

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

НИКОЛАЕВА ЛЮДМИЛА ЛЕОНИДОВНА

**СОЗДАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ НА
ОСНОВЕ НОВОГО ОТЕЧЕСТВЕННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ОРМУСТИНА
ИЗ КЛАССА НИТРОЗОАЛКИЛМОЧЕВИНЫ**

14.04.01 – технология получения лекарств

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор Н.Д. Бунятыян

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук, профессор Н.А. Оборотова

Москва – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Парентеральные лекарственные формы, требования предъявляемые к ним	13
1.2. Сублимационное высушивание в процессе получения лекарственных препаратов	19
1.3. Противоопухолевые алкилирующие агенты	23
1.4. Класс алкилнитрозомочевин, механизм действия и противоопухолевая активность	25
1.5. Особенности создания лекарственных форм для препаратов из класса алкилнитрозомочевин	32
1.6. Структура и противоопухолевая активность субстанции ормустина	33
Заключение по главе 1	36
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1. Материалы, реактивы и оборудование	37
2.2. Методы исследований	40
2.2.1. Изучение растворимости субстанции ормустина	40
2.2.2. Приготовления парентеральной лекарственной формы «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг»	40
2.2.3. Методы анализа парентеральной лекарственной формы ормустина	42
2.2.3.1. Определение подлинности ормустина	42
2.2.3.2. Количественный спектрофотометрический анализ ормустина в парентеральной лекарственной форме	43
2.2.3.3. Определение рН в концентрате и парентеральной лекарственной форме ормустина	43
2.2.3.4. Определения потери в массе при высушивании	44

2.2.3.5. Определение изомерного состава	44
2.2.3.6. Валидация методик количественного спектрофотометрического анализа	46
2.2.4. Исследование противоопухолевой активности парентеральной лекарственной формы ормустина в опытах <i>in vivo</i>	46
2.2.5. Статистическая обработка результатов анализа	47
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ОРМУСТИНА	48
3.1. Изучение растворимости субстанции ормустина	48
3.2. Выбор метода растворения ормустина в растворе 0,1 М хлористоводородной кислоты	50
3.3. Изучение влияние ультразвуковой обработки на изомерный состав ормустина	52
3.4. Изучение стабильности раствора ормустина в процессе хранения	52
3.5. Изучение влияния формообразователей на стабильность ормустина в растворе	53
3.6. Изучение влияния фильтрующего материала на содержание ормустина в растворе	55
3.7. Разработка режима лиофилизации раствора ормустина	56
3.8. Выбор растворителя для регидратации парентеральной лекарственной формы ормустина перед введением	59
3.9. Технологическая схема получение парентеральной лекарственной формы ормустина	61
Заключение по главе 3	63
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПАРЕНТЕРАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ОРМУСТИНА	64
4.1. Разработка методики качественного определения ормустина в парентеральной лекарственной форме методом тонкослойной	64

хроматографии	
4.2. Разработка методики количественного определения ормустина в парентеральной лекарственной форме	70
4.3. Валидация метода количественного определения	74
4.3.1. Линейность	75
4.3.2. Правильность	76
4.3.3. Сходимость и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность	77
4.3.4. Селективность	79
4.4. Стандартизация парентеральной лекарственной формы ормустина	81
4.4.1. Показатели качества парентеральной лекарственной формы ормустина	81
4.4.2. Изучение стабильности парентеральной лекарственной формы ормустина при хранении	85
Заключение по главе 4	88
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ОРМУСТИНА	89
5.1. Определение терапевтической дозы парентеральной лекарственной формы ормустина	89
5.2. Противоопухолевая активность ормустина на различных солидных моделях	91
Заключение по главе 5	93
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	94
ВЫВОДЫ	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА	116
ПРИЛОЖЕНИЯ	120

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АНМ – алкилнитрозомочевина

АФИ – активная фармацевтическая субстанция

БХНМ – 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина

ВВ – вспомогательное(-ые) вещество(-а)

ВМС – высокомолекулярное соединение

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИК₅₀ – показатель цитотоксичности, концентрация, необходимая для гибели 50% клеток

ЛВ – лекарственное вещество

ЛП – лекарственный препарат

ЛУК – ледяная уксусная кислота

ЛФ – лекарственная форма

НД – нормативный документ

ПЛП – парентеральные лекарственные препараты

ПЛФ – парентеральные лекарственные формы

ПР – раствор для проверки пригодности хроматографической системы

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РНК – рибонуклеиновая кислота

СО – стандартный образец

СФМ – спектрофотометрия

ТРО – торможение роста опухоли

ТСХ – тонкослойная хроматография

УЗ – ультразвук

УПЖ – увеличение продолжительности жизни

ЦНС – центральная нервная система

ЭСП – электронный спектр поглощения

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

По данным ВОЗ рак является второй ведущей причиной смертности в мире, в 2015 г от злокачественных образований умерло около 8,8 млн. человек [106]. Постоянно растет спрос на противоопухолевые препараты, по сообщению Росстата в период с января по сентябрь 2017 г. выпуск противоопухолевых и иммуномодуляторов по сравнению с тем же периодом в 2016 г. возрос на 140,9%. Основными методами лечения рака до сих пор являются применение хирургических операций, лучевая терапия и прием противоопухолевых лекарственных препаратов (ЛП) [161]. Различные виды противоопухолевой терапии получают более 70% всех больных злокачественными новообразованиями.

Высокая смертность обусловлена недостаточной эффективностью существующих противоопухолевых соединений и их высокой токсичностью по отношению к здоровым клеткам и органам. Отсутствие тенденции к снижению смертности от онкологических заболеваний требует разработки новых высокоэффективных режимов лечения больных и новых противораковых ЛП с оригинальным механизмом действия. Скрининг новых ЛП базируется на проведении химических, физических, биологических, фармацевтических, доклинических и клинических исследований [30, 51]. Противоопухолевые препараты отличаются от других фармакологических групп высокой агрессивностью, химической нестабильностью и сильным местно-раздражающим действием, поэтому большая часть противоопухолевых ЛП выпускают в виде растворов или лиофилизатов для приготовления растворов для парентерального введения.

Широкое применение в клинической практике комбинированной терапии солидных опухолей нашли соединения из класса алкилнитрозомочевин (АНМ), включенные в перечень ЖНВЛП на 2018 г. (Кармустин и Ломустин). Данной группе ЛП присущ гидролитический распад в условиях организма с образованием алкилирующих и карбамоилирующих молекул [48]. Внимание к ним связано с

отличным от других противораковых препаратов спектром противоопухолевого действия, различием в молекулярных механизмах у близких по структуре соединений и в отсутствии полной перекрестной устойчивости с алкилирующими веществами [34]. В настоящее время продолжается поиск новых соединений из класса АНМ, связанный с попытками расширить спектр их противоопухолевого действия, снизить побочные эффекты и увеличить избирательность действия [29]. Одним из таких соединений является ормустин, синтезированный в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского [49], показавший по данным биологических исследований высокую противоопухолевую активность [7].

В связи с вышеизложенным создание стабильной при хранении парентеральной лекарственной формы (ПЛФ) ормустина является актуальным.

Степень разработки темы исследования

На основании изучения данных базы патентов РФ и зарубежных патентных ведомств, российской и иностранной научной литературы было обнаружено наличие исследований по разработке ПЛФ класса АНМ, в том числе и по разработке липосомальной формы на основе активной фармацевтической субстанции (АФИ) из класса АНМ – ормустина. Однако в базах данных отсутствуют исследования по созданию лиофилизированной не наноструктурированной ПЛФ ормустина.

Цели и задачи исследования

Целью данного исследования являлась разработка состава и технологии получения ПЛФ на основе противоопухолевого лекарственного средства ормустина из класса алкилнитрозомочевины.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

1. Подобрать оптимальный состав лиофилизированной ПЛФ ормустина и разработать технологию ее получения.
2. Разработать методики качественного и количественного химико-фармацевтического анализа для контроля качества ПЛФ ормустина.
3. На основании экспериментальных данных обосновать диапазон допустимых значений в показателях качества для стандартизации ПЛФ

ормустина, изучить стабильность лекарственной формы (ЛФ) и срок ее годности в процессе хранения.

4. Изучить противоопухолевую активность разработанной ПЛФ на нескольких моделях опухолей *in vivo*;

5. На основании результатов исследований разработать проект НД и лабораторный регламент на получение ПЛФ ормустина.

Научная новизна исследования

Впервые разработана стабильная при хранении ПЛФ соединения из класса АНМ – ормустина, обладающего противоопухолевой активностью; подобран оптимальный состав и разработана технология получения лиофилизированной ЛФ, имеющая ряд особенностей, связанных с низкой стабильностью ормустина; предложены методики качественного и количественного анализа ПЛФ ормустина; определены допустимые диапазоны показателей качества и изучена стабильность готовой ЛФ ормустина при хранении; изучена противоопухолевая активность ПЛФ ормустина на опухолевых моделях *in vivo*. На основе проведенных исследований разработан лабораторный регламент на получение готовой ЛФ «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» и составлен проект нормативного документа (НД) на данную ЛФ.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Представленные данные могут служить теоретической базой для разработки инъекционных препаратов на основе умеренно растворимых и гидролитически неустойчивых АФИ. Обосновано применение лиофилизации для получения стабильной при хранении ЛФ. Разработаны и внедрены в практику лабораторный регламент на получение и проект НД на ПЛФ «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования по подбору состава и разработки технологии получения ПЛФ ормустина.

2. Методики химико-фармацевтического анализа ПЛФ ормустина: качественный хроматографический анализ компонентов ПЛФ и количественное спектрофотометрическое определение АФИ в ПЛФ.

3. Результаты исследования противоопухолевой активности в опытах *in vivo*.

4. Результаты определения стабильности готовой ПЛФ ормустина в процессе хранения.

Методология и методы исследования

Работы проводились на основе трудов ведущих российских ученых в области разработки ПЛФ лекарственных веществ (ЛВ), в том числе противоопухолевых – Оборотовой Н.А., Бунятян Н.Д., Алексеева К.В., Краснюка И.И. и др. Применяли методы анализа, утвержденные Государственной фармакопеей РФ. Противоопухолевую активность изучали на основании «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (под ред. А.Н. Миронова) [69].

В ходе проведения экспериментов применяли:

1. технологические методы: перемешивание, ультразвуковое (УЗ) воздействие, стерилизация фильтрованием, лиофилизация;
2. химико-фармацевтические методы: потенциометрия, хроматография (тонкослойная хроматография (ТСХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)), спектрофотометрия (СФМ);
3. биологические методы: определение противоопухолевой активности в опытах *in vivo*;
4. математические методы.

Достоверность научных положений и выводов

Диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне. В ходе выполнения экспериментов использовались современные методы анализа (СФМ, ТСХ, ВЭЖХ), исследования проводились с применением современного сертифицированного оборудования. Экспериментальные данные,

полученные автором, обработаны с применением статистических методов, что позволяет считать их достоверными.

Апробация результатов исследования

Результаты научных исследований по теме диссертации были представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике» (20-21 марта 2014 г., Москва), I Международной научно-практической Интернет-конференции «Технологические и биофармацевтические аспекты растворения лекарственных препаратов разной направленности действия» (7-8 ноября 2014 г., Харьков), XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (31 марта – 1 апреля 2015 г., Москва), научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическая наука и практика: достижения, инновации, перспективы» (25-27 ноября 2015 г., Пермь), XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова (17-18 марта 2016 г., Москва), XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (17 марта 2016 г., Москва), заседании Ученого совета НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (24 октября 2017 г., Москва).

Апробация проведена на межкафедральном учебно-методической конференции кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ИПО, кафедры фармации, кафедры управления и экономики фармации, кафедры аналитической токсикологии, фармацевтической химии и фармакогнозии и кафедры фармацевтической технологии Института фармации и трансляционной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 27 ноября 2017 г.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в постановке целей и задач настоящего исследования, их экспериментальной реализации, анализе и

систематизации полученных данных, изложении полученных результатов в виде научных публикаций. В работах, выполненных в соавторстве, автором проведена аналитическая и статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. Автором лично проанализирована научная литература по данной теме, проведен патентный поиск, подобран состав и разработана технология получения ПЛФ ормустина, предложены методики качественного и количественного анализа ЛП. На основании полученных данных разработан лабораторный регламент на получение и проект НД «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг».

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований внедрены в:

1. научную и практическую деятельность лаборатории разработки лекарственных форм и лаборатории химико-фармацевтического анализа НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
2. научную деятельность кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ИПО ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 3 и 4 паспорта специальности.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в рамках научной темы «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01201261653), а также в соответствии с планом научно-исследовательских работ НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по теме «Разработка лекарственных форм

противоопухолевых препаратов с организацией лабораторного производства» (2013-2018 гг.).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 127 страницах и представлена введением, пятью главами, общим заключением, выводами, списком литературы и приложением. Работа содержит 20 таблиц и 32 рисунка. Список литературы содержит 163 наименования, 65 из которых иностранные.

Публикации

Содержание выполненной работы отражено в 18 научных публикациях, из них 5 статей опубликованы в изданиях, включенных в перечень ведущих периодических изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 2 статьи – в журналах, индексируемых в базе SCOPUS.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Парентеральные лекарственные формы, требования предъявляемые к ним

К ПЛФ относят стерильные ЛФ, предназначенные для введения в организм человека путем инъекций, инфузий или имплантации (с нарушением целостности кожных покровов или слизистых оболочек, минуя желудочно-кишечный тракт) [24].



Рисунок 1 – Группы ПЛФ [46]

Анализ ЛС, представленных в настоящее время на отечественном фармацевтическом рынке, свидетельствует о том, что число ПЛФ составляет более 3 тыс. наименований (18,7% от общего числа ЛП, внесенных в государственный реестр ЛС) [45]. Около 80% противоопухолевых препаратов из перечня жизненно необходимых и важнейших ЛП представлены ПЛФ [80].



Рисунок 2 – Доля ПЛФ в Государственном реестре ЛС [45]

Такая распространенность данной группы препаратов связана с рядом преимуществ парентерального пути введения:

- быстрое оказание терапевтического действия;
- высокая точность дозирования;
- возможность локализации действия;
- капельным путем можно ввести большой объем жидкостей;
- данные ЛФ можно вводить пациентам в бессознательном состоянии или в случае невозможности введения препарата перорально;
- капельное введение позволяет немедленно прекратить введение ЛП при возникновении побочных эффектов;
- при возникновении в месте введения раздражающих реакций возможно применения разведение *ex tempore*;
- защита препарата от разрушения в ЖКТ;
- отсутствует необходимость вводить дополнительные вспомогательные вещества (ВВ) для коррекции вкуса и запаха [61].

Несмотря на целый ряд преимуществ парентерального введения, применение таких ЛФ связано с определенным риском. При данном пути введения нарушается кожный покров, что ведет к возможности инфицирования патогенными микроорганизмами и попаданию механических включений (эмболия). Поэтому данные ЛФ производятся в условиях, максимально предотвращающих загрязнение конечного продукта производства микроорганизмами, посторонними веществами и другими источниками патогенной микрофлоры [11, 55].

К основным требованиям, предъявляемым к ПЛФ относятся: стерильность, апиrogenность, контроль за показателем рН, отсутствие механических включений [62]. При наличии в составе органических растворителей контролируют их содержание. Если есть указания в фармакопейной статье, растворы должны быть изотоничны, изогидричны и изоионичны. У препаратов, содержащих в своем составе antimicrobные консерванты и антиоксиданты, проводят определение по таким показателям, как подлинность и количественное определение [74].

Создание ЛП как в виде ЛФ на основе одной или нескольких АФИ, так и их композиций со ВВ, является сложной задачей, зависящей от многих факторов. В первую очередь, процесс разработки состава и выбора оптимальной ЛФ начинают с изучения физико-химических свойств АФИ, её растворимости и липофильности.

К растворителям, применяемым в фармацевтическом производстве, относят индивидуальные химические соединения или их смеси, способные растворять различные АФИ и вспомогательные компоненты, т.е. образовывать с ними однородные системы – растворы. При производстве ПЛФ применяются как водные, так и неводные растворители. Вода, используемая при производстве ПЛФ должна отвечать всем требованиям ФС.2.2.0020.15 «Вода для инъекций» [67]. Кроме воды для инъекций разрешено применение ряда водных растворов, масел и органических растворителей (рис. 3) [24, 30-32].



Рисунок 3 – Некоторые растворители, разрешенные для применения в составе ПЛФ

Требования, предъявляемые к фармацевтическим растворителям, включают высокую растворяющую способность, химическую индифферентность, биологическую безвредность, низкую токсичность, микробиологическую чистоту и доступность [24].

Для обеспечения отсутствия возможности химического и физико-химического взаимодействия между веществами и растворителем, подбор

растворителя осуществляют, исходя из природы и свойств АФИ и вспомогательных компонентов [93].

Из-за нестабильности и низкой растворимости большинства новых, отобранных при скрининге биологически активных АФИ, разработка ЛФ на их основе невозможна без применения ВВ, доля которых в составе ЛФ может превышать 99% [99].

Исторически в качестве ВВ использовались абсолютно инертные вещества, выполняющие только одну функцию – формообразователя. Однако развитие такой науки как биофармация раскрыло влияние ВВ на терапевтическую активность АФИ в организме [77, 79, 140]. Вспомогательные компоненты нельзя относить к индифферентным, обладая различными физико-химическими [107], а часто и биологическими свойствами (антимикробные консерванты, антиоксиданты, красители и др.), они оказывают как отрицательное, так и положительное действие на активность АФИ, влияет на фармакокинетические параметры, изменяя процесс растворения, всасывания и распределения в организме [5, 76, 143].

При разработке состава ЛФ введение ВВ необходимо для [1, 2, 24, 32, 100, 163]:

1. повышения устойчивости в дисперсных системах (загустители, стабилизаторы в суспензионных и эмульсионных растворах);
2. подавления развития микроорганизмов, грибов (консерванты);
3. повышения растворимости АФИ (соразтворители, солеобразователи, комплексообразователи и др.);
4. изменения, продления, замедления терапевтической активности АФИ (пролонгаторы, синергисты и др.);
5. стабилизации раствора (стабилизаторы).

Основным требованием, которое предъявляют к ВВ, является их совместимость с АФИ и с материалом упаковки [104]. Использование различных технологий при производстве вспомогательных компонентов, в том числе способ их очистки, влияет на качество и свойства компонентов [87]. Согласно

современной формулировке термина ВВ, они либо не проявляют фармакологическую активность, либо могут проявлять очень ограниченную и направленную фармакологическую активность. ВВ могут усиливать, снижать действие АФИ или изменять его характер за счет химических реакций (ускорять или замедлять процессы гидролиза и окисления), интерференции, комплексообразования и др. [85] Кроме того, правильный подбор вспомогательных компонентов влияет на проницаемость клеточных мембран и скорость наступления эффекта. Существуют множество примеров несовместимости компонентов ЛФ, некоторые из них приведены в таблице 1 [80].

В настоящее время в мире при производстве лекарств используют более 500 наименований ВВ и ещё больше их смесей. Большая часть из них включена в Российскую и зарубежные фармакопеи, а также в национальные справочники [88, 141]. Согласно ГФ XIII издания, в состав ПЛФ могут быть добавлены antimicrobные консерванты (метил- и пропилпарагидроксибензоат, хлорбутанол, крезол, фенол, ртуть содержащие и катионные ПАВ), стабилизаторы (аскорбиновая, хлористоводородная, винная, лимонная и уксусная кислоты, гидроксид-, карбонат-, гидрокарбонат-, цитрат-, фосфат-, сульфит-, гидросульфит-, метабисульфит- и тиосульфат натрия, сульфит калия и динатрия эдетат), эмульгаторы (крахмал, декстрин, сапонины, танин, полисорбат, стеринны, амиды жирных кислот), солюбилизаторы (поливинилпирролидон, полиэтиленгликоли, полиэтокселированное касторовое масло) и др. [24].

