522	1,8055	3,5087	4,3389
Фактор сходимости, f₂	36,82								

Таблица 4.9 – Статистическая обработка сравнения профилей высвобождения для образца ЛС К-3 масл. и АФС ДОФА-ПК

Образец К-3 масл.									
Точки отбора проб, мин	5	10	20	30	60	90	120	240	360
Высвобождение, % (1)	7,42	18,23	25,22	45,29	65,94	74,12	81,24	89,11	96,54
Высвобождение, % (2)	8,11	17,42	26,23	46,78	68,36	76,16	84,06	86,71	94,23
Среднее значение	7,77	17,83	25,73	46,04	67,15	75,14	82,65	87,91	95,39
АФС ДОФА-ПК									
Высвобождение, % (1)	40,13	55,36	68,34	71,18	75,54	80,95	85,47	91,69	96,87
Высвобождение, % (2)	39,36	55,12	65,32	69,42	75,50	81,32	82,38	90,02	94,23
Среднее значение	39,75	55,24	66,83	70,30	75,52	81,14	83,93	90,86	95,55
Метрологические характеристики									
Стандартное отклонение	18,4685	21,6043	23,7676	14,0410	4,9324	3,5632	1,8597	2,0775	1,4353
RSD, %	77,7457	59,1372	51,3588	24,1389	6,9144	4,5602	2,2329	2,4943	1,5034
Фактор сходимости, f₂	31,77								

Таблица 4.10 – Статистическая обработка сравнения профилей высвобождения для образца ЛС К-4 масл. и АФС ДОФА-ПК

Образец К-4 масл.									
Точки отбора проб, мин	5	10	20	30	60	90	120	240	360
Высвобождение, % (1)	9,32	26,34	35,32	58,89	60,94	73,12	77,24	83,18	90,24
Высвобождение, % (2)	7,12	21,82	32,23	49,78	54,36	69,16	74,06	82,71	91,23
Среднее значение	8,22	24,08	33,78	54,34	57,65	71,14	75,65	82,95	90,74
АФС ДОФА-ПК									
Высвобождение, % (1)	40,13	55,36	68,34	71,18	75,54	80,95	85,47	91,69	96,87
Высвобождение, % (2)	39,36	55,12	65,32	69,42	75,50	81,32	82,38	90,02	94,23
Среднее значение	39,75	55,24	66,83	70,30	75,52	81,14	83,93	90,86	95,55
Метрологические характеристики									
Стандартное отклонение	18,2258	18,0849	19,1657	9,9654	10,6612	5,9947	5,1090	4,6214	3,0088
RSD, %	75,9964	45,5998	38,1008	15,9913	16,0115	7,8735	6,4033	5,7922	3,2303
Фактор сходимости, f₂	34,09								

Установленные факторы сходимости статистически свидетельствовали, что высвобождение образцов ЛС по сравнению с моно компонентной АФС имело тенденцию к замедлению. Данное явление было вызвано наличием дисперсионной среды в виде масляной структуры в ЛС.

Более того, у образцов К-3 масл. и К-4 масл. замедление высвобождения было более существенным.

Составы, содержащие в качестве вспомогательного вещества твин-80 (К-3 масл. и К-4 масл.), демонстрировали плавный и более замедленный переход АФС в акцепторную среду в сопоставлении с результатами высвобождения образца К-2 масл. и моно компонентной ДОФА-ПК, что обеспечивалось адекватным осмотическим давлением, создаваемым ПАВ на границе раздела сред на поверхности мембраны.

Присутствие ПАВ также способствовало проявлению эффекта солюбилизации ДОФА-ПК. Более замедленный переход АФС в акцепторную среду по результатам статистического анализа свидетельствовал о формировании эффекта «пролонгации» высвобождения действующего вещества из ЛФ и служит критерием его подтверждения в сопоставлении с данными высвобождения монокомпонентной АФС.

Согласно полученным результатам, все образцы ЛС, участвовавшие в эксперименте, демонстрировали замедленное высвобождение, что послужило подтверждением их использования для дальнейших исследований.

4.5 Оценка стабильности для определения оптимального состава

Данные по изучению стабильности являются неотъемлемой составляющей частью нормативного документа по качеству на лекарственное средство.

Срок годности ЛС устанавливается экспериментально при хранении в течение определенного времени в условиях и упаковке, регламентируемых нормативной документацией, и по мере накопления данных он может быть изменен как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения.

Помимо установления срока годности и выбора условий хранения изучение стабильности оригинальных ЛП и фармацевтических субстанций проводится с целью установления наиболее вредного влияния внешних факторов (высокие или низкие температуры, влага, кислород и другие компоненты воздуха, свет и т.п.) в зависимости от времени и условий их воздействия.

Исследования были проведены согласно требованиям Решения ЕЭК № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций» от 10.05.2018, ГФ РФ ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» и ГОСТ Р 57129-2016 «Лекарственные средства для медицинского применения» [11, 12, 13, 62, 72].

Изучение стабильности новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Образцы хранились в климатических камерах Memmert HPP110 (Германия) с контролем температурного режима каждые 30 с, оснащенные стабилизатором влажности с ежеминутной частотой поддержания необходимых условий в соответствии с требованиями ICH Q1A «Испытание новых лекарственных веществ и препаратов на стабильность» [24, 33].

Для изучения влияния условий хранения на качество было получено 3 серии назальных капель каждого наименования ЛС согласно технологии получения, указанной в главе 4. Полученные образцы упаковывали в прозрачные пластиковые контейнеры из темного материала в количестве 10 штук. Серии были промаркированы согласно каждому наименованию ЛС:

- серия № К – 2 масл. 1-19052020;
- серия № К – 3 масл. 2-19052020;
- серия № К – 4 масл. 3-19052020.

Температурный режим хранения АФС ДОФА-ПК, согласно спецификации, составляет 5 ± 3 °С, что предполагает его соблюдение для ЛС на ее основе. Отсутствие тенденции роста родственных примесей, а также соответствие их суммы требованиям спецификации по истечении 3 месяцев хранения по результатам экспериментальных исследований по оценке совместимости,

представленным в разделе 4.3, позволили предположить повышение температурного режима хранения для ЛС.

На основании этих данных и полноты эксперимента оценка стабильности образцов была проведена в температурном режиме хранения как при 5 ± 3 °С, так и при 25 ± 5 °С, относительная влажность при этом составляла 60 ± 5 %.

В процессе исследований по изучению стабильности была проведена оценка показателей качества образцов серий с масляной дисперсионной средой (К-2 масл, К-3 масл, К-4 масл), заложенных на хранение. Образцы в количестве 10 единиц каждого наименования, участвующие в экспериментальном исследовании, были упакованы в темные прозрачные пластиковые контейнеры и помещены в климатические камеры. Результаты исследования представлены в главе 6 в таблицах 6.22 и 6.24.

Математическая обработка полученных данных отражена в главе 6 в таблицах 6.23 и 6.25.

По результатам оценки показателей качества на всем протяжении хранения при температуре 25 ± 5 °С и относительной влажности 60 ± 5 % образец серии № К-3 масл. 2-19052020 отмечалась как более стабильная.

Отклонения были выявлены только на 9 месяце хранения по показателям родственные примеси и количественное определение.

В условиях пониженного температурного режима хранения все образцы ЛС были более стабильны, по сравнению с результатами аналогичных исследований при температуре 25 ± 5 °С.

Однако, у серии № К-2 масл. 1-19052020 с 6 месяца хранения в условиях температурного режима 5 ± 3 °С были выявлены несоответствия по показателям качества разрабатываемой спецификации по количественному содержанию АФС в ЛС, а с 12 месяца хранения наблюдалось значительное снижение кислотности суспензионного раствора ЛС и рост числа родственных примесей АФС.

Данные результаты послужили основанием исключения образца ЛС К-2 масл. из числа потенциальных составов в кандидаты ЛС. Следует отметить, что образцы ЛС К-4 масл. были сняты с эксперимента на 9 месяце хранения, в связи с

выявленными отклонениями по показателям кислотности суспензионного раствора и количественного содержания АФС в ЛС.

Образцы ЛС К-3 масл. при хранении в температурном режиме 5 ± 3 °С были стабильными по всем показателям качества разрабатываемой спецификации. При анализе полученных результатов отсутствовали резкие изменения и существенные отклонения. Для дальнейших исследований, разработки технологии получения и проекта опытно-промышленного регламента был выбран образец ЛС К-3 масл., который был стабилен на протяжении 2 лет экспериментального хранения при температуре 5 ± 3 °С.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Выбор ВВ при разработке ЛФ был обусловлен их физико – химическими и технологическими свойствами, характеристиками вводимого фармакологически активного компонента, физико-химическими параметрами слизистой носа и назального секрета.

2. Для разработки ЛС на основе АФС ДОФА–ПК были получены составы следующих ЛФ, применяемых в назальной доставке: назальные капли с водой очищенной и маслами в качестве дисперсионной среды; гели назальные.

С целью определения наиболее рационального состава разработанных назальных композиций на основе АФС ДОФА–ПК, была проведена оценка их поведения на модельной системе *in vitro*. Оценка проводилась по показателям площади распределения и степени адгезии на разработанной модельной поверхности. В соответствии с установленными значениями скоростей стекания образцов на модельной системе была вычислена функция отклика с помощью построения матрицы и установлен диапазон пространства проектного поля для выбора составов, соответствующих реологическим требованиям в условиях *in vivo*.

3. Для выявления возможной несовместимости компонентов и оценки стабильности отобранных модельных составов было проведено изучение появления возможных родственных примесей, образованных в процессе хранения, методом ВЭЖХ сразу после наработки образцов и через шесть месяцев при

хранении в климатической камере при температуре 25 ± 5 °С и относительной влажности 60 ± 5 %. По результатам анализа у образцов с масляной дисперсионной средой (К – 2 масл., К – 3 масл., К – 4 масл.) значения суммы родственных примесей по истечении 3 месяцев соответствовало требованиям спецификации на АФС и не превышало порог квалификации НД.

4. Для оценки пролонгированного высвобождения АФС из модельных составов была разработана методика высвобождения *in vitro*.

5. Для статистической оценки профилей высвобождения был рассчитан фактор сходимости (f_2) отобранных модельных составов ЛС по отношению к монокомпонентной АФС ДОФА–ПК. Статистический анализ свидетельствовал о формировании эффекта «пролонгации» высвобождения действующего вещества из ЛС и служил критерием его подтверждения.

6. Для разработки технологии получения и проекта опытно-промышленного регламента на следующем этапе экспериментального исследования был выбран образец ЛС К – 3 масл., который был стабилен на протяжении 2 лет экспериментального хранения при температуре 5 ± 3 °С.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДОФАМИНИН

Технология получения ЛС Дофаминин включает в себя образование суспензии L-ДОФА и полимера PLGA 50/50 в дисперсионной среде хлороформа, с последующим эмульгированием в растворе 2 % ПВС, насыщенного L-ДОФА.

На следующем этапе упаривается хлороформ, вносится раствор маннитола и проводится процесс лиофилизации с получением готового продукта - АФС ДОФА-ПК, которая используются для получения суспензии ЛФ в растворе твина-80 и масле оливковом.

При масштабировании был увеличен объем загрузки реактора, повышена скорость перемешивания смеси полимерных частиц с 3,4-дигидрокси-L-фенилаланином в полилактидгликолиде с оливковым маслом и твином-80. Количество вносимых компонентов получаемого ЛС было повышено в несколько раз, для увеличения объема получаемой продукции. Был осуществлен переход от ручного смешивания в лабораторной посуде, к смешиванию компонентов ЛФ в реакторе большого объема (6000 мл) планетарного смесителя РОМ-5 производства Pharma Test, лопасти которого разработаны для эффективного и быстрого перемешивания сред повышенной вязкости. Камера реактора оснащена специальной неподвижной лопастью для снятия со стенок налипающей массы.

По завершению исследования по разработке оптимального состава и технологии производства назальных капель был разработан опытно-промышленный регламент получения ЛС Дофаминин.

ОПР - технологический документ, которым завершается отработка новой технологии производства ЛС на опытно-промышленной установке и используется для получения и испытания опытных образцов разработанного ЛС в полупроизводственных условиях, отработки качественных показателей продукции, вводимых в НД по качеству [57, 58, 62, 64].

5.1 Разработка проекта опытно-промышленного регламента производства лекарственного средства Дофаминин

5.1.1 Характеристика готового продукта

Наименование продукции. Дофаминин, капли назальные

Основное назначение продукции. ЛС Дофаминин, капли назальные, представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую в качестве действующего вещества аминокислоту (3,4-дигидрокси-L-фенилаланин, леводопа, L-ДОФА), распределенную в полимерной матрице на основе биodeградируемого сополимера молочной/гликолевой кислот (полилактидгликолид, PLGA 50/50), с включением в процессе производства ДОФА-ПК: субстанции поливинилового спирта (ПВС), как стабилизатора эмульсии и криопротектора – D-маннита, а также вспомогательных веществ, введенных на этапе производства готовой лекарственной формы: масла оливкового, твин-80.

Фармакологические свойства: 3,4-дигидрокси-L-фенилаланин (леводопа) является непосредственным метаболическим предшественником дофамина, способен, в отличие от последнего, с помощью переносчика проникать через гематоэнцефалический барьер и компенсировать дефицит дофамина в мозге, лежащий в основе многих клинических проявлений болезни Паркинсона (БП), обусловленных деградацией дофаминергических нейронов черной субстанции. Леводопа захватывается окончаниями сохранившихся дофаминергических нигростриарных нейронов и, подвергаясь в них декарбоксилированию, превращается в дофамин, который выделяется в синаптическую щель, стимулирует дофаминовые рецепторы, поддерживая адекватное функциональное состояние нейронов полосатого тела и других базальных ганглиев. Эффективность Леводопа в отношении выработки дофамина и его биологическая доступность намного выше по сравнению с другими предшественниками дофамина - фенилаланином и тирозином.

Показания к применению: Нейродегенеративные заболевания, в частности, болезнь Паркинсона.

Краткое описание внешнего вида и потребительских свойств. Дофаминин, капли назальные, является оригинальным ЛС и представляют собой масляную суспензию светло - желтого цвета с однородно распределенными в ней частицами, без запаха. Упаковывается во флаконы из темного стекла, завинчивающиеся винтовой крышкой с маслостойкой пипеткой 20 мл. Состав и номинальное количество продукта на один флакон представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Состав ЛС Дофаминин на один флакон

Состав	Масса, г
3,4-дигидрокси-L-фенилаланин	0,5
Полимер PLGA 50/50	4,0
D-Маннитол	0,4
Поливиниловый спирт	0,1
Масло оливковое	4,9
Твин 80	0,1
Общая масса	10,0

Описание. Дофаминин, капли назальные представляют собой масляную суспензию светло-желтого цвета, без запаха, с однородно распределенными в ней частицами.

5.1.2 Характеристика назальных капель на основе ДОФА-ПК

Международное непатентованное название - L-ДОФА (Леводопа)

Химическое название - (2S)-2-амино-3-(3,4-дигидроксифенил) пропановая кислота

Содержание: от 99,0 % до 101,0 % (в пересчете на сухое вещество)

Структурная формула представлена на рисунке 2.1. в главе 2.

Нормативные требования к упаковке, маркировке, транспортированию, условиям хранения

Упаковка. Назальные капли расфасовывают с учётом ГОСТ 17768-90 (Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение) в стеклянные флаконы Ref.52634 фирмы SGD с винтовой нарезкой, вместимостью 20 мл и укупоривают крышкой с винтовой резьбой с встроенной пипеткой.

Флаконы должны иметь выпуклость в дне сосуда, что уменьшает потери лекарственного препарата.

Маркировка. На каждый флакон наклеивается этикетка из бумаги писчей по ГОСТ 18510-87 (Бумага писчая. Технические условия) или этикеточной по ГОСТ 7625-86 (Бумага этикеточная. Технические условия). Возможно использование импортной бумаги, разрешённой к применению МЗ РФ. На этикетке (первичной упаковки) указывают наименование ЛП, номер серии, срок годности, количество, наименование производителя.

На вторичной (потребительской) упаковке указывают наименование ЛП, наименование производителя, номер серии, номер регистрационного удостоверения, срок годности, способ применения, количество, лекарственная форма, условия отпуска, условия хранения, предупредительные надписи.

Транспортная тара, маркировка транспортной тары. Флаконы во вторичной упаковке с инструкцией по применению упаковываются в картонные коробки согласно ГОСТ 17768-90 (Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение).

Хранение. В сухом защищённом от света месте при температуре от +2 до +8 °С.

Срок годности: 2 года.

При производстве ЛС Дофаминин не происходит химических изменений, поэтому химическая схема отсутствует.

5.1.3 Технологическая схема производства

Технологическая схема производства наглядно отображает последовательность выполнения работ в данном производстве с разделением их по стадиям и операциям технологического процесса, указанием основных материальных потоков (поступление сырья, химикатов, получение промежуточных продуктов) и мест образования отходов, потерь, систем очистки и утилизации (Рисунок 5.1).

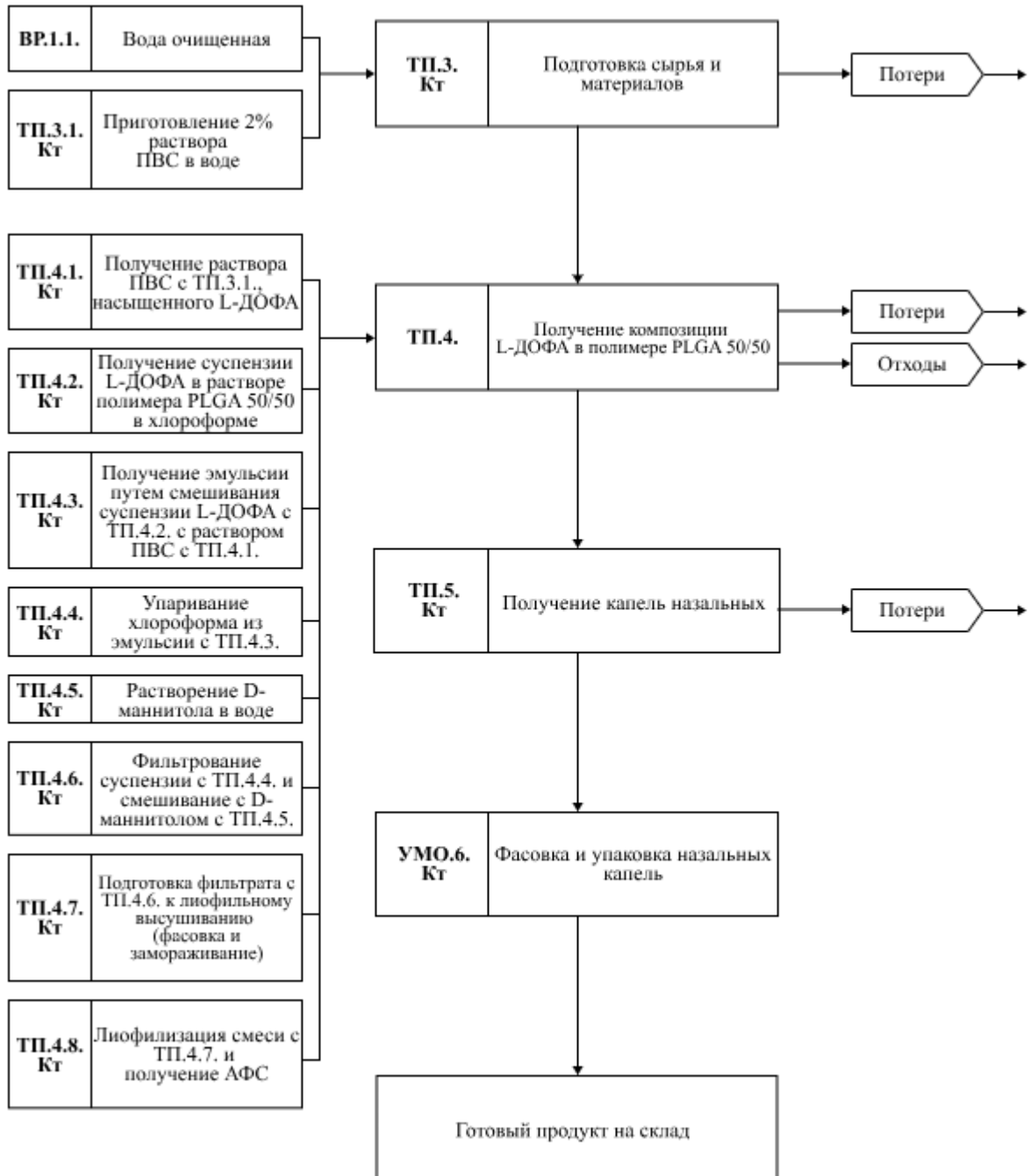


Рисунок 5.1 – Технологическая схема получения ЛС Дофаминин

5.1.4 Аппаратурная схема производства и спецификация оборудования

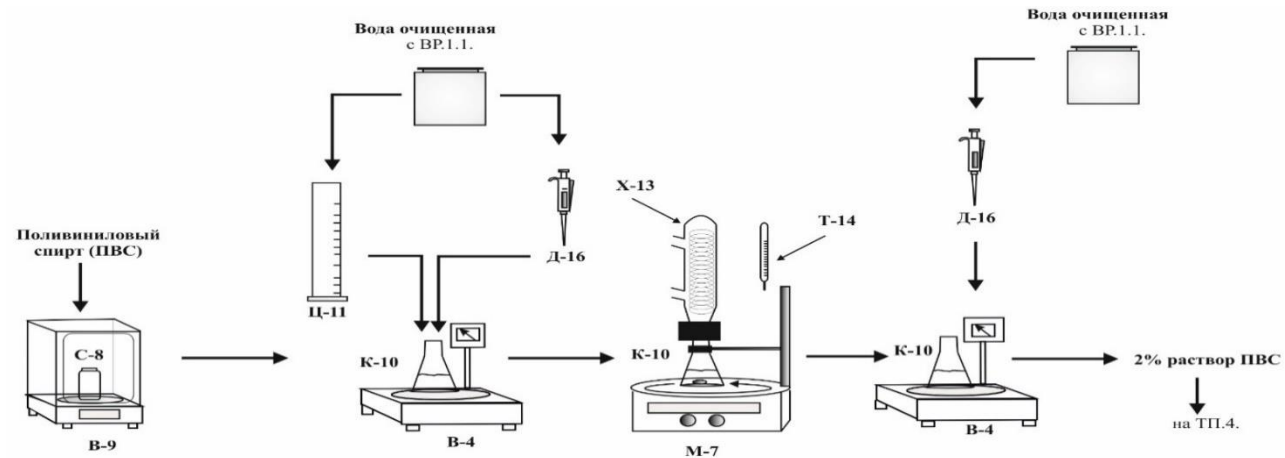


Рисунок 5.2 – Стадия ТП.3.1. Приготовление 2 % раствора ПВС в воде

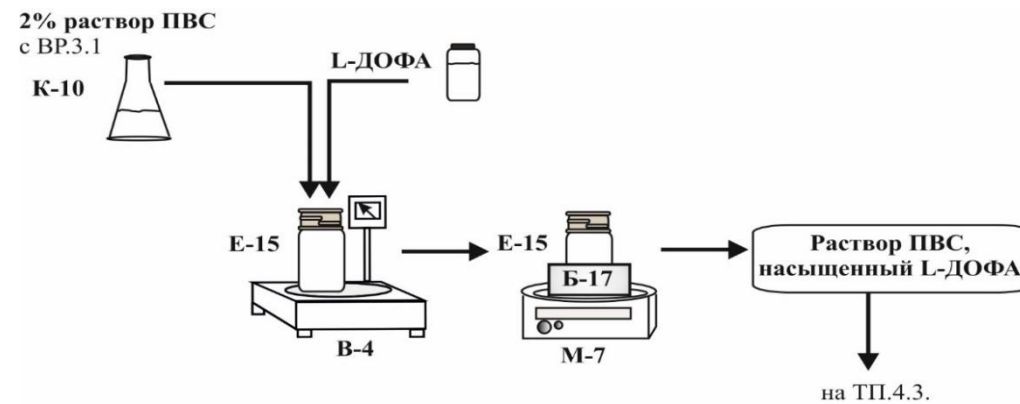


Рисунок 5.3 – Стадия ТП.4.1. Получение раствора ПВС, насыщенного L-ДОФА

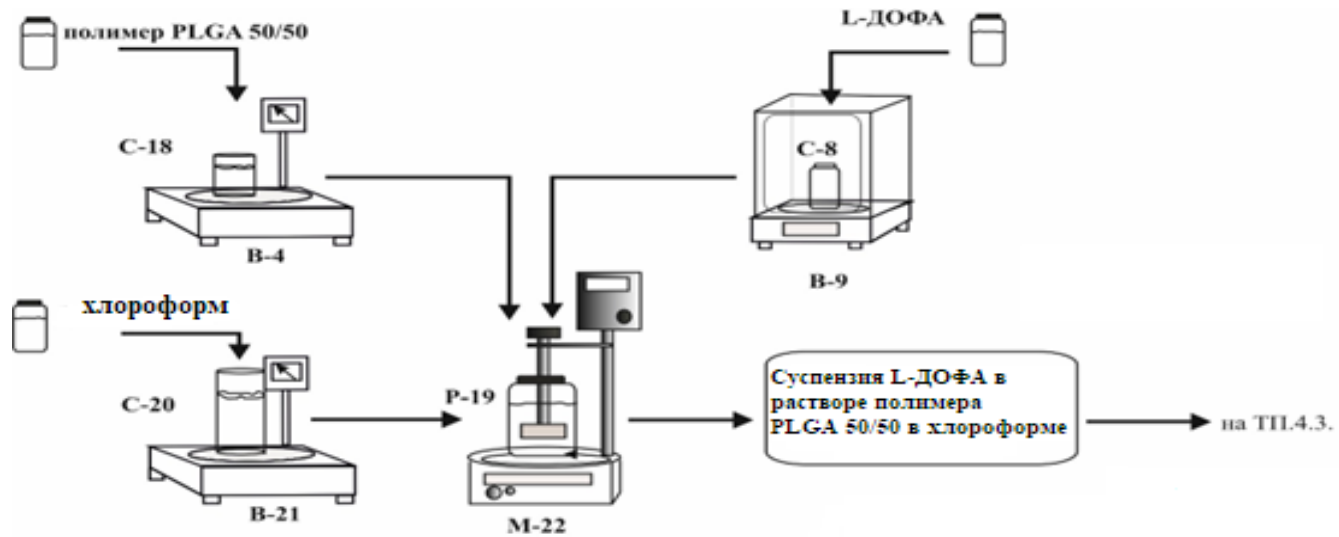


Рисунок 5.4 – Стадия ТП.4.2. Получение суспензии L-ДОФА в растворе полимера PLGA50/50 в хлороформе

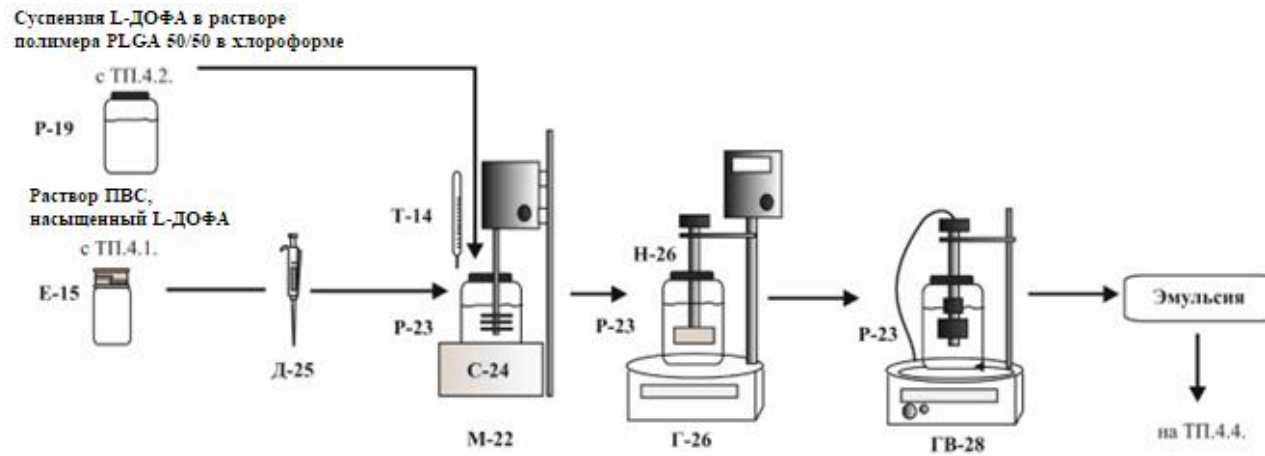


Рисунок 5.5 – Стадия ТП.4.3. Получение эмульсии

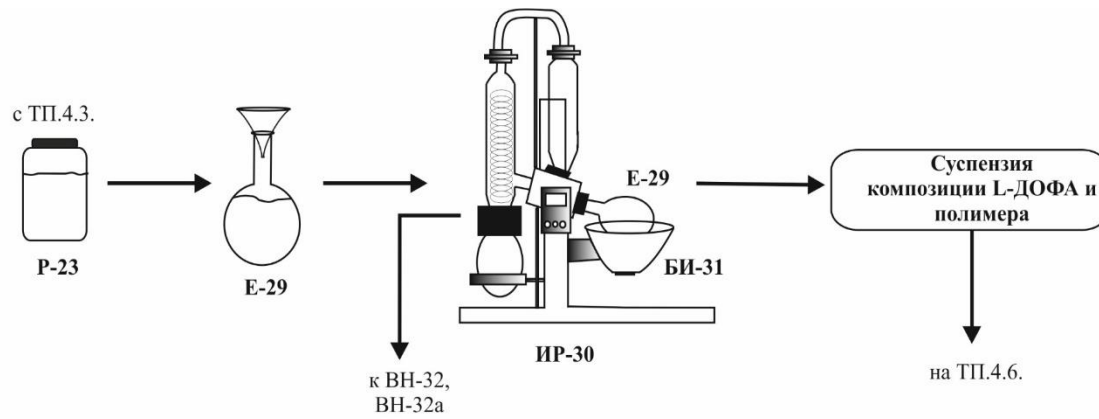


Рисунок 5.6 – Стадия ТП.4.4. Упаривание хлороформа

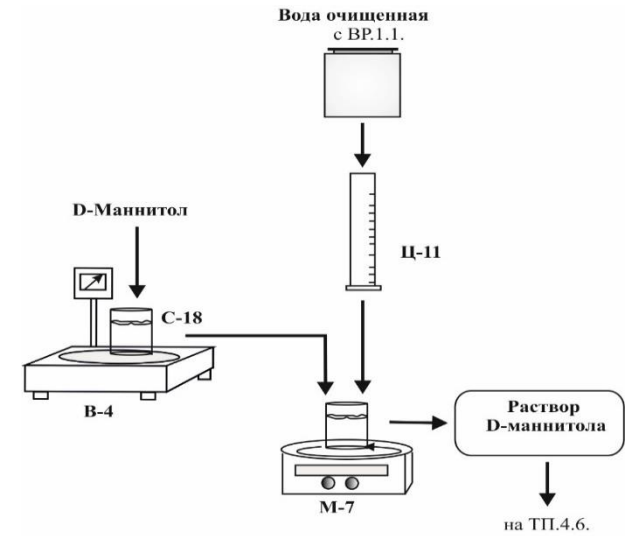


Рисунок 5.7 – Стадия ТП.4.5. Растворение D-маннитола в воде

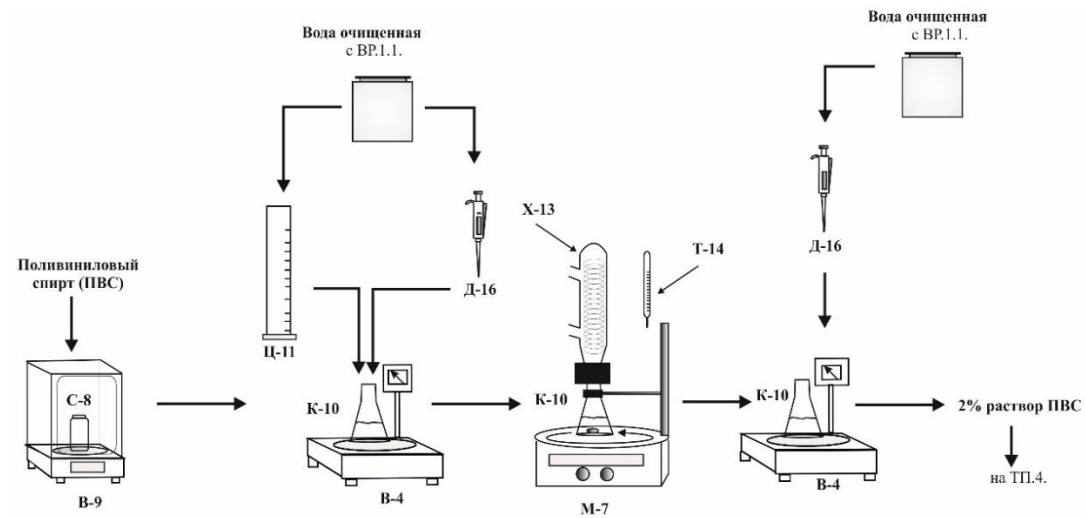


Рисунок 5.8 – Стадия ТП.4.6. Фильтрация суспензии и смешивание его с D-маннитолом

