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

Бариев Эдуард Альфитович

РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НАЛОКСОНА ГИДРОХЛОРИДА В ВИДЕ СПРЕЯ

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ
кандидат фармацевтических наук,
Бардаков А.И.

Москва 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 12
1.1 Фармакологическое действие антагониста опиоидных рецепторов налоксона 12
1.2 Побочные действия, возникающие при применении инъекционного раствора налоксона 14
1.3 Современные аспекты интраназального введения лекарственных форм 18
1.4 Современная упаковка лекарственных форм для интраназального введения в форме спреев 20
1.5 Оценка качества лекарственной формы «назальный спрей» 23
Выводы к главе 1 28
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 29
2.1 Физико-химические свойства субстанции налоксона гидрохлорида 29
2.2 Вспомогательные вещества, использованные при разработке состава и технологии производства назального спрея налоксона 29
2.3 Методики определения физико-химических характеристик и показателей качества нерасфасованных модельных растворов налоксона 31
2.3.1 Методика определения поверхностного натяжения 32
2.3.2 Методика определения кинетики абсорбции воды растворами 33
2.3.3 Методика определения реологических свойств растворов 33
2.3.4 Методика определения эффективности антимикробного действия консервантов 33
2.3.5 Методика определения микробиологической чистоты 40
2.4 Методики определения показателей качества расфасованного 41

препарата налоксона спрея назального

2.4.1 Методика определения высвобождения налоксона из модельных растворов 43

2.4.2 Методика количественного определения налоксона гидрохлорида и пропиленгликоля в растворе 43

2.4.3 Методика определения содержания пропиленгликоля в диализате 48

2.4.4 Методика проверки упаковки на герметичность 48

2.4.5 Методика проверки насоса-дозатора 48

2.4.6 Методика определения средней массы доставляемой дозы 48

2.4.7 Методика определения количества извлекаемых доз 49

2.4.8 Статистические методы исследования 49

Выводы к главе 2 50

3 РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА НАЗАЛЬНОГО СПРЕЯ НАЛОКСОНА ГИДРОХЛОРИДА 51

3.1 Программа исследований по разработке назального спрея налоксона 51

3.2 Обоснование выбора интраназального пути введения налоксона для лечения передозировки опиоидами 54

3.3 Обоснование дозы налоксона гидрохлорида в разрабатываемой лекарственной форме 63

3.4 Обоснование выбора вспомогательных веществ и технологии назального спрея налоксона 66

3.4.1 Подбор поверхностно-активного вспомогательного вещества и определение поверхностного натяжения модельных растворов 67

3.4.2 Подбор состава активаторов всасывания 69

3.4.3 Подбор регуляторов величины pH раствора налоксона 77

3.5 Оценка показателей качества назального спрея налоксона гидрохлорида 79

3.5.1 Результаты исследования эффективности антимикробного действия консерванта в составе назального спрея налоксона 80
3.5.2 Оценка микробиологической чистоты назального спрея налоксона 83
3.5.3 Определение плотности раствора налоксона 85
3.5.4 Реологические свойства раствора налоксона 87
3.5.5 Определение осмоляльности модельного раствора налоксона 88
3.6 Выбор насосов-дозаторов и насадок распылителей и исследование их влияния на технологические характеристики налоксона спрея назального 89
3.7 Технологическая схема производства налоксона спрея назального 103
3.8 Разработка аналитических методик определения показателей качества налоксона спрея назального 111
3.9 Исследование стабильности в процессе хранения назального спрея налоксона 124
Выводы к главе 3 128
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ 130
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 132
ПРИЛОЖЕНИЯ 147
Приложение 1 147
Приложение 2 149
Приложение 3 152
Приложение 4 153
Приложение 5 154
Приложение 6 162
Приложение 7 174
Приложение 8 186

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы Наркомания является серьезной медико-социальной проблемой, имеющей широкое распространение и приводящая к тяжелым последствиям. Одним из таких последствий является интоксикация наркотическими веществами, чаще всего приводящая к летальному исходу. На сегодняшний день задача эффективной неотложной помощи при интоксикациях наркотическими веществами стоит достаточно остро. По данным Всемирной организации здравоохранения число лиц, страдающих опиоидной зависимостью, в мире составляет примерно 15 миллионов человек [142]. В России по сообщению экс-главы Федеральной службы Российской Федерации по контролю за оборотом наркотиков В.П. Иванова ежегодно от передозировки наркотическими веществами умирают 70 тысяч человек, а наркозависимыми становятся 86 тысяч россиян [28]. Средний возраст подростка, начинающего употреблять наркотики, - от 15 до 17 лет и постепенно сдвигается в сторону омоложения.

Основная доля наркотических веществ, приводящих к интоксикациям и, как следствие, к летальному исходу наркозависимых, относится к опиоидам. Данная группа наркотических веществ вызывает быстрое привыкание. Наиболее быстро зависимость развивается при употреблении героина – уже после 3-5-го применения. Лечение тяжёлых форм наркомании (пристрастие к героину) в большинстве случаев не приводит к успеху, что объясняет частые случаи интоксикации у героиновых наркоманов [44, 57, 121, 130, 134].

В клинической наркологии и токсикологии в качестве антидота при тяжелой интоксикации опиоидами широко используется налоксон – антагонист опиоидных рецепторов. В настоящее время налоксон применяется в форме инъекционного раствора для внутривенного и внутримышечного введения. При инъекционном применении налоксон устраняет действие как эндогенных опиоидных пептидов, так и экзогенных опиоидных анальгетиков; при этом налоксон снимает симптомы угнетения дыхания, уменьшает седативное и

эйфоризирующее действие, ослабляет гипотензивный эффект, вызванные применением героина и других опиатов.

При необходимости оказания быстрой доврачебной неотложной помощи при острой интоксикации опиоидами инъекционный способ введения налоксона не всегда доступен и технически сложен, кроме того связан с высоким риском ВИЧ-инфицирования медицинских работников. Пероральное применение налоксона малоперспективно, ввиду его низкой биодоступности.

Актуальной проблемой является разработка лекарственной формы, содержащей в качестве действующего вещества налоксон, обладающей системным действием при введении ее не парентеральным путем. Одним из подходящих путей введения лекарственного средства, способным вызвать системное действие является интраназальное применение. Данный путь введения технически прост и лишен рисков, возникающих при парентеральном пути введения. В связи с этим, перспективным становится разработка состава и технологии производства назальной лекарственной формы налоксона.

Степень разработанности темы исследования

До проведения настоящих исследований работа по созданию интраназального препарата налоксона гидрохлорида в отечественной практике не проводилась.

На фармацевтическом рынке представлено незначительное количество лекарственных средств с интраназальным путем введения, обладающих системным действием. Данные лекарственные средства применяются при вакцинопрофилактике, лечение мигрени, заместительной гормонотерапии. Несмотря на простоту введения данных лекарственных форм, лишь небольшое количество активных фармацевтических субстанций было включено в их состав. Как следствие этого – недостаточно систематизированы критерии включения фармацевтических субстанций в назальные лекарственные формы.

Цель исследования

Целью диссертационной работы является проведение комплекса исследований по разработке состава и технологии производства лекарственной формы налоксона гидрохлорида в виде назального спрея.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Обосновать возможность получения лекарственной формы с интраназальным путем введения – назального спрея налоксона;
2. Обосновать выбор вспомогательных веществ с учётом их физико-химических характеристик и разработать состав назального спрея налоксона;
3. Разработать технологию получения назального спрея налоксона;
4. Обосновать выбор упаковки лекарственной формы;
5. Разработать методики анализа лекарственной формы налоксона;
6. Исследовать показатели качества разработанной лекарственной формы налоксона;
7. Разработать нормативную документацию (лабораторный регламент на производство, проект нормативной документации на препарат) на лекарственную форму налоксона.

Научная новизна работы

С использованием экспериментальных методов впервые разработан и научно обоснован состав лекарственной формы налоксона гидрохлорида в виде назального спрея. Подобраны вспомогательные вещества, обеспечивающие наиболее полное высвобождение налоксона гидрохлорида из лекарственной формы *in vitro*. Исследованы физико-химические свойства разработанного состава налоксона спрея назального и по полученным результатам подобрана упаковка для готовой лекарственной формы.

Разработана технологическая схема производства налоксона спрея назального. Согласно требованиям GMP выявлены и оценены все критические точки технологического процесса.

In vitro изучено высвобождение налоксона гидрохлорида из разработанной лекарственной формы – назального спрея, что позволит в дальнейшем получить примерную модель высвобождения налоксона гидрохлорида *in vivo*. На основании проведенных исследований определено содержание фармацевтической субстанции налоксона гидрохлорида в одной дозе назального спрея. Разработана методика определения микробиологической чистоты и эффективности антимикробного действия вспомогательных веществ в составе назального спрея налоксона гидрохлорида. Оценена стабильность назального спрея налоксона и определен его срок годности.

Приоритет исследований подтверждает патент на изобретение «Фармацевтическая композиция в виде назального спрея на основе налоксона гидрохлорида и способ ее получения» (№ 2572217 от 21.10.2013 года).

Теоретическая значимость работы

Произведена оценка литературных данных, касающихся применения налоксона для купирования симптомов передозировки опиоидами. Определены подходы к выбору пути введения налоксона гидрохлорида и технологии получения спреев назальных, оказывающих системное действие. Определены подходы к выбору упаковки для назальных спреев.

Практическая значимость исследований

На основании проведенных исследований разработаны:

- Состав назального спрея налоксона гидрохлорида (НД на «Налоксон спрей назальный»;
- Методики анализа лекарственной формы налоксона (отчеты о валидации аналитических методик);
- Технология получения препарата «Налоксон спрей назальный» (лабораторный регламент на производство лекарственного препарата, апробирован на опытно-промышленном производстве ОАО «Мосхимфармпрепараты» имени Н.А. Семашко»).

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили труды российских и украинских ученых в области разработки научных основ получения лекарственных форм в виде аэрозолей – Ляпунова Н.А., Мизиной П.Г., Рудаковой И.П., Павлова В.М., Митькиной Л.И. и др. В работе использованы методы фармакопейного анализа, включенные в Государственную Фармакопею РФ XIII издания. Также были учтены требования и рекомендации, представленные в руководствах под редакцией В.В. Береговых: «Валидация аналитических методик для производителей лекарств», Н.В. Юргеля и др.: «Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств», С.Н. Быковского и др.: «Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов».

При проведении исследования использованы:

- метод создания и редактирования документов, объектно-документальный анализ, патентный поиск;
- химико-фармацевтические методы: потенциометрия, УФ-спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, ротационная вискозиметрия;
- фармакопейные методы анализа лекарственных форм;
- статистические методы анализа и обработки результатов, полученных в ходе экспериментальной работы.

Степень достоверности результатов

При проведении экспериментальной работы использовано сертифицированное современное оборудование, методом статистической обработки установлена воспроизводимость и правильность результатов исследований, что позволяет считать их достоверными.

Апробация работы

Материалы научных исследований по теме диссертации были представлены на IV Всероссийской научно–практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» Санкт-Петербург, 9-10 ноября 2016 года

и на I Международной научно-практической конференции «Современная медицина: Традиции и инновации» Ставрополь, 30 ноября 2016 года.

Работа прошла апробацию на кафедре фармацевтической технологии образовательного департамента Института фармации и трансляционной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (29 марта 2017 года).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований внедрены в работу ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н. А. Семашко» (акт о внедрении от 14.11.2016 года), а также в учебный процесс на кафедре фармацевтической технологии Института фармации и трансляционной медицины Мультидисциплинарного центра клинических и медицинских исследований Международной школы «Медицина будущего» ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по дисциплине «Фармацевтическая технология» (акт о внедрении № 09/2017 от 01.09.2017 года).

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач и их реализации до обсуждения результатов в научных публикациях. Диссертантом проведены исследования технологических характеристик модельных смесей; определены технологические показатели качества назального спрея; проведена обработка результатов при обосновании состава лекарственной формы. Разработан состав и технология производства назального спрея. Определены показатели качества лекарственной формы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3 и 4 паспорта специальности технология получения лекарств.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планами научно исследовательских работ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России 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).

Основные положения, выносимые на защиту:

- Результаты исследования физико-химических свойств и показателей качества модельных растворов налоксона гидрохлорида;
- Результаты исследований по разработке, обоснованию состава и технологии получения назального спрея налоксона;
- Результаты изучения профилей высвобождения назального спрея налоксона;
- Результаты изучения микробиологической чистоты и эффективности антимикробного действия вспомогательных веществ в составе назального спрея налоксона.
- Результаты разработки методик анализа лекарственной формы.

Публикации

Материалы диссертации опубликованы в 9 научных работах, из которых 3 являются статьями в журналах, включенных в перечень ведущих периодических изданий ВАК РФ и патентом № 2572217 от 21.10.2013 года.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 189 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), выводов, списка литературы, а также Приложения. Работа иллюстрирована 43 таблицами и 18 рисунками. Библиографический указатель включает 142 источника, из них 114 на иностранных языках.

В Приложениях вынесены титульные листы патента № 2572217 «Фармацевтическая композиция в виде назального спрея на основе налоксона гидрохлорида и способ ее получения», актов внедрения результатов исследований в учебный процесс и производство, проекта нормативной документации, лабораторного регламента, отчетов о валидации аналитических методик, результатов доклинических исследований.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фармакологическое действие антагониста опиоидных рецепторов налоксона

С начала XX века и до настоящего времени одной из важнейших проблем наркологии является наркотическая передозировка, которая влечет за собой высокий уровень смертности среди наркозависимых пациентов [43, 131].

С начала 70-х годов в клинической практике использовались несколько препаратов, обладающих в той или иной степени свойствами антагонистов опиоидных рецепторов (налорфин, циклазоцин, налтрексон, налоксон и др.). Среди них наиболее «чистым» антагонистом, лишенным морфиноподобной активности, является налоксон, получивший разрешение FDA для применения в качестве антидота для лечения передозировки опиоидами (в том числе для устранения угнетения дыхания, вызванного введением больших доз героина у наркоманов) [7, 38, 81]. Налоксон конкурентно связывается с основными типами опиоидных рецепторов и предупреждает или устраняет центральное (в т.ч. угнетение дыхания) и периферическое действие как эндогенных опиоидных пептидов, так и экзогенных опиоидов – наркотических анальгетиков и их суррогатов. Наибольшее сродство налоксон имеет к μ-рецепторам и менее к к- и δ-опиоидным рецепторам.

Налоксон влияет также на дофаминергическую и ГАМК-ергическую системы головного мозга. Не вызывает толерантности и лекарственной зависимости. Введением опиоидных препаратов в увеличенных дозах можно ослабить или устранить действие этого антагониста.

Инъекционный раствор налоксона одобрен для использования и зарегистрирован на территории РФ. В клинической практике отечественных специалистов налоксон применяется с 1971 года - внутривенный (в/в), внутримышечный (в/м) и подкожный (п/к) [3]. Наступление эффекта при внутривенном введении развивается через 2 мин, поэтому данный путь введения предпочтительнее в чрезвычайных ситуациях. При внутримышечном введении

эффект развивается через 2-5 мин и достигает максимума через 5-15 мин. Продолжительность действия составляет от 20-45 мин после внутривенного введения и 2,5-3 часа после внутримышечного введения. Тем не менее, введение налоксона в/в на догоспитальном этапе является затруднительным, особенно среди наркозависимых пациентов, вводящих себе наркотики парентерально [35, 122]. Кроме того, при введении инъекционного препарата для медицинского персонала высок риск заражения такими заболеваниями, как ВИЧ или гепатит С.

Налоксон проникает через гематоэнцефалический и плацентарный барьеры. $T_{1/2}$ из плазмы у взрослых — 30-81 (64±12) мин, у новорожденных — 3,1±0,5 ч. Метаболизируется в печени с образованием преимущественно глюкуронидов, выводится почками (в течение 72 ч 70 % введенной дозы).

Применяют налоксон главным образом при острой интоксикации наркотическими анальгетиками [14, 61, 123]. Он эффективен также при алкогольной коме и различных видах шока, что связано, по-видимому, с активацией при шоке и некоторых формах стресса эндогенной опиодной системы, а также со способностью налоксона уменьшать гипотензию. Также применяется при передозировке декстрометорфаном [85, 94].

Лечение острых отравлений – не единственная сфера применения налоксона. Налоксон применяют также для установления наличия и тяжести зависимости от опиоидов (налоксоновая проба). Из-за болезненных проявлений синдрома отмены налоксон применяют, в основном, в случае бессознательного состояния пациента. При этом диагностические цели (определение вида психоактивного вещества, вызвавшего кому) и лечебные цели (неотложная помощь) назначения этого препарата могут быть достигнуты одновременно. Кроме того, налоксоновый тест проводят перед началом длительного противорецидивного лечения налтрексоном [11, 94, 119].

Налоксон, являясь блокатором опиоидных рецепторов, не обладает собственной анальгетической активностью. Однако, как свидетельствуют результаты некоторых клинических исследований, в низких и сверхнизких дозах налоксон способен потенцировать анальгетический эффект таких опиоидов, как

бупренорфин и налбуфин [70, 79]. Некоторые клиницисты уже используют налоксон в качестве адъюванта в комплексной терапии болевых синдромов различного происхождения [39, 119].

1.2 Побочные действия, возникающие при применении инъекционного раствора налоксона

Тяжелые побочные эффекты сопряжены только с использованием высоких доз налоксона. Однако в связи с необходимостью введения повторных доз налоксона для разрабатываемого лекарственного препарата необходимо рассмотреть случаи возникновения побочных явлений при парентеральном применении инъекционного раствора налоксона [37, 85].

Побочные действия, перечисленные в утвержденной инструкции на инъекционный раствор налоксона, представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 Побочные действия, возникающие после введения налоксона при лечении передозировки опиоидами

Расстройства сердечно - сосудистой системы
Остановка сердца
Тахикардия
Фибрилляция желудочков
Нарушение сократимости желудочков
Повышение или снижение артериального давления
Расстройства со стороны ЖКТ
Тошнота
Рвота
Расстройства со стороны нервной системы
Судороги
Тремор
Абстинентный синдром
Нарушения со стороны дыхательной системы
Отек легких
Нарушения со стороны подкожной жировой клетчатки и кожи
Гипергидроз

При купировании симптомов острой интоксикации опиоидами, после прихода в сознание пострадавший может испытывать относительно короткий абстинентный синдром. В отличие от алкогольного отравления, синдром отмены при приеме опиоидов, как правило, не угрожает жизни, но может доставить пациенту физические неудобства. Симптомы синдрома отмены, вызванного введением налоксона, как правило, исчезают в течение 30-60 минут, что связано с относительно коротким периодом полувыведения налоксона [59, 109]. Симптомы синдрома отмены при приеме опиоидов, перечисленные в инструкции раствора для инъекций налоксона [42], приведены в таблице 1.2.

Таблица 1.2 Симптомы острого синдрома отмены после приема опиоидов

Расстройства сердечно - сосудистой системы
Тахикардия
Повышение артериального давления
Расстройства со стороны ЖКТ
Диарея
Тошнота
Рвота
Общие недомогания и состояние места введения
Астения
Озноб
Боль
Лихорадка
Расстройства со стороны нервной системы
Тремор
Расстройства поведения
Нервозность
Неугомонность
Нарушения со стороны дыхательной системы
Ринорея
Чихание
Зевота
Нарушения со стороны подкожной жировой клетчатки и кожи
Гипергидроз
Пилоэрекция

Кроме того, отдельно выделяются нежелательные явления, возникающие при использовании лекарственного препарата в послеоперационном периоде

(таблица 1.3). Наиболее значимые побочные эффекты, возникающие при инъекции налоксона, сделанной с целью купирования симптомов передозировки у пациентов, которые имеют физическую зависимость от опиоидов, также приведены в таблице 1.3.

Таблица 1.3 Неблагоприятные явления, связанные с налоксоном у послеоперационных пациентов

Расстройства сердечно - сосудистой системы
Остановка сердца*
Сердечная недостаточность*
Кардиоваскулярные расстройства
Тахикардия*
Фибрилляция желудочков*
Нарушения сокращения желудочков*
Расстройства со стороны ЖКТ
Тошнота
Рвота
Состояние места введения
Болезненная реакция места инъекции
Расстройства со стороны нервной системы
Судороги
Большой эпилептический припадок
Парестезия
Тремор
Психические расстройства
Ажитация
Галлюцинации
Нарушения со стороны дыхательной системы
Диспноэ*
Гипоксия
Отек легких*
Угнетение дыхания
Нарушения со стороны подкожной жировой клетчатки и кожи

Гипергидроз
Сосудистые расстройства
Приливание крови
Приливы тепла
Гипотония *
Гипертония *
* Иногда приводит к смерти, коме или энцефалопатии.

Согласно литературным данным, по статистике побочные действия возникают, примерно, у 45% пациентов, которым вводили налоксон при подозрении на острую интоксикацию опиоидами [109, 115]. Из них спутанность сознания и головная боль, возникают чаще всего, примерно, у 20% пациентов. Тошнота, рвота, тахикардия, тремор и гипергидроз возникают, примерно у 10% пациентов, получавших лечение налоксоном [115, 127].

Побочные явления значительно чаще встречались в случаях тяжелого отравления, чем в случаях с легкой до умеренной степени тяжести отравления (49% против 22% случаев) [42]. Тяжелые случаи отравления проявлялись у пациентов с опасными для жизни осложнениями (например, остановка дыхания). Побочные эффекты приводили к госпитализации в 0,3% случаев [113].

Также имеет место быть возникновение побочных явлений, приводящих к смертельному исходу [137]. Введение налоксона может вызвать у пациентов опасные для жизни осложнения не более чем, в 1% случаев [45, 141].

На основе проведенного анализа можно сделать вывод, что доза налоксона и путь введения являются важными факторами в отношении возникновения и интенсивности побочных явлений. Введение инъекционного раствора налоксона в/в может обеспечить быстрое и относительно более сильное воздействие налоксона в ситуации оказания скорой медицинской помощи по сравнению с другими путями введения, требующими абсорбции фармацевтической субстанции. Кроме того, в/в путь введение приводит к быстрому клиренсу налоксона и может потребовать повторного приема до тех пор, пока опиоид метаболизируется и выводится.

Пути введения, отличные от в/в, имеющие фазу абсорбции, могут обеспечить более медленное начало восстановления жизненно важных функций, что может лучше переносится пациентом с острой интоксикацией опиоидами и снизить число возникновения побочных эффектов. Следовательно, разработка новой лекарственной формы налоксона с путем введения отличным от инъекционных, имеющей фазу абсорбции, адекватную для купирования симптомов передозировки, но не обеспечивающую пиковые уровни налоксона, которая, вероятно, покажет хорошие результаты на этапе оказания догоспитальной медицинской помощи, является актуальной задачей.

У новой лекарственной формы с неинъекционным путем введения должен быть баланс между быстротой купирования симптомов опиоидной передозировки и частотой возникновения и интенсивностью побочных реакций и синдрома отмены [50, 63].

1.3 Современные аспекты интраназального введения лекарственных форм

Все чаще слизистую оболочку полости носа используют в качестве неинвазивного пути для системного введения лекарственных средств. Площадь слизистой носа у человека составляет около 150 $см^2$. Она обильно снабжена кровеносными сосудами, что обеспечивает быструю абсорбцию большинства лекарственных средств, создает их высокую концентрацию в системном кровотоке и позволяет избежать эффекта первого прохождения препарата через печень, с которым приходится считаться при назначении лекарственных средств энтерально [66].

Интраназальный путь введения позволяет вводить даже пептидные гормоны [92, 93]. На фармацевтическом рынке уже много лет присутствуют интраназальные формы кальцитонина и десмопрессина. В стадии клинической разработки находились даже предназначенные для интраназального применения инсулин и глюкагон [66]. Большое значение имеет то, что интраназальное введение препаратов легко выполняется самими пациентами или лицами, осуществляющими за ними уход. Этот способ введения характеризуется низкой

вероятностью получения травм или передачи инфекций (гепатит С, ВИЧ). Это особенно важно, когда необходимо быстро купировать тяжелые симптомы, а пациент не способен сделать инъекцию самостоятельно, как в случае с передозировкой опиоидами [97, 102].

Жидкие лекарственные формы считаются наиболее удобными для интраназального применения [8].

При разработке лекарственной формы для интраназального введения есть ограничения, связанные с физиологическими особенностями строения верхних дыхательных путей, которые необходимо учитывать. При использовании стандартных насосов для назальных спреев большая часть введенной дозы оседает в передней части носовой полости [66]. Благодаря поверхностному натяжению между каплями и слизистой оболочкой, спрей быстро распространяется. В дальнейшем мукоцилиарный клиренс обеспечивает распространение слоя жидкости по носовой полости. Поскольку слизистая носа постоянно обновляется с удалением отмерших клеток в направлении глотки, время нахождения лекарственного препарата в носовой полости зависит от того, насколько быстро он растворяется в слизи и проникает в слизистую оболочку [129].

Рецептура лекарственных средств, предназначенные для назальной доставки, как правило, должна быть составлена таким образом, что терапевтическая доза фармацевтической субстанции должна содержаться в, приблизительно, 100-200 мкл раствора, данный объем может сохраняться в носовой полости до полной абсорбции лекарственного средства [48]. При интраназальном пути введения необходимо использовать концентрированный раствор фармацевтической субстанции, что связано с биодоступностью фармацевтической субстанции при данном пути введения. Показатель биодоступности будет зависеть как от характеристик самого лекарственного средства, так и от состояния слизистой оболочки пациента, но в среднем данный показатель находится в пределах 30% [23].

В качестве наиболее оптимальной и коммерчески выгодной лекарственной формы налоксона для интраназального применения был выбран спрей. В соответствии с ОФС. 1.4.1.0002.15 «Аэрозоли и спреи» – это аэрозоли, не содержащие пропеллента, высвобождение содержимого которых происходит за счет воздуха, создаваемого с помощью механического распылителя насосного типа или при сжатии полимерной упаковки [4].

1.4 Современная упаковка лекарственных форм для интраназального введения в форме спреев

Одним из первых этапов разработки назальных спреев является выбор упаковки. Он определяется, главным образом, характеристиками фармацевтической субстанции и режимом дозирования [77]. Выбор моно- или многодозовой системы зависит от предполагаемой частоты применения препарата и наличия законодательных ограничений (например, для учетных препаратов). После выбора типа системы изучают совместимость компонентов системы с предполагаемым активным фармацевтическим ингредиентом и известными вспомогательными веществами [12, 73].

Для эффективного нанесения лекарства на слизистую наиболее важными факторами являются широта распыления и угол направления, тогда как другие показатели, включая размеры частиц, оказывают относительно небольшое влияние на распределение спрея в носовой полости [71].

Нос является очень эффективным фильтром, поэтому большинство частиц и капель остается в носовой полости. Только частицы с медианным аэродинамическим диаметром менее 10 мкм (так называемые мелкодисперсные частицы) могут через нос достичь нижних дыхательных путей [125]. В ходе основной работы большинства насосов для спреев образуется аэрозоль со средним размером частиц 40 – 100 мкм, который определяется, как мелкодисперсная взвесь. Такой аэрозоль хорошо оседает в полости носа [46].

На сегодняшний день существует большое разнообразие видов упаковок для растворов лекарственных средств, применяемых в виде спреев:

— капельные дозаторы;

— присоединенные к шприцам распыляющие устройства;

— системы для одной или двух доз, а также многодозовые флаконы.

Капельные дозаторы обеспечивают наиболее простой способ доставки препарата в полость носа. В них широко используется технология BFS (blow-fill-seal, выдувание-наполнение-запаивание). BFS-дозаторы, изготовленные из полиэтилена или полипропилена, недорогие, однако требуют применения сложного фасовочного оборудования. Помимо этого, некоторые ограничения связаны с материалом капельных дозаторов (например, его адгезионными свойствами, коэффициентом испарения), а также температурным режимом изготовления по технологии BFS. Для доставки необходимой дозы объем препарата в устройстве должен существенно превышать необходимое количество. В то время как для потребительских товаров это несущественно, для дорогостоящих лекарственных средств это может иметь большое значение [63].

На рынке до сих пор имеются капельные дозаторы для многодозовых флаконов, однако их количество быстро уменьшается. В состав многодозовых лекарственных форм обязательно должны входить консерванты, однако это не решает всех проблем, связанных с гигиеной [62, 101, 104]. Точное дозирование лекарственного средства при использовании этих систем невозможно, поэтому в них можно использовать только препараты, обладающие широким уровнем безопасности. Интраназальное введение с помощью капельных дозаторов не очень удобно. Чтобы добиться эффективного осаждения препарата в носовой полости, пациенту приходится лечь на спину или запрокинуть голову [71].

Для введения некоторых препаратов для неотложной терапии, а также для некоторых интраназальных вакцин используются специальные распылительные насадки, которые надеваются на стандартный люэровский шприц. Образующийся аэрозоль и качество его распределения в носовой полости во многом зависят от характеристик насадки для распыления и от плавности смещения поршня шприца. С помощью этого устройства сложно разделить дозы для каждой ноздри. В зависимости от способа применения необходимо учитывать наличие мертвого пространства объемом 70–130 мкл в системе насадка + шприц. В случае подобных

наборов (шприц + насадка) опасение вызывает возможность перепутать путь введения в результате стресса, связанного с неотложной ситуацией [36,100]. На шприц легко может быть надета игла, поэтому в реальной практике существует риск инъецирования препарата, предназначенного для интраназального применения. Предварительно заполненные системы позволяют избежать большинства этих недостатков [75, 100].

Системы для одной и двух доз жидких лекарственных средств, представляют собой современные устройства для интраназального введения препаратов, требующих точного дозирования. Уже более 10 лет они используются для интраназального введения средств, применяемых при обострении болевого синдрома у онкологических больных и для лечения мигрени. Эти системы содержат одну или две готовые для введения отдельные половинные дозы. Разработанные для легкого, удобного и безопасного использования, эти системы также обеспечивают оптимальное осаждение препарата в носовой полости [100].

Наиболее часто используемые это *насосы-дозаторы для многодозовых спреев*. Насосы такого типа были разработаны около 50 лет назад и постепенно заменили капли и пипетки. В настоящее время насосы для многодозовых спреев лидируют на рынке, поскольку они экономически выгодны и удобны в применении. Насосы для назальных спреев представляют собой поршневые насосы. Эти системы не предотвращают бактериальную контаминацию, поэтому, в состав препарата должны входить консерванты. Данные насосы-дозаторы могут устанавливаться на полимерные или стеклянные флаконы, аэрозольные баллоны. Они удобны в применении пациентами [32, 72, 100].

Флаконы или контейнеры являются неотъемлемой частью укупорочной системы и определяют внешний вид конечного продукта. Стеклянные флаконы реже взаимодействуют с лекарственным средством и обеспечивают хорошую защиту препарата даже при длительном хранении. В отдельных случаях стекло может влиять на стабильность рецептуры (вызывать изменение pH или высвобождать следовые количества металлов). Это зависит от качества стекла, которое определяется его гидролитическим классом (для изготовления

фармацевтических продуктов обычно используется стекло I–III классов). К недостаткам стеклянных флаконов относятся более высокий вес, а также то, что они могут разбиться при падении [100].

Флаконы производятся также из различных полимерных материалов (полиэтилена, полипропилена, полиэтилентерефталата). Для производства флаконов используется метод выдувного формования. Наиболее серьезный недостаток всех пластиковых флаконов состоит в испарении (потере веса) конечного продукта в процессе хранения. Пластиковые материалы не являются идеальным барьером для испарения газов или жидкостей. Эту проблему можно решить, используя ламинированные материалы, однако они стоят дороже. Необходимо также учитывать другой потенциальный риск: находящиеся на этикетках чернила и адгезивные материалы могут проникать через стенку флакона в препарат [47, 76, 100].

1.5. Оценка качества лекарственной формы «назальный спрей»

Для оценки качества полученной лекарственной формы необходимо проанализировать существующие показатели качества и нормативную документацию, регламентирующую весь процесс оценки качества, а также сравнить требования, предъявляемые к качеству спреев на территории РФ и в других странах. Качество и пригодность выбранного вида упаковки определяют по эксплуатационным параметрам. Все нормативы для эксплуатационных параметров указаны в общей фармакопейной статье 1.4.1.0002.15 «Аэрозоли и спреи» в разделе «Испытания».

Таблица 1.4. Требования ведущих мировых фармакопей к показателям качества спреев для интраназального применения [4, 65, 112]

Государственная Фармакопея XIII	**European Pharmacopoeia 8.0**	**USP-38/NF-33**
ОФС. 1.4.1.0002.15 «Аэрозоли и спреи» (2016)	01/2008:0676 Nasal Preparations (2014)	<601> Inhalation and nasal drug products—aerosols, sprays, and powders—performance quality tests (2015-12-01)

Проверка клапана	Однородность массы	Однородность высвобождаемых доз
Выход содержимого упаковки	Однородность дозирования	-
Однородность массы дозы	Однородность содержания	-
Средняя масса дозы		
Количество доз в упаковке	-	-
Размер частиц		
Однородность дозирования	-	-

Более жесткие стандарты для производства интраназальных препаратов установлены федеральными медицинскими агенствами США (Guidance for Industry Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension, and Spray Drug Products — Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation – U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research) [73] и европейского союза (Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products – EMEA/CHMP/QWP/49313/2005) [63-65].

Резюмируя российские и общемировые фармакопейные требования [4, 65, 112] и требования промышленных руководств [63-65,73, 84, 108] можно выделить следующие характеристики, контроль которых необходим как на этапе разработки, так и при производстве назальных спреев:

- **Подготовка к использованию, повторная подготовка** (в ОФС. 1.4.1.0002.15 «проверка клапана»): перед использованием, прежде чем заполнить дозирующую камеру, большинство насосов-дозаторов для назальных спреев необходимо подготовить. В некоторых устройствах доза препарата не удерживается в дозирующей камере при хранении в течение длительного периода, например, 7 дней, 1 месяца и т. д. В этом случае после указанного периода неиспользования продукта насос следует подготовить к использованию повторно [100].

- **Масса дозы в течение периода пользования** (в ОФС. 1.4.1.0002.15 «средняя масса дозы»): этот тест позволяет удостовериться в том, что насос доставляет требуемую дозу в течение всего периода пользования продуктом. Обычно он проводится в начале, середине и конце использования [18, 100].

- **Просачивание** (в ОФС. 1.4.1.0002.15 «герметичность упаковки», определяется только для аэрозолей): этот тест обеспечивает поддержание целостности продукта в течение всего срока годности и сохранение объема содержимого во время хранения при различных условиях окружающей среды [100].

- **Исследование на стабильность** проводится в соответствии с условиями, определенными ICH и требованиями ГФ XIII [4, 124].

- **Метрологические тесты** (отсутствует в ОФС. 1.4.1.0002.15)**:** эти тесты позволяют убедиться в том, что насос соответствует критическим требованиям в отношении размеров, что необходимо для обеспечения эффективного функционирования продукта и стабильного качества препарата [73, 77].

- **Распределение частиц по размерам** (согласно требованиям ОФС. 1.4.1.0002.15, данный показатель определяется только для аэрозолей и спреев, содержащих суспензию лекарственного средства)**:** данный тест определяет соответствие размеров частиц фармацевтической субстанции в суспензии, или размера капель жидкого препарата или частиц сухого порошка в спрее имеющимся спецификациям. Для оценки этого показателя необходимо руководствоваться спецификациями и допустимыми нормами, зафиксированными в заявке на регистрацию, поскольку он непосредственно влияет на эффективное распределение спрея в носовой полости [73, 77].

- **Характеристика спрея** (отсутствует в ОФС. 1.4.1.0002.15): это еще один тест для оценки стабильности доставляемого назального спрея. В нем оцениваются такие показатели, как угол распыления и форма пятна распыления спрея [73, 77].

- **Экстрагируемые/вымываемые вещества** (отсутствует в ОФС. 1.4.1.0002.15)**:** этот тест служит для оценки безопасности продукта, а также специфической оценки и контроля потенциальных химических примесей, которые могут проникнуть в препарат из укупорочной системы [73, 77].

- **Посторонние частицы:** в этом тесте определяется содержание в препарате посторонних частиц и дается характеристика общей безопасности продукта [73, 77].

- **Микробиологическая чистота:** для препаратов, содержащих консерванты, этот показатель, как правило, отражает уровень консервантов в продукте в течение срока годности. Для продуктов, не содержащих консерванты, проводятся более сложные тесты, включающие тесты с контаминированной бактериями окружающей средой, чтобы убедиться в целостности системы, обеспечивающей защиту от контаминации. Для применения лекарственных препаратов, не содержащих консерванты, требуются специальные системы доставки препарата [73, 77].

- **Устойчивость системы к внешним воздействиям** (отсутствует в ОФС. 1.4.1.0002.15)**:** для оценки этого показателя проводится ряд тестов, включая тест с падением, воздействием вибрации и имитацией транспортировки. Эти тесты предназначены для оценки устойчивости готового продукта к обычным условиям транспортировки и применения [73, 77].

- **Изучение «человеческого фактора»** (отсутствует в ОФС. 1.4.1.0002.15)**:** в этих тестах изучаются такие аспекты применения, как эргономика и человеческий фактор. К ним относятся изучение и получение данных о таких потенциальных проблемах, как расположение продукта для использования, умение обращаться с продуктом (для молодых и пожилых, необходимость определенной сноровки и т. д.), необходимость приложения определенных усилий и многие другие факторы. В последние несколько лет появились руководства, в которых описывается, как регулировать эти «человеческие факторы» [83].

В ОФС.1.4.1.0002.15 «Аэрозоли и спреи» приведены показатели не рассмотренные выше: оценка давления в упаковке (для аэрозолей), определение процента выхода содержимого паковки (для недозированных аэрозолей и спреев), средняя масса дозы, количество доз в упаковке, однородность дозирования, однородность массы. Для ингаляционных аэрозолей, содержащих суспензию, определяется респирабельная фракция.

Таким образом, исходя из проанализированных данных, была обоснована актуальность создания неинъекционной лекарственной формы налоксона, выбран путь введения и определен вид данной лекарственной формы – спрей назальный. Также были рассмотрены варианты упаковки спреев и перечень показателей качества, регламентированных для данной лекарственной формы.

Выводы к главе 1:

1. Получение новой лекарственной формы налоксона для применения вне стационара является актуальной задачей современной медицины, обусловленной социально-экономической ситуацией в стране.

2. Показаны современные аспекты применения назальных лекарственных препаратов, обладающих системным действием.

3. В главе рассмотрены основные требования современной нормативной документации к спреям. Показана доступность и перспективность их разработки.

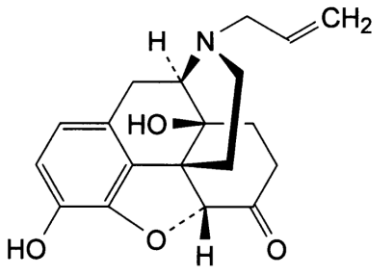
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Физико-химические свойства субстанции налоксона гидрохлорида

Объектами исследований являлись: субстанция налоксона гидрохлорид, модельные растворы и назальный спрей налоксона гидрохлорида.

Субстанция налоксона гидрохлорида (ЛСР-004169/08-300508 или ЕР 7.0, р. 2548; производитель «Аспен Осс Б.В.», Нидерланды) по внешнему виду представляет собой белый или почти белый, гигроскопический, кристаллический порошок [65].

Налоксона гидрохлорид – (5альфа)-4,5-эпокси-3,14-дигидрокси-17-(2-пропенил) морфинан-6-он гидрохлорида дигидрат



, HCl , $2\,H_2O$

$C_{19}H_{22}ClNO_4 \cdot 2H_2O$

М.м. 399,90

Брутто формула: $C_{19}H_{22}ClNO_4 \cdot 2H_2O$

Содержание: от 98,0 % до 102,0 % (в пересчете на безводное вещество).

Растворимость: легко растворим в воде, растворим в этаноле (96 %), практически не растворим в толуоле.

Групповая принадлежность: антагонист опиоидных рецепторов.

2.2 Вспомогательные вещества, использованные при разработке состава и технологии назального спрея налоксона

При разработке состава и технологии назального спрея налоксона использовали вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению и отвечающие требованиям соответствующей нормативной документации (НД) (таблица 2.1) [22].

Таблица 2.1 Вспомогательные вещества, использованные при разработке состава и технологии назального спрея налоксона

Наименование вспомогательного вещества	**Торговое название®, производитель**	**НД**
Пропиленгликоль	JLC-Chemie Handels GmbH, Германия	EPh 8.0
Диметилсульфоксид	«Toray Fine Chemicals», Китай	EPh 8.0
N-метилпирролидон	Pharmasolve®, «ISP», США	USP-38
Макрогол 400	Merck, Германия	EPh 8.0
Полоксамер 407	Lutrol® F 127, Kolliphor® P 407, BASF, Германия	EPh 8.0
Кислота лимонная моногидрат	Merck, Германия	EPh 8.0
Вода очищенная	ОАО «Татхимфармпрепараты», Россия	ФС 2.2.0020.15

Пропиленгликоль - вязкая жидкость без цвета и запаха, сладковатая на вкус, смешивается с водой, спиртами, карбоновыми кислотами, ацетоном, аминами, и ограничено с бензолом. Применяется в фармацевтической промышленности и ветеринарии в качестве вспомогательного вещества, входит в состав косметических средств. Пропиленгликоль является гидрофильным неводным растворителем, а также обладает собственной антимикробной активностью [65, 69].

Диметилсульфоксид (ДМСО) является важным биполярным апротонным растворителем. Он менее токсичен, чем другие представители этой группы, такие как диметилформамид, диметилацетамид, N-метил-2-пирролидон, ГМФТА. Благодаря своей сильной растворяющей способности, ДМСО часто используется как растворитель. Кислотные свойства ДМСО выражены слабо.

В качестве лекарственного средства очищенный диметилсульфоксид применяется в виде водных растворов (10-50 %), как местное противовоспалительное и обезболивающее средство, а также в составе мазей — для увеличения трансдермального переноса действующих веществ, поскольку за несколько секунд проникает через кожу и переносит другие вещества.

N-метилпирролидон (Pharmasolve®) – используется в фармацевтической промышленности в качестве трансдермального агента, способного обеспечивать транспортировку лекарственных веществ через биомембраны.

Макрогол 400 (полиэтиленгликоль, ПЭГ) представляет собой полиэфир с молекулярной формулой $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$. Полиэтиленгликоль растворим в воде, метаноле, этаноле, ацетонитриле, бензоле и дихлорметане, не растворим в диэтиловом эфире и гексане. Обладает выраженной осмотической активностью. В водном растворе молекулы ПЭГ несут на себе небольшой отрицательный заряд. Часто полиэтиленгликоль используют для стабилизации микросфер и наночастиц. В случае с наночастицами ПЭГ способствует их длительной циркуляции в крови [65, 69].

Полоксамер 407 (Lutrol® F 127, Kolliphor® P 407) используется в основном в качестве загустителя и гелеобразователя, а также эмульгатора в кремах и эмульсиях. Иногда в рецептуре он выполняет функцию полимерного солюбилизатора фармацевтической субстанции. Kolliphor® P 407 можно использовать при получении твердых дисперсий методом физического смешивания, гранулирования из расплава, распылительной сушки и процесса горячего прессования из расплава.

Полоксамеры представляют собой бифункциональные полимеры, молекулы которых имеют два гидрофильных окончания и гидрофобную центральную часть [23, 65].

Кислота лимонная моногидрат часто используется в рецептуре жидких лекарственных средств в качестве регулятора кислотности.

2.3 Методики определения физико-химических характеристик и показателей качества нерасфасованных модельных растворов налоксона

Физико-химические характеристики и показатели качества определяли по стандартным методикам, описанным в ГФ XIII издания (таблица 2.2).

Таблица 2.2 Физико-химические характеристики и показатели качества модельных растворов

Методика	**Документ / описание методики**	**Оборудование**
Определение pH раствора	ОФС 1.2.1.0004.15 «Ионометрия»	pH-метр «Metrohm 827 lab» (Швейцария) со стеклянным электродом
Определение поверхностного натяжения	На границе жидкость /воздух: метод наибольшего давления пузырька	Прибор П.А. Ребиндера
Межфазное натяжение	На границе водных растворов и вазелинового масла: по массе и объёму капли	Сталагмометр
Определение вязкости раствора	ОФС 1.2.1.0015.15 «Вязкость»	Вискозиметр Убеллоде
Определение плотности раствора	ОФС 1.2.1.0014.15 «Плотность»	Пикнометры
Определение кинетики абсорбции воды растворами	Метод диализа через полупроницаемую мембрану	Целлофан (ГОСТ 7730-89)
Внешний вид	-	визуально
Микробиологическая чистота	ОФС «Микробиологическая чистота» 1.2.4.0002.15	согласно НД
Эффективность антимикробного консервирующего действия	ОФС 1.2.4.0011.15 «Определение эффективности антимикробных консервантов»	согласно НД

2.3.1 Методика определения поверхностного натяжения

Поверхностное натяжение на границе жидкость/воздух (σ) измеряли методом наибольшего давления пузырька на приборе П.А. Ребиндера, а межфазное натяжение (γ) на границе водных растворов и вазелинового масла определяли с помощью сталагмометра по массе и объёму капли при температуре (25±0,1)°C. Исходя из полученных данных, рассчитывали работу когезии ($W_k = 2 \cdot \sigma_1$), работу адгезии ($W_a = \sigma_1 + \sigma_2 - \gamma$), краевой угол смачивания (θ) по уравнению Юнга ($\cos\theta = (\sigma_2 - \gamma) : \sigma_1$) и коэффициенты растекания по уравнению $f = W_a - W_k$, где σ_1 и σ_2 – поверхностное натяжение на границе водного раствора

(1) и масла (2). Все измерения проводились пятикратно и рассчитывались средние значения полученных величин и доверительные интервалы.