Таблица 1 – Некоторые примеры несовместимости компонентов ЛФ

Характер взаимодействия	Несовместимые компоненты	Результат взаимодействия
комплексообразование	твины + консерванты фенольного типа	снижение активности консервантов до 90%
	соли альгиновой, полиакриловой кислот + четвертичные органические катионы	снижение активности консервантов
	производные метилцеллюлозы + нитрофураны, сульфосодержащие вещества	снижение антибактериальной активности
химическое взаимодействие	сахара (лактоза и др.) + вещества, содержащие имино- и аминокгруппы	образование окрашенных примесей, снижение содержания АФИ
гидролиз	вещества, способствующие гидролизу + АФИ, содержащие эфирные, карбонильные группы, атомы хлора и др.	снижение содержания АФИ, снижение терапевтического эффекта

В отличие от АФИ изучение безопасности ВВ не предполагает применение всего арсенала доклинических исследований, существует ряд алгоритмов для подтверждения их безопасности. В США для новых ВВ рекомендовано проводить изучение генотоксичности, острой, подострой и специфической токсичности [86, 108].

Оценка безопасности ВВ необходима для [85-87]:

1. веществ, впервые применяемых у человека (в т.ч. при другом пути введения, в более высокой концентрации или при использовании у другой популяции пациентов, например, другая возрастная группа, другие показания);
2. веществ, полученных по новой технологии или представляющих собой их новую химическую модификацию;

3. веществ, не полностью характеризованных НД (например, при использовании смеси);
4. технологических (функциональных) веществ, изменяющих высвобождение (например, полимеры, используемые для высвобождения, агенты, стабилизирующие наносистемы).

1.2. Сублимационное высушивание в процессе получения лекарственных препаратов

Сублимационная сушка представляет собой процесс удаления влаги из замороженного материала путем сублимации (возгонки) льда, который переходит в пар, минуя жидкую фазу [3]. Образующийся продукт представляет собой твердое пористое вещество. Особенностью данного процесса является то, что влага удаляется из продукта при низких температурах [119]. Благодаря этому данный метод применим для сушки термолабильных веществ (антибиотиков, ферментов, гормонов, витаминов, вакцин, сывороток, препаратов крови и др.), сохраняя их биологическую активность и химическую целостность [33, 127].

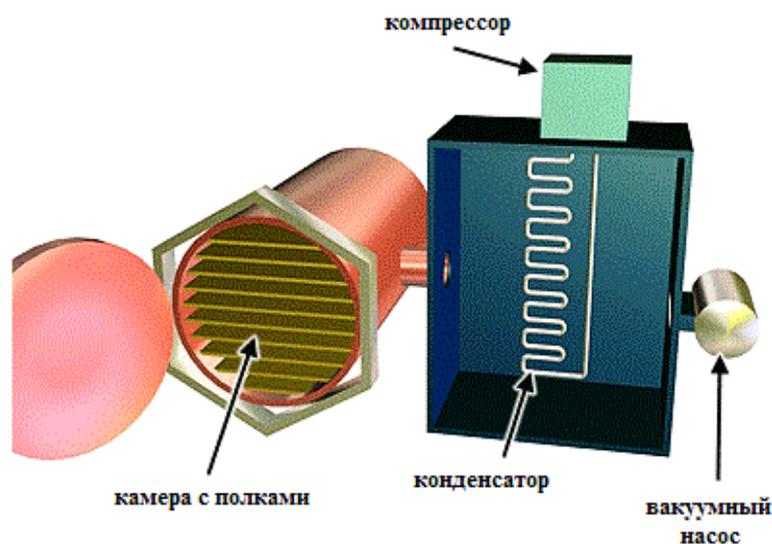


Рисунок 4 – Типовое устройство сублимационной установки [120]

Лиофилизацию проводят в специальных сублимационных установках. Сублимационная установка состоит из сушильной камеры, вакуумного насоса, конденсатора, компрессора, блока управления (рис. 4). Типовой процесс

лиофилизации состоит из 3-х этапов: замораживания, сублимации (рис. 5) и досушивания.

При этом частично укупоренные стеклянные флаконы с растворами помещают на охлажденные полки. При постепенном или быстром понижении температуры происходит замораживание раствора до заданной температуры. В процессе замораживания происходит формирование структуры ЛФ [4].

При досушивании методом сублимации создаются условия, при которых вещество претерпевает минимальные химические изменения. К этим условиям относят: низкую температуру, отсутствие растворителя в жидкой фазе и незначительную концентрацию кислорода в окружающей газовой среде.

Сублимация льда происходит только в том случае, когда парциальное давление в камере будет ниже давления паров воды над продуктом. Разность давления достигается путем повышения давления пара над поверхностью высушиваемого продукта или при снижении давления в окружающей среде посредством конденсации пара на охлаждающей поверхности, поглощения химическими веществами или непосредственного удаления в атмосферу за пределы сублимационной установки.

Создание глубокого вакуума не является обязательным в течение всего этапа сублимации, т.к. ниже определенного уровня не происходит увеличение скорости испарения влаги, кроме того слишком глубокий вакуум затрудняет теплоперенос от нагревательной пластины к продукту [18].

Разность давления пара достигается в основном подводом тепла к поверхности испарения, поэтому для увеличения скорости досушивания необходимо максимально допустимое нагревание материала. Начальная температура сушки определяется температурой эвтектики и возможностями используемого оборудования, конечная температура определяется свойствами препарата.

С момента исчезновения последних кристаллов льда температура продукта быстро возрастает, в это время необходимо поддерживать максимально допустимую температуру.

Температуры основной сушки и досушивания устанавливаются опытным путем, при этом контролируют изменения физико-химических и специфических свойств препарата.

Подвод тепла осуществляют двумя способами: с использованием источника нагрева и с применением температуры окружающей атмосферы для подвода к продукта.

Если нагрев недостаточный, то продукт сублимируется при слишком низкой температуре и длительность лиофилизации существенно возрастает [39].

Полнота связывания конденсатором водяного пара зависит от его температуры, чем она выше, тем большее количество молекул пара отражается от его поверхности и попадает вновь в окружающее пространство, увеличивая тем самым давление пара в конденсаторе и снижая скорость высушивания. Т.о. оптимальной является температура конденсатора, при которой происходит полное связывание всех молекул водяного пара, достигающих охлажденной поверхности.

Структура сформировавшегося лиофилизата имеет большое значение, так как через поры структуры происходит удаление влаги. В конце заморозки около 60–95% исходной влаги находится в замороженном состоянии, а остальное количество в адсорбированном состоянии. В процессе заморозки происходит либо затвердевание жидкой фазы (образование эвтектического состава) или в результате процесса стеклования образуется высоковязкая жидкость [89].

Для проведения кристаллизации метастабильных наполнителей (например, маннит, глицин), которые находятся в аморфном состоянии и/или для увеличения размеров кристаллов после завершения заморозки продукт может быть термически обработан путем отжига. Температура отжига должна быть выше эвтектической примерно на 10°C. Эта дополнительная обработка может значительно увеличить начальную скорость просушивания и улучшить однородность готового продукта за счет уменьшения высвобождения влаги в результате перекристаллизации остаточной аморфной или гидратированной формы [13].



Рисунок 5 – Структура продукта во время первичной сушки

Во время вторичной сушки связанная вода (10–35% общего влагосодержания) удаляется путем десорбции. Вторичная сушка начинается с повышения температуры полок обычно до температуры выше комнатной и дальнейшего снижения давления в камере для удаления абсорбированной воды из наполовину высушенного продукта. Длительность вторичной сушки напрямую зависит от показателя остаточной влажности в готовом продукте [40].

Процесс лиофилизации протекает при довольно низких температурах, что оказывает разрушающее действие на АФИ. Поэтому для получения лиофилизата надлежащего качества в состав раствора, подлежащего высушиванию, вводят те или иные ВВ (табл. 2), которые не только защищают действующее вещество в процессе заморозки, но и изменяют эвтектическую температуру раствора, чаще всего уменьшая время лиофилизации [3, 4, 59, 60].

Таблица 2 – Основные группы ВВ, вводимых в состав растворов, подлежащих сублимационному высушиванию

Группа ВВ	Основные функции	Типовые вещества
наполнители	образуют матрицу для АФИ, чаще всего используют при низких концентрациях АФИ	глицин, маннит, поливинилпирролидон, декстран, гидроксиптилкрахмал
буферные растворы	корректировка рН	трис-буфер, фосфатный буфер, гистидиновый буфер
регуляторы тоничности	контроль осмотического давления	декстроза, маннит, глицерин, хлорид натрия и др. соли
модификаторы структуры	вводят для, преодоления сопротивления потока пара	маннит
стабилизаторы	защищают действующее вещество от пересушивания и эффектов концентрирования вымораживанием	декстран, глюкоза, сахароза

1.3. Противоопухолевые алкилирующие агенты

Противоопухолевые ЛП в зависимости от механизма их действия уничтожают раковые клетки (цитотоксический эффект) или угнетают их пролиферативную активность (цитостатический эффект) [70]. Широкое применение в комбинированной терапии опухолей нашли алкилирующие соединения. В соответствии с международной классификацией АТС группа L01 (противоопухолевые препараты) подразделяется на пять групп 3-го уровня: алкилирующие препараты, противоопухолевые антибиотики, алкалоиды растительного происхождения, антиметаболиты и прочие противоопухолевые препараты. В натуральном эквиваленте значительная доля (почти треть) фармынка России представлена алкилирующими соединениями (рис. 6) [35, 37, 72, 90].

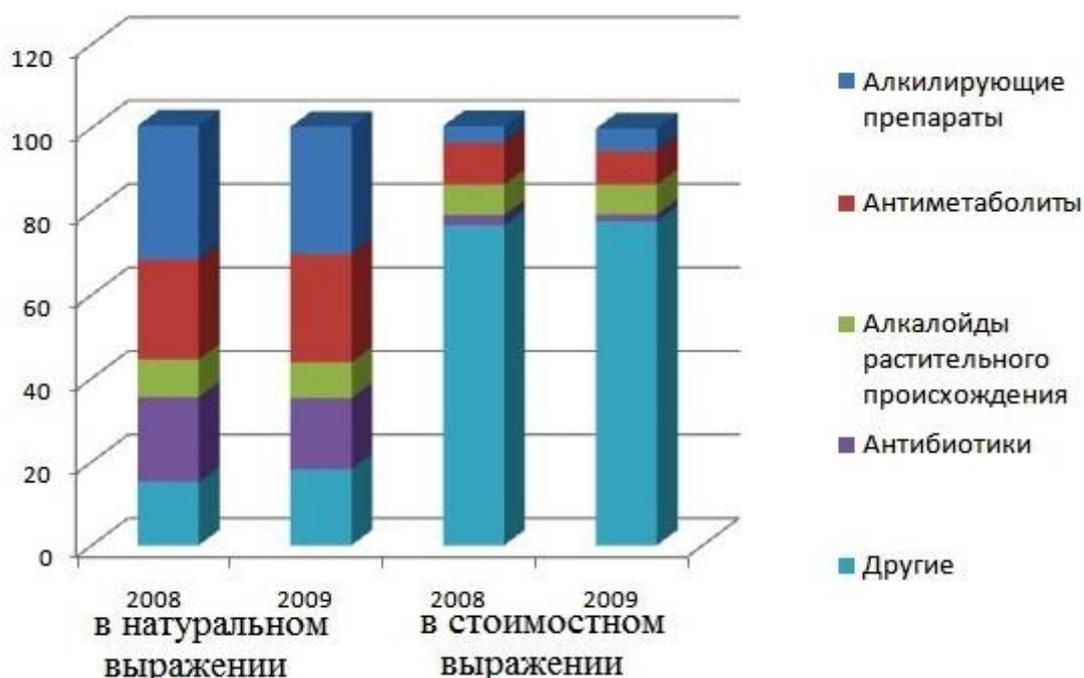


Рисунок 6 – Долевое соотношение различных групп противоопухолевых препаратов по объему продаж [90]

Алкилирующие агенты – это обширная группа противоопухолевых ЛП, содержащая в своей структуре хлорэтиламинные, эпоксидные, этилениминные группы, остатки метансульфоновой кислоты. Также к данной группе относят комплексные соединения платины и производные АНМ. В целом соединения алкилирующего действия включают в себя шесть групп противоопухолевых препаратов [70]. По данным официального сайта Группы компаний РЛС к ним относятся более 1000 препаратов, которые выпускаются в виде порошков, таблеток, капсул, концентратов и лиофилизатов [91].

В основе биологической активности алкилирующих агентов лежит их взаимодействие с веществами путем алкилирования, т.е. замещения атома водорода на алкильную группу. Алкилированию подвергаются различные соединения, в т.ч. и макромолекулы, но в основе механизма действия данной группы лежит взаимодействие с ДНК. В результате нарушения процесса репликации ДНК наблюдаются мутации и гибель раковых клеток. Кроме того, алкилирующие агенты не характеризуются фазоспецифичностью и действие

некоторых из них, в частности производных АНМ, не зависит от клеточного цикла [70, 115].

Как видно из данных, представленных в приложении 1, производные АНМ на российском рынке представлены пятью АФИ и выпускаются в основном в виде лиофилизатов и порошков для приготовления растворов для парентерального применения.

1.4. Класс алкилнитрозомочевин, механизм действия и противоопухолевая активность

Класс АНМ нашел широкое применение в клинической практике при раковых заболеваниях различного генеза. Их систематическое исследование началось ещё с 60-х годов после того, как было обнаружено супермутагенное и противоопухолевое действие 1-метил-3-нитро-1-нитрозогуанидина [160]. После этого были синтезированы сотни АНМ, производных алифатических, ароматических и других соединений [162].

Производные АНМ после ряда метаболических превращений в клетке становятся метилирующими агентами. Метилированию подвергаются гуаниновые и цитозинового остатка ДНК и различных фракций РНК [134, 159].

Обнаружено также карбамоилирование молекул ДНК под действием АНМ. Помимо метилирования и карбамоилирования молекул ДНК, нарушения процессов её репликации и связанных с этими реакциями мутагенных эффектов обнаружено сильное торможение АНМ процесса транскрипции. В основе этого эффекта лежит не только повреждение матричной активности ДНК, но и взаимодействие препаратов с РНК-полимеразой, приводящее к её инактивации [151].

Кроме того, показано вмешательство АНМ в процесс транскрипции, причина которого заключается, видимо, в алкилировании мРНК и карбамоилировании аминогрупп некоторых рибосомальных белков продуктами превращения нитрозомочевин изоцианидами [157].

В процессе синтеза различных производных АНМ одновременно проводились предварительные доклинические исследования, в результате

которых установлен ряд закономерностей, обуславливающих влияние химической структуры на специфическую активность. Например, бисчетвертичные АНМ обладают более высокой активностью, чем моночетвертичные соединения, хлорэтильные производные более активные, чем метильные и т.д. [9, 122, 158].

Препараты данного класса отличаются от других алкилирующих агентов отсутствием перекрестной устойчивости по отношению к другим препаратам этой группы, липофильностью и отсроченным миелосупрессивным действием (5-6 недель). АНМ используются при опухолях ЦНС, а также в комбинированной терапии некоторых солидных опухолей и гемобластозов [48, 126].

В целях расширения спектра действия АНМ при различных злокачественных новообразованиях в России и за рубежом проводят клинические исследования с применением препаратов данного класса.

Нимустин (ACNU, нидран) – водорастворимый ЛП, в доклинических исследованиях проявивший высокую противоопухолевую активность при лейкозах L-1210, С-1498, карциноме Эрлиха, саркоме твердой мозговой оболочки и раке молочной железы. Результаты клинических исследований показали эффективность нидрана в монотерапии или в комбинации с другими ЛП при лечении опухолей головного мозга (ответ наблюдался у 38-71% пациентов), мелкоклеточного рака легкого (47-80% пациентов), рака толстой кишки и желудка (10-15% пациентов) и острых лейкозах (60-80% пациентов) [63].

В ОНЦ РАМН проводили исследования нидрана в комбинациях с этопазидом и цисплатином для лечения рака желудка [6] и вепезидом с цисплатином для терапии мелкоклеточного рака легкого [117]. В первом случае объективный эффект достигал 5,2%, а чувствительность к лечению составила 31%. При приеме второй комбинации объективный эффект отмечен у 57,1% пациентов. Наблюдался значительный рост медианы выживаемости до 12,7 месяцев.

В Институте нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко применяли нидран при лечении нейробластом в качестве монотерапии и в комбинации с лучевой терапией. Объективный эффект составил 30 и 48% соответственно [16].

Ломустин (СсeNU) применяется перорально в монотерапии при глиобластомах, лимфосаркомах, лимфогранулематозе. В литературе описан ряд случаев применения ломустина, в монотерапии или в комбинации для лечения метастатической меланомы с длительной выживаемостью пациентов [83]. Samuel и др. применяли комбинацию из прокарбазина, винкристина и ломустина, из 40 пациентов у двоих в течение 6-6,5 лет наблюдалась полная ремиссия [150]. Кроме того, ломустин показан в комбинации с другими препаратами для лечения рака желудка, толстой и прямой кишки, легкого [48].

Кармустин (BCNU) выпускается в виде лиофилизата для приготовления раствора для инфузий, он рекомендован при различных опухолях мозга, множественной миеломе, лимфогранулематозе.

Berd и др. [101] проводили лечение 147 пациентов с меланомой с комбинацией кармустин, дакарбазин и цисплатин, у 17 пациентов наблюдался полный ответ на терапию. Представленные данные указывают на перспективность применения кармустина при меланоме.

Для лечения глиом в конце 90-х XX века и в начале XXI века проводились исследования эффективности рекомбинантного интерферона-альфа, вводимого после применения кармустина с лучевой терапией. Интерферон-альфа не увеличивал эффективность комбинации кармустина с лучевой терапией, а наоборот вызывал более сильное проявление токсичности [105].

Кроме лиофилизата кармустин выпускается в форме полимерных пластинок Gliadel (рис. 7). Полимерные пластины представляют собой новаторский способ доставки ЛП непосредственно к внутримозговой опухоли высокой степени агрессивности без системной токсичности [116]. До 8 пластин вводятся в полость, возникшую после хирургического удаления опухоли. После имплантации пластины медленно в течение 2-3 недель разрушаются и высвобождают кармустин. В экспериментах на животных было показано, что введение 62 мг кармустина в пластинах обеспечивает концентрацию действующего вещества в тканях мозга в 100-1000 раз больше, чем внутривенное введение растворенного

лиофилизата в дозе 3000 мг. Gliadel не вызывает системных побочных эффектов, которые проявляет кармустин при внутривенном введении [63].

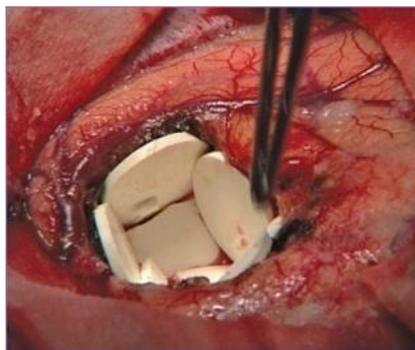


Рисунок 7 – Введение пластинок Gliadel в полость [92]

При проведении клинического изучения действия Gliadel, вводимого 222 пациентам во время операции по поводу рецидива злокачественной глиомы, по сравнению с действием плацебо было отмечено увеличение 6-ти месячной выживаемости на 50% [110].

Стрептозоцин (занозар) является синтезируемым антибиотиком, в отличие от остальных АНМ слабо проникает через ГЭБ. В химиотерапии применяется для лечения островковклеточного рака поджелудочной железы, феохромоцитомы, карциноида [48].

Фотемустин (мюстофоран) плохо растворим в воде, перед введением его растворяют в 95% спирте и разводят в физиологическом растворе натрия хлорида [148]. В проведенных доклинических исследованиях были показаны более выраженные изменения кинетики клеточного цикла при применении фотемустина по сравнению с кармустином [123, 128, 136]. При проведении клинических исследований отмечен эффект данного ЛП при ходжкинских и неходжкинских лимфомах и хроническом лимфолейкозе [48]. Petit и др. [145] описали 5 пациентов с ремиссией длительностью в 7 лет после приема фотемустина при меланоме. Эффект лечения при терапии диссеминированной меланомы достигал 27%, а при метастазах меланомы в головной мозг составил 22,2% [124]. В комбинированной терапии меланомы с дакарбазином и вепезидом общий эффект

составил 32% [147]. В комбинации с цисплатином и тамоксифеном объективный эффект получен в 40% случаях [154].

При лечении опухолей головного мозга у операбельных пациентов фотемустин назначали в день проведения хирургической операции. После 3-х инъекций фотемустина проводили лучевую терапию. Более чем у 50% пациентов наблюдалось улучшение неврологических симптомов, в 30% случаях наблюдалась стабилизация [63].