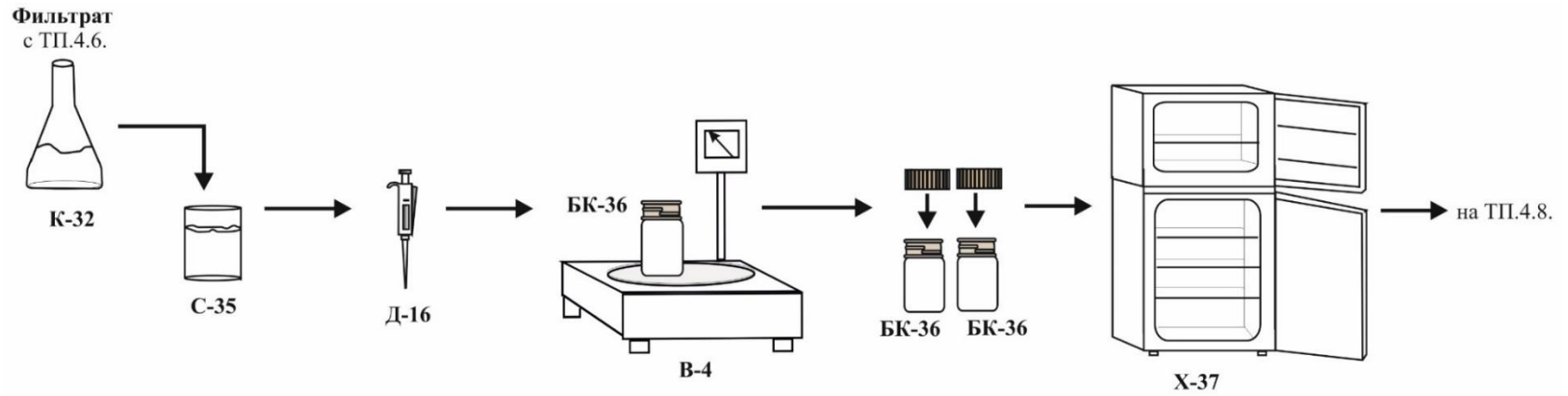


Рисунок 5.9 – Стадия ТП.4.7. Подготовка фильтрата к лиофильному высушиванию (фасовка и замораживание смеси)

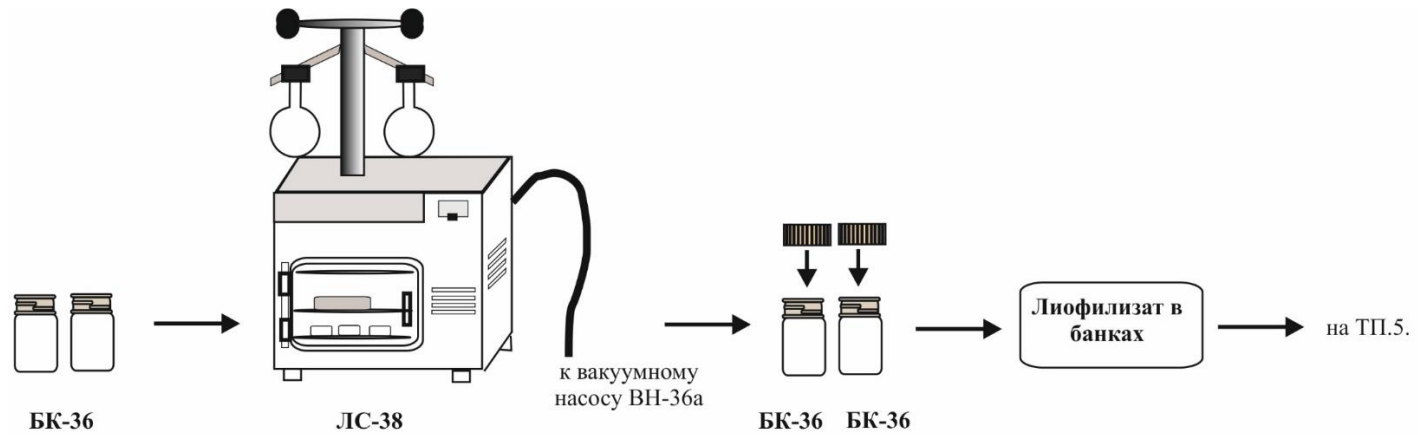


Рисунок 5.10 – Стадия ТП.4.8. Лиофилизация смеси

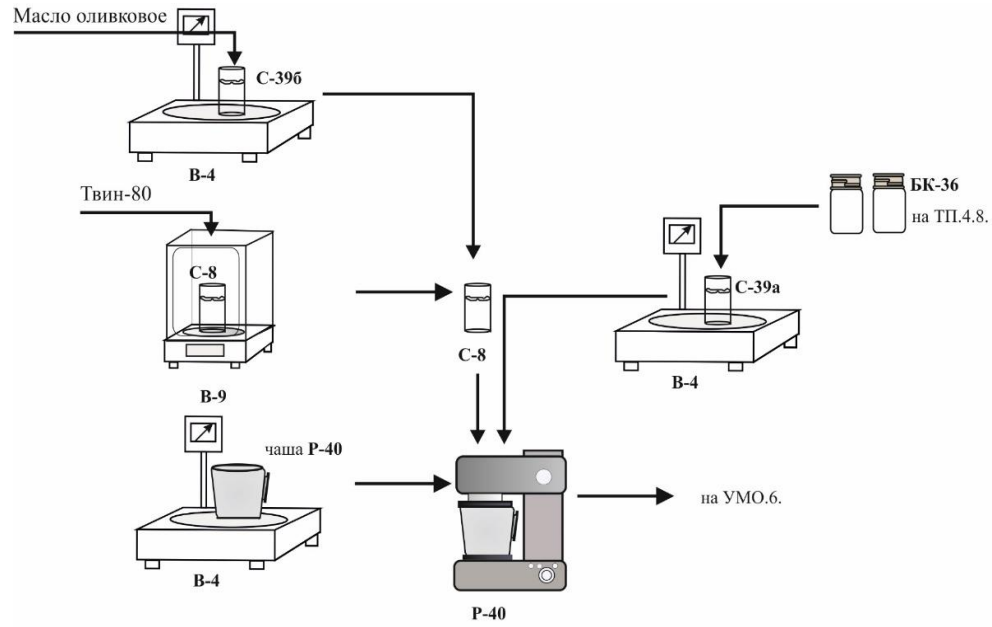


Рисунок 5.11 – Стадия ТП.5. Получение капель назальных

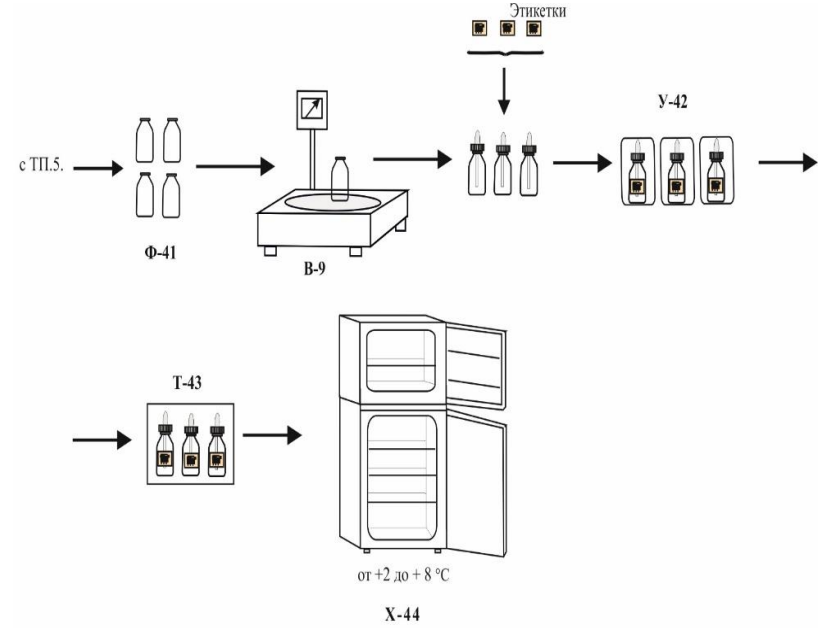


Рисунок 5.12 – Стадия УМО.6. Фасовка и упаковка назальных капель

Таблица 5.2 – Перечень основного оборудования и приборов, изображённых на аппаратурной схеме производства

Обозначение	Наименование	Кол-во, шт	Примечание
В-4	Весы лабораторные	2	Точность взвешивания 0,01 г Максимальная нагрузка 1200 г
М-7	Мешалка магнитная с подогревом	4	Диапазон скоростей вращения до 1500 об./мин, нагрев рабочей поверхности до 310 °С
С-8	Бюкс стеклянный для взвешивания	2	Стаканчик для взвешивания(бюкс) СН-50/45 ГОСТ 23932-90
В-9	Весы аналитические	1	Точность взвешивания 0.1 мг Максимальная нагрузка 210 г
К-10	Сосуд для приготовления раствора ПВС	2	Вместимость 1 л Колба коническая (шлиф 29) со стеклянной пробкой ГОСТ 25336-82
Ц-11	Цилиндр мерный	2	Вместимость 250 мл Цена деления 1 мл Исполнение 1 (с носиком) ГОСТ 1770-74
Х-13	Холодильник обратный	2	Длина рабочей зоны 500 мм Стеклянный, шлифы 14/29 ГОСТ 25336-82
Т-14	Термометр лабораторный	1	Диапазон от 0 до 100 °С Цена деления 0.5 °С
Е-15	Банка для приготовления насыщенного раствора L-ДОФА	2	Вместимость 1000 мл Банка светлого стекла навинчивающейся крышкой
Д-16	Дозатор пипеточный 5 мл	4	Объём дозы от 1 до 5.0 мл Цена деления 0.1 мл
Б-17	Баня водяная лабораторная 1-местная	1	Алюминий Вместимость бани, л. 2,5 л. Размер, мм
С-18	Стакан лабораторный для взвешивания полимера PLGA 50/50	2	Вместимость 600 мл стеклянный, Н-1 Vitlab (Германия)
Р-19	Реактор получения суспензии	1	Вместимость 5000 мл Банка пластиковая Vitlab (Германия)
С-20	Стакан пластиковый	2	Вместимость 5000 мл Цена деления 1 мл Исполнение 1 (с носиком) Vitlab (Германия)
В-21	Весы лабораторные технические	1	Серия НТ, фирма А&D, 5100, точность взвешивания – 1 г.
М-22	Перемешивающее устройство	1	Перемешивающее устройство ПЭ8310, фирмы «Экрос», 20-2000 об/мин
Р-23	Реактор получения вторичной эмульсии	1	Банка, полипропилен вместимость 7500 мл

Продолжение таблицы 5.2

С-24	Баня лабораторная	1	Водяная баня Memmert WNB 45, вместимостью 45 л, точность – 0,1°C
Д-25	Дозатор	1	Пипеточный дозатор вакуумный в комплекте со стеклянными пипетками, 100 мл.
Г-26	Гомогенизатор погружной	1	Диапазон скоростей вращения роторов насадок 6,5 – 24 тыс. об/мин
Н-26	Насадка для смешивания	1	Шифр по каталогу ИКА® S25N-25F
ГВ-28	Гомогенизатор	2	Частота 30 кГц, автоматическая регулировка частоты, амплитуда 20-100 %, В. Braun, США, погружной зонд (диаметр 19×70 мм)
Е-29	Колба для упаривания	1	Вместимость 10,0 л, круглодонная
ИР-30	Испаритель роторный	1	Скорости вращения вала от 10 до 130 об/мин. Серия R-1010, Производитель: Zhengzhou Great Wall, Китай
БИ-31	Баня роторного испарителя (водяная)	2	Диапазон температур до 100 °С Для колб до 20 л. В комплекте с роторным испарителем
ВН-32	Насос вакуумный	1	В комплекте с роторным испарителем
ВН-32а	Вакуумметр	1	В комплекте с роторным испарителем
К-32	Колба Бунзена	1	Колба Бунзена стеклянная вместимостью 2000 мл
С-35	Стакан для дозирования смеси	1	Вместимость 200 мл Пластиковый, с носиком
БК-36	Банка с крышкой	10	Вместимость 175 мл Материал – полиэтилентерефталат (ПЭТФ) прозрачный. Крышка – полиэтилен (ПЭ)
Х-37	Морозильник	1	Температура в камере минус 40 – минус 70 °С
ЛС-38	Лиофильная сушка	2	Zirbus, серия VaCo Производительность ≤ 4 кг/24 ч
С-39 (а,б)	Стакан пластиковый	2	Вместимость 600 мл стеклянный, Vitlab (Германия)
Р-40	Реактор	1	Миксер Profi Cook PC-КМ 1004 с чашей вместимостью 6000 мл
Ф-41	Флакон стеклянный	100	Стеклянные флаконы Ref.52634 фирмы SGD с винтовой нарезкой
У-42	Упаковка для флаконов (вторичная тара)	100	Коробочка из картона (пачка) для банок с лиофилизатором
Т-43	Коробка для транспортировки	10	Коробка картонная ГОСТ 12301-2006
Х-44	Холодильник для продукта	1	Температура в холодильном отделении от +2 до +8 °С

5.1.5 Изложение основных работ и процессов стадий производства

Стадия ТП.3. Подготовка сырья и материалов

Стадия ТП.3.1. Приготовление 2 % раствора поливинилового спирта (ПВС) в воде. Сведения о видах и количестве в производстве сырья, полупродуктов, отходов и потерь на стадии ТП.3.1. приведены в таблице 5.3-5.4.

Таблица 5.3 – Израсходовано на стадии ТП. 3.1

Наименование	Содержание, %	Израсходовано				
		Масса			Объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Сырье: ПВС Вода		11,0000 539,0000			539,0	
Итого:		550,0000				

Таблица 5.4 – ТП.3.1. получено на стадии ТП.3.1

Наименование	Содержание, %	Получено				
		Масса			Объём, л	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
2 % раствор ПВС в воде, в том числе: ПВС Вода	0,9850	549,0990 10,9820 538,1170			547,46	
Потери, в том числе: ПВС Вода		0,9010 0,018 0,8830				
Итого:		550,0000				

В стеклянном бюксе С-8 вместимостью 50,00 мл на весах В-9 с помощью металлического шпателя взвешивают $11,00 \pm 0,01$ г ПВС. Пересыпают его через стеклянную воронку в коническую колбу К-10 на 1 л, помещённую на весы В-4. С помощью мерного цилиндра Ц-11 (на 250 мл) и дозатора Д-16 добавляют воду очищенную со стадии ВР.1.1. из стеклянной бутылки на 1 л в количестве 539,00 г (до суммарной массы компонентов 550,00 г). Массу-брутто колбы К-10

записывают. Затем колбу К-10 помещают на магнитную мешалку М-7, закрепляют на лабораторном штативе за горловину с помощью лапки. Опускают в колбу магнитный элемент для перемешивания во фторопластовой оболочке (диаметр 8×32 мм), оснащают колбу обратным водяным холодильником ХВ-13. Включают перемешивание (500 об/мин) и нагрев рабочей поверхности мешалки М-7 (150 °С). Температуру смеси доводят до 60-75 °С, периодически измеряя её термометром Т-14 (Кт ТП.3.) Для этого вынимают обратный холодильник ХВ-13 из горловины колбы К-10. Перемешивание с нагревом проводят до полного растворения осадка (в течение около 1,5 ч).

Затем нагрев рабочей поверхности мешалки отключают и продолжают перемешивание, охлаждая на воздухе раствор ПВС до 30-35 °С. Из колбы извлекают магнитный элемент. Колбу К-10 помещают на весы В-4, определяют массу-брутто полученного раствора и сравнивают с показанием до растворения. Потерю (испарение) воды при нагреве (от 0,6 до 2,0 г) компенсируют добавлением воды очищенной с помощью дозатора Д-16. Получают 550,0 г прозрачного бесцветного 2 % раствора ПВС в воде. Колбу К-10 закрывают стеклянной пробкой и используют на стадии ТП.4.

При перемешивании раствора в колбе К-10 теряется около 0,9 г раствора ПВС.

Стадия ТП.4. Получение фармацевтической композиции

Стадия ТП.4.1. Получение раствора ПВС, насыщенного L-ДОФА

Сведения о видах и количестве в производстве сырья, полупродуктов, отходов и потерь на стадии ТП.4.1. приведены в таблице 5.5-5.6.

Стеклянный сосуд Е-15 на 1000 мл помещают на чашку весов В-4 и обнуляют показания. С помощью металлического шпателя добавляют (20,5 ± 0,01) г L-ДОФА, после чего приливают туда из колбы К-10 2 % раствор ПВС (549,0990) г.

Затем стеклянный сосуд Е-15 с отвешенной L-ДОФА и 2 % раствором ПВС переносят на водяную баню Б-17, расположенную на магнитной мешалке М-7.

Таблица 5.5 – Израсходовано на стадии ТП.4.1

Наименование	Содержание, %	Израсходовано				
		Масса			Объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Сырье: L-ДОФА 2 % раствор ПВС, в том числе: ПВС Вода	99,0	20,5000 549,0990 10,9820 538,1170			547,46	
Итого:		569,5990				

Таблица 5.6 – Получено стадии ТП.4.1

Наименование	Содержание, %	Получено				
		Масса			Объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Насыщенный раствор L-ДОФА в 2 % растворе ПВС, в том числе: L-ДОФА ПВС Вода	3,60	567,2545 20,4156 10,9367 535,9000 2,3445			~570	
Потери, в том числе: L-ДОФА ПВС Вода		0,0840 0,0450 2,2063				
Итого:		569,5990				

Растворение L-ДОФА проводят при помощи магнитной мешалки (диаметр 6х25) на мешалке М-7 при скорости перемешивания 400-500 об/мин в течение 2 ч.

Первоначальная температура в водяной бане составляет 59-65 °С. Температура в сосуде Е-15 не должна превышать 37-42 °С. Перемешивание смеси в бане продолжается 30-40 мин (без дополнительного подогрева).

Затем баня Б-17 с водой удаляется, перемешивание продолжается ещё 30-40 мин до полного растворения твёрдой фазы.

Стадия ТП.4.2. Получение суспензии L-ДОФА в растворе полимера PLGA 50/50 в хлороформе. Сведения о видах и количестве в производстве сырья, полупродуктов, отходов и потерь на стадии ТП.4.2. приведены в таблицах 5.7-5.8.

Таблица 5.7 – Израсходовано на стадии ТП.4.2

Наименование	Содержание %	Израсходовано				
		Масса			Объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Сырье:						
L-ДОФА	99,0	34,0000			2957,14	
Полимер PLGA 50/50	98,0	436,0000				
Хлороформ	99,8	3933,0000				
Итого:		4403,0000				

Таблица 5.8 – Получено на стадии ТП.4.2

Наименование	Содержание %	Получено				
		Масса			Объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Суспензия L-ДОФА в растворе полимера PLGA 50/50 в хлороформе, в том числе:	0,77	4403,0000			~2980,0	
L-ДОФА		34,0000				
Полимер PLGA 50/50		436,0000				
Хлороформ		3933,0000				
Итого:		4403,0000				

В стеклянной бюксе С-8 на аналитических весах В-9 отвешивают навеску ($34,00 \pm 0,001$) г L-ДОФА. В стеклянном стакане С-18 на весах -4 отвешивают полимер PLGA 50/50 ($436,00 \pm 0,001$) г и переносят с помощью металлического шпателя в реактор Р-19. В пластиковом стакане С-20 на весах -21 отвешивают ($3933 \pm 1,0$) г хлороформа.

Хлороформ переносят в реактор Р-19 (порционно). Закрывают крышкой из фольги. Включают перемешивающее устройство М-22. Растворение полимера

проводят при перемешивании лопастной мешалкой перемешивающего устройства со скоростью 300-400 об/мин в течение 20-25 мин.

После полного растворения полимера PLGA 50/50 в хлороформе, в реактор Р-20 перегружают отвешенную ранее навеску субстанции L-ДОФА, закрывают крышкой, продолжают перемешивание смеси со скоростью 300-400 об/мин в течение 25-30 мин до получения однородной смеси (Кт ТП.4.2-8).

Полученный раствор используют далее на стадии ТП.4.3.

Стадия ТП.4.3. Получение эмульсии.

2 % раствор ПВС, насыщенный L-ДОФА, переносят в пластиковый реактор Р-23 (емкостью 7500 мл), помещают на водяную баню С-24. Температура реакционной смеси должна быть в пределах от 21 до 27 °С. Устанавливают перемешивающее устройство М-22. При интенсивном перемешивании (600-700 об/мин) в центральную часть пластикового реактора Р-23 постепенно добавляют суспензию L-ДОФА из реактора Р-19 пипеточным дозатором Д-25 со стеклянным наконечником, порциями по 50-75 мл, перемешивание смеси продолжают 25-30 мин. Отключают нагревание, открывают спусковые вентили для воды, воду из бани Б-24 спускают, пространство емкости бани, свободное от реактора заполняют льдом.

Далее смесь подвергают второму эмульгированию (гомогенизации). Для этого штатив с гомогенизатором Г-26 помещают около реактора и погружают до дна насадку Н-27 (шифр S25N-25F). Смесь эмульгируют при 24 тыс. об/мин и комнатной температуре в режиме: 3 раза по 30-40 с и с двумя перерывами по 0,5 мин. В ходе процесса происходит образование пенистой массы.

Далее полученную эмульсию дополнительно обрабатывают при помощи погружного зонда (диаметр 19×70 мм) гомогенизатора (В. Braun, США) ГВ-28, проводят ультразвуковое смешивание в режиме: 1 мин; 1,5 мин; 1 мин с двумя перерывами по 1 мин.

Полученный продукт передают на стадию ТП.4.4.

Сведения о видах и количестве в производстве сырья, полупродуктов, отходов и потерь на стадии ТП.4.3. приведены в таблицах 5.9-5.10.

Таблица 5.9 – Израсходовано на стадии ТП.4.3

Наименование	Содержание %	Израсходовано				
		Масса			Объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Сырье: Суспензия L-ДОФА в растворе полимера PLGA 50/50 в хлороформе, в том числе: L-ДОФА Полимер PLGA 50/50 Хлороформ Насыщенный раствор L-ДОФА в 2 % ПВС, в том числе: L-ДОФА ПВС Вода	0,77	4403,0000			~2980	
	3,60	34,0000 436,0000 3933,0000 567,2545 20,4156 10,9367 535,9000			~570	
Итого:		4970,2545				

Таблица 5.10 – Получено на стадии ТП.4.3

Наименование	Содержание %	Получено				
		Масса			Объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Эмульсия типа (вода/масло/вода) в том числе: L-ДОФА Полимер PLGA 50/50 Хлороформ ПВС Вода <u>Потери,</u> в том числе: L-ДОФА Полимер PLGA 50/50 Хлороформ ПВС Вода	1,0546	4967,2400 52,3829 435,0632 3930,4357 10,9301 535,5785 3,0415 0,0327 0,9368 1,7439 0,0066 0,3215			~3500	
Итого:		4970,2545				

Стадия ТП.4.4. Упаривание хлороформа.

Сведения о видах и количестве в производстве сырья, полупродуктов, отходов и потерь на стадии ТП.4.4. приведены в таблицах 5.11-5.12.

Таблица 5.11 – Израсходовано на стадии ТП.4.4

Наименование	Содержание %	Израсходовано				
		Масса			Объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Сырье: Эмульсия типа (вода/масло/вода) в том числе: L-ДОФА Полимер PLGA 50/50 Хлороформ ПВС Вода	1,0546	4967,2400			~3500	
Итого:		4967,2400				

Таблица 5.12 – Получено на стадии ТП.4.4

Наименование	Содержание %	Получено				
		Масса			Объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Суспензия композиции L-ДОФА и PLGA 50/50, в том числе: L-ДОФА Полимер PLGA 50/50 ПВС Вода		978,9165			~960	
<u>Потери</u> в том числе: L-ДОФА Полимер PLGA 50/50 ПВС Вода Хлороформ		1,3239 26,5912 0,3281 29,6446 3930,4357				
Итого:		4967,2400				

Гомогенизат из реактора Р-23 переносят предварительно взвешенную круглодонную колбу Е-29 (емкостью 10 л) через стеклянную воронку с широким горлом. Колбу заполняют примерно на 1/3 часть объема. Колбу Е-29 соединяют с валами роторного испарителя ИР-30 через стеклянную каплеотбойную ловушку, подключают вакуум от мембранного (или водоструйного) вакуумного насоса ВН-32 (на схеме не показан).

После набора вакуума в системе (примерно 0,4 ед.) по вакуумметру ВМ-32а (на схеме не показан) включают вращение вала. Смесь упаривают на роторном испарителе ИР-30 (вакуумирование с помощью водоструйного насоса) в режиме: $t_{\text{комн.}}$ – 30-35 мин; 25 °С (в бане) – 15-20 мин; 35 °С – ~10 мин; 40 °С – ~10 мин. На начальном этапе упаривания (при температуре 25 °С) возможно сильное пенообразование и частичное попадание пены в ловушку и приёмную колбу.

На начальном этапе упаривания хлороформа (при $t_{\text{комн.}}$ и 25 °С) имеет место сильное пенообразование и частичное попадание пены в ловушку и приёмную колбу, поэтому данный этап процесса следует визуальным образом контролировать и, при необходимости, впускать воздух в систему через специальный кран для пеногашения.

Оставшееся количество смеси из реактора Р-23 постепенно доливаем после упаривания. Процесс заканчивают при достижении вакуума 0,93-0,98 ед. по стрелочному манометру и эффекту запотевания ловушки (Кт ТП.4.4). После упаривания хлороформа суспензию композиции L-ДОФА и полимера PLGA 50/50 в колбе Е-29 передают на стадию ТП.4.5, остатки реакционной смеси смывают 40 мл воды очищенной.

Стадия ТП.4.5. Растворение D-Маннитола в воде

Взвешивают в стакане С-18 на весах лабораторных В-4 ($41,00 \pm 0,01$) г D-Маннитола. Помещают на магнитную мешалку М-7. Цилиндром мерным Ц-11 отмеривают ($287,00 \pm 1,00$) мл воды очищенной. При постоянном перемешивании, добавляют воду к D-Маннитолу.

Добавление воды к навеске D-Маннитола осуществляют не менее чем за 1 ч до начала проведения операции смешивания с полученной ранее суспензией ввиду

медленного его растворения.

Сведения о видах и количестве в производстве сырья, полупродуктов, отходов и потерь на стадии ТП.4.5. приведены в таблицах 5.13-5.14.

Таблица 5.13 – Израсходовано на стадии ТП.4.5

Наименование	Содержание %	Израсходовано				
		масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Сырье: D-Маннитол		41,0000				
Вода		287,0000			287	
Итого:		328,0000				

Таблица 5.14 – Получено на стадии ТП.4.5

Наименование	Содержание %	Получено				
		масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Раствор D-Маннитола в воде, в том числе:	12,5	326,5000			~310	
D-Маннитол		40,8125				
Вода		285,6875				
		1,5000				
<u>Потери,</u>		0,1875				
в том числе:		1,3125				
D-Маннитол						
Вода						
Итого:		328,0000				

Стадия ТП.4.6. Фильтрация суспензии и смешивание с D-Маннитолом

Переносят раствор D-Маннитола в колбу Бунзена К-32. Суспензия в колбе Е-29, полученная на стадии ТП.4.4, может содержать крупные частицы, для отделения которых проводят процесс фильтрации через стеклянный фильтр Ф-33 с размером пор 40-100 мкм (пор 111). Фильтр Ф-33 вставлен в верхний шлиф стеклянной насадки Н-34 с отводом. Насадка вставлена в горловину колбы К-32 с раствором D-Маннитола. Фильтрация суспензии осуществляют самотёком, при необходимости систему подключают к вакуумной линии. Объединённый фильтрат собирают в приёмную колбу К-32 (Таблицы 5.15-5.16).