2.3.2 Методика определения кинетики абсорбции воды растворами

Кинетику абсорбции воды растворами определяли в опытах *in vitro* методом диализа через целлофановую мембрану при температуре при (37±0,1)°С путём взвешивания камеры с раствором. Исходно масса раствора в камере составляла 3,0 г.

2.3.3 Методика определения реологических свойств растворов

Реологические исследования проводили на ротационном вискозиметре с коаксиальными цилиндрами «Rheolab QS – Anton Paar» (Германия). Строили реограммы, отражающие зависимость касательного напряжения сдвига τ_r от градиента скорости сдвига D_r. По кривой текучести определяли тип течения системы, наличие тиксотроп ных свойств, нижний, верхний и экстраполированный пределы текучести, рассчитывали структурную вязкость по формуле: $\eta = \tau_r / D_r$ (*2.2.10*) [65].

2.3.4 Методика определения эффективности антимикробного действия консервантов

Для проведения испытаний эффективности антимикробного действия в препарате налоксон спрей назальный было использовано оборудование, перечень и характеристики которого приведены в таблице 2.3.

Таблица 2.3 Оборудование, использованное при изучении эффективности антимикробного консервирующего действия

Наименование, технические характеристики	Диапазон рабочих параметров	Назначение
Термостат суховоздушный с охлаждением ТСО-1/80 СПУ от +5°С до +60 °С; Δ = ±1,5 °С	От 20 °С до 25 °С	Хранение инокулированных образцов. Инкубация питательных сред для выращивания грибов.
Термостат суховоздушный ТС-80М-2 от +28°С до +55 °С; Δ = ±1,0 °С	От 30 °С до 35 °С	Инкубация питательных сред для выращивания бактерий.
Баня водяная VL-32 до +150°С; Δ = ±0,8 °С	От 43°С до 45 °С	Хранение расплавленных питательных сред при высевах двухслойным методом.

Питательные среды и растворы

При проведении испытаний использовали питательные среды в соответствии с требованиями ГФ XIII.

Питательные среды готовили из сухих питательных сред или из отдельных ингредиентов. Каждая партия приготовленной среды проходила контроль стерильности и ростовых свойств. Перечень и характеристика использованных для проведения исследований питательных сред приведены в таблице 2.4.

Таблица 2.4 Питательные среды, использованные для изучения эффективности антимикробного консервирующего действия

Наименование среды	Назначение	Заключение о пригодности среды
Соево-казеиновый агар	Подготовка рабочих культур тест-штаммов бактерий	Пригодна
Соево-казеиновый агар	Определение общего числа бактерий	Пригодна
Сабуро-глюкоза агар (без антибиотика)	Подготовка рабочих культур тест-штаммов грибов	Пригодна
Сабуро-глюкоза агар	Определение общего числа грибов	Пригодна

Тест-микроорганизмы

При проведении исследований использовали тест-микроорганизмы в соответствии с требованиями ГФ XIII. Перечень тест-микроорганизмов приведен в таблице 2.5.

Таблица 2.5 Тест-микроорганизмы, использованные для изучения эффективности антимикробного консервирующего действия

Тест-микроорганизм	Номер штамма	Количество пассажей от исходного штамма
Staphylococcusaureus	ATCC 6538-P	4
Pseudomonasaeruginosa	ATCC 9027	4
Escherichiacoli	ATCC 25922	4
Candidaalbicans	NCTC 885-653	4
Aspergillusniger	ATCC 16404	3

Тест-микроорганизмы были получены из Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ). Хранение тест-микроорганизмов осуществлялось в соответствии с документом «Порядок получения, учета, хранения и поддержания тест-штаммов микроорганизмов для проведения контроля качества лекарственных средств по микробиологическим показателям».

Для проведения исследований готовили рабочие культуры тест-микроорганизмов в соответствии с требованиями ГФ XIII. Каждый тест-микроорганизм выращивали отдельно на соответствующей питательной среде. Тест-штаммы бактерий выращивали на соево-казеиновом агаре при температуре от 30°С до 35°С от 18 ч до 24 ч. Тест-штаммы грибов выращивали на поверхности плотной среды Сабуро-глюкоза агар (без добавления антибиотика) при температуре от 20°С до 25°С. Тест-микроорганизм *Candida albicans* выращивали в течение 48 ч, тест-микроорганизм *Aspergillus niger* – в течение 7 суток. В день испытания готовили исходную суспензию каждого из тест-микроорганизмов.

Для приготовления суспензий культур бактерий и культуры *C. albicans* микробную массу смывали с поверхности питательной среды изотоническим раствором натрия хлорида (9 г/л натрия хлорида). Для приготовления суспензии культуры *A. niger* использовали стерильную суспендирующую жидкость, содержащую 9 г/л натрия хлорида и 0,5 г/л полисорбата 80. Для каждого из тест-микроорганизмов в том же растворителе готовили исходную суспензию, которая содержала около 10^9 КОЕ/мл. Для приготовления исходной суспензии использовали классический метод визуального сравнения мутности бактериальной суспензии со стандартом «мутности». Использовали стандарт «мутности» на 10 единиц с учетом индивидуальных особенностей суспензии, характерных для каждого из тест-микроорганизмов. Инокулят – суспензию, которая содержала 10^8 КОЕ/мл, готовили путем разбавления исходной суспензии в 10 раз и использовали для инокуляции образцов при изучении эффективности антимикробного консервирующего действия. Для определения точного числа КОЕ в инокуляте и исходного числа микроорганизмов при проведении испытания готовили серийные десятикратные разведения инокулята в фосфатном буферном

растворе с натрия хлоридом и пептоном pH 7,0 и проводили высевы из каждого приготовленного разведения на две чашки Петри с соответствующей плотной питательной средой. Число КОЕ в 1 мл инокулята и исходное число микроорганизмов определяли, исходя из среднего числа КОЕ на двух чашках с соответствующим разведением инокулята.

Для проверки пригодности методики определения числа тест-микроорганизмов в инокулированных образцах для каждого из тест-микроорганизмов методом серийных десятикратных разведений инокулята готовили рабочую суспензию монокультуры, содержащую около 100 КОЕ/мл в фосфатном буферном растворе с натрия хлоридом и пептоном pH 7,0. Точное число КОЕ каждого из тест-микроорганизмов в рабочих суспензиях, определяли методом посева на чашки Петри с соответствующей плотной питательной средой. Для каждого из проведенных испытаний полученное точное значение числа КОЕ каждого из тест-микроорганизмов в рабочей суспензии приведено в таблице 2.6, как результат контрольного опыта.

Таблица 2.6 Результаты проверки пригодности методики определения числа жизнеспособных микроорганизмов в препарате налоксон спрей назальный

	Среднее число КОЕ на чашках Петри				
	P. aeruginosa **ATCC 9027**	***S. aureus*** **ATCC 6538-P**	***E. coli*** **ATCC 25922**	***C. albicans*** **NCTC 885-653**	***A. niger*** **ATCC 16404**
Образец препарата	64	65	82	25	59
Контроль	61	72	88	24	68
Отношение числа КОЕ в присутствии и отсутствии испытуемого образца	0,95	1,11	1,07	0,96	1,15

Проверка пригодности методики определения числа жизнеспособных микроорганизмов в инокулированных образцах

Для каждого из тест-микроорганизмов была разработана методика определения числа жизнеспособных клеток в инокулированных образцах, позволяющая эффективно нейтрализовать антимикробное действие консерванта.

Проверку пригодности разработанных методик определения общего числа жизнеспособных микроорганизмов в инокулированных образцах проводили в соответствии с требованиями EPh 8.0. (*2.6.12*) [65]. Для каждого из тест-микроорганизмов, указанных в таблице 2.5, готовили рабочую суспензию монокультуры, содержащую около 100 КОЕ/мл тест-микроорганизма.

Испытуемые образцы налоксона спрея назального готовили в соответствии с разработанной методикой. В качестве растворителя использовали рабочие суспензии монокультур тест-микроорганизмов, содержащие около 100 КОЕ/мл. Таким образом, при каждом испытании готовили пять образцов препарата. По 1 мл каждого образца высевали двухслойным методом на необходимое число чашек Петри с соответствующей плотной питательной средой.

Проводили контрольный опыт: по 1 мл каждой рабочей суспензии высевали на две чашки Петри с соответствующей питательной средой.

Проводили инкубацию посевов в соответствии с требованиями EPh 8.0. (*2.6.12*) [65], подсчитывали число колоний на поверхности плотной питательной среды, определяли среднее арифметическое значение числа колоний в присутствии и отсутствии испытуемого образца.

Общепринятых критериев пригодности методики определения числа жизнеспособных микроорганизмов в инокулированных образцах при испытании эффективности антимикробного консерванта, не существует. Учитывая то, что в соответствии с требованиями EPh 8.0. (*5.1.3*) [65] методика должна быть пригодной для доказательства требуемой интенсивности снижения числа жизнеспособных микроорганизмов (минимальная значимая степень снижения составляет 10 раз), методику испытания считали пригодной в том случае, если результаты подсчета числа колоний на чашках в присутствии и отсутствии испытуемого образца отличались не более, чем в 2 раза.

Испытание эффективности антимикробного консервирующего действия

Испытание эффективности антимикробного консервирующего действия проводили в соответствии с требованиями общей статьи ГФ XIII и EPh 8.0. [4, 65].

Испытание проводили методом, описанным ниже. Открывали хвостовой конец тубы и вносили в тубу инокулят из расчета 0,1 мл инокулята на 10 г налоксона спрея назального. Таким образом, микробная нагрузка составляла 10^5-10^6 КОЕ в 1 г препарата налоксона спрея назального. Инокулированные образцы тщательно перемешивали для обеспечения равномерного распределения микроорганизмов, после чего закрывали хвостовой конец тубы. Каждую из пяти туб с препаратом налоксон спрей назальный инокулировали суспензией монокультуры одного из тест-микроорганизмов. Инокулированные образцы хранили в течение 28 суток в защищенном от света месте при температуре от 20 °С до 25 °С. От испытуемых образцов отбирали пробы непосредственно после инокуляции, через 2, 7, 14 и 28 суток и делали высевы на плотные питательные среды для определения числа жизнеспособных клеток бактерий и грибов в 1 г препарата.

Для каждого из тест-микроорганизмов была разработана методика определения числа жизнеспособных клеток в инокулированных образцах, позволяющая эффективно нейтрализовать антимикробное действие консерванта.

Проверка пригодности методики определения числа жизнеспособных микроорганизмов в инокулированных образцах препарата налоксон спрей назальный

Для определения числа жизнеспособных микроорганизмов в инокулированных образцах препарата налоксон спрей назальный была разработана методика, приведенная ниже.

Определение числа КОЕ тест-микроорганизмов *S. aureus, E. Coli* и *P. aeruginosa*

1 г препарата налоксон спрей назальный помещают в стерильный мерный сосуд, доводят объем до 10 мл стерильным фосфатным буферным раствором с натрия хлоридом и пептоном pH 7,0 и тщательно перемешивают. При

необходимости делают серийные разведения полученного образца в том же растворителе.

По 1 мл полученного образца высевают двухслойным методом на две чашки Петри с соево-казеиновым агаром. По 1 мл серийных разведений полученного образца (при необходимости) высевают двухслойным методом на две чашки Петри с соево-казеиновым агаром.

Определение числа КОЕ тест-микроорганизмов *C. albicans*

1 г препарата налоксон спрей назальный помещают в стерильный мерный сосуд, доводят объем до 10 мл стерильным фосфатным буферным раствором с натрия хлоридом и пептоном pH 7.0 и тщательно перемешивают. При необходимости делают серийные разведения полученного образца в том же растворителе.

По 1 мл полученного образца и, при необходимости, его серийных разведений высевают двухслойным методом на чашки Петри с Сабуро-глюкоза агаром.

Определение числа КОЕ тест-микроорганизмов*A. niger*

1 г препарата налоксон спрей назальный помещают в стерильный мерный сосуд, доводят объем до 20 мл стерильным фосфатным буферным раствором с натрия хлоридом и пептоном pH 7.0 и тщательно перемешивают. При необходимости делают серийные разведения полученного образца в том же растворителе. По 1 мл полученного образца и, при необходимости, его серийных разведений высевают двухслойным методом на чашки Петри с Сабуро-глюкоза агаром.

2.3.5 Методика определения микробиологической чистоты

Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», категория 2.

Для разработки и проверки пригодности методики использовали следующие штаммы тест-микроорганизмов: *Bacillus cereus* АТСС 10702; *Escherichia coli* АТСС 25922; *Salmonella typhimurium* 55; *Staphylococcus aureus* АТСС 6538-Р,

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, *Candida albicans* NCTC 885-653; *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Для устранения антимикробного действия разработанного препарата проводили разведение препарата 1:10.

Ход определения: 10 мл препарата помещают в стерильный мерный сосуд, доводят объем содержимого до 100 мл стерильным фосфатным буферным раствором с натрия хлоридом и пептоном pH 7,0 и тщательно перемешивают (образец А).

Для определения общего числа бактерий по 1 мл образца А высевают двухслойным методом на две чашки Петри с соево-казеиновым агаром или плотной питательной средой № 1.

Для определения общего числа грибов по 1 мл образца А высевают двухслойным методом на две чашки Петри с агаром Сабуро с глюкозой и антибиотиками или плотной питательной средой № 2.

Для испытания на наличие *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* 10 мл образца А вносят в 100 мл жидкой питательной среды (соево-казеинового бульона или среды № 8). Инкубацию посевов, учет и интерпретацию результатов проводят в соответствии с требованиями разделов 4.4 и 4.5 общей статьи.

Для количественного определения энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий 10 мл препарата вносят в 100 мл лактозного бульона (среда № 11), перемешивают и инкубируют от 2 ч до 5 ч (образец Б).

Для проведения испытания используют три пробирки, каждая из которых содержит 9 мл бульона Мосселя или среды № 3. По окончании инкубации образец Б перемешивают, переносят 1 мл (соответствует 0,1 мл препарата) в первую пробирку и перемешивают. Из первой пробирки 1 мл (соответствует 0,01 мл препарата) переносят во вторую пробирку и перемешивают; из второй пробирки 1 мл (соответствует 0,001 мл препарата) переносят в третью пробирку и перемешивают. Посевы инкубируют в течение 24-48 ч. В случае роста для подтверждения наличия энтеробактерий, делают пересев на плотную питательную среду (агар Мосселя или среда № 4) и инкубируют чашки Петри в

течение 18-24 ч. Учет и интерпретацию результатов проводят в соответствии с требованиями раздела 4.1.2 общей статьи.

2.4 Методики определения показателей качества расфасованного препарата налоксон спрей назальный

Показатели качества расфасованного препарата налоксон спрей назальный определяли по стандартным методикам, описанным в ГФ XIII издания (таблица 2.7).

Таблица 2.7 Показатели качества расфасованного препарата налоксон спрей назальный

Методика	**Документ / описание методики**	**Оборудование**
Определение подлинности: Налоксона гидрохлорид	-ВЭЖХ; -Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях; -Качественная реакция на хлориды (ГФ XI, вып. 1, с. 166)	Shimadzu в следующей комплектации: насос LC-20AD, автосамплер SIL-20A, детектор SPD-20AV, термостат CTO-20AS, системный контролер CBM-20 ALITE
Пропиленгликоль	ГХ	Shimadzu GC-2014 с FID-детектором, оснащенный авто-инжектором AOC-5000
Количественное определение Налоксона гидрохлорид ($C_{19}H_{22}ClNO_4$)	ВЭЖХ	Shimadzu в следующей комплектации: насос LC-20AD, автосамплер SIL-20A, детектор SPD-20AV, термостат CTO-20AS, системный контролер CBM-20 ALITE
Пропиленгликоль ($C_3H_8O_2$)	ГХ	Shimadzu GC-2014 с FID-детектором, оснащенный авто-инжектором AOC-5000
Посторонние примеси Любая индивидуальная неидентифицированная примесь Сумма примесей	ВЭЖХ	Shimadzu в следующей комплектации: насос LC-20AD, автосамплер SIL-20A, детектор SPD-20AV, термостат CTO-20AS, системный контролер CBM-20 ALITE

Определение высвобождения налоксона гидрохлорида и пропиленгликоля из модельных растворов	Диализ через полупроницаемую мембрану по Крувчинскому	Прибор для изучения диализа через полупроницаемую мембрану
Определение содержания пропиленгликоля в диализате	ГХ	Shimadzu GC-2014 с FID-детектором, оснащенный авто-инжектором АОС-5000
Определение осмоляльности раствора	По снижению температуры их замерзания	Миллиосмометр-криостат термоэлектрический МТ-5 (ОАО НПП «Буревестник», РФ)
Испытание упаковки:		
Проверка упаковки на герметичность	ОФС.1.4.1.0002.15	Фильтровальная бумага
Проверка насоса-дозатора	ОФС.1.4.1.0002.15	-
Средняя масса доставляемой дозы	ОФС.1.4.1.0002.15	Весы EUROPE-C500 фирмы “Gibertini S.A.” (Италия) и CRYSTAL 200 фирмы “Gibertini S.A.” (Италия)
Определение распределения капель по размерам	ОФС 42-0083-08, ГФ XII, ч. 2	Лазерный дифрактометр «Spraytec laser diffraction system» («Malvern Instruments», Великобритания)
Определение качества распыления	По статическим отпечаткам факела распыления	Специальная установка для определения статического отпечатка факела распыления
Определение массы доставляемой дозы	ОФС.1.4.1.0002.15	Согласно НД
Определение однородности массы доставляемой дозы	ОФС.1.4.1.0002.15	Аппарат, способный к количественному удержанию дозы
Определение количества извлекаемых доз	ОФС.1.4.1.0002.15	Согласно НД по методике 1

2.4.1 Методика определения высвобождения налоксона из модельных растворов

Степень высвобождения налоксона и ПГ из модельных растворов проводили методом диализа через полупроницаемую мембрану (по Крувчинскому) из целлофана (ГОСТ 7730-89) при температуре (37±0,1)°С. Масса препарата в испытываемом образце составляла 3,0 г; диализ проходил в камеру, содержащую 60 мл воды очищенной. Содержание налоксона в диализате определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе со спектрофотометрическим детектором в следующих условиях: колонка размером 100 мм х 4,0 мм, заполненная сорбентом «Reprosil-Pur Basic C18» с размер частиц 3 мкм; подвижная фаза – фосфатный буферный раствор pH 2,0 – ацетонитрил для хроматографии (82:18); скорость потока подвижной фазы 0,9 мл/мин; температура колонки 40°С; длина волны детектирования 281 нм.

2.4.2 Методика количественного определения налоксона гидрохлорида и пропиленгликоля в растворе

1. Налоксона гидрохлорид. Определение проводили методом ВЭЖХ.

Около 5,0 г (точная навеска) препарата налоксона спрея назального помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают (*испытуемый раствор*).

По 10 мкл *испытуемого раствора* и *раствора сравнения налоксона гидрохлорида* хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-спектрофото-метрическим детектором в следующих условиях:

– колонка стальная размером 100 мм х 4,0 мм, заполненная сорбентом «Reprosil-Pur Basic C18», размер частиц 3 мкм (или аналогичная, для которой выполняются требования к пригодности хроматографической системы);

– подвижная фаза: *фосфатный буферный раствор pH 2,0* – ацетонитрил для хроматографии (82 : 18);

– скорость потока подвижной фазы: 0,9 мл/мин;

– температура колонки: 40 ^{o}C;

– длина волны детектирования: 281 нм.

Содержание налоксона гидрохлорида (X) в 1 г препарата, в миллиграммах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times m_0 \times 50 \times P \times (100 - W)}{S_0 \times m \times 50 \times 100 \times 100} = \frac{S_1 \times m_0 \times P \times (100 - W)}{S_0 \times m \times 10000}$$

где: S_1 – среднее значение величины площади пика налоксона, рассчитанное по хроматограммам *испытуемого раствора*;

S_0 – среднее значение величины площади пика налоксона, рассчитанное по хроматограммам *раствора сравнения налоксона гидрохлорида*;

m – масса навески препарата, в граммах;

m_0 – масса навески налоксона гидрохлорида, взятой для приготовления *раствора сравнения налоксона гидрохлорида*, в миллиграммах;

P – содержание основного вещества в безводном налоксона гидрохлориде, который использован для приготовления *раствора сравнения налоксона гидрохлорида*, в процентах;

W – потеря в массе при высушивании налоксона гидрохлорида, который использован для приготовления *раствора сравнения налоксона гидрохлорида*, в процентах.

Содержание $C_{19}H_{22}ClNO_4$ (налоксона гидрохлорида) в 1 г препарата должно быть от 11,4 мг до12,6 мг.

Примечание. 1. Приготовление *раствора сравнения налоксона гидрохлорида*. Около 65 мг (точная навеска) налоксона гидрохлорида (НД 42-14673-07 или Eur. Pharm. 7.0, p. 2548) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл воды доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

2. Приготовление *фосфатного буферного раствора pH 2,0*. 1,17 г натрия 1-октансульфоната (octane-1-sulfonic acid sodium salt) (фирма «Merck», кат. № 1.18307.0025)

помещают в стакан вместимостью 1000 мл, прибавляют 1000 мл воды, перемешивают до полного растворения вещества, и, при непрерывном перемешивании прибавляют кислоту фосфорную до получения раствора с pH = (2,00±0,05).

3. При необходимости допускается корректировка состава подвижной фазы путем изменения соотношения *фосфатного буферного раствора pH 2,0* и ацетонитрила для хроматографии.

4. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах *испытуемого раствора* и *раствора сравнения налоксона гидрохлорида* выполняются следующие условия:

– эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пику налоксона, должна быть не менее 1500 теоретических тарелок;

– коэффициент симметрии пика налоксона должен быть не более 1,8;

– относительное стандартное отклонение (*RSD*), рассчитанное для площадей пиков налоксона, должно быть для трех параллельных хроматограмм не более 0,67 %, для четырех – не более 0,96 %, для пяти – не более 1,19 %, для шести – не более 1,38 %, для семи – не более 1,54 %.

2. Пропиленгликоль. Определение проводят методом ГХ.

Около 5,0 г (точная навеска) препарата помещают в конусную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 25,0 мл *раствора внутреннего стандарта* и перемешивают (*испытуемый раствор*).

Хроматографирование проводят на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

– колонка капиллярная кварцевая размером 30 м х 0,53 мм с неподвижной фазой 5 % фенил – 95 % метилполисилоксан, толщина слоя 5,0 мкм (например, производства фирмы «Macherey-Nagel», кат. № 726916.30, или аналогичная);

– температура колонки: 150 °С;

– температура испарителя и детектора: 250 °С;

– линейная скорость газа-носителя (*гелий, азот или аргон*): 40 см/с;

– коэффициент деления потока газа носителя: 1:20.

Содержание пропиленгликоля (X_1) в 1 г препарата, в миллиграммах, вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{B_i \times m_o \times 5 \times P}{B_o \times 100 \times m \times 100} = \frac{B_i \times m_o \times P}{B_o \times m \times 2000}$$

где: B_i – среднее значение отношения величин площадей пиков пропиленгликоля к величинам площадей пиков внутреннего стандарта, полученных на хроматограммах *испытуемого раствора*;

B_o – среднее значение отношения величин площадей пиков пропиленгликоля к величинам площадей пиков внутреннего стандарта, полученных на хроматограммах *раствора сравнения пропиленгликоля*;

m – масса навески препарата, в граммах;

m_o – масса навески пропиленгликоля, взятая для приготовления *раствора сравнения пропиленгликоля*, в граммах;

P – содержание основного вещества в субстанции пропиленгликоля, используемой для *приготовления раствора сравнения пропиленгликоля*, в процентах.

Содержание $C_3H_8O_2$ (пропиленгликоля) в 1 г препарата должно быть от 95,0 мг до 105,0 мг.

Примечание. 1. Приготовление *раствора сравнения пропиленгликоля*. Около 10,0 г (точная навеска) пропиленгликоля (1,2-propanediol) (фирма «Merck», кат. №

1.07478.2500) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл воды, доводят объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивают.

5,0 мл полученного раствора помещают в конусную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 25,0 мл *раствора внутреннего стандарта* и перемешивают.

2. Приготовление *раствора внутреннего стандарта*. 7,0 г 1,4-бутандиола (1,4-butanediol) (фирма «Merck», кат. № 8.01532.1000) растворяют в 250 мл воды.

3. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах *испытуемого раствора* и *раствора сравнения пропиленгликоля* выполняются следующие условия: – эффективность хроматографической системы, рассчитанная для пиков пропиленгликоля должна быть не менее 4000 теоретических тарелок;

– коэффициент разделения пиков пропиленгликоля и 1,4-бутандиола должен быть не менее 4,0;

– относительное стандартное отклонение, рассчитанное для величин отношения площадей пиков пропиленгликоля к площадям пиков внутреннего стандарта (1,4-бутандиола) должно быть для трех параллельных хроматограмм не более 0,67 %, для четырех – не более 0,96 %, для пяти – не более 1,19 %, для шести – не более 1,38 %, для семи – не более 1,54 %.

2.4.3 Методика определения содержания пропиленгликоля в диализате

Содержание ПГ в диализате определяли методом газовой хроматографии с использованием внутреннего стандарта 1,4-бутандиола на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях: колонка капиллярная кварцевая размером 30 м х 0,53 мм с неподвижной фазой 5 % фенил

– 95 % метилполисилоксан с толщиной слоя 5,0 мкм; температура колонки 150°С; температура испарителя и детектора 250°С; линейная скорость газа-носителя (азот) 40 см/с; коэффициент деления потока газа носителя 1:20.

2.4.4 Методика проверки упаковки на герметичность

Баллон без насадки-распылителя и защитного колпачка помещают вверх дном в стакан, дно которого устлано фильтровальной бумагой и выдерживают на протяжении 5 мин.

2.4.5 Методика проверки насоса-дозатора

Снимают защитный колпачок и последовательно с интервалом 5 с нажимают на насадку-распылитель сверху вниз до появления аэрозольной струи; баллон следует держать вертикально таким образом, чтобы насадка-распылитель находилась вверху.

Появление аэрозольной струи должно происходить после нажатия на насадку-распылитель не более чем 5 раз. Допускается при отсутствии струи нажать на насадку-распылитель еще один раз. В дальнейшем появление аэрозольной струи должно происходить после первого нажатия на насадку-распылитель.

2.4.6 Методика определения средней массы доставляемой дозы

Снимают защитный колпачок и последовательно с интервалом 5 с нажимают на насадку-распылитель сверху вниз до появления аэрозольной струи; баллон следует держать вертикально таким образом, чтобы насадка-распылитель находилась вверху. При проведении испытания баллон нельзя взбалтывать. Выпускают дозу и отбрасывают. Не менее чем через 5 с выпускают дозу и отбрасывают. Повторяют указанную операцию еще три раза. После этого баллон вместе с насадкой-распылителем взвешивают, выпускают дозу и снова взвешивают баллон вместе с насадкой-распылителем. Рассчитывают массу индивидуальной дозы как разницу двух масс. Повторяют вышеуказанную

процедуру еще для девяти баллонов. Определяют среднюю массу доставляемой дозы путем деления суммы масс индивидуальных доз на 9.

2.4.7 Методика определения количества извлекаемых доз

Берут 1 баллон, снимают защитный колпачок и последовательно с интервалом 5 с нажимают на насадку-распылитель сверху вниз до появления аэрозольной струи; баллон следует держать вертикально таким образом, чтобы насадка-распылитель находилась вверху. При проведении испытания баллон нельзя взбалтывать. Выпускают первую дозу и далее с интервалами не менее чем 5 сек. выпускают каждую последующую дозу до прекращения выхода препарата через насадку-распылитель. Подсчитывают число выпущенных доз.

2.4.8 Статистические методы исследования

Статистическую обработку данных проводили в программе MS Office Excel 2013. Данные на рисунках представлены в виде средних значений и стандартных отклонений по трем измерениям, если не оговорено другое количество измерений.

Для оценки различий средних использовали критерии на основе t-статистики Стьюдента [10].

Выводы к главе 2:

1. В работе использованы материалы, соответствующие требованиям действующих в настоящее время нормативных документов.

2. В исследовании применены современные физические методы исследования (спектрофотометрия, газовая и высокожидкостная хроматография), определены технологические характеристики модельных растворов и готовых лекарственных форм. Проведена всесторонняя оценка полупродуктов и готовых ЛФ в соответствии с современными требованиями нормативных документов. Разработаны методики качественного и количественного анализа интраназального спрея налоксона. Проведена статистическая обработка полученных экспериментальных данных, что свидетельствует о воспроизводимости и достоверности результатов исследований.

ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ НАЗАЛЬНОГО СПРЕЯ НАЛОКСОНА

3.1 Программа исследований по разработке назального спрея налоксона

Для систематизации и рационализации фармацевтической разработки была составлена программа исследований, включающая в себя два этапа, один из которых относятся непосредственно к процессу получения спрея назального налоксона.

Первым этапом программы исследования является выбор основной гипотезы и определение методологии ее осуществления. Для выбора основной гипотезы необходимо определить направления и предмет исследования. На данном этапе произведен анализ литературы с целью обоснования неинъекционной лекарственной формы налоксона гидрохлорида, обладающей системным действием. Наиболее подходящим путем введения является интраназальный. Основную гипотезу исследования можно сформулировать следующим образом: ***создание назального спрея налоксона***. В качестве *направлений и предмета исследований* выделяем: разработку подхода к созданию назального спрея налоксона.

Исследовательская часть состоит из одного этапа. При разработке лекарственной формы учитываются физико-химические свойства субстанции налоксона гидрохлорида, такие как: растворимость, устойчивость в различных средах, гидрофильность и др. На основании данных о субстанции налоксона гидрохлорида, можно судить о возможности введения вспомогательных веществ (рисунок 3.1).

С целью облегчения и рационализации осуществления разработки назального спрея налоксона выделен методологический подход (рисунок 3.2). В качестве групп вспомогательных веществ, включенных в состав, были выбраны: поверхностно-активные, активаторы всасывания, консерванты и корректоры

величины pH. Изученный диализ налоксона из модельных растворов позволяет предположить поведение препарата в организме [23].

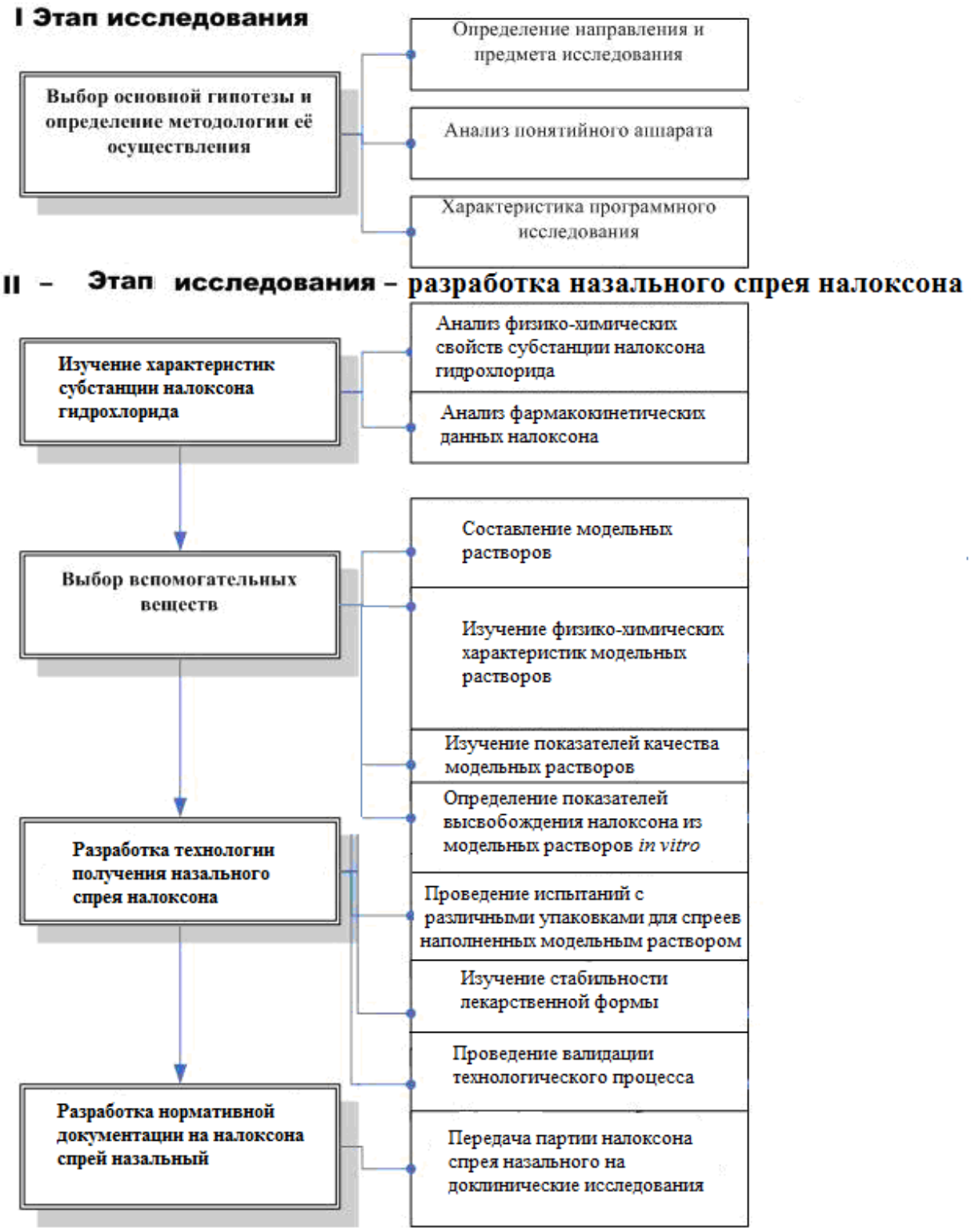


Рисунок 3.1 Программа исследования

Рисунок 3.2 Методология разработки налоксона спрея назального

При разработке технологии получения налоксона спрея назального мы опирались на данные, полученные при изучении физико-химических свойств раствора налоксона и его биодоступности (приложение 5); данные изучения диализа; и испытаний, проведенных с различными упаковками для спреев, наполненными раствором налоксона [50].

Последней стадией является разработка нормативной документации на налоксон спрей назальный.

3.2 Обоснование выбора интраназального пути введения налоксона для лечения передозировки опиоидами

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) выпустила в 2014 году новые рекомендации по предотвращению смертности от передозировки опиодами, где указано в виде рекомендации, что "люди, ставшие свидетелями передозировки опиоидов, должны иметь доступ к налоксону" [138].

В связи с учащением смертельных случаев при передозировке опиоидов, а также рекомендациями ВОЗ, необходимо увеличить снабжение налоксоном не только госпитального сегмента, но и свидетелей и семей наркозависимых, имеющих высокий риск возникновения передозировки.

При передозировке пострадавший находится без сознания, у него развивается гипоксия, возможно, апноэ, и он не в состоянии спасти себя, в данной ситуации время оказания неотложной медицинской помощи имеет существенное значение [45, 55]. Таким образом, люди, находящиеся в тесном контакте с человеком, входящим в группу риска возникновения передозировки, должны уметь узнавать симптомы передозировки, знать основы оказания первой помощи, если есть подозрение на передозировку. Первую помощь, как правило, оказывают семья пострадавшего или сотрудники полиции.

Расширение доступа к налоксону посторонних лиц, также имеет важное значение, так как:

1) базовый уровень техники оказания неотложной медицинской помощи в некоторых местах отсутствует;

2) машина скорой помощи не вызывается из-за страха быть задержанными полицейскими, прибывающими на место происшествия;

3) время реагирования на чрезвычайные ситуации в сельской местности может быть долгим [31, 36, 138].

Создание неинъекционной лекарственной формы налоксона будет иметь ряд преимуществ, по сравнению с инъекционным раствором, представленным на фармацевтическом рынке России. Во-первых, введение лекарственного средства парентерально не в госпитале, устрашает лиц вынужденных это делать [37]. Во-вторых, при использовании инъекционной лекарственной формы налоксона, существует риск уколоться иглой и заразиться заболеваниями, передающимися через кровь (например, гепатит С, ВИЧ), которые широко распространены среди этой группы пациентов. В-третьих, неинъекционная лекарственная форма налоксон может получить более широкой распространение среди рабочего класса (например, персонал гостиниц, работников социальной службы, полиции и др.) [140].

Другой путь введения налоксона должен быть пригодным для оказания первой помощи немедицинским персоналом на уровне общественных организаций. Кроме того, разработанная лекарственная форма должна иметь больший срок годности, ввиду предоставления данной лекарственной формы семьям наркозависимых и другим внебольничным организациям [51]. Также, учитывая ситуацию оказания первой помощи пострадавшему, необходимо, чтобы данная лекарственная форма налоксона быстро абсорбировалась и оказывала системное действие достаточное для устранения угнетения дыхания, вызванного передозировкой опиоидами [2, 11, 34].

Препаратом сравнения для любой лекарственной формы с неинъекционным путем введения является раствор для инъекций налоксона, применяемый, как указано в регистрационном досье, внутримышечно (в/м), внутривенно (в/в), и подкожно (п/к) [16, 21]. При ведении инъекционного раствора налоксона в/м или п/к, купирование симптомов передозировки обычно происходит через 3-7 мин; в то время как эффект от внутривенного введения проявляется, как правило, в течение 2 мин. С учетом длительности и опыта применения инъекционной формы налоксона, можно определить стандарт, по которому будет производиться оценка лекарственной формы с неинъекционным путем введения [80, 117].

Для выбора и обоснования пути введения налоксона в разрабатываемой лекарственной форме, был проведен отбор, проходивший в три этапа.

На *первом* этапе проводилась оценка всех 112 путей введения лекарственных средств, приведенных в рекомендациях FDA. Для каждого из возможных путей введения, рассматривали потенциальную применимость в качестве неинъекционного пути введения налоксона для оказания первой помощи при передозировке опиоидами лицами без медицинского образования. На основании этого были определены непригодные пути введения для данных целей по пяти выбранным критериям: 1) Парентеральный путь введения (в т.ч. любые инвазивные процедуры); 2) Путь введения относится исключительно к медицинским процедурам или требует медицинской подготовки; 3) Путь введения не удобен для применения (например, ректально или вагинально); 4) Путь введения не обеспечивает необходимую концентрацию налоксона для системного действия; 5) Путь введения не обеспечивает достаточно быстрое всасывание налоксона, по сравнению с парентеральным введением [80]. Орофарингеальный (oropharyngeal) путь исключен в виду того, что он дублирует трансбуккальный и сублингвальный пути введения; а трансмукозальный путь введения исключен, так в настоящем исследовании проводилось рассмотрение в рамках конкретной слизистой оболочки (буккальный, интраназальный и сублингвальный пути введения). Что касается путей введения через другие слизистые оболочки (например, ректальный путь введения способен сравнится с инъекционным при оказании первой помощи в педиатрической практике) [98], они не учитывались при выборе так как они обладают наименьшим удобством применения в качестве первой помощи пострадавшему при передозировке опиоидами. В результате были выбраны 4 неинъекционных пути введения (таблица 3.1).

Второй этап исследования предполагал оценку пригодности четырех путей введения, выбранных путем первичного скрининга.

Из дальнейших исследований был исключен ингаляционный путь введения, так как у пострадавшего от передозировки под действие опиоидов наблюдается

угнетение дыхания, в результате чего происходит остановка дыхания (или дыхание становится поверхностным), что приводит к отсутствию возможности введения лекарственной формы пострадавшему [125].

Таким образом, только три пути введения были рассмотрены в качестве потенциальных путей введения для оказания экстренной помощи при передозировке опиоидами лицами без медицинского образования: назальный, сублингвальный и трансбуккальный.

На *третьем* этапе исследования были отобраны пути введения, согласно критериям: 1) Пригодность для проведения неотложной помощи при передозировке; 2) Отсутствие риска возникновения осложнений при передозировке; и проведено сравнение отобранных путей введения с эталоном – инъекционным раствором налоксона.

Таблица 3.1 Третий этап отбора потенциально пригодных путей введения налоксона: критерии включения

Путь введения	**Характиристика**	**Код FDA**	**Критерий включения**	
			1	**2**
Буккальный	Применение посредствам приклеивания к слизистой оболочке щеки со стороны рта	030	Да	Возможно ухудшение эффективности из-за загрязнения слизистой оболочки рвотными массами или выделениями.
Назальный	Нанесение на слизистую оболочку носа; распыляют через нос	014	Да	Возможно ухудшение эффективности при носовых кровотечениях.

Сублингвальный	Под язык	024	Да	Возможно ухудшение эффективности из-за загрязнения слизистой оболочки рвотными массами или выделениями
Ингаляционный	Через респираторный тракт посредствам оральной или назальной ингаляции, оказывает местное или системное действие	136	Не приемлемо из-за отсутствия или угнетения дыхания при передозировке	Да

В соответствии с руководством FDA для отобранных в ходе исследования путей введения можно предложить следующую стратегию с учетом хорошего профиля безопасности налоксона: в то время как налоксон блокирует опиоидные рецепторы, он не вызывает фармакологических эффектов у лиц, не страдающих опиоидной зависимостью, и не принимавших опиоиды. К тому же, поскольку он не вызывает зависимости из-за отсутствия эйфории при применении [41], получение фармакокинетических данных новых композиций налоксона можно производить на здоровых добровольцах. В соответствии с руководством FDA, при проведении фармакокинетических исследований, необходимо будет оценивать относительную биодоступность по меньшей мере для двух различных доз, и сравнивать с инъекционной лекарственной формой налоксона (в/м, в/в или п/к). Исследования должны сравнивать дозу парентеральной лекарственной формы налоксона, по меньшей мере, 0,4 мг, и дозу(ы) новой неинъекционной лекарственной формы, которая, как можно ожидать, вызовет аналогичный или более высокий уровень фармакологического действия налоксона. Целевой уровень налоксона в плазме крови, фиксируемый у всех пациентов, должен быть сопоставимой продолжительности для новой лекарственной формы.

Также важным критерием включения является длительность фазы абсорбции налоксона из лекарственной формы. Для всех потенциальных пригодных неинъекционных форм налоксона абсорбция должна проходить в

течение первых 20-30 мин. Так как пострадавший от передозировки опиоидами нуждается в экстренной помощи, новая лекарственная форма налоксона должна быстро всасываться в кровь, далее проходить через гематоэнцефалический барьер и плаценту (педиатрическое применение), создавая при этом концентрацию достаточную для системного действия лекарственного средства. Данные условия выполняются для назального, трансбуккального и сублингвального путей введения, так как при данных путях введения налоксон абсорбируется через слизистую оболочку вне желудочно-кишечного тракта. Лекарственная субстанция попадает в периферическое кровообращение быстрее, чем в воротную вену, что позволяет избежать первичного метаболизма в печени. Назальный путь введения характеризуется высоким уровнем кровяной перфузии через слизистые оболочки носа, что облегчает всасывание через слизистую, и дренаж в основном происходит в вены лица [53, 119]. Буккальный (из преддверья ротовой полости) и сублингвальный пути введения обеспечивают проникновение лекарственного средства во внутреннюю яремную вену через вены лица, а оттуда быстрое прохождение в мозг [119].

Сублингвальный путь введения. В 2015 году в FDA началось рассмотрение возможности применения сублингвального спрея налоксон. Но остается ряд вопросов по поводу пригодности сублингвальной лекарственной формы налоксона для оказания экстренной помощи. Доступ к слизистой оболочке под языком может быть затруднен, если рот пострадавшего от передозировки закрыт и / или была рвота. Сублингвальный спрей трудно ввести, поскольку раствор налоксона будет теряться при проглатывании, а пероральная биодоступность налоксона очень мала. Подъязычные таблетки, как правило, имеют небольшой размер, и их трудно поместить под язык пострадавшему. Кроме того, наблюдалась значительная вариабельность подъязычной доставки налоксона и эффективности при исследованиях фармакодинамики у наркозависимых от опиоидов [111].

Сублингвальные лекарственные формы часто используются в медицине и приносят большую пользу при чрезвычайных ситуациях, как, например,

сублигвальные таблетки или спрей нитроглицерина используются для лечения острого приступа стенокардии или при инфаркте миокарда. Тем не менее, сублингвальный путь введения может не подойти, в случае рвоты у пострадавшего или патологической секреции слизистых оболочек.

Буккальный путь введения. Несмотря на отсутствие данных исследований на людях *in vivo* для буккальной лекарственной формы налоксона, достаточно перспективным может быть трансбуккальное применение быстро диспергируемых таблеток налоксона. В частности в институте фармацевтических наук в королевском колледже Лондона, была разработана модельная лиофилизированная таблетка налоксона, которая подходит для нанесения на слизистую оболочку щеки. Данная модельная лекарственная форма имеет быстрое высвобождением фармацевтической субстанции (распадается за 30 с) и достаточно высокий уровень абсорбции [29]. На данном этапе было получено одобрение от агентства по регулированию лекарственных средств и изделий медицинских медицинского назначения (MHRA) в Великобритании на первые исследования на людях, и 1 фазу клинических исследований, на которой будет производиться сбор фармакокинетических данных по абсорбции налоксона из трансбуккальной лекарственной формы у здоровых добровольцев. Полученные фармакокинетические данные будут сравниваться с данными введения инъекционной ЛФ налоксона при в/в и в/м введении.

Тем не менее, трансбуккальный путь введения успешно использован при разработке неинъекционной лекарственной формы других фармацевтической субстанции, ранее доступных только как инъекции. Буккальная лекарственная форма мидазолама (Buccolam) имеет быстрое начало действия и его биодоступность (80%) немного превосходит назальную форму мидазолама (73-75%) [53, 91, 120, 126]. Buccolam теперь является официально зарегистрированным на территории США лекарственным средством, которое родители могут применять самостоятельно в ожидании профессиональной медицинской помощи. Там также получены многообещающие экспериментальные результаты с буккальной доставкой налтрексона в организм

человека [110]. Но стоимость лиофилизированной лекарственной формы налоксона будет значительно выше, представленного на фармацевтическом рынке инъекционного раствора. И замена раствора для инъекций налоксона, который применялся с начала 1970 гг., на дорогостоящую лекарственную форму является нерациональной с финансовой точки зрения.