В монотерапии немелкоклеточного рака легкого эффект фотемустина наблюдался в 13,5% случаях [146]. В комбинации с цисплатином эффективность возрастала до 23% [149].

По результатам проведенных клинических исследований фотемустин рекомендован для лечения меланомы, немелкоклеточного рака легкого и различных опухолей головного мозга.

В конце XX века в США начали проводить исследования ЛП тауромустин (таурин, TCNU). В доклинических исследованиях показано, что таурин менее гепатотоксичен, чем ломустин [103, 121]. При проведении клинических исследований установлено, что он накапливается в больших концентрациях в ЦНС при лечении различных глиом, кроме того значительный эффект достигнут при применении препарата при меланоме, раке желудка, раке легкого (плоскоклеточном и мелкоклеточном) [138, 155].

В настоящее время клинические испытания проходит ещё одно производное АНМ – цистемустин. В монотерапии отмечена высокая противоопухолевая активность ЛП при лечении глиом и меланомы [109]. В последнее десятилетие данный препарат проходил клинические исследования в комбинации с безметиониновой диетой продолжительностью в один день при лечении глиом и метастатической меланомы. Медиана выживаемости составила 4,6 мес, а медиана без признаков заболевания – 1,8 мес. Результаты исследований указывают на перспективность применения цистемустина при лечении меланомы и глиомы [156].

В Японии при хроническом миелоидном лейкозе и истинной полицитемии применяют инъекционный ЛП ранимустин (цимерин, MCNU) [125, 139]. MCNU никогда не проходил оценку FDA, поэтому его применение разрешено только в Японии.

Российский препарат араноза [27, 28] был разработан в ОНЦ АНМ СССР. На I и II фазе клинических исследований отмечалась активность препарата при лечении меланомы, саркомы матки, рака молочной железы, головы, шей, лимфосаркоме, лимфогранулематозе и немелкоклеточном раке легкого [53, 144]. По данным клинических исследований араноза разрешена для клинического применения при меланоме.

В последние годы в отделении химиотерапии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для лечения нейроэндокринных опухолей проводили исследования аранозы в монорежиме и в различных комбинациях с другими противоопухолевыми ЛП (араноза+капецитабин, араноза+темолозомид, араноза+доксорубин). В зависимости от режима введения медиана выживаемости без прогрессирования составляла от 15,3 до 15,8 мес, а объективный эффект – от 16,1 до 33,3%. Представленные данные указывают на перспективность применения аранозы при лечении нейроэндокринных опухолей [65, 66].

Как и большинство противоопухолевых препаратов, производные АНМ обладают выраженной системной токсичностью. С целью повышения избирательности действия проводят конъюгирование цитотоксической части молекулы соединения с различными функциональными группами, способствующими проникновению молекул производных АНМ в опухолевые клетки. У таких производных как лизомустин и ормустин (предмет настоящего исследования) в качестве функциональной группы присоединены остатки аминокислот, которые более интенсивно поглощаются опухолевыми клетками по сравнению с нормальными. Наличие аминокислотного остатка обеспечивает более эффективный транспорт получаемых препаратов через ГЭБ, что служит

перспективой для применения таких производных АНМ при первичных и метастатических опухолях головного мозга [43].

Лизомустин [78, 131] в доклинических исследованиях продемонстрировал свою близость с нидраном по величине и спектру противоопухолевой активности. Также была отмечена лишь частичная перекрестная резистентность с 5-фторурацилом, цисплатином и саркализином [20, 97].

Клинические исследования лизомустина были начаты в 1998 г. В исследованиях I фазы, проведенных у 70 пациентов с различными злокачественными новообразованиями была отмечена чувствительность данного ЛП к меланоме кожи, у 4 пациентов в течение 6 месяцев наблюдалась стабилизация процесса. На II фазе исследований из 74 пациентов частичная регрессия выявлена у 18,8% пациентов, а у 19 человек наблюдалась стабилизация процесса. Чувствительными к лизомустину оказались метастазы меланомы кожи в мягкие ткани, лимфоузлы, легкие, головной мозг. В дальнейших исследованиях изучался эффект лизомустина в двух комбинациях: 1 – лизомустин+винкристин+цисплатин; 2 – лизомустин+блеомицин+цисплатин. Общая эффективность данных комбинаций составила 31%, комбинация с винкристином показала 21,7 % случаев частичной регрессии опухоли, в то время как комбинация с блеомицином была эффективной у 42,1 % больных, включая 10,5% полных регрессий. Различие в эффективности, в первую очередь, обусловлено различными курсовыми дозами лизомустина. Результаты клинических исследований продемонстрировали эффективность данного ЛП для лечения пациентов с диссеминированной меланомой кожи [22].

С целью повышения эффективности, селективности и преодоления быстрого распада ЛП в кровеносном русле проводились исследования по созданию наноструктурированных форм ломустина, кармустина, нимустина, аранозы, лизомустина и ормустина [47, 48, 113].

1.5. Особенности создания лекарственных форм для препаратов из класса алкилнитрозомочевины

При разработке ЛФ необходимо учитывать ряд биофармацевтических характеристик противоопухолевых АФИ, основными из которых являются: химическая лабильность, небольшая широта фармакологического действия, низкие терапевтические дозы, отсутствие специфичности или низкая избирательность противоопухолевого действия. При создании противоопухолевых ЛФ необходимо одновременно проводить ряд биологических исследований, что приводит к существенному увеличению времени разработки [30, 61].

Разработка ЛФ препаратов из класса АНМ для внутривенного введения осложняется высокой химической активностью и низкой стабильностью. Высокая реакционная способность данных соединений связана с наличием в молекуле АНМ связей «С-N», которая расщепляется по нуклеофильному механизму в щелочной и нейтральной средах, и «N-N», которая связана с предварительным протонированием нитрозогруппы с последующим денитрозированием и трансформированием [56, 94].

В литературе существуют противоречивые данные по оптимальному диапазону рН для препаратов АНМ. К. Frederiksson и др. [114] исследовали стабильность БХНМ в 0,01 М цитратном буфере со значением рН от 2,78 до 7,34. По данным их исследования максимальная стабильность действующего вещества наблюдается в области значений рН 3,4 – 4,8. В других источниках указано, что деградация минимальна при рН 5,2 – 5,5 и резко возрастает при значении рН больше 6 [129, 130]. При изучении стабильности тауромустина и ломустина в различных средах и буферах наблюдали увеличение скорости деградации препаратов при рН больше 4. Увеличение скорости гидролиза наблюдалась в основном в средах, содержащих бикарбонат натрия, а присутствие аминокислот, витаминов, неорганических солей и фосфатного буфера практически не оказывало влияние на стабильность [132, 133, 152]. При возрастании рН раствора лизомустина с 3 до 7 наблюдалось возрастание скорости гидролиза в 10 раз [56].

Кроме значения рН среды, основным дестабилизирующим фактором являются: температура, освещенность, растворители, нуклеофилы, ионы тяжелых металлов (стекло первичной упаковки) [8, 112, 118]. Так, у БХНМ температура плавления находится в интервале 29–31°C. При нагревании на водяной бане до температуры 50–60 °С наблюдалось снижение содержания АФИ в растворе лизомустина. В десятки раз наблюдалось возрастания скорости расщепления лизомустина при облучении светом и УФ [21].

Выше приведенные данные указывают на необходимость введения в состав ЛФ данной группы ЛС кроме веществ, повышающих растворимость, различных стабилизаторов. В Исландии проводили исследования по увеличению стабильности ломустина и тауромустина путем добавления циклодекстринов. Комплекс ломустина с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином гидролизует в 2–2,5 раза медленней, чем обычная форма ломустина, а скорость гидролиза комплекса тауромустина с гидроксипропил-α-циклодекстрином меньше в 1,25–1,5 раза, по сравнению с раствором без циклодекстрина [132, 133].

Для уменьшения скорости деградации в несколько раз и поддержания оптимального рН в состав ЛФ аранозы и лизомустина вводили соответственно сорбиновую и лимонную кислоты [95].

Ещё одним методом, применяемым для стабилизации производных АНМ, является сублимационное высушивание. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» разработали режимы для сублимационного высушивания ряда препаратов на основе АНМ (араноза, лизомустин, БХНМ), получаемые лиофилизаты легко гидратировались, были стабильны и фармакологически активны в течение всего установленного срока годности [39].

1.6. Структура и противоопухолевая активность субстанции ормустина

В структуре ормустина цитотоксическая группа присоединена к боковой цепи аминокислоты L-орнитин, а α-амино- и карбоксильная группы, определяющие основные биохимические свойства аминокислот, в том числе их транспорт через клеточные мембраны, сохранены.

Ормустин представляет собой смесь двух изомеров (рис. 8) по положению нитрозо-группы.

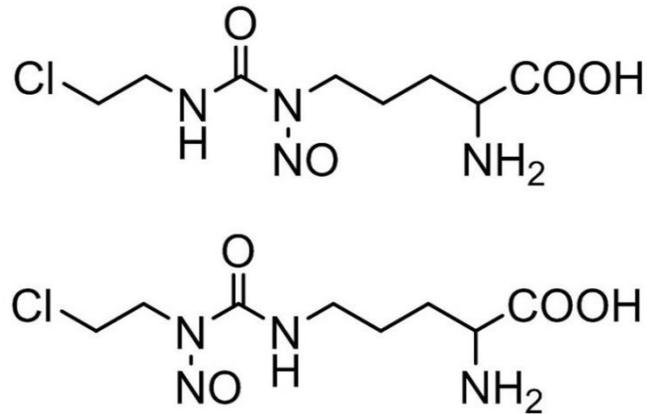


Рисунок 8 – Структурная формула ормустина

Цитотоксическую активность субстанции ормустина *in vitro* изучали на клеточных линиях диссеминированной меланомы человека Mel Kor и Т-лимфобластного лейкоза человека Jurkat.

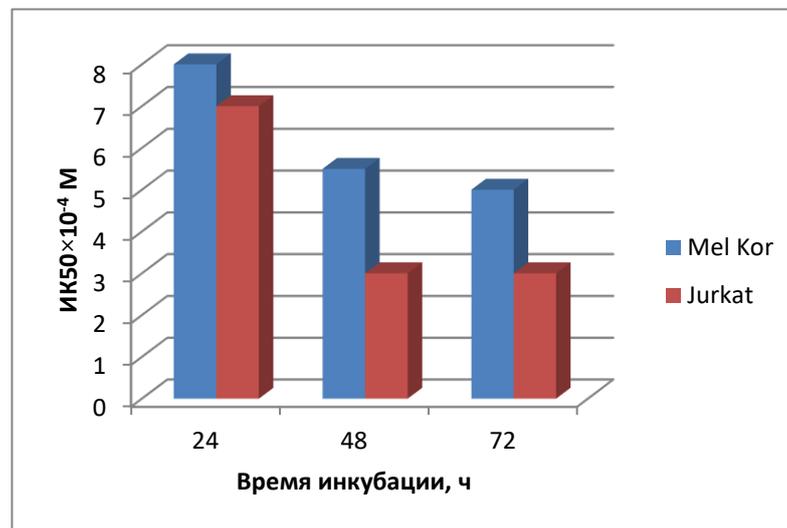


Рисунок 9 – Цитотоксическая активность АФИ ормустина на клеточных линиях диссеминированной меланомы человека Mel Kor и Т-лимфобластного лейкоза человека Jurkat

По данным графика, представленного на рисунке 9, видно, что АФИ ормустина обладает высокой цитотоксической активностью, при увеличении

времени инкубации уменьшается показатель IK_{50} – с 8×10^{-4} до 5×10^{-4} М для Mel Kog и с 7×10^{-4} до 3×10^{-4} М для Jurkat.

Противоопухолевая активность субстанции изучалась *in vivo* при однократном внутривнутрибрюшинном введении на трех опухолевых штаммах: эпидермоидной карциноме лёгкого Льюиса, меланоме В-16 и лимфолейкозе Р388. Исследования проводили на мышах линий DBA/2, C57BL/6 и гибридов BDF1(C57Bl/6×DBA/2), массой 22–27 г. Ормустин *in vivo* не только значительно увеличивал (на 26–238%) продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом Р-388, но и вызывал их излечение. При лечении животных с солидными опухолями (карцинома лёгкого Льюиса и меланома В-16) ормустин дозозависимо значительно ингибировал рост первичного опухолевого узла, увеличивал латентный период появления опухолей у мышей и увеличивал продолжительность жизни животных [7].

Заключение по главе 1

Разработка оригинальных противораковых ЛП является одним из основных направлений развития современной фармацевтической науки. Широкое применение в противоопухолевой терапии нашли алкилирующие агенты. Одним из классов данной группы являются производные АНМ. Они обладают широким спектром противоопухолевого действия, в особенности в комбинации с другими препаратами и, в ряде случаев, превосходят по эффективности другие группы. В Институте органического синтеза им. Постовского синтезировано соединение данного класса – ормустин. Результаты проведения биологических исследований противоопухолевой активности субстанции ормустина в опытах *in vivo* и *in vitro* дали основание для разработки инъекционной ЛФ.

Создание стабильной ЛФ – это многофазный процесс, который начинается с изучения свойств АФИ. Так как парентеральный путь введения обладает рядом преимуществ, в том числе быстрой скоростью наступления терапевтического эффекта, для препаратов из группы АНМ, которые легко гидролизуются, применение этого метода введения является предпочтительнее.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы, реактивы и оборудование

Действующее вещество:

Ормустин – N^ε-нитрозо-N^ε-[N'-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитин и N^ε-[N'-(2-хлорэтил)-N'-нитрозокарбамоил]-L-орнитин (Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург).

Ормустин представляет собой желтовато-белый мелкокристаллический порошок без запаха, M_r=266,68 г/моль. Ормустин умеренно растворим в воде, мало растворим в ДМСО, очень мало растворим в спирте 95% и практически нерастворим в ацетоне и гексане. Структурная формула ормустина представлена на рисунке 8 (стр. 34).

Вспомогательные компоненты:

1. Kollidon 17 PF (BASF The Chemical Company, Германия), Ph Eur, USP, JP;
2. Kollidon 12 PF (BASF The Chemical Company, Германия), Ph Eur, USP, JP ;
3. Kollisolv PEG-400 (BASF The Chemical Company, Германия), Ph Eur, USP, JP;
4. Декстран 70000 (Sigma-Aldrich GmbH, Германия), Ph Eur;
5. Калия фосфорнокислый однозамещенный, х.ч. (Химмед, Россия);
6. Кислота лимонная (Цитробел, Россия), ФС.2.1.0024.15;
7. Лактоза безводная (Химмед, Россия), ГОСТ 33567-2015;
8. Маннит (Химмед, Россия), ГОСТ 8321-74;
9. Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, х.ч. (Химмед, Россия), ГОСТ 4172-76.

Растворители:

1. Аммиак водный 25%, о.с.ч. (Химмед, Россия), ГОСТ 3760-79;
2. н-Бутанол, ч.д.а. (ЗАО Экос-1, Россия), ГОСТ 5208-2013;
3. Вода очищенная, ФС.2.2.0019.15;
4. Вода для инъекций, ФС.2.2.0020.15;

5. Гемодез-Н, раствор для инфузий (Биок, Россия);
6. Глюкоза, раствор для инфузий 5 % (Биосинтез, Россия);
7. Кислота соляная х.ч. (ЗАО «Мосреактив», Россия), ГОСТ 3118-77;
8. Ледяная уксусная кислота (ЛУК), х.ч. (ЗАО «Мосреактив», Россия), ГОСТ 61-75;
9. Натрия хлорид, раствор для инфузий 0,9 % (Биохимик, Саранск);
10. Пропанол-2 (изопропиловый спирт), о.с.ч. (Химмед, Россия), ТУ 2632-181-44493179-2014;
11. Рингер, раствор для инфузий (ЗАО «Рестер», Россия)
12. Спирт этиловый 95%, ФС.2.1.0036.15 (ЗАО «Брынцалов-А» Ферейн, Россия);
13. Хлороформ (трихлорметан) стабилизированный, х.ч. (Химмед, Россия), ТУ 2631-066-44493179-01;
14. Этилацетат (этиловый эфир уксусной кислоты), х.ч. (Химмед, Россия), ГОСТ 22300-76.

Реактивы для анализа:

1. Йод кристаллический, ч.д.а. (Химмед, Россия);
2. Нингидрин (Sigma Spray Reagents, USA).

Вспомогательные материалы для фильтрации:

1. Нейлоновые мембранные фильтры «Pall» N66 с диаметром 25, 47 мм и размером пор 0,22 мкм (Pall Corporation, США; ООО Палл Евразия, Россия);
2. Фильтрационная система Stericup GP Millipore Express Plus с полиэфирсульфоновыми фильтрами, имеющими размер пор 0,22 мкм.

Материалы для хроматографии (ТСХ, ВЭЖХ) и СФМ:

1. Хроматографическая колонка С 10/20 (Amersham Biosciences, Швеция);
2. Хроматографические пластинки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А, 10×15 см (Россия);
3. Стеклокамера с крышкой для ТСХ-анализа;
4. Кюветы с крышкой для спектрофотометрии (Россия).

Оборудование:

1. рН-метр HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Германия);

2. Весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия);
3. Весы лабораторные Sartorius LA1200S (Sartorius AG, Германия);
4. Водяная баня Büchi Heating Bath B-490 (Büchi Labortechnik AG Швейцария);
5. ВЭЖХ хроматограф Agilent 110 с колонкой Phenomenex Luna C 18(2) (Agilent, США);
6. Дозатор Dispensette (BRAND, Германия);
7. Мешалка верхнеприводная механическая RZR 2021 Heidolph с пропеллерным перемешивающим элементом PR 30 Heidolph (Heidolph, Германия);
8. Моечно-дезинфекционная машина Lancer 1400 UP DIN (Lancer, Франция);
9. Полуавтомат ПЗР-34-ВИПС-МЕД для закупорки флаконов колпачками К-2-20 и К-3-34 (ООО «Фирма «ВИПС-МЕД», Россия);
10. Система получения воды для инъекций УВОИ-М-Ф/1812 (Медиана Фильтр, Россия);
11. Спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия);
12. Стеклый фильтрдержатель в комплекте с колбой Millipore (Millipore, Франция);
13. Стерилизатор сухожаровой Binder ED (Binder, Германия);
14. Сублимационная сушка «Edwards Minifast DO.2» (Ero Electronic S.p. A., Италия);
15. Ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия);
16. Экструдер Lipex™ Thermobarrel Extruder 10 мл (Northern Lipids Inc., Lipex Biomembranes, Inc., Канада).

Материалы для проведения биологических исследований

При доклиническом исследовании использованы перевиваемые опухоли мышей, полученные из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России: лимфоцитарная лейкемия Р-388, лимфоидная лейкемия L-1210, эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC), меланома В-16, рак шейки матки РШМ-5.

Исследования проводили на иммунокомпетентных мышах линий C57Bl/6j, DBA/2 и CBA (доноры опухолевого материала) и гибридах первого поколения BDF1 (C57Bl/6j×DBA/2) массой 18–22 г, самки и самцы. Мышей получали из питомника лабораторных животных «Столбовая», а также из отделения лабораторных животных ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и содержали в конвенциональных условиях на брикетированном рационе кормления.

2.2. Методы исследований

2.2.1. Изучение растворимости субстанции ормустина

Изучение растворимости субстанции ормустина проводили визуально при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0005.15) [24].

2.2.2. Приготовления парентеральной лекарственной формы «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг»

Получение концентрата

Субстанцию ормустина, хранившуюся при температуре -18°C , предварительно выдерживали при комнатной температуре в течение 10–15 мин, а затем растворяли под действием УЗ в заранее приготовленном растворе 0,1 М кислоты хлористоводородной, охлажденном до $+15^\circ\text{C}$. К полученному раствору добавляли частями Kollidon 17PF и растворяли до получения светло-желтого прозрачного раствора.

Стерилизация концентрата ормустина

В связи с наличием у противоопухолевых препаратов, в том числе у группы АНМ, таких свойств, как термолабильность и высокая реакционная способность, для их стерилизации наиболее подходит метод стерилизующей фильтрации.

Стерилизацию раствора ормустина проводили под вакуумом через нейлоновые фильтры с размером пор 0,22 мкм с помощью стеклянного фильтродержателя в комплекте с колбой Millipore и через полиэфирсульфоновые фильтры системы Stericup GP Millipore Express Plus, а также под давлением через экструдер Lirеx. Профильтрованный раствор разливали по стеклянным флаконам.