Таблица 5.15 – Израсходовано на стадии ТП.4.6

Наименование	Содержание %	Израсходовано				
		Масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Суспензия композиции L-ДОФА и полимера PLGA 50/50, в том числе: L-ДОФА, Полимер PLGA 50/50 ПВС Вода Раствор D-Маннитола в воде, в том числе: D-Маннитол Вода		978,9165			~960	
		51,0590				
		408,4720				
		10,6020				
		508,7835			~310	
		326,5000				
		40,8125				
		285,6875				
		50.00			50	
Итого:		1355,4165				

Таблица 5.16 – Получено на стадии ТП.4.6

Наименование	Содержание %	Получено				
		Масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	г/моль		
Смесь фильтрата с D-Маннитолом, в том числе: L-ДОФА, Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Вода <u>Потери,</u> в том числе: L-ДОФА, Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Вода		1351,9725			~1300	
		50,9411				
		407,5284				
		10,5775				
		40,7178				
		842,2077				
		3,4440				
		0,1179				
		0.9436				
		0.0245				
		0.0947				
		2.2633				
Итого:		1355,4165				

Остатки содержимого из колбы для упаривания Е-29 смывают 40 мл воды очищенной (по 20 мл на колбу) порциями по 5 мл с помощью дозатора Д-16, направляя промывные воды через фильтр Ф-36 в приёмник К-32. После окончания фильтрования, колбу отсоединяют, переносят на магнитную мешалку М-7.

Раствор D-Маннитола, фильтрат суспензии и промывные воды перемешивают в приёмной колбе К-32 с помощью магнита во фторопластовой оболочке (диаметром 8×45 мм) и магнитной мешалки М-7 в течение 10-15 мин, при 300-400 об/мин, закрыв горловину колбы пластиковой пробкой. Затем магнит для перемешивания извлекают, колбу со смесью взвешивают на весах В-4. Определяют массу смеси в колбе К-32 и используют на стадии ТП.4.7 (Кт ТП.4.6-10). Переносят раствор D-Маннитола в колбу Бунзена К-32. Суспензия в колбе Е-29, полученная на стадии ТП.4.4, может содержать крупные частицы, для отделения которых проводят процесс фильтрования через стеклянный фильтр Ф-33 с размером пор 40-100 мкм (пор 111). Фильтр Ф-33 вставлен в верхний шлиф стеклянной насадки Н-34 с отводом. Насадка вставлена в горловину колбы К-32 с раствором D-Маннитола. Фильтрование суспензии осуществляют самотёком, при необходимости систему подключают к вакуумной линии. Объединённый фильтрат собирают в приёмную колбу К-32. Остатки содержимого из колбы для упаривания Е-29 смывают 40 мл воды очищенной (по 20 мл на колбу) порциями по 5 мл с помощью дозатора Д-16, направляя промывные воды через фильтр Ф-36 в приёмник К-32. После окончания фильтрования, колбу отсоединяют, переносят на магнитную мешалку М-7. Раствор D-Маннитола, фильтрат суспензии и промывные воды перемешивают в приёмной колбе К-32 с помощью магнита во фторопластовой оболочке (диаметром 8×45 мм) и магнитной мешалки М-7 в течение 10-15 мин, при 300-400 об/мин, закрыв горловину колбы пластиковой пробкой. Затем магнит для перемешивания извлекают, колбу со смесью взвешивают на весах В-4. Определяют массу смеси в колбе К-32 и используют на стадии ТП.4.7 (Кт ТП.4.6-10).

Стадия ТП.4.7. Подготовка фильтрата к лиофильному высушиванию (фасовка и замораживание смеси) (Таблицы 5.17-5.18).

Таблица 5.17 – Израсходовано на стадии ТП.4.7

Наименование	Содержание %	Израсходовано				
		Масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	мг/ моль		
Сырье: Смесь фильтрата с D-маннитолом, в том числе: L-ДОФА, Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Вода Банки (с крышками)		1351,9725			~1300	10
Итого:		1351,9725				

Таблица 5.18 – Получено на стадии ТП.4.7

Наименование	Содержание %	Получено				
		Масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	мг/ моль		
Смесь фильтрата с D-маннитолом, (расфасованная и замороженная) в том числе: L-ДОФА, Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Вода <u>Потери,</u> в том числе: Смесь фильтрата с D-Маннитолом, в том числе: L-ДОФА, Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Вода		1349,1075			~135 мл на банку	10
Итого:		1351,8550				

Смесь фильтрата с D-Маннитолом, полученная на стадии ТП.4.6, равномерно дозируется в пластиковые банки (контейнеры) вместимостью 175 мл БК-36 (10

штук), предварительно взвешенные на весах В-4.

Смесь из колбы Е-32 дозируют мерным стаканом С-35 на 200 мл в количестве примерно 135 мл в банки БК-36, помещенные на весы В-4. С помощью дозатора Д-16 доводят массу смеси до требуемого значения ($135,0 \pm 1,0$) г.

Процесс производится в помещении с ламинированным потоком воздуха. Наполненные банки прикрываются завинчивающимися крышками.

Банки БК-36 в количестве 10 шт., наполненные смесью фильтрата с D-Маннитолом, ставят на поддон и помещают для замораживания в морозильник Х-37, при температуре минус (70 ± 2) °С.

Время замораживания не менее 24 ч. Банки БК-36 с замороженной смесью передают на стадию ТП.4.8.

Стадия ТП.4.8. Лиофилизация смеси

Включают охлаждение камер конденсора лиофильной сушки ЛС-38. Банки БК-36 с замороженной смесью со стадии ТП.4.7. вынимают из морозильника Х-37, крышки снимают. Помещают банки на полки лиофильной сушилки ЛС-38. Включают вакуумные насосы ВН-39а (на аппаратурной схеме не показаны). Вакуум в системе поддерживается в пределах 0,02-0,50 мБар.

Процесс высушивания проводится в течение 45-48 ч (Кт ТП.4.8). После завершения процесса лиофилизации вакуумный насос и охлаждение конденсоров отключают, в систему медленно впускают воздух через специальный клапан.

Банки БК-36 с лиофилизатом помещают на поддон, прикрывают крышками и отправляют на стадию ТП.5.

Сведения о видах и количестве в производстве сырья, полупродуктов, отходов и потерь на стадии ТП.4.8. приведены в таблицах 5.19-5.20.

ТП.5 Получение капель назальных

Открывают банки БК-36 с лиофилизированными полимерными частицами с 3,4-дигидрокси-L-фенилаланином в полилактидгликолиде 50/50, переносят в стакан пластиковый С-39 (а) и взвешивают на весах лабораторных В-4. Масло оливковое взвешивают в стакане пластиковом С-39 (б) на весах лабораторных В-4.

Твин-80 взвешивают в стакане С-8 на весах лабораторных В-9. Чашу

реактора Р-40 взвешивают на весах лабораторных В-4. К навеске твина-80 в стакане С-8 из стакана С-43 (б) отливают 30-50 г масла оливкового, перемешивают металлическим шпателем до однородности смеси.

Таблица 5.19 – Израсходовано на стадии ТП.4.8

Наименование	Содержание %	Израсходовано				
		Масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	мг/ моль		
Смесь фильтрата с D-маннитолом, (расфасованная и замороженная) в том числе: L-ДОФА, Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Вода		1349,1075				10
		50,8332				
		406,6647				
		10,5551				
		40,6315				
		840,4231				
Итого:		1349,1075				

Таблица 5.20 – Получено на стадии ТП.4.8

Наименование	Содержание %	Получено				
		Масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	мг/ моль		
АФС ДОФА-ПК, в том числе: L-ДОФА, Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол <u>Потери,</u> в том числе: Вода		508,6844				10
		50,8332				
		406,6647				
		10,5551				
		40,6315				
		840,4231			840,4231	
Итого:		1349,1075				

В чашу реактора Р-40, вместимостью 6000 мл, переносят из стакана С-39 (а) лиофилизированные полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L-фенилаланином в полилактидгликолиде 50/50, закрепляют в основании перемешивающего устройства, опускают якорную мешалку. Стакан С-39 (а) взвешивают. Смесь твина-80 и масла оливкового переносят из стакана С-8, распределяя по всей

поверхности лиофилизированных частиц. Включают мешалку якорную реактора Р-40 со скоростью перемешивания 50-60 об/мин. Перемешивание ведут 5-10 минут, добиваясь равномерного распределения масляной смеси во всем объеме лиофилизированных частиц. Частями из стакана С-39 (б) добавляют оставшееся масло оливковое, тщательно перемешивают до образования однородной массы (Кт ТП.5). Сведения о видах и количестве в производстве сырья, полупродуктов, отходов и потерь на стадии ТП.5 приведены в таблицах 5.21-5.22.

Таблица 5.21 – Израсходовано на стадии ТП.5

Наименование	Содержание %	Израсходовано				
		Масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	мг/ моль		
АФС на основе L-ДОФА, в том числе: Леводопа Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Масло оливковое Твин-80		508,6844				10
		50,8332				
		406,6647				
		10,5551				
		40,6315				
		497,8200				
		11,8200				
Итого:		1017,3244				

Таблица 5.22 – Получено на стадии ТП.5

Наименование	Содержание %	Получено				
		Масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	мг/ моль		
АФС на основе L-ДОФА, в том числе: Леводопа Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Масло оливковое Твин-80 Потерь нет		508,6844				10
		50,8332				
		406,6647				
		10,5551				
		40,6315				
		497,8200				
		11,8200				
Итого:		1017,3244				

УМО.6. Фасовка и упаковка. Сведения представлены в таблицах 5.23-5.24.

Таблица 5.23 – Израсходовано на стадии УМО.6

Наименование	Содержание %	Израсходовано				
		Масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	мг/ моль		
Фармацевтическая субстанция на основе L-ДОФА, в том числе: Леводопа Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Масло оливковое Твин-80	99,9 2,0	508,6844 50,8332 406,6647 10,5551 40,6315 497,8200 11,8200				
Флаконы						100
Итого:		1017,3244г				

Таблица 5.24 – Получено на стадии УМО.6

Наименование	Содержание %	Израсходовано				
		Масса			объём, мл	Кол-во, шт
		г	г основного вещества	мг/ моль		
Флаконы с назальными каплями на основе полилактидных частиц с L-ДОФА в том числе: L-ДОФА, Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Масло оливковое Твин-80 Потери: в том числе: L-ДОФА, Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Масло оливковое Твин-80		1000,0000 50,0000 400,0000 10,0000 40,0000 490,0000 10,0000 17,3244 0,8332 6,6647 0,5551 0,6315 7,8200 1,8200				100
Итого:		1017,3244				

Готовые назальные капли, представляющие собой суспензию L-ДОФА-ПК (полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L-фенилаланином в полилактидгликолиде 50/50 1:9) в растворе твина-80 в масле. Из чаши реактора Р-40 отвешивают на весах -9 с точностью 0,01 г по 10,0 г в стеклянные флаконы Ф-41 Ref.52634 фирмы SGD с винтовой нарезкой, вместимостью 20 мл. Укупоривают крышкой с винтовой резьбой с маслостойкой пипеткой. На каждый флакон с назальными каплями на основе полилактидных частиц с L-ДОФА наносят наименование фирмы – производителя, наименование ЛС, серия, количество. Срок годности маркируется на принтере AlphaJET mondo, Германия (Кт УМО.6). Флаконы с назальными каплями на основе полилактидных частиц с L-ДОФА с инструкцией во вторичной упаковке упаковываются в картонные коробки согласно ГОСТ 17768-90.

Материальный баланс получения назальных капель Дофаминин представлен в таблице 5.25. Перечень важнейших контрольных точек производства представлен в таблице 5.26.

Таблица 5.25 – Материальный баланс

Израсходовано		Получено	
Наименование основного сырья и полупродуктов	Значение, г	Наименование конечного продукта, отходов и потерь	Значение, г
Сырьё и полупродукты		1. Готовая продукция назальные капли на основе полилактидных частиц с L-ДОФА (100 флаконов по 10,0 г)	1000,0
L-ДОФА	54,5000	2. Потери и отходы со стадий ТП. и ВР, в том числе: L-ДОФА Полимер PLGA 50/50 ПВС D-Маннитол Масло оливковое Твин-80 Вода очищенная Хлороформ	4,5000
Полимер PLGA 50/50	436,0000		36,0000
ПВС	11,0000		1,0000
D-Маннитол	41,0000		1,0000
Масло оливковое	497,8200		7,8200
Твин-80	11,8200		1,8200
Вода очищенная	876,0000		876,0000
Хлороформ	3933,0000		3933,0000
Итого	5861,1400	Итого	5861,1400

Таблица 5.26 – Перечень важнейших контрольных точек производства

Наименование стадий, места измерения параметров или отбора проб	Наименование объекта контроля	Наименование контролируемого параметра, единицы измерений	Регламентированный норматив (значение параметра)	Методы и средства контроля	Кто производит контроль и в каком документе регистрируют результаты
Стадия ТП.3.1. Приготовление 2 % раствора поливинилового спирта (ПВС) в воде Кт ТП.3.	Растворение ПВС в воде очищенной	Температура смеси	Нагревание смеси не должно превышать 75°C	Термометрический	Технолог в маршрутной карте
Стадия ТП.4.2. Получение суспензии L-ДОФА в растворе полимера PLGA 50/50 в хлороформе Кт ТП.4.2	Растворение полимера PLGA 50/50 в хлороформе	Однородность смеси	Недопустимо наличие нерастворенных частиц	Визуальный	Технолог в маршрутной карте
Стадия ТП.4.4 Упаривание хлороформе Кт ТП.4.4	Суспензия композиции L-ДОФА и PLGA 50/50	Помутнение смеси	Вакуум 0,93-0,98 ед. Появление воды	Визуальный	Технолог в маршрутной карте
Стадия ТП.4.6. Фильтрование суспензии и смешивание его с D-Маннитолом Кт ТП.4.6	Суспензия D-Маннитола	Масса смеси в колбе	Отсутствие агломератов	Весовой	Технолог в маршрутной карте
Стадия ТП.4.8. Лиофилизация смеси Кт ТП.4.8	Лиофилизат	Получение белой пористой массы	Время сушки. Влажность не более 1 %	Визуальный	Технолог в маршрутной карте
ТП.5 Получение капель назальных Кт ТП.5	Назальные капли	Отсутствие агломератов, видимых частиц	Недопустимо наличие видимых частиц	Визуальный	Технолог в маршрутной карте
УМО. 6. Фасовка и упаковка Кт УМО.6	Готовый продукт	Качество упаковки Качество маркировки	Соответствие НД	Визуальный	Технолог в маршрутной карте

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработана технология получения назальных капель ЛС Дофаминин, включающая в себя на первом этапе образование суспензии L-ДОФА с полимером PLGA 50/50 в дисперсионной среде хлороформа, с последующим эмульгированием в растворе 2 % ПВС, насыщенного L-ДОФА, с дальнейшим упариванием хлороформа, добавлением раствора маннитола и проведением процесса лиофилизации. Второй этап включает получение суспензии ЛФ в растворе твина - 80 и масле оливковом.

2. Разработаны технологическая и аппаратная схемы получения ЛС Дофаминин, которые наглядно отображают последовательность выполнения производственных работ с разделением их по стадиям и операциям технологического процесса, указанием основных материальных потоков (поступление сырья, получение промежуточных продуктов) и мест образования отходов, потерь, систем очистки и утилизации. Выбраны оптимальные технологические режимы и определены контрольные точки, выбрана наиболее удобная упаковка в форме назальных капель.

3. Разработан ОПР производства ЛС Дофаминин, которым завершается отработка новой технологии производства ЛС на опытно-промышленной установке.

ГЛАВА 6. СТРАТЕГИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РАЗРАБАТЫВАЕМОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

Целевой профиль качества для разработанного ЛС Дофаминин включал разработку методик для показателей подлинности и количественного определения АФС ДОФА-ПК в ЛС на основе ДОФА-ПК. Титриметрические методы используются в практике все меньше и меньше для анализа малых молекул, по сравнению с инструментальными методами. При несомненных плюсах титриметрического анализа, таких как простота проведения и дешевая себестоимость анализа, титриметрические методы имеют большое количество недостатков, основными из которых являются низкая селективность или специфичность методик, что приводит к снижению качества анализа. Более того, применение титриметрических методик сопровождается высоким пределом обнаружения. Поэтому в дальнейших исследованиях разработки был выбран инструментальный метод анализа в качестве основного для проведения количественного и качественного определения – ВЭЖХ.

Основываясь на физико-химических свойствах АФС ДОФА-ПК возможно применение детекторов типа УФ, МС или их комбинация. Основной характеристикой, по которой различаются данные детекторы является диапазон определения и чувствительностью метода. МС детекторы обладают более низкими диапазоном определения и чувствительностью, чем оборудование УФ типа, хотя для определения АФС в ЛС требуется большое разведение для попадания в диапазон определения методики. Это может привести к статистической ошибке при пробоподготовке, что может повлиять на качество анализа. Поэтому целесообразно применять различные типы УФ детекторов для количественного определения качества ЛС.

Есть два основных принципа работы детекторов УФ детекторов – снятие полного спектра и снятие экстремумов по определенным точкам. При разработке методик для соединений с неизвестным спектром или при изменении рН среды

целесообразно проводить идентификацию полного УФ спектра. К детекторам, снимающим полный спектр, относится диодноматричный тип (ДМД). В случае наличия идентифицированных экстремумов спектра соединения можно использовать снятие по определенным точкам. Следует отметить, что детектор ДМД обладает большей чувствительностью, чем УФ детектор. По этим причинам при разработке методики подлинности и количественного определения был использован метод ВЭЖХ с диодноматричным детектированием.

6.1 Оценка химико-фармацевтических свойств активной фармацевтической субстанции ДОФА-ПК для разработки методики контроля качества

Для разработки стратегия контроля количественных характеристик качества и подлинности требуется: определение метода анализа ЛС, определение физико-химических свойств объекта исследования, разработка и валидация методики количественного анализа объекта исследования.

Разработанное ЛС Дофаминин содержит в составе АФС, являющуюся фармацевтической композицией на основе 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина (Леводопа) и сополимеров молочной и гликолевой кислот. Согласно структурной формуле, действующее соединение комплекса обладает амфотерными свойствами, так как имеет 2 фенольные группы, 1 гидроксильную и 1 аминогруппу.

Для разработки методики требовалось изучение физико-химических свойств для проведения анализа. Основные химико-фармацевтические характеристики представлены в таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Химико-фармацевтические характеристики L-ДОФА и методы анализа

Параметр	Значение
Молекулярная масса	197,19 г/моль
Растворимость	3,3 мг/мл
Константа распределения октанол/вода LogP [ACD]	-2,92
Константа кислотности pKa [1]	2,32
Константа основности pKb [Chemaxon]	9,06
Характеристическая длина волны	280 нм

Значение константы распределения свидетельствует о преобладании распределения L-ДОФА в водной фракции, что связано с ее хорошей растворимостью в воде. Отношение значений констант кислотности (2,32 и 9,06) отражает амфотерные свойства АФС.

В соответствии с установленными химико-фармацевтическими характеристиками АФС были рассмотрены потенциально возможные методы количественного определения (Таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Потенциально возможные методы количественного определения

Методы количественного определения	
Титриметрические методы	Ацидиметрия в среде ледяной уксусной кислоты Формольное титрование по Сёренсону Метод Кьельдаля
Инструментальные методы	ВЭЖХ СФМ ГХ

6.2 Разработка методики подлинности и количественного определения активной фармацевтической субстанции ДОФА- ПК в лекарственном средстве Дофаминин

Основными характеристиками при разработке методики хроматографического определения являлись скорость потока подвижной фазы, температура термостата колонки и ее характеристика, объем вводимой пробы, температура автосамплера и время хроматографирования. Основное влияние на время удерживания, как и предполагалось, оказывало изменение скорости потока мобильной фазы. Скорость потока была установлена на значении 0,8 мл/мин, при этом значении получались остроконечные пики вещества среди всех измеряемых величин.

Влияние состава мобильной фазы на время удерживания L-ДОФА представлено на рисунке 6.1 из которого видно, что количество ацетонитрила в мобильной фазе вносило существенный вклад на время удерживания основного анализа. Время удерживания L-ДОФА увеличивалось с ростом процента

органического растворителя в мобильной фазе, что характерно для соединений с показателем LogP , составляющим минус 2.92.

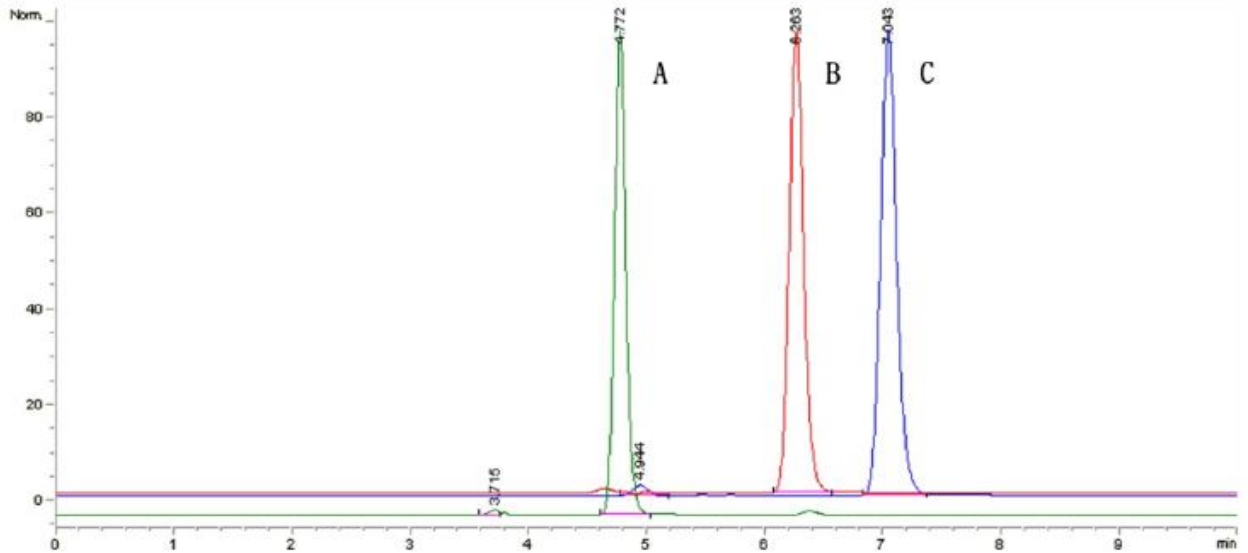


Рисунок 6.1 – Влияние состава мобильной фазы (ацетонитрил: фосфатный буфер) на время удерживания L-ДОФА. (A) 3: 97; (B) 4: 96; (C) 5: 95

Оптимальным соотношением органической и неорганической подвижной фазы было решено выбрать соотношение (C). Также на время удерживания влияет ионизация молекулы L-ДОФА. pH мобильной фазы вносит существенный вклад во время удерживания L-ДОФА. При $\text{pH}=2,3$, молекула L-ДОФА становится положительно заряженной (Рисунок 6.2), в этом случае, сиаловые группы неподвижной фазы также являются положительно заряженными и взаимодействие между ними и L-ДОФА становится более сильным, что позволяет молекуле дольше удерживаться на колонке. Результатом такого взаимодействия является уменьшение скорости элюирования L-ДОФА из хроматографической колонки (Рисунок 6.3).

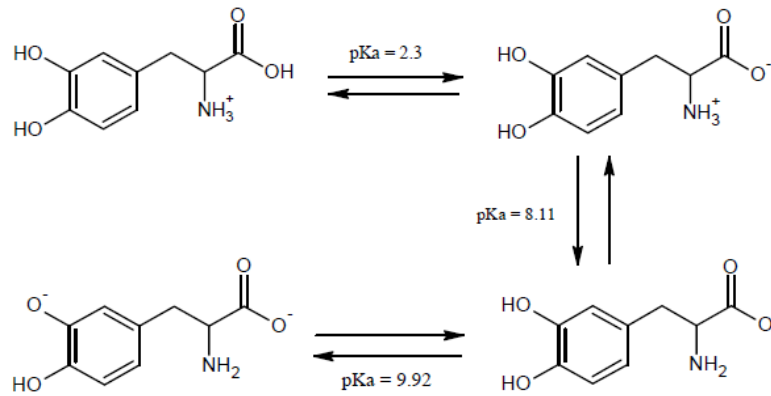


Рисунок 6.2 – Ионизация L-ДОФА при различных рН

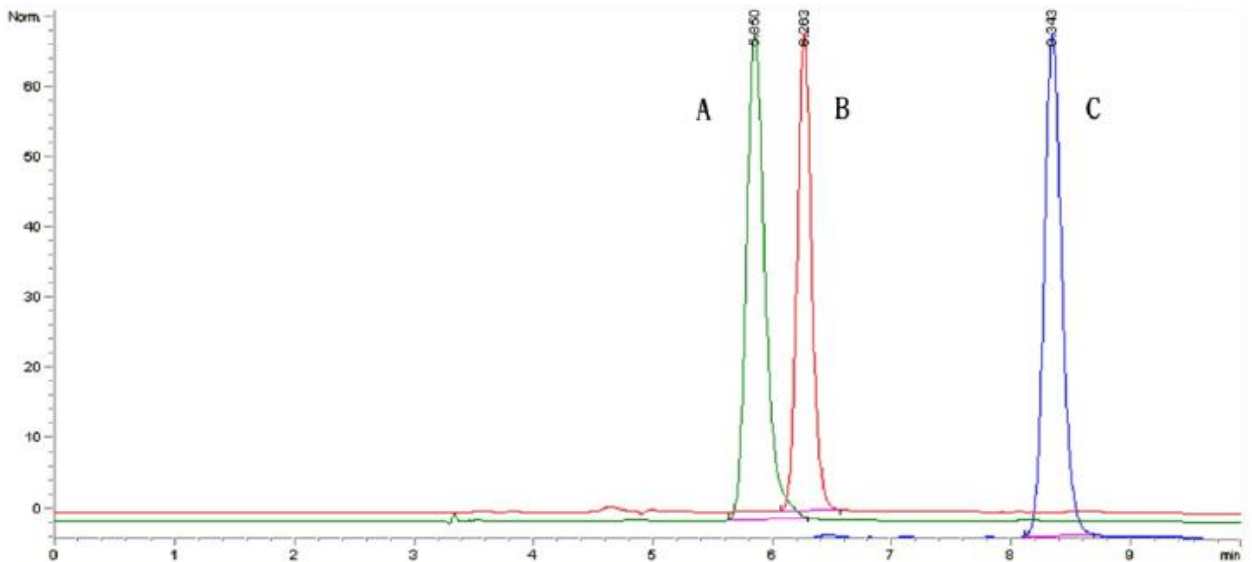


Рисунок 6.3 – Влияние рН мобильной фазы на время удерживания L-ДОФА.

(A) рН=1,5; (B) рН=2,0; (C) рН=2,5

Более того, уменьшение рН мобильной фазы до рН=1,5 приводило к затягиванию пика основного анализата и росту «хвоста». Это предположительно связано с более высокой растворимостью L-ДОФА и более в более кислой среде, что приводило к низкой ионизации фенильных групп в составе молекулы, что приводило к затяжному пику.

Таким образом, оптимальным рН для разделения и разрешения было выбрано рН=2,5.

На основе экспериментальных данных были установлены характеристики и условия методики, которые согласуются с задачами проведения анализа качества L-ДОФА в ЛС.

Условия проведения инструментального исследования представлены в таблице 6.3.

Таблица 6.3 – Условия хроматографирования

Колонка		
Из нержавеющей стали размером 150 мм x 4,6 мм, заполненная сорбентом C18 с размером частиц 5 мкм (типа Zorbax Eclipse XDB-C18 кат. № 993967-902, «Agilent», США или аналогичная);		
Подвижная фаза		
Состоит из смеси подвижной фазы А и В (А-фосфатный буфер, рН=2,54; В- ацетонитрил):		
Время, мин	Раствор А, %	Раствор В, %
0	95	5
18	95	5
22	0	100
35	0	100
Скорость потока подвижной фазы		
0,8 мл/мин		
Температура		
30 °С		
Длина волны		
280 нм		
Объем пробы		
10 мкл		
Температура автосамплера		
4 °С		
Время хроматографирования		
35 мин		

При проведении анализа согласно установленным условиям хроматографирования время удерживания L-ДОФА составляет около 8 мин. Режим градиентного элюирования представлен в таблице 6.4.

Таблица 6.4 – Режим градиентного элюирования

Время, мин	Раствор А, %	Раствор Б, %
0	90	5
18	90	5
22	0	100
35	0	100

На рисунке 6.4 представлен спектр соединения в заданных условиях проведения методики.

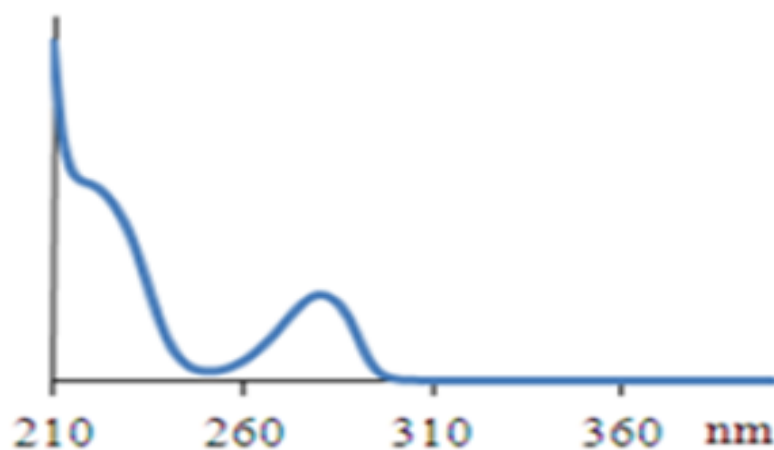


Рисунок 6.4 – Спектр в ультрафиолетовой области АФС L-ДОФА

Для проверки пригодности хроматографической системы проводили анализ стандартного раствора L-ДОФА, получая не менее 5 хроматограмм.