Интраназальный путь введения. Отчеты о клинических исследованиях содержат данные об использовании импровизированных наборов для назального применения налоксона, предназначенных для экстренной помощи. Данный набор представляет собой инъекционный раствор налоксона, помещенный в стеклянный флакон с распылителем. Эти наборы выдавались полицейским в США в середине 2000-ых годов [96, 106, 107, 116, 118]. В отношении этих наборов для назального применения, сохраняется неопределенность в отношении биодоступности и клинической эффективности [87, 88, 89, 125]. По некоторым данным [60] назальный спрей налоксона с низкой концентрацией (2 мг/5 мл), имел биологическую доступность не более 4%, хотя данные значения биодоступности, скорее всего, связаны с низкой концентрацией налоксона в растворе.

Для назального спрея, следует использовать более высокую концентрацию налоксона, по меньшей мере, в 5-10 раз превышающую текущую концентрацию инъекционного раствора, чтобы преодолеть потерю фармацевтической субстанции, связанную с введением избыточного объема в носовую полость.

Для назального пути введения выделяют три механизма абсорбции [54]:

— инерциальное столкновение, которое осуществляется в верхних дыхательных путях (носовая полость, глотка, гортань);

— гравитационная седиментация, ответственная за депонирование частиц аэрозоля/спрея, которые не подвергались столкновению при вхождении в верхние дыхательные пути;

— броуновская диффузия, ответственная за депозицию частиц размерами менее 0,5 мкм.

Инерциальное столкновение в данном случае считается наиболее важным механизмом, при котором абсорбция происходит, главным образом, в задней / дыхательной зоне носовой полости [49].

Для разработки интраназальной лекарственной формы важен также размер частиц, который определяет место, где будет происходить абсорбция фармацевтической субстанции:

— 10 – 5 мкм – осаждение в ротоглотке, гортани, трахее;

— 5 – 2 мкм – осаждение в нижних дыхательных путях;

— 2 – 0,5 мкм – осаждение в альвеолах;

— менее 0,5 мкм – не осаждаются в легких [1].

Кроме того, выдвинута гипотеза о соединение «нос к мозгу» (N2B). Суть, которой заключается в следующем: наркотические средства могут транспортироваться непосредственно в спинномозговую жидкость через обонятельный и тройничный нерв [58] через обонятельный эпителий (выстилающий верхнюю стенку носовой полости), выступающий непосредственно в обонятельную луковицу. Тем не менее, на данный момент нет доказательств наличия прямого транспорта лекарственных веществ от носа до спинномозговой жидкости у человека [58, 105].

В дополнение к этим анатомическим и фармакологическим факторам, необходимо учитывать ситуацию при оказании первой помощи при купировании симптомов передозировки (например, устройства должны быть портативными, доступными, простыми в использовании, а также способными осуществлять введение необходимой дозы фармацевтической субстанции пострадавшему от передозировке, находящемуся без сознания лежа на спине), а также физическое здоровье целевой группы населения, в том числе потенциальное повреждение или загрязнение соответствующей слизистой оболочки.

Обязательным требованием к разработанной новой интраназальной лекарственной форме налоксона является проведение оценки индивидуальной изменчивости биодоступности препарата при: интраназальном пути введения, сужении или закупорки дыхательных путей или апноэ; попаданию рвотных масс в

носовые ходы или ротовую полость; повреждение слизистой оболочки носа при злоупотреблении наркотиками. Для назального спрея, следует использовать более высокую концентрацию налоксона, по меньшей мере, в 5-10 раз превышающую текущую концентрацию инъекционного раствора, чтобы преодолеть потерю фармацевтической субстанции, связанную с введением избыточного объема в носовую полость.

3.3 Обоснование дозы налоксона гидрохлорида в разрабатываемой лекарственной форме

Разрабатываемый налоксон спрей назальный является препаратом, который оказывает системное действие, поэтому концентрация налоксона гидрохлорида и его доза были выбраны на основании результатов исследований биодоступности при интраназальном введении кроликам по сравнению с внутривенным и внутримышечным введением препарата Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/мл (АО «Варшавский фармацевтический завод Польфа», Польша) [16, 25, 50]. Кроме того, эффективность препарата была подтверждена результатами сравнительных фармакологических исследований *in vivo*, а безопасность – результатами сравнительного исследования общетоксического действия и местнораздражающего действия на слизистую оболочку полости носа [15].

Были исследованы уровни концентрации налоксона гидрохлорида в плазме крови кроликов при различных путях введения: внутривенном и внутримышечном для препарата Налоксон раствор для инъекций в дозе 0,6 мг/кг и интраназальном для препарата налоксон спрей назальный в различных дозах (приложение 5). Результаты исследований приведены в табл. 3.2 и на рис. 3.3.

При внутривенном введении раствора средняя концентрация налоксона гидрохлорида через 2 мин составляет 188,59 нг/мл; далее в течение 20 мин наблюдается быстрое снижение его концентрации, а через 120 мин в плазме обнаруживаются следовые количества вещества (рис. 3.3). Таким образом, проведенный анализ показал, что снижение концентрации налоксона носит двухфазный характер.

Несмотря на значительный начальный уровень налоксона (C_0 = 240,20 нг/мл), время его пребывания в крови непродолжительно: MRT = 32,84 мин, $T_{1/2}$ = 31,83 мин. Налоксон быстро выводится из организма: Cl_T = 110,61 мл/мин·кг, K_{el} = 0,0218 мин$^{-1}$ (табл. 3.2).

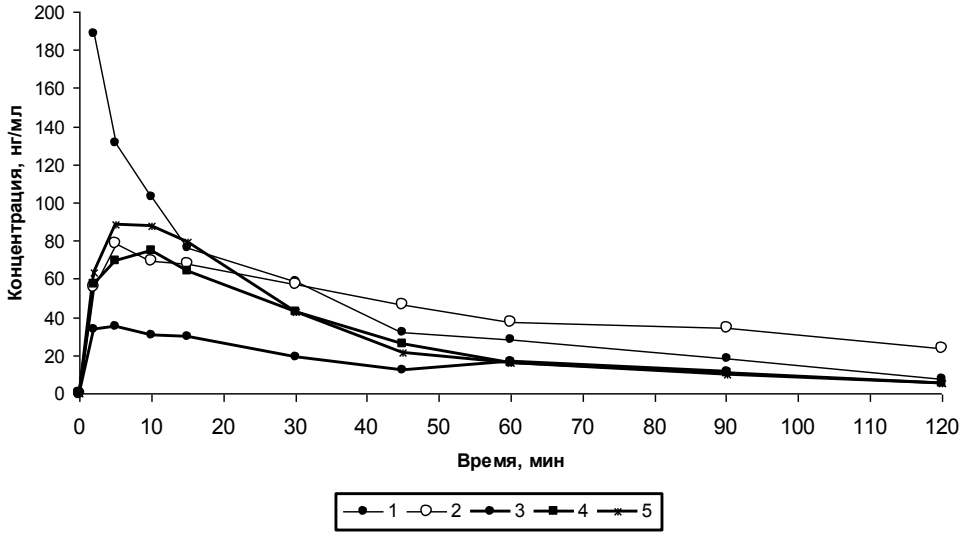


Рис. 3.3 Фармакокинетические кривые налоксона после внутривенного (1) и внутримышечного (2) введения препарата *Налоксон раствор для инъекций* в дозе 0,6 мг/кг и интраназального введения препарата *Налоксон спрей назальный* в дозах 0,6 мг/кг (3); 1,2 мг/кг (4) и 1,8 мг/кг (5).

Таблица 3.2 Основные фармакокинетические параметры налоксона при внутривенном, внутримышечном и интраназальном введении кроликам

Фармакокинетические константы	**Путь введения (дозы, мг/кг)**				
	в/в (0,6)	**в/м (0,6)**	**и/н (0,6)**	**и/н (1,2)**	**и/н (1,8)**
C_{max} (C_0), нг/мл	240,20	78,79	34,87	74,97	88,34
C_{max}/D	–	131,32	58,12	62,48	49,07
T_{max}, мин	–	5	5	10	5
K_{el}, мин$^{-1}$	0,0218	0,0098	0,0131	0,0240	0,0178
$T_{1/2}$, мин	31,83	70,91	52,85	28,91	39,02
MRT, мин	32,84	48,83	36,54	34,56	32,04
Cl_T, мл/мин·кг	110,61	77,84	233,95	346,86	478,39

Фармакокинетические константы	**Путь введения (дозы, мг/кг)**				
	в/в (0,6)	**в/м (0,6)**	**и/н (0,6)**	**и/н (1,2)**	**и/н (1,8)**
$AUC_{0\rightarrow t}$, нг мин/мл	5184,73	5273,64	1684,11	3236,84	3446,29
$AUC_{0\rightarrow \infty}$, нг мин/мл	5541,99	7708,38	2564,67	3459,58	3762,25
$C_{max}/AUC_{0\rightarrow t}$, $мин^{-1}$	–	0,0149	0,0207	0,0232	0,0256
f, % ($AUC_{0\rightarrow t}$ / D)	100	101,71	32,48	31,22	22,16
f, % ($AUC_{0\rightarrow t}$)	100	101,71	32,48	62,43	66,47

При внутримышечном введении концентрация налоксона нарастает в течение первых 5 мин (C_{max}-78,79 нг/мл) и далее начинает снижаться. Можно выделить два этапа снижения концентрации вещества: к 60 мин уровень его концентрации снижается в 2 раза (до 39,66 нг/мл). Начиная с этого момента, наступает вторая более продолжительная фаза элиминации. К 120 мин после инъекции концентрация налоксона в крови составляет 30 % от его максимально регистрируемого уровня.

При интраназальном введении препарата пик максимальной концентрации налоксона в плазме регистрируется через 5-10 мин и составляет 34,87 нг/мл; 74,97 нг/мл и 88,34 нг/мл соответственно для доз 0,6 мг/кг, 1,2 мг/кг и 1,8 мг/кг.

Через 30 мин концентрация налоксона снижается почти в 2 раза от максимальных значений, а через 120 мин в крови остается 5-7 % налоксона. При интраназальном введении кроликам препарата в дозе 0,6 мг/кг фармакокинетическая кривая характеризуется низким уровнем налоксона в крови. При введении препарата в дозах 1,2 мг/кг и 1,8 мг/кг концентрации налоксона в плазме сопоставимы с его уровнем при внутримышечном введении, а после достижения максимальной концентрации – с его уровнем при внутривенном введении.

Профили фармакокинетических кривых налоксона при интраназальном введении аналогичны профилю фармакокинетической кривой при внутримышечном введении (рис. 3.3). Параметры фармакокинетики свидетельствуют о быстром всасывании налоксона в системный кровоток с

последующей достаточно быстрой элиминацией из плазмы крови животных (рис. 3.3, табл. 3.2).

Основные фармакокинетические параметры, представленные в табл. 3.2, свидетельствуют, что при интраназальном введении налоксон очень быстро и с одинаковой скоростью для всех доз всасывается в кровь (T_{max}, $C_{max}/AUC_{0\rightarrow t}$). Скорость абсорбции налоксона при интраназальном введении выше, чем при внутримышечном примерно в 1,5 раза. Налоксон при интраназальном введении, также, как и при внутривенном, непродолжительно циркулирует в крови и быстро элиминирует: MRT составляет 36,54 мин; 34,56 мин и 32,04 мин; $T_{1/2}$ – 70,91 мин, 52,85 мин и 28,91 мин соответственно для дозы 0,6 мг/кг, 1,2мг/кг и 1,8 мг/кг. Абсолютная биодоступность налоксона имеет тенденцию к снижению при введении максимальной из тестируемых доз и составляет соответственно 32,48 %, 31,22 % и 22,16 % (в пересчете на дозу 0,6 мг/кг), или 32,48 %, 62,43 % и 66,47 % с учетом введенной дозы. Таким образом, абсолютная биодоступность налоксона при интраназальном введении кроликам составляет ~30% и пропорционально возрастает при двукратном повышении дозы. Исходя из результатов фармакокинетических исследований была рассчитана концентрация налоксона гидрохлорида в модельном растворе для интраназального введения, эквивалентная 0,4 мг налоксона гидрохлорида при инъекционном введении, она составила 1,2% в пересчете на чистое вещество.

В результате, проведенные исследования позволяют прогнозировать терапевтическую эквивалентность препарата налоксон спрей назальный с концентрацией действующего вещества 1,2% дозой 100 мкл и препаратов налоксона для внутримышечного и внутривенного введения и может рассматриваться как альтернатива инъекционным препаратам налоксона.

3.4 Обоснование выбора вспомогательных веществ и технологии назального спрея налоксона

При интраназальном введении, для обеспечения системного действия, налоксон должен быстро и достаточно полно всасываться в системный кровоток.

Для этого необходимо, чтобы раствор налоксона, распыляемый на слизистую оболочку носа, хорошо смачивал слизистую оболочку, растекался по ней (для всасывания с большой поверхности) и не вытекал из носа, а также не пересушивал слизистую оболочку и способствовал быстрой абсорбции налоксона в кровоток [71]. Заданные параметры раствора налоксона можно обеспечить введением в состав назального спрея вспомогательных веществ.

Согласно общей фармакопейной статье 1.4.1.0002.15 «Аэрозоли и спреи» в состав спреев могут входить следующие группы вспомогательных веществ: растворители, поверхностно-активные вещества, пленкообразователи, корригенты, антимикробные консерванты, антиоксиданты и другие группы [4, 9].

Налоксона гидрохлорид – гидрофильная лекарственная субстанция, кроме того есть многолетний опыт применения инъекционного раствора со сроком годности 2 года, что доказывает стабильность налоксона в растворе. Следовательно, в качестве растворителя была выбрана вода очищенная.

Для обеспечения смачиваемости слизистой оболочки раствором налоксона и улучшения его абсорбции, в состав спрея необходимо будет ввести *поверхностно-активное вещество* [30].

Поскольку налоксона гидрохлорид всасывается через слизистую оболочку полости носа посредством пассивной диффузии, необходимо подобрать состав *осмотически активных гидрофильных веществ* таким образом, чтобы обеспечить максимальную скорость и степень высвобождения налоксона гидрохлорида из препарата в опытах *in vitro* [24, 135].

Для обеспечения длительного срока годности назального спрея налоксона, в состав лекарственной формы вводили *антимикробный консервант*.

3.4.1 Подбор поверхностно-активного вспомогательного вещества и определение поверхностного натяжения модельных растворов

Для обеспечения хорошей смачиваемости слизистой оболочки, а также равномерного распределения раствора налоксона, в качестве одного из технологических приемов, способных справится с подобной задачей, можно

ввести в состав разрабатываемого раствора налоксона полимер, обладающий мукоадгезивными свойствами. В качестве мукоадгезивного полимера был выбран полоксамер 407. Полоксамер 407 широко применяется в составе биоадгезивных лекарственных форм, наносимых на слизистые оболочки, сочетает в себе свойства биоадгезивного компонента, поверхносто-активного вещества, стабилизатора, обладает гидрофильными свойствами, что обусловлено наличием в составе молекулы двух гидрофильных хвостов. Применение гидрофильных полимеров удлиняет время удерживания лекарственной формы на слизистой оболочке, что ведет к постепенному высвобождению фармацевтической субстанции и улучшению переносимости пациента [26]. В связи с этим, применение полоксамера 407 является первым выбором при разработке препаратов, наносимых на слизистую оболочку.

Кроме того, полоксамер 407 обладает поверхностной активностью, что будет способствовать улучшению смачиваемости и распределению модельного раствора по поверхности слизистой оболочки носа и стабилизации капелек раствора в аэрозольной струе. Оценка влияния полоксамера 407 на поверхностно-активные свойства модельных растворов налоксона проводилась с помощью определения поверхностного натяжения, по методике, представленной в главе 2 «Материалы и методы».

Таблица 3.3 Поверхностно-активные свойства воды и модельных растворов налоксона

Состав раствора	**σ**	**γ**	**Wk**	**Wa**	**f**	**cos θ**	**θ, °**
	мДж/м^2 (мН/м)						
Вода	71,96	64,66	143,92	41,19	–102,73	–0,42760	115,32
Раствор налоксона без полоксамера	51,23	36,44	102,46	48,68	–53,78	–0,04978	92,85
1 % водный раствор полоксамера 407	40,21	21,35	80,42	52,75	–27,67	0,31186	71,83
Раствор налоксона, содержащий 1 % полоксамера 407	38,91	21,06	77,82	51,74	–26,08	0,32974	70,75

Для воды и водного раствор налоксона, не содержащего ПАВ, краевой угол смачивания гидрофобной поверхности превышает 90 ^{o} (табл. 3.3), работа когезии оказывается в несколько раз больше работы адгезии, что препятствует растеканию раствора налоксона по слизистой оболочке носа. Следовательно, модельные водные растворы, не содержащие ПАВ (полоксамер 407), предположительно будут иметь более низкую биодоступность налоксона из-за небольшой площади контакта раствора со слизистой.

В присутствии 1 % полоксамера 407 краевой угол смачивания уменьшается примерно до 70 ^{o}, значения работы когезии и работы адгезии становятся сопоставимы, вследствие чего значительно увеличивается коэффициент растекания. Как следует из данных табл. 3.3, поверхностно-активные свойства препарата определяются именно полоксамером 407, так как он обладает выраженными поверхностно-активными свойствами [26] и, в соответствии с этим, обеспечивает мукоадгезию препарата. Введение полоксамера 407 в более высоких концентрациях посчитали не целесообразным, так как введеная концентрация обеспечивает необходимый уровень биоадгезивных и поверхностно-активных свойств, а увеличение количества полимера может привести к повышению токсичности препарата.

Результатом проведенного исследование явилось включение в состав полоксамера 407 в качестве вспомогательного вещества, обладающего поверхностной активностью и мукоадгезивными свойствами. Данный сополимер будет способствовать лучшему смачиванию слизистой оболочки носа раствором налоксона.

3.4.2 Подбор состава активаторов всасывания

Для быстрого и полного всасывания налоксона гидрохлорида препарат должен обладать повышенной осмотической активностью, которая является движущей силой процесса пассивной диффузии через биомембраны. Осмотической активностью обладают гидрофильные растворители и полимеры, в частности, димексид (ДМСО), пропиленгликоль и макроголы

(полиэтиленгликоли). Например, на их осмотической активности основано применение этих вспомогательных веществ в препаратах для местного лечения ран [12]. При этом следует различать осмотически активные растворители с низкой молекулярной массой (ДМСО, N-метилпирролидон, пропиленгликоль, этанол и др.), которые способны к проникновению через биомембраны и могут выступать в качестве усилителей проникновения, и осмотически активные растворители/полимеры, которые имеют высокую молекулярную массу (400 и более) (полиэтиленгликоли), которые не способны проникать сквозь биомембраны без их повреждения [12].

При контакте осмотически активного препарата с биообъектом имеют место два разнонаправленных диффузионных процесса, которые возникают, чтобы устранить разницу в осмотическом давлении между биообъектом и препаратом. Первый процесс – это диффузия лекарственного средства и низкомолекулярных веществ, которые могут проникать сквозь биомембраны, в биообъект, а второй – диффузия воды из биообъекта в препарат. Полиэтиленгликоли с высокой молекулярной массой не являются усилителями проникновения, но из-за создаваемого ими высокого осмотического давления способствую высвобождению из препарата лекарственных средств.

При значительной концентрации непроникающих осмотически активных веществ (в частности, полиэтиленгликолей) они вызывают обезвоживание биообъекта, приводящее к осмотическому шоку клеток ткани [12]. При контакте с биологическими объектами полиэтиленгликоли оказывают на них дегидратирующее действие, абсорбируя как внеклеточную, так и внутриклеточную воду. В свою очередь, это ведет к созданию высокого осмотического давления в клетках и притоку в них воды из близлежащих тканей, вследствие чего в клетках может наступить осмотический шок с разрушением биомембран [2, 16]. С другой стороны, проникающие осмотически активные растворители (например, пропиленгликоль) в высоких концентрациях оказывают цитотоксическое и местнораздражающее действие [20].

Исходя из современных представлений, местное применение гиперосмолярных препаратов может быть безвредно для тканей, если эти препараты содержат, как минимум, два гидрофильных компонента: низкомолекулярный, который легко проникает в живые клетки и удерживает в них воду, и высокомолекулярный, который в них не проникает, но абсорбирует внеклеточную воду [1,2, 16, 20]. Такая комбинация, с одной стороны, позволяет избежать осмотического шока клеток и местнораздражающего действия, а, с другой стороны, будет способствовать быстрому и полному высвобождению и всасыванию лекарственного средства.

При выборе вспомогательных веществ было исследовано влияние различных осмотически активных растворителей на диализ налоксона гидрохлорида из лекарственной формы через полупроницаемую мембрану в опытах *in vitro*. Диализ является первым этапом всасывания фармацевтической субстанции в системный кровоток и моделирует прохождение его молекул/ионов через биомембраны. Для обеспечения быстрого и полного диализа налоксона гидрохлорида были исследованы комбинации водных растворов различных гидрофильных растворителей в разных соотношениях. Составы модельных растворов приведены в табл. 3.4, составы подобраны на основе литературных данных [2,3,12]. В табл. 3.5 и на рис. 3.4 представлены результаты исследований, полученные в ходе исследования.

Таблица 3.4 Составы модельных растворов для исследования диализа налоксона гидрохлорида

Наименование вещества	**Номер образца**					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Налоксона гидрохлорид (в пересчете на 100 % безводное вещество)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Полиэтиленгликоль 400	20,0	15,0	5,0	10,0	10,0	10,0
Пропиленгликоль	—	5,0	15,0	10,0	10,0	10,0
N-метилпирролидон	—	—	—	—	5,0	—
Диметилсульфоксид	—	—	—	—	—	5,0
Полоксамер 407	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Кислота лимонная моногидрат	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Вода очищенная	до 100 г					

Таблица 3.5 Диализ налоксона гидрохлорида через полупроницаемую мембрану

Номер образца	Высвобождение, % от исходной концентрации, через время:				
	0,25 ч	0,5 ч	1,0 ч	2,0 ч	3,0 ч
1	0,92±0,02	1,85±0,04	3,35±0,07	5,57±0,11	6,24±0,12
2	13,96±0,28	21,91±0,44	37,43±0,76	58,06±1,2	62,60±1,25
3	3,32±0,06	19,25±0,38	23,39±0,47	34,30±0,68	38,47±0,77
4	17,71±0,35	33,66±0,67	48,48±0,96	61,12±1,2	67,66±1,35
5	14,30±0,286	27,11±0,54	50,22±1,0	63,41±1,26	68,88±1,37
6	6,76±0,13	17,92±0,36	41,83±0,83	67,81±1,35	72,70±1,45

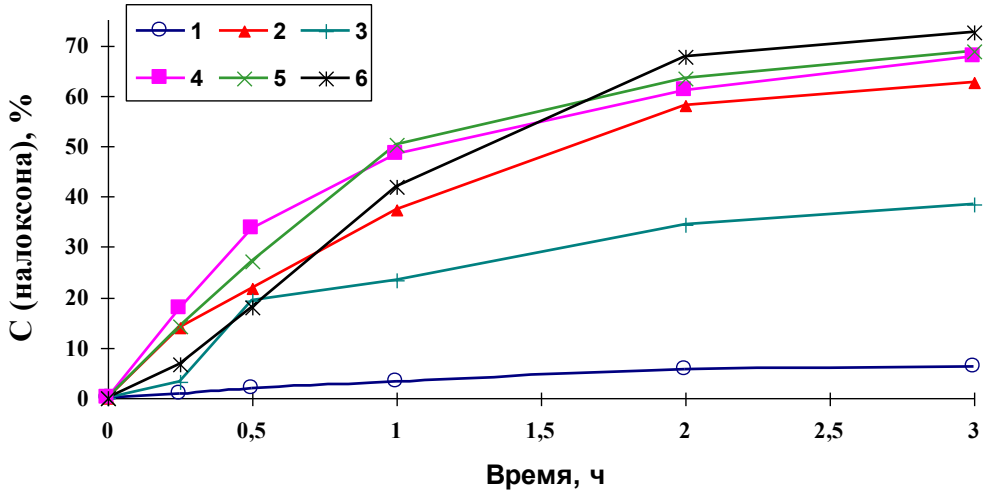


Рисунок 3.4 Кинетика диализа налоксона гидрохлорида через полупроницаемую мембрану

Методика проведения диализа через полупроницаемую мембрану описана в главе 2.

Как видно из данных, представленных в табл. 3.3 и на рис. 3.4, наименьшая скорость и степень диализа налоксона гидрохлорида наблюдается при содержании 20 % ПЭО 400. Замена 5 % ПЭО 400 на 5 % пропиленгликоля приводит к резкому увеличению скорости диализа налоксона гидрохлорида, о которой можно судить по углу наклона начального участка кривой к оси абсцисс (рис. 3.1), и степени его диализа в течение 3 часов с 6,24 % до 62,60 % (в 10 раз) (табл. 3.3). Замена 10 % ПЭО 400 на 10 % пропиленгликоля приводит к дальнейшему повышению скорости диализа налоксона гидрохлорида и степени его диализа до 67,66 % (табл. 3.5). При увеличении содержания пропиленгликоля до 15 % резко уменьшается скорость диализа налоксона гидрохлорида и

снижается степень его высвобождения с 67,77 % до 38,47 % (в 1,76 раза) (табл. 3.5).

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют, что оптимальным для диализа налоксона гидрохлорида является соотношение концентраций ПЭО 400 и пропиленгликоля 10%: 10%, которое обеспечивает максимальные скорость и степень диализа.

При дополнительном введении в состав препарата 5% N-метилпирролидона скорость диализа налоксона гидрохлорида в первые 30 мин несколько уменьшается (рис. 3.4), а степень его диализа остается примерно на том же уровне 68,88 % (табл. 3.5). Дополнительное введение 5 % диметилсульфоксида уменьшило в первый час исследования скорость диализа налоксона гидрохлорида (рис. 3.1) и мало повлияло на степень его диализа (табл. 3.5).

Исходя из результатов эксперимента, в итоговый состав модельного раствора налоксона включены ПЭО 400 в концентрации 10 % и пропиленгликоль в концентрации 10 %, в состав препарата не стали включать слабо влияющие на увеличения проникновения диметилсульфоксид и N-метилпирролидон.

Результаты исследования диализата образца № 4 методом газовой хроматографии показали, что ПЭО 400 не проникает через полупроницаемую мембрану и в диализате не обнаруживается. Роль усилителя проникновения выполняет пропиленгликоль, который диффундирует через полупроницаемую мембрану в диализат (рис. 3.5). Пропиленгликоль быстро высвобождается из растворителя № 4 (табл. 3.6) в камеру с водой: 0,25 ч – 13,54 %, 0,5 ч – 23,78 %, 1,0 ч – 33,25 %, 2,0 ч – 51,62 %, 3,0 ч –70,65 %. Затем диализ пропиленгликоля замедляется; через на 4 часа высвобождается 72,15 %, то есть с 3 ч по 4 ч высвобождается 1,5 %.

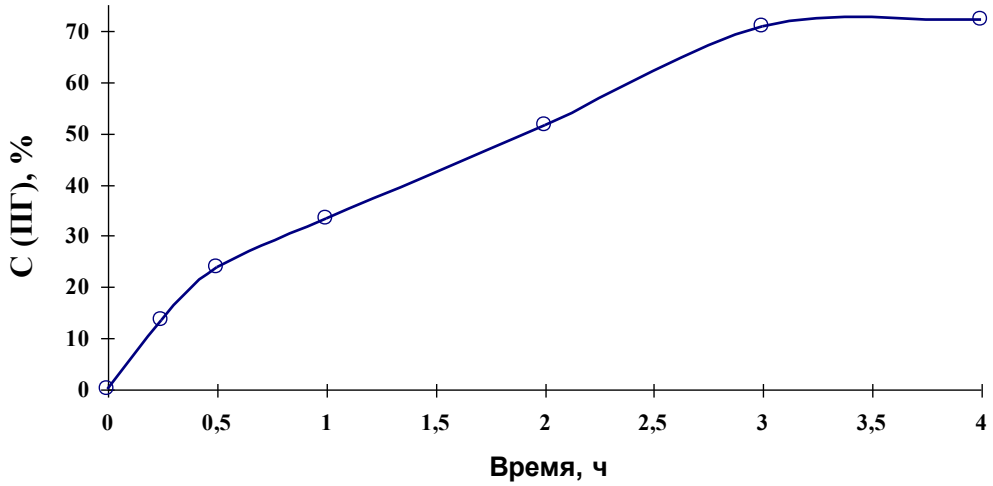


Рисунок 3.5 Кинетика диализа ПГ через полупроницаемую мембрану в камеру с водой при 37 ^{o}C

Результаты исследований, свидетельствуют, что пропиленгликоль выполняет функцию усилителя проникновения. При этом кинетика диализа пропиленгликоля напоминает кинетику диализа налоксона гидрохлорида из растворов № 2 и № 4, что свидетельствует о существенном вкладе пропиленгликоля в диализе налоксона гидрохлорида.

Процессом противоположным диализу дейстующего вещества через полупроницаемую мембрану является диффузия воды в камеру с препаратом, вследствие чего масса камеры с препаратом увеличивается. Результаты исследования кинетики абсорбции воды модельными растворами № 1, № 2 и № 4 представлены в табл. 3.6 и на рис.3.6.

Таблица 3.6 Кинетика абсорбции воды образцами растворами (состав см. в табл. 3.4)

Номер образца	**Δm, %, через время:**						
	0,25 ч	**0,5 ч**	**1,0 ч**	**2,0 ч**	**2,5 ч**	**3,0 ч**	**4,0 ч**
1	29,28±0,58	40,79±0,81	53,95±1,16	82,1±1,64	93,95±1,8	109,87±2,01	119,41±2,38
2	25,99±0,53	39,14±0,8	52,63±1,03	78,4±1,53	89,14±1,7	95,39±1,94	99,34±1,98
4	25,89±0,52	39,20±0,81	51,31±1,19	68,75±1,44	75,12±1,6	78,88±1,55	82,21±1,76

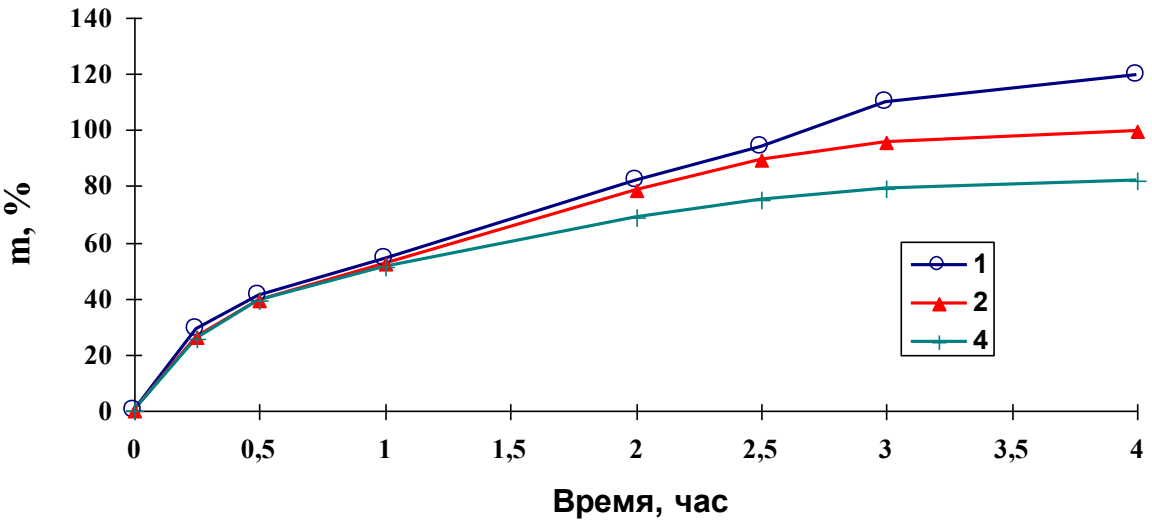


Рисунок 3.6 Кинетика увеличения массы (m) камеры с растворами (кинетика абсорбции воды растворами)

Масса абсорбируемой воды оказывается наибольшей, если в качестве растворителя используется ПЭО 400 в концентрации 20 %. При уменьшении содержания ПЭО 400 и увеличении концентрации пропиленгликоля масса воды, абсорбируемой препаратом, снижается, вследствие чего должно снижаться и дегидратирующее действие препарата на слизистую оболочку полости носа. Уменьшение абсорбции воды при частичной замене ПЭО 400 на пропиленгликоль обусловлено тем, что пропиленгликоль менее гидрофилен чем ПЭО 400 (ГЛБ = 9,38 и 12,49 соответственно) и следовательно связывает меньшее количество воды. Кроме того, уменьшение массы камеры с препаратом частично связано с диффузией пропиленгликоля из этой камеры в камеру с водой (рис. 3.5).

В табл. 3.7 и на рис. 3.7 представлена кинетика увеличения массы (m) камеры с растворами (кинетика абсорбции воды растворами) при разных концентрациях гидрофильных растворителей пропиленгликоля и ПЭО 400, взятых в равных массовых соотношениях 1:1. Препарат, не содержащий пропиленгликоля и ПЭО 400, также обладает определенной осмотической активностью и абсорбирует воду во времени, что связано с наличием полоксамера 407 и налоксона гидрохлорида.

Таблица 3.7 Кинетика увеличения массы (m) камеры с растворами (кинетика абсорбции воды растворами) при разных концентрациях гидрофильных растворителей

Концентрация смеси ПГ и ПЭО 400, % масс.	**Δm, %, через время:**				
	0,5 ч	**1 ч**	**2 ч**	**3 ч**	**4 ч**
0 %	11,32±0,23	19,17±0,38	27,62±0,55	34,81±0,70	39,44±0,78
5 %	20,86±0,41	34,41±0,69	44,30±0,88	51,28±1,02	58,28±1,16
10 %	27,15±0,54	39,87±0,80	56,15±1,12	63,67±1,27	67,77±1,35
15 %	28,24±0,56	43,71±0,87	64,90±1,30	75,45±1,5	81,62±1,63
20 %	37,33±0,74	54,67±1,09	70,67±1,41	83,03±1,66	88,68±1,77

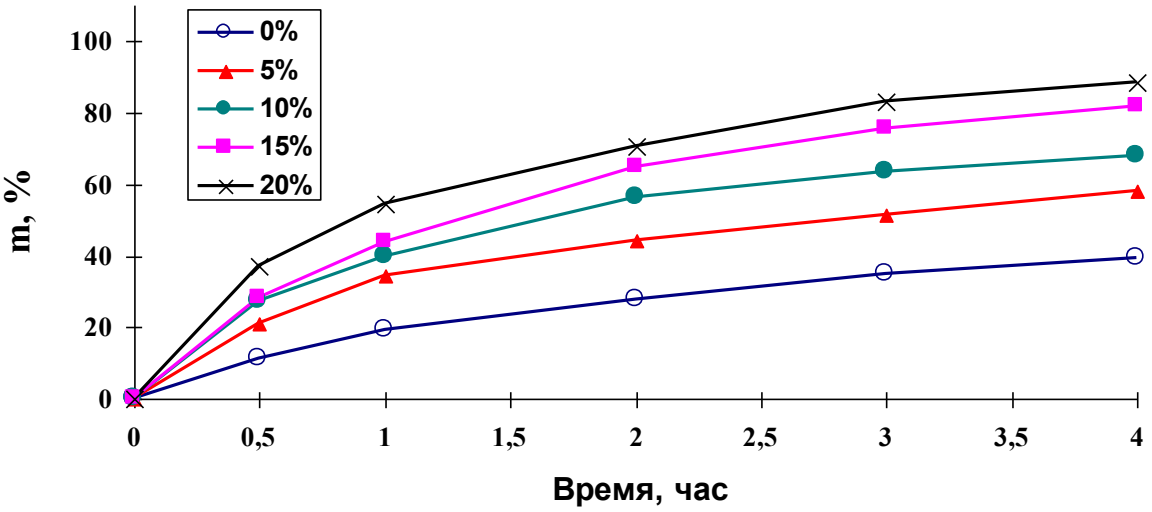


Рисунок 3.7 Кинетика увеличения массы (m) камеры с растворами (кинетика абсорбции воды растворами), содержащими разные концентрации смеси гидрофильных растворителей пропиленгликоля и ПЭО 400, взятых в массовом соотношении 1:1

Как видно из данных, представленных на рис. 3.7 и в табл. 3.7, при включении в состав препарата смеси гидрофильных растворителей масса абсорбируемой воды увеличивается. Однако это увеличение не является пропорциональным увеличению концентрации смеси растворителей. Так, например, через 3 часа раствор с 5 % смеси пропиленгликоля и ПЭО 400 абсорбирует на **16,5 %** больше воды, чем раствор без гидрофильных

растворителей; последовательное добавление по 5 % смеси растворителей увеличивает абсорбцию на **12,4 %**, **11,8 %** и **7,6 %**. При наличии смеси пропиленгликоля и ПЭО 400 в концентрации 20 % препарат абсорбирует в течение 3 часов около 83 % воды, то есть обладает достаточно умеренной осмотической активностью, и не будет оказывать сильного пересушивающего (дегидратирующего) действия на слизистую оболочку полости носа. Кроме того, слизистую оболочку будет предохранять от избыточного пересушивания комбинированное применение непроникающего ПЭО 400 и проникающего пропиленгликоля, который связывает внутриклеточную воду [2, 22].

Таким образом, для предотвращения возникновения пересушивающего эффекта слизистой оболочки носа и получения гиперосмоляльного раствора налоксона в состав разрабатываемой формы следует ввести ПЭГ 400 и ПГ с суммарной концентрацией в растворе 20%.

3.4.3 Подбор регуляторов величины pH раствора налоксона

pH среды является значимым фактором для химической стабилизации налоксона гидрохлорида в препарате. По данным литературы в щелочной среде налоксона гидрохлорид вследствие химической несовместимости разлагается с образованием избыточного количества примесей, поэтому инъекционные растворы налоксона гидрохлорида нельзя смешивать с препаратами, содержащими бисульфиты, метабисульфиты, длинноцепочечные или высокомолекулярные анионы, а также с растворами, имеющими щелочной pH [65]. То есть, налоксона гидрохлорид химически несовместим с большинством антиоксидантов, используемыми для стабилизации водных растворов. Такие же антиоксиданты как α-токоферол, бутилгидроксианизол и бутилгидрокситолуол не растворимы в водно-гликолевой среде препарата [90]. Поэтому наиболее значимым фактором для химической стабилизации налоксона гидрохлорида в препарате представляется кислый pH среды.

Для всех инъекционных растворов налоксона гидрохлорида устанавливают пределы pH. Так, в монографии «Naloxone Injection» Британской фармакопеи pH нормируют в пределах от 3,0 до 4,5; в монографии «Naloxone Hydrochloride

Injection» Фармакопеи США – от 3,0 до 6,5; в НД 42-10711-05 – от 3,0 до 5,0 [40, 65]. В качестве регулятора pH используется кислота хлористоводородная.

pH разрабатываемого препарата без буферных веществ составляет около 4,5, что является верхним пределом, установленным Британской фармакопеей [40]. Поскольку в составе препарата должен был присутствовать регулятор pH, установили пределы pH от 3,0 до 4,0, которые находятся в соответствии с тремя указанными нормативными документами [65].

На основе литературных данных, вместо кислоты хлористоводородной, которая может оказывать корродирующее действие на пружины насосов, в качестве регулятора pH использовали кислоту лимонную моногидрат [13, 65, 90]. Результаты исследований по выбору концентрации кислоты лимонной моногидрата представлены на рис. 3.8.

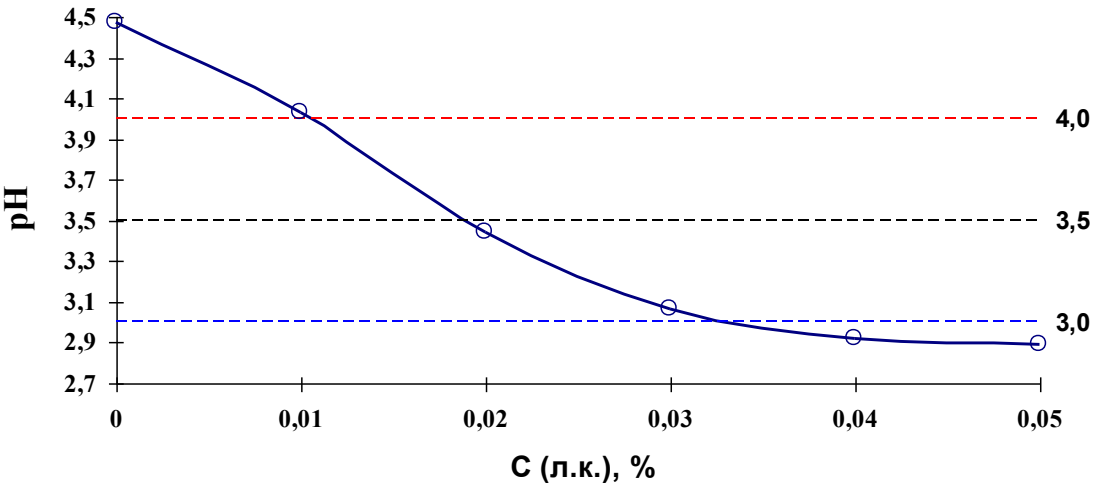


Рисунок 3.8 Зависимость pH препарата налоксон спрей назальный от содержания лимонной кислоты моногидрата

Оптимальную величину pH ≈ 3,5 обеспечивает 0,02 % кислоты лимонной моногидрата (рис. 3.8). Таким образом, при необходимости достижения оптимального pH препарата около 3,5 допускается изменение содержания в 100 г препарата кислоты лимонной моногидрата в пределах от 0,01 г до 0,03г.

Выбранные пределы pH и регулятор кислотности (кислота лимонная моногидрат) подтверждена изучением стабильности налоксона гидрохлорида в препарате при хранении (табл. 3.30).

Разработанный состав препарата «Налоксон спрей назальный» не оказывает токсического влияния на общее состояние и поведение лабораторных животных, не проявляет местнораздражающего действия на слизистую оболочку полости носа, что подтверждено доклиническим изучением острой и субхронической токсичности и гистологическими исследованиями (приложение 6).

3.5 Оценка качества назального спрея налоксона гидрохлорида

Для разработки технологии назального спрея налоксона необходимо оценить показатели качества модельного раствора с выбранным составом. Помимо показателей качества, приведенных в ОФС.1.4.1.0002.15 «Аэрозоли и спреи» (глава 1), дополнительно были оценены следующие показатели качества назального спрея налоксона: эффективность антимикробного действия консервантов назального спрея налоксона и его микробиологическая чистота; определение плотности раствора налоксона при различных температурах; оценка реологических свойств; распределение капель по размерам в аэрозольной струе.

При производстве нестерильных жидких лекарственных средств наиболее серьезный риск для их качества представляет микробная контаминация. Поэтому принцип, изложенный в приложении 9 «Производство жидкостей, кремов и мазей» к Руководству по надлежащей практике производства лекарственных средств для человека, принятому в Российской Федерации (2007), гласит: «При производстве жидкостей, кремов, мазей и других мягких лекарственных форм существует особенно большой риск микробной и другой контаминации. Следовательно, необходимы особые меры по предотвращению любой контаминации».

Чтобы обеспечить микробиологическую чистоту назальных спреев, с одной стороны, соблюдают установленные правила надлежащей производственной практики [19]; с другой стороны, в их составы вводят антимикробные консерванты [62]. При этом необходимо доказать, что выбранные консерванты действительно способны эффективно предотвращать развитие микроорганизмов в препаратах при их хранении. В частности, Европейская Фармакопея в общей

фармакопейной статье «Nasal Preparations» выдвигает требование, в соответствии с которым при разработке назальных лекарственных средств, в состав которых входят антимикробные консерванты, уполномоченному органу должны быть представлены данные, которые подтверждают эффективность выбранных консервантов [64].

Испытания эффективности антимикробного консервирующего действия всегда необходимо проводить при разработке нестерильных жидких лекарственных средств (особенно тех, в состав которых входит вода), поскольку эффективность антимикробного консерванта может ослабляться в результате его взаимодействия с лекарственными и другими вспомогательными веществами, а также с первичными упаковочными материалами [62]. Поэтому на стадии разработки жидкого лекарственного средства необходимо выбрать подходящие для конкретного препарата концентрации и комбинации консервантов и убедиться, что антимикробная активность исследуемого препарата обеспечивает надлежащую защиту от нежелательных эффектов, которые могут быть результатом избыточного микробного загрязнения или размножения микроорганизмов на этапах его хранения и использования.

3.5.1 Результаты исследования эффективности антимикробного действия консервантов в составе назального спрея налоксона

Метод испытания эффективности антимикробных консервантов и критерии их пригодности изложены в общей статье 5.1.3 «Efficacy of antimicrobial preservation» Европейской Фармакопеи 7.0 и в ОФС 1.2.4.0011.15 «Определение эффективности антимикробных консервантов лекарственных средств» ГФ XIII. Критерием оценки эффективности антимикробного консерванта служит уменьшение числа жизнеспособных клеток микроорганизмов в препарате за определенный период времени после его инокуляции. Критерии оценки зависят от требуемой степени защиты лекарственных средств и приведены в общей статье 5.1.3 EPh 7.0 и в ОФС 1.2.4.0011.15.