Лиофилизация 2,5% раствора ормустина

Лиофилизацию проводили на сублимационной сушилке Minifast DO.2. При этом раствор ормустина дозировали по 5 мл во флаконы объемом 20 мл, загружали на полки сублимационной сушилки и лиофилизировали с использованием различных температурных режимов:

1. загрузка раствора во флаконах на теплые полки (20°C) с быстрым замораживанием до минус 45 °С и равномерным подъемом температуры со скоростью 2-3 °С/ ч;
2. загрузка раствора во флаконах на теплые полки (20°C) с быстрым замораживанием до минус 45 °С и длительным выдерживанием при данной температуре (10 ч), с последующим равномерным подъемом температуры со скоростью 2-3 °С/ ч;
3. загрузка раствора во флаконах на холодные полки (минус 45 °С) с быстрым замораживанием до минус 45 °С и равномерным подъемом температур со скоростью 2-3 °С/ ч.

Графики изменения температуры при всех трех режимах приведены на рисунке 10.

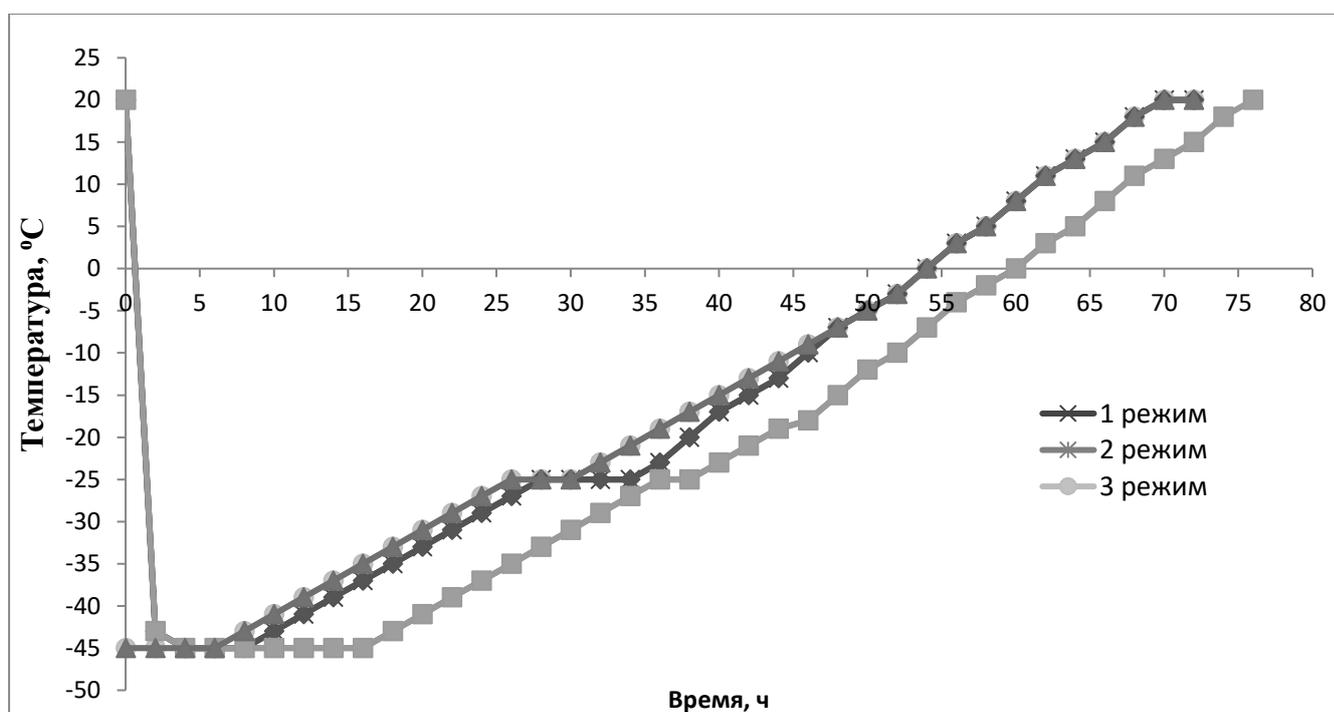


Рисунок 10 – Три режима лиофилизации раствора ормустина

Определение эвтектической температуры в растворе ормустина

Эвтектическую температуру определяли термическим методом [60]. При этом флаконы с раствором замораживали до температуры минус 45°C. После достижения заданной температуры начинали нагрев до 20±2°C. При оттаивании наблюдалось расслоение замороженной «таблетки» моделей ЛФ ормустина. При достижении температуры эвтектики в нижнем слое «таблетки» образовывался раствор.

2.2.3. Методы анализа парентеральной лекарственной формы ормустина

2.2.3.1. Определение подлинности ормустина в парентеральной лекарственной форме

А. ТСХ-анализ

Метод ТСХ включен во множество нормативных документов (ФС, ТУ, мировые и российская фармакопеи) и традиционно применяется в фармацевтическом анализе для оценки подлинности, количественного содержания и чистоты АФИ и ЛФ [23, 68, 71, 81]. С целью установления подлинности компонентов изучаемой ЛФ можно использовать метод ТСХ. Методика анализа приведена в разделе 4.1.

Б. СФМ-анализ

Спектроскопические методы анализа основаны на избирательном поглощении электромагнитного излучения анализируемым веществом и служат для исследования строения, идентификации и количественного определения светопоглощающих соединений [12, 15, 41].

ЭСП в области 200–450 нм имеет два максимума поглощения при 229±2 нм и при 396±2 нм. При проведении исследования используют кюветы с толщиной слоя 10 мм.

В. ВЭЖХ-анализ

ВЭЖХ относится к колоночным хроматографиям, где в качестве подвижной фазы представлена жидкость, движущаяся через колонку, заполненную сорбентом (неподвижной фазой) [19, 25, 26, 111].

При проведении анализа ЛФ на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для определения изомерного состава, должны обнаруживаться два последовательно элюирующихся пика: неактивный изомер 1 (время выхода 8,0–9,0 мин) и активный изомер 2 (время выхода 11,3–12,8 мин). Более подробно данный метод описан в разделе 2.2.3.5. «Определение изомерного состава».

2.2.3.2. Количественный спектрофотометрический анализ ормустина в парентеральной лекарственной форме

Количественное содержание ормустина в ЛФ определяли методом СФМ в видимом диапазоне при длине волне 396 ± 2 нм. Методика анализа представлена в разделе 4.2.

2.2.3.3. Определение рН в концентрате и парентеральной лекарственной форме ормустина

Определение рН концентрата и лиофилизата (после его регидратации) ормустина проводили потенциометрически. Измерения проводили в интервале температур от 20 до 25°C.

2.2.3.4. Определения потери в массе при высушивании

В предварительно высушенный и взвешенный бюкс помещали 0,5 г препарата и сушили до постоянной массы в вакуумном сушильном шкафу над пятиокисью фосфора при комнатной температуре и остаточном давлении 5 мм рт.ст.

2.2.3.5. Определение изомерного состава ормустина в парентеральной лекарственной форме

Ормустин представляет собой смесь двух изомеров. Исследование биологической активности индивидуальных изомеров показало, что только второй изомер обладает противоопухолевой активностью, т.е. терапевтическое действие изучаемого препарата зависит от соотношения изомеров в ПЛФ. Для определения изомерного состава использовали ВЭЖХ.

Приготовление испытуемого раствора: содержимое флакона растворяют в воде и количественно переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят объем колбы

водой до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Проведение анализа: хроматографируют испытуемый раствор, получая не менее 5 хроматограмм. Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». На хроматограмме субстанции определяются два пика, соотношение площадей которых соответствует соотношению изомеров в субстанции.

Содержание второго изомера X_2 в % вычисляют по формуле 1:

$$X_2 = \frac{S_2}{S_2 + S_1} \times 100\%, \quad (1)$$

где S_1 – площадь пика, соответствующего первому изомеру;

S_2 – площадь пика, соответствующего второму изомеру.

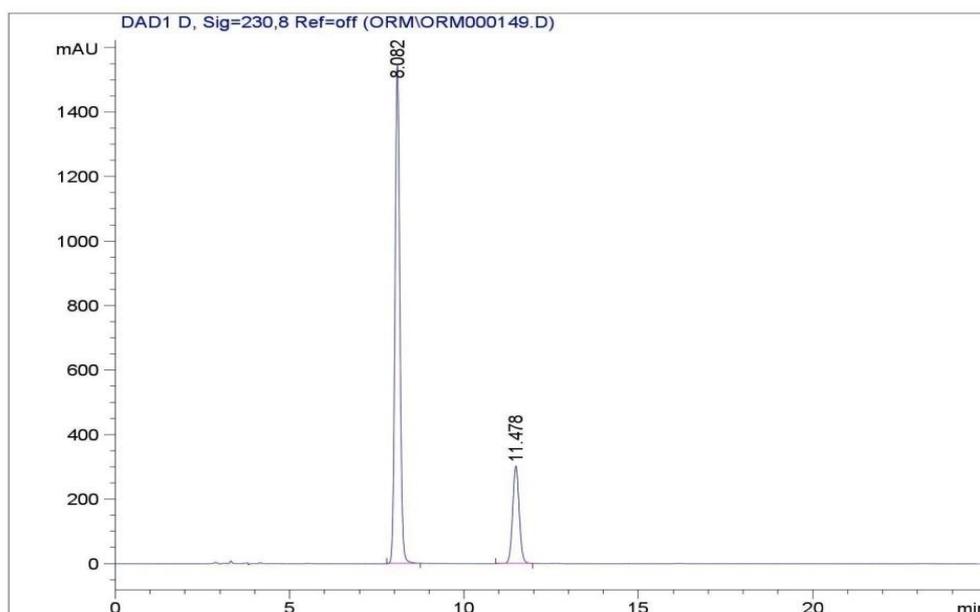


Рисунок 11 – Типичная хроматограмма ПЛФ ормустина

Раствор для определения пригодности системы: используют испытуемый раствор.

Определение пригодности хроматографической системы: система считается пригодной, если выполняются следующие условия: относительные стандартные отклонения результатов измерений времени удерживания и площадей пиков двух изомеров не превышают 2,0%; эффективность колонки (N),

рассчитанная для пика первого изомера не менее 10000 теоретических тарелок; разрешение (R) между пиками первого и второго изомеров не менее 6,0. Фактор асимметрии (T) пиков изомеров один и два должен быть не более 1,5.

Условия хроматографирования:

1. Подвижная фаза: 10 мл спирта этилового 96 % и 90 мл 0,01 М раствора калия фосфата однозамещенного смешивают в круглодонной колбе, перемешивают. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и дегазируют. Срок годности раствора 24 ч.

Приготовление 0,01 М раствора калия фосфата однозамещенного: около 1,36 г калия фосфата однозамещенного (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 1,0 л, растворяют в небольшом количестве воды, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

2. Колонка: длина колонки – 250 мм; внутренний диаметр – 4,6 мм; адсорбент – Phenomenex Luna C18(2) с размером частиц 5 мкм. Допускается использование альтернативной колонки, удовлетворяющей требованиям пригодности хроматографической системы.

3. Детектор: спектрофотометрический, $\lambda=230$ нм.

4. Объем пробы: 10 мкл.

5. Скорость потока: 0,8 мл/мин.

5. Время хроматографирования: 20 мин.

Пример типичной хроматограммы изомеров ормустина в ПЛФ представлен на рисунке 11.

2.2.3.6. Валидация методик количественного спектрофотометрического анализа

Соответствие качества ЛП регламентированным нормам предполагает применение различных аналитических методов, при этом окончательный вывод в значительной степени зависит от качества самого метода, который должен отвечать определенным требованиям. Проведение валидации гарантирует получение достоверных и точных результатов анализа, поскольку позволяет своевременно выявить недостатки методики в процессе разработки [10, 14, 41].

Валидацию проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [24] по таким параметрам, как специфичность, линейность, правильность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность.

2.2.4. Исследование противоопухолевой активности парентеральной лекарственной формы ормустина в опытах *in vivo*

Противоопухолевую активность готовой ЛФ ормустина изучали на нескольких опухолях: лимфоцитарной лейкемии Р-388, лимфоидной лейкемии L-1210, эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC), меланома В-16, рак шейки матки РШМ-5.

Солидные и асцитные опухоли перевивали лабораторным животным по стандартной методике. При перевивке солидных моделей опухолевую ткань измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10 и 0,5 мл полученной суспензии (около 50 мг опухолевых клеток), вводили подкожно в область правой подмышечной впадины. При перевивке асцитных опухолей гибридам первого поколения BDF1 вводили внутривентриально по 0,3 мл асцитной жидкости, разведенной средой 199 и содержащей по 1×10^6 опухолевых клеток. Лечение начинали через 24 ч после перевивки гематобластозов и через 48 ч – солидных опухолей.

Критериями оценки противоопухолевой активности служили:

1. ТРО, расчет вели по формуле 2:

$$\text{ТРО} = \frac{V_{\text{к}} - V_{\text{о}}}{V_{\text{к}}} \times 100\%, \quad (2)$$

где $V_{\text{к}}$ и $V_{\text{о}}$ – средний объем опухоли (мм^3) в контрольной и опытной группах, соответственно.

2. УПЖ, расчет вели по формуле 3:

$$\text{УПЖ} = \frac{P_{\text{к}} - P_{\text{о}}}{P_{\text{к}}} \times 100\%, \quad (3)$$

где $P_{\text{к}}$ и $P_{\text{о}}$ – средняя продолжительность жизни мышей (дни) в контрольной и опытной группах, соответственно.

3. Извлечение (% случаев) – количество животных, проживших 90 дней без признаков опухолевого процесса.

2.2.5. Статистическая обработка результатов анализа

Статистическую обработку данных, полученных в ходе выполнения исследований, проводили с помощью пакета программы Microsoft Office Excel 2007 на основании ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ОРМУСТИНА

3.1. Изучение растворимости субстанции ормустина

Чтобы пройти через мембрану клетки, АФИ должна обладать определенной липофильностью и растворяться в липидном материале мембраны. Кроме того, по своим физико-химическим свойствам вещества могут быть полярными или неполярными, кислыми или основными [30]. Для АФИ со слабо кислыми или основными свойствами рН жидкостей ЖКТ и крови будут контролировать растворимость препарата в организме и, таким образом, скорость абсорбции через мембраны [142].

Так как субстанция ормустина медленно и умеренно растворима в воде (100 мг в 10 мл) с целью возможности повышения растворимости сравнивали растворяющую способность различных растворителей, разрешенных для применения в инъекционных ЛФ.

На данном этапе в качестве растворителей, способствующих повышению растворимости субстанции, использовали растворы маннита, ВМС (Kollidon 12PF, Kollidon 17PF, декстран 7000, ПЭГ-1500, Kollisolv PEG-400), органической (лимонная) и неорганической (хлористоводородная) кислот, сахара (лактоза) (табл. 3).

Оказалось, что повышение растворимости субстанции ормустина более чем в 1,5 раза обеспечивается явлением солюбилизации [32] при добавлении маннита и таких ВМС, как Kollidon 17PF, декстран 70000. Более значимого повышения растворимости – в 2 и более раза удалось достичь только с применением лимонной и хлористоводородной кислот. Причем, при растворении ормустина в растворе 0,1 М хлористоводородной кислоты происходит образование соли (рис. 12) [135, 153].

Таблица 3 – Изучение растворимости АФИ ормустина в различных растворителях

№ п/п	Растворитель	pH раствора	Концентрация ормустина в растворе, %
1.	вода для инъекций	3,9	1,0
2.	раствор маннита 5 %	3,5	1,7
3.	раствор Kollidon 17PF 2 %	3,5	1,8
4.	2 % раствор декстрана 70000	3,6	1,7
5.	раствор маннита 5 % 2 % Kollidon 17PF	3,6	1,6
6.	0,2 % раствор лимонной кислоты	2,9	1,5
7.	2 % раствор лимонной кислоты	2,4	2,0
8.	4 % раствор лимонной кислоты	2,3	2,5
9.	6 % раствор лимонной кислоты	2,2	2,5
10.	раствор лимонной кислоты 2 % 6% лактозы	2,0	2,0
11.	раствор лимонной кислоты 2 % 4% лактозы	2,0	2,2
12.	раствор Kollidon 17PF 10 % 0,1 % лимонной кислоты	3,1	1,6
13.	раствор Kollidon 12PF 10 % 0,1 % лимонной кислоты	3,2	1,7
14.	раствор Kollisolv PEG-400 10 % 0,1 % лимонной кислоты	3,1	1,8
15.	раствор ПЭГ-1500 10 % 0,1 % лимонной кислоты	3,2	1,8
16.	раствор 0,1 М хлористоводородной кислоты	2,0	2,5

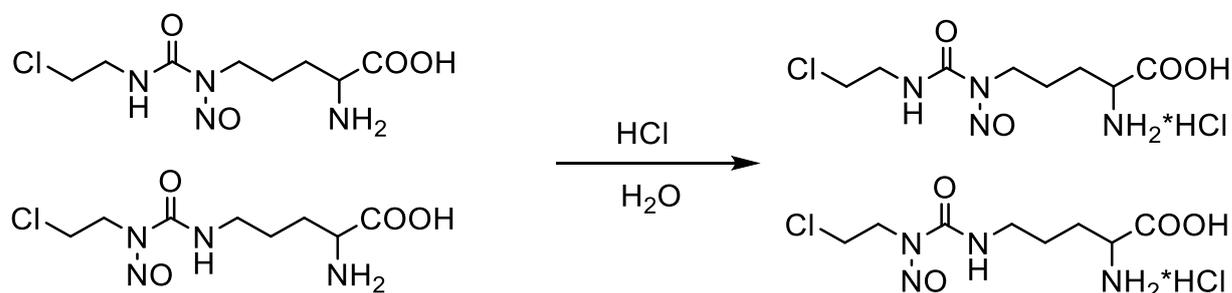


Рисунок 12 – Схема образования гидрохлорида ормустина

Для окончательного выбора растворителя из двух кислот (лимонной и 0,1 М хлористоводородной) проводили исследования биологической активности двух полученных растворов на лабораторных животных. Оказалось, что введение в

состав раствора лимонной кислоты в концентрации 2–6% вызывает гибель лабораторных животных, связанную с гемолитической реакцией. В связи с этим, в качестве растворителя ормустина выбрали 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты.

3.2. Выбор метода растворения ормустина в растворе 0,1 М хлористоводородной кислоты

После выбора растворителя для субстанции ормустина изучали влияние различных методик интенсификации растворимости [137] – нагревание на водяной бане при 60°C, обработка УЗ [58], перемешивание на магнитной или пропеллерной мешалке с целью уменьшения времени растворения и недопущения значительного снижения концентрации действующего вещества в растворе (рис. 13 и 14).

Для определения скорости растворения ормустина в 100 мл 0,1 М хлористоводородной кислоты растворяли 2,5 г субстанции, после получения прозрачного раствора определяли содержание действующего вещества в полученных растворах.