Система считалась пригодной, если выполнялись следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику L-ДОФА, должна быть не менее 2000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика L-ДОФА на повторных хроматограммах стандартного раствора, должно быть не более 2,0 %;
- коэффициент асимметрии пика (Т) L-ДОФА должен быть не более 2,5.

Результаты проверки пригодности хроматографической системы представлены в таблице 6.5, статистической обработки данных представлены в таблицах 6.6 и 6.7.

Таблица 6.5 – Результаты анализа хроматограмм, полученных при тестировании системы

Показатель	№ п/п хроматограммы					RSD, %
	1	2	3	4	5	
Площадь пика L-ДОФА	9319,6	9312,5	9314,0	9312,2	9308,3	0,04
Время удерживания	7,922	7,924	7,844	7,904	7,893	0,28
T	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	-
N	30683	30686	30641	29530	29621	-

Таблица 6.6 – Оценка площади пиков по RSD, %

Детектор	Площадь пика	Среднее значение	SD	RSD, %
ДМД	81,3	81,5	0,01	1,02
	81,6			
	81,6			
	81,5			
	81,5			

Таблица 6.7 – Оценка времени удерживания по RSD, %

Детектор	Время удерживания	Среднее значение	SD	RSD, %
ДМД	7,922	7,897	0,03	0,28
	7,924			
	7,844			
	7,904			
	7,893			

Относительное стандартное отклонение, рассчитанное для пика L-ДОФА, не превышало критерия оценки воспроизводимости методики (не более 2,0 %).

Эффективность хроматографической колонки, коэффициент асимметрии пика и разрешение между пиками находилось в пределах критериев приемлемости (Таблица 6.8).

Таким образом, результаты тестирования хроматографической системы методики определения L-ДОФА демонстрировали ее пригодность для анализа качества АФС в ЛС Дофаминин.

Таблица 6.8 – Показатели тестирования хроматографической системы в методике количественного определения

Показатели качества	Критерий приемлемости	Раствор для пригодности системы
Эффективность хроматографической колонки, N	не менее 2000	35099
Коэффициент асимметрии пика, T	не более 2,5	1,1
RSD (площадь пика), %	не более 2,0 %	1,02
RSD (время удерживания), %	не более 2,0 %	0,28

6.3 Валидация методики контроля качества

Валидация аналитической методики оценки подлинности и количественного определения выполнялась в соответствии с требованиями Решения Коллегии ЕЭК от 17 июля 2018 г. № 113, ГФ РФ, ФЕАЭС по следующим характеристикам: специфичность, правильность, повторяемость, промежуточная прецизионность, линейность, диапазон применения, по результатам которой устанавливалось возможность применения методики для инструментального анализа, разрабатываемого ЛС Дофаминин.

Для проведения процедуры валидации также учитывали требования и рекомендации, указанные в ICH Q6A и руководстве по составлению нормативного документа по качеству ЛС в соответствии с ЕАЭС [70, 74, 76, 71].

Специфичность аналитической методики

Для оценки специфичности требовалось провести анализ L-ДОФА в присутствии компонентов матрицы (примеси, продукты разложения, ингредиенты плацебо) и отсутствии L-ДОФА (только для ингредиентов плацебо и влияния хроматографической системы).

Было решено разделить определение специфичности на 2 этапа: определение примесей, связанных с матрицей (ЛФ) и хроматографической системой, и непосредственно определение специфичности определения L-ДОФА.

На первом этапе происходило определение влияния растворителя, используемого для приготовления образца, и раствора ЛФ «Плацебо», содержащих компоненты ЛФ без АФС.

Результаты представлены на рисунках 6.5 и 6.6.

Полученные хроматограммы в ходе анализа специфичности на первом этапе демонстрировали отсутствие пиков, мешающих анализу подлинности и количественного определения АФС.

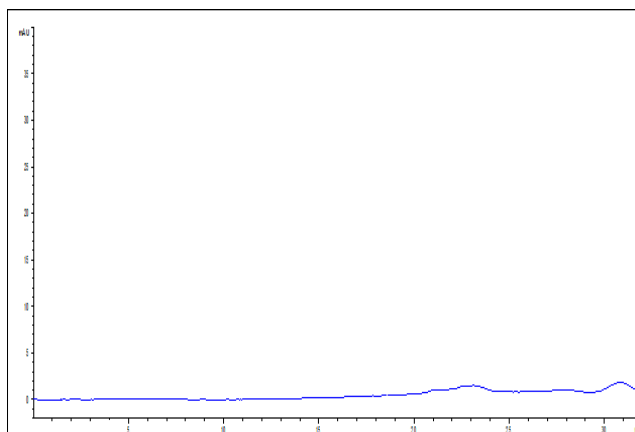


Рисунок 6.5 – Пример хроматограммы раствора ЛФ «Плацебо»

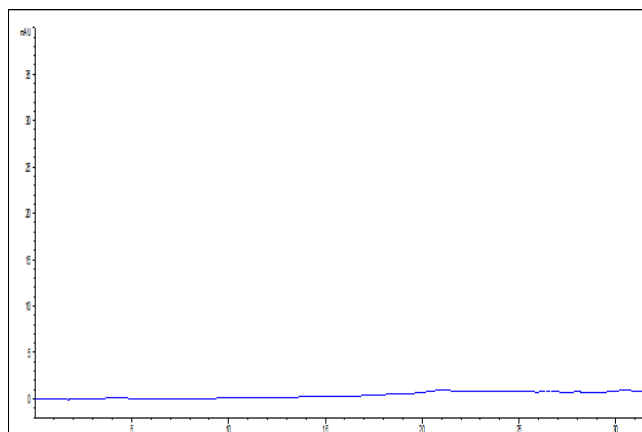


Рисунок 6.6 – Пример хроматограммы растворителя

На следующем этапе проводился анализ стандартных растворов АФС L-ДОФА в 5 повторностях и анализ согласно времени удерживания и площади пиков. Результаты представлены в таблицах 6.9 и 6.10.

Анализ результатов определения стандартных растворов АФС показал, что относительное стандартное отклонение, рассчитанное для пика L-ДОФА, не превышало критерия оценки, который равен 2,0 %.

Повторяемость

На хроматограмме испытуемого ЛС, полученной при количественном определении, время удерживания основного пика должно совпадать со временем удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО L-ДОФА.

Содержание L-ДОФА в ЛС рассчитывали по формуле, представленной в главе 2. Результаты определения валидационной характеристики «Повторяемость» представлены в таблице 6.9. Относительное стандартное отклонение, рассчитанное для пика L-ДОФА, не превышало критерия оценки, который равен 2,0 %.

Таблица 6.9 – Относительное стандартное отклонение количественного содержания и времени удерживания L-ДОФА модельного раствора в количестве равном содержанию в ЛС, выполненные одним химиком

Показатель	Повторы					RSD, %
	1	2	3	4	5	
Средняя площадь пика	10298,9	10155,9	10400,1	9743,4	9573,6	-
Содержание АФС, мг/флакон	2,51	2,48	2,54	2,38	2,34	0,09
Среднее время удерживания, мин	8,113	8,115	8,110	8,124	8,115	0,04

Таблица 6.10 – Относительное стандартное отклонение количественного содержания и времени удерживания L-ДОФА в разных сериях ЛС, выполненные одним химиком

Показатель	Повторы					RSD, %
	1	2	3	4	5	
Лекарственное средство серии № К - 3 масл.2-19052020 -1						
Средняя площадь пика	10955,0	10344,6	9672,7	9787,5	11265,3	-

Продолжение таблицы 6.10

Содержание АФС, мг/флакон	2,68	2,53	2,36	2,39	2,75	0,17
Среднее время удерживания, мин	8,108	8,100	8,127	8,128	8,100	0,01
Лекарственное средство серии № К - 3 масл. 2-19052020 -2						
Средняя площадь пика	10559,7	10494,3	9429,9	11307,7	9392,6	-
Содержание АФС, мг/флакон	2,58	2,56	2,30	2,76	2,29	0,20
Среднее время удерживания, мин	8,112	8,105	8,103	8,121	8,118	0,01
Лекарственное средство серии № К - 3 масл. 2-19052020 -3						
Средняя площадь пика	10192,1	10349,4	9153,4	9759,4	9943,0	-
Содержание АФС, мг/флакон	2,49	2,53	2,24	2,38	2,43	0,11
Среднее время удерживания, мин	8,109	8,107	8,118	8,111	8,104	0,01

Промежуточная прецизионность

Для проведения исследования характеристик требовалось проведение исследования на одном модельном растворе и 3 сериями ЛС.

Результаты исследования представлены в таблицах 6.11 и 6.12.

Таблица 6.11 – Относительное стандартное отклонение количественного содержания и времени удерживания L-ДОФА модельного раствора в количестве равном содержанию в ЛС, выполненные вторым химиком

Показатель	Повторы					RSD, %
	1	2	3	4	5	
Средняя площадь пика	9663,9	9578,2	9623	9939	10076,5	-
Содержание АФС, мг/флакон	2,36	2,34	2,35	2,43	2,46	0,05
Среднее время удерживания, мин	8,143	8,119	8,117	8,117	8,112	0,09

Таблица 6.12 – Относительное стандартное отклонение количественного содержания и времени удерживания L-ДОФА в разных сериях ЛС, выполненные вторым химиком

Показатель	Повторы					RSD, %
	1	2	3	4	5	
Лекарственное средство серии № К – 3 масл. 2-19052020 -1						
Средняя площадь пика	10783,0	10371,5	10770,4	10266,7	11342,6	-
Содержание АФС, мг/флакон	2,63	2,53	2,63	2,51	2,77	0,10
Среднее время удерживания, мин	8,108	8,1	8,127	8,128	8,1	0,01
Лекарственное средство серии № К – 3 масл. 2-19052020 -2						
Средняя площадь пика	9814,8	10780,5	11129,2	10505,5	9139,3	-
Содержание АФС, мг/флакон	2,40	2,63	2,72	2,57	2,23	0,19
Среднее время удерживания, мин	8,112	8,105	8,103	8,121	8,118	0,01
Лекарственное средство серии № К – 3 масл. 2-19052020 -3						
Средняя площадь пика	10910,9	9629,3	10064,9	9723,2	11305,2	-
Содержание АФС, мг/флакон	2,66	2,35	2,46	2,37	2,76	0,18
Среднее время удерживания, мин	8,109	8,107	8,118	8,111	8,104	0,01

Результаты, полученные аналитиком, имеют относительное стандартное отклонение менее 2,0 %. Критерий Фишера (F) использовался для сравнения различных отклонений, полученных для каждого химика. Также была оценена выборка показателей однородности результатов теста, проведенного химиками согласно критериям Стьюдента. Результаты вычислений отражены в таблице 6.13 и 6.14.

Критическое значение Фишера определено по таблице, учитывая доверительный интервал (P) и число степеней свободы (n-1). Табличное значение критерия Фишера $F_{(0,95;5;5)} = 5,05$.

Таблица 6.13 – Оценка результатов определения содержания L-ДОФА статистической обработки при помощи критерия Фишера

Образец	Химик 1 (S^2_1)	Химик 2 (S^2_2)	Критерий Фишера	Критерий Стьюдента
Модельный раствор	0,9342	0,9101	0,3799	0,3659
19052016-NLD-3	0,9694	1,0594	0,3547	0,2514
20052016-NLD-4	0,9136	0,9229	0,9594	0,9397
27052016-NLD-5	0,8913	0,9390	0,3836	0,2922

Таблица 6.14 – Оценка результатов определения содержания L-ДОФА статистической обработки при помощи критерия Фишера

Образец	Химик 1 (S^2_1)	Химик 2 (S^2_2)	Критерий Фишера	Критерий Стьюдента
Модельный раствор	10,8687	10,9604	0,1279	0,3905
19052016-NLD-3	10,9314	10,9576	0,7326	0,3589
20052016-NLD-4	10,9457	10,9909	0,9867	0,0536
27052016-NLD-5	10,9473	10,9571	0,8474	0,1018

Затем с помощью критерия Фишера дисперсии, рассчитанные для каждого результата химика-аналитика, сравнивали со значениями в таблице. Все полученные значения были ниже критического значения критерия Фишера.

Сравнили вычисленные значения критерия Стьюдента с табличным $t_{0,95;10} = 2,23$. Все вычисленные значения не превышают табличного значения. Следовательно, между средним арифметическим значением результатов испытаний 2-х химиков-аналитиков нет значимых различий.

Диапазон определения

Данная методика количественного определения L-ДОФА должна иметь диапазон определения в испытуемых растворах, в интервале 80-120 % от номинальной концентрации, принятой за 100 % [25, 63].

Номинальной концентрацией считается концентрация в исследуемом образце разрабатываемого ЛС Дофаминин.

Предел количественного определения

Так как установленный диапазон определения аналитической методики находится в интервале 70-120 %, было решено взять точки меньше 70 % от номинальной концентрации в ЛС.

Разведение образцов для анализа предела количественного обнаружения представлены в таблице 6.15, а результаты проведения исследования в таблице 6.16.

Таблица 6.15 – Разведение растворов для определения предела количественного обнаружения

Концентрация L-ДОФА на флакон (мг/флакон)	Градуировочная характеристическая точка L-ДОФА согласно графику* (%)
0,25	10
0,5	20
1,0	40
1,5	60

*Примечание. График представлен на рисунке 6.8.

Анализ результатов по характеристике «Предел количественного обнаружения» демонстрирует, что данная методика определения АФС позволяет количественно определить точки от 20 % от номинальной концентрации в ЛС. Данное значение было использован для ограничения нижнего предела диапазона определения методики. Таким образом диапазон определения методики для анализа показателей качества установлен в интервале 20 –120 % от номинальной концентрации в ЛС.

Таблица 6.16 – Результаты количественного определения АФС L-ДОФА

Показатель	Повторы					RSD, %
	1	2	3	4	5	
Концентрация 0,25 мг (10 %)						

Продолжение таблицы 6.16

Средняя площадь пика	1107,1	1156,9	1167,1	1138,0	1145,7	2,00
Среднее время удерживания, мин	8,143	8,119	8,117	8,117	8,112	0,09
Концентрация 0,5 мг (20 %)						
Средняя площадь пика	2334,50	2332,20	2336,30	2351,10	2317,00	0,52
Среднее время удерживания, мин	8,122	8,127	8,133	8,137	8,105	0,02
Концентрация 1,0 мг (40 %)						
Средняя площадь пика	4759,2	4690,7	4718,7	4747,2	4753,8	0,61
Среднее время удерживания, мин	8,128	8,117	8,110	8,134	8,100	0,01
Концентрация 1,5 мг (60 %)						
Средняя площадь пика	6871,6	6844,2	6868,5	6835,9	6848,7	0,23
Среднее время удерживания, мин	8,121	8,106	8,125	8,135	8,114	0,03

Линейность аналитической методики

Для определения линейности аналитической методики готовили 5 калибровочных растворов с заведомо известной концентрацией из стандартного раствора АФС L-ДОФА в заданном интервале от номинальной концентрации ЛС (Таблица 6.17). Анализ результатов проводят по параметру коэффициента корреляции, который должен быть равен 0,99.

Результаты анализа валидационной характеристики «Линейность» представлены в таблице 6.18 и рисунке 6.7.

Таблица 6.17 – Разведение растворов для построения градуировочного графика

Концентрация L-ДОФА на флакон (мг/флакон)	Градуировочная характеристическая точка L-ДОФА согласно графику* (%)
0,5	20
1,0	40
1,5	60
2,0	80
3,0	120

*Примечание. График представлен на рисунке 6.7.

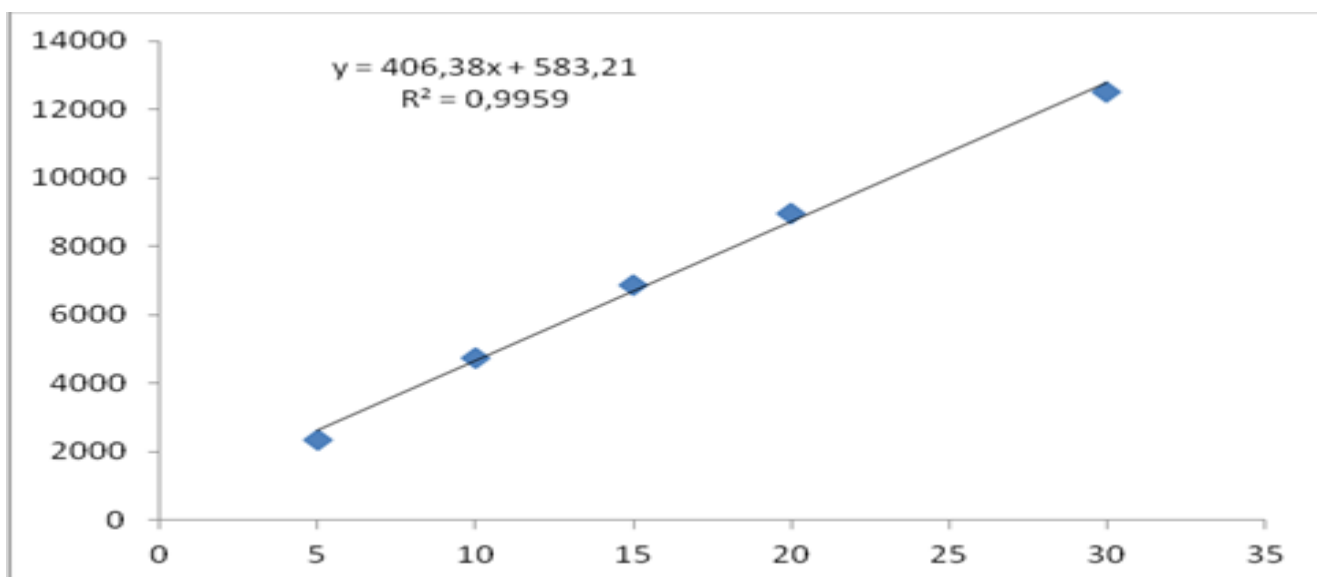


Рисунок 6.7 – График зависимости площади пика от концентрации раствора L-ДОФА

Таблица 6.18 – Результаты вычислений параметров для оценки линейности

№	Градировочная характеристическая точка L-ДОФА согласно графику	Площадь пика	Среднее значение площади пика	Метрологические измерения	
1	20	2334,50	2334,22	$\sum d_i^2$	7,6960
		2332,20		S_x^2	$1,48 \times 10^2$
		2336,30		S_x	12,1444
		2351,10		S_r	0,0052
		2317,00		RSD	0,5203
2	40	4759,2	4733,92	$\sum d_i^2$	23,3760
		4690,7		S_x^2	$8,28 \times 10^2$
		4718,7		S_x	28,7675
		4747,2		S_r	0,0061
		4753,8		RSD	0,6077
3	60	6871,6	6853,8	$\sum d_i^2$	13,0160
		6844,2		S_x^2	$2,42 \times 10^2$
		6868,5		S_x	15,5845
		6835,9		S_r	0,0023

Продолжение таблицы 6.18

		6848,7		RSD	0,2274
4	80	8962,4	8977,14	$\sum d_i^2$	9,3120
		8993,5		S_x^2	$1,45 \times 10^2$
		8981,1		S_x	12,0654
		8968,6		S_r	0,0013
		8980,1		RSD	0,1344
5	120	12516,4	12527,64	$\sum d_i^2$	6,9520
		12521,5		S_x^2	$7,76 \times 10^1$
		12529,6		S_x	8,8115
		12531,9		S_r	0,0007
		12538,8		RSD	0,0703

Для оценки характеристики линейность были вычислены параметры по уравнению функции прямой: $y=k \times x+a$. Определена точка пересечения с осью 406,38.

Согласно рисунку 6.7 градуировочный график имеет линейную зависимость концентрации от площади пика с коэффициентом корреляции 0,9959.

Согласно метрологическим результатам анализа характеристики «Линейность» относительное стандартное отклонение измерений калибровочных растворов не превышает 2,0 %, что отвечает требованиям повторяемости результатов аналитических методик.

Правильность

Анализ характеристики требуется проводить во всем диапазоне определения методики. Анализ характеристики требовалось провести в диапазоне 20 – 120 от номинальной концентрации АФС.

Поэтому было решено выполнить анализ при помощи следующих модельных образцов после пробоподготовки, которые соответствуют калибровочным точкам

20, 60, 100 и 120 от номинальной концентрации АФС. Результаты анализа характеристики представлены в таблицах 6.19 и 6.20.

Согласно таблице 6.19 у всех модельных образцов относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 2 %.

Данные параметрическая характеристика доказывает, что при помощи исследуемой методики возможно получить точные результаты исследований.

Также из таблицы видно, что методика отвечает критериям приемлемости, который является характеристическим параметром правильности.

Результаты проведенного анализа валидационной характеристики «Правильность» позволили считать результаты данной методики истинными.

Таблица 6.19 – Оценка характеристики правильность для модельных растворов

Образец	Площадь пика	Среднее значение площади пика	RSD, %	Содержание L-ДОФА в пробе, мг/флакон	% восстановления	Среднее значение %
МО20	2034,6	2036,40	1,0786	0,4968	99,37	99,46
	2010,7			0,4910	98,20	
	2066,3			0,5046	100,92	
	2013,5			0,4917	98,34	
	2038,9			0,4979	99,58	
	2054,4			0,5017	100,34	
МО60	6260,5	6188,57	1,0068	1,5288	101,92	100,75
	6107,7			1,4915	99,43	
	6199,7			1,5140	100,93	
	6207,8			1,5159	101,06	
	6118,8			1,4942	99,61	
	6236,9			1,5231	101,54	

Продолжение таблицы 6.19

МО100	10204,9	10205,68	0,4058	2,4920	99,68	101,10
	10155,6			2,4800	99,20	
	10280,5			2,5105	100,42	
	10209,4			2,4931	99,73	
	10197,9			2,4903	99,61	
	10185,8			2,4874	99,49	
МО120	12377,4	12355,70	0,4809	3,0226	100,75	100,58
	12302,2			3,0042	100,14	
	12452,4			3,0409	101,36	
	12382,5			3,0238	100,79	
	12314,5			3,0072	100,24	
	12305,2			3,0049	100,16	
Критерий приемлемости (средний % восстановления должен находиться в пределах от 98 до 102 %)						Соответ.

Таблица 6.20 – Результаты вычислений всех метрологических параметров для оценки характеристики повторяемость для калибровочных и модельных растворов

P-p	\bar{A}	S^2x	$\sum di^2$	Sx	SR	RSD, %	Δz
МО20	2036,40	$4,824 \times 10^2$	16,8000	21,9654	0,0108	1,0786	$7,21 \times 10^{-5}$
МО60	6188,57	$3,882 \times 10^3$	50,2111	62,3076	0,0101	1,0068	$2,26 \times 10^{-5}$
МО100	10205,68	$1,715 \times 10^3$	26,1778	41,4155	0,0041	0,4058	$8,82 \times 10^{-6}$
МО120	12355,70	$3,529 \times 10^3$	48,4000	59,4137	0,0048	0,4809	$7,92 \times 10^{-6}$

Результаты проведенной валидации представлены в таблице 6.21.

Таблица 6.21 – Результаты проведенной валидации

Валидационные характеристики	Критерий приемлемости	Полученный результат	Заключение о соответствии
Пригодность хроматографической системы	Относительное стандартное отклонение не более 2 % (площадь пика)	1,02	Соответ.
	Относительное стандартное отклонение не более 2 % (время удерживания)	0,28	Соответ.
	Эффективность хроматографической колонки не менее 2000	35099	Соответ.
	Коэффициент асимметрии пика не более 2,5	1,1	Соответ.
Специфичность	Подтверждение специфичности методики путем доказательства достаточного разделения известных и возможных примесей с основным веществом	Разрешение между пиком основного вещества и пиками продуктов полураспада, пиками примесей более 1,0	Соответ.
Линейность	Для зависимости $Y = a + bx$ коэффициент линейной регрессии $r \geq 0,995$	0,9959	Соответ.
	Пересечение с осью Y должно быть не более 2 % отклика номинальной концентрации	0,21 %	Соответ.
Повторяемость	Величина систематической ошибки при определении степени близости результатов единичных определений количественного содержания основного вещества в АФС RSD не превышает 2,0 %	Серия: К – 3 масл. 2-19052020 -1 RSD = 0,17 % Серия: К – 3 масл. 2-19052020 -2 RSD = 0,20 % Серия К – 3 масл. 2-19052020 -3 RSD = 0,11 %	Соответ.

Продолжение таблицы 6.21

Внутрилабораторная прецизионность	Влияние случайных факторов на количественное определение основного вещества является незначимым, если: Критерий Фишера не превышает 5,05 Критерий Стьюдента не превышает 2,23	Модельный раствор СО		Соответ.
		Критерий Фишера	0,3799	
		Критерий Стьюдента	0,3659	
		Серия К – 3 масл.2-19052020 -1		
		Критерий Фишера	0,3547	
		Критерий Стьюдента	0,2514	
		Серия: К – 3 масл.2-19052020 -2		
		Критерий Фишера	0,9594	
		Критерий Стьюдента	0,9397	
		Серия К – 3 масл. 2-19052020 -3		
		Критерий Фишера	0,3836	
		Критерий Стьюдента	0,2922	

Продолжение таблицы 6.21

Правильность	Правильность определения АФС является незначимой, если: RSD не более 2 % Δz не более 0,0418 Критерий приемлемости находится в пределах 98–102 %	Модельный раствор 90 % концентрации		Соответ.
		RSD	0,4809	
		Δz	$7,92 \times 10^{-6}$	
		Критерий приемлемости находится	100,58	
		Модельный раствор 100 % концентрации		
		RSD	0,4058	
		Δz	$8,82 \times 10^{-6}$	
		Критерий приемлемости	101,10	
		Модельный раствор 120 % концентрации		
		RSD	0,4809	
		Δz	$7,92 \times 10^{-6}$	
		Критерий приемлемости находится	100,58	

6.4 Изучение условий хранения и стабильности лекарственного средства Дофаминин

Изучение показателей качества в экспериментальном исследовании стабильности было проведено в соответствии с разрабатываемой спецификацией на ЛС в установленные сроки. При проведении исследования стабильности руководствовались решением Совета Евразийской экономической комиссии «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций» № 69, требованиями ГФ РФ, ФЕАЭС, рекомендациями ICH Q1A(R2) «Испытания стабильности новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» [12, 13, 24, 72, 76] :

Определение подлинности и количественного содержания АФС ДОФА-ПК проводили в соответствии с разработанной методикой контроля качества. Результаты исследования представлены в таблицах 6.22 и 6.24. Математическая обработка полученных данных отражена в таблицах 6.23 и 6.25. Согласно результатам проведенных исследований установлено, что при температуре хранения 25 ± 5 °С и относительной влажности 60 ± 5 % в климатических камерах у всех образцов ЛС наблюдались отклонения по показателям качества. У серии № К - 2 масл. 1-19052020 наблюдалось отклонение по показателю количественное определение с 6 месяца экспериментального хранения, а затем с 9 месяца хранения по показателю кислотности суспензионного раствора. Также наблюдалось отклонение значений по содержанию родственных примесей на 9 месяце хранения. По результатам оценки показателей качества на всем протяжении хранения при температуре 25 ± 5 °С и относительной влажности 60 ± 5 % серия № К - 3 масл. 2-19052020 отмечалась как более стабильная. Отклонения были выявлены только на 9 месяце хранения по показателям родственные примеси и количественное определение. На 9 месяце хранения у серии № К - 4 масл. 3-19052020 наблюдалось значительное снижение кислотности суспензионного раствора, количественного содержания АФС в ЛС, а также было выявлено превышение содержания родственных примесей. Вероятно, подобное явление у образцов К - 3 масл. и К - 4

масл. связано с фармацевтической несовместимостью вспомогательных веществ с АФС L-ДОФА. Несмотря на выявленные отклонения, для глубины исследований параллельно продолжались экспериментальные исследования хранения всех образцов ЛС в климатических камерах при температуре 5 ± 3 °С. На следующем этапе было необходимо провести расчет срока годности разрабатываемого ЛС. Значение температуры экспериментального хранения ($t_э$) превышает температуру хранения ($t_{хр}$) не менее чем на 10 °С (на 25 °С, $t_э = 5$ °С). С помощью методики расчета, основанной на правиле Вант-Гоффа о росте скоростей химических реакций согласно ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств», использовали среднюю температуру 25 ± 5 °С, в качестве температуры хранения ($t_{хр}$):

$$K = 2,5^{25-5/10} = 2,5^2 = 6,25 \approx 6$$

Согласно полученным данным исследования при хранении в температурном интервале 25 ± 5 °С и относительной влажности 60 ± 5 % у образца ЛС К – 3 масл. были выявлены отклонения от требований проекта спецификации на 9 месяце хранения. Соответственно, хранение ЛС на основе L-ДОФА может осуществляться в течение 6 месяцев при температуре 25 ± 5 °С без отклонения от проекта спецификации. Срок хранения был рассчитан методом «ускоренного старения» при температуре 5 ± 3 °С. 6 месяцев хранения при температуре 25 ± 5 °С составляет 180 суток, следовательно, при температуре 5 ± 3 °С = $180 * 6 = 1080$ суток, что составляет 3 года. Следует отметить, что отклонения показателей качества от проекта спецификации при температуре хранения 25 ± 5 °С у образца ЛС К – 3 масл. наблюдались с 6 месяца, что гарантирует сохранение стабильности ЛС до полугода при нарушении температурного режима в 5 ± 3 °С. Более того, установленный режим хранения в 3 года по результатам экспериментальных исследований для ЛС превышает регламентированные условия хранения на АФС, свидетельствующий о верном подборе качественного и количественного состава вспомогательных веществ и повышении стабильности АФС. Таким образом, оптимальной рекомендуемой температурой хранения ЛС Дофаминин является температура от 2 до 8 °С в течение 3 лет в сухом защищённом от света месте.