По требованиям ГФ XIII в нестерильных препаратах для введения в полость носа логарифм снижения числа жизнеспособных клеток бактерий через 14 суток должен составлять не менее 2, с 14 до 28 сутки число бактерий не должно увеличиваться. Число жизнеспособных клеток грибов не должно увеличиваться через 14 и 28 суток по сравнению с исходным уровнем (критерий 2).

Эффективности антимикробного консервирующего действия изучали на образцах лабораторной серии препарата *налоксон спрей назальный*, по методике, описанной в главе 2 «Материалы и методы».

Для исследования эффективности антимикробного консервирующего действия по требованиям соответствующего руководства по качеству [62] приготовлена лабораторная серия препарата, в которой концентрация пропиленгликоля была на нижнем пределе, установленном в спецификации в течение срока хранения, то есть 9,5 % (табл. 3.10). Такой подход к изучению эффективности антимикробных консервантов соответствует нормам, принятым в Европейском Союзе [62].

Таблица 3.10 Исследуемый состав назального спрея налоксона

Компоненты	**Количество (г) на 100,0 г раствора**
Налоксона гидрохлорид	1,2*
Пропиленгликоль	9,5
Макрогол (ПЭГ) 400	10,0
Полоксамер 407	1,0
Кислота лимонная	0,03
Воды очищенной	до 100,0

* - в пересчете на чистое вещество

Таблица 3.11 Эффективность антимикробного действия препарата *налоксон спрей назальный* при концентрации пропиленгликоля 9,5%

Экспозиция	Требования ГФ XIII (категория 2)		Число микроорганизмов, КОЕ/г (log снижения)				
	Число бактерий КОЕ/г, log снижения	Число грибов КОЕ/г, log снижения	*S. aureus* ATCC 6538-P	*E. coli* ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 9027	*C. albicans* NCTC 885-653	*A. niger* ATCC 16404
Исходная нагрузка	1×10^5 – 1×10^6	1×10^5 – 1×10^6	$1{,}17\times10^5$	$9{,}05\times10^5$	$8{,}50\times10^5$	$1{,}05\times10^5$	$5{,}45\times10^5$
Исходный высев	–	–	$9{,}65\times10^5$ (0,08)	$8{,}35\times10^5$ (0,03)	$9{,}15\times10^4$ (0,97)	$7{,}40\times10^4$ (0,15)	$5{,}40\times10^5$ (0,004)
2 сут	–	–	НО	НО	НО	НО	$4{,}35\times10^5$ (0,10)
7 сут	–	–	НО	НО	НО	НО	$3{,}75\times10^5$ (0,16)
14 сут	2	НУ	НО	НО	НО	НО	$2{,}90\times10^5$ (0,27)
28 сут	НУ	НУ	НО	НО	НО	НО	$2{,}10\times10^5$ (0,41)

НО – жизнеспособные клетки тест-микроорганизмов не обнаружены (менее 5 КОЕ/г для *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* и менее 10 КОЕ/г для *A. niger*);

НУ – число жизнеспособных клеток тест-микроорганизмов не увеличивается.

Результаты изучения эффективности антимикробного действия консерванта в разработанном препарате, приведенные в табл. 3.11, показали, что в образцах препарата после инокуляции наблюдается быстрая гибель бактерий и дрожжеподобных грибов, т.е. консервант в составе препарата налоксон спрей назальный обладает высокой эффективностью антимикробного консервирующего действия в отношении бактерий и дрожжеподобных грибов, которая соответствует требованиям ГФ РФ XIII изд.; через 14 суток после инокуляции и при последующем высеве жизнеспособные клетки этих тест-микроорганизмов не были обнаружены.

В отношении плесневых грибов эффективность антимикробного действия

консерванта в составе препарата налоксон спрей назальный также соответствует требованиям ГФ РФ XIII изд., так как через 14 суток и 28 суток после инокуляции не наблюдалось увеличения числа жизнеспособных клеток A. niger по сравнению с исходной нагрузкой. Однако антимикробное консервирующее действие в отношении A. niger оказывается менее эффективным, поскольку логарифм снижения числа жизнеспособных клеток A. niger через 14 и 28 суток составил всего 0,27 и 0,41 соответственно.

Количество клеток дрожжевых и плесневых грибов не увеличивалось на протяжении всего срока исследования.

Эффективность антимикробного действия (при содержании пропиленгликоля на нижнем пределе 9,5 % в препарате налоксон спрей назальный) соответствует требованиям ГФ XIII изд. (категория 2). Надлежащая эффективность антимикробного консервирующего действия позволяет сохранять препарату налоксон спрей назальный требуемую микробиологическую чистоту как после изготовления, так и при хранении в течение всего срока годности.

3.5.2 Оценка микробиологической чистоты назального спрея налоксона

Препарат н*алоксон спрей назальный* относится к препаратам, предназначенным для введения в полость носа. Поэтому в соответствии с требованиями ГФ XIII этот препарат относится к категории 2 и в отношении микробиологической чистоты к нему предъявляют следующие требования [4]:

– общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) – не более 10^2 в 1 г;

– не более 10^1 энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий в 1 г;

– отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г:

– отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г.

Методика определения микробиологической чистоты, по которой проводили определение, представлена в главе 2 «Материалы и методы».

Перед испытанием на микробиологическую чистоту, во избежание неправильной оценки полученных результатов, предварительно необходимо определить возможность проявления лекарственным средством антимикробного

действия. Для этого мы сравнивали интенсивность роста тест-штамов микроорганизмов на средах в присутствии и без испытуемого препарата. Исследования последовательных разведений не проводили, так как первое разведение препарата 1:10 показало рост тест-микроорганизмов, аналогичного контрольным образцам, т.е данное разведение устранило антимикробное действие исследуемого препарата.

Проверку пригодности разработанной методики проводили по ОФС 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота». Результаты проверки представленные в таблице 3.8, показали, что разработанная методика испытания позволяет нейтрализовать антимикробное действие консерванта назального спрея налоксона в условиях испытания на микробиологическую чистоту.

Таблица 3.8 Результаты проверки пригодности методики испытания микробиологической чистоты препарата *налоксон* спрей назальный

	Наличие роста тест-микроорганизмов на питательных средах						
	***B. cereus ATCC* 10702** (среда № 1, соево-казеиновый агар)	***C. albicans NTCC* 885-653** (агар Сабуро с глюкозой и антибиотиком, среда № 2)	***A. niger ATCC* 16404** (агар Сабуро с глюкозой и антибиотиком, среда № 2)	***P.aeruginosa ATCC* 9027** (бульон Мосселя, среда № 3, среда № 8, соево-казеиновый бульон)	***S. aureus ATCC* 6538-P** (соево-казеиновый бульон, среда № 8)	***E. coli ATCC* 25922** (бульон Мосселя, среда № 3)	***Salmonella typhimurium* 55** (бульон Мосселя, среда № 3)
Образец препарата (в разбавлении 1:10, инокулированный м/о)	++	++	++	++	++	++	++
Контроль (разбавитель инокулированный м/о)	++	++	++	++	++	++	++

В соответствии с разработанными методиками контроля, проведено испытание микробиологической чистоты препарата *налоксон спрей назальный* (табл. 3.9).

Таблица 3.9 Текущие результаты испытаний микробиологической чистоты препарата *налоксон спрей назальный*

Номер серии	Количество в 1 г препарата (КОЕ/мл):				
	Аэробных бактерий и грибов (суммарно)		Энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий	*S. aureus*	*P. aeruginosa*
	бакте-рий	грибов			
Нормы НД	Не более 10^2		Не более 10^1	Не допускается	
010212	менее 10	менее 10	НО	НО	НО
020212	менее 10	менее 10	НО	НО	НО
030212	менее 10	менее 10	НО	НО	НО

Примечание: НО – не обнаружено.

Как видно из данных, представленных в таблице 3.9, препарат после приготовления по микробиологической чистоте соответствует требованиям проекта НД и ОФС.1.2.4.0002.15 ГФ РФ XIII издания.

3.5.3 Определение плотности раствора налоксона

Точное значение плотности раствора налоксона играет важную роль при фасовке готового раствора в баллоны, так как дозирование происходит по объему, который меняется в зависимости от температуры. Методика определения плотности модельного раствора налоксона, с разработанным составом, описана в главе 2. Была изучена зависимость плотности раствора от температуры. Результаты исследований представлены в таблице 3.10 и на рисунке 3.9.

Таблица 3.10 Зависимость плотности (ρ) раствора налоксона гидрохлорида от температуры

Температура, °С	**ρ_1, г/см^3**	**ρ_2, г/см^3**	**ρ_3, г/см^3**	**$\rho_{ср}$, г/см^3**	**$\Delta\rho$*, %**
10	1,03162	1,03158	1,03157	1,03159	+0,331

15	1,02986	1,02988	1,02991	1,02988	+0,164
20	**1,02817**	**1,02818**	**1,02821**	**1,02819**	**0**
25	1,02625	1,02628	1,02629	1,02627	–0,187
30	1,02471	1,02474	1,02475	1,02473	–0,337
Примечание. **Δρ** – изменение плотности (в %) по отношению к плотности при температуре 20°С с увеличением или уменьшением температуры					

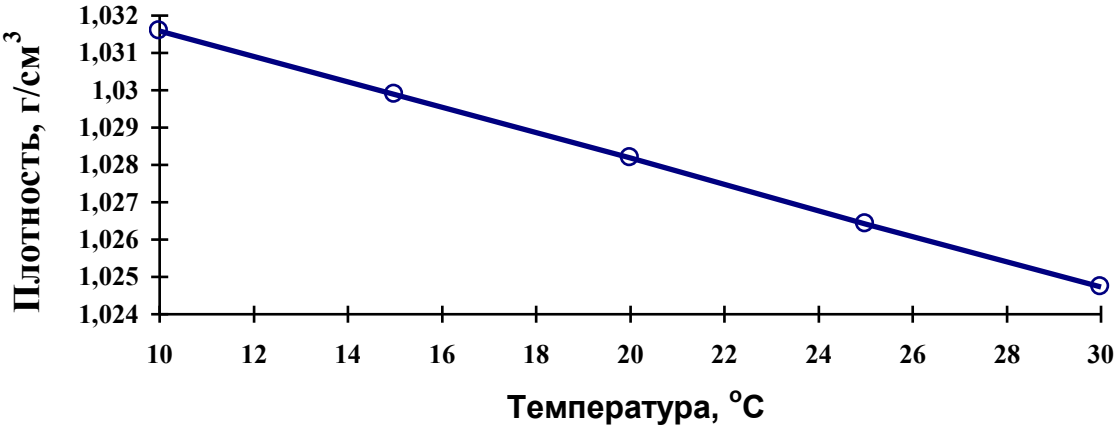


Рисунок 3.9 Зависимость плотности раствора налоксона гидрохлорида от температуры

Как видно из данных, представленных в таблице 3.12 и на рисунке 3.9, с увеличением температуры от 10°С до 30°С плотность линейно уменьшается. Плотность раствора налоксона гидрохлорида при температуре 20°С составляет около 1,028 г/см^3.

Если в ходе технологического процесса дозирование препарата в баллоны предусмотрено осуществлять при температуре 20°С, то дозирующий цилиндр для дозирования 10,0 г препарата должен быть выставлен на объем 9,7258 мл. При уменьшении температуры до 15°С и 10°С в баллон будет дозироваться соответственно 10,016 г и 10,033 г препарата, то есть больше на 0,16 % и 0,33 %. При увеличении температуры до 25°С и 30°С в баллон будет дозироваться соответственно 9,981 г и 9,966 г препарата, то есть меньше на 0,19 % и 0,34 %. ОСТ 64-492-85 предусматривает отклонения при дозировании жидких лекарственных форм по массе (от 5 г до 100 г) не более 2 % для одной упаковки и не более 0,6 % для десяти упаковок [18]. Таким образом, колебания температуры

в пределах от 15°С до 25°С несущественно влияют на точность дозирования препарата в баллоны; отклонения от массы дозы входит в установленные пределы и не превышает массы одной дозы.

3.5.4 Реологические свойства раствора налоксона

Реологические свойства раствора влияют на процесс дозирования. Если модельный раствор налоксона по типу течения близок к неньютоновски жидкостям, то возможно возникновение отклонений при наполнении баллонов спрея назального налоксона [13].

Методика определения реологических характеристик раствора представлена во 2 главе. Дозируемый в баллоны раствор налоксона имеет жидкую консистенцию при обычных условиях. Как видно из реограммы, представленной на рис. 3.10, тип течения препарата близок к типу ньютоновской жидкости, однако это пластический тип течения, характеризующийся следующими пределами текучести:

- нижний предел текучести Рн ≈ 0,15 Па;
- экстраполированный предел текучести Рэ = 0,24 Па;
- верхний предел текучести Рв = 2,05 Па.

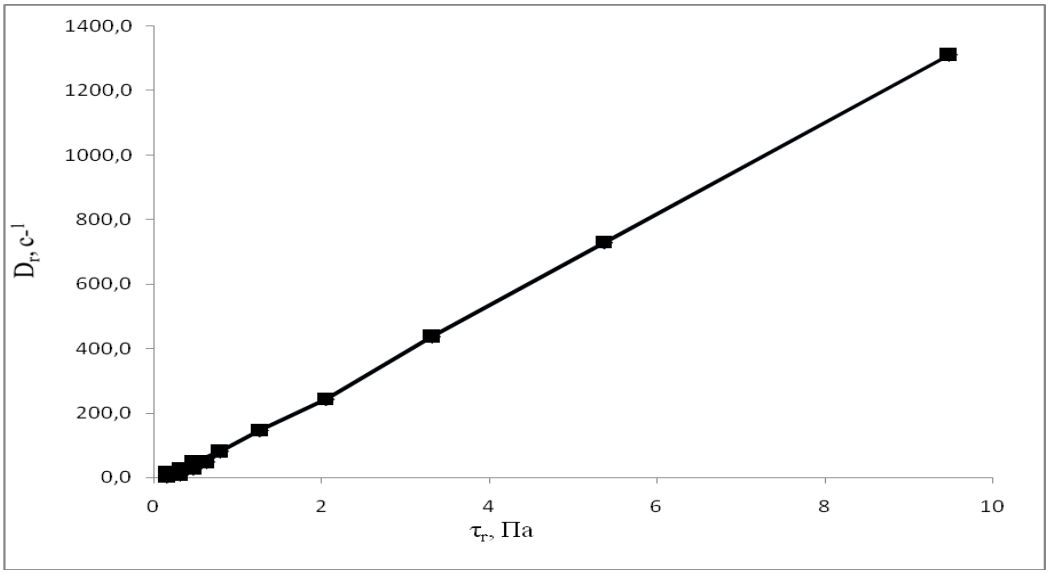


Рисунок 3.10 Реограмма препарата налоксон раствор нерасфасованный при температуре 20°С

Раствор налоксона имеет низкую кинематическую и динамическую вязкость и сохраняет жидкую консистенцию в интервалах температур от 15°С до 30°С, значимых при ведении технологического процесса (табл. 3.13). Зависимость кинематической вязкости препарата от температуры представлена на рис. 3.11.

Таблица 3.13 Зависимость кинематической вязкости (**ν**) и динамической вязкости (**η**) препарата налоксон раствор нерасфасованный от температуры

Температура, °С	**ν, мм^2·с$^{-1}$**	**η, мПа·с**
15	3,28±0,06	3,39±0,06
20	2,87±0,05	2,95±0,06
25	2,42±0,05	2,49±0,05
30	2,03±0,04	2,08±0,04

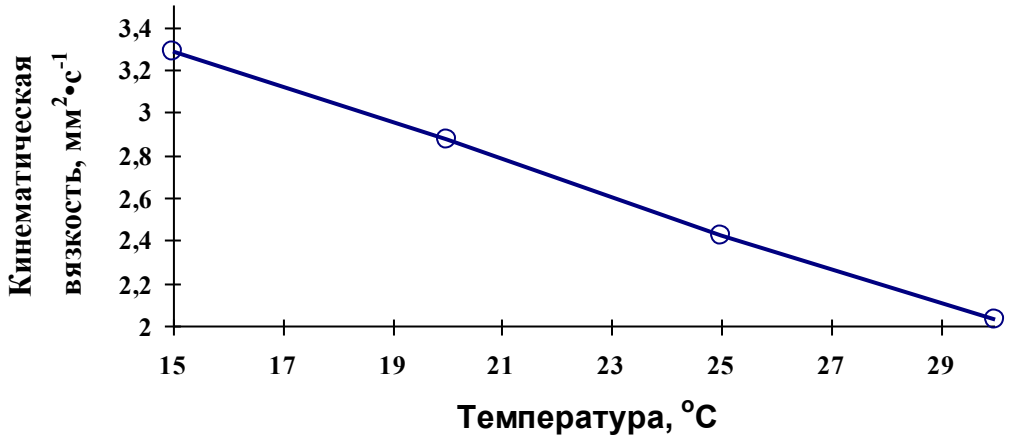


Рисунок 3.11 Зависимость кинематической вязкости препарата Налоксон раствор нерасфасованный от температуры

Таким образом, тип течения препарата налоксона спрея назального, а также его кинематическая и динамическая вязкость таковы, что они не должны создавать факторов риска в ходе ведения технологического процесса при дозировании препарата в баллоны. Кроме того, низкая вязкость должна позволять клапанно-распылительной системе эффективно переводить жидкость в аэрозольную струю.

3.5.5 Определение осмоляльности модельного раствора налоксона

В ряде литературных источников указаны требования определения значений осмоляльности назальных спреев [23, 68, 86, 128].

Методика определения осмоляльности представлена в главе 2.

Осмоляльность препарата налоксона спрея назальный составляет 1016 мосмоль/кг, а изотонического 0,9 % раствора натрия хлорида – 290 мосмоль/кг, т.е. препарат является гипертоническим, что обусловлено пропиленгликолем и макроголом 400, без которых его осмоляльность равна 8 мосмоль/кг. С увеличением суммарной концентрации гидрофильных растворителей осмоляльность линейно увеличивается: 2,5 % – 126 мосмоль/кг, 5 % – 254 мосмоль/кг. При содержании гидрофильных растворителей 7,5 % температура замерзания становится ниже –10 ^{o}C и измерение осмоляльности при помощи миллиосмометра-криостата становится невозможным. Величина осмоляльности препарата 1016 мосмоль/кг получена методом экстраполяции. Гипертонические свойства препарата обеспечивают быструю пассивную диффузию налоксона гидрохлорида через мембраны как в опытах *in vitro*, так и *in vivo*.

3.6 Выбор насосов-дозаторов и насадок распылителей и исследование их влияния на технологические характеристики налоксона спрея назального

На основании результатов исследования биодоступности была выбрана доза налоксона для однократного применения, составляющая 1,2 мг, что соответствует однократному введению 100 мкл 1,2 % раствора препарата в виде одной дозы в одну ноздрю или в виде двух доз по 50 мкл (по одной дозе в каждую ноздрю). Введение двух доз по 50 мкл более предпочтительно, поскольку при меньшем объеме препарата меньше риск вытекания его из носа и в 2 раза больше поверхность слизистой оболочки для всасывания налоксона гидрохлорида. В связи с вышеизложенным было принято решение об использовании насоса-дозатора с объемом дозирующей камеры 50 мкл. Если возникнет необходимость в увеличении вводимой дозы, то в каждую ноздрю можно будет впрыснуть по 2 дозы.

В экспериментальных исследованиях использовали следующие насосы-дозаторы и насадки-распылители:

– дозирующие насосы типа 20 MSP 6/50, снабженные насадкой-распылителем для назального впрыскивания с защитным колпачком типа V04.1450 + V16.83 производства фирмы «Coster Technologie Speciali S.p.a.» (Италия);

– дозирующие насосы типа SP270/J/S/20mm/ARGT/D50/BD50I/BD50/TR100, снабженные насадкой-распылителем для назального впрыскивания с защитным колпачком типа EMBT PPE/NASAL BI.AB3959/BLC/CAP 792 производства фирмы «Rexam Dispensing Systems» (Швейцария).

Препарат дозировали по 10,0 г в баллоны алюминиевые моноблочные фирмы «Linhard GmbH & Co KG» (Германия) типа D 22.0 DDG – 28 (диаметром 22 мм и высотой 58 мм) с внутренним лаковым покрытием Gold tubalac E/P 716.050. Эти баллоны герметизировали указанными дозирующими насосами.

Определение массы доставляемой дозы, однородности массы доставляемой дозы, количества извлекаемых доз

В соответствии с общей статьей «Nasal Preparations» Европейской Фармакопеи [65] дозированные назальные спреи, которые представляют собой растворы, должны выдерживать испытание на однородность массы дозы, которая определяется путем сравнения массы дозы каждого из 9 баллонов со средней массой доставляемой дозы. При испытании на 9 баллонах индивидуальная масса доставляемой дозы только для двух баллонов может отклоняться от средней массы доставляемой дозы более чем на (±25 %), но не более чем на (±35 %).

В соответствии с Руководством по фармацевтическому качеству ингаляционных и назальных препаратов [46] на этапе фармацевтической разработки была исследована однородность доставляемой дозы в течение срока эксплуатации контейнеров, то есть по мере опорожнения контейнеров.

Для дозированных назальных спреев различают два понятия [46]:

Доставляемая доза *(delivered dose)* – количество фармацевтической субстанции, которое получает потребитель в расчете на одну дозу (без учета количества фармацевтической субстанции, осевшего на устройстве доставки).

Отмеренная доза *(metered dose)* – количество фармацевтической субстанции, содержащееся в дозирующей камере устройства доставки.

Доставляемая доза оказывается меньше отмеренной дозы. Поскольку препарат представляет собой истинный раствор, в котором налоксона гидрохлорид, распределен равномерно, то для таких препаратов допускается определять не содержание действующего вещества в доставляемой или отмеренной дозе, а определять массу доставляемой или отмеренной дозы, при необходимости рассчитывая содержание в ней действующего вещества.

В таблицах 3.13 и 3.14 представлены данные о массе доз, получаемых по мере выхода препарата из баллона.

Таблица 3.13 Массы доставляемых доз препарата *налоксон спрей назальный*, получаемых по мере выхода раствора из баллона, герметизированного насосом типа 20MSP 50

Показатели	**Масса доставляемой дозы (г) для следующих номеров выпускаемых последовательно доз:**			
	№№ 3-12*	**№№ 41-50**	**№№ 91-100**	**№№ 141-150**
Масса единичных доз	0,05534	0,05618	0,05706	0,05569
	0,05530	0,05546	0,05687	0,05572
	0,05455**	0,05632	0,05712	0,05560
	0,05481	0,05641	0,05762***	0,05582
	0,05532	0,05614	0,05749	0,05587
	0,05503	0,05650	0,05617	0,05571
	0,05489	0,05628	0,05685	0,05591
	0,05457	0,05610	0,05691	0,05597
	0,05526	0,05682	0,05681	0,05611
	0,05515	0,05657	0,05711	0,05617
Средняя масса для 10 доз	0,05502	0,05628	0,05700	0,05586
Средняя масса дозы	0,05604			

Примечания.

* Отсчет доз ведется с момента начала выдачи препарата из баллона и не учитывает нажатия, требуемые для заполнения насоса и распылителя препаратом.

** Максимальное отклонение от средней массы дозы составляет –2,66 %.

*** Максимальное отклонение от средней массы дозы составляет +2,82 %.

Таблица 3.14 Массы доставляемых доз препарата налоксон спрей назальный, получаемых по мере выхода раствора из баллона, герметизированного насосом типа SP270

Показатели	**Масса доставляемой дозы (г) для следующих номеров выпускаемых последовательно доз:**			
	№№ 3-12*	**№№ 41-50**	**№№ 91-100**	**№№ 141-150**
Масса единичных доз	0,05375	0,05478	0,05438	0,05435
	0,05543	0,05525	0,05544	0,05601
	0,05540	0,05422	0,05550	0,05539
	0,05440	0,05632***	0,05517	0,05448
	0,05456	0,05492	0,05550	0,05231
	0,05481	0,05533	0,05463	0,05501
	0,05475	0,05587	0,05548	0,05588
	0,05509	0,05592	0,05563	0,04728**
	0,05518	0,05577	0,05578	0,05576
	0,05531	0,05568	0,05551	0,05174
Средняя масса для 10 доз	0,05487	0,05541	0,05530	0,05382
Средняя масса дозы	0,05484			

Примечания. * Отсчет доз ведется с момента начала выдачи препарата из баллона и не учитывает нажатия, требуемые для заполнения насоса и распылителя препаратом.

** Максимальное отклонение от средней массы дозы составляет –13,79 %.

*** Максимальное отклонение от средней массы дозы составляет +2,70 %.

Как видно из данных, представленных в таблице 3.14, средняя масса дозы для насоса типа 20 MSP 6/50 составила 0,05604 г. По мере выхода препарата из баллона получаются однородные по массе дозы; максимальные отклонения от средней массы дозы составляют –2,66 % и +2,82 %, что свидетельствует о качественной работе насоса-дозатора.

Для насоса типа SP270 средняя масса дозы составила 0,05484 г (табл. 3.14). По мере выхода препарата из баллона получаются менее однородные по массе дозы; максимальные отклонения от средней массы дозы при использовании насоса типа SP270 составили –13,79 % и +2,70 %.

В таблицах 3.15 представлены данные об однородности массы доз, которая определяется путем сравнения массы дозы каждого из 9 баллонов со средней массой доставляемой дозы.

Таблица 3.15 Массы доставляемых доз (m) препарата *налоксон спрей назальный*, получаемых из 9 баллонов и отклонения (Δm) от средней массы доставляемой дозы

№ баллона	**Масса доставляемой дозы и отклонение от средней массы дозы**			
	Насос-дозатор типа 20MSP 50		**Насос-дозатор типа SP270**	
	m, г	**Δm, %**	**m, г**	**№№ 141-150**
1	0,05661	+0,28	0,05217	–5,35
2	0,05836	+3,38	0,05445	–1,22
3	0,05747	+1,81	0,05210	–5,48
4	0,05609	–0,64	0,05587	+1,36
5	0,05578	–1,19	0,05792	+5,08
6	0,05584	–1,08	0,05412	–1,81
7	0,05536	–1,93	0,05788	–5,01
8	0,05669	+0,43	0,05543	+0,56
9	0,05584	–1,08	0,05610	+1,78
Средняя масса	**0,05645**		**0,05512**	
RSD, %	***1,69***		***3,87***	
Δ, %	***3,14***		***7,19***	

Как видно из данных, представленных в таблице 3.15, по однородности массы дозы препарат «Налоксон спрей назальный» соответствует требованиям Европейской Фармакопеи при использовании как насосов дозаторов типа 20MSP 50, так и насосов-дозаторов типа SP270; отклонения от средней массы дозы находятся в пределах (±25 %) [65]. Максимальные отклонения от средней массы доставляемой дозы в случае насосов-дозаторов типа 20MSP 50 составляют –1,93 % и +3,38 %, а в случае насосов-дозаторов типа SP270 абсолютные величины отклонений от средней массы доставляемой дозы оказываются больше: –5,48 % и +5,08 %. Насосы типа 20MSP 50 от баллона к баллону обеспечивают бóльшую точность дозирования, о чем свидетельствуют мéньшие значения относительного стандартного отклонения (***RSD***) и относительного доверительного интервала (***Δ***) (табл. 3.15).

Таким образом, по однородности массы дозы более предпочтительно использование насосов-дозаторов типа 20MSP 50 производства фирмы «Coster Technologie Speciali S.p.a.» (Италия).

Требования к первому использованию и использованию после перерыва

В соответствии с требованиями Руководства по фармацевтическому качеству ингаляционных и назальных препаратов [46] на этапе фармацевтической разработки следует провести исследование, чтобы подтвердить количество рекомендованных в маркировке предварительных нажатий, после которых начинается выход аэрозольной струи, а также тех распылений, которые должны быть отброшены (первоначальные отбрасываемые дозы) перед первым применением препарата [6].

В таблицах 3.16 и 3.17 приведены массы доставляемых доз препарата *налоксон спрей назальный*, укомплектованного соответственно насосами-дозаторами типа 20 MSP 50 и насосами-дозаторами типа SP270, по мере выхода препарата из баллонов от 1-й до 12-й дозы:

– при первом использовании баллона,

– после перерыва в использовании в течение 7 дней,

– после перерыва в использовании в течение 24 часов.

Испытания были проведены при температуре 25 °С.

Таблица 3.16 Массы (m) первых доставляемых доз препарата *налоксон спрей назальный* при первом использовании препарата и после перерывов 24 ч и 7 дней (комплектация насосом-дозатором типа 20 MSP 50)

№№ доз	**Первое использование**		**Использование через 7 дней**		**Использование через 24 ч**	
	m, г	**Δ, %**	**m, г**	**Δ, %**	**m, г**	**Δ, %**
1	*0*	*–100 %*	*0*	*–100 %*	*0,01882*	–66,34
2	*0*	*–100 %*	*0,01296*	–76,88	**0,05413**	–3,18
3	*0*	*–100 %*	**0,05448**	–2,80	**0,05664**	+1,31
4	*0,00175*	*–96,87*	**0,05705**	+1,78	**0,05597**	+0,11
5	*0,02206*	*–60,58*	**0,05641**	+0,64	**0,05573**	–0,32
6	**0,05537**	–1,05	**0,05571**	–0,61	**0,05625**	+0,61
7	**0,05448**	–2,64	**0,05670**	+1,16	**0,05589**	–0,04
8	**0,05732**	+2,43	**0,05603**	–0,04	**0,05623**	+0,57
9	**0,05651**	+0,98	**0,05579**	–0,46	**0,05527**	–1,14
10	**0,05587**	–0,16	**0,05631**	+0,46	**0,05576**	–0,27
11	**0,05600**	+0,07	**0,05595**	–0,18	**0,05645**	+0,97
12	**0,05618**	+0,39	**0,05609**	+0,07	**0,05663**	+1,29
Среднее	***0,05596***		***0,05605***		***0,05591***	
Вывод	Соответствует с 6-й дозы		Соответствует с 3-й дозы		Соответствует со 2-й дозы	

Как видно из данных, представленных в табл. 3.16, при использовании насоса типа 20 MSP 50 при первом использовании баллона препарат начинает соответствовать требованиям проекта НД по массе дозы после выпуска первых 5 доз, то есть с шестой дозы. После перерыва в использовании в течение 7 дней препарат соответствует установленным требованиям к массе дозы, начиная с 3-й дозы; после короткого перерыва в течение 24 часов препарат соответствует требованиям проекта НД по массе дозы, начиная со 2-й дозы.

Таблица 3.17 Массы (m) первых доставляемых доз препарата *налоксон спрей назальный* при первом использовании препарата и после перерывов 24 ч и 7 дней (комплектация насосом-дозатором типа SP270)

№№ доз	**Первое использование**		**Использование через 7 дней**		**Использование через 24 ч**	
	m, г	**Δ, %**	**m, г**	**Δ, %**	**m, г**	**Δ, %**
1	*0*	*–100 %*	*0,01360*	–75,14	*0,03272*	–40,05
2	*0,00827*	–84,87	**0,05388**	–1,52	**0,05359**	–1,81
3	**0,05420**	–0,84	**0,05579**	+1,97	**0,05611**	+2,80
4	**0,05511**	+0,82	**0,05466**	–0,09	**0,05464**	+0,11
5	**0,05249**	–3,97	**0,05513**	+0,77	**0,05504**	+0,84
6	**0,05508**	–0,77	**0,05490**	+0,35	**0,05245**	–3,90
7	**0,05438**	–0,51	**0,05514**	+0,79	**0,05568**	+2,02
8	**0,05566**	+1,83	**0,05255**	–3,95	**0,05441**	–0,31
9	**0,05576**	+2,01	**0,05498**	+0,49	**0,05453**	–0,09
10	**0,05438**	–0,51	**0,05453**	–0,33	**0,05527**	+1,26
11	**0,05429**	–0,68	**0,05536**	+1,19	**0,05416**	–0,77
12	**0,05523**	+1,04	**0,05487**	+0,29	**0,05448**	–0,18
Среднее	***0,05466***		***0,05471***		***0,05458***	
Вывод	Соответствует с 3-й дозы		Соответствует со 2-й дозы		Соответствует со 2-й дозы	

Как видно из данных, представленных в табл. 3.17, при использовании насоса типа SP270 при первом использовании баллона препарат начинает соответствовать требованиям проекта НД по массе дозы после выпуска первых 2 доз, то есть с третьей дозы. После перерыва в использовании в течение 7 дней препарат соответствует установленным требованиям к массе дозы, начиная со 2-й дозы; после короткого перерыва в течение 24 часов препарат соответствует требованиям проекта НД по массе дозы, также начиная со 2-й дозы.

При первых нажатиях происходит заполнение препаратом сифонной трубки, дозирующей камеры и штока насоса-дозатора, а также полостей в насадке-распылителе. Поэтому выдача полноценной дозы препарата начинается с шестого нажатия при использовании насоса-дозатора 20 MSP 50 и с третьего нажатия при использовании насоса-дозатора SP270.

Представленные данные следует учитывать при составлении инструкции по медицинскому применению препарата *налоксон спрей назальный*.

Исследование функционирования при смене температур

На этапе фармацевтической разработки необходимо исследовать влияние смены температур на функциональные характеристики препарата [46]. С этой целью баллоны с модельным раствором налоксона хранили в течение суток при температуре 0 °С и +40°С, после чего их помещали в инкубатор с температурой +25 °С на сутки; так повторяли 5 раз и далее при температуре около 25°С проводили испытания на однородность массы дозы в соответствии с проектом НД. Результаты испытаний приведены в таблицах 3.18 и 3.19 для препарата *налоксон спрей назальный*, укомплектованного соответственно насосами-дозаторами типа 20 MSP 50 и насосами-дозаторами типа SP270.

Таблица 3.18 Массы (m) доставляемых доз препарата *налоксон спрей назальный*, хранившегося при температуре 25 °С, а также после смены температур (комплектация насосом-дозатором типа 20 MSP 50)

№ дозы	**0°С → 25°С**		**40 °С → 25°С**		**25°С**	
	m, г	**Δ, %**	**m, г**	**Δ, %**	**m, г**	**Δ, %**
3	0,05545	–0,91	0,05487	–2,07	0,05519	–1,39
4	0,05514	–1,47	0,05561	–0,75	0,05506	–1,63
5	0,05543	–0,95	0,05622	+0,34	0,05573	–0,43
81	0,05702	+1,89	0,05678	+1,34	0,05672	+1,34
82	0,05633	+0,66	0,05649	+0,82	0,05705	+1,93
83	0,05616	+0,36	0,05714	+1,98	0,05681	+1,50
84	0,05657	+1,09	0,05676	+1,30	0,05633	+0,64
148	0,05581	–0,27	0,05586	–0,30	0,05597	+0,55
149	0,05605	+0,16	0,05563	–0,71	0,05611	–0,38
150	0,05563	–0,59	0,05495	–1,93	0,05474	–2,20
Среднее	***0,05596***		***0,05603***		***0,05597***	
$RSD_{ср}$	*1,03611*		*1,389145*		*1,40815*	

Таблица 3.19 Массы (m) доставляемых доз препарата *налоксон спрей назальный*, хранившегося при температуре 25 °С, а также после смены температур (комплектация насосом-дозатором типа SP270)

№ дозы	0°С → 25 °С		40°С → 25 °С		25°С	
	m, г	Δ, %	m, г	Δ, %	m, г	Δ, %
3	0,05453	–0,40	0,05546	+0,95	0,05541	+0,88
4	0,05476	+0,02	0,05574	+1,46	0,05373	–1,97
5	0,05487	+0,22	0,05428	–1,20	0,05538	+0,83
81	0,05574	+1,81	0,05519	+0,46	0,05489	0
82	0,05521	+0,84	0,05557	+1,15	0,05524	+0,59
83	0,05498	+0,42	0,05516	+0,40	0,05561	+1,22
84	0,05535	+1,10	0,05484	–0,18	0,05467	–0,37
148	0,05522	+0,86	0,05446	–0,87	0,05451	–0,65
149	0,05262	–3,89	0,05537	+0,78	0,05514	+0,42
150	0,05407	–1,24	0,05329	–3,00	0,05434	–0,93
Среднее	***0,05474***		***0,05494***		***0,05489***	
$RSD_{ср}$	*1,59801*		*1,35697*		*1,06135*	

Смена температур практически не повлияла на среднюю массу доставляемой дозы препарата *налоксон спрей назальный*, а также на однородность массы доставляемой дозы. По показателю «Средняя масса доставляемой дозы» образцы препарата, подвергавшиеся смене температур, практически не отличаются от образца, хранившегося при температуре (25±1) °С. Сопоставимы для них также относительные стандартные отклонения от средней массы дозы ($RSD_{ср}$), характеризующие однородность массы доставляемой дозы. Смену температур выдерживают насосы-дозаторы обоих типов 20 MSP 50 и SP270. В случае насоса SP270 смена температур приводит к небольшому увеличению *RSD.*

Обоснование минимального наполнения

Минимальное наполнение обосновывали по насосу-дозатору типа 20 MSP 50, поскольку он выдает бóльшую массу дозы (см. табл. 3.14 и 3.15). По проекту НД количество извлекаемых доз из баллона должно быть не менее 150. Средняя масса одной дозы составляет 0,056 г; отклонения от средней массы дозы не превышают +5 %, в связи с чем максимальная масса одной дозы может быть 0,0588 г, а 150 доз – 8,82 г. К этой цифре следует прибавить массу двух первых неполных доз ~0,03 г, что составит ~8,85 г.

Таблица 3.20 Массы (m) последних доставляемых доз препарата н*алоксон спрей назальный* (комплектация насосом-дозатором типа 20 MSP 50)

№№ доз	**Баллон № 1**		**Баллон № 2**		**Баллон № 3**	
	m, г	**Δm, %**	**m, г**	**Δm, %**	**m, г**	**Δm, %**
150	0,05407	–3,45	0,05617	+0,30	0,05563	–0,66
151	0,05570	–0,54	0,05630	+0,54	0,05542	–1,04
152	0,05567	–0,59	0,05572	–0,50	0,05473	–2,27
153	0,05458	–2,54	0,05566	–0,61	0,05512	–1,57
154	0,05570	–0,54	0,05642	+0,75	0,05489	–1,98
155	0,05485	–2,05	0,05546	–0,96	0,05514	–1,54
156	0,05528	–1,29	0,05603	+0,05	0,05407	–3,45
157	0,05615	+0,27	0,05640	+0,71	0,05551	–0,88
158	0,05451	–2,66	0,05645	+0,80	0,05488	–2,00
159	0,05524	–1,36	0,05045	–9,91	0,05564	–0,64
160	0,05564	–0,64	***0,02877***	***–48,63***	0,05526	–1,32
161	***0,03216***	***–42,57***	***0,01364***	***–75,64***	0,05497	–1,84
162	***0,02677***	***–52,20***	—		***0,04451***	***–20,52***
163	***0,01214***	***–78,32***	—		***0,02223***	***–60,30***
164	—	—	—		***0,01107***	***–80,23***
165	—	—	—		—	
Вывод	Соответствует по 160 дозу		Соответствует по 159 дозу		Соответствует по 161 дозу	

При выдаче препарата из баллона получается не менее 159 полноценных доз (табл. 3.20). Остальное количество приходится на случайные полноценные дозы (0,056-0,112 г), на неполноценные дозы (около 0,04-0,08 г) и препарат остающийся в баллоне. Насос и распылитель стабильно обеспечивают выход препарата на уровне около 90 % от массы содержимого баллона (10 г). За вычетом первых двух и последних неполноценных доз это составляет 8,89 г. За вычетом максимальной ошибки при дозировании –2 % от 10,0 г это составит 8,87 г.

Исходя из вышеизложенного, для получения 150 полноценных доз в баллоны необходимо дозировать 10,0 г препарата налоксон спрей назальный.

Осаждение препарата на насадке-распылителе

При прохождении препарата через насадку-распылитель часть его задерживается насадкой и оседает внутри насадки, что составляет разницу между отмеренной и доставляемой дозами.

В табл. 3.21 представлены массы препарата, осаждаемые на насадках-распылителях двух типов, которыми комплектуют насосы 20 MSP 50 и SP270.

Таблица 3.21 Масса препарата *налоксон спрей назальный*, которая находится в насадках-распылителях при выдаче модельного раствора налоксона из баллонов

Номер дозы	**V05.1.1450**		**EMBT PPE/NASAL**	
	Масса, г	**Δ, %**	**Масса, г**	**Δ, %**
3	0,01070	+1,90	0,00964	+0,21
4	0,01053	+0,29	0,00948	–1,46
5	0,01080	+2,86	0,00919	–4,47
97	0,00984	–6,29	0,00952	–1,04
98	0,01078	+2,67	0,00914	–4,99
99	0,00999	–4,86	0,01015	+5,51
100	0,01050	0,00	0,00961	–0,10
148	0,01082	+3,05	0,00997	+3,64
149	0,01041	–0,86	0,00966	+0,42
150	0,01063	+1,24	0,00983	+2,18
Среднее	**0,01050**		**0,00962**	

Как видно из данных, представленных в табл. 3.21, масса раствора налокосна, которая находится в насадках-распылителях при выдаче препарата из баллонов, остается достаточно постоянной для обоих типов насадок-распылителей и составляет около 0,01 г, то есть около 18 % от средней массы дозы. Поскольку раствор налоксона из насадки-распылителя сразу не испаряется, то после заполнения полостей в насадке-распылителе раствором фактически отмеренная и доставляемая дозы начинают совпадать. То есть, при выдаче дозы спрея на водной основе осаждение препарата на насадке-распылителе в количестве ~0,01 г компенсируется присоединением к доставляемой дозе около 0,01 г препарата, заполнившего полости насадки-распылителя при выдаче предыдущей дозы. Это существенное отличие спреев на основе водных растворов от ингаляционных препаратов на основе пропеллента HFC 134a, поскольку пропеллент с насадки-ингалятора моментально испаряется. При этом в доставляемой дозе масса фармацевтической субстанции всегда будет меньше, чем в отмеренной дозе.

Исходя из вышеизложенного, в инструкции по медицинскому применению должно быть указано, что впрыскивать препарат больному в полость носа можно только после предварительно выпущенных в воздух 1-2 доз.

Определение распределения капель по размерам в аэрозольной струе

При применении препарата *налоксон спрея назального* капли аэрозольной струи должны осаждаться в полости носа, а не попадать в легкие при вдохе или удаляться из полости носа при выдохе, которые могут сопровождать впрыскивание препарата. В связи с этим капли в аэрозольной струе должны иметь преимущественно размер частиц более 10 мкм [56]. На этапе фармацевтической разработки при выборе упаковки необходимо определить распределение частиц в аэрозольной струе по размерам, средний диаметр частиц и содержание фракции с размером частиц менее 10 мкм. Использованная методика определения распределения капель по размерам, метод лазерной дифрактометрии (глава 2). В качестве элементов упаковки спрея назального налоксона использован насос-дозатор 20MSP 50 и распылитель V04.1450.

В табл. 3.22 и на рис. 3.11 представлены данные по распределению частиц по размерам в аэрозольной струе препарата *налоксон спрей назальный*.

Как видно из данных, представленных в табл. 3.21 и на рис. 3.12, при разных условиях выполнения эксперимента средний диаметр частиц в аэрозольной струе оказывается в несколько раз больше 10 мкм и составляет при разных условиях выполнения эксперимента от 43,02 мкм до 49,81 мкм.

Размер частиц в аэрозольной струе характеризуется гауссовским распределением (рис. 3.12). При среднем диаметре частиц 48,41 мкм в струе находятся частицы диаметром от 0,631 мкм (0,02 %) до 215,44 мкм (0,31 %). Однако содержание фракции частиц с диаметром менее 10 мкм очень невелико и при разных условиях выполнения эксперимента составляет от 1,349 % до 1,879 %.

Таким образом, распылитель типа V04.1450 эффективно выполняет свое функциональное назначение и обеспечивает требуемый размер частиц аэрозольной струи. Исследование проводили только с распылителями типа V04.1450, которыми фирма «Coster Technologie Speciali S.p.a.» (Италия) комплектует насосы-дозаторы типа 20 MSP 50. Это было обусловлено тем, что применение насосов-дозаторов указанного типа более предпочтительно, поскольку они обладают бóльшей точностью дозирования.