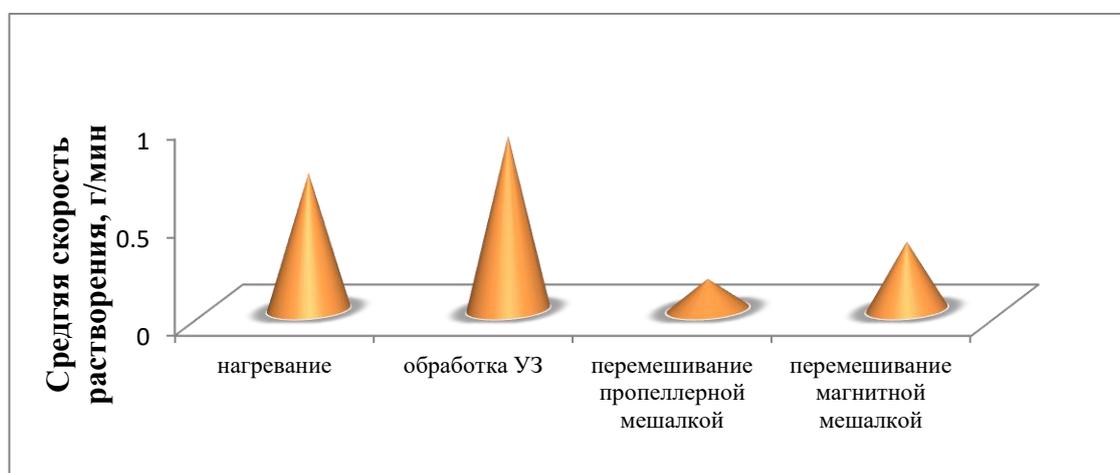


Рисунок 13– Влияние различных методик на скорость растворения субстанции ормустина

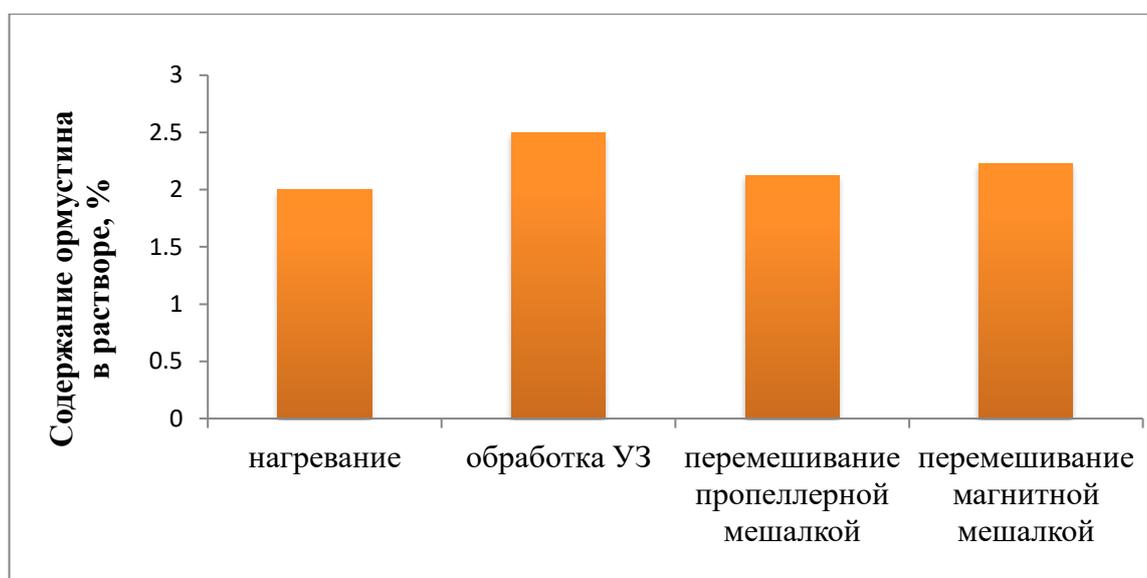


Рисунок 14 – Влияние различных методик на содержание ормустина в растворе после полного растворения

Наиболее быстро со скоростью $0,7 \pm 0,1$ и $0,89 \pm 0,05$ г/мин процесс растворения проходит при нагревании на водяной бане и обработке УЗ, соответственно. Однако применение нагревания нецелесообразно из-за значительного снижения (на 20%) концентрации действующего вещества в растворе по сравнению с теоретическим содержанием. При использовании мешалок потери достигали 15%, а средняя скорость растворения составила лишь 0,16 и 0,35 г/мин при применении пропеллерной и магнитной мешалок, соответственно.

Представленные данные указывают на то, что использование УЗ в технологическом процессе получения ЛФ позволяет значительно снизить продолжительность растворения субстанции и при этом обеспечивает сохранение концентрации активного вещества практически на исходном уровне. Более быстрое растворение действующего вещества под действием УЗ связано с тем, что под действием ультразвуковых микропотоков происходит интенсивное перемешивание слоев жидкостей у самой поверхности, кроме того, в результате кавитационной эрозии и дробления твердых частиц значительно увеличивается поверхность контакта между растворителем и растворяемым веществом [50]. В то время как интенсификация растворения субстанции с помощью перемешивания

на магнитной и пропеллерной мешалках лишь незначительно ускоряет процесс растворения, а нагревание приводит к снижению концентрации действующего вещества более чем на 20% от первоначального.

3.3. Изучение влияние ультразвуковой обработки на изомерный состав ормустина

Субстанция ормустина представляет собой смесь двух изомеров (неактивного и активного). От стабильности изомерного состава зависит противоопухолевая активность разрабатываемого препарата. При этом 10 г АФИ растворяли под действием УЗ и исследовали влияние времени и температуры, при которых происходит растворение, на изомерный состав ормустина (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние УЗ на изомерный состав ормустина

Температура, °С	Время воздействия, мин	Соотношение изомеров 1:2
+20±2 °С	0	79,75 : 20,25
	22	79,77 : 20,23
	48	79,89 : 20,11
+15±2 °С	0	79,81 : 20,19
	22	79,83 : 20,17
	56	80,11 : 19,89

Из данных, представленных в таблице 5 видно, что непродолжительное воздействие УЗ (до 48 мин при +20±2 °С) практически не влияет на изомерный состав ормустина и содержание второго изомера находится в пределах нормы (20,0-24,0%). Поэтому можно сделать вывод о целесообразности применения УЗ в технологии получения ПЛФ ормустина.

3.4. Изучение стабильности раствора ормустина в процессе хранения

Изучение стабильности 2,5% раствора ормустина в процессе хранения проводили в течение 5 суток. При этом свежеприготовленный раствор ормустина хранили при комнатной температуре (22°С) и в холодильнике (4°С). В определенные промежутки времени (после приготовления, через 3 ч, через 6 ч, через 24 ч, через 48 ч, через 72 ч и через 120 ч) оценивали внешний вид растворов

и контролировали содержание действующего вещества в растворе (рис. 15) и pH раствора.

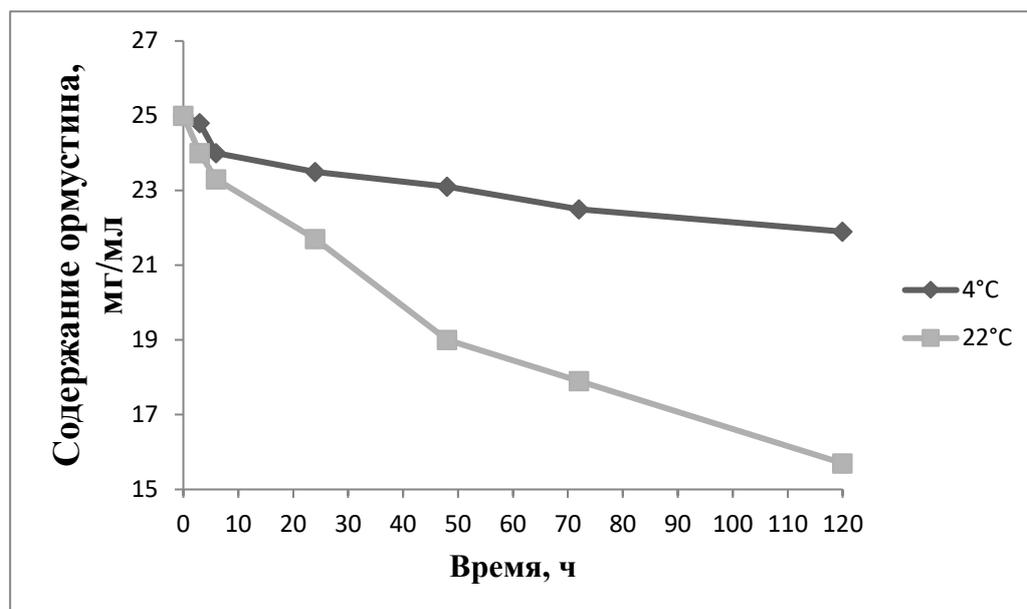


Рисунок - 15. Изменение содержания ормустина в растворе в процессе хранения

За все время эксперимента не наблюдалось внешних изменений (прозрачный, светло-желтый раствор), а также изменения pH (2,1-2,2). Но концентрация раствора за 5 суток упала на 12,5 и на 37% при хранении в холодильнике и при комнатной температуре соответственно. Поэтому с целью увеличения срока хранения раствора необходимо введение стабилизаторов или проведение лиофилизации данной ЛФ.

3.5. Изучение влияния формообразователей на стабильность ормустина в растворе

Поскольку 2,5% раствор ормустина нестабилен при хранении, для повышения срока хранения ЛФ необходимо проводить её лиофилизацию. В связи с этим, изучали влияние введения в состав раствора ормустина формообразователей. Формообразователи в процессе сублимационной сушки отвечают за формирование пористой лиофильной массы и, в то же время, обеспечивают отсутствие значимого снижения содержания действующего

вещества в растворе во время проведения технологических операций (как минимум в течение 3 ч).

При изготовлении модельных составов 2,5 г. субстанции ормустина растворяли в 100 мл раствора 0,1 М хлористоводородной кислоты под действием УЗ. К раствору ЛВ добавляли одно или смесь ВВ: Kollidon 12PF и 17PF, лактозу, маннит, лимонную кислоту в различных концентрациях и фильтровали полученные растворы.

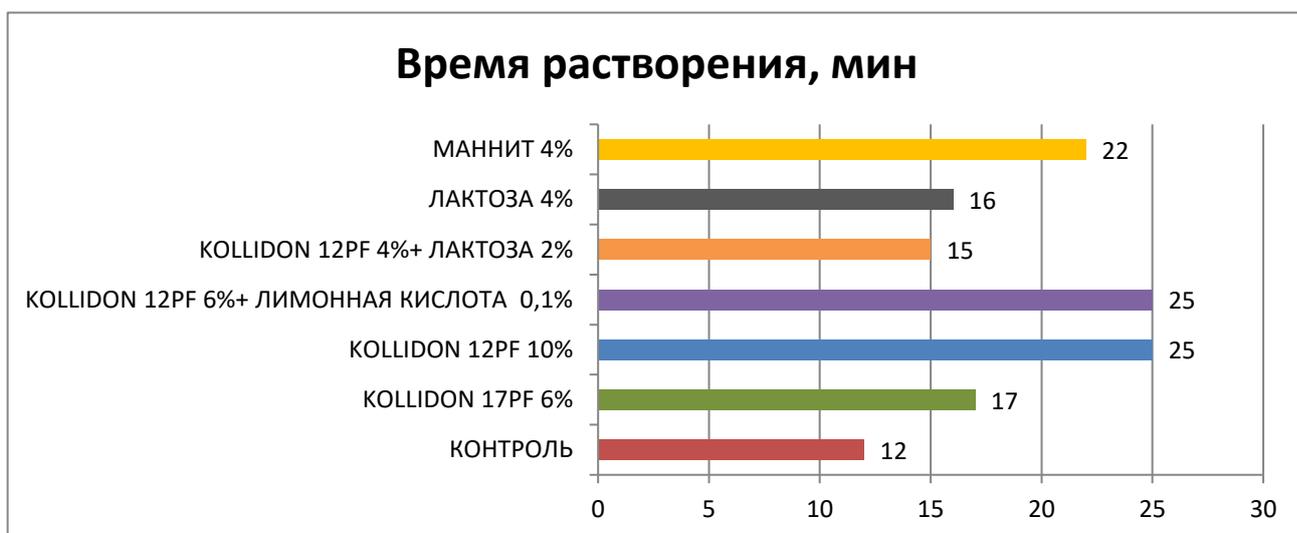


Рисунок 16 – Влияние формообразователя на время получения прозрачного раствора

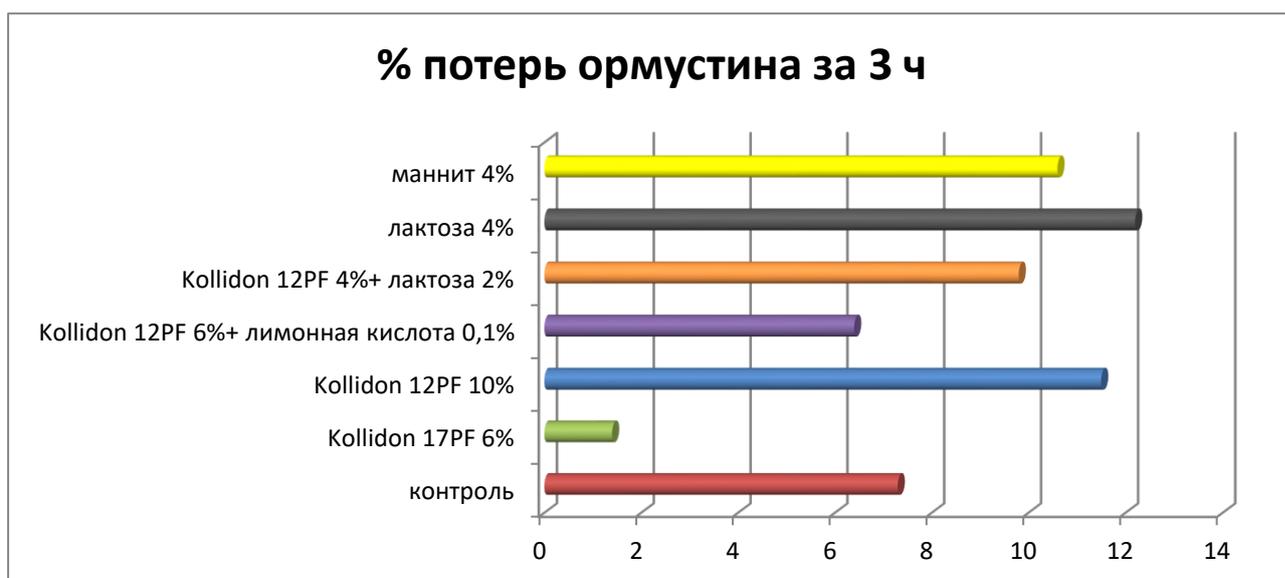


Рисунок 17 – Влияние формообразователя на стабильность ормустина в растворе

Все растворы были прозрачные, светло-желтого цвета. рН сразу после растворения и через 3 ч оставалось постоянным и составляло для всех растворов 2,0-2,1. Результаты измерений, представленные на рисунках 16 и 17, указывают на то, что добавление в состав модельного раствора в качестве соразтворителя и формообразователя 6% Kollidon 17PF значительно снижает потерю действующего вещества с 7,3% до 1,4% в процессе приготовления концентрата. В растворе, содержащем смесь 6% Kollidon 12PF и 0,1% лимонной кислоты, наблюдали небольшое снижение потери ормустина, тогда как добавление 10% Kollidon 12PF или смеси 4% Kollidon 12PF с 2% лактозой наоборот приводило к ускорению разрушения действующего вещества в 1,5 раза. Введение в состав 4% лактозы и 4% маннита привело к усилению деструкции ЛВ примерно в 2,5 раза. В связи с вышесказанным, в качестве наиболее оптимального формообразователя, стабилизирующего раствор ормустина, выбран Kollidon 17PF в концентрации 6%.

3.6. Изучение влияния фильтрующего материала на содержание ормустина в растворе

В связи с тем, что разрабатываемую ЛФ ормустина планируется применять для парентерального введения, необходимо было выбрать метод ее стерилизации и оценить его влияние на содержание АФИ в ЛФ.

Выделяют 4 основных метода стерилизации ЛП: термический (насыщенным водным паром под давлением; горячим воздухом), химический (растворы антисептиков; газы), фильтрованием (через фильтры с требуемым размером пор) и радиационный (облучение продукта ионизирующим излучением) [24].

Для растворов термолабильных веществ, к которым относится ормустин, наиболее эффективным методом стерилизации, оказывающим наименьшее негативное воздействие на качество ЛП, является стерилизующая фильтрация. При этом раствор пропускают через фильтры с номинальным размером пор не более 0,22 мкм, способные задерживать не менее 10^7 микроорганизмов *Pseudomonas diminuta* на 1 см² поверхности.

При выборе материала для фильтрации учитывают:

- совместимость фильтруемой жидкости с материалами фильтрующей системы;
- скорость фильтрации;
- объем серии продукта;
- пропускная способность фильтра и др.

Исследования проводили путем фильтрации раствора ормустина через нейлоновые и полиэфирсульфоновые мембранные фильтры.

Таблица 5 – Влияние фильтрующего материала на содержание ормустина в растворе

Фильтрующий материал	Содержание ормустина в растворе, мг/мл	
	до фильтрации	после фильтрации
нейлон	25,0±0,3	24,8±0,5
полиэфирсульфон	25,0±0,3	14,0±0,5

Скорость фильтрования была одинаково и составила 45-50 мл/мин. При использовании полиэфирсульфоновых фильтров наблюдалось значительное снижение, более чем на 40%, содержание действующего вещества в растворе, тогда как при использовании нейлоновых фильтров потери не превышали 2% (табл. 5). Анализ полученных данных позволяет говорить о вероятном взаимодействии субстанции или хлористоводородной кислоты с полиэфирсульфовыми мембранами и невозможности их дальнейшего применения в технологии получения инъекционной ЛФ ормустина. Так как применение нейлоновых фильтров не приводит к существенному снижению содержания ормустина их применяли в дальнейших исследованиях.

3.7. Разработка режима лиофилизации раствора ормустина

Перед разработкой режима лиофилизации ЛФ проводили изучение влияния процесса замораживания на стабильность действующего вещества. При этом флаконы, содержащие по 5 мл раствора, выдерживали при температуре -18°C в течение 24 ч. До заморозки и после разморозки определяли содержание ормустина.

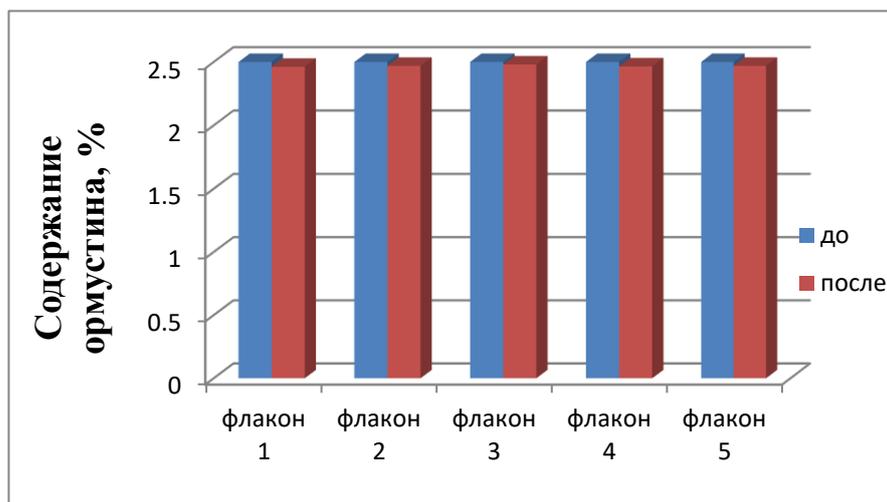


Рисунок 18 – Изменение содержания действующего вещества в ПЛФ после заморозки

Как видно по данным графика, представленного на рисунке 18, снижение концентрации действующего вещества при заморозке было незначительным и не превышало 1,5%, следовательно, для данного раствора можно проводить лиофилизацию.

Перед выбором условий заморозки раствора ормустина определяли температуру эвтектики (температуру полного затвердевания раствора) термическим методом, который основан на фиксации температуры при медленном оттаивании замороженного раствора [57]. Эвтектическая температура раствора ормустина находится в диапазоне от -23 до -26°C .

В процессе разработки режима сушки сравнивали различные режимы лиофилизации (рис. 10). Описание данных режимов приведено в разделе 2.2.2. Оценивали эффективность предложенных режимов по параметрам: продолжительность лиофилизации и качество полученного лиофилизата (внешний вид, изменение рН, потери ЛВ при лиофилизации, регидратируемость) (табл. 6).

Таблица 6 – Сравнение параметров лиофилизатов ормустина, полученных при различных режимах лиофилизации

Параметр		Режим лиофилизации		
		1	2	3
продолжительность лиофилизации, ч		72	76	72
внешний вид лиофилизата		однородная пористая «таблетка»		«таблетка» с кристаллической структурой
регидратируемость водой		проходит легко	проходит легко	затруднена
рН	до лиофил.	2,1	2,1	2,1
	после лиофил.	2,1	2,1	2,1
% потерь содержания ормустина при лиофилизации		0,6	1,4	1,1

Использование 1 и 2 режимов позволяет получить лиофилизат надлежащего качества с незначительными потерями действующего вещества (до 1,4%), однако так как 1 режим требует меньших затрат времени, он предложен для получения ПЛФ ормустина, при котором препарат замораживали до -45°C на полке сублимационной установки (температура полки -45°C) и выдерживали при данной температуре в течение 3-х ч, а затем включали вакуум. После выравнивания вакуума, температуры конденсатора и препарата повышали температуру полки на $+5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ до достижения -25°C . Далее подъем температуры вели (после прохождения зоны эвтектики препарата) со скоростью $+3^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. При достижении температуры на препарате 0°C осуществляли постепенный подъем температуры до $+20^{\circ}\text{C}$ со скоростью $+2^{\circ}\text{C}/\text{ч}$., а после достижения заданной температуры на препарате проводили досушивание (удаление остаточной влаги) в течение 3-х ч.