Таблица 6.22 – Результаты исследования стабильности

Температурный режим хранения 25 ± 5 °C 60 ± 5 %										
Срок хранения, месяц	Описание	Растворимость	Подлинность	Родственные примеси	Размер частиц	pH суспензии	Содержание воды	Ост. орг. раств.	Кол. определение	Серия, №
		В соответствии с проектом спецификации	Образование суспензии. Растворимо в ДМСО. Плохо растворимо в эфире, спирте 96 %	Совпадение со временем удерживания пика L-ДОФА хроматограммы стандарта	Сумма примесей – не более 1,5 %	Не более 500 нм	От 4,5 до 7,0	Не более 1 %	Хлороформ не более 0,04 %	
0	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,57	Соответ.	Соответ.	4,58	К – 2 масл. 1-19052020
3	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,32	Соответ.	Соответ.	4,51	
6	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Не соответ.	434 (± 10) нм	5,13	Соответ.	Соответ.	3,82	
9	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Не соответ.	440 (± 10) нм	4,24	Соответ.	Соответ.	3,80	

Продолжение таблицы 6.22

Температурный режим хранения 25 ± 5 °С 60 ± 5 %										
Срок хранения, месяц	Описание	Растворимость	Подлинность	Родственные примеси	Размер частиц	pH суспензии	Содержание воды	Ост. орг. раств.	Кол. определение	Серия, №
	В соответствии с проектом спецификации	Образование суспензии. Растворимо в ДМСО. Плохо растворимо в эфире, спирте 96 %	Совпадение со временем удерживания пика L-ДОФА хроматограммы стандарта	Сумма примесей – не более 1,5 %	Не более 500 нм	От 4,5 до 7,0	Не более 1 %	Хлороформ не более 0,04 %	От 4,0 % до 6,0 % (на 100,00 г ЛФ)	
0	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,61	Соответ.	Соответ.	5,65	К – 3 масл. 2-19052020
3	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,27	Соответ.	Соответ.	5,35	
6	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,22	Соответ.	Соответ.	4,35	
9	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Не соответ.	440 (± 10) нм	5,19	Соответ.	Соответ.	3,98	

Продолжение таблицы 6.22

Температурный режим хранения 25 ± 5 °C 60 ± 5 %										
Срок хранения, месяц	Описание	Растворимость	Подлинность ВЭЖХ	Родственные примеси ВЭЖХ	Размер частиц	pH суспензии	Содержание воды	Ост. орг. раств.	Кол. определение	Серия, №
	В соответствии с проектом спецификации	Образование суспензии. Растворимо в ДМСО. Плохо растворимо в эфире, спирте 96 %	Совпадение со временем удерживания пика L-ДОФА хроматограммы стандарта	Сумма примесей – не более 1,5 %	Не более 500 нм	От 4,5 до 7,0	Не более 1 %	Хлороформ не более 0,04 %	От 4,0 % до 6,0 % (на 100,00 г ЛФ)	
0	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,53	Соответ.	Соответ.	5,28	К – 4 масл. 3-19052020
3	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,19	Соответ.	Соответ.	5,09	
6	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,18	Соответ.	Соответ.	4,26	
9	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Не соответ.	440 (± 10) нм	3,18	Соответ.	Соответ.	3,04	

Таблица 6.23 – Статистическая обработка полученных значений

Срок хранения, месяц	pH суспензии	Xcp	Sx	RSD, %	Количественное определение, %	Xcp	Sx	RSD, %	Образец, №	Режим хранения
0	5,73	5,57	0,2014	2,21	4,55	4,58	0,0234	0,51	К – 2 масл. 1-19052020	25 ± 2 °C 60 ± 5 %
	5,55				4,61					
	5,65				4,58					
	5,71				4,59					
	5,23				4,58					
	5,78				4,55					
	5,34				4,57					
	5,67				4,59					
	5,60				4,59					
	5,51				4,59					
3	5,22	5,32	0,0894	1,68	4,40	4,51	0,0714	1,58	К – 2 масл. 1-19052020	25 ± 2 °C 60 ± 5 %
	5,34				4,41					
	5,28				4,58					
	5,44				4,51					

Продолжение таблицы 6.23

	5,45				4,53				
	5,35				4,52				
	5,34				4,52				
	5,23				4,55				
	5,31				4,54				
	5,28				4,55				
6	5,12	5,13	0,0436	0,85	3,91	3,82	0,0374	0,98	
	5,18				3,89				
	5,21				3,87				
	5,16				3,85				
	5,09				3,83				
	5,13				3,81				
	5,11				3,79				
	5,15				3,77				
	5,08				3,75				
	5,14				3,73				

Примечания: $\bar{X}_{ср}$ – среднее значение; S_x – стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение, %.

Продолжение таблицы 6.23

Срок хранения, месяц	рН суспензии	Хср	Sx	RSD, %	Количественное определение, %	Хср	Sx	RSD, %	Серия, №	Режим хранения
9	4,45	4,24	0,0812	1,91	3,82	3,80	0,0158	0,42	К – 2 масл. 1-19052020	$25 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C } 60 \pm 5 \%$
	4,34				3,85					
	4,26				3,81					
	4,31				3,82					
	4,23				3,81					
	4,25				3,81					
	4,28				3,80					
	4,12				3,80					
	4,10				3,79					
	4,12				3,79					
0	5,63	5,61	0,0427	0,76	5,67	5,65	0,0299	0,53	К – 3 масл. 2-19052020	$25 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C } 60 \pm 5 \%$
	5,55				5,65					
	5,65				5,62					
	5,67				5,61					
	5,61				5,69					

Продолжение таблицы 6.23

	5,65				5,65				
	5,61				5,64				
	5,67				5,65				
	5,60				5,66				
	5,51				5,67				
3	5,32	5,27	0,0423	0,80	5,37	5,35	0,0299	0,56	
	5,35				5,35				
	5,25				5,32				
	5,27				5,31				
	5,29				5,39				
	5,24				5,35				
	5,28				5,34				
	5,27				5,35				
	5,26				5,36				
	5,24				5,37				

Продолжение таблицы 6.23

Срок хранения, месяц	pH суспензии	Хср	Sx	RSD, %	Количественное определение, %	Хср	Sx	RSD, %	Серия, №	Режим хранения
6	5,31	5,22	0,0539	1,03	4,37	4,35	0,0299	0,69	К – 3 масл. 2-19052020	$25 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C } 60 \pm 5 \%$
	5,30				4,35					
	5,20				4,32					
	5,22				4,31					
	5,19				4,39					
	5,20				4,35					
	5,21				4,34					
	5,17				4,35					
	5,26				4,36					
	5,22				4,37					
9	5,21	5,19	0,0117	0,23	4,07	3,98	0,0374	0,94	К – 3 масл. 2-19052020	$25 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C } 60 \pm 5 \%$
	5,22				4,05					
	5,19				4,03					
	5,20				4,01					

Продолжение таблицы 6.23

	5,19				3,99				
	5,20				3,97				
	5,19				3,95				
	5,17				3,93				
	5,16				3,91				
	5,19				3,89				
0	5,65	5,53	0,1860	3,36	5,37	5,28	0,0363	0,71	К – 4 масл. 3-19052020
	5,53				5,35				
	5,60				5,33				
	5,48				5,31				
	5,23				5,29				
	5,78				5,27				
	5,34				5,25				
	5,67				5,23				
	5,55				5,21				
	5,51				5,19				

Продолжение таблицы 6.23

Срок хранения, месяц	pH суспензии	Xcp	Sx	RSD, %	Количественное определение, %	Xcp	Sx	RSD, %	Серия, №	Режим хранения
3	5,25	5,19	0,0242	0,47	5,17	5,09	0,0374	0,73	К – 4 масл. 1-19052020	25 ± 2 °C 60 ± 5 %
	5,22				5,15					
	5,19				5,13					
	5,20				5,11					
	5,19				5,09					
	5,23				5,07					
	5,15				5,08					
	5,17				5,08					
	5,16				5,01					
	5,15				5,05					
6	5,15	5,18	0,0280	0,54	4,30	4,26	0,0294	0,69	К – 4 масл. 1-19052020	25 ± 2 °C 60 ± 5 %
	5,22				4,26					
	5,19				4,22					
	5,20				4,24					
	5,19				4,28					
	5,23				4,28					

Продолжение таблицы 6.23

	5,15				4,26				
	5,17				4,27				
	5,16				4,26				
	5,15				4,28				
9	3,15	3,18	0,0280	0,88	3,97	3,96	0,0301	0,76	
	3,22				3,95				
	3,19				4,03				
	3,20				3,95				
	3,19				3,99				
	3,23				3,97				
	3,15				3,96				
	3,17				3,93				
	3,16				3,95				
	3,15				3,95				

Таблица 6.24 – Результаты исследования стабильности

Температурный режим хранения $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$										
Срок хранения, месяц	Описание	Растворимость	Подлинность	Родственные примеси	Размер частиц	рН суспензии	Содержание воды	Ост. орг. раств.	Кол. определе-ние	Серия, №
	В соответствии с проектом спецификации	Образование суспензии. Растворимо в ДМСО. Плохо растворимо в эфире, спирте 96 %	Совпадение со временем удерживания пика L-ДОФА хроматограммы стандарта	Сумма примесей – не более 1,5 %	Не более 500 нм	От 4,5 до 7,0	Не более 1 %	Хлороформ не более 0,04 %	От 4,0 % до 6,0 % (на 100,00 г. ЛФ)	
0	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,57	Соответ.	Соответ.	4,58	К – 2 масл. 1-19052020
3	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,32	Соответ.	Соответ.	4,51	
6	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,13	Соответ.	Соответ.	4,15	
9	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	440 (± 10) нм	5,10	Соответ.	Соответ.	3,80	
12	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Не соответ.	434 (± 10) нм	4,24	Соответ.	Соответ.	3,77	

Продолжение таблицы 6.24

Температурный режим хранения 5 ± 3 °С										
Срок хранения, месяц	Описание	Растворимость	Подлинность	Родственные примеси	Размер частиц	рН суспензии	Содержание воды	Ост. орг. раств.	Кол. определе-ние	Серия, №
	В соответствии с проектом спецификации	Образование суспензии. Растворимо в ДМСО. Плохо растворимо в эфире, спирте 96 %	Совпадение со временем удерживания пика L-ДОФА хроматограммы стандарта	Сумма примесей – не более 1,5 %	Не более 500 нм	От 4,5 до 7,0	Не более 1 %	Хлороформ не более 0,04 %	От 4,0 % до 6,0 % (на 100,00 г. ЛФ)	
0	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,61	Соответ.	Соответ.	5,65	К – 3 масл. 2-19052020
3	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,27	Соответ.	Соответ.	5,58	
6	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,22	Соответ.	Соответ.	5,53	
9	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	440 (± 10) нм	5,18	Соответ.	Соответ.	5,47	
12	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,18	Соответ.	Соответ.	5,45	
18	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,18	Соответ.	Соответ.	5,45	
24	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,18	Соответ.	Соответ.	5,45	

Продолжение таблицы 6.24

Температурный режим хранения 5 ± 3 °С										
Срок хранения, месяц	Описание	Растворимость	Подлинность	Родственные примеси	Размер частиц	рН суспензии	Содержание воды	Ост. орг. раств.	Кол. определе-ние	Серия, №
	В соответствии с проектом спецификации	Образование суспензии. Растворимо в ДМСО. Плохо растворимо в эфире, спирте 96 %	Совпадение со временем удерживания пика L-ДОФА хроматограммы стандарта	Сумма примесей – не более 1,5 %	Не более 500 нм	От 4,5 до 7,0	Не более 1 %	Хлороформ не более 0,04 %	От 4,0 % до 6,0 % (на 100,00 г. ЛФ)	
0	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,53	Соответ.	Соответ.	5,28	К – 4 масл. 3-19052020
3	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,19	Соответ.	Соответ.	5,09	
6	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	434 (± 10) нм	5,18	Соответ.	Соответ.	4,26	
9	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	440 (± 10) нм	3,18	Соответ.	Соответ.	3,04	

Таблица 6.25 – Статистическая обработка полученных значений

Срок хранения, месяц	pH суспензии	Xcp	Sx	RSD, %	Количественное определение, %	Xcp	Sx	RSD, %	Серия, №	Режим хранения
0	5,72	5,57	0,2014	2,21	4,55	4,58	0,0234	0,51	К – 2 масл. 1-19052020	5 ± 3 °C
	5,55				4,61					
	5,63				4,58					
	5,71				4,59					
	5,23				4,58					
	5,78				4,55					
	5,34				4,57					
	5,67				4,59					
	5,60				4,59					
	5,51				4,59					
3	5,21	5,32	0,0894	1,68	4,40	4,51	0,0714	1,58	К – 2 масл. 1-19052020	5 ± 3 °C
	5,33				4,41					
	5,28				4,58					
	5,44				4,51					
	5,45				4,53					

Продолжение таблицы 6.25

	5,35				4,52				
	5,34				4,52				
	5,23				4,55				
	5,31				4,54				
	5,28				4,55				
6	5,11	5,13	0,0436	0,85	4,16	4,15	0,0089	0,22	
	5,15				4,15				
	5,20				4,14				
	5,16				4,15				
	5,09				4,14				
	5,13				4,16				
	5,11				4,15				
	5,15				4,17				
	5,08				4,15				
	5,14				4,14				

Примечания: $\bar{X}_{ср}$ – среднее значение; S_x – стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение, %.

Продолжение таблицы 6.25

Срок хранения, месяц	pH суспензии	X _{ср}	S _x	RSD, %	Количественное определение, %	X _{ср}	S _x	RSD, %	Серия, №	Режим хранения
9	5,10	5,10	0,0121	0,24	3,82	3,80	0,0158	0,42	К – 2 масл. 1-19052020	5 ± 3 °С
	5,11				3,85					
	5,11				3,81					
	5,09				3,82					
	5,08				3,81					
	5,09				3,81					
	5,10				3,80					
	5,12				3,80					
	5,10				3,79					
	5,10				3,79					
12	4,45	4,24	0,0812	1,91	3,72	3,77	0,0428	1,13	К – 2 масл. 1-19052020	5 ± 3 °С
	4,34				3,75					
	4,26				3,78					
	4,31				3,82					
	4,23				3,82					
	4,25				3,82					

Продолжение таблицы 6.25

	4,28				3,82					
	4,12				3,74					
	4,10				3,75					
	4,12				3,77					
0	5,63	5,61	0,0427	0,76	5,67	5,65	0,0299	0,53	К – 3 масл. 2-19052020	5 ± 3 °C
	5,55				5,65					
	5,65				5,62					
	5,67				5,61					
	5,61				5,69					
	5,65				5,65					
	5,61				5,64					
	5,67				5,65					
	5,60				5,66					
	5,51				5,67					

Продолжение таблицы 6.25

Срок хранения, месяц	pH суспензии	Xcp	Sx	RSD, %	Количественное определение, %	Xcp	Sx	RSD, %	Серия, №	Режим хранения
3	5,32	5,27	0,0423	0,80	5,57	5,58	0,0299	0,56		
	5,35				5,55					
	5,25				5,62					
	5,27				5,61					
	5,29				5,60					
	5,24				5,55					
	5,28				5,54					
	5,27				5,55					
	5,26				5,56					
	5,24				5,57					
6	5,31	5,22	0,0539	1,03	5,52	5,53	0,0152	0,27	К – 3 масл. 2-19052020	5 ± 3 °C
	5,30				5,54					
	5,20				5,52					
	5,22				5,54					
	5,19				5,53					

Продолжение таблицы 6.25

	5,20				5,56				
	5,21				5,56				
	5,17				5,52				
	5,26				5,53				
	5,22				5,54				
9	5,19	5,18	0,0075	0,15	5,49	5,47	0,0186	0,34	
	5,20				5,48				
	5,19				5,47				
	5,20				5,44				
	5,19				5,49				
	5,18				5,47				
	5,19				5,49				
	5,15				5,48				
	5,16				5,49				
	5,19				5,49				

Продолжение таблицы 6.25

Срок хранения, месяц	pH суспензии	Xcp	Sx	RSD, %	Количественное определение, %	Xcp	Sx	RSD, %	Серия, №	Режим хранения
12	5,19	5,18	0,0075	0,15	5,45	5,45	0,0117	0,21	К – 3 масл. 2-19052020	5 ± 3 °С
	5,20				5,44					
	5,19				5,43					
	5,20				5,44					
	5,19				5,42					
	5,18				5,45					
	5,19				5,49					
	5,15				5,48					
	5,16				5,49					
	5,19				5,49					
18	5,19	5,18	0,0075	0,15	5,45	5,45	0,0117	0,21	К – 3 масл. 2-19052020	5 ± 3 °С
	5,20				5,44					
	5,19				5,43					
	5,20				5,44					
	5,19				5,42					

Продолжение таблицы 6.25

	5,18				5,45				
	5,19				5,49				
	5,15				5,48				
	5,16				5,49				
	5,19				5,49				
24	5,19	5,18	0,0075	0,15	5,45	5,45	0,0117	0,21	
	5,20				5,44				
	5,19				5,43				
	5,20				5,44				
	5,19				5,42				
	5,18				5,45				
	5,19				5,49				
	5,15				5,48				
	5,16				5,49				
	5,19				5,49				

Продолжение таблицы 6.25

Срок хранения, месяц	pH суспензии	Xcp	Sx	RSD, %	Количественное определение, %	Xcp	Sx	RSD, %	Серия, №	Режим хранения
0	5,65	5,53	0,1860	3,36	5,37	5,28	0,0363	0,71	К – 4 масл. 3-19052020	5 ± 3 °C
	5,53				5,35					
	5,60				5,33					
	5,48				5,31					
	5,23				5,29					
	5,78				5,27					
	5,34				5,25					
	5,67				5,23					
	5,55				5,21					
	5,51				5,19					
3	5,25	5,19	0,0242	0,47	5,17	5,09	0,0374	0,73	К – 4 масл. 3-19052020	5 ± 3 °C
	5,22				5,15					
	5,19				5,13					
	5,20				5,11					
	5,19				5,09					

Продолжение таблицы 6.25

	5,23				5,07				
	5,15				5,08				
	5,17				5,08				
	5,16				5,01				
	5,15				5,05				
6	5,15	5,18	0,0280	0,54	4,30	4,26	0,0294	0,69	
	5,22				4,26				
	5,19				4,22				
	5,20				4,24				
	5,19				4,28				
	5,23				4,28				
	5,15				4,26				
	5,17				4,27				
	5,16				4,26				
	5,15				4,28				

Продолжение таблицы 6.25

Срок хранения, месяц	pH суспензии	Xcp	Sx	RSD, %	Количественное определение, %	Xcp	Sx	RSD, %	Серия, №	Режим хранения
9	3,15	3,18	0,0280	0,88	3,07	3,05	0,0210	0,76	К – 4 масл. 3-19052020	5 ± 3 °C
	3,22				3,05					
	3,19				3,03					
	3,20				3,55					
	3,19				3,09					
	3,23				3,07					
	3,15				3,06					
	3,17				3,03					
	3,16				3,05					
	3,15				3,05					

6.5 Разработка проекта нормативного документа по качеству лекарственного средства Дофаминин

Проект нормативного документа по качеству (НД) на лекарственное средство Дофаминин был составлен впервые в соответствии с требованиями Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата», ГФ РФ, Европейской фармакопеи, Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения», а также Руководства ICH «Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A» («Спецификации: аналитические методики и критерии приемлемости новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов: химические вещества»). Также были учтены нормативные требования решения ЕАЭС «О руководства по составлению документации по химическому и фармацевтическому качеству для исследуемых лекарственных средств, применяемых в клинических исследованиях» от 27.12.2022 № 49 и ФЕАЭС для многоуровневой подготовки стратегии контроля качества [12, 13, 18, 62, 70, 74, 76].

Разработанное лекарственное средство Дофаминин представляет собой суспензионную композицию, поэтому необходимо придерживаться требованиям, установленным ГФ РФ ОФС «Суспензии». В соответствии с требованиями ГФ РФ предложены следующие испытания: описание, рН, размер частиц, седиментационная устойчивость, вязкость, маркировка, однако оговорено, что определение вязкости должно быть предусмотрено для суспензий, если в их состав входят вещества, увеличивающие вязкость. В ЕФ [18] включена монография «Оливковое масло очищенное», которая содержит следующие показатели качества (нормы): Описание; Растворимость; Относительная плотность; Подлинность; Испытания:

- кислотное число (норма: не более 0,3);

- перекисное число (норма: не более 10,0);
- неомыляемые вещества (норма: не более 1,5 %);
- щелочные примеси;
- удельный показатель поглощения (не более 1,2 при длине волны 270 нм);
- состав жирных кислот;
- стеролы;
- кунжутное масло;
- вода (норма: не более 0,1 %).

Для включения в проект спецификации были выбраны следующие испытания (показатели качества):

- Описание;
- Подлинность;
- Масса содержимого упаковки;
- Однородность дозирования;
- Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света;
- Седиментационная устойчивость;
- pH;
- Микробиологическая чистота;
- Количественное определение;
- Кислотное число;
- Перекисное число;
- Упаковка;
- Маркировка;
- Условия хранения;
- Срок годности.

Проект разработанной спецификации на ЛС представлен в Таблице 6.26.

Таблица 6.26 – Проект спецификации на ЛС Дофаминин

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Органолептический, визуальный ГФ РФ ФЕАЭС 2.5.1.1. Лекарственные формы	Масляная суспензия светло-желтого цвета, без запаха
Подлинность	ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0005 ВЭЖХ ФЕАЭС 2.1.2.28. ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора L-ДОФА
Масса содержимого упаковки	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007 Масса (объем) содержимого упаковки ФЕАЭС 2.1.9.17. Масса (объем) содержимого упаковки	Среднее значение массы 10 упаковок должна быть не менее указанной на этикетке. Масса содержимого каждой отдельной упаковки должна быть не менее 90 % от указанного на этикетке
Однородность дозирования	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0008 Однородность дозирования, способ 1 ФЕАЭС 2.1.9.14. Однородность дозированных единиц	Результат испытания признается удовлетворительным, если при n=10 первый показатель приемлемости AV (%) $AV \leq 15\%$
Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0008 Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света	Не менее 90 % основной фракции частиц должны быть размером не более 500 нм
Седиментационная устойчивость	ГФ РФ ОФС.1.4.1.0014 Суспензии ФЕАЭС 2.5.1.33. Суспензии	Энергично встряхивают и помещают в мерный цилиндр; не должно наблюдаться седиментации и образования агломератов в течение 2-3 мин
pH	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004 метод потенциометрического определения pH ФЕАЭС 2.1.2.47. Потенциометрическое определение концентрации ионов с использованием ионоселективных электродов	От 4,5 до 7,0
Микробиологическая чистота	ГФ РФ ОФС.1.2.4.0002 Микробиологическая чистота	Категория 2.2

Продолжение таблицы 6.26

Показатели	Методы	Нормы
Количественное определение	ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0005 ВЭЖХ ФЕАЭС 2.1.2.28. ВЭЖХ	От 4,0 до 6,0 %
Кислотное число	ГФ РФ ОФС.1.2.3.0004 Кислотное число ФЕАЭС 2.1.5.1. Кислотное число	Не более 0,5
Переокисное число	ГФ РФ ОФС.1.2.3.0007 Переокисное число, метод 1 ФЕАЭС 2.1.5.5. Пероксидное число	Не более 10,0
Упаковка	Флакон из химически индифферентного пластика – полиэтилентерефталата с навинчивающейся крышкой. Масса содержимого флакона составляет 10,0 г, 200 доз.	
Маркировка	На каждый флакон наклеивается этикетка. На этикетке (первичной упаковки) указывают наименование лекарственного препарата, номер серии, срок годности, количество, наименование производителя. На вторичной (потребительской) упаковке указывают наименование лекарственного препарата, наименование производителя, номер серии, номер регистрационного удостоверения, срок годности, способ применения, количество, лекарственная форма, условия отпуска, условия хранения, предупредительные надписи.	
Хранение	В сухом защищённом от света месте при температуре от +2 до +8 °С.	
Срок годности	3 года	

6.6 Выбор упаковки лекарственного средства Дофаминин

Для выбора упаковки ЛС Дофаминин необходимо было провести тестирование производительности укупорочной системы с дозирующим устройством. Выбор системы доставки, а, следовательно, и упаковки был обусловлен реологическими свойствами ЛФ – равномерностью и скоростью дозирования, оценкой геометрии площади распределения. Состав разработанной ЛФ представляет собой масляную суспензию, что позволяет его использовать в качестве системы дозирования в виде назальных капель или спрея (Рисунок 6.8).

В результате проведенных исследований были подобраны оптимальные флаконы требуемой формы, размера и материала изготовления для ЛС Дофаминин. Набор флаконов одинаковой вместимости, но с различной геометрией и дозирующим устройством заполняли равным объемом суспензии ЛФ.

Упаковка ЛС назальных капель подбиралась на основе расчета веса 1 капли, формирующейся при нажатии на первичную тару из дозирующего устройства флаконов, изготовленных из химически индифферентного пластика – полиэтилентерефталата. Выбор формы упаковки ЛС в виде назального спрея осуществлялся на основе количества дозы, формирующейся при нажатии на устройство спрея. Масса содержимого флакона составляет 10,0 г, что соответствует 200 дозам ЛС Дофаминин.



Рисунок 6.8 – Флакон ЛС Дофаминин, 200 доз

Так как поверхностное натяжение является основным свойством любой границы раздела жидкость–газ, то решающим параметром при работе с поверхностями и/или искривленными границами раздела фаз, является капиллярное давление. В наиболее распространенной макроскопической модели системы жидкость–пар, находящейся в равновесии (модель Гиббса), полная свободная энергия системы представляет собой сумму свободных энергий двух объемных фаз и избыточной свободной энергии. С микроскопической точки зрения молекулы вблизи поверхности жидкости испытывают большее притяжение к объему, чем к газу. Поскольку взаимодействия любой молекулы на границе раздела с конденсированной фазой более сильные (чем с газовой фазой), межфазное натяжение имеет меньшие значения по сравнению с поверхностным натяжением.

Жидкости разной природы имеют различную величину поверхностного натяжения и при стекании с одной и той же каплеобразующей системы формируют

капли разной массы. Микромеханика каплеобразования заключается в медленном стекании жидкости с поверхности. Капли в момент отрыва от каплеобразующей поверхности принимают грушеобразную форму. Диаметр шейки в момент отрыва капли всегда оказывается несколько меньшим, чем диаметр каплеобразующей поверхности. В результате проведенных исследований по разработке упаковки дозирующего устройства для ЛС Дофаминин выбор был сделан в пользу назальных капель, которые больше концентрируются в обонятельной области по сравнению с назальными спреями, что формирует их более высокие значения биодоступности АФС всасывания непосредственно в ЦНС.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Проведена оценка химико-фармацевтических свойств АФС ДОФА-ПК для разработки методики контроля качества. Значение константы распределения свидетельствовало о преобладании распределения L-ДОФА в водной фракции, что было связано с ее хорошей растворимостью в воде. В соответствии с установленными физико-химическими характеристиками АФС были рассмотрены потенциально возможные методы количественного определения.

2. При разработке методики подлинности и количественного определения АФС ДОФА-ПК в ЛС Дофаминин был выбран и использован метод ВЭЖХ с диодноматричным детектированием. Основными характеристиками при разработке методики хроматографического определения являлись скорость потока подвижной фазы, температура термостата колонки, объем вводимой пробы, температура автосамплера, время хроматографирования, характеристика колонки. Основное влияние на время удерживание оказывало изменение скорости потока мобильной фазы. Скорость потока была установлена на значении 0,8 мл/мин, при этом значении получались остроконечные пики, что соответствовало критерию приемлемости для оценки степени эффективности.

3. Проведена валидация данной методики. Валидация аналитической методики оценки подлинности и количественного определения выполнялась в

соответствии с требованиями Решения Коллегии ЕЭК № 113, ГФ РФ, ФЕАЭС по следующим характеристикам: специфичность, правильность, повторяемость, промежуточная прецизионность, линейность, диапазон применения, по результатам которой устанавливалось возможность применения методики для инструментального анализа, разрабатываемого ЛС Дофаминин.

4. Оценка стабильности образцов была проведена в температурном режиме хранения как при 5 ± 3 °С, так и при 25 ± 5 °С, относительная влажность при этом составляла 60 ± 5 %. В процессе исследований по изучению стабильности была проведена оценка показателей качества образцов. По результатам оценки показателей качества на всем протяжении хранения при температуре 25 ± 5 °С и относительной влажности 60 ± 5 % образец серии № К-3 масл. 2-19052020 отмечался как более стабильный. В условиях пониженного температурного режима хранения все образцы ЛС были более стабильны, по сравнению с результатами аналогичных исследований при температуре 25 ± 5 °С. Оптимальной рекомендуемой температурой хранения ЛС Дофаминин является температура от 2 до 8 °С в течение 3 лет в сухом защищённом от света месте.

5. Разработан проект нормативного документа по качеству на ЛС Дофаминин в соответствии с требованиями Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии № 151.

6. Для выбора упаковки ЛС Дофаминин необходимо было провести тестирование производительности укупорочной системы с дозирующим устройством. Выбор системы доставки, а, следовательно, и упаковки был обусловлен реологическими свойствами ЛФ – равномерностью и скоростью дозирования, оценкой геометрии площади распределения. В результате проведенных исследований по разработке упаковки дозирующего устройства для ЛС Дофаминин выбор был сделан в пользу назальных капель, которые больше концентрируются в обонятельной области по сравнению с назальными спреями, что формирует их более высокие значения биодоступности АФС всасывания непосредственно в ЦНС.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Анализ уровня разработок ЛС, ориентированных на лечение болезни Паркинсона, демонстрирует продолжающийся интерес к разработке лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний, при этом «Золотым стандартом» на протяжении многих лет остаются ДОФА-содержащие средства. Существующие лекарственные формы Леводопы имеют ряд недостатков, приводящих к необходимости многократного введения лекарственного препарата, что требует поиска и разработки альтернативных путей доставки и введения лекарственного вещества. Для разработки перспективной полимер содержащей наносомальной ЛФ, позволяющей обеспечить биосовместимость, контролируемое высвобождение и необходимую биодоступность, был предложен дизайн исследований, предусматривающий все необходимые этапы фармацевтической разработки с разработкой стратегии контроля и последующим масштабированием технологии.