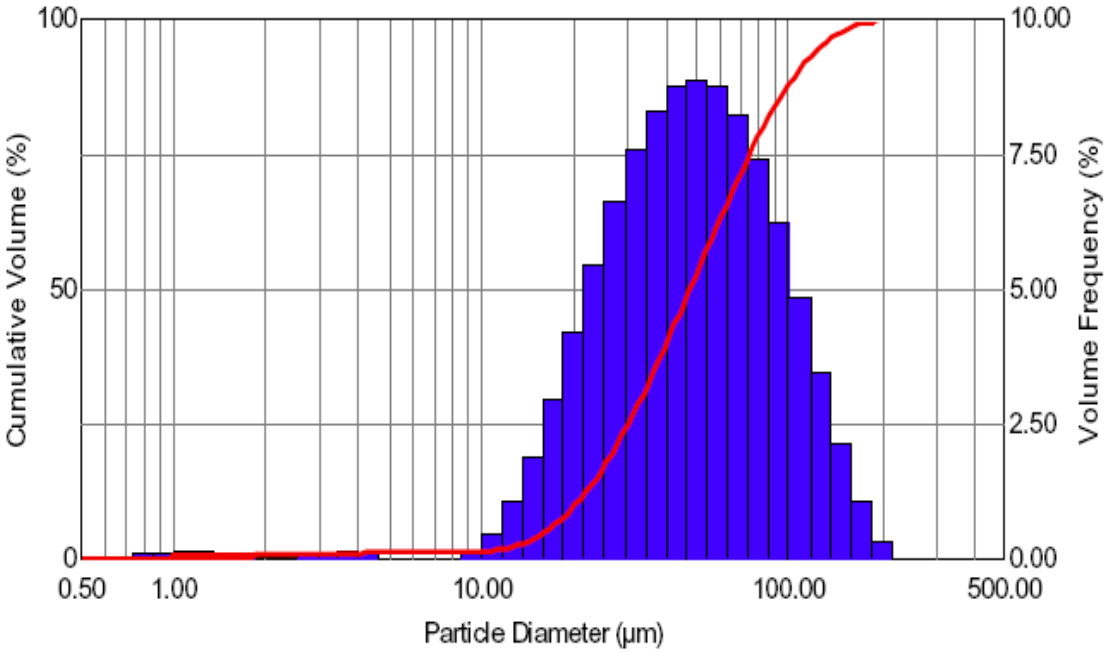
Таблица 3.21 - Параметры, характеризующие распределение частиц по размерам в аэрозольной струе препарата *налоксон спрей назальный* при использовании насоса-дозатора 20MSP 50 и распылителя V04.1450 при различных условиях эксперимента: разных усилиях нажатия (actuation force) и разных расстояниях до лазерного луча (spray distance)

	SPRAY DISTANCE: 3 cm						
ACTUATION FORCE	Shot	D[4][3] [μm]	Dv(10) [μm]	Dv(50) [μm]	Dv(90) [μm]	Trans [%]	% Vol< 10 μm
4 kgf	1	59,24	20,31	49,81	112,6	75,1	1,349
	2	56,68	20,19	47,92	106,7	74,5	1,354
	3	56,15	20,18	47,51	105,5	75,0	1,349
	Mean	**57,36**	**20,23**	**48,41**	**108,27**	**74,87**	**1,351**
	Min	56,15	20,18	47,51	105,50	74,50	1,349
	Max	59,24	20,31	49,81	112,60	75,10	1,354
5 kgf	1	51,27	18,24	43,02	69,89	73,1	1,833
	2	51,31	18,57	43,18	96,49	72,8	1,767
	3	51,22	18,28	43,08	96,59	73,1	1,83
	Mean	**51,27**	**18,36**	**43,09**	**87,66**	**73,00**	**1,810**
	Min	51,22	18,24	43,02	69,89	72,80	1,767
	Max	51,31	18,57	43,18	96,59	73,10	1,833

	SPRAY DISTANCE: 5 cm						
ACTUATION FORCE	Shot	D[4][3] [μm]	Dv(10) [μm]	Dv(50) [μm]	Dv(90) [μm]	Trans [%]	% Vol< 10 mm
4 kgf	1	53,81	22,98	46,57	95,38	73,5	1,057
	2	52,83	22,47	45,96	93,63	73,1	1,640
	3	54,37	22,59	46,94	97,38	73,4	1,612
	Mean	**53,67**	**22,68**	**46,49**	**95,46**	**73,33**	**1,436**
	Min	52,83	22,47	45,96	93,63	73,10	1,057
	Max	54,37	22,98	46,94	97,38	73,50	1,640
5 kgf	1	51,70	21,37	44,44	92,51	70,7	1,879
	2	50,75	20,86	43,78	90,90	71,0	1,859
	3	50,08	21,08	43,33	88,87	71,3	1,804
	Mean	**50,84**	**21,10**	**43,85**	**90,76**	**71,00**	**1,847**
	Min	50,08	20,86	43,33	88,87	70,70	1,804
	Max	51,70	21,37	44,44	92,51	71,30	1,879

D[4][3] - Volume mean diameter (μm)
Dv(10) - Particle size diameter below which 10% of the spray lies (μm)
Dv(50) - Particle size diameter below which 50% of the spray lies (μm)
Dv(90) - Particle size diameter below which 90% of the spray lies (μm)
Trans - Measure of the amount of laser light reaching the beam power detector
% Vol<10 μm – Distribution percentage below 10 μm

20MSP50 V04_1450 BC con Miscela Distanza 3cm Forza 4...\20MSP50 con V04_1450 BC x 3.ps
Sample : 20MSP50 con V04_1450 BC x SEMASHKO
Start+0.0080 (s) :: +0.0420 (s)



Size (µm)	% V <	% V	Size (µm)	% V <	% V	Size (µm)	% V <	% V
0.117	0.00	0.00	2.51	0.81	0.05	54.12	57.56	8.91
0.136	0.00	0.00	2.93	0.88	0.07	63.10	66.30	8.74
0.158	0.00	0.00	3.41	1.00	0.11	73.56	74.54	8.24
0.185	0.00	0.00	3.98	1.13	0.14	85.77	81.93	7.39
0.215	0.00	0.00	4.64	1.23	0.10	100.00	88.16	6.24
0.251	0.00	0.00	5.41	1.23	0.00	116.59	93.04	4.87
0.293	0.00	0.00	6.31	1.23	0.00	135.94	96.49	3.45
0.341	0.00	0.00	7.36	1.23	0.00	158.49	98.62	2.14
0.398	0.00	0.00	8.58	1.23	0.00	184.79	99.69	1.06
0.464	0.00	0.00	10.00	1.35	0.12	215.44	100.00	0.31
0.541	0.00	0.00	11.66	1.81	0.46	251.19	100.00	0.00
0.631	0.02	0.02	13.59	2.86	1.05	292.87	100.00	0.00
0.736	0.07	0.05	15.85	4.76	1.90	341.46	100.00	0.00
0.858	0.15	0.08	18.48	7.74	2.98	398.11	100.00	0.00
1.00	0.26	0.11	21.54	11.94	4.20	464.16	100.00	0.00
1.17	0.38	0.12	25.12	17.39	5.45	541.17	100.00	0.00
1.36	0.50	0.12	29.29	24.00	6.61	630.96	100.00	0.00
1.58	0.61	0.11	34.15	31.58	7.58	735.64	100.00	0.00
1.85	0.70	0.08	39.81	39.89	8.31	857.70	100.00	0.00
2.15	0.76	0.06	46.42	48.65	8.76	1000.00	100.00	0.00

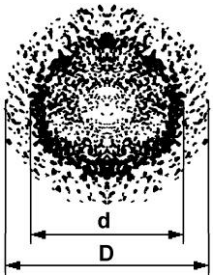
Рисунок 3.12 Распределение частиц по размерам в аэрозольной струе препарата налоксон спрей назальный при использовании насоса-дозатора 20MSP 50 и распылителя V04.1450

Примечание. Actuation force: 4 rgf; spray distance: 3 cm

Определение факела распыления

Насадка-распылитель обеспечивает выдачу препарата в виде аэрозольной струи, которая распыляется на всю поверхность слизистой полости носа, а не воздействует локально на какую-то часть носовой полости. В таблице 3.22 представлены диаметры факелов распыления препарата *налоксон спрей,* снятые в начале, в средине и в конце выхода препарата из баллона.

Таблица 3.22 Диаметры (d/D) факелов распыления препарата *Налоксона спрея назального* по мере опорожнения баллона



d/D, мм		
Начало	**Середина**	**Конец**
16/23	17/24	17/23

Как видно из данных, представленных в табл. 3.22, выбранная насадка-распылитель обеспечивает практически одинаковое распыление препарата *налоксон спрей назальный* по мере опорожнения баллона.

По результатам исследований был обоснован выбор упаковки для налоксона спрей назальный: баллоны алюминиевые моноблочные, герметизированные насосом-дозатором типа 20 MSP 6/50 и снабженные насадкой-распылителем с защитным колпачком типа V04.1450 + V16.83.

3.7 Технологическая схема производства налоксона спрея назального

На основании проведенных исследований был разработан состав лекарственной формы назального спрея налоксона (табл. 3.23). Технология получения данной лекарственной формы легла в основу лабораторного и промышленного регламента получения лекарственного препарата Налоксона спрея назального [17].

В таблице 3.23 представлена рецептура на 1 промышленную серию Налоксона спрея назального. Серия препарата формируется на основании 100 кг раствора, изготовленного в одном производственном цикле.

Таблица 3.23 Состав на промышленную серию при производстве препарата Налоксон спрей назальный[*1]

Компоненты	**Состав на серию, кг**
Фармацевтическая субстанция	
Налоксона гидрохлорид[*2] (в пересчета на 100 % безводное вещество)	1,200
Вспомогательные вещества	
Пропиленгликоль	10,000
Макрогол 400 (Polyethylene glycol 400)	10,000
Полоксамер 407 (Lutrol® F 127)	1,000
Кислота лимонная моногидрат[*3]	0,020 (0,010-0,030)
Вода очищенная[*4]	до 100,000

Примечания:

[*1] Состав на промышленную серию составлен в соответствии с Руководством по составлению сведений о производстве лекарственных препаратов для включения в регистрационное досье (Москва, 2007).

[*2] Массу субстанции налоксона гидрохлорида на серию рассчитывают с учетом количественного содержания в ней основного вещества и воды:

$X_1 = m_1 \cdot 100 : Z \cdot [(Z_1 + 100) : 100]$, где

X_1 – искомая масса субстанции налоксона гидрохлорида на серию, кг;

m_1 – требуемое содержание данной субстанции на серию, кг;

Z – содержание основного вещества в безводной субстанции, % масс.;

Z_1 – содержание воды в субстанции, %.

[*3] При необходимости, для корректировки pH допускается изменение содержания кислоты лимонной моногидрата в указанных пределах.

[*4] Массу воды очищенной (М), кг, на серию рассчитывают по формуле:

$M = m - \Sigma m_n$, где

m – размер серии (кг);

Σm_n – сумма масс остальных компонентов на серию (кг).

После подготовительных мероприятий (водоподготовки и санитарной обработки помещений и оборудования) начинается непосредственно процесс получения налоксона спрея назального [5, 9, 17, 19].

В вакуумный реактор, снабженный мешалкой, отмеривают с помощью мерника или отвешивают на весах воду очищенную; отвешивают на весах и загружают в реактор кислоту лимонную моногидрат. Массу в реакторе перемешивают до полного растворения кислоты лимонной моногидрата. Контролируют объем или массу воды очищенной, массу кислоты лимонной моногидрата, время перемешивания, полноту растворения кислоты лимонной моногидрата. Полноту растворения контролируют визуально через смотровое стекло реактора, в растворе не должно быть нерастворившихся частиц.

Отвешивают в емкостях на весах и последовательно загружают в реактор пропиленгликоль и полиэтиленгликоль 400. Создают вакуум глубиной от –0,05 МПа до –0,07 МПа, включают мешалку и перемешивают раствор в течение 5-10 мин до однородности. Процесс перемешивания ведут под вакуумом для предотвращения образования газовой эмульсии. Контролируют массу отвешиваемых пропиленгликоля и полиэтиленгликоля 400, полноту их выгрузки из емкостей и загрузки в реактор, время перемешивания и глубину вакуума, полноту растворения пропиленгликоля и полиэтиленгликоля 400. Полноту растворения контролируют визуально через смотровое стекло реактора, раствор должен быть однородным.

Отвешивают на весах и загружают в реактор полоксамер 407. Создают вакуум глубиной от –0,05 МПа до –0,07 МПа, включают мешалку и перемешивают смесь до полного растворения полоксамера 407. Процесс перемешивания ведут под вакуумом для предотвращения образования газовой эмульсии. Контролируют время перемешивания и глубину вакуума, полноту растворения полоксамера 407. Полноту растворения контролируют визуально через смотровое стекло реактора, в растворе не должно быть нерастворившихся частиц.

В реакторе создают вакуум глубиной от –0,05 МПа до –0,07 МПа и выдерживают раствор без перемешивания в течение 20-40 мин для дегазации; при необходимости в случае пенообразования периодически сбрасывают вакуум для разрушения пены. Контролируют глубину вакуума и уровень пены в реакторе-гомогенизаторе до прекращения пенообразования. После дегазации контролируют pH раствора, который должен быть в пределах от 3,0 до 4,5.

Отвешивают на весах и загружают в реактор налоксона гидрохлорид. Создают вакуум глубиной от –0,05 МПа до –0,07 МПа, включают мешалку и перемешивают смесь до полного растворения налоксона гидрохлорида. Контролируют массу налоксона гидрохлорида, время перемешивания, полноту растворения налоксона гидрохлорида. Полноту растворения контролируют визуально через смотровое стекло реактора, в растворе не должно быть нерастворившихся частиц.

Из реактора отбирают пробу раствора и контролируют pH; значение pH должно быть около 3,5 (от 3,0 до 4,0). При необходимости проводят корректировку pH, добавляя кислоту лимонную моногидрат и растворяя ее при перемешивании. Для понижения pH препарата на 0,1 pH необходимо повысить концентрацию кислоты лимонной моногидрата на ~0,0017 %.

После получения необходимого значения pH из реактора-гомогенизатора отбирают среднюю пробу раствора в соответствии с установленной стандартной рабочей методикой и контролируют на соответствие требованиям НД на промежуточную продукцию «Налоксон раствор нерасфасованный».

После получения положительных результатов анализа, раствор из реактора фильтруют через вакуумный фильтр в реактор-сборник.

Контролируют полноту выгрузки раствора из реактора.

Подготовка баллонов

С баллонов снимают упаковку и загружают их на накопительный стол. Баллоны очищают продувкой отфильтрованным сжатым воздухом, после чего направляют на стадию 3. Визуально контролируют чистоту баллонов.

Фасовка раствора и герметизация баллонов насосами

Перед дозированием раствора контролируют качество баллонов, насосов-дозаторов и насадок-распылителей для назального впрыскивания, снабженных защитным колпачком в соответствии со спецификациями.

Температуру раствора нерасфасованного в реакторе-сборнике поддерживают в пределах (20±2)^{o}С и периодически ее контролируют.

Из реактора-сборника раствор нерасфасованный частями передают в бункер фасовочной машины. Раствор дозируют по 10 г при температуре 20^{o}С в баллоны. В ходе процесса фасовки периодически контролируют массу раствора в баллонах. Масса препарата в каждом баллоне должна быть от 9,8 г до 10,2 г (±2 % от номинальной массы). Средняя масса препарата в 10 баллонах должна быть от 9,94 г до 10,06 г (±0,6 % от номинальной массы). Контролируют температуру воздуха в помещении, которая должна быть от 18^{o}С до 22^{o}С.

В каждый баллон вставляют насос-дозатор, обжимают его на горловине баллона с помощью закаточной цанги, герметизируя баллоны. Визуально контролируют качество укупорки (насос-дозатор должен быть неподвижно, без перекосов и повреждений зафиксирован на горловине баллона. После этого укупоренные баллоны с препаратом размещают на стеллажах вниз насосом и проводят визуальный 100 % контроль на герметичность (не должно быть мокрых пятен на бумаге из лигнина, расположенной под укупоренными баллонами с препаратом). На каждый насос-дозатор, зафиксированный на баллоне, надевают насадку-распылитель с защитным колпачком.

Маркировка баллонов и упаковка в пачки

На каждый баллон наклеивают этикетку из материала с клейким покрытием. Контролируют идентичность и качество этикеток. На этикетку каждого баллона наносят клеймо с указанием серии и срока годности. Контролируют правильность печати на этикетке баллона (номер серии, срок годности).

В каждую пачку вкладывают укупоренный баллон с препаратом и надетой на него насадкой-распылителем с защитным колпачком и инструкцию по медицинскому применению, после чего пачку закрывают.

Контролируют идентичность и качество пачек и инструкций по медицинскому применению, комплектность упаковки, а также правильность печати на пачке (номер серии, срок годности).

Упаковка пачек с препаратом в групповую упаковку

Пачки с препаратом упаковывают в групповую упаковку. Контролируют количество пачек и правильность информации на групповых этикетках.

Отбирают пробы готовой продукции для контроля по всем показателям качества, предусмотренным в НД на препарат Налоксон спрей назальный.

Препарат Налоксон спрей назальный будет производиться на сертифицированном специализированном стандартном производственном оборудовании. Поэтому в соответствии с Решением ЕАЭС № 78 «О правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» для препарата Налоксон спрей назальный допускается проводить сопутствующую валидацию процесса, то есть валидацию в ходе выпуска первых промышленных серий.

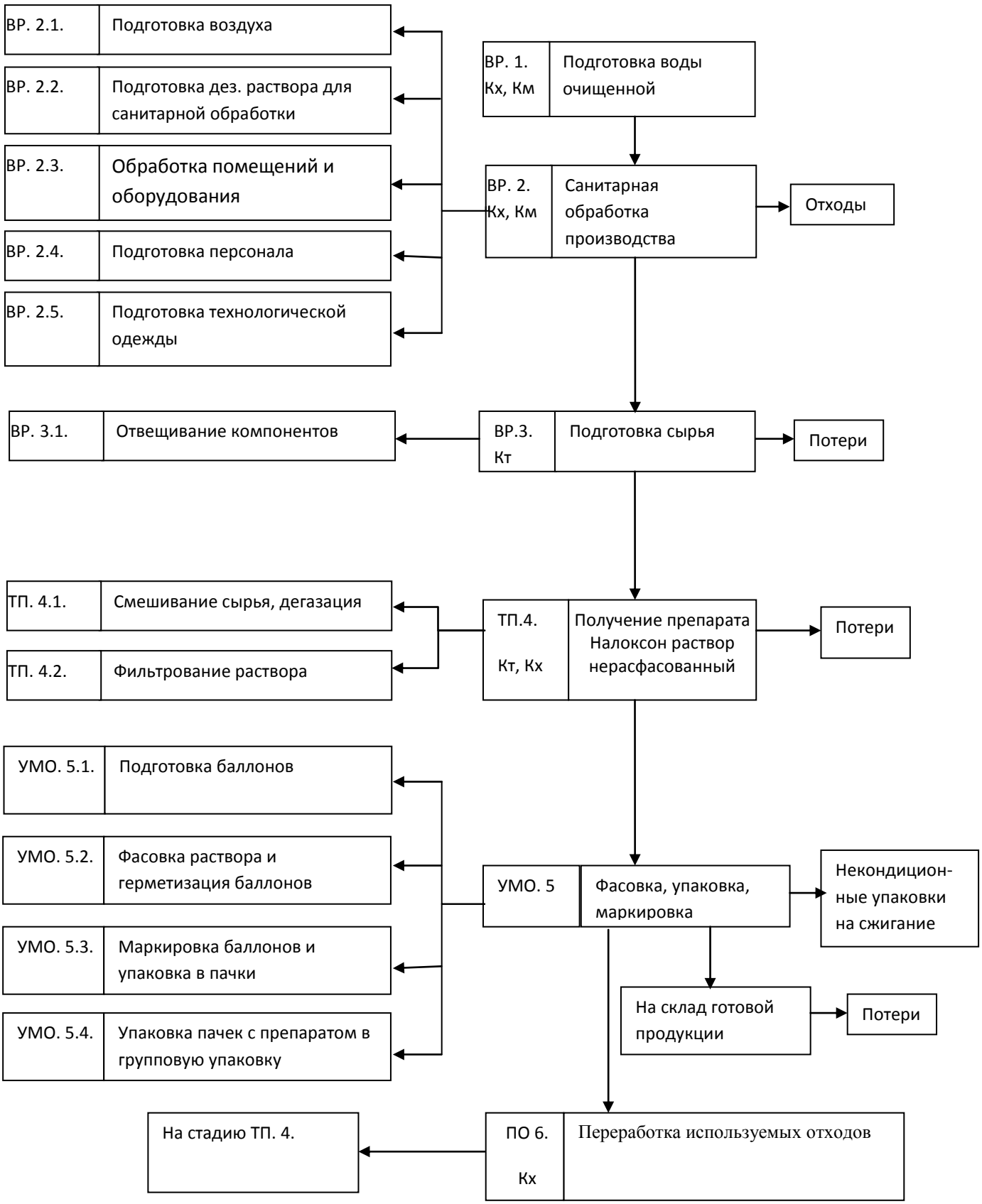


Рисунок 3.13 Технологическая схема производства налоксона спрея назального
Кх, Кт, Км – контроль химический, технологический и микробиологический, соответственно

Препарат *Налоксон спрей назальный* имеет традиционную лекарственную форму, вещества, входящие в его состав, стабильны и не разлагаются в ходе технологического процесса. Препарат, дозируемый в баллоны, является истинным раствором, что обеспечивает однородное распределение действующего вещества и вспомогательных веществ в препарате *Налоксон спрей назальный*. Кроме того, препарат является нестерильным лекарственным средством (категория 2), предназначенным для введения в полость носа, в составе которого присутстсвуют антимикробные консерванты, обладающие надлежащей эффективностью антимикробного действия [74].

На схеме производственного процесса препарата *Налоксон спрей назальный* серым цветом выделены критические стадии и критические контрольные точки в процессе производства (рисунок 3.14).

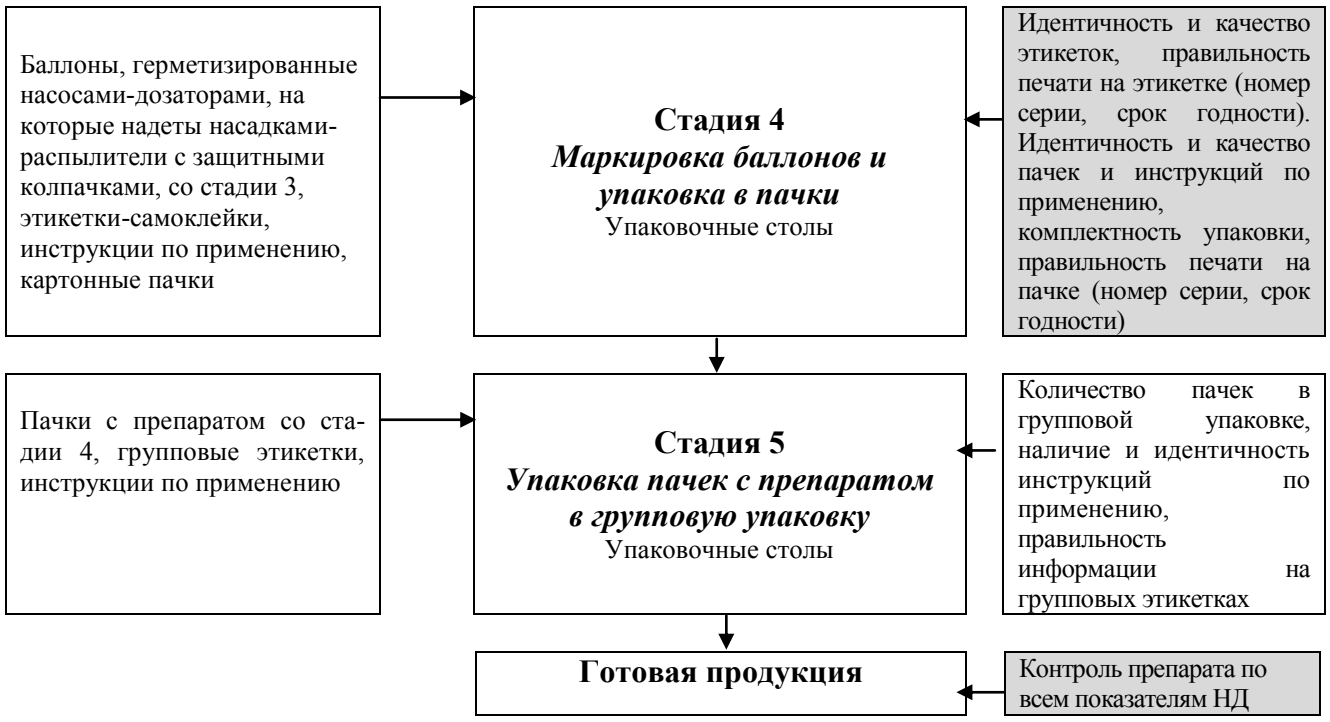


Рисунок 3.14 Схема производственного процесса и контроля процесса производства препарата налоксон спрей назальный

3.8 Разработка аналитических методик определения показателей качества налоксона спрея назального

Следующим этапом была разработка методик показателей качества готовой лекарственной формы. В основу были взяты методики общих фармакопейных статей ГФ XIII, которые были адаптированы и модифицированы в Центральной лаборатории ОАО «Мосхимфармпрепараты» им.Н. А. Семашко» применительно к разработанному препарату. Предложены методики идентификации и количественного определения налоксона гидрохлорида в лекарственном препарате методами ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии, методика определения пропиленгликоля методом газожидкостной хроматографии, определение посторонних примесей методом ВЭЖХ. Разработанные методики были валидированы в соответствии с требованиями ГФ XIII по следующим валидационным характеристикам: специфичность; правильность; прецизионность (сходимость); линейность; диапазон применения (таблица 3.24 и приложение 8).

При определении подлинности и количественного содержания налоксона гидрохлорида, а также при определении посторонних примесей в качестве материала сравнения применялся:

– **Налоксона гидрохлорид (Naloxone Hydrochloride)**

(ЛСР-004169/08-300508или European Pharmacopoeia 7.0, p. 2548)

(фирма «Аспен Осс Б.В.», Нидерланды).

При определении подлинности и количественного содержания пропиленгликоля в качестве стандартного образца применялся:

– **1,2-Пропандиол (1,2-propanediol)**

(European Pharmacopoeia 7.0, p. 2814)

(фирма «Merck», кат. № 1.07478.2500).

При определении подлинности и количественного содержания пропиленгликоля в качестве внутреннего стандарта применялся:

– **1,4-Бутандиол (1,4-butanediol)**

(фирма «Merck», кат. № 8.01532.1000).

Таблица 3.24 Спецификация на Налоксон спрей назальный

Показатель	Метод	Нормы
Описание	Визуальный	Прозрачная бесцветная жидкость, которая находится в аэрозольном баллоне, герметизированном насосом-дозатором, укомплектованным насадкой-распылителем с защитным колпачком. Препарат выдается из баллона через насадку-распылитель в виде аэрозольной струи, представляющей собой диспергированные в газовой среде жидкие частицы
Подлинность Налоксона гидрохлорид	ВЭЖХ ОФС 1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» УФ-	На хроматограммах испытуемого раствора, полученных в разделе «Количественное определение. Налоксона гидрохлорид», должен обнаруживаться пик, время удерживания которого совпадает со временем удерживания пика налоксона на хроматограммах раствора сравнения с точностью ±2 %

	спектрофотометрия ОФС 1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» Качественная реакция на хлориды ОФС 1.2.2.2.0009.15 «Хлориды»	На УФ-спектре испытуемого раствора препарата должен быть максимум оптического поглощения при длине волны (281±2) нм 2 мл препарата должны давать качественную реакцию на хлориды
Пропиленгликоль	ГХ ОФС 1.2.1.2.0004.15 «Газовая хроматография»	На хроматограммах испытуемого раствора, полученных в разделе «Количественное определение. Пропиленгликоль», должен обнаруживаться пик, относительное время удерживания которого (относительно внутреннего стандарта) должно совпадать с относительным временем удерживания пика пропиленгликоля (относительно внутреннего стандарта) на хроматограммах раствора сравнения
pH	Потенциометрический ОФС 1.2.1.0004.15 «Ионометрия»	От 3,0 до 4,0
Прозрачность	ОФС 1.2.1.2.0007.15 «Прозрачность и степень мутности»	Препарат должен быть прозрачным
Цветность	ОФС 1.2.1.2.0006.15 «Степень окраски жидкостей»	Препарат должен быть бесцветным
Испытание упаковки: 1. Проверка упаковки на герметичность	Визуальный	Не должно быть мокрых пятен на фильтровальной бумаге
2. Проверка насоса-дозатора	Визуальный	Появление аэрозольной струи должно происходить после нажатия на насадку-распылитель не более чем 5 раз. Допускается при отсутствии струи нажать на насадку-распылитель еще один раз. В дальнейшем появление аэрозольной струи должно происходить после первого нажатия на насадку-распылитель
3. Средняя масса доставляемой дозы	Расчетно-весовой метод	От 0,0476 г до 0,0644 г
4. Однородность массы	Европейская	При испытании на 9 баллонах индивидуальная

доставляемой дозы	фармакопея. Расчетно-весовой метод	масса доставляемой дозы только для двух баллонов может отклоняться от средней массы доставляемой дозы более чем на (±25 %), но не более чем на (±35 %)
4. Количество извлекаемых доз	Метод подсчета	Не менее 150
Микробиологическая чистота	ОФС 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»	В препарате допускается общее число жизнеспособных аэробных бактерий и грибов (суммарно) не более 10^2 в 1 мл. Допускается наличие энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий не более 10^1 в 1 мл Не допускается наличие *Staphylococ-cus aureus* в 1 мл Не допускается наличие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 мл
Посторонние примеси Любая индивидуальная неидентифицированная примесь Сумма примесей	ВЭЖХ ОФС 1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффектив-ная жидкостная хроматография»	*При выпуске*: не более 0,5 %; *в течение срока хранения:* не более 1,0 % *При выпуске*: не более 1,0 %; *в течение срока хранения:* не более 2,5 %
Количественное определение		
Налоксона гидрохлорид ($C_{19}H_{22}ClNO_4$)	ВЭЖХ ОФС 1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография»	От 11,4 мг до 12,6 мг в 1 г препарата
Пропиленгликоль ($C_3H_8O_2$)	ОФС 1.2.1.2.0004.15 «Газовая хроматография»	От 95,0 мг до 105,0 мг в 1 г препарата
Упаковка	По 10 г в баллоны алюминиевые моноблочные с внутренней защитой, герметизированные насосом-дозатором и снабженные насадкой-распылителем с защитным колпачком. Каждый баллон вместе с насадкой-распылителем и защитным колпачком, а также инструкцией по медицинскому применению помещают в пачку из картона	
Маркировка	В соответствии с НД	
Хранение	При температуре от 15°С до 25°С. Не замораживать	

Для идентификации налоксона гидрохлорида в составе лекарственной формы предложена методика спектрофотометрического определения. В соответствии с ОФС. 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» для

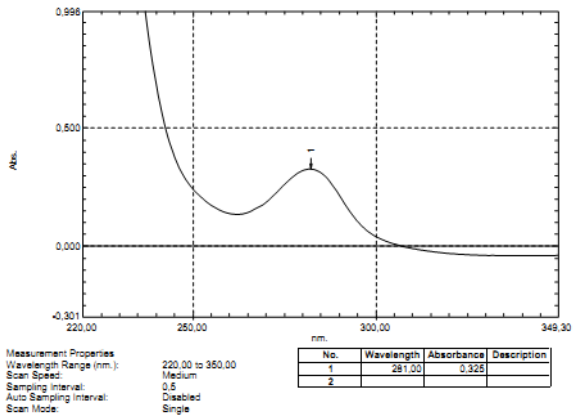
аналитических методик определения подлинности необходимо определить такую валидационную характеристику, как *специфичность.*

На УФ-спектре (от 220 нм до 350 нм) испытуемого раствора препарата должен присутствовать максимум оптического поглощения при длине волны 281±2 нм.

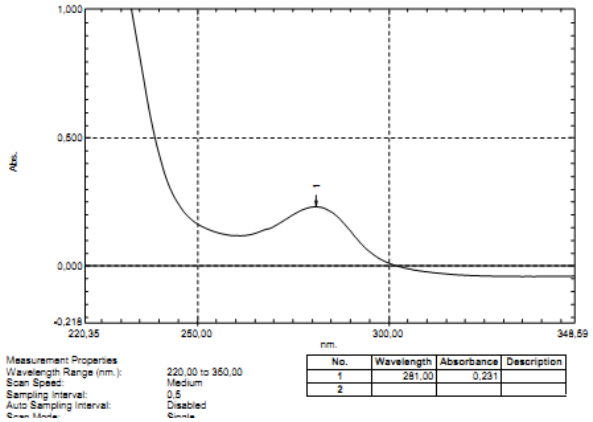
Специфичность испытания подтверждается тем, что:

1. Величина оптического поглощения раствора «плацебо» при длине волны 281±2 нм не значима, по сравнению с величиной оптического поглощения испытуемого раствора препарата при этой длине волны (рис. 3.15 А, В).

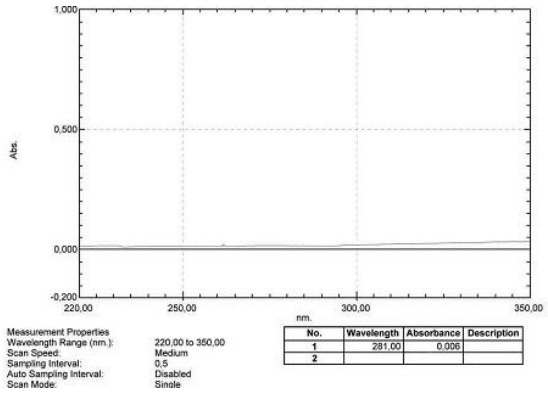
2. Длина волны максимума оптического поглощения испытуемого раствора (281 нм) совпадает с длиной волны максимума оптического поглощения раствора сравнения налоксона гидрохлорида (281 нм) (рис. 3.15 А, Б).



А



Б



В

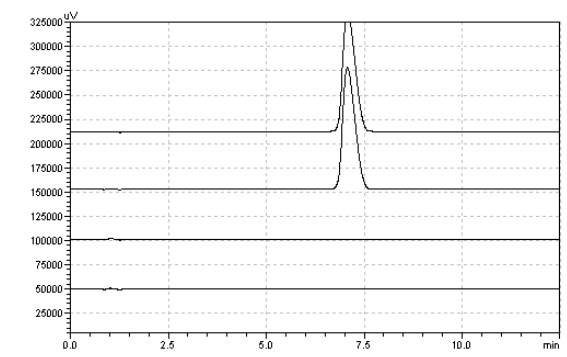
Рисунок 3.15 А Оптический спектр поглощения испытуемого раствора препарата. Максимум оптического поглощения при длине волны 281 нм; Б - оптический спектр поглощения раствора налоксона гидрохлорида. Максимум

оптического поглощения при длине волны 281 нм; В - оптический спектр поглощения раствора «плацебо».

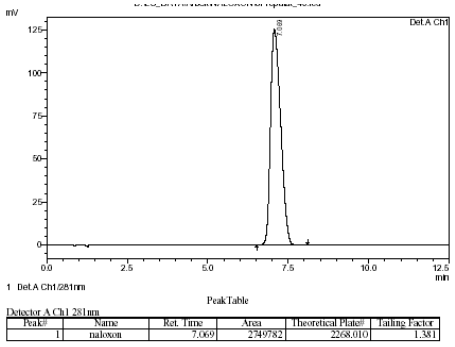
Для качественного и количественного определения налоксона гидрохлорида в составе лекарственной формы были разработаны аналитические методики определения подлинности и количественного содержания налоксона гидрохлорида в промежуточной продукции *налоксон раствор нерасфасованный* и препарате *налоксон спрей назальный* методом ВЭЖХ.

В соответствии с ОФС. 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» для аналитических методик определения подлинности необходимо определить такую валидационную характеристику, как *специфичность;* а для аналитических методик определения количественного содержания также: *правильность, прецизионность, линейность, диапазон применения.*

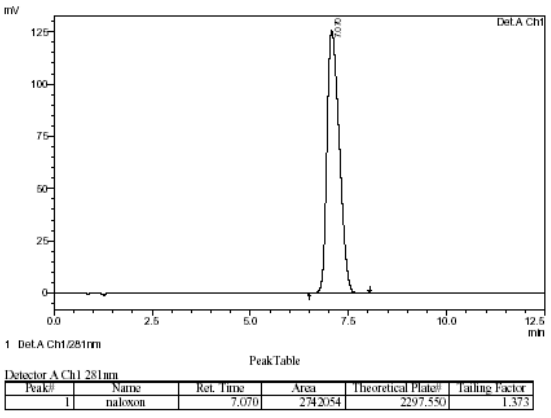
Специфичность методики определения подлинности и количественного содержания налоксона гидрохлорида представлена на хроматограммах на рис. 3.16 А-Д.



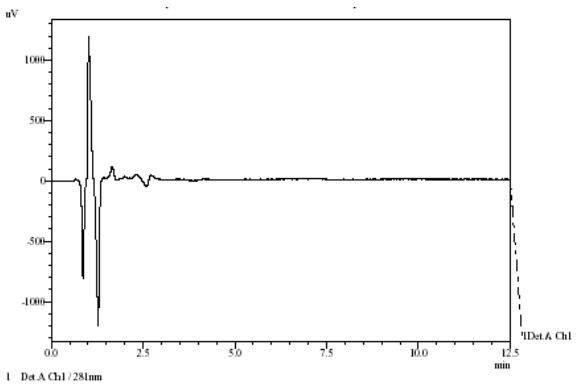
А



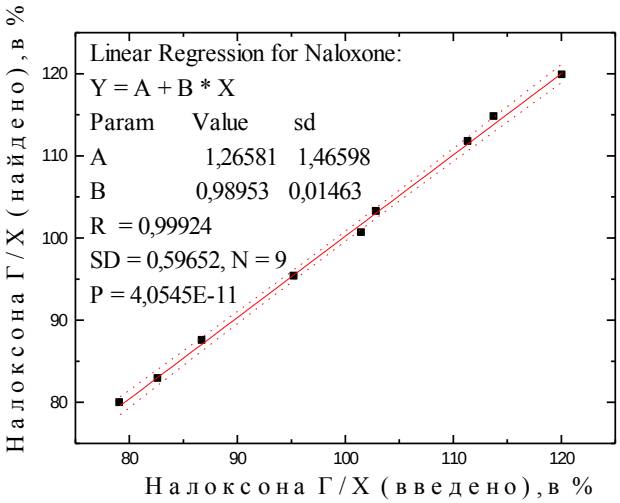
Б



В



Г



Д

Рисунок 3.16 Хроматограммы А - хроматограммы (сверху вниз): испытуемого раствора, раствора сравнения, раствора «плацебо» и растворителя («бланка»); Б - Хроматограмма испытуемого раствора препарата в условиях количественного определения налоксона гидрохлорида; В - хроматограмма раствора сравнения в условиях количественного определения налоксона гидрохлорида; хроматограмма раствора «плацебо» в условиях количественного определения налоксона гидрохлорида.

На хроматограммах 3.16 Б и В пик со временем удерживания 7,070 мин соответствует налоксона гидрохлориду.

Специфичность испытания подтверждается тем, что: 1. На хроматограммах *раствора плацебо* и растворителя отсутствуют пики со временем удерживания, совпадающим со временем удерживания пика налоксона на хроматограмме *испытуемого раствора* (рис.3.16 А, Б, Г). То есть, компоненты плацебо и растворитель не мешают проведению испытаний по определению подлинности и количественного содержания налоксона гидрохлорида. 2. Время удерживания пика налоксона на хроматограмме *испытуемого раствора* совпадает со временем удерживания пика налоксона на хроматограмме *раствора сравнения* с точностью 0,014 % (рис. 3.16 Б, В). 3. На хроматограмме *испытуемого раствора* и *раствора сравнения* имеется один пик, который хорошо разделяется с системными шумами. Время удерживания пика налоксона намного больше «мертвого времени». Таким

образом, было показано, что методики определения подлинности и количественного содержания налоксона гидрохлорида в промежуточной продукции и препарате *налоксон спрей назальный* методом ВЭЖХ являются специфичными.

Определение правильности и прецизионности методики количественного определения налоксона гидрохлорида представлены в таблица 3.26. Из данных, приведенных в табл. 3.26, следует, что методика количественного определения налоксона гидрохлорида характеризуется достаточной правильностью и сходимостью (прецизионностью) во всем диапазоне концентраций (от 80 % до 120 %) и является корректной. Как свидетельствуют данные, приведенные в табл. 3.25, в диапазоне концентраций налоксона гидрохлорида от 80 % до 120 % по отношению к номинальной концентрации методика его количественного определения не имеет систематической ошибки.

Таблица 3.25 Результаты валидации по характеристиками правильность и прецизионность методики количественного определения налоксона гидрохлорида в составе лекарственной формы методом ВЭЖХ

№ раствора	**Введено в % от номинальной концентрации (Xi, факт., %)**	**Найдено в % от номинальной концентрации (Yi, %)**	**Найдено в % к введенному Zi = 100 • (Yi/Xi)**
1	79,15	79,91	100,96
2	82,69	82,86	100,21
3	86,78	87,51	100,84
4	95,29	95,32	100,03
5	101,51	100,61	99,11
6	102,89	103,21	100,31
7	111,41	111,70	100,26
8	113,79	114,74	100,83
9	120,13	119,82	99,74
Среднее, Zcp, % =			100,25
Относительное стандартное отклонение, RSD_z, % =			0,5918
Относительный доверительный интервал Δ_z % = t (95 %, 9 – 1) x RSD_z = 1,860 x 0,5918 =			1,1007
Критическое значение для сходимости результатов Δ_{As}, % =			1,6
Систематическая ошибка δ % = | Zcp – 100 | =			0,25
Критерий незначимости систематической ошибки: 1) статистическая незначимость: $\delta < \Delta_z : \sqrt{9} = 1{,}1007 : 3 = 0{,}37\ \% > 0{,}25\ \%$ Если не выполняется 1), то $\delta \leq \max \delta$: 2) практическая незначимость: $\delta\% \leq 0{,}32 \times 1{,}6 = 0{,}51\ \% > 0{,}25\ \%$			Выполняется Выполняется
Общий вывод о методике			**КОРРЕКТНА**

Характеристику «Линейность» исследовали в диапазоне концентраций налоксона гидрохлорида от 80 % до 120 % по отношению к номинальному значению (рис. 3.16 Д). Показано, что в указанном диапазоне концентраций методика является линейной (коэффициент корреляции более 0,99),

Таблица 3.26 Метрологические характеристики линейной зависимости найденной концентрации налоксона гидрохлорида от его введенной концентрации

Параметры	**Значения**	**Требования 1**	**Требования 2**	**Заключение**
b	0,98953			
S_b	0,01463			
a	1,26581	□ 1,895 □ S_a = |2,78|	□|2,6|	Соответствует по 1 и 2 критериям
S_a	1,46598			
RSD_0	0,59180			
RSD_0/b	0,59806	□|0,84|		Соответствует
r	0,99924	>|0,99810|		Соответствует

Как следует из данных, представленных в таблице 3.27, требования к параметрам линейной зависимости выполняются, то есть линейность методики количественного определения налоксона гидрохлорида подтверждается в диапазоне концентраций от 80 % до 120 % от номинального значения.

Таким образом, было показано, что методика количественного определения налоксона гидрохлорида в препарате *налоксон спрей назальный* методом ВЭЖХ в диапазоне применения методики соответствует критериям приемлемости для валидационных характеристик: *специфичность, правильность, прецизионность (сходимость) и линейность*.

Валидация аналитических методик определения подлинности и количественного содержания пропиленгликоля методом газовой хроматографии (ГХ) в препарате *Налоксон спрей назальный* проводилась по следующим показателям: специфичность, правильность, прецизионность, линейность, диапазон применения.

Специфичность методик определения подлинности и количественного содержания пропиленгликоля представлена на рис. 3.17 (А-В), а также в табл. 3.27.

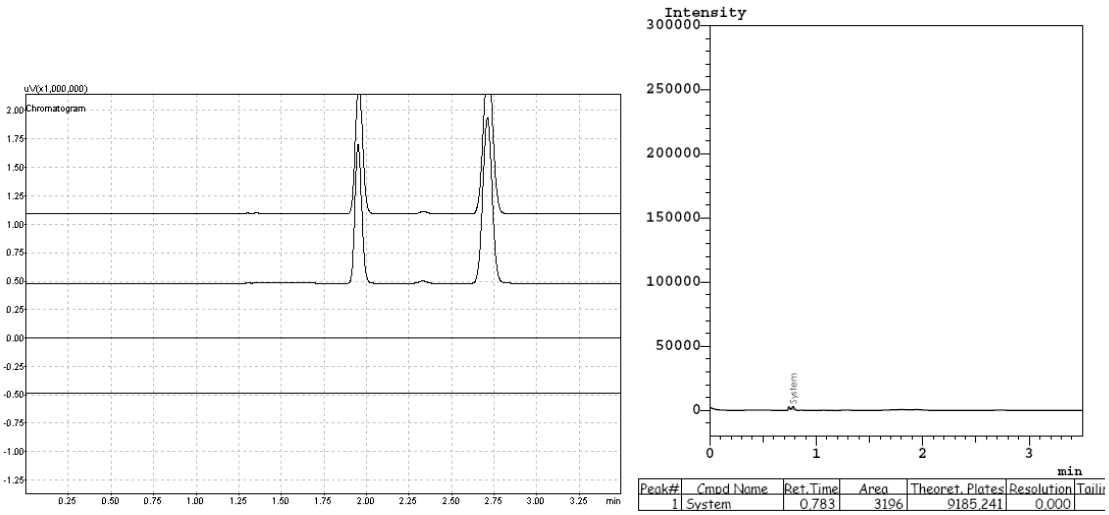
Таблица 3.27 Времена удерживания компонентов на хроматограммах раствора сравнения и испытуемого раствора, а также относительные времена удерживания пропиленгликоля (относительно 1,4-бутандиола)

Раствор	**Вещество**	**Время удерживания, мин**	**Относительное время удерживания**
Раствор сравнения	Пропиленгликоль	1,933	0,720
	1,4-бутандиол	2,684	1
Испытуемый раствор	Пропиленгликоль	1,930	0,721
	1,4-бутандиол	2,678	1
Примечание: *1,4-бутандиол* является внутренним стандартом.			