График изменения температуры на препарате при выбранном режиме представлен на рисунке 19.

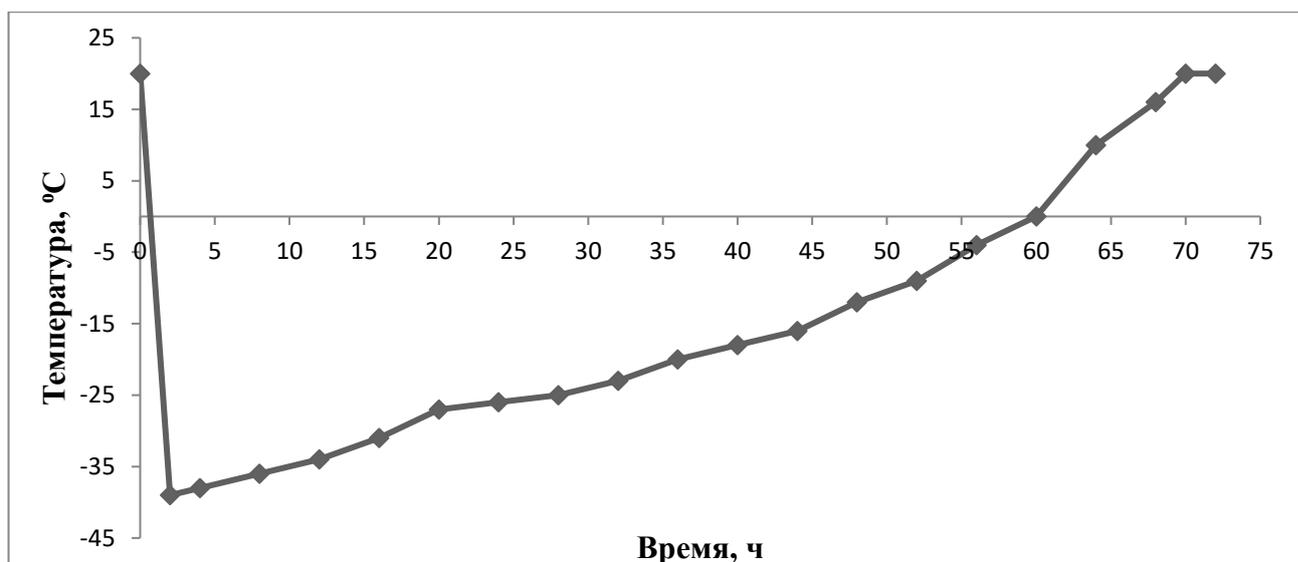


Рисунок 19 – График изменения температуры на препарате в процессе лиофилизации

3.8. Выбор растворителя для регидратации парентеральной лекарственной формы ормустина перед введением

На завершающем этапе технологических исследований необходимо было подобрать растворитель для регидратации полученного лиофилизата. С этой целью оценивали влияние наиболее часто применяемых растворителей для инъекционного пути введения (вода для инъекций, 0,9% раствор NaCl, 5% раствор глюкозы, раствор Рингера, Гемодез-Н и фосфатный буферный раствор с рН=6,8-7,1) на значение рН и физическую стабильность раствора, получаемого после регидратации лиофилизата ормустина (табл. 7).

Таблица 7 – Изменение рН при добавлении различных объемов растворителей к ПЛФ ормустина

Объем добавляемого растворителя, мл	Значение рН при добавлении к лиофилизату раствора:					
	вода для инъекций	0,9% раствор NaCl	5% раствор глюкозы	Рингера	Гемодез-Н	Фосфатный буфер
5	2,1	2,0	2,0	2,0	2,3	не растворился
10	2,1	2,0	2,1	2,1	2,5	6,5
15	2,1	2,1	2,2	2,3	2,9	-

Все растворители обеспечивали получение истинного раствора, но значительное повышение рН обеспечило только применение фосфатного буферного раствора. В дальнейшем с целью выбора наиболее приемлемого растворителя из шести предложенных оценивали их влияние на стабильность ормустина в получаемом после регидратации растворе. С этой целью лиофилизат ормустина растворяли в 5 мл воды для инъекций, 0,9% растворе NaCl, 5% растворе глюкозы, растворе Рингера и Гемодез-Н и в 10 мл растворе фосфатного буфера и измеряли содержание действующего вещества в контрольных временных точках – 1, 3, 8, 24 ч. (рис. 20).

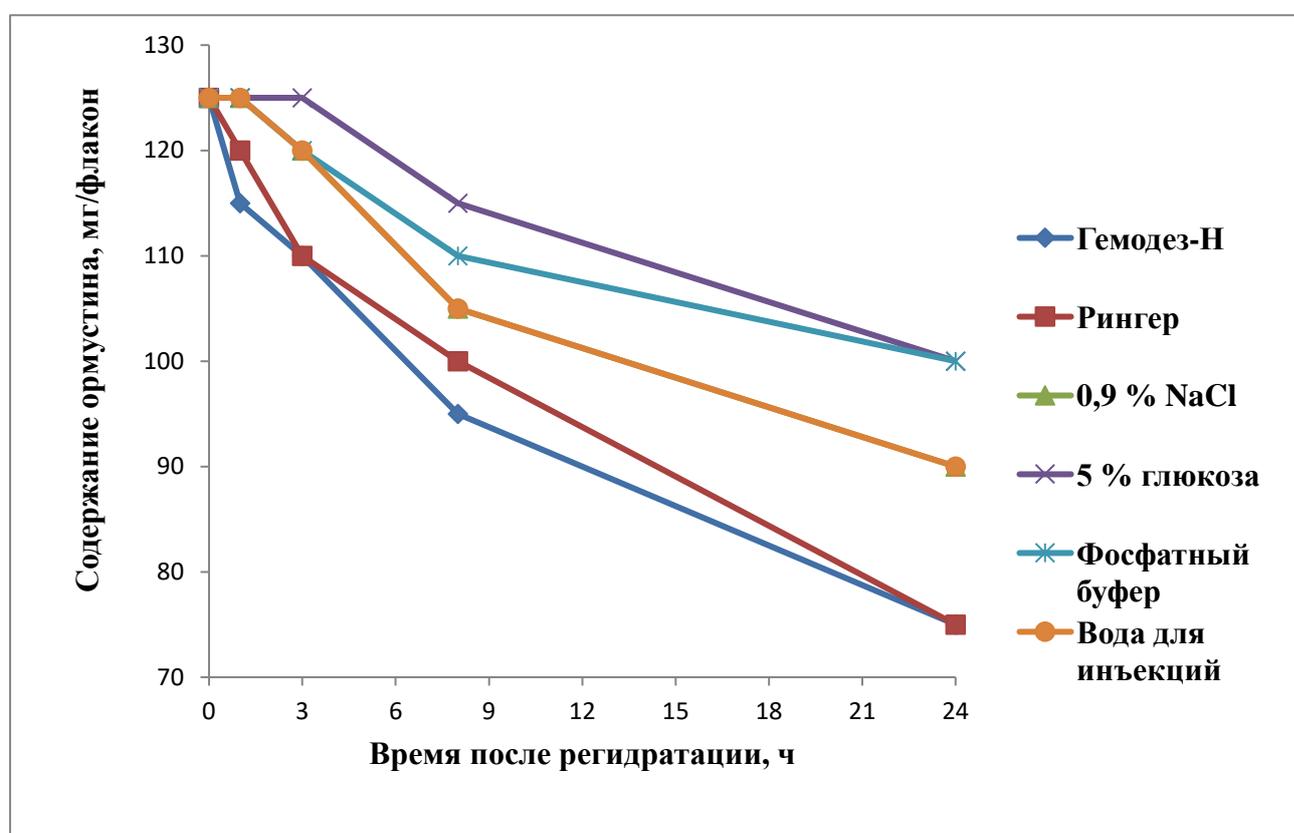


Рисунок 20 – Стабильность растворов ормустина после регидратации при использовании различных растворителей

При применении растворов Рингера и Гемодеза-Н уже через 1 ч после регидратации лиофилизата наблюдали снижение содержания действующего вещества, потери составили 4 и 8%, соответственно. По прошествии одних суток в растворах с упомянутыми растворителями концентрация ормустина падала на 40% от первоначальной. Использование в качестве растворителей воды для инъекций

инъекций, изотонического раствора NaCl и фосфатного буферного раствора позволяло сохранить исходную концентрацию ормустина в течение 1 ч, а 5% раствора глюкозы – в течение 3 ч. Наименьшие потери действующего вещества на всех этапах эксперимента наблюдали при использовании в качестве растворителей 5% раствора глюкозы и раствора фосфатного буфера. Однако низкий показатель pH при внутривенном введении мышам приводил к проявлению местно-тканевых реакций, поэтому для проведения доклинических исследований предпочтительней использовать фосфатный буферный раствор с pH=6,8-7,1.

3.9. Технологическая схема получения готовой ПЛФ ормустина

В результате проведения ряда экспериментов была разработана ПЛФ «Ормустин, лиофилизат для приготовления инъекционного раствора 125 мг» следующего состава:

Ормустин	125 мг
Kollidon 17PF	300 мг
Кислота хлористоводородная концентрированная	16 мг

Технологическая схема приготовления данной ЛФ представлена на рисунке 21. По разработанной технологии составлен лабораторный регламент на получение готовой ПЛФ ормустина.

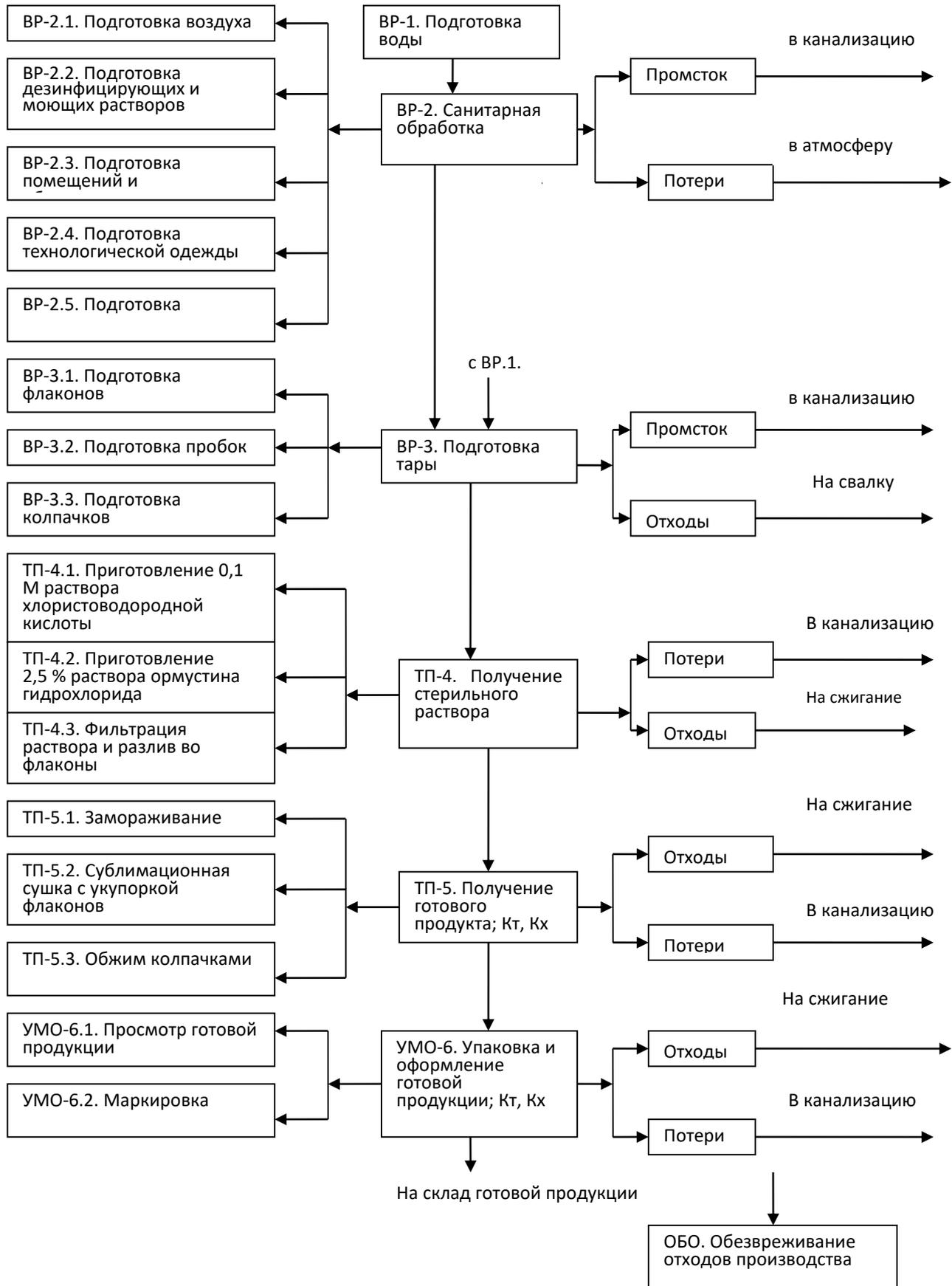


Рисунок 21 – Технологическая схема получения ПЛФ ормустина

Заключение по главе 3

В ходе проведения исследований по созданию инъекционной ЛФ нового производного АНМ ормустина изучена его растворимость в различных водных растворителях, содержащих спирт, ВМС, органическую и неорганическую кислоты, сахар. Раствор 0,1 М хлористоводородной кислоты позволил значительно повысить растворимость субстанции с образованием 2,5% раствора ормустина. Оптимизировано время растворения ормустина путем изучения влияния различных технологических приемов на скорость образования прозрачного раствора. С целью получения стабильной во времени ЛФ разработан режим лиофилизации, для эффективного применения данного процесса выбран поливинилпирролидон марки Kollidon 17PF в концентрации 6% в качестве формообразователя и соразтворителя, позволяющего получить лиофилизат надлежащего качества. На завершающем этапе работы оценено влияние растворителей для парентерального пути введения на стабильность получаемого при регидратации лиофилизата раствора ормустина. Установлено, что растворителями, обеспечивающими наиболее длительную стабильность полученного раствора являются вода для инъекций, изотонический раствор натрия хлорида, 5% раствор глюкозы и фосфатный буферный раствор.

В результате проведения комплекса технологических экспериментов разработана лиофилизированная ПЛФ ормустина, которая передана на доклинические исследования.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПЛФ ОРМУСТИНА

Создание новой ЛФ предполагает разработку методик контроля качества и стандартизации. Наиболее перспективными являются оптические [12] и хроматографические [19, 64] методы анализа в связи с их простотой исполнения, экспрессностью, достаточной точностью и воспроизводимостью.

4.1. Разработка методики качественного определения ормустина и Kollidon 17PF в парентеральной лекарственной форме методом тонкослойной хроматографии

Хроматографирование проводили с использованием пластинок «Sorbfil» и стандартного образца (СО) [54]. Оценку эффективности системы растворителей проводили по следующим параметрам:

- количество зон адсорбции (пятен) веществ, образующихся при разделении смеси компонентов;
- значение фактора удерживания R_f анализируемых веществ;
- время пробега подвижной фазы.

Приготовление испытуемого раствора: содержимое флакона растворяют в 12,5 мл воды.

Приготовление раствора стандартного образца 1 (СО-1): в мерную колбу на 25 мл отвешивают 250 мг ормустина и растворяют в небольшом количестве воды, доводят объем колбы водой до метки.

Приготовление раствора стандартного образца 2 (СО-2): в мерную колбу на 25 мл отвешивают 600 мг Kollidon 17PF и растворяют в небольшом количестве воды, доводят объем колбы водой до метки.

Приготовление йодной камеры: в эксикатор помещают тигель, в который засыпают 1 г кристаллов йода. Время насыщения парами – 15-20 мин.

Приготовление раствора нингидрина: 0,3 г нингидрина растворяют в 100 мл н-бутанола, прибавляют 3 мл ЛУК. Раствор используют свежеприготовленным.

Описание методики: на линию старта хроматографической пластинки

размером 15×10 см наносят по 5 мкл испытуемого раствора (50 мкг ормустина и 120 мкг Kollidon 17PF), раствора СО-1 (50 мкг ормустина), раствора СО-2 (120 мкг Kollidon 17PF). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 10 мин, помещают в камеру, насыщенную парами подвижной фазой, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы достигнет линии финиша, пластинку вынимают из камеры и сушат на воздухе. После этого пластинку помещают в йодную камеру, где проявляются желтые пятна Kollidon 17PF. Затем пластинку опрыскивают раствором нингидрина и сушат в сушильном шкафу при температуре от 100 до 105°С в течение 5 мин. Ормустин проявляется в виде пятен фиолетового цвета.

Подбор подвижной фазы для определения ормустина в ПЛФ

После изучения литературных данных по проведению ТСХ-анализа препаратов группы АНМ [38, 73, 96] остановились на ряде подвижных систем, которые приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Значение показателей R_f ормустина и Kollidon 17PF в различных системах растворителей

№ п/п	Подвижная фаза		Значение R_f			
	растворители	соотношение	ормустин		Kollidon 17PF	
			ЛФ	СО-1	ЛФ	СО-2
1.	спирт 95%: ледяная уксусная кислота (ЛУК): вода	12:3:5	0,07	0,07	старт	старт
2.	н-бутанол: ЛУК: вода	12:3:5	0,42	0,42	старт	старт
3.	пропанол-2: аммиак водный	3:2	0,5	0,5	0,63	0,63
4.	спирт 95%: аммиак водный	3:2	0,61	0,61	0,78	0,78
5.	н-бутанол: аммиак водный	3:2	0,07	0,07	старт	старт
6.	н-бутанол: аммиак водный	2:1	старт	старт	старт	старт
7.	этилацетат: спирт 95%: аммиак водный	10:4:1	0,34	0,35	0,08	0,09
8.	хлороформ: спирт 95%	7:1	0,63	0,63	старт	старт

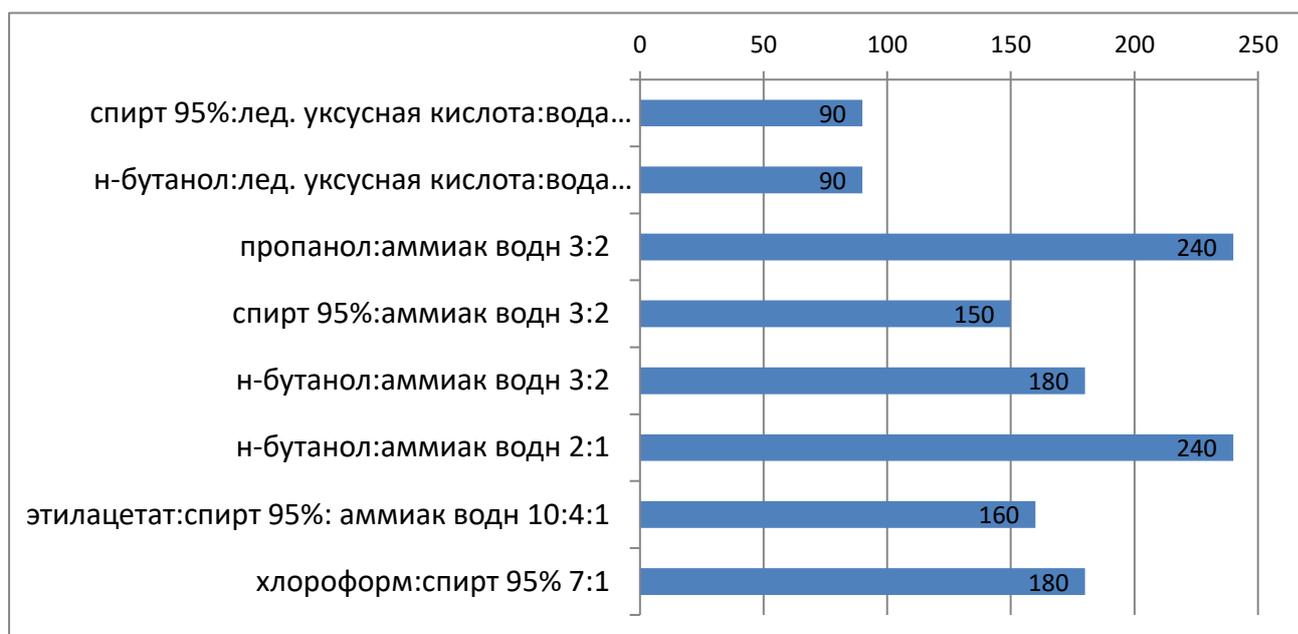


Рисунок 22 – Время подъема фронта в различных системах растворителей

Из всех приведенных систем наиболее быстрое (90 мин) поднятие фронта растворителя наблюдалось в системе н-бутанол:ЛУК:вода (12:3:5), поэтому в дальнейших исследованиях для идентификации ормустина методом ТСХ использовали данную систему. Kollidon 17PF малоподвижен, из восьми систем он поднимался от линии старта только в трех системах, причем наиболее быстрый (в течение 150 мин) подъем фронта подвижной фазы наблюдался в системе спирт 95%: аммиак водный (3:2). Поэтому если в ЛФ требуется дополнительно идентифицировать Kollidon 17PF, то следует применять систему спирт 95%: аммиак водный (3:2) (рис. 22).