2. С целью разработки состава лекарственного средства были изучены необходимые физико-химические характеристики АФС ДОФА-ПК; разработана модельная система поверхности назального эпителия *in vitro*; методики высвобождения ЛС *in vitro*; проведена оценка совместимости компонентов и изучены возможные родственные примеси, образующиеся в процессе хранения; установлен целевой профиль качества разрабатываемого лекарственного средства, определены его структура, способ доставки, эффективность в отношении основных симптомов заболевания, путь введения, уровень ЛД₅₀, безопасность; изучены физико-химические характеристики полимерной композиции ДОФА-ПК и определены показатели качества. Готовые назальные капли представляют собой суспензию L-ДОФА-ПК (полимерные частицы с 3,4-дигидрокси-L-фенилаланином в полилактидгликолиде 50/50 1:9) в растворе твина-80 в масле оливковом.

3. Разработана технология получения назальных капель ЛС Дофаминин, включающая в себя образование суспензии L-ДОФА с полимером PLGA 50/50 в дисперсионной среде хлороформа, с последующим эмульгированием в растворе

2 % ПВС, насыщенного L-ДОФА, с дальнейшим упариванием хлороформа, добавлением раствора маннитола и проведением процесса лиофилизации, получение суспензии ЛФ в растворе твина-80 и масле оливковом. Разработаны технологическая и аппаратная схемы получения ЛС Дофаминин, которые наглядно отображают последовательность выполнения производственных работ с разделением их по стадиям и операциям технологического процесса, указанием основных материальных потоков.

4. В соответствии с установленными химико-фармацевтическими свойствами АФС ДОФА-ПК была разработана и валидирована методика подлинности и количественного определения с использованием метода ВЭЖХ с диодноматричным детектированием. Для оценки пролонгированного высвобождения АФС из модельных составов была разработана методика высвобождения в условиях *in vitro*.

5. Оценка стабильности образцов АФС ДОФА-ПК и ЛС Дофаминин была проведена в температурном режиме хранения как при 5 ± 3 °С, так и при 25 ± 5 °С при относительной влажности 60 ± 5 %. В условиях пониженного температурного режима хранения все образцы ЛС были более стабильны, по сравнению с результатами аналогичных исследований при температуре 25 ± 5 °С. В связи с чем, оптимальной температурой хранения ЛС Дофаминин была рекомендована температура от 2 до 8 °С в течение 3 лет в сухом защищённом от света месте.

6. Разработан проект опытно-промышленного регламента, которым завершена отработка и масштабирование новой технологии производства ЛС Дофаминин. Разработан проект нормативного документа по качеству на ЛС Дофаминин в соответствии с установленными требованиями для регистрации лекарственных средств в ЕАЭС.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФС	–	Активная фармацевтическая субстанция
БП	–	Болезнь Паркинсона
ВЭЖХ	–	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ВВ	–	Вспомогательные вещества
ГПМЦ	–	Гидроксипропилметилцеллюлоза
ГФ РФ	–	Государственная фармакопея Российской Федерации
ДСС	–	ДОФА-содержащие средства
ЕМА	–	Европейское агентство по лекарственным средствам (The European Medicines Agency)
ЕЭК	–	Евразийская экономическая комиссия
ЛП	–	Лекарственный препарат
ЛС	–	Лекарственное средство
ЛФ	–	Лекарственная форма
НД	–	Нормативный документ по качеству
ОПР	–	Опытно-промышленный регламент
СРМР	–	Комитет по медицинским продуктам для человека (Committee for Proprietary Medicinal Products)
ФЕАЭС	–	Фармакопея ЕАЭС
ФР	–	Фармацевтическая разработка
GMP	–	Правила надлежащей производственной практики
ICH	–	Международная конференция по гармонизации технических требований для регистрации лекарственных средств для медицинского применения (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
ISO (ИСО)	–	Международная организация по стандартизации
L-ДОФА	–	Леводопа
PLGA	–	Сополимер молочной и гликолевой кислот

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антибиотическая активность наносомальной формы рифабутина / И. Г. Кузнецова, Е. А. Воронцов, С. Л. Кузнецов [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 8. – С. 48-52.
2. Артемьев, Д. В. Современные подходы к лечению ранних стадий болезни Паркинсона / Д. В. Артемьев, А. В. Обухова // Неврология и ревматология. Приложение к журналу Consilium Medicum. – 2009. – № 2. – С. 22-27.
3. Балабаньян, В. Ю. Основные механизмы доставки лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц / В. Ю. Балабаньян, С. Э. Гельперина // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2012. – № 2. – С. 3-9.
4. Биофармация, или основы фармацевтической разработки, производства и обоснования дизайна лекарственных форм: учебное пособие / И. И. Краснюк, Н. Б. Демина, М. Н. Анурова [и др.] – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 192 с. – Текст : непосредственный.
5. Болезнь Паркинсона: учебник / О.С. Левин, Н.В. Федорова, А.Е. Дмитруха, Е.А. Васильев – 3-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2012. – 352 с.– ISBN 978-5-98322-863-4. Текст – непосредственный.
6. Бркич, Г. Э. Взаимосвязь наук при разработке лекарственных средств / Г. Э. Бркич. – Текст : электронный // Актуальные направления фундаментальных и прикладных исследований : материалы XXIV международной научно-практической конференции (Норт-Чарлстон, США, 26-27 октября 2020 г.). – Morrisville: Lulu Press, Inc., 2020 – С. 159-162. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44180286> (дата обращения: 20.01.2024). – Режим доступа: научная электронная библиотека eLibrary.ru
7. Бркич, Г. Э. Методологическое и экспериментальное обоснование реализации концепции «Качество, запланированное при разработке» для лекарственных средств : специальность 3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств; 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия: диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Бркич

Галина Эдуардовна; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)». – Москва, 2021. – 459 с. – Текст : непосредственный.

8. Бркич, Л. Л. Разработка состава и технологии получения комбинированного лекарственного препарата на основе хитозансодержащих фармацевтических субстанций : специальность 14.04.01 «Технология получения лекарств» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Бркич, Лилиана Любановна ; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)». – Москва, 2020. – 190 с. – Текст : непосредственный.

9. Варпаховская, И.К. Лекарственные препараты для интраназального применения // Медлайн Экспресс. – 2001. – № 15(137). – С. 16-19.

10. Годованный, А.В. Разработка подхода избирательной доставки паклитаксела в составе наночастиц, связанных с рекомбинантным фрагментом - фетопротеина, в опухолевые клетки / А.В. Годованный, Е.А. Воронцов, Н.В. Гукасова [и др.] // Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 439. – № 2. – С. 260-262.

11. ГОСТ Р 57129-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Часть 1. Лекарственные средства для медицинского применения. Изучение стабильности новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Общие положения: национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Росстандарта от 10 октября 2016 года № 1344-ст. : введен в первые : дата введения 2017-05-01. – Москва: Стандартинформ, 2016. – Текст: электронный. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200140435> (дата обращения : 03.03.2020 г.).

12. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. – В 4-х тт. : утверждена приказом Министерства здравоохранения 31 октября 2018 г. № 749. – Москва, 2018. – Текст : непосредственный.

13. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV изд.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 20 июля 2023 г. № 377. – Москва, 2023. – Текст : непосредственный.

14. Государственный Реестр лекарственных средств РФ : официальное издание : по состоянию на 22 января 2024 года / М-во здравоохранения Рос. Федерации. – Текст : электронный. – URL: Режим доступа: www.grls.rosminzdrav.ru (дата обращения: 22.01.2024 г.).

15. Гуревич, К.Г. Разработка систем интраназальной доставки лекарственных средств // Качественная Клиническая Практика. – 2002. – № 1. – С. 2-5.

16. Дмитруха, Н.Н. Культура клеток как *in vitro* модель в токсикологических исследованиях // *Medix Anti-Aging*. – 2013. – № 3(33). – С. 50 – 55.

17. Доклиническое изучение лекарственных средств (промышленная фармация) : для студентов высших учебных заведений] / Ж. И. Аладышева, В. В. Береговых, Н. Н. Вольхин [и др.] ; редакторы: А. Л. Хохлов, Н. В. Пятигорская ; Российская академия наук. – Москва : Ремедиум, 2021. – 395 с. – Текст : непосредственный.

18. Европейская фармакопея: публикуется в соответствии с Конвенцией о разработке Европейской Фармакопеи : (Серия Европейских договоров № 50). – 8-е изд. – Москва: Ремедиум. – 2015.– Т. 1. – 2015. – 2032 с.

19. Зырянов, О. А. Разработка состава и технологии получения лекарственной формы на основе триазатрициклотетрадекана потенциального модулятора AMPA-рецептора : специальность 14.04.01 «Технология получения лекарств» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Зырянов, Олег Анатольевич ; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский

государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)». – Москва, 2021. – 186 с. – Текст : непосредственный.

20. Изучение дофаминэргической системы и управление функциональным состоянием организма при высоких нагрузках / И.Е. Кондрашева, Е.Ю. Ситникова, А.А. Каменский, П.Е. Еамбарян, М.С. Рябцева, А.В. Родина, И.А. Тубашева, Е.С. Северин // Материалы I Всероссийского конгресса «Медицина для спорта». – 2011. Т. 1. – С. 209 – 213.

21. Изучение распределения наносомального ломефлоксацина по тканям и органам в сравнении со свободной субстанцией / О.В. Климова, М.С. Рябцева, Е.А. Воронцов, С.Е. Северин // Молекулярная медицина. –2012. – № 1. – С. 27-30.

22. Иллариошкин, С. Н. Современные подходы к лечению болезни Паркинсона // Нервные болезни. – 2004. – №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennyye-podhody-k-lecheniyu-bolezni-parkinsona> (дата обращения: 19.01.2024).

23. Испытание «Растворение» в средах, моделирующих физиологические условия, как способ оценки поведения лекарственных средств *in vivo* / Г. В. Раменская, И. Е. Шохин [и др.] // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57, № 5. – С. 482-489. – Текст : непосредственный

24. Испытания стабильности новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов (Q1A(R2)). Гармонизированное трехстороннее руководство (ICH) от 6 февраля 2003 г. / Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарств для медицинского применения. – Текст : электронный. – URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3520> (дата обращения: 22.01.2024).

25. Каргин, В.С. Разработка состава и технологии получения лекарственного ранозаживляющего средства пролонгированного действия на основе биоразлагаемых полимеров: специальность 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств: диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Каргин Владимир Сергеевич; Федеральное

государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)». – Москва, 2022. – 220 с. – Текст : непосредственный.

26. Карпова, Л. А. Определение катехоламинов и их метаболитов в различных режимах капиллярного электрофореза с использованием макроциклических и ион-парных реагентов / Л. А. Карпова, А. А. Сидорова, О. В. Ганжа // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8, № 1. – С. 75-82.

27. Коровина, Н. В. Создание аэрозольных сред с помощью автономных распылительных устройств, их эволюция и распространение в замкнутых объемах: специальность 01.02.05 «Механика жидкости, газа и плазмы» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук/ Коровина Наталья Владимировна; Национальный исследовательский Томский государственный университет. – Томск, 2014. – 22 с.

28. Кравченко, А.Д. Разработка состава и технологии получения твердой лекарственной формы на основе производного фенилтетрагидрохинолиндиона из группы селективных блокаторов TRPA1: специальность 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств: диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Кравченко Алексей Дмитриевич; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)». – Москва, 2023. – 208 с. – Текст : непосредственный.

29. Максимов, М.Л. Дженирики и оригинальные препараты в лечении болезни Паркинсона / М.Л. Максимов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2013. – Т. 113, – № 9. – С. 94-98.

30. Махнев, С. О. Болевые синдромы при болезни Паркинсона: специальность 14.01.11 «Нервные болезни»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Махнев Сергей Олегович;

ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздравсоцразвития России. – Москва, 2011. – 23 с.

31. Медвецкий, А. И. Разработка состава и анализ микрочастиц алпразолама пролонгированного действия на основе поли-D,L-лактид-ко-гликолида : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Медвецкий Александр Игоревич; Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Пятигорск, 2013. – 125 с.

32. Новикова, А.А. Методы получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств (обзор) / А.А. Новикова, П.А. Кезимана, Я.М. Станишевский // Разработка и регистрация лекарственных средств – 2017. № (2). – С. 134-138.

33. Оценка данных по стабильности (Q1E). Гармонизированное трехстороннее руководство (ICH) от 6 февраля 2003 г. / Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарств для медицинского применения. – Текст : электронный. – URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3524> (дата обращения: 21.01.2024).

34. Павлов, А.Н. Исследование стабильности лекарственного средства на основе L-ДОФА / А. Н. Павлов, Г. Э. Бркич, Н. В. Пятигорская [и др.] // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2023. – Т. 25, № 10. – С. 47-53.

35. Павлов, А.Н. Определение показателей качества назальных капель на основе леводопы для лечения болезни Паркинсона / А.Н. Павлов, Г.Э Бркич., Н.В. Пятигорская [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. – Т. 11. – С. 9 - 14. – DOI: <https://doi.org/10.29296/25877313-2023-11-02>.

36. Патент № 2318513 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/42, А61К 9/14, А61Р 31/06. Лекарственное средство на основе D-циклосерина, препарат пролонгированного действия, содержащий наночастицы, способ его получения : №

2007113041/15 : заявл. 10.04.2007 : опубл. 10.03.2008 / Е. С. Северин, Л. Н. Крюков, И. Е. Зыкова [и др.] ; заявитель Автономная некоммерческая организация "Институт молекулярной диагностики" (АНО "ИнМоДи").

37. Патент № 2365580 С2 Российская Федерация, МПК С07С 229/36, С07С 235/60, С07D 213/79. Пролекарства леводопа, композиции на их основе и их применения: № 2006141416/04: заявл. 03.06.2005: опубл. 27.08.2009 / Ц. Н. Сян, М. А. Геллоп, С. С. Чжоу [и др.].

38. Патент № 2396945 С2 Российская Федерация, МПК А61К 9/51, А61К 45/08, А61К 47/30. Способ получения поли-DL-лактид-со-гликолидных наночастиц с инкапсулированными в них противотуберкулезными лекарственными средствами : № 2007141620/15 : заявл. 11.04.2005 : опубл. 20.08.2010 / Г. К. Кхуллер, Р. Пандей, С. Шарма, Д. Н. Верма ; заявитель ЛАЙФКЭР ИННОВЕЙШНЗ ПВТ. ЛТД.

39. Патент № 2475233 С2 Российская Федерация, МПК А61К 9/51, А61К 9/58, А61К 31/451. Фармакологическая композиция, предназначенная для интраназального введения с целью доставки в мозг фармакологически активного компонента, и способ ее получения : № 2010149002/15 : заявл. 01.12.2010 : опубл. 20.02.2013 / М. В. Ковальчук, Т. Н. Бородина, И. В. Дегтев [и др.] ; заявитель Учреждение Российской академии наук Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН.

40. Патент № 2484823 С2 Российская Федерация, МПК А61К 31/485, А61К 9/14, А61К 9/16. Композиции для лечения болезни Паркинсона : № 2010121827/15 : заявл. 31.10.2008: опубл. 20.06.2013 / Д. Гандертон, М. Д. Мэйн, Ф. Д. Морган. – EDN LMZEVY.

41. Патент № 2508093 С2 Российская Федерация, МПК А61К 9/16, А61К 38/00, А61К 38/28. Фармацевтическая композиция, содержащая микрочастицы с поверхностным покрытием : № 2011103437/15 : заявл. 01.07.2009 : опубл. 27.02.2014 / К. Окубо, Ч. Китаура, К. Миноми [и др.] ; заявитель НИТТО ДЕНКО КОРПОРЕЙШН.

42. Патент № 2518329 С1 Российская Федерация, МПК С07К 14/505, С12N 15/16, В82В 1/00. Способ получения субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека и нанокапсулированная форма рекомбинантного эритропоэтина человека с использованием субстанции, полученной указанным способом: № 2012153074/10: заявл. 07.12.2012 : опубл. 10.06.2014 / Е. А. Нечаева, Н. А. Вараксин, Т. Г. Рябичева [и др.]; заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»).

43. Патент № 2526822 С2 Российская Федерация, МПК А61К 38/08, А61К 47/30, А61К 9/16. Содежащий октреотид состав с замедленным высвобождением со стабильно высоким уровнем воздействия : № 2011128538/15 : заявл. 14.12.2009 : опубл. 27.08.2014 / М. Альхайм, Х. Петерзен.

44. Патент № 2526914 С2 Российская Федерация, МПК А61К 9/14, А61К 31/4184, А61Р 9/12. Композиции телмисартана в форме наночастиц и способ их получения : № 2012101819/15 : заявл. 18.06.2010 : опубл. 27.08.2014 / Г. Филиппеи, Ж. Этвеш, К. Понграц, Ф. Дарваш; заявитель наноформ хунгари лтд.

45. Патент № 2537137 С2 Российская Федерация, МПК А61К 9/16, А61К 31/135, А61К 47/20. Фармацевтические композиции и пероральные дозированные формы пролекарства леводопы и способы применения : № 2012142811/15 : заявл. 08.11.2010 : опубл. 27.12.2014 / Ч. Мао, Н. Паргаонкар, Л. Е. Морер, С. Г. Х. Ма.

46. Патент № 2545734 С1 Российская Федерация, МПК А61К 9/14, А61К 31/216, А61К 47/34. Лекарственный препарат для лечения болезни Паркинсона : № 2014103180/15 : заявл. 31.01.2014 : опубл. 10.04.2015 / Г. Г. Барсегян, Е. А. Воронцов, П. Е. Гамбарян [и др.] ; заявитель Открытое акционерное общество "Всероссийский Научный Центр Молекулярной Диагностики и Лечения" (ОАО "ВНЦМДЛ).

47. Патент № 2697411 С2 Российская Федерация, МПК А61К 9/10, А61К 31/216, А61К 47/10. Композиция для лечения болезни Паркинсона : № 2017136047 : заявл. 11.10.2017 : опубл. 14.08.2019 / Н. В. Пятигорская, Г. Э. Бркич, А. Н. Павлов [и др.]; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное

учреждение высшего образования первый московский государственный медицинский университет имени и.м. сеченова министерства здравоохранения российской федерации (Сеченовский Университет).

48. Поздеев, А.В. Системы липосомальной доставки лекарственных веществ в организм животных / А.В. Поздеев, Н.П. Щербаков, К.Н. Вагин // Ветеринарный врач. – 2021. – №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/metodika-polucheniya-liposomalnyh-sistem-dostavki-lekarstvennyh-veschestv-v-organizm-zhivotnyh> (дата обращения: 19.01.2024).

49. Поли-D,L-лактид-ко-гликолид - перспективный полимер для разработки наносистем доставки лекарственных средств (обзор) / Сорокоумова М.В., Компанцев Д.В., Щербакова Л.И. [и др.] // Здоровье и образование в XXI веке. 2022. №8. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/poli-d-l-laktid-ko-glikolid-perspektivnyu-polimer-dlya-razrabotki-nanosistem-dostavki-lekarstvennyh-sredstv-obzor> (дата обращения: 19.01.2024).

50. Полимеры для систем доставки лекарственных веществ пролонгированного действия (обзор). Перспективные синтетические и природные полимеры / С.А. Кедик, Е.С. Жаворонок, И.П. Седишев и [др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – №5. – С.25 – 28.

51. Примеси в новых фармацевтических субстанциях (Q3A(R2)). Гармонизированное трехстороннее руководство (ICH) от 25 октября 2006 г. / Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарств для медицинского применения. – Текст : электронный. – URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3570> (дата обращения: 02.01.2024).

52. Промышленная фармация. Путь создания продукта : монография / Ж. И. Аладышева [и др.]; ред. А. Л. Хохлов, Н. В. Пятигорская. – Москва : Издательство РАН, 2019. – 394 с. – Текст : непосредственный.

53. Протокол ведения больных болезнью Паркинсона (G20). Утвержден Министерством здравоохранения и социального развития РФ от 14 января 2005 г. // Рос. газета. – 2005. – 14 апреля. – Текст: непосредственный.

54. Пятигорская, Н. В. Валидация аналитических методик : учебно-методическое пособие для обучающихся по программе «Промышленная фармация» / Н. В. Пятигорская, Ж. И. Аладышева, Г. Э. Бркич ; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)». – Москва: Издательство Сеченовского университета, 2021. – 70 с. – Текст : непосредственный.

55. Рахметова, А. А. Изучение биологической активности наночастиц меди, различающихся по дисперсности и фазовому составу: специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Рахметова Алла Александровна; Российский университет дружбы народов. – Москва, 2011. – 125 с.

56. Российская Федерация. Законы. Об обращении лекарственных средств: Федеральный закон № 61-ФЗ : [принят Гос. думой 24 марта 2010 года : одобрен Советом Федерации 31 октября 2010 года] // Рос. газета. – 2010. – 14 апреля. – Текст: непосредственный.

57. Руководства ICH для фармацевтической отрасли. Качество. 2-е издание. Перевод с англ. (2007-2021, ICH Guidelines Quality), под ред Пятигорской Н.В. Твердый переплет. 800 с. 2021. ISBN: 978-5-91884-127-3.

58. Руководство по надлежащей практике производства активных фармацевтических ингредиентов (Q7). Гармонизированное трехстороннее руководство (ICH) от 10 ноября 2000 г. / Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарств для медицинского применения. – Текст: электронный. – URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3738/> (дата обращения: 22.01.2024).

59. Сидорова, А. А. Хроматографическое и электрофоретическое определение катехоламинов, метанефринов и 3,4-дигидроксифенилаланина в моче и плазме крови / А. А. Сидорова, Л. А. Карцова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9, № 6. – С. 774-782.

60. Смоленцева, И. Г. Моторные и немоторные нарушения на развернутой и поздней стадиях болезни Паркинсона: специальность 14.01.11 «Нервные болезни»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Смоленцева Ирина Геннадьевна; ГОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет Минздравсохранности России». – Москва, 2011. – 219 с.

61. Совет Евразийской экономической комиссии. О перечне лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций (активных фармацевтических субстанций) для медицинского применения, производство которых рекомендуется обеспечить в Евразийском экономическом союзе до 2024 года: рекомендация от 20 декабря 2022 г. №47. – Текст : электронный // Консультант : справочно-правовая система : сайт. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_435312/ (дата обращения: 10.01.2024).– Режим доступа: свободный.

62. Совет Евразийской экономической комиссии. О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения: решение от 3 ноября 2016 г. №78. – Текст : электронный // Консультант : справочно-правовая система : сайт. – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207379 (дата обращения: 10.03.2020).– Режим доступа: свободный.

63. Совет Евразийской экономической комиссии. О Руководстве по валидации процесса производства лекарственных препаратов для медицинского применения: решение от 26 сентября 2017 года № 19. – Текст: электронный // Консультант: справочно-правовая система: сайт. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_278964/ (дата обращения: 22.01.2024). – Режим доступа: свободный.

64. Совет Евразийской экономической комиссии. О руководстве по производству готовых лекарственных форм лекарственных препаратов: решение от 29 января 2019 г. № 3 – Текст: электронный // Консультант: справочно-правовая система: сайт. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_317099 (дата обращения: 22.01.2024). – Режим доступа: свободный.

65. Совет Евразийской экономической комиссии. О Руководстве по разработке и производству активных фармацевтических субстанций: решение от 22 декабря 2020 г. № 26 – Текст: электронный // Консультант: справочно-правовая система: сайт. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_372518 (дата обращения: 22.01.2024). – Режим доступа: свободный.

66. Совет Евразийской экономической комиссии. О Руководстве по составлению документации по химическому и фармацевтическому качеству для исследуемых лекарственных средств, применяемых в клинических исследованиях.: решение от 27.12.2022 № 49. – Текст: электронный // Консультант: справочно-правовая система: сайт. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_436069 (дата обращения: 22.01.2024). – Режим доступа: свободный.

67. Совет Евразийской экономической комиссии. О руководстве по трансферу технологий и (или) аналитических методик при производстве лекарственных средств: решение от 8 июня 2021 г. № 11. – Текст: электронный // Консультант: справочно-правовая система: сайт. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_386736 (дата обращения: 22.01.2024). – Режим доступа: свободный.

68. Совет Евразийской экономической комиссии. Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза : решение от 3 ноября 2016 г. № 77. – Текст : электронный // Консультант : справочно-правовая система : сайт. – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207780 (дата обращения : 10.03.2020). – Режим доступа: свободный.

69. Совет Евразийской экономической комиссии. Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках евразийского экономического союза: решение от 3 ноября 2016 г. № 85. – Текст : электронный // Консультант: справочно-правовая система : сайт. – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ (дата обращения : 10.03.2020). – Режим доступа: свободный.

70. Совет Евразийской экономической комиссии. Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата: решение от 10 мая 2018 г. № 151. – Текст: электронный // Консультант: справочно-правовая система: сайт. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_306666/ (дата обращения: 22.01.2024). – Режим доступа: свободный.

71. Совет Евразийской экономической комиссии. Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств: решение от 17 июля 2018 г. № 113. – Текст электронный. – URL: https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evraziiskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-17072018_3/reshenie (дата обращения: 22.01.2024).

72. Совет Евразийской экономической комиссии. Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций: решение от 10 мая 2018 г. № 69. – Текст: электронный // Консультант: справочно-правовая система: сайт. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_298184// (дата обращения: 22.01.2024). – Режим доступа: свободный

73. Современные проблемы технологии получения фосфолипидов (обзор)/ Э. М. Плотникова, Р. Н. Низамов, Ф. Р. Вафин [и др.] // Вестник Марийского государственного университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки». – 2023. – №2 (34). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennyye-problemy-tehnologii-polucheniya-fosfolipidov-obzor> (дата обращения: 19.01.2024).

74. Спецификации: аналитические методики и критерии приемлемости новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов - химические вещества (Q6A). Гармонизированное трехстороннее руководство (ICH) от 6 октября 1999 г. / Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарств для медицинского применения. – Текст: электронный. – URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3579> (дата обращения: 22.01.2024).

75. Тюляев, А. И. Разработка капсулированных лекарственных форм на основе микрокристаллической целлюлозы и методов их стандартизации: специальность 15.00.01 Технология получения лекарств; 15.00.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия / Тюляев Александр Иванович; – Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московская медицинская академия». – Москва, 2004. – 143 с. – Текст: непосредственный.

76. Фармакопея ЕАС. О фармакопее Евразийского экономического союза: решение ЕЭК № 100 от 11 августа 2020 г. – Текст электронный. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/565516251> (дата обращения: 22.01.2024).

77. Фармакопея США. Национальный формуляр : USP 43 : NF 38 : [сборник стандартов]. – Текст : электронный. – URL: <https://www.uspnf.com/purchase-usp-nf>, свободный (дата обращения : 03.03.2023 г.).

78. Фармацевтическая разработка (Q8 (P2)). Гармонизированное трехстороннее руководство (ICH) от августа 2009 г. / Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарств для медицинского применения. – Текст : электронный. – URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3614/> (дата обращения: 03.01.2024).

79. Федорова, Н.В. Практические аспекты применения препаратов леводопы в лечении болезни Паркинсона // «Материалы II Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений» – Москва, 2011. – Т.1 – С. 180-188.

80. A consensus research agenda for optimising nasal drug delivery / B. Forbes, R. Bommer, J. Goole, [et al.] // Expert Opin Drug Deliv. – 2020. – № 17(2). P. 127–132.

81. A cross-sectional multicenter study of cognitive and behavioural features in multiple system atrophy patients of the parkinsonian and cerebellar type / C. Siri, S. Duerr, M. Canesi, [et al.] // J Neural Transm (Vienna). – 2013. – № 120(4). – P.613–618.

82. A reassessment of risks and benefits of dopamine agonists in Parkinson's disease / A. Antonini, E. Tolosa, Y. Mizuno, M. Yamamoto, [et al.] // Lancet Neurol. – 2009. – №8(10). – P. 929–937.

83. A Scientific Methodology for Expansion of Anti-Parkinson Drug Product Range / N. V. Pyatigorskaya, G. E. Brkich, A. N. Pavlov, [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2017. – Vol. 9, № 9. – P. 1561–1563.
84. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial / P.A. LeWitt, A.R. Rezai, M.A. Leehey, [et al.] // *Lancet Neurol*. – 2011. – № 10(4). – P. 309–319.
85. Acute oral toxicity and biodistribution study of zinc-aluminium-levodopa nanocomposite / A.U. Kura, B. Saifullah, P.S. Cheah, [et al.] // *Nanoscale Res Lett*. – 2015. – № 1. – P.100–105.
86. Advances in nasal trans-mucosal drug delivery / S.K. Kushwaha, R.K. Keshari, A.K. Rai // *J. Appl. Pharm. Sci*. –2011. – № 1. –P. 21–28.
87. Alabrahim, O.A. Polymeric nanoparticles for dopamine and levodopa replacement in Parkinson's disease / O.A. Alabrahim, H.M. Azzazy // *Nanoscale Adv*. – 2022. – №4 (24). – P. 5233–5244.
88. An optimized gastroretentive nanosystem for the delivery of levodopa / N.C. Ngwuluka, Y.E. Choonara, P. Kumar, [et al.] // *Int J Pharm*. – 2015. – №494(1). – P 49–65.
89. Antitumor activity of targeted nanosome delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, paclitaxel, and a recombinant alpha-fetoprotein fragment / A. V. Godovannyi, E. A. Vorontsov, N. V. Gukasova, [et al.] // *Nanotechnologies in Russia*. – 2012. – №7. – P. 76–84.
90. Arora, P. Role of mucoadhesive polymers in enhancing delivery of nimodipine microemulsion to brain via intranasal route / P. Arora, S. Sharma, S. Garg // *Acta Pharm. Sin. B*. –2014. – P. 151–160.
91. Babita, K. Transcutaneous delivery of levodopa: enhancement by fatty acid synthesis inhibition / K. Babita, A. Tiwary // *Mol Pharm*. – 2005. – №2(1). – P. 57–63.
92. Baseline Plasma C-Reactive Protein Concentrations and Motor Prognosis in Parkinson Disease / A. Umemura, T. Oeda, K. Yamamoto, [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – № 26. – P.10–18.

93. Blair Jackson, David J. Bennett, Raymond T. Bartus, Dwaine F. Emerich Patent № CA 2478980 CPulmonary delivery for levodopa.

94. Chun IK, Lee YH, Lee KE, Gwak HS. Design and evaluation of levodopa methyl ester intranasal delivery systems / Chun I.K., Lee Y.H., Lee K.E., [et al.] // J Parkinsons Dis. – 2011. –№ 1. P.101–107.