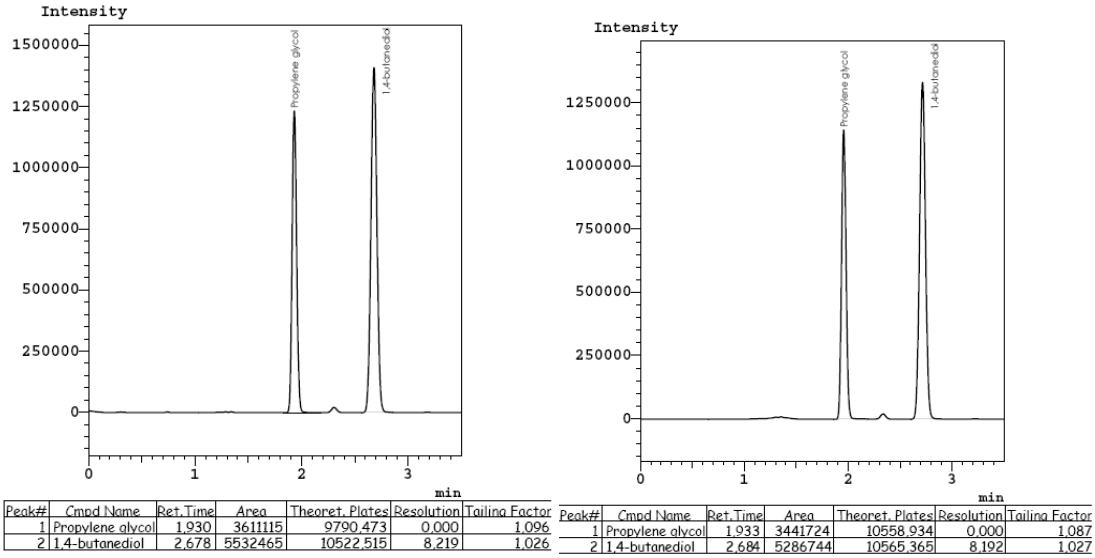
Пик со временем удерживания 1,930 мин соответствуют пропиленгликолю; пик со временем удерживания 2,678 мин – 1,4-бутандиолу.

Как видно из данных, представленных на рис. 3.17 на хроматограммах раствора «плацебо» препарата и растворителя отсутствуют пики со временем удерживания, совпадающим со временем удерживания пика пропиленгликоля, а также 1,4-бутандиола (внутренний стандарт). Пик пропиленгликоля (определяемый компонент) и пик 1,4-бутандиола (внутренний стандарт) хорошо разделяются. Коэффициент разделения пары пиков пропиленгликоля и 1,4-бутандиола на хроматограмме испытуемого раствора равен 8,219, а на хроматограмме раствора сравнения – 8,192 (рис. 4), что примерно в 2 раза больше критерия приемлемости 4,0. Пики плацебо и растворителя на хроматограммах отсутствуют.

Таким образом показано, что методика определения подлинности и количественного содержания пропиленгликоля в промежуточной продукции и препарате *Налоксон спрей назальный* методом газовой хроматографии (ГХ) отвечает заданным критериям приемлемости для специфичности и является специфичной.



Peak#	Cmpd Name	Ret.Time	Area	Theoret. Plates	Resolution	Tailin
1	System	0,783	3196	9185,241	0,000	



Peak#	Cmpd Name	Ret.Time	Area	Theoret. Plates	Resolution	Tailing Factor
1	Propylene glycol	1,930	3611115	9790,473	0,000	1,096
2	1,4-butanediol	2,678	5532465	10522,515	8,219	1,026

Peak#	Cmpd Name	Ret.Time	Area	Theoret. Plates	Resolution	Tailing Factor
1	Propylene glycol	1,933	3441724	10558,934	0,000	1,087
2	1,4-butanediol	2,684	5286744	10565,365	8,192	1,027

Рисунок 3.17 Хроматограммы: А - хроматограммы (сверху вниз) испытуемого раствора, раствора сравнения, раствора «плацебо», воды (растворителя); Б - хроматограмма раствора «плацебо», полученная в условиях количественного определения пропиленгликоля; В - хроматограмма испытуемого раствора, полученная в условиях количественного определения пропиленгликоля; Г - хроматограмма раствора сравнения, полученная в условиях количественного определения пропиленгликоля.

Линейность, правильность и сходимость (прецизионность) методики количественного определения пропиленгликоля была проверена методом «введено-найдено». Характеристики правильности и сходимости исследовали на модельных растворах препарата с концентрациями определяемого компонента,

которые соответствуют 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 105 %, 110 %, 115 % и 120 % его содержания по отношению к номинальному значению.

Таблица 3.28 Результаты анализа модельных смесей препарата *Налоксон спрей назальный*, содержащих от 80 % до 120 % пропиленгликоля, и их статистическая обработка

№ р-ра	**Введено в % от номинально концентрации ($X_{i,\ факт.}$, %)**	**Найдено в % к номинальной концентрации (Y_i, %)**	**Найдено в % к введенному $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$**
1	80,25	79,53	99,10
2	85,55	85,14	99,52
3	91,66	92,23	100,62
4	96,73	96,77	100,04
5	99,96	100,95	100,99
6	107,25	108,55	101,21
7	110,87	110,87	100,00
8	114,85	115,83	100,85
9	121,15	121,58	100,35
Среднее, $Z_{ср}$, % =			100,30
Относительное стандартное отклонение, RSD_z, % =			0,6978
Относительный доверительный интервал Δ_z % = t (95 %, 9 – 1) · RSD_z = 1,860 · 0,6978 =			1,2979
Критическое значение для сходимости результатов %			1,6
Систематическая погрешность = | $Z_{ср} – 100$ |			0,30
Критерий незначимости систематической ошибки 1) Статистическая незначимость: $\delta,\% \le \frac{\Delta_{\bar{Z}}}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_{\bar{Z}}}{3}$ = 1,2979 : 3 = 0,43 % > 0,30% если не выполняется требование к критерию 1), то: 2) δ,% ≤ 0,32 × 1,6 = 0,51 % > 0,30 %			Выполняется Выполняется
Общий вывод о методике			**корректна**

Из данных, приведенных в таблице 3.28, следует, что методика количественного определения пропиленгликоля характеризуется достаточной правильностью и сходимостью (прецизионностью) во всем диапазоне концентраций (от 80 % до 120 %) и является корректной.

График линейной зависимости представлен на рис. 3.18, а результаты расчета параметров линейной зависимости – в таблице 3.29.

Как следует из данных, представленных на рис. 3.18 и в табл. 3.29, требования к параметрам линейной зависимости выполняются, то есть

линейность методики количественного определения пропиленгликоля подтверждается в диапазоне концентраций от 80 % до 120 % от номинального значения.

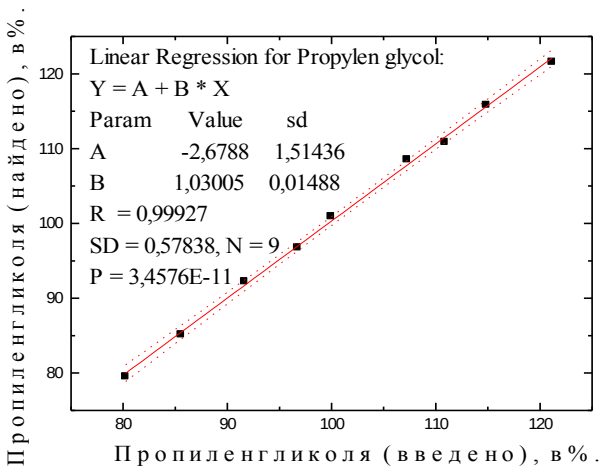


Рис. 3.18 Линейная зависимость найденной концентрации пропиленгликоля от его введенной концентрации в нормализованных координатах

Таблица 3.29 Метрологические характеристики линейной зависимости найденной концентрации пропиленгликоля от его введенной концентрации

Параметры	**Значения**	**Требования 1**	**Требования 2**	**Заключение**
b	1,03005			
S_b	0,01488			
a	–2,6788	□ 1,895 □ S_a = |2,87|	□ |2,6|	Соответствует по 1 критерию
S_a	1,51436			
RSD_0	0,6978			
RSD_0/b	0,6774	□ |0,84|		Соответствует
r	0,99927	> |0,99810|		Соответствует

Таким образом, было показано, что методика количественного определения пропиленгликоля в препарате *Налоксон спрей назальный* методом газовой хроматографии (ГХ) в диапазоне применения методики соответствует критериям приемлемости для валидационных характеристик: *специфичность, правильность, прецизионность (сходимость) и линейность*.

3.9 Исследование стабильности в процессе хранения назального спрея налоксона

Полученная лекарственная форма налоксон спрей назальный расфасован по 10 г в баллоны алюминиевые моноблочные фирмы «Linhardt GmbH & Co KG» (Германия) (типа D 22.0 DDG – 28) с внутренней защитой, герметизированные насосом-дозатором типа 20 MSP 6/50 и снабженные насадкой-распылителем с защитным колпачком типа V04.1450 + V16.83 производства фирмы «Coster Technologie Speciali S.p.a.» (Италия), и заложена на хранение в условиях естественного хранения. На хранение закладывались три промышленные серии препарата. Контролировали следующие показатели качества, представленные в таблице 17, с периодичностью 3 месяца. Лекарственный препарат стабилен в течение 27 месяцев (таблица 3.30), что согласно ОФС. 1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств», позволяет сделать заключение о сроке годности 2 года.

Таблица 3.30 Результаты анализов препарата Налоксон спрей назальный в процессе хранения

Номер серии	Дата анализа	Описание	Подлинность				Прозрачность и цветность	pH	Испытание аэрозольной упаковки					Посторонние примеси	Микробиологическая чистота	Количественное содержание, мг/г		Срок годности	Выводы
			Налоксона гидрохлорид (ВЭЖХ)	Налоксона гидрохлорид (спектрофото-метрия)	Налоксона гидрохлорид	Пропилен-гликоль (ГХ)			*Проверка упаковки на герметичность*	*Проверка насоса-дозатора*	*Средняя масса доставляемой дозы, г*	*Однородность массы доставляемой дозы*	*Количество извлекаемых доз*			налоксона гидрохлорид	пропилен-гликоль		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Требования проекта НД		Прозрачная бесцветная жидкость, находящаяся в аэрозольном баллоне, герметизированном насосом-дозато-ром с насадкой-распыли-телем и защитным кол-пачком. Препарат выдается в виде аэрозольной струи.	По совпадению времен удерживания пиков на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения с точностью ±2 %.	На УФ-спектре испытуемого раствора препарата должен быть максимум оптического поглощения при длине волны (281±2) нм.	2 мл препарата должны давать качественную реакцию на хлориды.	По совпадению относительных времен удерживания (относительно внутреннего стандарта) пиков на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения.	Препарат должен быть прозрачным и бесцветным.	От 3,0 до 4,0.	Не должно быть мокрых пятен на фильтровальной бумаге (под препаратом, перевернутым вниз насосом-дозато-ром).	Появление аэрозольной струи должно происходить после нажатия на насадку-распылитель не более чем 5 раз. Допускается еще одно нажатие.	От 0,0476 г до 0,0644 г	Для 9 баллонов индивидуальная масса доставляемой дозы только для 2 баллонов может отклоняться от средней массы более чем на ±25%, но не более чем на ±35%	Не менее 150.	Любой единичной примеси при выпуске ≤0,5 %, в течение срока хранения ≤1,0 %. Сумма примесей (∑) при выпуске ≤1,0 %, в течение срока хранения ≤2,5 %.	В препарате допускается общее число жизнеспособных аэробных бактерий и грибов (суммарно): не более 10^2 в 1 мл. Допускается не более 10 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 мл. Не допускается наличие в 1 мл *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa.*	От 11,4 мг до 12,6 мг в 1 г препарата	От 95,0 мг до 105,0 мг в 1 г препарата	2 года	

011209	15.12.09 16.03.10 15.06.10 16.09.10 16.12.10 16.06.11 15.12.11 15.03.12	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	3,53 3,55 3,58 3,60 3,59 3,61 3,64 3,67	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	0,05614 0,05542 0,05628 0,05637 0,05646 0,05624 0,05606 0,05553	max 3,61% max 2,47% max 3,12% max 3,16% max 4,21% max 3,73% max 3,54% max 3,65%	160 158 162 161 159 163 162 160	≤0,05%; ∑=0,10% ≤0,05%; ∑=0,10% ≤0,06%; ∑=0,11% ≤0,07%; ∑=0,12% ≤0,08%; ∑=0,13% ≤0,10%; ∑=0,15% ≤0,12%; ∑=0,17% ≤0,13%; ∑=0,18%	Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) менее 10. В 1 мл отсутствуют энтеробактерии и некоторые другие грамотрицательные бактерии, *S. aureus, P. aeruginosa*.	11,97 11,95 11,96 11,94 11,92 11,91 11,89 11,90	101,3 101,1 102,1 101,4 102,2 100,8 101,3 101,6	– 3 мес. 6 мес. 9 мес. 12 мес. 18 мес. 24 мес. 27 мес.	годен годен годен годен годен годен годен годен
021209	15.12.09 16.03.10 15.06.10 16.09.10 16.12.10 16.06.11 15.12.11 15.03.12	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	3,61 3,63 3,64 3,66 3,65 3,68 3,70 3,73	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//- -//-	0,05565 0,05528 0,05556 0,05648 0,05683 0,05537 0,05657 0,05623	max 4,38% max 3,72% max 3,83% max 4,35% max 4,71% max 4,07% max 3,80% max 3,12%	157 161 159 162 163 160 158 161	≤0,06%; ∑=0,11% ≤0,07%; ∑=0,12% ≤0,08%; ∑=0,13% ≤0,09%; ∑=0,14% ≤0,10%; ∑=0,15% ≤0,12%; ∑=0,17% ≤0,14%; ∑=0,19% ≤0,15%; ∑=0,20%	Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) менее 10. В 1 мл отсутствуют энтеробактерии и некоторые другие грамотрицательные бактерии, *S. aureus, P. aeruginosa*.	12,10 12,03 12,06 12,10 12,05 11,98 12,05 12,07	100,6 100,8 100,9 101,2 100,8 101,3 100,7 101,1	– 3 мес. 6 мес. 9 мес. 12 мес. 18 мес. 24 мес. 27 мес.	годен годен годен годен годен годен годен годен

031209	15.12.09 16.03.10 15.06.10 16.09.10 16.12.10 16.06.11 15.12.11 15.03.12	Соотв. То же -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//-	3,50 3,51 3,53 3,54 3,56 3,61 3,62 3,63	Соотв. То же -//- -//- -//- -//-	Соотв. То же -//- -//- -//- -//-	0,05613 0,05546 0,05654 0,05581 0,05612 0,05593 0,05605 0,05541	max 4,22 % max 4,54 % max 3,97 % max 4,73 % max 4,06 % max 3,18 % max 3,33 % max 4,26 %	163 161 160 159 162 161 158 162	≤0,05%; ∑=0,10% ≤0,06%; ∑=0,11% ≤0,07%; ∑=0,12% ≤0,08%; ∑=0,13% ≤0,09%; ∑=0,14% ≤0,12%; ∑=0,17% ≤0,14%; ∑=0,19% ≤0,16%; ∑=0,21%	Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) менее 10. В 1 мл отсутствуют энтеробактерии и некоторые другие грамотрицательные бактерии, *S. aureus, P. aeruginosa*.	12,16 12,18 12,08 12,13 12,11 12,14 12,12 12,12	100,3 100,1 99,8 100,4 99,9 99,8 100,2 100,3	– 3 мес. 6 мес. 9 мес. 12 мес. 18 мес. 24 мес. 27 мес.	годен годен годен годен годен годен годен годен

Выводы к главе 3:

1. Обоснована возможность получения лекарственной формы назального спрея налоксона.

2. Осуществлен подбор вспомогательных веществ с учетом физико-химических характеристик вспомогательных веществ и на основании результатов исследования характеристик модельных растворов: поверхностного натяжения, осмоляльности, реологических свойств, плотности и вязкости. По результатам исследования осмотической активности (в частности, кинетики и степени высвобождения налоксона) выбрано содержание пропиленгликоля и макрогола 400. Полоксамер 407 обеспечивает препарату хорошие поверхностно-активные свойства (эффективные смачивание и растекание), что обусловливает всасывание налоксона со всей поверхности слизистой оболочки полости носа. Концентрация кислоты лимонной моногидрата 0,02 % обеспечивает pH препарата около 3,5 (в пределах от 3,0 до 4,0), при котором препарат оказывается стабилен при хранении, в частности, не происходит избыточного накопления примесей.

3. Исследованы показатели качества разработанной лекарственной формы налоксон спрей назальный: на основе результатов, полученных при исследовании высвобождения модельного раствора налоксона, выбран конечный состав и получен профиль высвобождения фармацевтической субстанции *in vitro*.

4. Обоснован выбор упаковки назального спрея налоксона. В качестве упаковки выбраны баллоны алюминиевые моноблочные фирмы «Linhardt GmbH & Co KG» (Германия) (типа D 22.0 DDG – 28) с внутренней защитой, герметизированные насосом-дозатором типа 20 MSP 6/50 и снабженные насадкой-распылителем с защитным колпачком типа V04.1450 + V16.83 производства фирмы «Coster Technologie Speciali S.p.a.». При выдаче одной дозы выдается 50 мкл препарата, что соответствует ~56 мг препарата, в которых содержится 0,672 мг налоксона гидрохлорида.

5. С учетом физико-химических свойств компонентов, а также вида и свойств лекарственной формы разработана рациональная технология

производства препарата Налоксон спрей назальный; показаны ее критические аспекты.

6. Проведено исследование стабильности налоксона спрея назального в процессе хранения при нормальных условиях. Установлено, что все контролируемые показатели качества препаратов остаются в пределах норм допустимых отклонений в течение 27 месяцев, что позволило установить срок хранения равный 2 годам. Наработанный в соответствии с предложенной технологической схемой налоксон спрей назальный отвечает требованиям проекта НД.

7. Разработан и утвержден лабораторный регламент на производство налоксона спрея назального, который апробирован на опытно-промышленном производстве ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко».

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1) На основе анализа литературных данных обоснован выбор лекарственной формы налоксона – назальный спрей.

2) Изучение научных публикаций и технической документации фирм-производителей вспомогательных веществ позволил выявить ассортимент вспомогательных веществ, перспективных для разработки лекарственной формы. На основе изучения физико-химических характеристик лекарственного и вспомогательных веществ разработан состав назального спрея налоксона, способного равномерно распределяться по слизистой оболочке, обладающего оптимальными осмотическими, реологическими и биофармацевтическими характеристиками.

3) Разработана технологическая схема получения лекарственной формы налоксона в виде спрея. Апробирование разработанной технологии в условиях опытного производства показало ее воспроизводимость.

4) Обоснован выбор упаковки назального спрея и установлен срок годности лекарственной формы, который составил 2 года.

5) Разработаны и валидированы методики определения подлинности спрея налоксона методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, газовой хроматографии и УФ-спектроскопии, количественное определение налоксона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, пропиленгликоля – газовой хроматографией.

6) Изучение показателей качества полученного спрея показало, что он соответствуют современным требованиям по всем фармакопейным показателям, установленным для данной лекарственной формы.

7) На основании результатов исследований разработана нормативная документация (лабораторный регламент на производство, проект нормативного документа) на лекарственную форму налоксона спрея назального.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AUC – (англ. *area under ROC curve*) площадь по фармакокинетической кривой

EPh – (англ. *European Pharmacopoeia*) европейская фармакопея

FDA –- (англ. *Food and Drug Administration*) Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

USP – (англ. *United States Pharmacopeia*) фармакопея Соединенных Штатов Америки

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАМК – γ-Аминомасляная кислота

ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс

ГОСТ – государственный отраслевой стандарт

ГФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ГХ – газовая хроматография

КОЕ – колониеобразующая единица

НД – нормативная документация

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПГ – пропиленгликоль

ПЭО – полиэтиленоксид

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеев С.Н. Устройства доставки ингаляционных препаратов, используемые при терапии заболеваний дыхательных путей // Русский медицинский журнал. 2002. №5. С.255.
2. Алексеев К.В. Технология повышения биологической и фармацевтической доступности лекарственных веществ / Алексеев К.В. и др. // Вестник новых медицинских технологий. 2012. Т.XIX. №4. С.43
3. Государственный реестр лекарственных средств. URL: https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=налоксон (дата обращения 10.12.2017)
4. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. М: 2015. Федеральная электронная медицинская библиотека. URL: http://femb.ru/feml (дата обращения 25.12.2017)
5. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства / Н.В. Меньшутина, Ю.В. Мишина, С.В. Алвес и др. - М.: Изд-во БИНОМ, 2013. - Т.2. - 480 с.
6. Ковалева, Е.Л. Проблема современной маркировки лекарственных препаратов / Е.Л. Ковалева, В.Л. Багирова, К.С. Шаназаров // Фармация. – 2002. – № 4. – С. 4–8.
7. КОМПЕНДИУМ 2011 – лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – К.: МОРИОН, 2011. – 2320 с.
8. Коржавых, Э.А. Номенклатура лекарственных форм: справочное пособие / Э.А. Коржавых. – М., 2004. – 126 с.
9. Краснюк, И.И. Фармацевтическая технология / И.И. Краснюк, Г.В. Михайлова, О.Н. Григорьева. – М.: «Академия», 2006. – 424 с.
10. Лапач С.Н. Статистические методы в биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: МОРИОН, 2000. – 320 с.
11. Линский, И.В. Традиционные и перспективные сферы применения налоксона в клинической практике (обзор) / И.В. Линский, Е.С. Самойлова, Э.Б.

Первомайский, В.В. Голощапов // Український вісник психоневрології. – 2008. – Т. 16, вип. 2. – С. 111-116.

12. Ляпунов Н.А. Технологические и биофармацевтические основы создания пенных препаратов в аэрозольной упаковке антибактериального и противовоспалительного действия: Дисс. … докт. фармац. наук. – Харьков, 1989. – 481 с.
13. Малкин А.Я., Исаев А.И. Реология: концепции, методы, приложения / пер. с англ. – Спб.: ЦОП Профессия. 2010. 560 с.
14. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – 17-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: ООО «Издательство Новая волна», 2017. – С. 157.
15. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
16. Настанова 42-7.1:2005. – Настанови з клінічних досліджень. Лікарські засоби. Дослідження біодоступності та біоеквівалентності / В.Мальцев, М.Ляпунов, В.Чумак та ін. – К.: МОЗ України. – 2005. – 18 с.
17. ОСТ 64-02-003-2002 «Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения»
18. ОСТ 64-492-85. – Средства лекарственные. Допустимые отклонения на промышленное фасование.
19. Приказ Минпромторга России от 14 июля 2013 № 916 «Об утверждении правил надлежащей производственной практики»
20. Резуненко Ю.К., Прокопов В.О., Жуков В.І. Вплив поліолів на основі гліцеролу, етилені пропіленгліколю на процеси вільнорадикального окислення в організмі щурів // Мир медицины и биологии. 2012. №2. С.143-154
21. Сакаева, И.В. Современное состояние вопроса классификации и стандартизации лекарственных форм в Российской Федерации / И.В. Сакаева, А.Н. Васильев, Н.Д. Бунятян и др. // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. - 2012. - № 3. - С. 52-55.

22. Терешкина, О.И. Информация о безопасности вспомогательных веществ, входящих в лекарственные препараты / О.И. Терешкина, Т.А. Гуськова // Фармация. - 2007. - №6. - С.6-9.
23. Тихонов А.И. Биофармация / А.И. Тихонов, Т.Г. Ярных, И.А. Зупанец, О.С. Данькевич, Е.Е. Богуцкая, Н.В. Бездетно, Ю.Н. Азаренко. – Х.: «НФаУ», 2003. – 240 с.
24. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации: научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / под ред. С. Н. Быковского, И. А. Василенко, Н. Б. Деминой и др. – М.: Изд-во Перо, 2015. - 472 с.
25. Фармацевтический сектор: основы законодательства в Европейском Союзе / Авт.-составители Н.А. Ляпунов, В.А. Усенко, А.Л. Спасокукоцкий, Е.П. Безуглая. – К.: МОРИОН, 2002. – С. 7-65.
26. Харенко, Е.А. Мукоадгезивные лекарственные формы / Е.А. Харенко, Н.И. Ларионова, Н.Б. Демина // Хим.-фарм. журнал. - 2009. - Т.43, №4. - С.21-29.
27. Физическая и коллоидная химия/ Н.Н. Мушкамбаров. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 295 с.
28. 70 тысяч молодых людей ежегодно умирают в России от наркотиков//Interfax.ru: междунар. информ. группа. 2014. 14 янв. URL: http://www.interfax.ru/russia/351424 (дата обращения: 20.08.2016)
29. Alqurshi, A., Amorphous formulation and in vitro performance testing ofinstantly disintegrating buccal tablets for the emergency delivery of naloxone / Alqurshi, A., Kumar, Z., McDonald, R. et al. // Mol Pharm. 2016 May 2;13(5):1688-98. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00096.
30. Aurora R., et al, ‘Development of nasal delivery systems: a review’ / Drug Del. Tech. 2(7), 70-73 (2002)
31. Avetian G.K., Fiuty P., Mazzella S., Koppa D., Heye V., Hebbar P. Use of naloxone nasal spray 4 mg in the community setting: a survey of use by community organizations// Curr Med Res Opin. 2017 Jun 7:1-4. doi: 10.1080/03007995.2017.1334637.

32. Bagel, S. Extension of in-use stability of preservative-free nasalia / Bagel S, Wiedemann B. //. Europ J Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2004, (57): 353–358.
33. Bailey, A. Naloxone for opioid overdose prevention: pharmacists role in community based practice settings / Bailey, A., Wermeling, D. // Ann Pharmacother 2014, 48: 601–606.
34. Bailey, J. The under recognized toll of prescription opioid abuse on young children / Bailey, J., Campagna, E. and Dart, R. // Ann Emerg Med 2009, 53: 419–424.
35. Barton, E. Efficacy of intranasal naloxone as a needleless alternative for treatment of opioid overdose in the prehospital setting / Barton, E., Colwell, C., Wolfe, T., Fosnocht, D., Gravitz, C., Bryan, T. et al. // J Emerg Med 2005, 29: 265–271.
36. Barton, E. Intranasal administration of naloxone by paramedics / Ramos, J., Colwell, C., Benson, J., Baily, J. and Dunn, W. // Prehosp Emerg Care 2002, 6: 54–58.
37. Beletsky, L. Prevention of fatal opioid overdose. / Beletsky, L., Rich, J.D., Walley, A.Y. // JAMA308, 2012, 1863–1864.
38. Belz, D. Naloxone use in a tiered-response emergency medical services system / Belz, D., Lieb, J., Rea, T., Eisenberg, M.S. // Prehosp. Emerg. Care 10, 2006, 468–471.
39. Bond, G. The growing impact of pediatric pharmaceutical poisoning / Bond, G., Woodward, R. and Ho, M. // J Pediatr 2012, 160: 265–270.
40. British Pharmacopoeia 2009. – Volume III. – Naloxone Injection. – 2 p.
41. Brunton, L., Chabner, B., Knollman, B. (Eds.). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw Hill, New York.CDC, 2012.
42. Buajordet, I. Adverse events after naloxone treatment of episodes of suspected acute opioid overdose / Buajordet, I., Næss, A., Jacobsen, D. and Brørs, O. // Eur J Emerg Med 2004, 11: 19–23.
43. Bunn, T. and Slavova, S. (2012) Drug overdose morbidity and mortality in Kentucky, 2000–2010. Kentucky Injury and Prevention Center.
44. Calcaterra, S., Glanz, J., Binswanger, I.A., 2013. National trends in pharmaceutical opioid related overdose deaths compared to other substance related overdose deaths: 1999–2009. Drug Alcohol Depend. 131, 263–270.

45. Cantwell, K. The relationship between naloxone dose and key patient variables in the treatment of non-fatal heroin overdose in the pre-hospital setting / Cantwell, K., Dietze, P. and Flander, L. // Resuscitation 2005, 65: 315–319.
46. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products. London: European Medicines Agency; 2006.
47. Consumer Product Safety Ccommission 16 CFR Part 1700, CPSC Docket No. 2012–0005, Requirements for child-resistant packaging: Products containing imidazolines equivalent to 0.08 milligrams or more. December 12, 2012.
48. Cordray S., Harjo J.B., Miner L. Comparison of intranasal hypertonic dead sea saline spray and intranasal aqueous triamcinolone spray in seasonal allergic rhinitis // Ear Nose Throat J. 2005 Jul;84(7):426-30.
49. Costantino, H. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects / Costantino, H., Illum, L., Brandt, G., Johnson, P. and Quay, S. // Int J Pharm 2007, 337: 1–24.
50. CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr. – Guideline on the investigation of bioequivalence, 2010.
51. CPMP/QWP/122/02 Rev 1 corr. – Guideline on stability testing: stability testing of existing active substances and related finished products, 2003.
52. CPMP/ICH/367/96 (ICH Topic Q6A). – Note for Guidance Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, 2000.
53. Dale, O. Intranasal midazolam: a comparison of two delivery devices in human volunteers / Dale, O., Nilsen, T., Loftsson, T., Tonnesen, H.H., Klepstad, P., Kaasa, S., Holand, T., Djupesland, P.G. // J. Pharm. Pharmacol. 2006, 58, 1311–1318.
54. Davis S., et al, ‘Absorption enhancers for nasal drug delivery’, Clin. Pharm., 42(13), 1107-28 (2003)
55. Davis, C. Changing Law from Barrier to Facilitator of Opioid OVerdose Prevention / Davis, C., Webb, D. and Burris, S. // J Law Med Ethics 2013, 41(Suppl. 1): 33–36.

56. Dayal P., et al, ‘Evaluation of different parameters that effect droplet size distribution from nasal sprays using the Malvern Spraytech, J. Pharm. Sci., 93: 1725-1742 (2004).
57. Degenhardt, L. Mortality among regular or dependent users of heroin and other opioids: a systematic review and meta-analysis of cohort studies / Degenhardt, L., Bucello, C., Mathers, B., Briegleb, C., Ali, H., Hickman, M., McLaren, J. // Addiction 2011, 106, 32–51.
58. Djupesland, P.G.. The nasal approach todelivering treatment for brain diseases: an anatomic physiologic, and delivery technology overview / Djupesland, P.G., Messina, J.C., Mahmoud, R.A. // Ther. Deliv. 2014, 5, 709–733.
59. Doe-Simkins, M. Saved by the nose: by stander-administered intranasal naloxone hydrochloride for opioid overdose / Doe-Simkins, M., Walley, A.Y., Epstein, A., Moyer, P. // Am. J. Public Health 2009, 99, 788–791.
60. Dowling, J. Population pharmacokinetics of intravenous, intramuscular, and intranasal naloxone in human volunteers / Dowling, J., Isbister, G., Kirkpatrick, C., Naidoo, D. and Graudins, A. // Ther Drug Monit 2008, 30: 490–496.
61. Dwyer, K. Opioid education and nasal naloxone rescue kits in the emergency department / Dwyer, K., Walley, A.Y., Langlois, B.K., Mitchell, P.M., Nelson, K.P., Cromwell, J., Bernstein, E. // West. J. Emerg. Med. 2015, 16, 381–384.
62. EMEA/CHMP/QWP/396951/2006. – Guideline on Excipients in the Dossier for Application for Marketing Authorisation of a Medicinal Product, 2007.
63. EMEA/CHMP/167068/2004 – ICH (ICH Topic Q8). – Note for Guidance on Pharmaceutical Development, 2006.
64. EMEA-Heath Canada: Joint Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products EMEA/CHMP/QWP/49313/2005
65. European Pharmacopoeia 8.0 ed. 2014. 3162 c.
66. Fagot Ch and Marx D. Intranasal vaccines -a platform technology for an innovative vaccine industry. December 2011, Express Pharma India, access at http://archive. expresspharmaonline.com/20111231/research02.shtml

67. Fareed A., Buchanan-Cummings A.M., Crampton K., Grant A., Drexler K. Reversal of overdose on fentanyl being illicitly sold as heroin with naloxone nasal spray: A case report. // Am J Addict. 2015 Aug;24(5):388-90. doi: 10.1111/ajad.12230.

68. Farina, D. Regulatory aspects of nasal and pulmonary spray drug products/, published in Handbook of non-invasive drug delivery systems, Ed. V.Kulkarni, Elsevier, Oxford, UK, 247-290 (2010).

69. FDA IIG (Inactive Ingredient Guidance), http://accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm

70. Floettmann E., Bui K., Sostek M., Payza K., Eldon M. Pharmacologic Profile of Naloxegol, a Peripherally Acting μ-Opioid Receptor Antagonist, for the Treatment of Opioid-Induced Constipation // J Pharmacol Exp Ther. 2017 May;361(2):280-291. doi: 10.1124/jpet.116.239061

71. Foo M.Y. The influence of spray properties on intranasal deposition / Foo MY, Cheng YS, Su WC, Donovan MD // J Aerosol Med. 2007, 20(4): 495-508

72. Gro D. The COMOD-System – a preservative free drug therapy against glaucoma. 321-328, in Org l/Flammer (Editors): Pharmacotherapie in glaucoma, Bern 2000.

73. Guidance for Industry: Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension, and Spray Drug Products - Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Rockville, MD; 2002.

74. Guideline 3AQ11a. – Specifications and Control Tests on the Finished Product.

75. Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use, 3 January 2013, EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev. 2

76. Guideline on Plastic Immediate Packaging Materials. – CPMP/QWP/4359/03, EMEA/CVMP/205/04. – London, 19 May 2005. – 11 p.

77. Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products. – EMEA/CHMP/QWP/49313/2006 corr. – London, 21 June 2006. – 25 p.

78. Hasegawa, K. Epidemiology of emergency department visits for opioid overdose: A population-based study / Hasegawa, K., Brown, D., Tsugawa, Y and Camargo, C. // Mayo Clin Proc 2014, 89: 461–471.

79. Havens, J. Prevalence of opioid analgesic injection among rural nonmedical opioid analgesic users / Havens, J., Walker, R. and Leukefeld, C. // Drug Alcohol Depend 2007, 87: 98–102.

80. Hertz, S., 2012. Naloxone for Outpatient Use: Data Required to Support an NDA (accessed on 05.30.14.). http://www.fda.gov/downloads/Drugs/NewsEvents/UCM300874.pdf.

81. Hewlett, L. Survey of naloxone legal status in opioid overdose prevention / Hewlett, L. and Wermeling, D. // J Opioid Mgmt 2013, 9: 369–377.

82. Hong J. Allergy to ophthalmic preservatives / Hong J, Bielory L. // Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2009; 9(5):447-453.

83. Human factors engineering—Design of medical devices, ANSI/AAMI HE75, 2009/(R) 2013.

84. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Pharmaceutical Development Q8; Step 4 version, November 2005.

85. Jones, C. Alcohol involvement in opioid pain reliever and benzodiazepine drug abuse – related emergency department visits and drug-related deaths / Jones, C., Paulozzi, L. and Mack, K. – United States, 2010. CDC MMWR 63(40): 881–885.

86. Kalkotwar, RS. EVALUATION AND QUALITY CONTROL OF NASAL SPRAY/ Patil Vidya Bankar, Kalkotwar RS, Patel Ankita, Tathe Swati, Jadhav VB // Journal of Drug Delivery & Therapeutics; 2012, 2(4), 1-4.

87. Kelly, A. Randomised trial of intranasal versus intramuscular naloxone in prehospital treatment for suspected opioid overdose / Kelly, A., Kerr, D., Dietze, P., Patrick, I., Walker, T. and Koutsogiannis, Z. // Med J Aust 2005, 182: 24–27.

88. Kerr, D. Intranasal naloxone for the treatment of suspected heroin overdose / Kerr, D., Dietze, P. and Kelly, A. // Addiction 2008, 103: 379–386.

89. Kerr, D. Randomized controlled trial comparing the effectiveness and safety of intranasal and intramuscular naloxone for the treatment of suspected heroin overdose / Kerr, D., Kelly, A., Dietze, P., Jolley, D. and Barger, B. // Addiction 2009, 104: 2067–2074.

90. Kibbe A.H., (Ed), Handbook of pharmaceutical excipients, 3rd Edition, Am. Pharm. Asso., 392-398, 442-444 (2000).
91. Knoester, P.D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam administered as a concentrated intranasal spray. A study in healthy volunteers / Knoester, P.D., Jonker, D.M., van der Hoeven, R.T.M. et al. // Br. J. Clin. Pharmacol. 2002, 53, 501–507.
92. Law S.L., et al, 'Preparation of desmopressin containing liposomes for intranasal delivery', J. Control. Rel., 70: 375-382 (2001).
93. Leary, A.C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intranasal insulin spray (Nasulin) administered to healthy male volunteers: infuence of the nasal cycle / Leary AC, Dowling M, Cussen K, O'Brien J, Stote RM. // J Diabetes Sci Technol. 2008, 2(6): 1054-60.
94. Lenton S.R. A trial of naloxone for peer administration has merit, but will the lawyers let it happen / Lenton S.R., Hargreaves K.M. // Drug and Alcohol Review. – 2000. – Vol. 19. – P. 365-369.
95. Lim D., Melucci J., Rizer M.K., Prier B.E., Weber R.J. Detection of adverse drug events using an electronic trigger tool // Am J Health Syst Pharm. 2016 Sep 1;73(17 Suppl 4):S112-20. doi: 10.2146/ajhp150481.
96. Loimer, N. Nasal administration of naloxone is as effective as the intravenous route in opiate addicts / Loimer, N., Hofmann, P., Chaudhry, H.R. // Int. J. Addict. 1994, 29, 819–827.
97. Longest P. W., Hindle M. Small Airway Absorption and Microdosimetry of Inhaled Corticosteroid Particles after Deposition // Pharm Res. 2017 Oct;34(10):2049-2065. doi: 10.1007/s11095-017-2210-7.Suman, J.D. Validity of *in vitro* tests on aqueous spray pumps as surrogates for nasal deposition / Suman JD, Laube BL, Lin TC, Brouet G, Dalby R. // Pharm Res. 2002;19(1):1-6.
98. Lyon, A., McIntosh, N., 1985. Rectal aminophylline in the management of apnoea of prematurity. Arch. Dis. Child. 60, 38–41. MHRA, 2011. Buccal Midazolam (Buccolam): New Authorised Medicine forPaediatric Use—care Needed when Transferring from Unlicensed Formulations (accessed on 12.2.14.). http://www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/DrugSafetyUpdate/CON131931.

99. Madah-Amiri D., Clausen T., Lobmaier P. Rapid widespread distribution of intranasal naloxone for overdose prevention. // Drug Alcohol Depend. 2017 Apr 1;173:17-23. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2016.12.013.

100. Marx D and Birkhoff M (2011). Multi-Dose Container for Nasal and Ophthalmic Drugs: A Preservative Free Future, Drug Development - A Case Study Based Insight into Modern Strategies, Dr. Chris Rundfeldt (Ed.), ISBN: 978-953-307-257-9, InTech, DOI: 10.5772/27767.

101. Marx D and Birkhoff M. Will the future be preservative free? Manufacturing Chemist Pharma, published 17th May 2013, access at http://www.manufacturingchemist.com/technical/article_page/Will_the_future_be_preservativefree/88155

102. Marx D, Leitz M, Fagot C. Do We Need New Devices for Intranasal Vaccination? Drug Development & Delivery. 2011, 11 (3): 54-59.

103. McDonald R., Lorch U., Woodward J., Bosse B., Dooner H., Mundin G., Smith K., Strang J. Pharmacokinetics of concentrated naloxone nasal spray for opioid overdose reversal: Phase I healthy volunteer study // Addiction. 2017 Nov 16. doi: 10.1111/add.14033.

104. Medizinproduke fur benzalkoniumchlorid-haltige Arzneimittel zur Anwendung in der Nase, A 37489/38186/03 Bonn, Dezember 2003.

105. Merkus, P. Direct access of drugs to the human brain after intranasal drug administration? / Merkus, P., Guchelaar, H.-J., Bosch, D.A., Merkus, F.W. // Neurology 2003, 60, 1669–1671.

106. Merlin M.A., Ariyaprakai N., Arshad F.H. Assessment of the safety and ease of use of the naloxone auto-injector for the reversal of opioid overdose // Open Access Emerg Med. 2015 Jun 8;7:21-4. doi: 10.2147/OAEM.S82133.

107. Merlin, M.A. Intranasal naloxone delivery is an alternative to intravenous naloxone for opioid overdoses / Merlin, M.A., Saybolt, M., Kapitanyan, R., Alter, S.M., Jeges, J., Liu, J., Calabrese, S.,Rynn, K.O., Perritt, R., Pryor 2nd, P.W. // Am. J. Emerg. Med 2010, 28, 296–303.

108. Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension, and Spray Drug Products Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Juny 2002.
109. Neale, J. Naloxone—does over-antagonism matter? Evidence of iatrogenic harm after emergency treatment of heroin/opioid overdose / Neale, J., Strang, J. // Addiction 2015, 110, 1644–1652.
110. Paderni, C. Controlled delivery of naltrexone by an intraoral device: in vivo study on human subjects / Paderni, C., Campisi, G., Schumacher, A., Gottsche, T., Giannola, L.I., De Caro, V., Wolff, A. // Int. J. Pharm. 2013, 452, 128–134.
111. Peyrière, H., Léglise, Y., Rousseau, A., Cartier, C., Gibaja, V., Galland, P., 2013.Necrosis of the intranasal structures and soft palate as a result of heroin snorting: a case series. Subst. Abuse 34, 409–414.
112. Pharmacopeia of the United State. USP 38/ NF 33. 2015.
113. Rech M.A., Barbas B., Chaney W., Greenhalgh E., Turck C. When to Pick the Nose: Out-of-Hospital and Emergency Department Intranasal Administration of Medications // Ann Emerg Med. 2017 Aug;70(2):203-211. doi: 10.1016/ aas.12898.
114. Robertson, T. Intranasal naloxone is a viable alternative to intravenous naloxone for prehospital narcotic overdose / Robertson, T., Hendey, G., Stroh, G. and Shalit, M. // Prehosp Emerg Care 2009, 13: 512–515.
115. Robinson A., Wermeling DP. Intranasal naloxone administration for treatment of opioid overdose // Am J Health Syst Pharm. 2014 Dec 15;71(24):2129-35. doi: 10.2146/ajhp130798.
116. Rosen, L. Trends and geographic patterns in drug-poisoning death rates in the US, 1999–2009 / Rosen, L., Khan, D. and Warner, M. // Am J Prev Med 2013, 45: e19–e25.
117. Rzasa Lynn R, Galinkin JL. Naloxone dosage for opioid reversal: current evidence and clinical implications // Ther Adv Drug Saf. 2018 Jan;9(1):63-88. doi: 10.1177/2042098617744161.

118. Rando, J. Intranasal naloxone administration by police first responders is associated with decreased opioid overdose deaths / Rando, J., Broering, D., Olson, J.E., Marco, C., Evans, S.B. // Am. J. Emerg. Med. 2015, 33, 1201–1204.

119. Schmidt B.L., Gear R.W., Levine J.D. Response of neuropathic trigeminal pain to the combination of low-dose nalbuphine plus naloxone in humans // Neuroscience Letters. – 2003. – Vol. 343, № 2. – P. 144-146.

120. Schwagmeier, R., Alincic, S., Striebel, H., 1998. Midazolam pharmacokinetics following intravenous and buccal administration. Br. J. Clin. Pharmacol. 46,203–206.Standring, S., 2015. Gray's Anatomy. Elsevier Health Sciences, Amsterdam.

121. Shah, N., Lathrop, S., Reichard, R. and Landen, M. (2007) Unintentional drug overdose death trends in New Mexico, USA, 1990–2005: combinations of heroin, cocaine, prescription opioids and alcohol. Addiction 103: 126–136.

122. Shcherbakova N., Tereso G., Spain J., Roose R.J.. Treatment Persistence Among Insured Patients Newly Starting Buprenorphine/Naloxone for Opioid Use Disorder // Ann Pharmacother. 2018 Jan 1:1060028017751913. doi: 10.1177/1060028017751913.

123. Sporer, K. and Kral, A. (2007) Prescription naloxone: a novel approach to heroin overdose prevention. Ann Emerg Med 49: 172–177.

124. Stability testing of new drug substances and products Q1A, ICH harmonized tripartite guideline, 6 February 2003.

125. Strang, J., McDonald, R., Tas, B., Day, E., 2016. Clinical provision of improvised nasal naloxone without experimental testing and without regulatory approval: imaginative shortcut or dangerous bypass of essential safety procedures? Addiction, http://dx.doi.org/10.1111/add.13209.

126. Taylor, D. Buccal midazolam for agitation on psychiatric intensive care wards / Taylor, D., Okocha, C., Paton, C., Smith, S., Connolly, A. // Int. J. Psychiatry Clin. Pract. 2008, 12,309–311.

127. Toblin, R. Mental illness and psychotropic use among prescription drug overdose deaths: a medical examiner chart review / Toblin, R., Paulozzi, L., Logan, J., Hall, A. and Kaplan, J. // J Clin Psychiatry 2010, 71: 491–496.

128. Trows, S. Analytical Challenges and Regulatory Requirements for Nasal Drug Products in Europe and the U.S./ Sabrina Trows, Klaus Wuchner, Rene Spycher and Hartwig Steckel // Pharmaceutics 2014, 6, 195-219.

129. Vanky E., Hellmundt L., Bondesson U., Eksborg S., Lundeberg S. Pharmacokinetics after a single dose of naloxone administered as a nasal spray in healthy volunteers // Acta Anaesthesiol Scand. 2017 Jul;61(6):636-640. doi: 10.1111/aas.12898.

130. Vilke, G. Assessment for deaths in out-of-hospital heroin overdose patients treated with naloxone who refuse transport / Vilke, G., Sloane, C., Smith, A. and Chan, T. // Acad Emerg Med 2003, 10: 893–896.

131. Volkow, N.D. Medication-assisted therapies—tackling the opioid-overdose epidemic / Volkow, N.D., Frieden, T.R., Hyde, P.S., Cha, S.S. // N. Engl. J. Med. 2014, 370,2063–2066.

132. Walley, A. Opioid overdose prevention with intranasal naloxone among people who take methadone / Walley, A., Doe-Simkins, M., Quinn, E., Pierce, C., Xuan, Z. and Ozonoff, A. // J Sub Abuse Treat 2013a, 44: 241–247.