Оценка пригодности хроматографической системы н-бутанол:ЛУК:вода (12:3:5) для определения ормустина

Оценку пригодности системы проводили путем установления предела обнаружения вещества, для ормустина он составил 1 мкг.

Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы 1 (ПР-1): в мерную колбу на 25 мл переносят 0,5 мл СО-1, перемешивают и доводят объем колбы водой до метки.

Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы 2 (ПР-2): в мерную колбу на 25 мл переносят 1 мл СО-1, перемешивают

и доводят объем колбы водой до метки.

Методика анализа

На линию старта хроматографической пластинки наносят пробы: 1 – 5 мкл испытуемого раствора (50 мкг ормустина); 2 – 5 мкл СО-1 (50 мкг ормустина), 3 – 5 мкл ПР-1 (1 мкг ормустина), 4 – 5 мкл ПР-2 (2 мкг ормустина).

Пластинку помещают в камеру, насыщенную парами системой н-бутанол:ЛУК:вода (12:3:5), плотно закрывают крышкой и хроматографируют. После достижения фронтом системы линии финиша пластинку вынимают, подсушивают на воздухе, после чего пластинку опрыскивают раствором нингидрина и сушат в сушильном шкафу при температуре от 100 до 105°C в течение 5 мин. Ормустин проявляется в виде пятен фиолетового цвета.

На хроматограмме (рис. 23) наблюдают проявление 4 пятен фиолетового цвета. Далее определяют значения R_f : 1 – 0,42; 2 – 0,42; 3 – 0,42; 4 – 0,42.

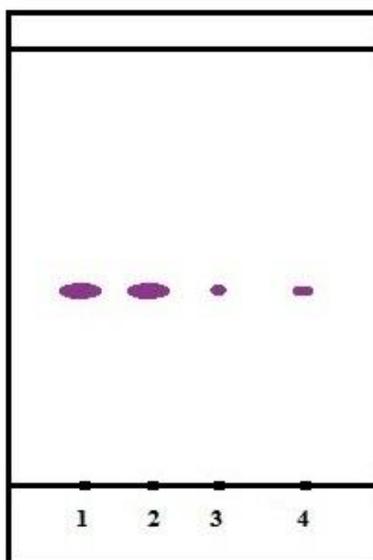


Рисунок 23 – Хроматограмма системы н-бутанол:ЛУК:вода (12:3:5): 1 – испытуемый раствор (50 мкг ормустина), 2 – СО-1 (50 мкг ормустина), 3 – ПР-1 (1 мкг ормустина), 4 – ПР-2 (2 мкг ормустина)

Значение R_f и проявление четырех пятен фиолетового цвета указывает на пригодность системы н-бутанол:ЛУК:вода (12:3:5).

Оценка пригодности хроматографической системы спирт 95%:аммиак водный (3:2) для определения Kollidon 17PF

Оценку пригодности системы проводили путем установления предела обнаружения вещества, для Kollidon 17PF он составил 1 мкг.

Приготовление раствора для проверки пригодности систем 3 (ПР-3): во флакон на 20 мл переносят 0,1 мл СО-2, добавляют 5,9 мл воды, перемешивают.

Приготовление раствора для проверки пригодности системы 4 (ПР-4): во флакон на 20 мл переносят 2 мл ПР-3, добавляют 2 мл воды, перемешивают.

Методика анализа

На линию старта хроматографической пластинки наносят пробы: 1 – 5 мкл испытуемого раствора (50 мкг ормустина, 120 мкг Kollidon 17PF); 2 – 5 мкл СО-2 (120 мкг Kollidon 17PF), 3 – 5 мкл ПР-3 (2 мкг Kollidon 17PF), 4 – 5 мкл ПР-4 (1 мкг Kollidon 17PF).

Пластинку помещают в камеру, насыщенную парами системой спирт 95%:аммиак водный (3:2), плотно закрывают крышкой и хроматографируют. После достижения фронтом системы линии финиша пластинку вынимают, подсушивают на воздухе. Kollidon 17PF проявляют помещением пластинку в йодную камеру. Kollidon 17PF проявляется в виде пятен ярко желтого цвета.

Наблюдают проявление 4 пятен желтого цвета со значением R_f : 1 – 0,78; 2 – 0,78; 3 – 0,78; 4 – 0,78 (рис. 24).

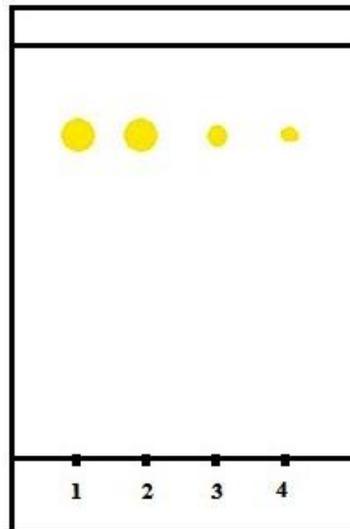


Рисунок 24 – Хроматограмма системы спирт 95%: аммиак водный (3:2) после йодной камеры: 1 – испытуемый раствор (120 мкг Kollidon 17PF), 2 – СО-2 (120 мкг Kollidon 17PF), 3 – ПР-3 (2 мкг Kollidon 17PF), 4 – ПР-4 (1 мкг Kollidon 17PF)

Затем пластинку опрыскивают раствором нингидрина и сушат в сушильном шкафу при температуре от 100 до 105 °С в течение 5 мин. Ормустин проявляется в виде пятна фиолетового цвета (рис. 25).

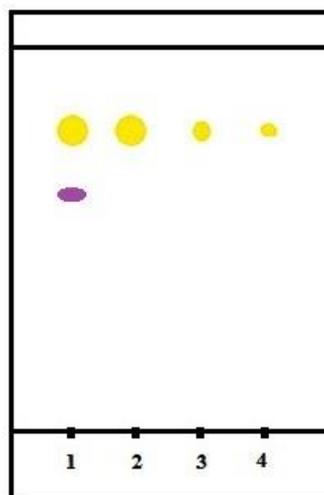


Рисунок 25 – Хроматограмма системы спирт 95%: аммиак водный (3:2): 1 – испытуемый раствор (50 мкг ормустина, 120 мкг Kollidon 17PF), 2 – СО-2 (120 мкг Kollidon 17PF), 3 – ПР-3 (2 мкг Kollidon 17PF), 4 – ПР-4 (1 мкг Kollidon 17PF)

Значение R_f и проявление четырех пятен ярко желтого цвета и одного пятна фиолетового цвета указывает на пригодность системы спирт 95%: аммиак водный (3:2).

4.2. Разработка методики количественного определения ормустина в парентеральной лекарственной форме

По химической структуре молекула ормустина является производным аминокислоты, содержащим в своем составе амино- и карбоксильную группу, легко гидролизуемый атом хлора и хромофорную нитрозо-группу. Наличие данных групп позволяет использовать различные методы для количественного определения препарата: СФМ [12, 15, 44], полярографию, хроматографический анализ, а также титрование амино- и карбоксильной группы или иона хлора.

Ормустин является химически нестабильным веществом, поэтому большое значение имеет время пробоподготовки. Наиболее простым из выше перечисленных методов является СФМ, основанный на хромофорных свойствах нитрозо-группы [41].

Электронный спектр субстанции имеет две полосы поглощения: одну, интенсивную, с максимумом поглощения вблизи 228 ± 2 нм и другую, меньшей интенсивности, с максимумом при 396 ± 2 нм. Обе эти полосы можно использовать для количественного определения ормустина, но использование коротковолновой полосы сопряжено с большой вероятностью случайных и систематических ошибок. Многие органические соединения, в том числе примеси ормустина, поглощают в этой области спектра. По этой причине определение содержания ормустина в ЛФ проводили при $\lambda = 396 \pm 2$ нм.

Kollidon 17PF и раствор 0,1 М хлористоводородной кислоты, входящих в состав ЛФ, не поглощают в диапазоне 350-450 нм (рис.26), поэтому чтобы упростить процесс измерения СО и раствор сравнения готовили без Kollidon 17PF.

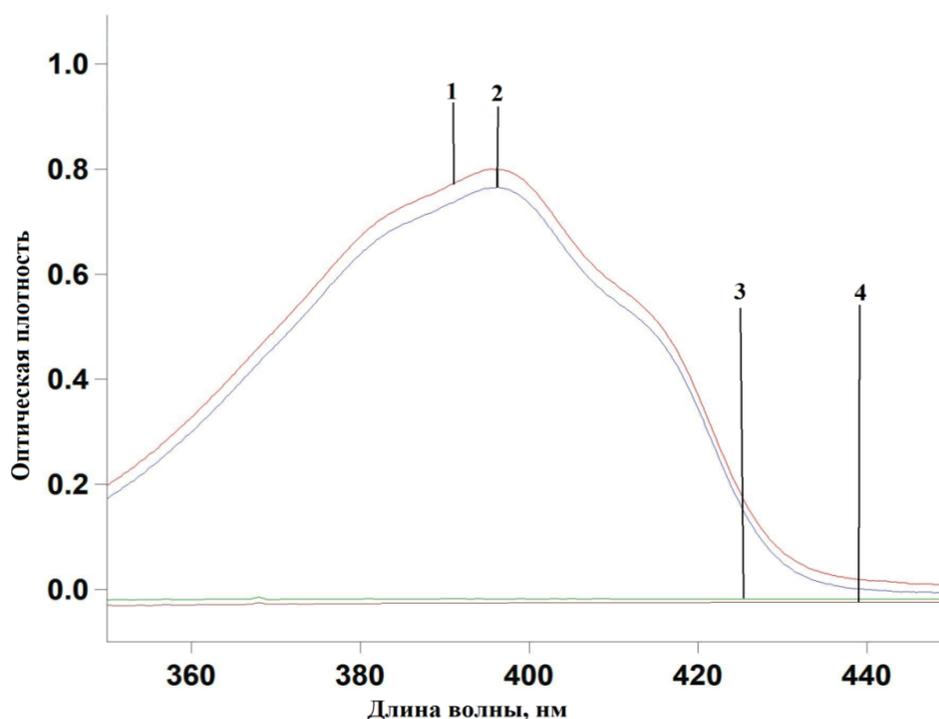


Рисунок 26 – УФ-спектры поглощения ПЛФ ормустина (1), субстанции ормустина (2), 6% раствора Kollidon 17PF (3) и раствора 0,1 М хлористоводородной кислоты (4)

При подборе методики разведения остановились на определении линейной зависимости оптической плотности от концентрации. В качестве растворителя использовали раствор 0,01 М хлористоводородной кислоты, в котором умеренно растворимы субстанция и ЛФ ормустина. Изготавливали по 5 образцов с конечным содержанием ормустина в разведении от 0,5 до 2,5 мг/мл.

Для разведений субстанции и ЛФ линейную зависимость оптической плотности от концентрации наблюдали во всем исследуемом диапазоне (рис. 27 и 28), что указывает на соблюдение закона Бугера-Ламберта-Бера.

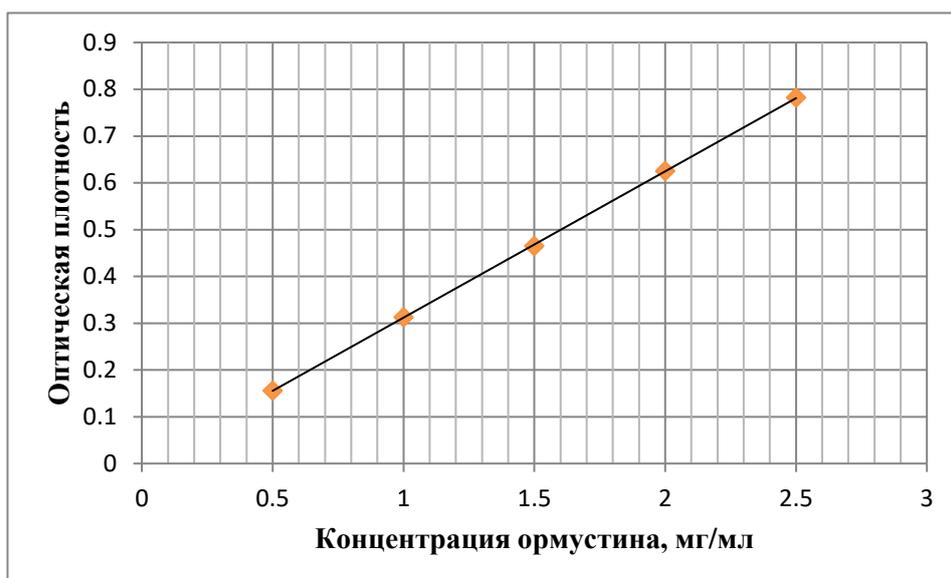


Рисунок 27 – Соблюдение закона Бугера-Ламберта-Бера для субстанции ормустина при длине волны 396 ± 2 нм в растворе 0,01 М хлористоводородной КИСЛОТЫ

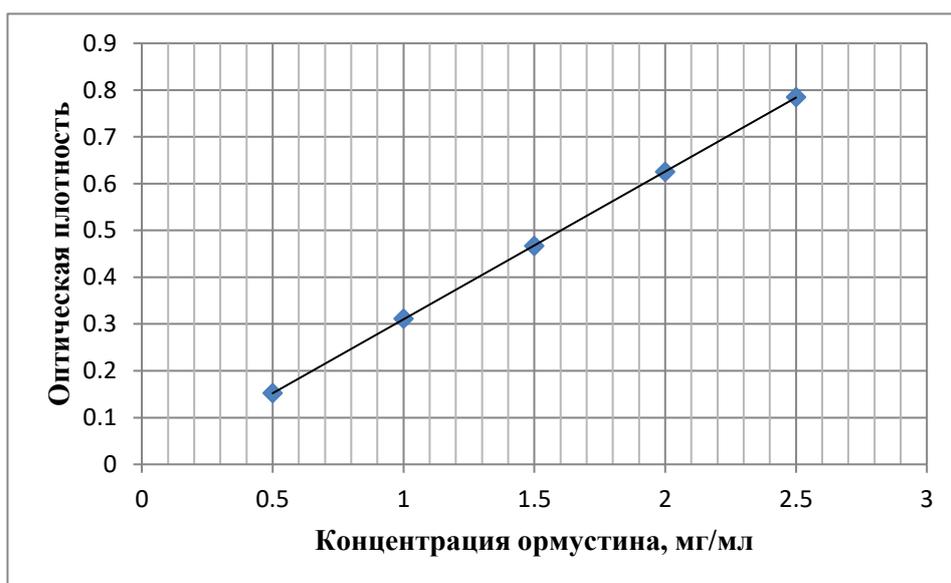


Рисунок 28 – Соблюдение закона Бугера-Ламберта-Бера для ПЛФ ормустина при длине волны 396 ± 2 нм в растворе 0,01М хлористоводородной КИСЛОТЫ

При разработке состава ЛФ готовили растворы с различной концентрацией ормустина, поэтому каждый раз проводили корректировку разведения. В конечном итоге, для выбранного состава ЛФ, остановились на следующей методике:

Разведение свежеприготовленного раствора ормустина:

Мерной пипеткой переносят 5 мл раствора ормустина в мерную колбу на 50 мл, доводят объем колбы 0,01М хлористоводородной кислотой и перемешивают.

Разведение ЛФ:

Содержимое флакона растворяют в 0,01М хлористоводородной кислоте, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивают. Время между началом приготовления испытуемого раствора и измерением оптической плотности не должно превышать 30 мин.

Приготовление раствора СО:

Около 125 мг (точная навеска) субстанции ормустина растворяют в 0,01 М хлористоводородной кислоте, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивают. Время между началом приготовления испытуемого раствора и измерением оптической плотности не должно превышать 30 мин.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и раствора СО на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 396 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения кислоту хлористоводородную 0,01 М.

Содержание ормустина X (мг) во флаконе вычисляют по формуле 4:

$$x = \frac{D_1 \cdot V_1 \cdot a_0}{D_0 \cdot V_0}, \quad (4)$$

где D_1 - оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 - оптическая плотность раствора СО;

V_1 - величина разбавления испытуемого раствора;

V_0 - величина разбавления раствора СО;

a_0 - навеска СО, в мг.

Данную методику проверили на 5 образцах концентрата (табл. 10) и 5 образцах лиофилизата (табл. 10).

Таблица 9 – Результаты количественного определения ормустина в свежеприготовленном растворе

№ образца		Оптическая плотность раствора		Концентрация ормустина, мг/мл		
1		0,800		25,574		
2		0,796		25,448		
3		0,802		25,638		
4		0,794		25,384		
5		0,796		25,448		
Статистические данные						
\bar{X}	S	S^2	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$
25,498	0,104	0,0108	0,093	0,13	25,498±0,13	0,51

Таблица 10 – Результаты количественного определения ормустина в лиофилизате

№ образца		Оптическая плотность раствора		Концентрация ормустина, мг/флакон		
1		0,792		126,6		
2		0,788		125,9		
3		0,791		126,4		
4		0,790		126,2		
5		0,791		126,5		
Статистические данные						
\bar{X}	S	S^2	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$
126,32	0,277	0,077	0,124	0,34	126,32±0,34	0,27

Так как рассчитанная погрешность определения и в свежеприготовленном растворе ормустина, и в лиофилизате не превышает 1%, то можно сделать заключение о высокой точности данного метода анализа.

4.3. Валидация метода количественного определения

Валидацию [10, 14, 41] методики количественного определения проводили в соответствии с требованиями на образцах препарата и модельных смесях, полученных в лабораторных условиях. Изучение разработанной методики проводилось по таким валидационным параметрам, как специфичность, линейность, правильность и прецизионность (сходимость и внутрिलाбораторная прецизионность) [98]. Протокол валидации с установленными критериями

приемлемости был составлен в соответствии с утвержденными правилами и рекомендациями.

4.3.1. Линейность

Линейность предложенной методики анализа определяли путем доказательства линейного соотношения между концентрацией действующего вещества (ормустина) в ПЛФ и величиной сигнала (значение оптической плотности). Первоначально изготавливались модельные растворы с концентрацией ЛВ от 80 (20 мг/мл) до 120 % (30 мг/мл) от номинального содержания (25 мг/мл) путем разведения ЛФ водой. Затем определяли среднюю оптическую плотность из ряда определений для каждой концентрации и проводили статистическую обработку данных с построением и решением уравнения регрессии вида $y=a+b \cdot x$ (табл. 11).