95. Comparative analysis of the efficacy of dopa-containing nanoparticles and standard L-dopa-based drugs nasal administration using a parkinson's disease rat model / P. Y. Gambaryan, I.G. Kondrasheva, I.A.Tubashova, [et al.] // Parkinsonism and related disorders, 20 World Congress on Parkinson disease and related disorders. – 2013. – p. 128.

96. Continuous dopaminergic delivery in Parkinson's disease / A. Antonini, G. Ursino, D. Calandrella, L. Bernardi, [et al.] // J Neurol. – 2010. – №257. – P. 305–308.

97. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology / J.M. Lü, X. Wang, C. Marin-Muller, [et al.] // Expert Rev Mol Diagn. – 2009. – № 9(4). – P.325–341.

98. Dahlin, M. Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats // Eur J Pharm Sci 14. –P. 75–80.

99. Determination of L-dopa, carbidopa, 3-O-methyldopa and entacapone in human plasma by HPLC-ED / F. Bugamelli, C. Marcheselli, E. Barba, M. Raggi // J Pharm Biomed Anal. – 2011. – №54(3). – P. 562–567.

100. Devkar, T.B. Khandelwal Surface engineered nanostructured lipid carriers 35 for efficient nose to brain delivery of ondansetron HCl using Delonix regia gum as a natural mucoadhesive polymer / T.B. Devkar, A.R. Tekade, K.R. Khandelwal // Colloids Surfaces B Biointerfaces. – 2014. – № 122. – P.143–150.

101. Dhuria, S.V. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations / S.V. Dhuria, L.R. Hanson, W.H. Frey // J Pharm Sci. – 2010. –№ (4). – P.1654–1673.

102. Differential involvement of Ras-GRF1 and Ras-GRF2 in L-DOPA-induced dyskinesia / S. Bido, N. Solari, M. Indrigo [et al.] // Ann Clin Transl Neurol. – 2015. – №2(6). – P. 662–678.

103. Djupesland, P.G. Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective-a review / P.G. Djupesland // *Drug Deliv Transl Res.* – 2013. – № 3(1). – P. 42–62.

104. Djupesland, P.G. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview / P.G. Djupesland, J.C. Messina, R.A. Mahmoud // *Ther Deliv.* – 2014. – № 5(6). – P. 709–733.

105. Djupesland, Per. G. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview / Per. G. Djupesland, J. C. Messina, R. A. Mahmoud // *Therapeutic Delivery.* – 2014. – № 5(6). – P.709–733.

106. Dopamine and serotonin in the larval CNS of a drosophilid fly, *Chymomyza costata*: are they involved in the regulation of diapause? / V. Kostal, H. Noguchi, Shimada K., [et al.] // *Arch Insect Biochem Physiol.* – 1999. – № 42 (2). – P.147-162.

107. Duodenal levodopa infusion monotherapy vs oral polypharmacy in advanced Parkinson disease / D. Nyholm, A.I. Nilsson Remahl, N.Dizdar, [et al.] // *Neurology.* – 2005. – №64(2). – P.216–223.

108. Effect and safety of duodenal levodopa infusion in advanced Parkinson's disease: a retrospective multicenter outcome assessment in patient routine care / A. Antonini, P. Odin, L. Opiano, V. Tomantschger, [et al.] // *J Neural Transm (Vienna).* – 2013. – №120(11). – P. 1553-1558.

109. Effects of intranasally applied dopamine on behavioral asymmetries in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigro-striatal tract / M. Pum, S. Schnble, H. Harooni, [et al.] // *Neuroscience.* – 2009. – №. 162. – P.174–183.

110. Effects of rotigotine transdermal patch in patients with Parkinson's disease presenting with non-motor symptoms - results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial / A. Antonini, L. Bauer, E. Dohin, W. Oertel, [et al.] // *Eur J Neurol.* – 2015. – №22(10). – P. 1400–1407.

111. Efficacy and safety of entacapone in levodopa/carbidopa versus levodopa/benserazide treated Parkinson's disease patients with wearing-off / M.

Kuoppamäki, M. Leinonen, W. Poewe // *J Neural Transm (Vienna)*. – 2015. – № 122(12). – P.1709–1714.

112. European Federation of Neurological Societies; Movement Disorder Society-European Section. Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Movement Disorder Society-European Section. Part I: early (uncomplicated) Parkinson's disease / M. Horstink, E. Tolosa, U. Bonuccelli, [et al.] // *Eur J Neurol*. –2006. – № 13.

113. Fabrication of an ionicsensitive in situ gel loaded with resveratrol nanosuspensions intended for direct nose-to-brain delivery / J. Hao, J. Zhao, S. Zhang, [et al.] // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. –2016. – № 147. – P. 376–386.

114. FDA Guidance for Industry, Process Validation: General Principles and Practices// FDA. gov: site. – 2022. – Text: electronic. – URL: – <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Process-Validation-General-Principles-and-Practices.pdf> (date of treatment: 03.01.2023).

115. FDA Guidance for Industry: Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension, and Spray Drug Products—Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Nasal-Spray-and-Inhalation-Solution--Suspension--and-Drug-Products.pdf>

116. Formulation and Device Design to Increase Nose to Brain Drug Delivery / Z.N. Warnken, H.D. Smyth, A.B.Watts, [et al.] // *J. Drug Deliv. Sci. Technol*. – 2016. – № 35. – P.213–222.

117. Formulation and evaluation of thermoreversible mucoadhesive in-situ gel for intranasal delivery of naratriptan hydrochloride / S. Shelke, S. Shahi, S. Jalalpure, [et al.] // *J. Drug Deliv. Sci. Technol*. – 2015. – № 29. – P. 238–244.

118. Formulation of olfactory-targeted microparticles with tamarind seed polysaccharide to improve nose-to-brain transport of drugs / S.B. Yarragudi, R. Richter, H. Lee, [et al.]// *Carbohydr. Polym*. – 2017. – №163. – P. 216–226.

119. Formulation, functional evaluation and ex vivo performance of thermoresponsive soluble gels - A platform for therapeutic delivery to mucosal sinus

tissue / P. Pandey, P.J. Cabot, B. Wallwork, [et al.] // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2017. – № 96. – P. 499–507.

120. Gänger, S. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa / S. Gänger, K. Schindowski // *Pharmaceutics.* – 2018. № 10. –p.116.

121. Genetic Identification Is Critical for the Diagnosis of Parkinsonism: A Chinese Pedigree with Early Onset of Parkinsonism / Y. Yang, B.S. Tang, L. Weng, [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – № 10(8). – P. 78–92.

122. Gizurarson S. Anatomical and histological factors affecting intranasal drug and vaccine delivery / S. Gizurarson // *Curr Drug Deliv.* – 2012. – № 9(6). – P. 566–582.

123. Hasçıçek, C. Mucoadhesive microspheres containing gentamicin sulfate for nasal administration: Preparation and in vitro characterization / C. Hasçıçek, N. Gönül, N. Erk // *Il Farm.* – 2003. – № 58. – P.11–16.

124. Heart rate circadian profile in the differential diagnosis between Parkinson disease and multiple system atrophy / M. Pilleri, G. Levedianos, L. Weis, [et al.] // *Parkinsonism Relat Disord.* – 2014. – №20(2). – P.217–221.

125. High-speed laser imaging analysis of plume angles for pressurized metered-dose inhalers: effect nozzle geometry / Chen Y., Yang P.M., Murphy S., [et al.] // *AAPS PharmSciTech.* – 2017. – № 18. – P. 782–789.

126. HPLC-MS/MS method application for the determination of pharmacokinetic parameters of intranasal delivered L-DOPA in rats / A. A. Nedorubov, A. N. Pavlov, N. V. Pyatigorskaya [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* – 2018. – Vol. 10, № 10. – P. 2489–2492.

127. Human pharmacokinetics of L-3,4-dihydroxyphenylalanine studied with microdialysis / N. Dizdar, A. Kullman, B. Norlander, [et al.] // *Clin Chem.* – 1999. № 45(10). –P. 1813–1820.

128. ICH Q11 Development and Manufacture of Drug Substances (chemical entities and biotechnological/ biological entities) // European Medicines Agency (EMA) : site. – 2011. – Text : electronic. – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q11->

development-manufacture-drug-substances-chemical-entities-biotechnological-biological (Дата обращения: 03.08.2022).

129. Identifying lipidic emulsomes for improved oxcarbazepine brain targeting: In vitro and rat in vivo studies / G.M. El-Zaafarany, M.E. Soliman, S. Mansour, [et al.] // Int. J. Pharm. – 2016. – № 503. – P.127–140.

130. Illum, L. Nasal drug delivery: New developments and strategies / L. Illum // Drug Discov. – 2002. – № 7. P. 1184–1189.

131. Imaging essential tremor / I.U. Isaias, G.Marotta, S. Hirano, [et al.] // Mov Disord. – 2010. – № 25(6). –P.679-686.

132. In vitro, ex vivo and in vivo performance of chitosan-based spray-dried nasal mucoadhesive microspheres of diltiazem hydrochloride / A.D. Kulkarni, D.B. Bari, S.J. Surana, [et al.] // J. Drug Deliv. Sci. Technol – 2016. – № 31. – P.108–117.

133. Increasing the Efficiency of Parkinson's Disease Treatment Using a poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Based L-DOPA Delivery System / P.Y. Gambaryan, I.G. Kondrasheva, E.S. Severin, [et al.] // Exp Neurobiol. – 2014. – № 23(3). – P.246–252.

134. International conference on harmonisation of technical requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use considerations (ICH) guideline Q8 (R2) Current Step 4 version dated // European Medicines Agency (EMA) : site. – August, 2009. –Text : electronic. – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q8-r2-pharmaceutical-development> (дата обращения: 03.01.2024).

135. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease / R. Leah, W. Hansonland, H. Frey, [et al.] // BMC Neuroscience. – 2008. –№ 9(Suppl 3).–p 5.

136. Intranasally applied 1-DOPA alleviates parkinsonian symptoms in rats with unilateral nigro-striatal 6-OHDA lesions / Chao O., Mattern C., Silva A., [et al.] // Brain research bulletin. – 2012. – №2. – P. 340–345.

137. Intranasally applied 1-DOPA alleviates parkinsonian symptoms in rats with unilateral nigro-striatal 6-OHDA lesions / Y.C. Owen, M. Claudia, M.D. Angelica, [et al.] // Brain research bulletin.– 2012. – № 87. – P. 340–345.

138. J, Xu. Design and Application in Delivery System of Intranasal Antidepressants / J. Xu, J. Tao, J. Wang // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2020. – № 21(8). – p.626.
139. Jellinger, K.A. Recent developments in the pathology of Parkinson's / K.A. Jellinger // *J Neural Transm Suppl.* – 2002. – № 62. – P.347–376.
140. Jorg Kreuter, Renad N. Alyautdin, Dimitri A. Karkevich, Bernhard A. Sabel US Patent № 6117454 A Drug targeting to the nervous system by nanoparticles
141. Julius Remenar, Orn Almarsson, Anthony J. Meehan, Jr .Zhong Zhang Patent № US 8815950 B2 Pharmaceutical compositions and method of using levodopa and carbidopa. 26.08.2014.
142. Koller, W. Other formulations and future considerations for apomorphine for subcutaneous injection therapy / W. Koller // *Neurology.* –2004. – № 4. –P. 22–26.
143. L-dopa increases α -synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients in vivo and in vitro / Schmitt I., Kaut O., Khazneh H., [et al.] // *Mov Disord.* – 2015. –№ 30(13). – P.1794–801.
144. Levodopa and 3-OMD levels in Parkinson patients treated with Duodopa / A. Antonini, G. Bondiolotti, F. Natuzzi, Bareggi S. // *Eur Neuropsychopharmacol.* – 2010. – №20(10). – P. 683–687.
145. Levodopa effects on [(11)C]raclopride binding in the resting human brain / K.J. Black, M.L. Piccirillo, J.M. Koller, [et al.] // *Ann Clin Transl Neurol.* – 2015. – №23. – P. 23–26.
146. Levodopa/benserazide-loaded biodegradable microspheres reduce dyskinesia in rats / X. Yang, W. Yuan, T. Ren, [et al.] // *Neuroreport.* – 2010. –№ 21(12). P. – 837–840.
147. Maaz, A. In Vitro Evaluation of Nasal Aerosol Depositions: An Insight for Direct Nose to Brain Drug Delivery / A. Maaz, I.S. Blagbrough, P.A. De Bank // *Pharmaceutics.* –2021. №13(7). – P.1079–1080.
148. Mahajan, H.S. Ondansetron loaded pectin based microspheres for nasal administration: In vitro and in vivo studies / H.S. Mahajan, B. V. Tatiya, P.P. Nerkar // *Powder Technol.* – 2012. – № 221. – P. 168–176.

149. Microemulsion-Based Media in Nose-to-Brain Drug Delivery / A. Froelich, T. Osmalek, B. Jadach, [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2021. – № 2. – P.200–201.

150. Microgels of silylated HPMC as a multimodal system for drug co-encapsulation / M. Zayed, C.Tourne-Peteilh, M. Ramonda, [et al.] // *Int J Pharm.* – 2017. – № 532(2). – P. 790–801.

151. Moschen, R. Psychooncological Treatment of Patients with Head and Neck Cancer / R. Moschen, D. Riedl // *Laryngorhinootologie*. – 2017. – Vol. 96. – № 5. – P. 319-331.

152. Moshe Kushnir, Eliahu Heldman Patent № US 6746688 B1 Apparatus for the transdermal treatment of Parkinson's disease.

153. Multicomponent covalent dye assembly for tight binding and sensitive sensing of L-DOPA / Chen X.X., Wu X., Zhang P., [et al.] // *Chem Commun (Camb)*. – 2015. – № 51(71). – P. 13630–13633.

154. Non-exercise physical activity attenuates motor symptoms in Parkinson disease independent from nigrostriatal degeneration / J. Snider, M. L. Müller, V. Kotagal, [et al.] // *Parkinsonism & related disorders*. – 2015. – № 21(10). – P. 1227–1231.

155. Nose-to-Brain Delivery of Therapeutic Peptides as Nasal Aerosols / W. Alabsi, B. Eedara, D. Encinas–Basurto, [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – № 14(9). – P.1870 – 1877. doi: 10.3390/pharmaceutics14091870.

156. Numerical Comparison of Nasal Aerosol Administration Systems for Efficient Nose-to-Brain Drug Delivery / J. Dong, Y.Shang, K. Inthavong, [et al.] // *Pharm Res*. – 2017. –№ 29. – P. 5–10.

157. Olanow, C.W. The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease / C.W. Olanow // *Annu Rev Med*. – 2004. – № 55. – P. 41–60.

158. Optimization of PLGA nanoparticles formulation containing L-dopa by applying the central composite design / Y. Zhou, R. Alany, V. Chuang, [et al.] // *Drug development and industrial pharmacy*. – 2013. – № 39(2). – P. 321–330.

159. Oral and infusion levodopa-based strategies for managing motor complications in patients with Parkinson's disease / A. Antonini, K. Chaudhuri, P. Martinez-Martin, P.Odin // *CNS Drugs*. – 2010. – №24(2). – P. 119-129.

160. Parkinson's disease tremor-related metabolic network: characterization, progression, and treatment effects / H. Mure, S. Hirano, C.C. Tang, [et al.] // *Neuroimage*. – 2011. – № 54(2). – P.1244–1253.
161. Patel, S. Design and development of intranasal in situ gelling system of Midazolam hydrochloride using 32 full factorial design / S. Patel, H. Koradia, R. Parikh // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* –2015. – № 32. – P.154–162.
162. Permeability issues in nasal drug delivery / P. Arora, S. Sharma, S. Garg, [et al.] // *Drug Discovery Today*. – 2002. – Volume 7, № 18. –P. 967–975.
163. Personalised Advanced Therapies in Parkinson's Disease: The Role of Non-Motor Symptoms Profile / V. Leta, H.S. Dafsari, A. Sauerbier, [et al.] // *J Pers Med*. – 2021. –№ 11(8). – P. 773–775.
164. Pharmacokinetic and clinical evaluation of liquid L-dopa/carbidopa in Parkinson's disease / J. Marriott, B. Bryant, P. Kempster, [et al.] // *J Clin Neurosci*. – 1998. – № 5(2). –P.178–181.
165. Pharmacokinetic evaluation and modeling of formulated levodopa intranasal delivery systems / Tae Kyung K., Wonku K., In Koo C., [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2009. – Vol. 38. –P. 525–532.
166. Pharmacokinetics of L-dopa in plasma and extracellular fluid of striatum in common marmosets / J. Zhang, F.R. Qu, A. Nakatsuka, [et al.] // *Brain Res*. – 2003. – № 99. – P. 54–58.
167. Pharmacokinetics of nanosomal form of levodopa in intranasal administration / A. A. Nedorubov, A. N. Pavlov, N. V. Pyatigorskaya [et al.] // *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. – 2019. – Vol. 7, № 21. – P. 3509-3513.
168. Pharmacological Management of Lewy Body Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis / C. Stinton, I. McKeith, J.P. Taylor, [et al.] // *Am J Psychiatry*. – 2015. –№ 172(8). –P.731–742.
169. Preparation and in vitro characterization of thermosensitive and mucoadhesive hydrogels for nasal delivery of phenylephrine hydrochloride / X. Xu, Y. Shen, W. Wang, [et al.] // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2014. – № 88. – P. 998–1004.

170. Quality by Design approach for an in situ gelling microemulsion of Lorazepam via intranasal route, Mater / V. Shah, M. Sharma, R. Pandya, [et al.] //Sci. Eng. C. – 2017. – №75. – P. 1231–1241.

171. Quantitative Estimation of the Effect of Nasal Mucociliary Function on in Vivo Absorption of Norfloxacin after Intranasal Administration to Rats / D. Inoue, S. Kimura, A. Kiriya, [et al.] // Mol Pharm. – 2018. – № 15(10). – P.4462–4469.

172. Rotigotine transdermal patch in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis / C.Q. Zhou, L.I. SS, Z.M.Chen, [et al.] // PLoS One. – 2013. – № 8(7).– P. 69–73.

173. Salunke, S.R. Ion activated in situ gel of gellan gum containing salbutamol sulphate for nasal administration / S.R. Salunke, S.B. Patil // Int. J. Biol. Macromol. – 2016. – № 87. – P. 41–47.

174. Sasson Cohen, Yoram Sela, Ruth Levy, Nava Shterman, Eldad Melamed, Daphne Atlas Patent № WO1997003662A1 Pharmaceutical composition of 1-dopa ethyl ester.

175. Scherließ, R. Nasal formulations for drug administration and characterization of nasal preparations in drug delivery / R. Scherließ // Ther. Deliv. – 2020. – № 11. – P. 183–191.

176. Seju, U. Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: in vitro and in vivo studies / U. Seju, A. Kumar, K. Sawant // Actabiomaterialia. – 2011. – №7. – № 4169-4176.

177. Simone, E.A. Polymeric carriers: role of geometry in drug delivery / E.A. Simone, T.D. Dziubla, V.R. Muzykantov //Expert Opin DrugDeliv. – 2008. – №5(12). – P. 1283–1300.

178. Spinal cord stimulation for the treatment of sensory symptoms in advanced Parkinson's disease / A. Landi, A.Trezza, D. Pirillo, [et al.] // Neuromodulation. – 2013. –№ 16(3). – P.276–279.

179. Stevanovic, M. Poly(lactide-co-glycolide)-based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins / M. Stevanovic, D. Uskokovic //Current Nanoscience. – 2009. – № 5(1). – P. 1–14.

180. Study of adhesive properties of new dosage forms for Nano-L-DOPA nasal delivery system based on PLGA nanoparticles / A. N. Pavlov, N. V. Pyatigorskaya, G. E. Brkich [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2018. – Vol. 10, № 3. – P. 668–671.

181. Sveinbjorn, G. Anatomical and Histological Factors Affecting Intranasal Drug and Vaccine Delivery / G. Sveinbjorn// *Current Drug Delivery*. – 2012. – № 9. – P. 566–582.

182. Swamy, N.G. Mucoadhesive in situ gels as nasal drug delivery systems: An overview / N.G. Swamy, Z. Abbas // *Asian J. Pharm. Sci.* – 2012. – № 7. – P. 168–180.

183. The motor inhibition system in Parkinson's disease with levodopa-induced dyskinesias / A. Cerasa, G. Donzuso, M. Morelli, [et al.] // *Mov Disord.* – 2015. – 30(14). – P. 1912–1920.

184. The preferential nNOS inhibitor 7-nitroindazole and the non-selective one N(G)-nitro-L-arginine methyl ester administered alone or jointly with L-DOPA differentially affect motor behavior and monoamine metabolism in sham operated and 6-OHDA-lesioned rats / Czarnecka A., Konieczny J., Lenda T., [et al.] // *Brain Res.* – 2015. – № 1625. – P.218–237.

185. The relationship between in vivo nasal drug clearance and in vitro nasal mucociliary clearance: Application to the prediction of nasal drug absorption / D. Inoue, A.Tanaka, S. Kimura, [et al.] // *Eur J Pharm Sci.* – 2018. – № 117. – P. 21–26.

186. The Research of Physicochemical Properties and Determination of Nano-L-DOPA Quality Attributes Based on PLGA Nanoparticles for the Treatment of Parkinson's Disease / A. N. Pavlov, N. V. Pyatigorskaya, G. E. Brkich [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2018. – Vol. 10, № 6. – P. 1457–1460.

187. Thermosensitive gels containing lorazepam microspheres for intranasal brain targeting / S. Jose, C.R. Ansa, T.A. Cinu, [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2013. – № 441. – P. 516–526.

188. Trenkel, M. Nasal Powder Formulations: In-Vitro Characterisation of the Impact of Powders on Nasal Residence Time and Sensory Effects / M.Trenkel, R. Scherließ // *Pharmaceutics*. – 2021. – № 13. – P. 380–385.

189. Trevino, J.T. Non-Invasive Strategies for Nose-to-Brain Drug Delivery / J.T. Trevino, R.C. Quispe, F. Khan, V. Novak // *J Clin Trials*. – 2020. – № 10(7). – P. 429–439.
190. Ugwoke, M.I. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery / M.I. Ugwoke, N. Verbeke, R. Kinget // *J Pharm Pharmacol*. – 2001. – № 53(1). – P. 3–21.
191. Watts, P. In situ gelling system for optimised nasal drug delivery / P. Watts, A. Smith // *Expert Opin. Drug Deliv*. – 2009. – № 6. – P. 543–552.
192. Wijemanne, S. Dopa-responsive dystonia--clinical and genetic heterogeneity / S. Wijemanne, J. Jankovic // *Nat Rev Neurol*. – 2015. – № 11(7). – P. 414–424.
193. William J. Curatolo, Ravi M. Shanker, Walter C. Babcock, Dwayne T. Friesen, James A. S. Nightingale, Douglas A. Lorenz Patent № US8980321 B2 Pharmaceutical compositions providing enhanced drug.
194. Wohlfart, S. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles / Wohlfart S., Gelperina S., Kreuter J. // *J Control Release*. – 2012. – № 20. – P. 264–273.
195. Xu, X. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes / X. Xu, M.A. Khan, D.J. Burgess // *Int. J. Pharm*. – 2012. – № 426. – P. 211–218.
196. Y. Cabeza-Arvelaiz. Transcriptome analysis of a rotenone model of parkinsonism reveals complex I-tied and -untied toxicity mechanisms / Y. Cabeza-Arvelaiz, R.H. Schiestl // *Neurodegenerative diseases*. – 2012. – 7(9). – P. 36–45.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ПАТЕНТ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2697411

Композиция для лечения болезни Паркинсона

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

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2017136047

Приоритет изобретения 11 октября 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 14 августа 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 11 октября 2037 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Налиев



ПРИЛОЖЕНИЕ Б

АКТЫ ВНЕДРЕНИЯ

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебно-воспитательной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)



Т.М. Литвинова

2023 г.

АКТ

внедрения в учебный процесс

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
результатов диссертационного исследования Павлова Алексея Никитича на тему:
«Разработка состава и технологии получения назальных капель с пролонгированным
высвобождением для лечения болезни Паркинсона»

Мы, нижеподписавшиеся, д.ф.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедры Промышленной фармации ИПО Пятигорская Наталья Валерьевна; академик РАН, д.т.н., профессор кафедры Промышленной фармации ИПО Береговых Валерий Васильевич; д.м.н., профессор кафедры Промышленной фармации ИПО Филиппова Ольга Всеволодовна удостоверяем факт внедрения результатов научной работы Павлова А.Н. в учебный процесс кафедры Промышленной фармации ИПО ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Материалы исследования используются при чтении лекций и проведении семинаров для студентов магистратуры промышленная фармация и при подготовке учебных материалов для слушателей курсов дополнительного профессионального образования.

д.ф.н., профессор, член-корреспондент РАН,
заведующий кафедры Промышленной
фармации ИПО

Н.В. Пятигорская

академик РАН, д.т.н., профессор кафедры
Промышленной фармации ИПО

В.В. Береговых

д.м.н., профессор кафедры Промышленной
фармации ИПО

О.В. Филиппова

к.м.н., начальник Учебного управления

Л.Ю. Юдина

Минздрав России

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)
Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050
Телефон (3822) 53 04 23
Факс (3822) 53 33 09

е
<http://www.ssmu.ru>

ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251
ИНН 7018013613 КПП 701701001

На № 45/В от 03.10.2013

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

канд. мед. наук, доцент

А.О. Окороков



АКТ

внедрения в учебный процесс кафедры фармацевтического анализа результатов диссертационной работы Павлова Алексея Никитича на тему «Разработка состава и технологии получения назальных капель с пролонгированным высвобождением для лечения болезни Паркинсона»,

представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя – заведующего кафедрой фармацевтического анализа, д-ра фарм. наук, профессора Белоусова М.В. и членов: профессора кафедры фармацевтического анализа, д-ра фарм. наук Авдеевой Е.Ю., доцента кафедры фармацевтического анализа, канд. фарм. наук Кадыровой Т.В., удостоверяем, что результаты диссертационного исследования Павлова А.Н., изложенные в главе 4 «Разработка состава и технологии получения назальных капель с пролонгированным высвобождением для лечения болезни Паркинсона» внедрены и используются в процессе обучения ординаторов кафедры фармацевтического анализа в разделе «Фармацевтический анализ».

Председатель

Заведующий кафедрой фармацевтического анализа,
д-р фарм. наук, профессор

Белоусов М.В.

Члены комиссии:

профессор кафедры фармацевтического анализа,
д-р фарм. наук

Авдеева Е.Ю.

доцент кафедры фармацевтического анализа,
канд. фарм. наук

Кадырова Т.В.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по
инновационным проектам
ООО «Тульская фармацевтическая
фабрика», г. Туль. Д. Безчинский



2023 г.

АКТ №

15/09

внедрения результатов научно-исследовательской работы

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе представителей ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» – главный инженер Бирюков А.В., заместитель директора по исследованиям и разработкам Демерлий А.М., начальник отдела обеспечения качества – уполномоченное лицо Ларионов Д.Ю. составили настоящий акт о проведении апробации в условиях производства и контроля качества разработанных аналитических методик для определения лекарственного препарата «Капли назальные на основе ДОФА–ПК».

Данное предложение было разработано в рамках материалов диссертационного исследования по теме: «Разработка состава и технологии получения назальных капель с пролонгированным высвобождением для лечения болезни Паркинсона» в условиях Центральной контрольно-аналитической лаборатории ООО «Тульская фармацевтическая фабрика».

Данное внедрение может быть использовано для разработки проекта нормативного документа по качеству на лекарственный препарат «Капли назальные на основе ДОФА–ПК» для дальнейшего производства на ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» с использованием производственного оборудования.

Главный инженер

А.В. Бирюков

Заместитель директора по исследованиям
и разработкам

А.М. Демерлий

Начальник отдела обеспечения качества
уполномоченное лицо

Д.Ю. Ларионов

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора
по инновационным проектам
ООО «Тульская фармацевтическая
фабрика», к.ф.н. Я.А. Безчинский

«*Семидесять*» 20__ г.

АКТ № *16/09*

внедрения результатов научно-исследовательской работы

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе представителей ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» – главный инженер Бирюков А.В., заместитель директора по исследованиям и разработкам Демерлий А.М., начальник отдела обеспечения качества – уполномоченное лицо Ларионов Д.Ю. составили настоящий акт о проведении апробации в условиях производства технологии получения лекарственного препарата «Капли назальные на основе ДОФА–ПК».

Данное предложение было разработано в рамках материалов диссертационного исследования по теме: «Разработка состава и технологии получения назальных капель с пролонгированным высвобождением для лечения болезни Паркинсона» в условиях производственного участка ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» и может быть использовано для дальнейшего производства.

Главный инженер

А.В. Бирюков

А.В. Бирюков

Заместитель директора по исследованиям
и разработкам

А.М. Демерлий

А.М. Демерлий

Начальник отдела обеспечения качества
уполномоченное лицо

Д.Ю. Ларионов

Д.Ю. Ларионов



Институт Фармацевтических Технологий

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
Генерального директора
АО «Институт фармацевтических
технологий»

Ю.В. Кочкина

2023 г.



АКТ

внедрения результатов научно-исследовательской работы Павлова Алексей Никитича по теме: «Разработка состава и технологии получения назальных капель с пролонгированным высвобождением для лечения болезни Паркинсона»

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе председателя комиссии – директора по науке Панова А.В., членов комиссии: заместителя директора по качеству Карповой А.В., руководителя научно-исследовательской лаборатории Жаворонок Е.С., составили настоящий акт том, что результаты научно-исследовательской работы Павлова Алексея Никитича по теме: «Разработка состава и технологии получения назальных капель с пролонгированным высвобождением для лечения болезни Паркинсона» внедрены в производственный процесс АО «Институт фармацевтических технологий».

Председатель комиссии

Директор по науке

к.х.н. Панов А.В.

Члены комиссии:

Заместитель
директора по качеству
А.С.

к.фарм.н. Карпова

Руководитель
научно-исследовательской лаборатории
Е.С.

д.х.н. Жаворонок

ПРИЛОЖЕНИЕ В**ПРОЕКТ ТИТУЛЬНОГО ЛИСТА НОРМАТИВНОГО ДОКУМЕНТА ПО
КАЧЕСТВУ ЛС «ДОФАМИНИН»**

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ НОРМАТИВНОГО ДОКУМЕНТА ПО КАЧЕСТВУ

СОГЛАСОВАН**УТВЕРЖДЕН**(наименование уполномоченного органа
государства признания)(наименование уполномоченного органа
референтного государства)_____
(Ф.И.О., должность, подпись)_____
(Ф.И.О., должность, подпись)

" " 20 г.