133. Walley, A. Opioid overdose rates and implementation of overdose education and nasal naloxone distribution in Massachusetts: interrupted time series analysis / Walley, A., Xuan, Z., Hackman, H., Quinn, E., Doe-Simkins, M., Sorensen, A. et al. // BMJ 2013b, 346: f174.

134. Warner, M., Chen, L., Makuc, D., Anderson, R. and Miniño, A. (2011) Drug poisoning deaths in the DP Wermeling http://taw.sagepub.com 31 United States, 1980–2008. NCHS data brief, no. 81. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics.

135. Washington N., et al, 'Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers', Int. J. Pharm. 198:139-146 (2000).

136. Weber, J.M. Can nebulized naloxone be used safely and effectively by emergency medical services for suspected opioid overdose? / Weber, J.M., Tataris, K.L., Hoffman, J.D., Aks, S.E., Mycyk, M.B. // Prehosp. Emerg. Care 2012, 16, 289–292.

137. Weiner S.G., Mitchell P.M., Temin E.S., Langlois B.K., Dyer K.S. Use of Intranasal Naloxone by Basic Life Support Providers // Prehosp Emerg Care. 2017 May-Jun;21(3):322-326. doi: 10.1080/10903127.2017.1282562.

138. Wermeling D.P. Review of naloxone safety for opioid overdose: practical considerations for new technology and expanded public access // Ther Adv Drug Saf. 2015 Feb;6(1):20-31. doi: 10.1177/2042098614564776.

139. Wermeling, D. (2012) A response to the opioid overdose epidemic: naloxone nasal spray. Drug Del Trans Res 3: 63–74.

140. Wheeler, E. Community-based opioid overdose prevention programs providing naloxone – United States, 2010 / Wheeler, E., Davidson, P. and Jones, T. // MMWR 2012, 61(06): 101–105.

141. Wunsch, M. Opioid deaths in rural Virginia: A description of the high prevalence of accidental fatalities involving prescribed medications / Wunsch, M., Nakamoto, K., Behonick, G. and Massello, W. // Am J Addict 2009, 18: 5–14.

142. World Health Organization: http://www.who.int. URL: http://www.who.int/substance_abuse/information-sheet/en/

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Патент на изобретение

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2572217

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ В ВИДЕ НАЗАЛЬНОГО СПРЕЯ НА ОСНОВЕ НАЛОКСОНА ГИДРОХЛОРИДА И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

Патентообладатель(ли): *Российская Федерация, от имени которой выступает Федеральное государственное казенное учреждение "Войсковая часть 68240" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2013146906

Приоритет изобретения 21 октября 2013 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 02 декабря 2015 г.

Срок действия патента истекает 21 октября 2033 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 572 217** (13) **C2**

(51) МПК
A61K 31/485 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61K 9/12 (2006.01)
A61P 25/36 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2013146906/15, 21.10.2013**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.10.2013

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **21.10.2013**

(43) Дата публикации заявки: **27.04.2015** Бюл. № 12

(45) Опубликовано: **27.12.2015** Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 00/62757 A1, 26.10.2000. WO 82/03768 A1, 11.11.1982. RU 2344822 C2, 27.01.2009. CN 101057830 A, 24.10.2007. CN 101036651 A, 19.09.2007.**

Адрес для переписки:
101000, Москва, Главпочтамт, а/я 875, Войсковая часть 68240-Б

(72) Автор(ы):
Бариев Эдуард Альфитович (RU),
Бубело Владимир Дмитриевич (RU),
Полковникова Елена Викторовна (RU),
Скорняков Александр Витальевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Российская Федерация, от имени которой выступает Федеральное государственное казенное учреждение "Войсковая часть 68240" (RU)

RU 2572217 C2

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ В ВИДЕ НАЗАЛЬНОГО СПРЕЯ НА ОСНОВЕ НАЛОКСОНА ГИДРОХЛОРИДА И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к получению спрея назального, содержащего налоксона гидрохлорид, и может быть использовано в качестве антидота при тяжелой интоксикации опиоидами. Фармацевтическая композиция в виде назального спрея содержит в качестве активного компонента налоксона гидрохлорид и вспомогательные вещества: пропиленгликоль, макрогол 400, полоксамер 407, кислоты лимонной моногидрат и воду при определенном соотношении ингредиентов. Также описан способ получения фармацевтической композиции. Полученный препарат обеспечивает необходимое качество, его соответствие требованиям ГФ XII изд. и срок годности более двух лет. 2 н. п. ф-лы, 3 табл.

RU 2572217 C2

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Акт о внедрении результатов научных достижений

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель генерального директора
ОАО «Мосхимфармпрепараты»
им. Н.А. Семашко»
_____В.Д. Бубело
« 14 » ноября 2016г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных достижений

Мы, ниже подписавшиеся, комиссия в составе: Полковникова Е.В., Дмитренко И.О., Бариев Э.А. составили настоящий акт о том, что наше подразделение: Центральная лаборатория использует в производственном процессе с «14» ноября 2016 г. следующее предложение: получение назального спрея системного действия. На данном примере раскрываются способы получения лекарственных форм в виде назального спрея, а также методы изучения технологических характеристик полученного препарата. Все результаты эксперимента были получены в ходе экспериментальных исследований в рамках диссертационной работы: «Разработка состава и технологии производства лекарственной формы налоксона гидрохлорида в виде спрея».

На основе полученных результатов был предложен проект фармакопейной статьи предприятия «Налоксон, спрей назальный», получен патент на изобретение № 2572217 от 02.12.2015 «Фармацевтическая композиция в виде назального спрея на основе налоксона гидрохлорида и способ её получения».

Авторы предложения:

Полковникова Елена Викторовна – начальник Центральной лаборатории ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко»;

Дмитренко Ирина Олеговна – заместитель начальника Центральной лаборатории ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко»;

Бариев Эдуард Альфитович – начальник отдела фармацевтических технологий ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко».

Начальник Центральной лаборатории (ЦЛ) Е.В. Полковникова

Заместитель начальника ЦЛ И.О. Дмитренко

Начальник отдела фармацевтических технологий Э.А. Бариев

УТВЕРЖДАЮ

Проректор учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им.
И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
к.ф.н. Лаптинова Т.М.

№ 09/2017
«01» 09 2017 г.

«04» 09 2017 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ
результатов научных достижений

Мы, ниже подписавшиеся, комиссия в составе: профессор, д.ф.н. Краснюк И.И., профессор, д.ф.н. Дёмина Н. Б., доцент, к.ф.н. Бардаков А.И, доцент Козлова Ж.М..
Составили настоящий акт о том, что наше подразделение кафедра фармацевтической технологии образовательного департамента Института фармации и трансляционной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

(наименование подразделения и учреждения)

используют в повседневной работе с «1» сентября 2017 г.

следующее предложение: результаты научно-исследовательской работы по теме «РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НАЛОКСОНА ГИДРОХЛОРИДА В ВИДЕ СПРЕЯ» в лекционном курсе и лабораторном практикуме студентов по дисциплине «Фармацевтическая технология»» по теме: «Изучение аэрозольных лекарственных форм» по теме НИР совершенствование образовательной технологии додипломного и последипломного фармацевтического образования

(название темы НИР подразделения, подавшего предложение для внедрения)

авторы предложения: аспирант Бариев Э.А.
Кафедра фармацевтической технологии образовательного департамента Института фармации и трансляционной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Профессор, д.ф.н. _____ Краснюк И.И.

Профессор, д.ф.н. _____ Дёмина Н. Б.

Доцент, к.ф.н. _____ Бардаков А.И.

Доцент, к.ф.н. _____ Козлова Ж.М.

Аспирант _____ Бариев Э.А.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Проект нормативного документа на препарат

ПРОЕКТ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации «____»_____ 20___ г.

Открытое акционерное общество «Московское производственное химико-фармацевтическое объединение им. Н.А. Семашко»
(ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко»)
115172, г. Москва, ул. Б. Каменщики, д. 9

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

_____(номер)

Налоксон, спрей назальный
торговое наименование лекарственного препарата
Налоксона гидрохлорид
международное непатентованное или химическое наименование
спрей назальный 0,672 мг/доза
лекарственная форма, дозировка

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ОАО «Мосхимфармпрепараты» имени Н.А. Семашко, Россия

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)
ОАО «Мосхимфармпрепараты» имени Н.А. Семашко, Россия

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)
ОАО «Мосхимфармпрепараты» имени Н.А. Семашко, Россия

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА
ОАО «Мосхимфармпрепараты» имени Н.А. Семашко, Россия

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Лабораторный регламент на производство препарата «Налоксон спрей назальный»

ОТКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«Московское производственное химико-фармацевтическое объединение имени Н.А. Семашко
/ОАО «МОСХИМФАРМПРЕПАРАТЫ» ИМ.Н.А.СЕМАШКО»/

Для служебного пользования
Экз. №

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель генерального директора
ОАО «Мосхимфармпрепараты»
имени Н.А. Семашко»

_____ В.Д. Бубело
«__» _____ 2016 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ
на производство препарата Налоксон спрей назальный
(150 доз)

ЛР 00480359-2-ОФТ-12

Москва 2016

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

ГП «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ»
(ГП «ГНЦЛС»)

«УТВЕРЖДАЮ»
И.о. директора ГП «ГНЦЛС»

_____ Бутова М.Э.
«28» 10 2011 г.

О Т Ч Е Т

о сравнительном исследовании фармакокинетики препарата

Налоксон спрей назальный

(заявитель и производитель ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко»)

и зарегистрированного препарата

Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/мл

(АО «Варшавский фармацевтический завод Польфа», Польша)

Руководитель
фармакокинетического раздела работ –
ведущий научный сотрудник
методологической группы фармакокинетики
канд. биол. наук Либина В.В.

Харьков – 2011

Выдержка из отчета:

«Фармакокинетику препарата *Налоксон спрей назальный* (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко») исследовали при однократном интраназальном введении кроликам в диапазоне доз 0,6÷1,8 мг/кг по показателям концентрации налоксона в плазме крови. Фармакокинетику референтного препарата *Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/мл* («Варшавский фармацевтический завод Польфа АО», Польша) изучали при однократном внутривенном и внутримышечном введении кроликам в дозе 0,6 мг/кг.

2.2. Результаты исследования

Уровень концентраций налоксона в плазме крови кроликов после однократного внутривенного введения препарата Налоксон раствор для инъекций в дозе 0,6 мг/кг представлены в табл. 2.9, усредненная фармакокинетическая кривая, отражающая динамическое изменение уровня налоксона – на рис. 2.2, репрезентативные хроматограммы – на рис. П20-П28.

Таблица 2.9

Концентрация налоксона в плазме крови кроликов
после однократного внутривенного введения препарата
Налоксон раствор для инъекций в дозе 0,6 мг/кг

Концентрация налоксона (нг/мл) через .... минут после введения препарата										
№	**0**	**2**	**5**	**10**	**15**	**30**	**45**	**60**	**90**	**120**
1	0	200,46	151,81	138,01	100,11	104,85	43,65	43,66	37,78	9,21
2	0	179,78	121,31	88,42	71,92	46,58	30,75	27,88	8,95	8,49
3	0	226,89	147,11	109,30	83,89	52,70	30,63	19,52	11,43	7,21
4	0	172,09	113,94	103,72	60,37	41,83	28,88	22,04	18,52	13,98
5	0	163,75	121,84	76,82	66,36	46,66	27,46	27,42	15,97	0,00
Mean	0	**188,59**	**131,20**	**103,25**	**76,53**	**58,52**	**32,27**	**28,10**	**18,53**	**7,78**
S.D.	-	25,37	17,04	23,26	15,78	26,18	6,50	9,40	11,39	5,04
S.E.	-	11,35	7,62	10,40	7,06	11,71	2,91	4,20	5,09	2,26
C.V., %	-	13,45	12,98	22,53	20,62	44,74	20,15	33,43	61,48	64,87

При внутривенном введении раствор налоксона для инъекций через 2 мин средняя концентрация налоксона составляет 188,59 нг/мл. Далее в течение 20 мин наблюдается быстрое снижение его концентрации, а через 120 мин в плазме обнаруживаются следовые количества вещества. Проведенный анализ показал, что снижение концентрации налоксона носит двухфазный (двухчастевой) характер.

Анализ параметров фармакокинетики (табл. 2.12) показал, что несмотря на значительный начальный уровень налоксона (C_0 = 240,20 нг/мл), время его

пребывание в крови непродолжительно: MRT = 32,84 мин, $T_{1/2}$ = 31,83 мин. Налоксон быстро выводится из организма: Cl_T = 110,61 мл/мин·кг, K_{el} = 0,0218 мин$^{-1}$.

Результаты определения концентрации налоксона при внутримышечном введении представлены в табл. 2.10, усредненная фармакокинетическая кривая – на рис. 2.2, фармакокинетические параметры – в табл. 2.12.

Таблица 2.10

Концентрация налоксона в плазме крови кроликов
после однократного внутримышечного введения препарата
Налоксон раствор для инъекций в дозе 0,6 мг/кг

Концентрация налоксона (нг/мл) через .... мин. после введения препарата										
№	**0**	**2**	**5**	**10**	**15**	**30**	**45**	**60**	**90**	**120**
1	0	65,61	74,98	49,32	45,28	32,50	26,63	22,14	19,87	-
2	0	43,14	55,03	51,20	58,52	42,93	32,50	31,89	26,13	-
3	0	57,96	92,61	100,69	86,43	64,91	53,56	53,43-	43,83	18,25
4	0	85,60	127,05	85,94	82,09	79,25	53,73	-	40,99	31,43
5	0	27,65	44,28	61,26	67,63	66,40	67,85	51,19	32,55	21,73
Mean		**55,99**	**78,79**	**69,68**	**67,99**	**57,20**	**46,85**	**39,66**	**32,67**	**23,80**
S.D.		**22,03**	**32,75**	**22,66**	**16,91**	**19,00**	**16,94**	**15,17**	**10,00**	**6,83**
S.E.		9,85	14,65	10,13	7,56	8,50	7,58	7,58	4,47	3,94
C.V., %		**39,35**	**41,56**	**32,51**	**24,88**	**33,22**	**36,15**	**38,24**	**30,62**	**28,68**

Как видно из приведенных данных, при внутримышечном введении концентрация налоксона нарастает в течение первых 5 мин и достигает в данной точке C_{max}, равной 78,79 нг/мл. В дальнейшем наблюдается двухчастевое снижение концентрации вещества: к 60 мин его уровень снижается в 2 раза (до 39,66 нг/мл), а, начиная с этого момента, наблюдается более продолжительная вторая фаза элиминации. К 120 мин после инъекции концентрация налоксона в крови составляет 30 % от его максимально регистрируемого уровня.

Фармакокинетические константы, характеризующие скорость выведения налоксона, при внутримышечном введении значительно отличаются от соответствующих параметров при внутривенном введении: MRT = 48,83 мин, $T_{1/2}$ = 70,91 мин, Cl_T = 77,84 мл/мин·кг, K_{el} = 0,0098 мин$^{-1}$ (табл. 2.12). Абсолютная биодоступность налоксона при внутримышечном введении очень высокая 101,71 %.

Полученные результаты изучения фармакокинетики налоксона при однократном внутривенном и внутримышечном введении кроликам коррелируют с данными литературы о быстром выведении препарата из организма [20,29,30].

Уровни концентраций и фармакокинетические параметры налоксона при интраназальном введении исследуемого препарата Налоксон спрей назальный

представлены на рис. 2.2 и в табл. 2.11 и 2.12, а репрезентативные хроматограммы – на рис. П29-П38.

Таблица 2.11

Концентрация налоксона в плазме крови кроликов
после однократного интраназального введения препарата
Налоксон спрей назальный в различных дозах

Концентрация налоксона (нг/мл) через ……. минут после введения препарата										
№	**0**	**2**	**5**	**10**	**15**	**30**	**45**	**60**	**90**	**120**
Доза 0,6 мг/кг										
Mean	0	**33,57**	**34,87**	**30,37**	**29,47**	**18,99**	**12,29**	**16,52**	**11,55**	**-**
Доза 1,2 мг/кг										
1	0	78,43	87,87	97,85	77,80	58,16	30,08	18,60	12,95	11,05
2	0	72,75	108,35	104,14	81,07	52,75	38,82	22,15	9,98	0,00
3	0	46,04	49,95	-	57,46	36,96	17,65	12,13	7,56	0,00
4	0	72,44	80,61	67,75	75,13	45,45	23,81	15,69	11,34	9,23
5	0	15,46	21,40	30,13	31,06	21,53	20,60	12,407	10,51	6,43
Mean	0	**57,02**	**69,64**	**74,97**	**64,50**	**42,97**	**26,19**	**16,20**	**10,47**	**5,34**
S.D.		26,42	34,15	33,85	20,81	14,39	8,43	4,25	1,98	5,15
S.E.		11,84	15,31	16,92	9,33	6,45	3,78	1,91	0,89	2,31
C.V.,%		46,33	49,05	45,15	32,26	33,49	32,20	26,26	18,88	96,34
Доза 1,8 мг/кг										
1	0	32,98	64,52	55,90	53,01	32,99	15,60	10,85	5,12	3,06
2	0	13,20	31,24	64,38	59,03	22,68	15,12	8,51	8,13	0,00
3	0	93,03	127,98	129,85	89,09	59,14	22,03	23,47	10,82	5,64
4	0	45,21	91,29	73,07	77,96	40,51	24,22	17,78	12,93	10,54
5	0	131,92	126,67	113,85	118,98	56,88	30,76	20,31	11,90	8,88
Mean	0	**63,27**	**88,34**	**87,41**	**79,61**	**42,44**	**21,55**	**16,18**	**9,78**	**5,62**
S.D.		48,35	41,46	32,52	26,33	15,58	6,50	6,32	3,16	4,27
S.E.		21,67	18,59	14,58	11,80	6,98	2,91	2,84	1,42	1,91
C.V.,%		76,41	46,94	37,20	33,08	36,71	30,16	39,08	32,31	75,95

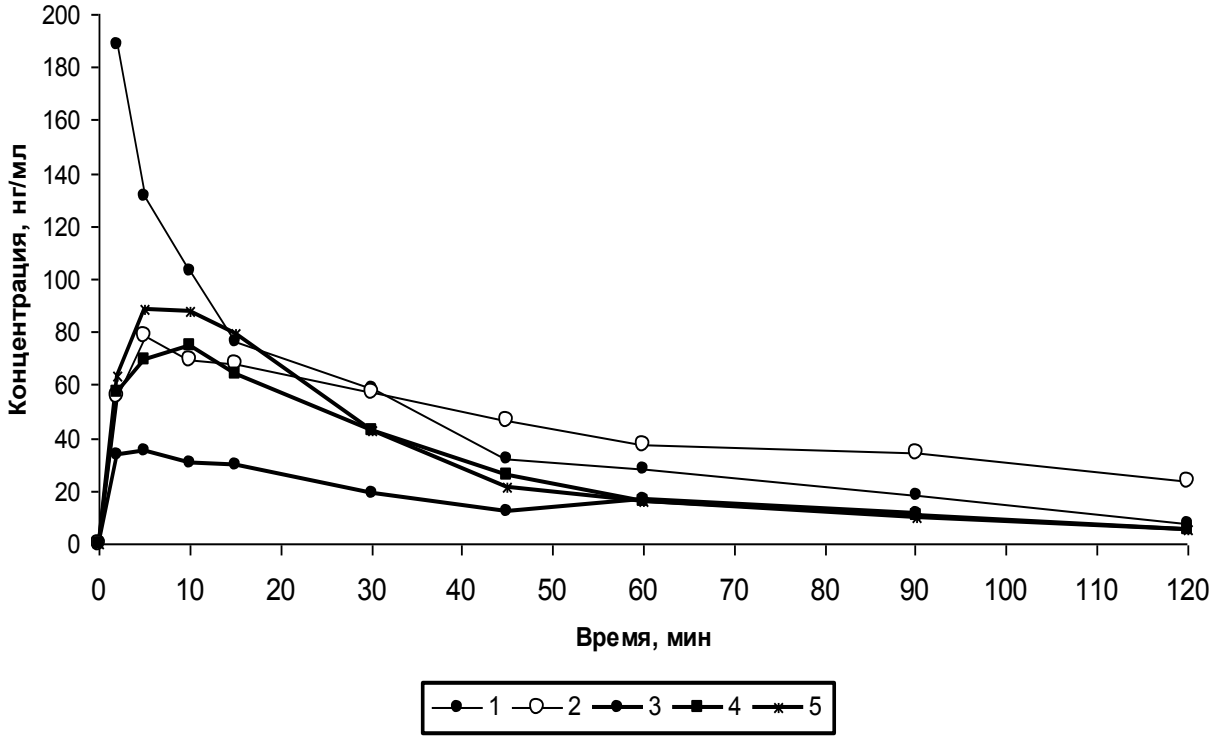


Рис. 2.2. Фармакокинетические кривые налоксона после внутривенного (1) и внутримышечного (2) введения препарата Налоксон раствор для инъекций в дозе 0,6 мг/кг и интраназального введения препарата Налоксон спрей назальный 1% в дозах 0,6 мг/кг (3); 1,2 мг/кг (4) и 1,8 мг/кг (5).

Как видно из приведенных данных, при интраназальном введении пик концентрации налоксона в плазме регистрируется через 5-10 мин и составляет 34,87 нг/мл; 74,97 нг/мл и 88,34 нг/мл соответственно для дозы 0,6 мг/кг, 1,2 мг/кг и 1,8 мг/кг.

Через 30 мин концентрация налоксона снижается почти в 2 раза от максимальных значений, а через 120 мин в крови остается 5-7 % налоксона. При интраназальном введении кроликам препарата в дозе 0,6 мг/кг фармакокинетическая кривая характеризуется низким уровнем налоксона в крови. При введении препарата в дозах 1,2 мг/кг и 1,8 мг/кг концентрации налоксона в плазме сопоставимы с его уровнем при внутримышечном введении, а после достижения максимальной концентрации – при внутривенном введении.

Фармакокинетические кривые налоксона при интраназальном введении имеют аналогичный профиль, свидетельствующий о быстром всасывании налоксона в системный кровоток с последующей достаточно быстрой элиминацией из плазмы крови животного.

Основные фармакокинетические параметры, представленные в табл. 2.12, свидетельствуют, что при интраназальном введении препарата налоксон очень быстро и с одинаковой скоростью для всех доз всасывается в кровь (T_{max}, $C_{max}/AUC_{0\rightarrow t}$). Скорость абсорбции налоксона при интраназальном введении выше, чем при внутримышечном примерно в 1,5 раза. Налоксон при интраназальном введении также, как и при внутривенном введении, непродолжительно циркулирует в крови и быстро элиминирует: MRT составляет 36,54 мин; 34,56 мин и 32,04 мин; $T_{1/2}$ – 70,91 мин, 52,85 мин и 28,91 мин соответственно для дозы 0,6 мг/кг, 1,2мг/кг и 1,8 мг/кг. Абсолютная биодоступность налоксона имеет тенденцию к снижению при введении максимальной из тестируемых доз и составляет соответственно 32,48 %, 31,22 % и 22,16 % (в пересчете на дозу 0,6 мг/кг), или 32,48 %, 62,43 % и 66,47 % с учетом введенной дозы. Таким образом, абсолютная биодоступность налоксона при интраназальном введении кроликам составляет около 30 %.

Таблица 2.12

Основные фармакокинетические параметры налоксона при внутривенном, внутримышечном и интраназальном введении кроликам

Фармакокинетические константы	**Путь введения (дозы, мг/кг)**				
	в/в (0,6)	**в/м (0,6)**	**и/н (0,6)**	**и/н (1,2)**	**и/н (1,8)**
C_{max} (C_0), нг/мл	240,20	78,79	34,87	74,97	88,34
C_{max}/D	–	131,32	58,12	62,48	49,07
T_{max}, мин	–	5	5	10	5
K_{el}, мин$^{-1}$	0,0218	0,0098	0,0131	0,0240	0,0178
$T_{1/2}$, мин	31,83	70,91	52,85	28,91	39,02
MRT, мин	32,84	48,83	36,54	34,56	32,04
Cl_T, мл/мин кг	110,61	77,84	233,95	346,86	478,39
$AUC_{0\rightarrow t}$, нг мин/мл	5184,73	5273,64	1684,11	3236,84	3446,29
$AUC_{0\rightarrow\infty}$, нг мин/мл	5541,99	7708,38	2564,67	3459,58	3762,25
$C_{max}/AUC_{0\rightarrow t}$, мин$^{-1}$	–	0,0149	0,0207	0,0232	0,0256
f, % ($AUC_{0\rightarrow t}$ / D)	100	101,71	32,48	31,22	22,16
f, % ($AUC_{0\rightarrow t}$)	100	101,71	32,48	62,43	66,47

Для оценки линейности фармакокинетики налоксона при изменении дозы построены графики зависимости максимальной концентрации от дозы и площади под кривой «концентрация-время» от дозы (рис. 2.3 и 2.4). Как видно из приведенных графиков, на участке доз 0÷1,2 нг/мл величины C_{max} и AUC возрастают пропорционально дозе. При дальнейшем повышении дозы увеличение значений C_{max} и AUC идет более медленно. Возможно, у кроликов наблюдается процесс насыщения всасывания налоксона при повышении интраназальных доз

более 1,2 мг/кг.

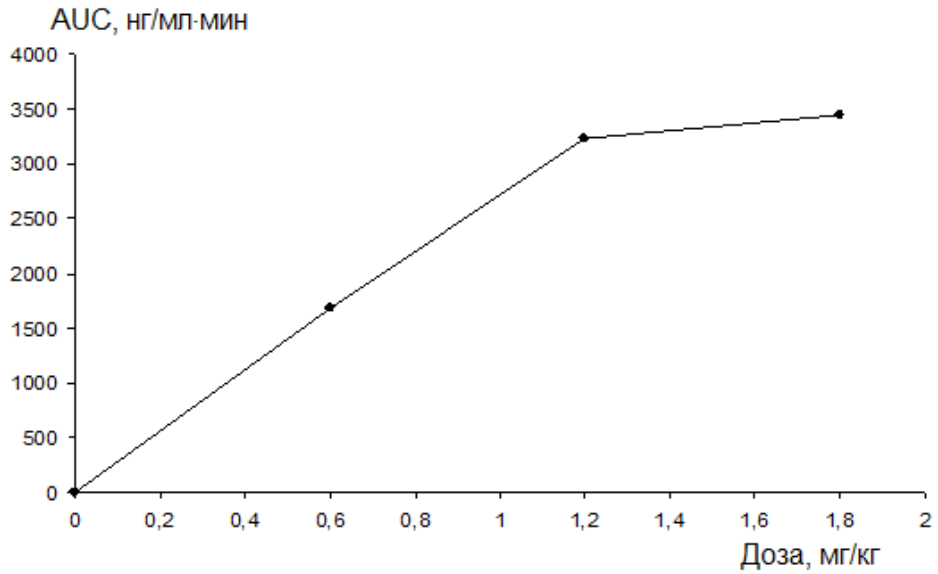


Рис. 2.3. Зависимость площади под фармакокинетической кривой от дозы налоксона при интраназальном введении препарата Налоксон спрей назальный.

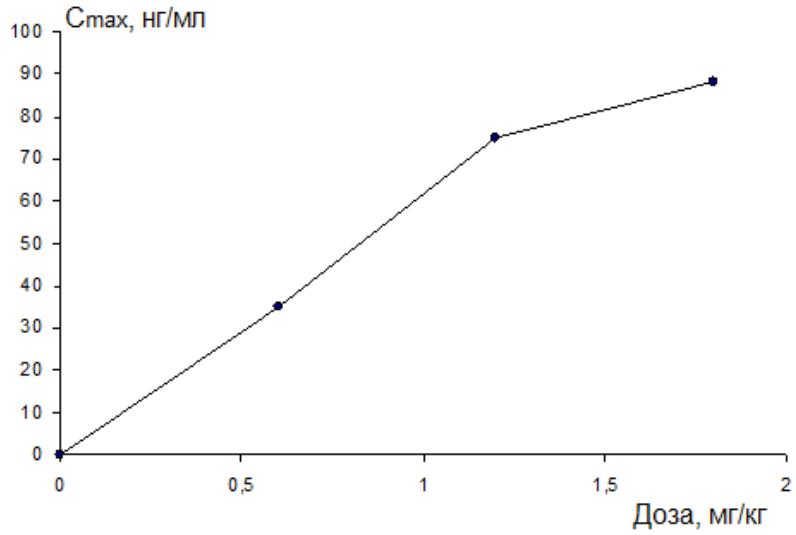


Рис. 2.4. Зависимость максимальной концентрации от дозы налоксона при интраназальном введении препарата Налоксон спрей назальный.

В целом, анализ полученных данных свидетельствует, что фармакокинетика налоксона характеризуется быстрым всасыванием его в кровь с последующей быстрой элиминацией.

Абсолютная биодоступность налоксона при интраназальном введении кроликам составляет около 30 % (при введении равных доз) и пропорционально возрастает при двукратном увеличении дозы препарата.

Таким образом, учитывая безопасность, простоту и удобство интраназального способа введения, а также полученные данные о фармакокинетике исследуемой лекарственной формы налоксона можно

заключить, что разработанный препарат *Налоксон спрей назальный* (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко») может рассматриваться как альтернатива инъекционным препаратам налоксона при необходимости неотложного доврачебного купирования острых интоксикаций опиатами и может быть рекомендован для доклинических фармакологических и токсикологических исследований.»

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

ГП «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ» (ГП «ГНЦЛС»)

«УТВЕРЖДАЮ»
И.о. директора ГП «ГНЦЛС»
_____ Бутова М.Э.
«___» _____ 2011 г.

О Т Ч Е Т

о доклиническом исследовании

общетоксического действия препарата

НАЛОКСОН спрей назальный

(заявитель и производитель

ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко», РФ)

Руководитель
токсикологического раздела работ –

зав. лабораторией лекарственной и
промышленной токсикологии,
канд. биол. наук Никитина Н.С.

Харьков – 2011

Выдержка из отчета: «**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА НАЛОКСОН СПРЕЙ НАЗАЛЬНЫЙ**
(*Экспериментальная часть*)

1. ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ

1.1. Материалы и методы исследований

При проведении экспериментальных исследований руководствовались методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ [13,14].

Исследования проведены на крысах линии Вистар обоего пола с исходной массой тела 270-280 г (самцы) и 250-260 г (самки). Экспериментальные группы животных насчитывали по 5 самцов и 5 самок. Всего в эксперименте использовано 10 крыс.

Животные были получены из питомника лабораторных животных ЧП «Дали-2001» (г. Киев). В период карантина и во время эксперимента животные находились в виварии при температуре воздуха 18-20 ^{o}C, относительной влажности 50-60 %, естественном световом режиме «день-ночь», в стандартных пластиковых клетках, на стандартном пищевом рационе [12-14].

Исследуемый препарат изучали при назальном введении, которое осуществляли с помощью дозирующей насадки-распылителя дробно (10 введений по 1,0 мг по налоксона гидрохлориду с интервалом 45 мин между введениями). Суммарная доза препарата по налоксона гидрохлориду в среднем составляла 36,6 мг/кг для самцов и 39,4 мг/кг для самок.

Критериями суждения о токсичности исследуемого препарата служили клиническая картина интоксикации, выживаемость животных, динамика массы тела крыс (исходные данные, 3, 7, 14 суток). Оценку влияния препарата на функциональное состояние печени проводили в конце эксперимента по ряду биохимических показателей крови. Все биохимические исследования проведены при использовании диагностических наборов фирмы «Филисит Диагностика» (Украина). Содержание общего белка в крови определяли биуретовым методом, альбумин – по реакции с бромкрезоловым зеленым, показатель тимоловой пробы – по методу осадочных проб [15].

Наблюдение за животными проводили в течение 2-х недель. На 14-е сутки после воздействия препарата крыс подвергали эвтаназии методом щадящей декапитации. При вскрытии по Roe [16] была проведена макроскопическая оценка состояния внутренних органов и определена их относительная масса.

Все полученные экспериментальные данные обрабатывали методом вариационной статистики. В отчете принят уровень значимости $p \leq 0,05$. Вычисление статистической значимости в случае номинальных переменных проводили, используя однофакторный дисперсионный анализ и дисперсионный анализ для экспериментов с повторным измерением. Проверку гипотезы о равенстве двух средних проводили с помощью t-критерия Стьюдента для связанных выборок [17, 18].

1.2. Результаты исследований

В результате проведенных исследований установлено, что после каждого введения у животных отмечалось снижение двигательной активности, заторможенность в течение 5-10 мин, затем животные начинали передвигаться по клетке, умываться, пить воду, есть корм. В дальнейшем состояние и поведение крыс не отличалось от состояния и поведения интактных животных.

Гибели животных, а также отклонений в их общем состоянии и поведении в течение периода наблюдений не отмечалось (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Параметры токсичности исследуемого препарата

Препарат	**Пол животных**	**Количество животных**	**Доза, мг/кг (по налоксона гидрохлориду)**	**Летальность, %**
Налоксон спрей	Самцы	5	36,6	0
	Самки	5	39,4	0

Влияние исследуемого препарата на динамику массы тела крыс представлено в таблице 1.2. Анализ полученных данных показал, что после острого воздействия исследуемого препарата, начиная с 7-х суток, было отмечено достоверное увеличение массы тела экспериментальных животных по сравнению с исходными данными.

Таблица 1.2

Динамика массы тела крыс при остром воздействии исследуемого препарата

Препарат	**Период наблюдения, сутки**	**Масса тела крыс, г**	
		самцы	**самки**
Налоксон спрей	0	273,0 ± 2,00	254,0 ± 1,87
	3	285,0 ± 5,00	258,0 ± 1,22
	7	283,0 ± 3,39[1]	260,0 ± 1,58[1]
	14	309,0 ± 4,85[1]	262,0 ± 2,55[1]

Примечание: [1] – $p \leq 0,05$ относительно исходных данных.

Результаты биохимических исследований (табл. 1.3) показали, что препарат в исследованных дозах не влиял на функциональное состояние печени: содержание общего белка, альбумина и показатель тимоловой пробы в сыворотке крови животных соответствовали показателям интактных животных.

Таблица 1.3

Биохимические показатели сыворотки крови крыс после острого воздействия исследуемого препарата

Показатели	**Контрольная группа**		**Налоксон спрей**	
	самцы	**самки**	**самцы**	**самки**
Общий белок, г/л	71,79 ± 3,30	75,58 ± 3,88	72,47 ± 2,68	79,63 ± 4,39
Альбумин, г/л	31,78 ± 1,83	30,79 ± 1,67	32,65 ± 1,99	31,15 ± 2,40
Тимоловая проба, ед.	1,53 ± 0,33	1,13 ± 0,18	1,63 ± 0,44	1,28 ± 0,33

Патоморфологическое исследование крыс

Патоморфологическое исследование, проведенное через 14 дней после применения препарата в дозах 36,6 мг/кг для самцов и 39,4 мг/кг для самок (по

налоксона гидрохлориду), включало в себя аутопсию, макроскопическое исследование внутренних органов крыс. После эвтаназии животные были тщательно обследованы на предмет видимых патологических признаков. По данным вскрытия отклонений от нормы выявлено не было. Шерсть блестящая, опрятная, лимфатические узлы не увеличены. Видимые слизистые оболочки блестящие, бледно-розовые, гладкие. Все макроскопически исследованные органы (сердце, легкие, тимус, желудок, печень, почки, надпочечники, поджелудочная железа, селезенка, половые железы) имели обычные размеры, цвет и консистенцию. Относительная масса внутренних органов крыс, получавших исследуемый препарат (табл. 1.4), оставалась в пределах физиологической нормы [15].

Таблица 1.4

Коэффициенты масс внутренних органов крыс
после острого воздействия исследуемого препарата

Органы	**Коэффициенты масс**	
	Самцы	**Самки**
Сердце	0,36 ± 0,02	0,35 ± 0,02
Легкие	0,73 ± 0,04	0,85 ± 0,05
Печень	3,27 ± 0,11	3,28 ± 0,18
Селезенка	0,35 ± 0,01	0,39 ± 0,05
Надпочечники	0,023 ± 0,001	0,037 ± 0,001
Почка левая	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,02
Почка правая	0,35 ± 0,01	0,37 ± 0,02
Яичко левое	0,57 ± 0,02	
Яичко правое	0,57 ± 0,02	
Тимус	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,01

1.3. Выводы

На основании результатов изучения острой токсичности исследуемого препарата *Налоксон спрей назальный* можно сделать выводы, препарат в дозах 36,6 мг/кг для самцов и 39,4 мг/кг для самок по налоксона гидрохлориду:

- не вызывает гибели животных;
- не оказывает токсического влияния на общее состояние, поведение, потребление пищи и воды, массу тела крыс;
- не влияет на параметры, характеризующие белковый обмен: содержание общего белка, альбумина и показатель тимоловой пробы в сыворотке крови экспериментальных животных;
- не вызывает видимых изменений внутренних органов крыс;
- не влияет на абсолютную и относительную массу внутренних органов.

2. ИЗУЧЕНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ

Целью данных исследований являлось изучение общетоксического действия препарата *Налоксон спрей назальный* в субхроническом опыте на половозрелых крысах в течение 7 суток при назальном применении. При проведении экспериментов руководствовались методическими указаниями [13, 14].

2.1. Материалы и методы исследований

Исследования проведены на половозрелых крысах линии Вистар обоего пола, с исходной массой тела 245-275 г (самцы) и 225-255 г (самки). Все животные были распределены на группы. Каждая экспериментальная группа насчитывала по 14 крыс (7 самцов и 7 самок). Всего в эксперименте использовано 42 крысы.

Животные были получены из питомника лабораторных животных ЧП «Дали-2001» (г. Киев). В период карантина (2 недели) и во время эксперимента животные находились в виварии при температуре воздуха 18-20 ^{o}C, относительной влажности 50-60 %, естественном световом режиме «день-ночь», в стандартных пластиковых клетках, на стандартном пищевом рационе [12-14].

При выборе доз руководствовались экспериментальными данными, полученными при изучении острой токсичности.

Дозы исследуемого препарата составляли: 3,8 мг/кг и 7,7 мг/кг (для самцов) и 4,2 мг/кг и 8,4 мг/кг для самок по налоксона гидрохлориду (приблизительно 1/10 и 1/5 от дозы, изученной в остром эксперименте). Контролем служили интактные животные.

Исследуемый препарат вводили назально один раз в сутки в течение 7 суток.

Оценку токсического воздействия исследуемого препарата на организм экспериментальных животных проводили по следующим параметрам: клинические наблюдения, выживаемость животных, потребление пищи и воды, динамика массы тела, гематологические и биохимические показатели крови и мочи, клинический анализ мочи, электрофизиологическая активность миокарда, функциональное состояние ЦНС. В конце эксперимента животных подвергали эвтаназии для проведения макроскопии и изучения морфоструктуры внутренних органов.

Клинические наблюдения за животными проводили ежедневно в течение эксперимента, регистрируя изменения в их общем состоянии, поведении, потреблении пищи и воды. Регистрацию массы тела животных проводили до начала и в конце эксперимента.

Оценку влияния препарата на состояние ЦНС проводили у крыс методом «открытого поля» в конце эксперимента [20].

ЭКГ снимали в конце эксперимента во втором стандартном отведении (электрокардиограф ЭК1К-01). При расшифровке электрокардиограмм учитывали следующие показатели: R-R – длительность полного сердечного цикла; длительность интервала P-Q, характеризующую время распространения возбуждения по предсердиям; длительность желудочкового комплекса QRS и электрической систолы желудочков – интервала Q-T; вольтаж и направленность зубцов P и T, вольтаж зубца R [21].

В периферической крови, взятой у крыс из вены хвоста перед началом и в конце эксперимента, определяли содержание гемоглобина, количество и морфологию эритроцитов, содержание лейкоцитов, тромбоцитов, а также процентное соотношение различных форм лейкоцитов (лейкоцитарную формулу). Гемоглобин определяли гемоглобинцианидным методом, подсчет эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и лейкоцитарной формулы проводили общепринятыми методами [22].

Оценку влияния исследуемого препарата на функциональное состояние печени и различные метаболические процессы проводили по ряду биохимических показателей крови с использованием диагностических наборов «Филисит Диагностика» (Украина). Содержание общего белка в крови определяли биуретовым методом, показатель тимоловой пробы – по методу осадочных проб, содержание альбумина – по реакции с бромкрезоловым зеленым, активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы (АлАТ и АсАТ) – методом Райтмана-Френкеля, содержание глюкозы в крови – ферментативным методом, содержание мочевины в крови – диацетилмонооксимным методом, холестерин – по методу Илька [15]. Исследуемые показатели определяли в конце опыта.

Для оценки влияния исследуемого препарата на функциональное состояние почек крыс определяли спонтанный суточный диурез, удельную плотность мочи. По диагностическим полоскам «PHAN» (фирма PLIVA-Lachema a.s.,) определяли pH мочи (тест основан на изменении цвета смешанного кислотно-основного индикатора в диапазоне pH 5-9), белок мочи (тест основан на изменении цвета кислотно-основного индикатора под влиянием белков), содержание глюкозы в моче (тест основан на ферментативной реакции), содержание мочевины в моче – диацетилмонооксимным методом [15]. Перечисленные показатели определяли в конце эксперимента.

Все полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики. В данном отчете принят уровень значимости $p \leq 0,05$. Для получения статистических выводов при сравнении выборок относительных переменных, после того как однофакторный дисперсионный анализ (или критерий Крускала-Уоллиса для данных, не подчиняющихся нормальному закону распределения) выявлял различия между экспериментальными группами, применяли критерий Стьюдента для множественных сравнений или критерий Ньюмена-Кейлса [17, 18].

2.2. Результаты исследований

Наблюдения в течение эксперимента не выявили токсического влияния исследуемого препарата на общее состояние и поведение экспериментальных животных. Визуальное наблюдение за животными экспериментальных групп показало, что внешне они выглядели нормально, истощенных или ожиревших животных не выявлено. Область живота в объеме не увеличена. Шерсть мягкая, блестящая, плотно прилегает к поверхности тела, без признаков расчесов и опрелости. Внешний вид кожи ушной раковины и наружного слухового прохода нормальный, выделение секрета и образование корок, а также подергивание ушей отсутствовали. Слезотечение, выделение секрета из глаз не отмечено, конъюнктивы век и глаза влажные, помутнения роговицы не выявлены. Состояние носовых отверстий и слизистых оболочек ротовой полости не изменены, поверхность языка не обложена, без признаков десквамации и трещин. Наличия геморрагических везикул и сыпи на твердом небе не отмечалось. Потребление пищи и воды у животных опытных групп не имело отличий от таковых у интактных крыс.

Анализ данных, приведенных в таблице 2.1, показал, что животные всех групп в течение эксперимента не имели достоверного изменения массы тела по сравнению с исходными данными.

Таблица 2.1

Масса (г) тела крыс
при субхроническом воздействии исследуемого препарата

Показатели	**Интактный контроль**	**Налоксон, 1 доза**	**Налоксон, 2 доза**
Самцы			
Исходные данные	261,4 ± 3,40	260,7 ± 3,85	259,3 ± 4,42
7 сут	274,3 ± 2,97	274,3 ± 6,94	269,3 ± 7,19
Самки			
Исходные данные	237,9 ± 3,76	237,9 ± 3,06	237,1 ± 3,25
7 сут	245,7 ± 2,97	244,3 ± 3,69	241,4 ± 3,40

Примечание: [1] – $p \leq 0,05$ относительно исходных данных.

Результаты изучения функционального состояния центральной нервной системы крыс (табл. 2.2) показали, что исследуемый препарат не влияет на показатели, характеризующие горизонтальную и вертикальную двигательную активность, а также эмоциональную реактивность крыс.

Таблица 2.2

Показатели ЦНС крыс
после субхронического воздействия исследуемого препарата

Показатели	**Интактный контроль**	**Налоксон, 1 доза**	**Налоксон, 2 доза**
Самцы			
Количество: пересеченных квадратов	26,0 ± 2,44	23,9 ± 3,98	24,3 ± 3,57
стоек	5,0 ± 1,91	5,9 ± 1,93	4,1 ± 1,14
умываний	0,9 ± 0,34	0,6 ± 0,57	0,3 ± 0,18
дефекаций	3,4 ± 1,00	4,4 ± 0,90	4,7 ± 0,61
Самки			
Количество: пересеченных квадратов	32,8 ± 2,24	31,0 ± 4,32	30,7 ± 4,80
стоек	7,1 ± 1,90	5,3 ± 1,32	7,3 ± 1,11
умываний	0,6 ± 0,30	0,1 ± 0,14	0,7 ± 0,29
дефекаций	3,4 ± 1,02	4,3 ± 1,19	4,7 ± 0,71

Анализ данных, характеризующих электрофизиологическую активность миокарда крыс (табл. 2.3), показал, что введение исследуемого препарата в течение 7 суток не вызывает изменений длительности интервалов PQ, QRS, QT и RR, а также не влияет на высоту зубцов P, R и T.