" " 20 г.

М.П.

М.П.

СОГЛАСОВАН**ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России****(Сеченовский Университет)**(наименование заявителя или
уполномоченного юридического лица)**первый проректор Свистунов А.А.**

(Ф.И.О., должность, подпись)

" " 20 г.

М.П.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТТорговое наименование лекарственного препарата: **Дофаминин**Международное непатентованное наименование: **ДОФА-ПК**Лекарственная форма: **Капли назальные**Держатель регистрационного удостоверения: **ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)**

Номер и дата нормативного документа:

ПРИЛОЖЕНИЕ Г**ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ ПОЛУЧЕНИЯ ЛС
ДОФАМИНИН**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)

УТВЕРЖДАЮ
Первый проректор
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова
Минздрава России
(Сеченовский Университет)
член-корр. РАН, д.м.н., профессор,
А.А. Свистунов

20 марта 2017 г.

**ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ**

ДОФАМИНИН, капли назальные

ОПР 71-2017

шифр «2015-14-N08-0023»

Государственный контракт от 11 июня 2015 г. № 14. N08.12.0038
в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской
Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу»

Москва 2017

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Выдержка из отчета о проведении доклинических исследований

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИННОВАЦИОННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ 3,4-ДИГИДРОКСИ-L-ФЕНИЛАЛАНИНА И ПОЛИЛАКТИДГЛИКОЛИДОВ НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Оценка специфической активности инновационного лекарственного средства с оптимальным составом, и стандартного препарата Леводопа противопаркинсонического действия проводилась с помощью разработанной модели болезни Паркинсона (БП) и батареи поведенческих тестов.

Согласно современным рекомендациям, доклиническое изучение активности потенциальных противопаркинсонических препаратов проводят на моделях паркинсонического синдрома. При фармакологическом моделировании БП обычно прибегают либо к различным способам угнетения дофаминергической (ДА) передачи, прежде всего в нигростриатуме, либо к активации холинэргических (ХЭ) нейронов.

Два типа этих моделей различаются динамикой развития процесса, а также его проявлениям, и рассматриваются как воспроизводящие, соответственно, akinetико-ригидную или дрожательную формы БП.

Поскольку разработанное лекарственное средство на основе 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина (Леводопа) в полилактидгликолиды (PLGA) ориентировано на пролонгированное высвобождение действующего вещества, то необходимой динамике постепенного развития и длительности сохранения моделируемой БП в большей степени соответствует модель с угнетением ДА передачи.

Выбор модели

С целью адекватного формирования БП и последующего её лечения потенциальным антипаркинсоническим средством, была использована фармакологическая модель БП, индуцированная разрушением нигростриарной

дофаминэргической системы нейротоксином 6-гидроксидофамином (6-OHDA), введенным в головной мозг крысы.

Модель с использованием 6-OHDA считается моделью БП у крыс, т.к. они наиболее подвержены действию нейротоксина, хотя проявления его эффектов у крыс и обезьян также были изучены. 6-OHDA вызывает характерное изменение позы животных — поворот головы и девиацию хвоста в направлении поврежденной стороны, а также типичные круговые движения и стереотипии (принюхивание, облизывание, покусывание).

Приготовление препаратов для исследования. Композиционная эмульсия из лиофилизата L-ДОФА (Sigma) в составе полимерных частиц на основе биodeградируемого сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA (Plurac Biochem), 50/50) и вспомогательных веществ (субстанция Леводопа). Размер частиц составлял 250 ± 50 нм, включение действующего вещества – 10 ± 2 %. Для введения крысам линии Wistar стандартный препарат растворяли в 1 % растворе аскорбиновой кислоты до концентрации 3,2 мг/мл, первоначально доводя pH до 2 посредством добавления раствора 1M HCl.

После растворения L-ДОФА pH доводили до 7 с использованием 5M NaOH. Непосредственно перед введением полученный состав доводили до нужной концентрации (по L-ДОФА), чтобы предупредить выход активного вещества до попадания в организм.

Исследование в тесте спонтанной активности передних конечностей

Данный тест предъявлялся через 4 недели после введения 6-OHDA подготовленным животным (n=112) с подтвержденным развитием БП для поиска диапазона эффективных доз с целью их последующего применения при интраназальном введении. Контролем служили крысы (n=7), оперированные по указанной схеме, которым не вводили 6-OHDA, но получавшие эквивалентное количество стерильного физиологического раствора.

Введение препаратов и дозировки

Все препараты вводили ежедневно, назально, при помощи автоматической пипетки. Объем введения составлял 40 мкл (по 20 мкл в каждый носовой проход),

расчёт предъявляемых доз производили в пересчёте на действующее вещество.

Для контроля физического состояния животных проводили еженедельное взвешивание. Эффективность однократного введения испытуемого препарата Леводопа в дозах 0,1-1 мг/кг (в пересчете на действующее вещество) и препарата сравнения L-ДОФА (прототип) в тех же дозах оценивали при тестировании животных в следующем режиме: непосредственно перед введением препаратов, через 30 мин, после курсового введения через 3 суток и через 7 суток ежедневных назальных введений сравниваемых препаратов.

Пример 1. Регистрация спонтанной активности передних конечностей

Данный тест предъявлялся через 4 недели после введения 6-OHDA для поиска диапазона эффективных доз с целью их последующего применения при интраназальном введении. Результаты, полученные в тесте спонтанной активности передних конечностей, сведены в таблицу 1.

Результаты тестирования животных после ежедневного введения препаратов в течение 3 дней показали, что во всём диапазоне испытанных доз показатель приближения к норме после введения Леводопа всегда был больше, чем в контрольной группе без лечения БП. Превышение над результатами группы прототипа наблюдалось при дозах не меньше 0,2 мг/кг ($D > 0,3$ мг/кг). Результаты выполнения теста контрольными животными с БП достоверно отличались от результатов группы оперированного контроля ($p < 0,05$).

Оптимальными для терапии модельной БП при однократном и курсовом трехдневном введении можно считать дозы 0,3-0,5 мг/кг, поскольку повышение доз до 1,0 мг/кг, т.е. в 2-3 раза, не сопровождалось дальнейшим повышением процента правильных решений. Данные, полученные после ежедневного введения препаратов в течение 7 дней, подтверждают такое заключение.

Положительные результаты в последствии введения сравниваемых препаратов были более выражены и имели меньший разброс при введении препарата ДОФА-ПК, чем при введении прототипа L-ДОФА, во всём диапазоне испытанных доз 0,1-1 мг/кг.

Таблица 1 – Влияние сравниваемых препаратов на процентное отношение числа касаний лапки поврежденной стороны (КЛПС) к общему количеству контактов (ОКК)

Группы	Данные в среднем по группе (M±m, %)							
	Контроль - оперированные крысы (n=7)							
30 мин	50±3,7	50±3,7	50±3,7	50±3,7	50±3,7	50±3,7	50±3,7	50±3,7
3 дня	51±4,4	51±4,4	51±4,4	51±4,4	51±4,4	51±4,4	51±4,4	51±4,4
7 дней	51±4,9	51±4,9	51±4,9	51±4,9	51±4,9	51±4,9	51±4,9	51±4,9
Контроль - БП без лечения (n=7)								
30 мин	9,2±2,7	9,2±2,7	9,2±2,7	9,2±2,7	9,2±2,7	9,2±2,7	9,2±2,7	9,2±2,7
3 дня	8,6±4,1	8,6±4,1	8,6±4,1	8,6±4,1	8,6±4,1	8,6±4,1	8,6±4,1	8,6±4,1
7 дней	7,8±2,7	7,8±2,7	7,8±2,7	7,8±2,7	7,8±2,7	7,8±2,7	7,8±2,7	7,8±2,7
Продолжительность лечения	Дозы, мг/кг							
	0,1 (n=7)	0,2 (n=7)	0,3 (n=7)	0,35 (n=7)	0,4 (n=7)	0,5 (n=7)	1,0 (n=7)	
Лечение - БП Леводопа (L-ДОФА)								
30 мин	13,5±10,9	17,8±12,4	18,5±7,8	32,1±7,9	35,7±7,2	31±9,2	30±9,2	
3 дня	31±9,2	32,1±7,9	35,0±4,6	35,0±5,3	37,8±3,6	41,4±5,1	42,1±5,2	
7 дней	41,4±5,1	42,1±4,5	43,5±5,4	44,2±3,1	43,8±5,8	45,7±4,1	46,4±3,4	
Лечение - БП ДОФА-ПК								
30 мин	20±9,2	25±9,6	36,43±5,0	40,7±5,6*	37,8±3,6	42,1±5,2	42,1±5,8*	
3 дня	45,7±4,1	46,4±3,4*	47,8±2,4	49,2±3,0*	48,6±2,2*	49,2±1,7*	49,2±1,7*	
7 дней	49,3±1,7*	49,6±1,9*	50±3,7*	50,1±3,4*	49,3±3,4*	50±3,7*	50±3,7*	
			*P < 0,05					

Наряду с этим необходимо отметить, что лечебный эффект семидневного курса лечения сопровождался повышением показателя правильных реакций (касание стенок цилиндра) до уровня «норма», выявленного в группе «оперированный контроль», - до уровня крыс, которым не вводился 6-ОНДА и, в этом смысле, по сохранности дофаминэргической системы – до уровня интактных животных. Такой результат наблюдался практически во всём диапазоне испытанных доз 0,1-1 мг/кг и сохранялся спустя 24 часа от момента последнего введения препаратов ДОФА-ПК, но не прототипа L-ДОФА, что свидетельствует о высокой специфической активности и чётком терапевтическом эффекте разработанного средства. Диапазон испытанных доз 0,1-1 мг/кг может рассматриваться как терапевтический или как терапевтическая широта препарата ДОФА-ПК, поскольку сопровождался положительным эффектом при низких дозах (0,1 -0,3 мг/кг) и хорошей переносимостью при более высоких дозах (0,35-1 мг/кг). По комплексу показателей: необходимая и достаточная эффективность при

однократном (разовом) и многократном курсовом введении, хорошая переносимость, пролонгация лечебного эффекта после отмены курса терапии, а также технических сложностях возникающих при дробном введении доз больших 0,4 мг/кг, для дальнейшего экспериментального исследования была выбрана доза 0,35 мг/кг. Необходимо отметить, что эта доза при переносе её значения согласно правилам межвидового переноса с крысы на человека будет соответствовать среднему значению разовой терапевтической дозе, рекомендуемой для человека.

Пример 2. Исследование в тесте «Постановка конечности»

В ходе экспериментов введение препаратов начинали с 5-й недели после операции, после подтверждения развития БП у крыс. Животным контрольных групп вводили не нагруженную L-ДОФА эмульсию. Животные были разделены на 4 группы (n=10) на основе результатов теста «Постановка конечности» таким образом, чтобы средние результаты выполнения теста не различались для всех групп с БП. Все препараты вводили ежедневно, назально, при помощи автоматической пипетки. Объем введения составлял 40 мкл (по 20 мкл в каждый носовой проход), расчёт предъявляемых доз производили в пересчёте на действующее вещество. Для контроля физического состояния животных проводили еженедельное взвешивание.

Тест «Постановка конечности» проводили еженедельно в течение всего периода введения препаратов. Животных тестировали дважды - непосредственно до введения препаратов и через 30 минут после их введения. Тестирование животных в таком режиме при хроническом введении позволяло выявить эффективность действия препарата непосредственно после введения и изучить действие препаратов через сутки после введения. Через 5 недель после операции, до начала введения препаратов, результаты тестирования групп животных с индуцированной БП не превышали 75 % от результатов группы интактного контроля, различия были достоверны ($p < 0,05$). Эффективность однократного введения испытуемого препарата ДОФА-ПК в дозе 0,35 мг/кг (в пересчете на действующее вещество) и препарата сравнения L-ДОФА (прототип) в дозе 0,35 мг/кг исследовали при тестировании животных непосредственно перед введением

препаратов, через 30, 60 и 180 минут после введения препаратов. Результаты сведены в таблицу 2.

Таблица 2 – Результаты теста «Постановка конечности», динамика изменения количества успешных попыток после введения исследуемых препаратов при однократном введении. Данные представлены в % от результатов интактного контроля

№№	Группы	Время, мин			
		30	60	120	180
1	Контроль интактный (n=10)	100±4 %	100±5 %	100±7 %	100±5 %
2	Контроль БП без лечения (n=10)	69±14 %	66±18 %	71±17 %	73±15 %
3	Лечение БП Леводопа (n=10)	88±5 %	82±9 %	79±11 %	76±8 %
4	Лечение БП ДОФА-ПК (n=10)	73±21 %	75±19 %	78±13 %	80±11 %
	P <0,05				

Из представленных данных видно, что через 30 минут после введения препаратов среднее количество успешных попыток постановки конечности составляло 100±4 % для интактного контроля, 69±14 % для контроля БП, 88±5 % для группы, получающей L-ДОФА и 73±21 % для группы ДОФА-ПК. Через час после введения результаты были следующими: 100±5 %, 66±180 %, 82±90 % и 75±19 % соответственно. Достоверные различия были выявлены между результатами группы контроля БП и группы, получавшей L-ДОФА ($p < 0,05$), через 30 и 60 минут после введения препарата. Через 180 минут после введения препаратов, результаты всех групп животных с БП не отличались между собой, но в группе ДОФА-ПК наметился тренд к повышению количества успешных попыток постановки конечности.

Таким образом, эффект однократного введения стандартного препарата продолжался не более часа, действие ДОФА-ПК не привело к значимым изменениям в координации движения крыс. Различия в эффекте исследуемых препаратов можно объяснить замедленным высвобождением лекарственного средства из полимерных частиц ДОФА-ПК, что не позволяет достичь эффективной концентрации при однократном введении. В то же время действие препарата сравнения достоверно увеличивает количество успешных попыток при выполнении теста через 30 минут после введения L-ДОФА с полным

исчезновением эффекта к 180 минуте.

Тестирование животных после ежедневного введения препаратов в течение 7 дней проводили по той же схеме, что и после однократного введения - непосредственно перед введением препаратов, затем через 30, 60 и 180 минут после их введения. В среднем количество успешных попыток постановки конечности до введения препаратов составляло 100 ± 6 % для интактного контроля, 60 ± 17 % для контроля БП, 65 ± 15 % для группы, получающей L-ДОФА, и 80 ± 19 % для группы ДОФА-ПК. Результаты выполнения теста контрольными животными с БП достоверно отличались от результатов группы интактного контроля ($p < 0,05$). Достоверные различия были выявлены между группой контроля БП и группой, получавшей ДОФА-ПК ($p < 0,05$). Результаты исследования зафиксированы в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты теста «Постановка конечности», динамика изменения количества успешных попыток после семидневного курса введения исследуемых препаратов. Данные представлены в % от результатов интактного контроля, планки погрешностей отражают стандартное отклонение

№№	Группы	Время, мин			
		Фон	30	60	180
1	Контроль интактный (n=10)	100 ± 6 %	100 ± 5 %	100 ± 7 %	100 ± 8 %
2	Контроль БП без лечения (n=10)	60 ± 17 %	69 ± 18 %	66 ± 11 %	67 ± 16 %
3	Лечение БП Леводопа (n=10)	65 ± 15 %*	80 ± 21 %*	71 ± 10 %	70 ± 12 %
4	Лечение БП ДОФА-ПК (n=10)	80 ± 19 %*	83 ± 7 %*	85 ± 15 %*	89 ± 11 %*
	P < 0,05				

Важно отметить, что во все исследованные интервалы времени после введения препарата достоверные отличия в результатах теста были обнаружены только после введения ДОФА-ПК. У группы животных, получавших L-ДОФА, достоверных отличий результатов теста от таковых у группы контроля БП зафиксировано не было.

Нивелирование эффекта от введения препарата сравнения можно объяснить следующим образом: суточная доза стандартного препарата L-ДОФА в данном эксперименте равна 0,35 мг/кг, что в 60 раз ниже минимальной терапевтической

суточной дозы (в пересчете на человека).

Можно предположить, что мы наблюдаем характерный для терапии Леводопой эффект истощения дозы, который является одной из ключевых проблем использования препарата в клинике и проявился столь быстро из-за использования малых доз препаратов.

Важно отметить, что введение ДОФА-ПК в течение 7 дней приводило к улучшению координации движений у животных с БП вплоть до очередного введения препарата, то есть эффект сохранялся в течение 24 часов после предыдущего введения.

При этом эффект был максимальным в течение 180 мин после введения (89 % от результата интактного контроля), но несколько уменьшался через 24 часа после введения (83 % от результата интактного контроля при тестировании до очередного введения препарата).

Результаты сведены в таблицу 4.

Таблица 4 – Результаты теста «Постановка конечности», динамика изменения количества успешных попыток на фоне 120-дневного курса хронического введения и через 30 минут после введения исследуемых препаратов. Данные представлены в % от результатов интактного контроля, планки погрешностей отражают стандартную ошибку среднего

№№	Группы	Дни			
		Фон	30	60	180
1	Контроль интактный (n=10)	100±6 %	100±5 %	100±7 %	100±8 %
2	Контроль БП без лечения (n=10)	54±9 %	57±10 %	66±11 %	57±12 %
Дни на фоне лечения					
3	Лечение БП Леводопа (n=10)	65±12 %*	80±11 %*	71±10 %	62±13 %
4	Лечение БП ДОФА-ПК (n=10)	80±19 %*	83±7 %*	85±15 %*	94±5 %*
*P <0,05					

Тестирование животных после хронического курса ежедневного введения препаратов в течение 120 дней выявило значительное снижение способности к выполнению теста в контрольной группе животных с БП до 51±12 % от интактного контроля.

Похожая динамика наблюдалась и для результатов группы животных,

получавших L-ДОФА: к 120 дню лечения результаты выполнения теста через 30 минут после введения препарата составили 62 ± 13 % от результата группы интактного контроля. В то же время результаты группы, получавшей ДОФА-ПК, составили 94 ± 5 % и были достоверно выше по сравнению с животными как группы контроля БП ($p < 0,05$), так группы, получавшей препарат прототипа, что наблюдалось на протяжении всего периода ежедневной терапии. Как показал анализ данных тестирования и наблюдений, полученных в процессе 180-дневного курса терапии, уже через неделю ежедневного введения ДОФА-ПК проявились преимущества разработанного средства по сравнению со стандартным препаратом L-ДОФА. Возможно, различия в эффекте связаны со стабилизацией концентрации препарата, капсулированного в PLGA, на терапевтическом уровне.

Координация движений у животных в группе ДОФА-ПК была достоверно лучше по сравнению с животными в группе контроля БП ($p < 0,05$) начиная с 7 дня терапии и в течение всего остального приема препаратов. С 14 дня терапии и в последующие дни результаты в группе ДОФА-ПК также достоверно отличались от результатов группы L-ДОФА ($p < 0,05$).

При этом отличия наблюдали как через 30 минут, так и через 24 часа после введения препаратов. Уже через три недели ежедневного использования ДОФА-ПК через 30 мин после введения препарата способность животных выполнять тест достоверно не отличалась от результатов животных группы интактного контроля.

Отсутствие различий сохранялось вплоть до отмены препарата, что свидетельствует о полном восстановлении исследуемых моторных функций животных после введения ДОФА-ПК в составе полимерных частиц, но не прототипа - L-ДОФА. Важно еще раз подчеркнуть, что выраженный терапевтический эффект ДОФА-ПК наблюдался не только непосредственно после введения препарата, но и через 24 часа после приема препарата. Данный факт указывает на компенсацию недостатка дофамина и стабилизацию его уровня в мозге.

Кроме того, эффект препарата сохранялся как минимум неделю после его отмены и полностью исчезал только через месяц после прекращения терапии.

Результаты эксперимента сведены в таблицу 5.

Таблица 5 – Результаты теста «Постановка конечности», динамика изменения количества успешных попыток на фоне 180-дневного курса хронического введения и через 30 минут после введения исследуемых препаратов. Данные представлены в % от результатов интактного контроля, планки погрешностей отражают стандартную ошибку среднего

№№	Группы	Дни						
		15	30	60	90	120	180	195
1	Контроль интактный (n=10)	100±9 %	100±6 %	100±5 %	100±7 %	100±8 %	100±7 %	
2	Контроль БП без лечения (n=10)	70±7 %	54±9 %	57±10 %	66±11 %	67±16%	53±16 %	
Дни на фоне лечения								Отмена лечения
3	Лечение БП Леводопа (n=10)	65±15%*	65±15%*	67±21%*	61±10 %	60±12 %	59±6 %	57±7 %
4	Лечение БП ДОФА-ПК (n=10)	80±8%*	94±19%*	97±7 %*	100±5%*	94±5 %*	95±7 %*	78±5 %*

Пример 3. Исследование животных в тесте «Открытое поле»

Тест «Открытое поле» проводили дважды - непосредственно перед началом терапии и через 6 недель после начала терапии. Данный тест используют для оценки возможных последствий введения препарата на двигательную и исследовательскую активность экспериментальных животных в условиях свободного поведения в экстремальных для них условиях. Поведение крыс исследовалось в «открытом поле» в соответствии с общепринятыми стандартами. «Открытое поле» - квадратная равномерно освещенная площадка размером 100x100 см, огороженная непрозрачными стенками высотой 40 см. Пол «открытого поля» расчерчен на квадраты.

Методика «Открытое поле» - классическая испытательная система для изучения поведения животных в незнакомой обстановке, основанная на конфликте

двух доминирующих мотиваций в незнакомом пространстве - инстинктивной тенденции к исследованию нового окружения и тенденции минимизировать возможную опасность со стороны такового.

Тест «Открытое поле» является информативной методикой, позволяющей, в частности, адекватно оценивать нейротропные, психостимулирующие эффекты действия фармакологических средств. В этом тесте оцениваются двигательная и ориентировочно-исследовательская активность, а также эмоциональная реакция страха, возникающая при изучении незнакомого пространства.

Для испытания крысы по одной помещались на 2 минуты в центр ярко освещённой разграфлённой круглой площадки. Учитывались следующие показатели: горизонтальная активность (количество пересечённых секторов), вертикальная активность (число стоек), акты выхода в центр поля, количество актов груминга, заглядываний, количество фекальных болюсов.

По соотношению регистрируемых показателей в контрольных и испытуемых группах судили о характере влияния веществ на психоэмоциональное состояние (тревога, страх) и на уровень ориентировочно исследовательской активности. Усиление тревожности отражается в увеличении количества фекальных болюсов и снижении показателей исследовательской активности. Перед испытанием в «открытом поле» за 60 минут до тестирования животных помещали в тихое, слабо освещенное помещение. В этот период исключались любые активные манипуляции.

До начала терапии экспериментальные группы животных не различались ни по одному из регистрируемых параметров. Тестирование через 6 недель после начала терапии выявило достоверное увеличение количества стоек в группе животных получающих ДОФА-ПК по сравнению как с интактным контролем, так и с контрольной группой с БП до 162 ± 75 % ($p < 0,05$). Достоверное увеличение вертикальной активности животных свидетельствует о повышении исследовательской активности, снижении тревожности и улучшении общего эмоционального состояния животных.

Введение препарата L-ДОФА в той же дозе не привело к достоверному

изменению активности животных. Кроме того, выявлено достоверное снижение среднего количества актов груминга у группы животных, получающих ДОФА-ПК, по сравнению с группой интактного контроля ($p < 0,05$). Среднее значение количества актов груминга для группы ДОФА-ПК составил 22 ± 23 % от результата интактного контроля.

Введение L-ДОФА в той же дозе не приводило к достоверному изменению количество актов груминга у животных. Поскольку в течение эксперимента достоверных различий между контрольными группами выявлено не было, наблюдаемое достоверное изменение количества актов груминга у группы, получавшей препарат ДОФА-ПК следует отнести к собственному, не связанному с развитием БП, действию препарата, приводящему к снижению тревожности и ускорению принятия решений в новых для животного условиях.

Пример 4. Исследование животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Тест и установка «Приподнятый крестообразный лабиринт» предназначены для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности (при свободном выборе комфортных условий) и позволяет оценить: уровень тревожности животного (по предпочтению темноты/света, боязни высоты, выраженности и динамике поведения «выглядывания»); симптомы неврологического дефицита; привыкание.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» проводили однократно, через 11 недель после начала терапии. Исследование выявило достоверные различия только между группами контроля БП и группы, получавшей ДОФА-ПК по снижению количества актов автогруминга до 50 % от значения группы интактного контроля ($p < 0,05$), что воспроизводит результаты, полученные в тесте «Открытое поле».

Резкое снижение уровня автогруминга в группе, получавшей ДОФА-ПК наряду с повышением уровня исследовательской активности в открытом поле и со снижением уровня дефекаций рассматривается как подавление уровня тревожности и страха.

Результаты испытаний ДОФА-ПК в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» позволяют заключить, что комплексное повышение исследовательских компонентов поведения и снижение показателей психоэмоционального напряжения, уровня страха в стрессогенной среде, указывают на восстановление дофаминэргических функций под влиянием ДОФА-ПК, что говорит о фармакологическом эффекте испытанной дозы. При сравнительной оценке действия препаратов установлено, что выявленный сдвиг в направлении повышения психоэмоциональной устойчивости и усиления исследовательского поведения более выражен при назальном введении ДОФА-ПК, чем при введении препарата сравнения L-ДОФА.

Других достоверных различий в поведении животных по регистрируемым в тесте параметрам выявлено не было.

Пример 5. Тест «Передвижение по горизонтальной сетке»

Исследования в тесте «Передвижение по горизонтальной сетке» позволяют дать сравнительную оценку степени сохранности локомоторных и сложно координированных двигательных реакций у животных с повреждённой дофаминэргической нигростриарной системой относительно поведения интактных животных. Животные по одному помещались в центр горизонтальной квадратной сетки-экрана (1x1м) на 4 минуты, определялось количество шагов каждой из конечностей по горизонтальной сетке и процент ошибок при постановке каждой из конечностей. Было проведено однократное исследование животных через 30 и 60 дней терапии с анализом количества шагов каждой из конечностей по горизонтальной сетке, процента ошибок при постановке каждой из конечностей и коэффициента асимметрии через 30 мин после введения препаратов. Количество шагов как левой, так и правой ногой достоверно не отличалось у животных всех групп.

Процент ошибок при постановке левой конечности составлял $7,5 \pm 4,8$ % для интактного контроля, $14,2 \pm 6,7$ % для контроля БП, $12 \pm 5,9$ % для группы, получающей Леводопу, и $9,9 \pm 3,4$ % для группы ДОФА-ПК. Процент ошибок группы контроля БП достоверно отличался от такового у интактного контроля в

два раза ($p < 0,05$), результаты группы, получавшей ДОФА-ПК, а также группы, получавшей препарат сравнения, от интактного контроля достоверно не отличались. При исследовании процента ошибок при постановке правой конечности достоверных различий между группами обнаружено не было.

Коэффициент асимметрии через 30 минут после введения препаратов составлял $0,9 \pm 4,6$ % для интактного контроля, $5,8 \pm 4,9$ % для контроля БП, $6,7 \pm 3,3$ % для группы, получающей Леводопу, и $1,3 \pm 4,3$ % для группы ДОФА-ПК (представлены абсолютные значения параметра). Коэффициенты асимметрии групп контроля БП и L-ДОФА достоверно отличались от такового группы интактного контроля ($p < 0,05$) и группы ДОФА-ПК. Коэффициент асимметрии группы животных, получавшей ДОФА-ПК, был наиболее близок к значению группы интактного контроля и достоверно отличался от контроля БП и группы L-ДОФА.

Полученные результаты теста «Передвижение по горизонтальной сетке» полностью согласуются с результатами, полученными в тесте «Постановка конечности» и подтверждают как наличие моторных дисфункций у животных с индуцированной БП, так и значимо более высокую эффективность назальной терапии ДОФА-ПК по сравнению со стандартным препаратом в той же дозе.

Результаты эксперимента сведены в таблицу 6.

Таблица 6 – Процент ошибок при постановке левой конечности теста «Передвижение по горизонтальной сетке»

№	Группы	Время, мин	
		30	60
1	Контроль интактный (n=10)	$7,5 \pm 4,8$ %	$6,7 \pm 4,1$ %
2	Контроль БП без лечения (n=10)	$14,2 \pm 6,7$ %	$17,3 \pm 7,2$ %
3	Лечение БП Леводопы (n=10)	$12 \pm 5,9$ %	$11 \pm 4,6$ %
4	Лечение БП ДОФА-ПК (n=10)	$9,9 \pm 3,4$ %	$7,6 \pm 4,2$ %

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во всех проведенных тестах отсутствие достоверных отличий при манипуляции правой конечностью объясняется односторонним характером повреждений *s. nigra* в используемой модели БП, влияющим в основном на возможности противоположной поврежденной части мозга стороны тела.

Техническим результатом были установлены пролонгированность действия и биодоступность, а именно после получения и экспериментального обоснования модели БП, вызванная внутримозговым введением 6-гидроксидофамина крысам. Новая фармацевтическая композиция показала следующее:

- Интраназальное введение ДОФА-ПК в дозах 0,1 – 1,0 мг/кг по L-ДОФА привело к достоверному улучшению координации движений животных с БП в тесте «Цилиндр-касания передних конечностей» через трех- и семидневные курсы ежедневного назального введения. Установлены оптимальные терапевтические дозы лечения для данного теста.

- Курсовое интраназальное введение ДОФА-ПК в дозе с 0,25 мг/кг по L-ДОФА привело к достоверному улучшению координации движений животных с БП через неделю ежедневного назального введения. Терапевтический эффект сохранялся в течение всего периода введения, начиная с 7 дня, и через неделю после отмены препарата.

- Обнаружено пролонгированное действие ДОФА-ПК, которое выразилось в сохранении эффективности препарата через 24 часа после однократного введения и на протяжении всего периода лечения, в отличие от стандартного препарата, эффективность действия которого снижалась по мере курсового введения.

- Обнаруженное влияние ДОФА-ПК на психоэмоциональное состояние животных, приводящее к уменьшению тревожности и увеличению исследовательского интереса, является собственным эффектом препарата и может быть полезным для улучшения самочувствия пациентов при лечении БП.