Таблица 2.3

Показатели ЭКГ крыс
после субхронического воздействия исследуемого препарата

Показатели	Интактный контроль	Налоксон, 1 доза	Налоксон, 2 доза
Самцы			
Длительность интервалов, с: PQ	0,035 ± 0,003	0,034 ± 0,002	0,030 ± 0,000
QRS	0,024 ± 0,002	0,020 ± 0,000	0,026 ± 0,002
QT	0,070 ± 0,003	0,072 ± 0,002	0,070 ± 0,003
RR	0,123 ± 0,004	0,123 ± 0,003	0,120 ± 0,003
Высота зубцов, mv: P	0,100 ± 0,000	0,110 ± 0,010	0,100 ± 0,000
R	0,660 ± 0,051	0,690 ± 0,087	0,520 ± 0,082
T	0,120 ± 0,012	0,160 ± 0,019	0,120 ± 0,012
Самки			
Длительность интервалов, с: PQ	0,036 ± 0,002	0,032 ± 0,002	0,032 ± 0,002
QRS	0,026 ± 0,002	0,026 ± 0,002	0,020 ± 0,000
QT	0,070 ± 0,003	0,068 ± 0,002	0,066 ± 0,004
RR	0,120 ± 0,003	0,118 ± 0,002	0,119 ± 0,004
Высота зубцов, mv: P	0,110 ± 0,010	0,110 ± 0,010	0,100 ± 0,000
R	0,630 ± 0,044	0,620 ± 0,075	0,640 ± 0,048
T	0,160 ± 0,019	0,170 ± 0,012	0,150 ± 0,016

Данные, характеризующие периферическую кровь, свидетельствуют, что введение исследуемого препарата в течение 7 суток не влияет на изучаемые гематологические показатели крови крыс: концентрация гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов не отличались от аналогичных показателей контрольной группы животных (табл. 2.4 и 2.5). К концу эксперимента у животных всех групп отмечено достоверное изменение количества эритроцитов по сравнению с исходными данными, однако оно не выходит за пределы физиологической нормы для крыс. В лейкоцитарной формуле крови крыс всех экспериментальных групп количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов находилось в пределах физиологической нормы.

Таблица 2.4

Показатели гемограммы самцов крыс
при субхроническом воздействии исследуемого препарата

Показатели	Интактный контроль	Налоксон, 1 доза	Налоксон, 2 доза
Исходные данные			
Гемоглобин, г/л	128,5 ± 2,66	128,1 ± 2,68	127,4 ± 1,79
Эритроциты, $\times 10^{12}$/л	5,65 ± 0,03	5,66 ± 0,05	5,67 ± 0,03
Лейкоциты, $\times 10^{9}$/л	19,11 ± 0,94	16,93 ± 1,10	19,06 ± 1,57
Тромбоциты, $\times 10^{9}$/л	433,2 ± 16,61	436,0 ± 11,09	431,2 ± 14,21
Лейкограмма, %			
Нейтрофилы пал.	0,3 ± 0,18	0,3 ± 0,18	0,7 ± 0,36
Нейтрофилы сегм.	12,7 ± 1,27	16,1 ± 2,26	14,3 ± 1,30

Эозинофилы	2,6 ± 0,43	2,0 ± 0,49	2,0 ± 0,38
Моноциты	0,8 ± 0,34	0,7 ± 0,29	0,6 ± 0,30
Лимфоциты	83,6 ± 1,45	80,9 ± 1,96	82,4 ± 1,39
7 суток			
Гемоглобин, г/л	130,0 ± 1,31	129,4 ± 1,58	130,4 ± 0,58
Эритроциты, $\times 10^{12}$/л	6,25 ± 0,04[1]	6,30 ± 0,02[1]	6,29 ± 0,04[1]
Лейкоциты, $\times 10^{9}$/л	18,56 ± 0,85	17,20 ± 1,54	16,54 ± 1,10
Тромбоциты, $\times 10^{9}$/л	460,4 ± 12,18	453,2 ± 11,39	454,5 ± 12,06
Лейкограмма, %			
Нейтрофилы пал.	0,6 ± 0,30	0,4 ± 0,20	0,3 ± 0,18
Нейтрофилы сегм.	13,4 ± 1,36	15,7 ± 1,84	16,9 ± 1,56
Эозинофилы	2,7 ± 0,84	2,4 ± 0,36	3,0 ± 0,76
Моноциты	0,7 ± 0,18	0,9 ± 0,26	0,4 ± 0,30
Лимфоциты	82,6 ± 1,00	80,7 ± 2,15	79,4 ± 1,63

Примечание: [1] – $p \leq 0,05$ относительно исходных данных.

Таблица 2.5

Показатели гемограммы самок крыс
при субхроническом воздействии исследуемого препарата

Показатели	Интактный контроль	Налоксон, 1 доза	Налоксон, 2 доза
Исходные данные			
Гемоглобин, г/л	126,6 ± 1,36	126,5 ± 3,17	126,9 ± 3,10
Эритроциты, $\times 10^{12}$/л	5,69 ± 0,03	5,71 ± 0,01	5,73 ± 0,02
Лейкоциты, $\times 10^{9}$/л	15,37 ± 0,75	15,74 ± 1,01	15,94 ± 1,06
Тромбоциты, $\times 10^{9}$/л	437,6 ± 15,42	430,5 ± 13,07	435,3 ± 11,25
Лейкограмма, %			
Нейтрофилы пал.	0,7 ± 0,36	0,60 ± 0,30	0,7 ± 0,30
Нейтрофилы сегм.	14,3 ± 1,69	15,4 ± 1,02	15,9 ± 1,75
Эозинофилы	1,86 ± 0,46	2,14 ± 0,67	1,4 ± 0,43
Моноциты	0,86 ± 0,34	1,14 ± 0,63	1,0 ± 0,31
Лимфоциты	82,3 ± 1,85	80,7 ± 0,94	81,1 ± 1,91
7 суток			
Гемоглобин, г/л	129,6 ± 1,40	129,9 ± 0,58	130,0 ± 0,61
Эритроциты, $\times 10^{12}$/л	6,27 ± 0,04[1]	6,34 ± 0,03[1]	6,32 ± 0,05[1]
Лейкоциты, $\times 10^{9}$/л	14,74 ± 1,18	15,11 ± 1,77	13,57 ± 0,83
Тромбоциты, $\times 10^{9}$/л	455,3 ± 15,20	461,6 ± 10,89	462,9 ± 13,24
Лейкограмма, %			
Нейтрофилы пал.	0,3 ± 0,16	0,1 ± 0,14	0,4 ± 0,30
Нейтрофилы сегм.	14,3 ± 1,57	14,3 ± 1,44	17,1 ± 1,45
Эозинофилы	2,3 ± 0,42	2,6 ± 0,69	2,4 ± 0,81
Моноциты	0,9 ± 0,26	0,4 ± 0,30	1,0 ± 0,22
Лимфоциты	82,3 ± 1,55	82,6 ± 1,43	79,0 ± 1,62

Примечание: [1] – $p \leq 0,05$ относительно исходных данных.

Результаты биохимических исследований (табл. 2.6) показали, что применение препарата *Налоксон спрей назальный* не влияет на тестируемые параметры, характеризующие белковый обмен (содержание общего белка, концентрация альбумина, показатель тимоловой пробы), углеводный обмен (концентрация глюкозы), липидный обмен (концентрация холестерина), а также активность некоторых ферментов (аланин- и аспартатаминотрансфераза).

Таблица 2.6

Биохимические показатели сыворотки крови крыс
после субхронического воздействия исследуемого препарата

Показатели	Интактный контроль	Налоксон, 1 доза	Налоксон, 2 доза
Самцы			
Общий белок, г/л	83,82 ± 3,40	80,70 ± 4,94	85,41 ± 4,90
Альбумин, г/л	42,76 ± 2,75	45,22 ± 1,28	43,09 ± 1,79
Тимоловая проба, ед	0,85 ± 0,13	1,19 ± 0,37	1,58 ± 0,28
АлАт, мккат/л	0,60 ± 0,04	0,55 ± 0,05	0,66 ± 0,05
АсАт, мккат/л	0,72 ± 0,03	0,71 ± 0,07	0,83 ± 0,08
Глюкоза, ммоль/л	6,09 ± 0,31	6,52 ± 0,40	6,41 ± 0,29
Холестерин, ммоль/л	1,86 ± 0,38	1,59 ± 0,27	1,88 ± 0,45
Мочевина, ммоль/л	6,73 ± 0,17	6,47 ± 0,23	6,44 ± 0,38
Самки			
Общий белок, г/л	76,84 ± 2,46	78,90 ± 4,61	75,68 ± 0,50
Альбумин. г/л	34,50 ± 2,56	36,43 ± 2,15	35,31 ± 1,65
Тимоловая проба, ед	0,74 ± 0,32	0,50 ± 0,08	0,63 ± 0,29
АлАт, мккат/л	0,40 ± 0,07	0,39 ± 0,04	0,39 ± 0,03
АсАт, мккат/л	0,46 ± 0,03	0,46 ± 0,06	0,43 ± 0,07
Глюкоза, ммоль/л	5,26 ± 0,29	5,85 ± 0,52	5,72 ± 0,38
Холестерин, ммоль/л	1,78 ± 0,40	2,02 ± 0,25	2,12 ± 0,35
Мочевина, ммоль/л	6,89 ± 0,26	6,72 ± 0,48	6,98 ± 0,49

Из данных, представленных в таблице 2.7, следует, что введение исследуемого препарата не изменяет основных показателей, характеризующих функциональное состояние почек крыс. Через 7 суток у животных всех экспериментальных групп суточный диурез, относительная плотность и pH мочи, содержание мочевины в крови и моче находились в пределах физиологической нормы для крыс [15]. В моче животных всех групп отсутствовала глюкоза и отмечались следы белка.

Таблица 2.7

Показатели функционального состояния почек крыс
после субхронического воздействия исследуемого препарата

Показатели	Интактный контроль	Налоксон, 1 доза	Налоксон, 2 доза
Самцы			
Количество мочи, мл	3,18 ± 0,73	3,62 ± 0,90	3,64 ± 0,93
pH	6,10 ± 0,10	6,10 ± 0,10	6,20 ± 0,12
Удельная плотность	1,047 ± 0,005	1,047 ± 0,005	1,045 ± 0,004
Мочевина мочи, ммоль/л	629,2 ± 43,05	663,4 ± 27,54	612,3 ± 74,74
Самки			
Количество мочи, мл	2,56 ± 0,43	2,54 ± 0,77	3,32 ± 0,81
pH	6,20 ± 0,20	6,00 ± 0,00	6,10 ± 0,10
Удельная плотность	1,037 ± 0,005	1,041 ± 0,004	1,039 ± 0,004
Мочевина мочи, ммоль/л	692,7 ± 95,69	692,3 ± 128,83	613,6 ± 36,93

2.3. Выводы

Проведенные исследования по изучению субхронической токсичности препарата *Налоксон спрей назальный* позволяют сделать выводы, что при назальном введении в изученных дозах препарат:

– не оказывает токсического влияния на общее состояние, поведение, потребление воды и пищи, массу тела крыс;

– не влияет на функциональное состояние центральной нервной системы и электрофизиологическую активность миокарда крыс;

– не оказывает токсического влияния на показатели периферической крови;

– не влияет на белковый обмен (содержание общего белка, концентрация альбумина, показатель тимоловой пробы), углеводный обмен (концентрация глюкозы), липидный обмен (концентрация холестерина), а также активность некоторых ферментов (аланин- и аспартатаминотрансфераза);

– не изменяет показателей, характеризующих функциональное состояние печени и почек крыс»

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

ГП «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
И ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ»
(ГП «ГНЦЛС»)

«УТВЕРЖДАЮ»
И.о. директора ГП «ГНЦЛС»
_____ Бутова М.Э.
«26» ____12_____ 2011 г.

О Т Ч Е Т

о сравнительном исследовании

специфической фармакологической активности препарата

Налоксон спрей назальный

(заявитель и производитель ОАО «Мосхимфармпрепараты»им. Н.А. Семашко»)

и зарегистрированного препарата

Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/мл

(АО «Варшавский фармацевтический завод Польфа», Польша)

Руководитель
фармакологического раздела работ –

зав. лабораторией общей фармакологии,
канд. мед. наук Чайка Л.А.

Харьков – 2011

Выдержка из отчета**:**

Устранение токсического седативного эффекта морфина

Как свидетельствуют данные, приведенные на рис. 6 и в табл. 1, однократное подкожное введение морфина крысам в дозе 100 мг/кг оказывает токсическое седативное действие на центральную нервную систему крыс, уменьшая число пересечений секторов, характеризующее двигательную активность, количество стоек и умываний, отражающее функциональную активность эмоционально-поведенческой сферы головного мозга, а также количество актов уринаций и дефекаций, характеризующее интенсивность вегетативных реакций [11,78].

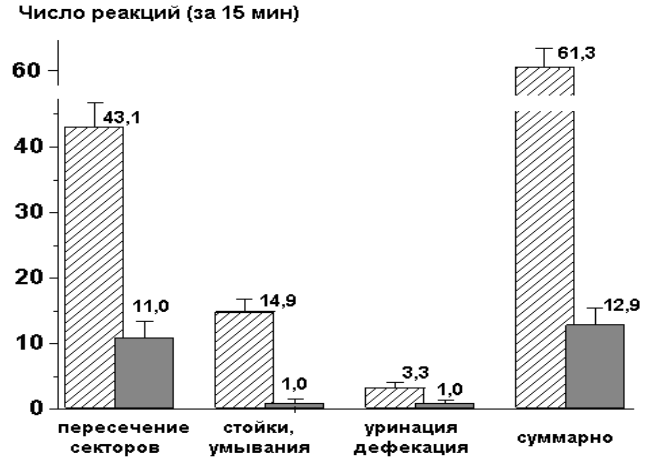


Рис. 6. Угнетение функциональной активности ЦНС крыс на фоне однократного подкожного введения морфина в дозе 100 мг/кг

– интактные – морфин

Как видно из представленных данных, сравнительно с группой интактных животных (контроль I) число пересеченных секторов на фоне морфина (контроль II) сократилось в 3,9 раза: с 43,1 до 11,0; число стоек и умываний – в 14,9 раза: с 14,9 до 1,0; число уринаций и дефекаций – в 3,3 раза: с 3,3 до 1,0. Интегральная активность ЦНС, оцениваемая как сумма перечисленных показателей, сократилась в 4,8 раза: с 61,3 до 12,9 (рис. 6, табл. 1). Полученные результаты соответствуют данным литературы о периоде седации у крыс под влиянием морфина в дозах выше 10-20 мг/кг как наиболее выраженной фазе его токсического влияния на ЦНС [34,35,36,37,38,39].

Таблица 1

Активность налоксона при интраназальном и внутримышечном введении крысам при морфин-индуцированном угнетении ЦНС в тесте «открытое поле»

Наименование групп	**Доза налоксона, мг/кг**	**Двигательная активность (пересечение секторов)**		**Поведенческие реакции (стойки, умывания)**		**Вегетататативные реакции (уринация, дефекация)**		**Суммарная активность**	
		абс.	ИЭ, %	абс.	ИЭ, %	абс.	ИЭ, %	абс.	ИЭ, %
Интактные (контроль I)	—	43,1±3,7	—	14,9±1,9	—	3,3±0,8	—	61,3±3,6	—
Патология (морфин, п/к 100 мг/кг; контроль II)	—	11,0±2,41[1]	—	1,0±0,5[1]	—	1,0±0,38[1]	—	12,9±2,57[1]	—
Патология + налоксон интраназально	0,2	12,0±1,1[1]	3,1	3,6±1,0[1,2]	18,7	1,3±0,5[1]	13,0	17,0±1,3[1]	8,5
	1,0	14,1±2,4[1]	9,7	13,1±3,0[2]	87,1	1,6±0,5	26,1	28,9±2,9[1,2]	33,1
	3,0	21,8±1,8[1,2]	33,6	14,4±2,8[2]	96,4	2,5±0,6[2]	65,2	38,6±3,6[1,2]	53,1
Патология + налоксон внутримышечно	0,2	12,5±2,8[1]	4,7	5,4±1,9[1,2]	31,7	1,3±0,5[1]	13,0	19,1±4,7[1]	12,8
	1,0	22,4±5,0[1]	35,5	10,5±3,1[2]	68,3	2,5±0,4[2]	65,2	35,4±5,1[1,2]	46,5
	3,0	26,3±2,4[1,2]	47,7	13,3±1,9[2]	88,5	2,6±0,5[2]	69,6	42,1±2,8[1,2]	60,3

Примечание: 1. Препараты налоксона вводили однократно непосредственно после инъекции морфина.

2. [1] – $p < 0,05$ сравнительно с интактными животными (контролем I).

[2] – $p < 0,05$ сравнительно с группой патологии (контролем II).

3. ИЭ, % – ингибирующий эффект.

4. Число животных в группе – 8.

Однократное интраназальное введение препарата налоксона, как и внутримышечное введение раствора налоксона для инъекций, дозозависимо предотвращает морфин-индуцированное угнетение ЦНС, нормализуя ее функциональное состояние. В большей степени налоксон влияет на восстановление нарушенных поведенческих и вегетативных реакций, в меньшей мере – на двигательную активность (табл. 1, рис. 7).

Согласно данным, приведенным в табл. 1 и на рис. 7, на фоне интраназального и внутримышечного введения налоксона в дозе 0,2 мг/кг интегральная активность ЦНС животных составила, соответственно, в среднем, 17,0 и 19,1 реакций, что недостоверно выше, чем в контрольной группе не леченных крыс.

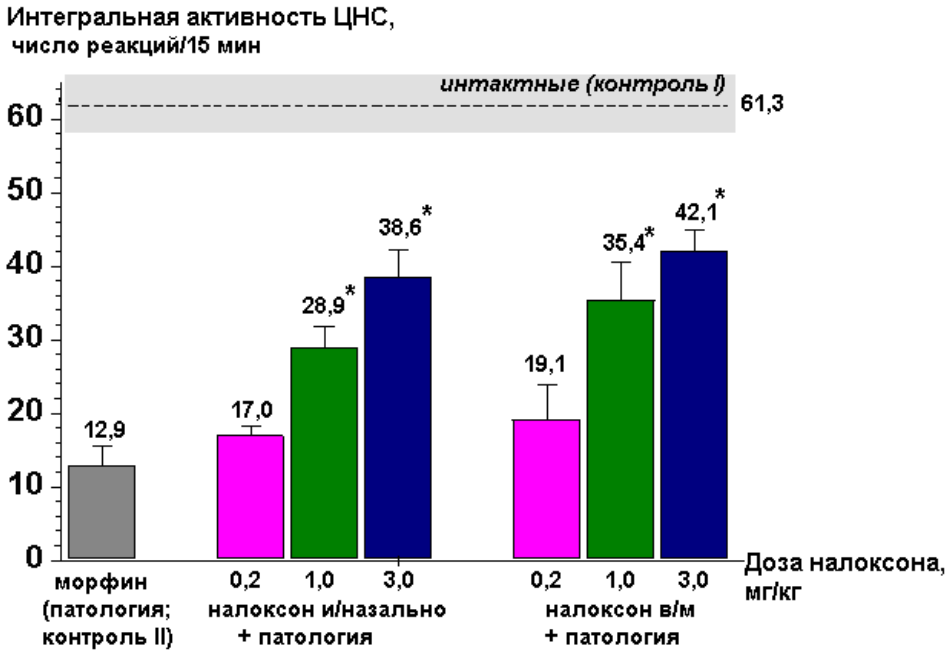


Рис. 7. Дозозависимость ингибирующего эффекта налоксона в отношении морфин-индуцированной седации у крыс.

При увеличении дозы налоксона до 1 мг/кг интегральная активность ЦНС крыс возрастала до 28,9 (интраназально) и 35,4 (внутримышечно) реакций, что достоверно выше, чем у контрольных не леченных крыс. Увеличение дозы налоксона до 3 мг/кг сопровождалось дальнейшим повышением антиморфиновой эффективности с более выраженной активацией ЦНС – до 38,6 и 42,1 реакций.

Достоверных различий в выраженности интегральной активности ЦНС между группами животных, получавшими налоксон интраназально и

внутримышечно, не выявлено.

В целом, по сравнению с интактным контролем интегральная активность ЦНС в группе не леченного контроля снижается в 4,8 раза, тогда как при интраназальном введении налоксона – от 3,6 до 1,6 раза, при внутримышечном – от 3,2 до 1,5 раза в зависимости от дозы.

Ингибирующий эффект налоксона при интраназальном введении в дозах 0,2 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг в отношении морфин-индуцированного угнетения интегральной активности ЦНС составил соответственно 8,5 %, 33,1 % и 53,1 %, а при внутримышечном введении в тех же дозах – 12,8 %, 46,5 % и 60,3 % (табл. 1).

Средняя эффективная доза ($ЭД_{50}$) налоксона гидрохлорида при интраназальном введении составила 2,6 (1,3÷3,8) мг/кг, что незначительно уступает $ЭД_{50}$ налоксона гидрохлорида при внутримышечном введении – 2,0 (0,8÷3,2) мг/кг.

Полученные результаты свидетельствуют, что препарат *Налоксон спрей назальный* при интраназальном введении дозозависимо купирует токсический эффект морфина в отношении ЦНС, в целом соответствуя активности препарата сравнения *Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/кг* (при тенденции в сторону несколько более высокой активности инъекционного препарата).

Устранение анальгетического эффекта морфина

Термоболевое раздражение хвоста крыс сопровождается развитием болевой реакции, которая проявляется в отдергивании крысой хвоста из теплового фокуса с периодом безболезненного удержания хвоста в фокусе 1,7-3,9 сек.

В контрольной группе не леченных крыс однократное подкожное введение морфина в дозе 10 мг/кг оказывает мощный быстроразвивающийся анальгетический эффект, что выражается в достоверном увеличении времени удержания хвоста в тепловом фокусе, то есть в возрастании ПБЧ (табл. 2, рис. 8). Так, уже через 15 мин после введения морфина ПБЧ крыс увеличивался с 2,61 сек (исходный уровень) до 3,95 сек, к 20 мин – до 4,63 сек, к 35 мин – 6,06 сек, к 60 мин – 8,76 сек.

Интраназальное введение налоксона устраняет анальгетический эффект морфина, дозозависимо предотвращая повышение ПБЧ крыс (табл. 2, рис. 8)

.

Таблица 2

Влияние налоксона при интраназальном и внутримышечном введении крысам
на морфин-индуцированную анальгезию в тесте «tail-flick»

Наименование групп	Доза налоксона, мг/кг	Исх. ПБЧ, сек	ПБЧ (сек) и эффект налоксона (%) через . . . мин после введения:							
			15		20		35		60	
			ПБЧ, сек	ИЭ, %	ПБЧ, сек	ИЭ, %	ПБЧ, сек	ИЭ, %	ПБЧ, сек	ИЭ, %
Контроль, патология (морфин, п/к, 10 мг/кг)	—	2,61 ±0,43	3,95 ±0,90	—	4,63 ±0,95	—	6,06[1] ±1,05	—	8,76[1] ±0,91	—
Патология + налоксон интраназально	0,2	2,78 ±0,21	3,93[1] ±0,30	0,5	3,71[1] ±0,20	19,9	3,64[1,2] ±0,25	39,9	3,18[2] ±0,19	63,7
	1,0	2,99 ±0,15	2,54 ±0,24	35,7	2,67 ±0,23	42,3	2,65[2] ±0,28	56,3	2,41[1,2] ±0,17	72,5
	3,0	2,58 ±0,17	2,08[1,2] ±0,16	47,6	2,04[1,2] ±0,17	55,9	1,80[1,2] ±0,07	70,3	2,24[2] ±0,14	74,4
Патология + налоксон внутримышечно	0,2	3,30 ±0,15	3,59 ±0,12	9,1	3,33 ±0,17	28,1	3,61[2] ±0,43	40,4	4,26[1,2] ±0,34	51,4
	1,0	2,84 ±0,26	2,70 ±0,27	31,6	2,61 ±0,22	43,6	2,54[2] ±0,26	58,1	2,29[2] ±0,18	73,9
	3,0	2,75 ±0,23	2,01[1] ±0,13	49,1	1,98[1,2] ±0,14	57,2	1,93[1,2] ±0,13	68,2	2,08[1,2] ±0,13	76,3

Примечание: 1. Препараты налоксона вводили однократно непосредственно после инъекции морфина.

2. [1] – $p < 0,05$ сравнительно с исходным уровнем.
[2] – $p < 0,05$ сравнительно с контрольной группой патологии.

3. ИЭ, % – эффект.

4. Число животных в группе – 8.

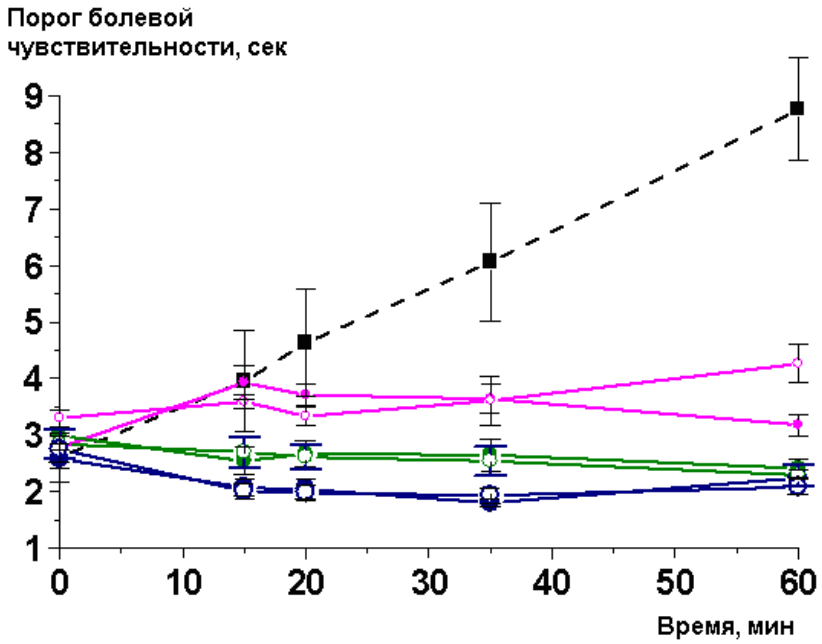


Рис. 8. Динамика порога болевой чувствительности крыс в тесте «tail-flick» под влиянием морфина и налоксона при интраназальном (и/н) и внутримышечном (в/м) введении препаратов:

- - ■ - - морфин, 10 мг/кг; подкожно (контроль)
—●— морфин + налоксон 0,2 мг/кг; и/н
—○— морфин + налоксон 0,2 мг/кг; в/м
—●— морфин + налоксон 1,0 мг/кг; и/н
—○— морфин + налоксон 1,0 мг/кг; в/м
—●— морфин + налоксон 3,0 мг/кг; и/н
—○— морфин + налоксон 3,0 мг/кг; в/м

На фоне интраназального введения налоксона в дозе 0,2 мг/кг некоторое морфин-обусловленное повышение ПБЧ животных сохранялось в течение первых 15 мин, а в дальнейшем, в отличие от не леченного контроля, величина ПБЧ снижалась практически до исходного уровня (рис. 8). При внутримышечном введении раствора налоксона в то же дозе динамика ПБЧ крыс в целом соответствует описанной динамике при интраназальном введении при недостоверной тенденции к незначительному повышению в период с 20 мин после в/м введения. Вместе с тем, в обеих опытных группах, начиная с 35 мин после введения и до конца периода наблюдения, ПБЧ был достоверно ниже, чем в не леченном контроле.

При повышении дозы налоксона до 1 мг/кг анальгетический эффект морфина устраняется полностью. В отличие от контроля, ПБЧ крыс, получавших налоксон как интраназально, так и внутримышечно, в течение всего периода наблюдения не только не превышает исходный уровень, но и имеет тенденцию к снижению. В целом, динамика ноцицептивного ответа крыс после

интраназального введения налоксона в дозе 1 мг/кг полностью соответствует таковой после внутримышечного введения препарата в той же дозе (рис. 8).

Дальнейшее повышение дозы налоксона до 3 мг/кг при обоих путях введения сопровождается не только полной блокадой анальгетического эффекта морфина, но и достоверным снижением ПБЧ животных ниже исходного уровня уже с 15 мин после введения, что сохраняется до 35 мин. К 60 мин после введения ПБЧ крыс несколько возрастает, однако в группе, получавшей налоксон внутримышечно, достоверное различие с исходным уровнем сохраняется. Динамика ПБЧ крыс после интраназального введения налоксона в дозе 3 мг/кг также полностью соответствует таковой после внутримышечного введения препарата в той же дозе (рис. 8).

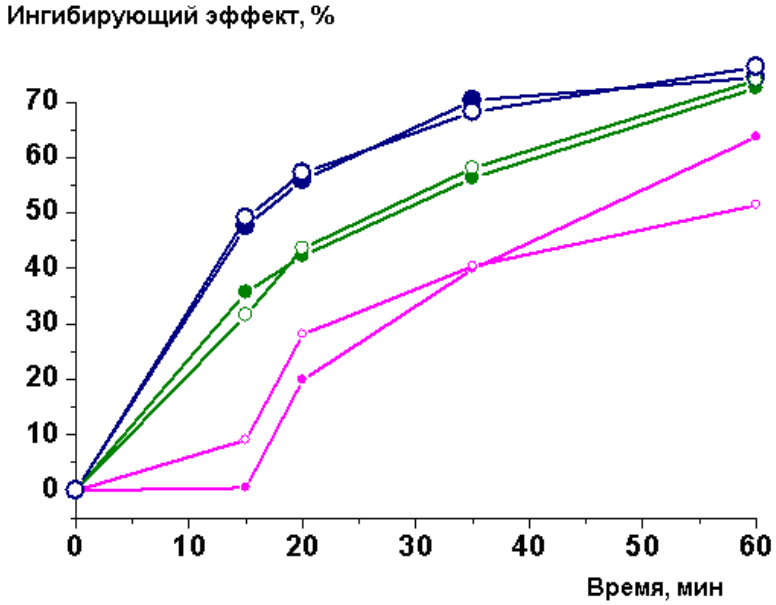


Рис. 9. Динамика ингибирующего эффекта налоксона в отношении морфин-индуцированной анальгезии при интраназальном (и/н) и внутримышечном (в/м) введении крысам в тесте «tail-flick»:

— морфин + налоксон 0,2 мг/кг; и/н
— морфин + налоксон 1,0 мг/кг; и/н
— морфин + налоксон 3,0 мг/кг; и/н
— морфин + налоксон 0,2 мг/кг; в/м
— морфин + налоксон 1,0 мг/кг; в/м
— морфин + налоксон 3,0 мг/кг; в/м

Таким образом, ингибирующий эффект налоксона при интраназальном введении характеризуется четко выраженной дозозависимостью (рис. 9), при этом количественная динамика этого эффекта соответствует активности налоксона при внутримышечном введении, подтверждая данные литературы о высокой биодоступности налоксона у крыс при интраназальном введении [70].

Средняя эффективная доза препарата *Налоксон спрей назальный*, рассчитанная на основе величин ингибирующего эффекта налоксона через 20 мин после введения, составила 2,2 (0,7÷3,8) мг/кг, не отличаясь достоверно от $ЭД_{50}$ препарата *Налоксон раствор для инъекций* – 2,1 (0,1÷4,0).

Полученные результаты соответствуют также данным литературы о диапазоне эффективных доз налоксона в устранении морфин-индуцированной анальгезии в тесте «tail-flick» [32,33,46].

Суммарный ингибирующий эффект препарата *Налоксон спрей назальный*, рассчитанный как площадь под кривой «эффект-время» (рис. 9), составил для доз 0,2 мг/кг, 1,0 мг/кг и 3,0 мг/кг, соответственно 1798,25, 2812,25 и 3371,0 (%·мин), что соответствует данным показателям для препарата *Налоксон раствор для инъекций*: 2075,5, 2837,8 и 3390,8 (%·мин), соответственно.

Дозозависимость ингибирующего эффекта налоксона как при интраназальном, так и при внутримышечном введении характеризуется насыщением в дозах выше 1 мг/кг, о чем свидетельствует нелинейный характер зависимости «доза-эффект», обусловленный, вероятно, лимитированием скорости всасывания действующего вещества из места введения (рис. 10).

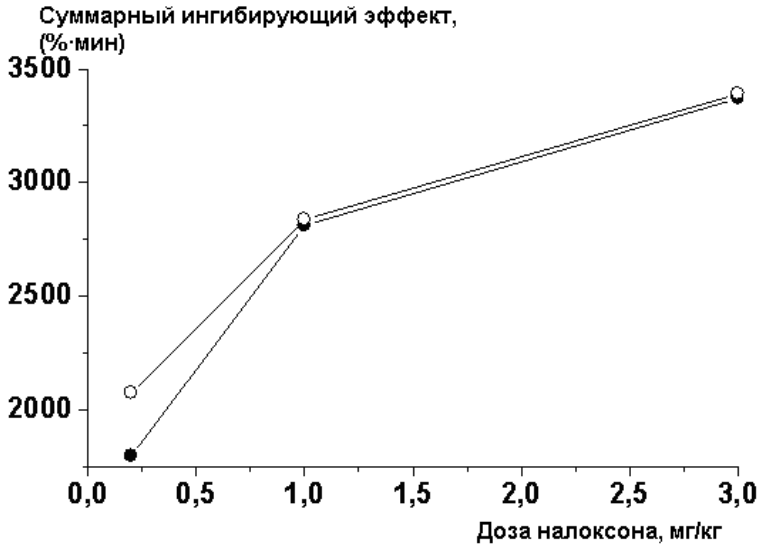


Рис. 10. Дозозависимость суммарного ингибирующего эффекта налоксона в отношении морфин-индуцированной анальгезии при интраназальном (—•—) и внутримышечном (—○—) введении крысам в тесте «tail-flick».

Это подтверждается и характером зависимости уровня концентрации налоксона в плазме крови кроликов после однократного интраназального

введения налоксона в дозах 0,6-1,8 мг, которая также характеризуется насыщением в дозах выше 1,2 мг, что было установлено в ходе фармакокинетического изучения препарата *Налоксон спрей назальный* (см. «Отчет о сравнительном исследовании фармакокинетики препарата Налоксон спрей назальный и зарегистрированного препарата Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/мл»).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что препарат *Налоксон спрей назальный* выраженно и дозозависимо ингибирует анальгетический эффект морфина и по количественному антиморфиновому действию соответствует активности препарата сравнения *Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/мл* при его внутримышечном введении.

Результаты изучения специфической фармакологической активности препарата *Налоксон спрей назальный* (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко») свидетельствуют о том, что разработанный препарат обладает характерным для налоксона антагонизмом в отношении фармакологических (седативного, анальгетического) эффектов морфина. По степени выраженности специфической фармакологической активности разработанный препарат *Налоксон спрей назальный* в целом соответствует препарату сравнения *Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/мл* при тенденции в сторону несколько более высокой активности инъекционного препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящий отчет содержит материалы сравнительного доклинического фармакологического исследования препарата *Налоксон спрей назальный* (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко») и зарегистрированного в России препарата *Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/мл* (АО «Варшавский фармацевтический завод Польфа», Польша).

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование специфической фармакологической активности препарата *Налоксон спрей назальный* при интраназальном введении по сравнению с препаратом *Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/мл* при внутримышечном введении экспериментальным животным (крысам).

Специфическая фармакологическая активность сравниваемых препаратов налоксона изучена по влиянию на фармако-токсикологические эффекты морфина в двух сериях опытов:

- по устранению токсического седативного (депримирующего) действия морфина на показатели функционального состояния центральной нервной системы у крыс в тесте «открытое поле»;
- по устранению анальгетического эффекта морфина при термоболевом раздражении у крыс в тесте «tail-flick».

Объектом исследования являлись лабораторные образцы препарата *Налоксон спрей назальный* (сер. 140611) следующего состава (в 1 г): налоксона гидрохлорида – 10 мг; вспомогательные вещества (пропиленгликоль, полиэтиленгликоль 400, полоксамер 407, кислота лимонная моногидрат, вода очищенная).

В качестве препарата сравнения использовали *Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/мл* (АО «Варшавский фармацевтический завод Польфа», Польша; сер. 01BZ0908, годен до 09.2012 г.) следующего состава (на 1 мл): налоксона гидрохлорида - 0,4 мг; вспомогательные вещества (хлористый натрий; кислота хлористоводородная, вода для инъекций; pH=3,3).

Установлено, что в тесте «открытое поле» однократное интраназальное введение препарата *Налоксон спрей назальный* и однократное внутримышечное введение препарата сравнения крысам в дозах 0,2 мг/кг, 1,0 мг/кг и 3,0 мг/кг (по налоксона гидрохлориду), дозозависимо предотвращает морфин-индуцированное угнетение ЦНС, более эффективно восстанавливая нарушенные поведенческие и вегетативные реакции и в меньшей мере – двигательную активность. По сравнению с интактным контролем морфин понижал интегральную активность ЦНС крыс в 4,8 раза, тогда как при интраназальном введении налоксона – от 3,6 до 1,6 раза, при внутримышечном – от 3,2 до 1,5 раза в зависимости от дозы. Ингибирующие эффекты налоксона в дозах 0,2 мг/кг, 1,0 мг/кг и 3,0 мг/кг на морфин-индуцированное угнетение интегральной активности ЦНС составили при интраназальном введении соответственно 8,5 %, 33,1 % и 53,1 %, а при внутримышечном введении – 12,8 %, 46,5 % и 60,3 %. $ЭД_{50}$ препарата *Налоксон спрей назальный* составила 2,6 (1,3÷3,8) мг/кг, что незначительно уступает $ЭД_{50}$ налоксона при внутримышечном введении – 2,0 (0,8÷3,2) мг/кг.

При термоболевом раздражении крыс (тесте «tail-flick») однократное интраназальное и внутримышечное введение налоксона в тех же дозах дозозависимо уменьшает вплоть до полного устранения анальгетическое действие морфина у крыс. $ЭД_{50}$ препарата *Налоксон спрей назальный* составила 2,2 (0,7÷3,8) мг/кг, не имея достоверных различий с $ЭД_{50}$ раствора налоксона для инъекций – 2,1 (0,1÷4,0). Суммарный эффект препарата *Налоксон спрей назальный* составил для доз 0,2 мг/кг, 1,0 мг/кг и 3,0 мг/кг соответственно 1798,25, 2812,25 и 3371,0 (%·мин), что соответствует показателям для раствора налоксона для инъекций: 2075,5, 2837,8 и 3390,8 (%·мин) соответственно. Зависимости «доза-эффект» для обоих препаратов характеризуются насыщением в дозах выше 1 мг/кг.

В целом, результаты изучения специфической фармакологической активности препарата *Налоксон спрей назальный* (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко») свидетельствуют, что разработанный препарат обладает характерным для налоксона антагонизмом в отношении фармакологических (седативного, анальгетического) эффектов морфина. По количественной выраженности специфических фармакологических эффектов препарат *Налоксон спрей назальный* в целом соответствует препарату сравнения при тенденции в сторону более высокой активности препарата *Налоксон раствор для инъекций 0,4 мг/мл* при внутримышечном введении».

ПРИЛОЖЕНИЕ 8

Отчеты о валидации аналитических методик

ОТЧЕТ
о валидации аналитических методик определения подлинности и количественного содержания налоксона гидрохлорида методом ВЭЖХ в препарате *Налоксон спрей назальный*

Объекты исследований

Объектами исследований служили аналитические методики определения подлинности и количественного содержания налоксона гидрохлорида в промежуточной продукции *Налоксон раствор нерасфасованный* и препарате *Налоксон спрей назальный* методом ВЭЖХ.

Валидационные характеристики

В соответствии с Руководством по валидации методик анализа лекарственных средств (Москва, 2007) для аналитических методик определения подлинности необходимо определить такую валидационную характеристику, как:

– *специфичность;*

а для аналитических методик определения количественного содержания также:

– *правильность;*
– *прецизионность (сходимость);*
– *линейность;*
– *диапазон применения.*

Кроме того, была рассчитана *полная неопределенность методики* количественного определения налоксона гидрохлорида.

Аналитические методики для тестов «Подлинность» и «Количественное определение. 1. Налоксона гидрохлорид»

Методики описаны в НД на промежуточную продукцию Налоксон раствор нерасфасованный и проекте НД на препарат Налоксон спрей назальный.

Хроматограф: Shimadzu в следующей комплектации: насос LC-20AD, автосамплер SIL-20A, детектор SPD-20AV, термостат CTO-20AS, системный контролер CBM-20 ALITE.

Колонка: колонка стальная размером 100 мм х 4,0 мм, заполненная сорбентом «Reprosil-Pur Basic C18» с размером частиц 3 мкм.

Пределы: Содержание $C_{19}H_{22}ClNO_4$ (налоксона гидрохлорида) в 1 г промежуточной продукции и препарата должно быть от 11,4 мг до 12,6 мг.

Приготовление образцов и проведение испытаний

Исследования проводили с использование образца «плацебо», полученного в лабораторных условиях из компонентов препарата, которые соответствуют требованиям нормативных документов для входного контроля. Испытуемые растворы для хроматографирования были получены из модельных образцов «плацебо» препарата, к которым в определенных количествах был добавлен налоксона гидрохлорид. Анализ проводили в соответствии с методикой проектов НД, изложенной в разделе «Количественное определение. 1. Налоксона гидрохлорид».

ОТЧЕТ
о валидации аналитических методик определения подлинности и количественного содержания пропиленгликоля методом газовой хроматографии (ГХ) в препарате *Налоксон спрей назальный*

Объекты исследований

Объектами исследований служили аналитические методики определения подлинности и количественного содержания пропиленгликоля в промежуточной продукции *Налоксон раствор нерасфасованный* и препарате *Налоксон спрей назальный* методом ГХ.

Валидационные характеристики

В соответствии с Руководством по валидации методик анализа лекарственных средств (Москва, 2007) для аналитических методик определения подлинности необходимо определить такую валидационную характеристику, как:

– *специфичность;*

а для методик определения количественного содержания также:

– *правильность;*

– *прецизионность (сходимость);*

– *линейность;*

– *диапазон применения.*

Кроме того, была рассчитана *полная неопределенность методики* количественного определения пропиленгликоля.

Аналитические методики для тестов «Подлинность» и «Количественное определение. 2. Пропиленгликоль»

Методики описаны в НД на промежуточную продукцию *Налоксон раствор нерасфасованный* и проекте НД на препарат *Налоксон спрей назальный.*

Хроматограф: Shimadzu GC-2014 с FID-детектором, оснащенный автоинжектором AOC-5000.

Колонка: колонка капиллярная кварцевая DB-5, размером 30 м х 0,53 мм с неподвижной фазой 5 % фенил – 95 % метилполисилоксан, толщина слоя 5,0 мкм.

Пределы: Содержание $C_3H_8O_2$ (пропиленгликоля) в 1 г препарата должно быть от 95,0 мг до 105,0 мг.

Приготовление образцов и проведение испытаний

Исследования проводили с использование образца «плацебо», полученного в лабораторных условиях из компонентов препарата, которые соответствуют требованиям нормативных документов для входного контроля. Испытуемые растворы для хроматографирования были получены из модельных образцов «плацебо» препарата, к которым в определенных количествах был добавлен пропиленгликоль. Анализ проводили в соответствии с методикой проектов НД и НД, изложенной в разделе «Количественное определение. 2. Пропиленгликоль».

ОТЧЕТ
о валидации аналитической методики определения подлинности налоксона гидрохлорида методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях в препарате *Налоксон спрей назальный*

Объект исследований

Объектом исследований служила аналитическая методика определения подлинности налоксона гидрохлорида в препарате *Налоксон спрей назальный.*

Валидационные характеристики

В соответствии с Руководством по валидации методик анализа лекарственных средств (Москва, 2007) для аналитических методик определения подлинности необходимо определить такую валидационную характеристику, как:

– *специфичность;*

Аналитическая спектрофотометрическая методика для теста «Подлинность (налоксона гидрохлорид)».

Методика описана в НД на промежуточную продукцию *Налоксон раствор нерасфасованный* и проекте НД на препарат *Налоксон спрей назальный.*

Спектрофотометр: Shimadzu UV-1700 PharmaSpec.

Условие подлинности налоксона гидрохлорида

На УФ-спектре (от 220 нм до 350 нм) испытуемого раствора препарата должен присутствовать максимум оптического поглощения при длине волны 281±2 нм.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Критерии приемлемости

1. На спектре раствора «плацебо» оптическое поглощение при длине волны 281±2 нм должно быть не значимо.

2. Длина волны максимума оптического поглощения испытуемого раствора должна совпадать с длиной волны максимума оптического поглощения раствора сравнения налоксона гидрохлорида.

Результаты исследований

Специфичность методики определения подлинности налоксона гидрохлорида, представлена на рис. 1, 2 и 3.

ОТЧЕТ
о валидации аналитической методики определения предельного содержания посторонних примесей методом ВЭЖХ в препарате *Налоксон спрей назальный*

Объекты исследований

Объект исследований – методика определения посторонних примесей в промежуточной продукции *Налоксон раствор нерасфасованный* и препарате *Налоксон спрей назальный* методом ВЭЖХ. Контроль содержания посторонних примесей является предельным испытанием, так как исследуется вопрос, превышает ли содержание примеси установленный верхний предел.

Валидационные характеристики

В соответствии с Руководством по валидации методик анализа лекарственных средств (Москва, 2007) для аналитической методики определения предельного содержания посторонних примесей необходимо определить такие валидационные характеристики, как:

- *специфичность;*
- *предел обнаружения.*

Аналитическая методика для теста «Посторонние примеси»

Методика описана в НД на промежуточную продукцию *Налоксон раствор нерасфасованный* и проекте НД на препарат *Налоксон спрей назальный.*

Хроматограф: Shimadzu в следующей комплектации: насос LC-20AD, автосамплер SIL-20A, детектор SPD-20AV, термостат CTO-20AS, системный контролер CBM-20 ALITE.

Условия хроматографирования:

По 10 мкл *испытуемого раствора* и *раствора сравнения* хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-спектрофотометриче-ским детектором, получая не менее 3 хроматограмм каждого из растворов, в следующих условиях:

– колонка стальная размером 100 мм х 4,0 мм, заполненная сорбентом «Reprosil-Pur Basic C18», размер частиц 3 мкм;

– состав подвижной фазы (ПФ) программируют:

Время (мин)	Концентрация ПФ А, % об/об	Концентрация ПФ Б, % об/об
0 - 5	100	0
5 - 20	100 → 0	0 → 100
20 - 25	0	100
25 - 27	0 → 100	100 → 0
27 - 32	100	0

– подвижная фаза А: *фосфатный буферный раствор pH 2,0* – ацетонитрил для хроматографии (82 : 18);