Таблица 11 – Расчет линейности методики количественного определения ормустина в ПЛФ

Концентрация ормустина		Среднее значение оптической плотности, нм	Регрессия
%	мг/мл		
80	20,0	0,625	0,625
90	22,5	0,703	0,702
100	25,0	0,782	0,779
110	27,5	0,86	0,856
120	30,0	0,932	0,933
Статистические данные			
Наклон прямой (b)		0,0308	
Отрезок на оси ординат (a)		0,0094	
Коэффициент корреляции (r)		0,9998	

Уравнение регрессии для данной зависимости имеет вид $y=0,0308x+0,0094$. О достаточно тесной линейной связи между концентрацией ормустина и оптической плотностью говорит близость коэффициента корреляции к 1 (по абсолютной величине). Дополнительным подтверждением линейности зависимости исследуемых величин является графическое изображение регрессионной прямой (рис. 29).

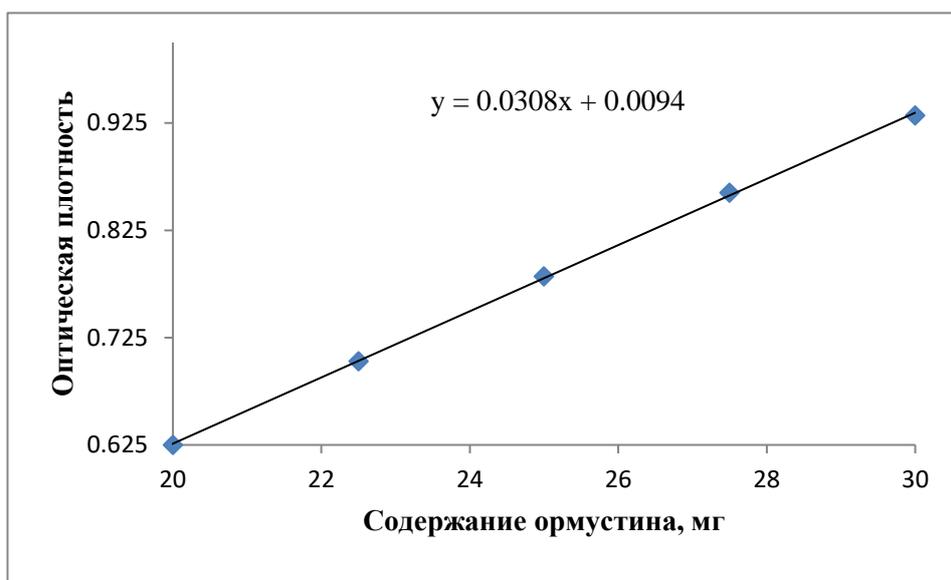


Рисунок 29 – График регрессивной прямой

4.3.2. Правильность

Для доказательства правильности аналитической методики проводили количественное определение АФИ в модельных смесях, отличающихся только содержанием действующего вещества (метод плацебо), в диапазоне концентраций 100 – 150 мг/флакон (80-120 %). Оценивали результаты анализа путем сравнения полученного результата с ожидаемым значением величины (концентрация ЛВ, мг/флакон).

На основании данных представленных в таблице 12 методику количественного определения можно считать правильной, т.к. отклонения от среднего значения входят в доверительный интервал средних результатов анализа.

Таблица 12 – Результаты исследования правильности методики количественного спектрофотометрического определения ормустина в ПЛФ

Концентрация, %	№ пробы	Масса ормустина, мг		Отклик, %		
		навеска	найденное значение			
80	1	100,6	100,8	100,2		
	2	99,5	99,4	99,9		
	3	99,8	99,6	99,8		
90	1	112,8	112,7	99,91		
	2	112,3	111,7	99,97		
	3	113,0	113,3	100,27		
100	1	125,7	125,3	99,68		
	2	124,7	124,6	99,92		
	3	125,1	124,9	99,84		
110	1	138,0	137,7	99,78		
	2	137,5	136,7	99,42		
	3	137,5	137,7	100,15		
120	1	150,0	149,8	99,87		
	2	150,2	150,6	100,27		
	3	150,0	149,8	99,87		
Статистические данные						
\bar{X}	S	S ²	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$, %
99,89	0,256	0,066	0,066	0,14	99,89±0,14	0,14

4.3.3. Сходимость и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность

Для изучения сходимости сравнивали результаты, полученные в одинаковых условиях, а именно с использованием одного и того же спектрофотометра, одним и тем же исследователем, в короткий промежуток времени (табл. 13). Так как для СФМ метода анализа коэффициент вариации составил менее 1%, то изменчивость вариационного ряда незначительна и можно сделать вывод о сходимости предложенной методики анализа.

Определение внутрилабораторной прецизионности производилось двумя сотрудниками на одном спектрофотометре с целью показать, что аналитическая методика обеспечивает получение согласующихся результатов независимо от изменений внешних условий при использовании однородных проб (табл. 14).

Таблица 13 – Сходимость аналитической методики количественного определения ормустина в ПЛФ

серия		№ образца		ормустин, мг/флакон		
1004		1		125,07		
		2		125,1		
		3		124,82		
		4		124,95		
		5		125,02		
		6		124,96		
		7		125,08		
Статистические данные						
\bar{X}	S	S ²	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$, %
125,0	0,0985	0,0097	0,0297	0,09	125,0±0,09	0,07

Таблица 14 – Результаты определения промежуточной прецизионности

серия		№ образца		ормустин, мг/флакон					
				Исследователь 1	Исследователь 2				
1004		1		125,07	125,2				
		2		125,1	124,96				
		3		124,82	124,9				
		4		124,95	125,05				
		5		125,02	125,14				
		6		124,96	125,1				
		7		125,08	124,93				
Статистические данные									
№	\bar{X}	S	S ²	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$, %	t _{теор.}	t _{практ.}
1	125,0	0,0985	0,0097	0,0297	0,09	125,0±0,09	0,07	2,179	0,7
2	125,04	0,1136	0,0129	0,0343	0,11	125,04±0,11	0,09		

При сравнении результатов определения содержания ормустина, полученных двумя сотрудниками в разные дни видно, что различия между средними значениями и стандартными отклонениями результатов 1-го и 2-го сотрудников случайны. Результаты теста Стьюдента для сравнения двух независимых выборок ($t(95\%;12)=2,179 > 0,7$) указывают на отсутствие систематических ошибок в методике.

4.3.4. Специфичность

Специфичность методики количественного определения оценивалась с использованием трех модельных смесей. При этом содержание ВВ в смесях оставалось неизменным, а варьировали только количеством субстанции ормустина (табл. 15).

Таблица 15 – Состав модельных смесей растворов ормустина для оценки селективности методики количественного определения

Состав компонентов	Ормустин, мг	Kollidon 17PF, мг	0,1 М HCl, мл
Модель №1	100	300	5
Модель №2	125		
Модель №3	150		

Во всех исследуемых модельных смесях $t_{\text{теор}} > t_{\text{практ}}$. Показатели статистических данных (табл. 16) указывают на незначительное расхождении между истинным значением искомой величины и ее средним значением, а также об отсутствии системной ошибки анализа. Данная методика позволяет достоверно определить содержание ормустина в ПЛФ в присутствии ВВ.

Таблица 16 – Определение содержания ормустина в модельных смесях

Модельная смесь	Раствор СО		Исследуемые образцы		Статистические данные						
	оптическая плотность	содержание ормустина, мг	оптическая плотность	содержание ормустина, мг	\bar{X}	S	S ²	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	t _{практ}	ε, %
1	0,626	100	0,619	98,9	99,72	0,676	0,457	0,302	0,84	0,93	0,84
			0,627	100,2							
			0,623	99,5							
			0,630	100,6							
			0,622	99,4							
2	0,782	125	0,779	124,5	124,6	0,367	0,135	0,164	0,46	2,44	0,37
			0,784	125,3							
			0,782	125,0							
			0,778	124,4							
			0,781	125,6							
3	0,938	150	0,936	149,7	150,02	0,531	0,282	0,238	0,66	0,08	0,44
			0,943	150,8							
			0,939	150,2							
			0,934	149,4							
			0,938	150,0							

4.4. Стандартизация парентеральной лекарственной формы ормустина

4.4.1. Показатели качества парентеральной лекарственной формы ормустина

В соответствии с требованиями ГФ XIII для составления проекта НД на готовую ЛФ «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» определяли показатели, по которым следует контролировать качество данного препарата при получении и в процессе хранения. Для стандартизации ПЛФ ормустина выбраны следующие показатели качества: описание, подлинность, средняя масса и однородность по массе, прозрачность и цветность раствора, рН раствора, отсутствие механических включений, изомерный состав, посторонние примеси, количественное определение, потеря в массе при высушивании, пирогенность, аномальная токсичность и стерильность.

Описание. По внешнему виду все наработанные серии препарата представляют собой пористую массу белого цвета с желтоватым оттенком.

Подлинность.

1. СФМ-анализ (методика представлена в разделе 2.2.3.1). В области от 350 до 450 нм ЭСП растворов, приготовленные для количественного определения ормустина в ПЛФ, имели максимум поглощения при длине волны (396 ± 2) нм.

2. ТСХ-анализ (методика описана в разделе 4.1). При использовании системы н-бутанол: ЛУК: вода (12:3:5) после насыщения порами йода в йодной камере, на линии старта хроматограммы наблюдали желтое пятно Kollidon 17PF на уровне СО-2. После обработки пластинок раствором нингидрина и подсушивания в сушильном шкафу проявлялись фиолетовые пятна ормустина на уровне соответствующего СО-1 ($R_f=0,42$). При использовании системы этанол 95%: аммиак водный (3:2), после детектирования парами йода, на хроматограмме наблюдали желтое пятно Kollidon 17PF на уровне соответствующего СО-2 ($R_f=0,78$). После детектирования раствором нингидрина и подсушивания в сушильном шкафу проявлялись фиолетовые пятна на уровне СО-1 ($R_f=0,61$).

3. ВЭЖХ-анализ (методика приведена в разделе 2.2.3.1 и 2.2.3.5). На хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для определения изомерного состава, наблюдались два последовательно элюирующихся пика:

неактивный изомер 1 (время выхода 8,0-9,0 мин) и активный изомер 2 (время выхода 11,3-12,8 мин).

Количественное определение. Содержание ормустина в ПЛФ осуществляли методом СФМ с использованием раствора СО (методика представлена в разделе 4.2).

Однородность дозирования. Испытание на «однородность дозирования» проводили путем количественного определения содержания ормустина по отдельности в каждом отобранном образце препарата. С этой целью отбирали случайным образом по 10 флаконов от испытываемой серии. Каждый из полученных результатов выражали в процентах от номинального содержания действующего вещества в одном флаконе – 1,0 мг (100%). Согласно ОФС.1.4.2.0008.15 «Однородность дозирования», для 10 отобранных единиц анализа отклонение от номинала не должно превышать 1,5%.

Из результатов, представленных в таблице 17, видно, что содержание ормустина во флаконе для трех серий препарата находилось в пределах 99,8 – 100,2% от номинала, что укладывается в допустимые нормы отклонения.

Таблица 17 – Стандартизация ПЛФ ормустина по показателю «количественное определение»

Серия	№ образца	Содержание ормустина, мг/флакон	Содержание ормустина в % от номинального	Статистические данные
0903	1	124,7	99,8	$\bar{X}=124,68$ $S^2=0,006$ $S=0,079$ $S\bar{x}=0,125$ $\bar{X}\pm\Delta\bar{x}=124,68\pm0,056$ $\bar{\varepsilon}, \%=0,05$
	2	124,8	99,8	
	3	124,7	99,8	
	4	124,7	99,8	
	5	124,6	99,7	
	6	124,7	99,8	
	7	124,8	99,8	
	8	124,6	99,7	
	9	124,6	99,7	
	10	124,7	99,8	
1004	1	125,1	100,1	$\bar{X}=124,94$ $S^2=0,038$ $S=0,19$ $S\bar{x}=0,06$ $\bar{X}\pm\Delta\bar{x}=124,94\pm0,14$ $\bar{\varepsilon}, \%=0,11$
	2	125,1	100,1	
	3	124,8	99,8	
	4	124,9	99,9	
	5	124,7	99,8	
	6	124,9	99,9	
	7	124,6	99,7	
	8	125,2	100,2	
	9	125,1	100,1	
	10	125,0	100	
1204	1	125,1	100,1	$\bar{X}=125,06$ $S^2=0,007$ $S=0,084$ $S\bar{x}=0,027$ $\bar{X}\pm\Delta\bar{x}=125,06\pm0,06$ $\bar{\varepsilon}, \%=0,05$
	2	125,0	100	
	3	125,1	100,1	
	4	125,1	100,1	
	5	124,9	99,9	
	6	125,2	100,2	
	7	125,0	100	
	8	125,1	100,1	
	9	125,1	100,1	
	10	125,0	100	

Средняя масса и однородность по массе. Определение средней массы проводили согласно требованию ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм» на 20 флаконах каждой серии. Взвешивали каждую единицу в отдельности с точностью до 0,001 г. Отклонение от средней массы не должно превышать $\pm 10\%$.

Средняя масса содержимого флаконов указанных серий колебалась от 431 до 449 мг (табл. 18), номинальная масса флакона составляет 441,0 мг.

Таблица 18 – Стандартизация ПЛФ ормустина по показателю «средняя масса и однородность по массе»

№ флакона	Серия					
	090313		100414		120414	
	М, мг	О, %	М, мг	О, %	М, мг	О, %
1	436	-0,9	433	-1,8	437	-0,8
2	442	+0,5	438	-0,7	431	-2,2
3	437	-0,7	447	+1,4	442	+0,3
4	434	-1,4	441	+0,2	443	+0,5
5	439	-0,2	441	+0,2	441	+0,1
6	443	+0,7	437	-0,9	438	-0,6
7	448	+1,8	438	-0,7	437	-0,8
8	431	-2,0	442	+0,3	443	+0,5
9	440	0	431	-2,3	432	-2,0
10	444	+0,9	447	+1,4	447	+1,4
11	447	+1,6	448	+1,6	446	+1,2
12	435	-1,1	436	-1,1	435	-1,3
13	439	-0,2	435	-1,3	436	-1,1
14	440	0	437	-0,9	437	-0,8
15	440	0	448	+1,6	449	+1,9
16	435	-1,1	448	+1,6	446	+1,2
17	439	-0,2	445	+0,9	446	+1,2
18	438	-0,5	443	+0,5	444	+0,7
19	438	-0,5	442	+0,3	440	-0,2
20	435	-1,1	441	+0,02	444	+0,7
	Mcp=440 мг		Mcp=440,9 мг		Mcp=440,7 мг	

Примечание: М – масса содержимого флакона; Mcp – средняя масса содержимого; О – отклонение от средней массы

pH. Определение проводили потенциметрически согласно ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия». Для получения испытуемых растворов использовали воду очищенную, не содержащую углерода диоксид (pH 5,8-7,0). После добавления к содержимому флакона 20 мл воды получали прозрачные растворы с pH=2,0-2,3.

Потеря в массе при высушивании. Во всех исследуемых образцах потеря в массе при высушивании не превышала 3%.

4.4.2. Изучение стабильности готовой ЛФ ормустина при хранении

Качество, терапевтическая эффективность и безопасность ЛП в процессе хранения напрямую зависит от его способности сохранять свойства в пределах установленной НД, в течение определенного срока при надлежащих условиях хранения и транспортировки, т.е. от стабильности. На основании результатов

исследования стабильности устанавливают срок годности ЛП, осуществляют выбор первичной упаковки и определяют условия хранения [17, 51, 75].

В процессе работы наработано несколько серий ПЛФ ормустина, заложенных на хранение при двух температурных режимах (4 °С и минус 18 °С). Мониторинг стабильности данных серий осуществлялся по срокам установленным в ГФ: первый год – сразу после производства и через каждые 3 мес; второй и третий год – через каждые 6 мес.

Во время всего срока хранения трех серий не наблюдалось изменений в ЛФ по таким параметрам как описание, подлинность, прозрачность и цветность раствора, аномальная токсичность и стерильность. Результаты определения параметра «средняя масса и однородность по массе» для исследуемых серий, представленные в таблице 19, указывают на незначительное увеличение данного показателя в процессе хранения за счет поглощения влаги, но при этом средняя масса укладывается в допустимый предел. После хранения в течение полугода масса увеличилась на 0,2–0,4 %, в течение 1 года – на 0,5-0,7%, а в течение 2 лет масса возрастает на 1,0-1,2%. Анализ представленных данных по остальным параметрам показал отсутствие значимых изменений показателей качества, введенных в проект НД при обоих режимах хранения. Следовательно, данный препарат можно хранить при температуре 4 °С в течение 1,5 лет. Изучение стабильности препарата в процессе хранения продолжается.

Таблица 19 – Изучение стабильности серий ПЛФ ормустина после получения и в процессе хранения

Серия	Режим хранения, °С	Срок хранения, мес	pH	Изомерный состав	Количественное определение, мг/флакон	Средняя масса, мг/флакон
0903	-	-	2.0	78.88 : 21.12	124.7	440.0
	минус 18 °С	3	2.1	78.76 : 21.24	124.8	440.2
	4 °С		2.1	78.81 : 21.19	124.8	440.2
	минус 18 °С	6	2.1	78.91 : 21.09	124.8	441.7
	4 °С		2.0	78.92 : 21.08	124.8	441.5
	минус 18 °С	9	2.1	78.83 : 21.17	124.7	441.6
	4 °С		2.1	78.99 : 21.01	124.8	441.8
	минус 18 °С	12	2.1	78.76 : 21.24	124.7	443.0
	4 °С		2.1	79.07 : 20.93	124.8	442.9
	минус 18 °С	18	2.0	78.80 : 21.20	124.8	443.5
	4 °С		2.1	79.01 : 20.99	124.8	443.6
	минус 18 °С	24	2.1	78.85 : 21.15	124.8	444.8
4 °С	2.1		79.05 : 20.95	124.8	444.8	
1004	-	-	2.1	78.91 : 21.09	125.0	440.9
	минус 18 °С	3	2.1	79.04 : 20.96	124.9	441.7
	4 °С		2.0	78.85 : 21.15	125.0	441.8
	минус 18 °С	6	2.0	78.91 : 21.09	124.9	442.5
	4 °С		2.0	78.81 : 21.19	124.9	442.6
	минус 18 °С	9	2.1	78.88 : 21.12	125.0	443.1
	4 °С		2.0	78.76 : 21.14	125.0	443.0
	минус 18 °С	12	2.1	78.92 : 21.08	125.0	443.7
	4 °С		2.1	78.99 : 21.01	124.9	443.6
	минус 18 °С	18	2.0	78.92 : 21.08	124.9	444.8
	4 °С		2.1	78.94 : 21.06	124.9	444.7
	минус 18 °С	24	2.1	79.03 : 20.97	125.0	445.9
4 °С	2.1		78.99 : 21.01	124.9	446.1	

1204	-	-	2.1	78.96 : 21.04	125.1	440.7
	минус 18 °С	3	2.1	79.05 : 20.95	125.0	441.6
	4 °С		2.1	79.12 : 20.88	125.1	441.6
	минус 18 °С	6	2.1	78.97 : 21.03	125.1	442.4
	4 °С		2.1	78.92 : 21.08	125.1	442.3
	минус 18 °С	9	2.1	79.02 : 20.98	125.1	443.1
	4 °С		2.1	78.99 : 21.01	125.0	443.0
	минус 18 °С	12	2.1	79.09 : 20.91	125.0	443.8
	4 °С		2.1	78.91 : 21.19	125.1	443.7
	минус 18 °С	18	2.0	79.01 : 20.99	125.1	444.8
	4 °С		2.1	78.87 : 21.13	125.1	444.8
	минус 18 °С	24	2.1	78.96 : 21.04	125.1	445.7
4 °С	2.1		78.93 : 21.07	125.1	445.9	

Заключение по главе 4

В результате проведенных исследований в качестве одного из методов определения подлинности разработан метод ТСХ-анализа. Подобраны оптимальные условия хроматографирования и выбраны две системы растворителей для идентификации ормустина и Kollidon 17PF в составе ПЛФ: н-бутонол: ЛУК: вода в соотношении 12:3:5 и пропанол-2: аммиак водный – 3:2. Разработан и валидирован метод количественного спектрофотометрического определения ормустина в составе ПЛФ. Для стандартизации готовой ПЛФ ормустина подобраны показатели качества. Установлено, что ВВ входящие в состав ЛФ не поглощают в диапазоне 350-450 нм. В целях установления срока годности ПЛФ согласно требованиям фармакопеи проводили определение выбранных параметров на трех сериях, хранившихся при двух температурных режимах (+4 °С и -18 °С). За два года не наблюдалось значительных изменений в показателях при обоих режимах хранения. Поэтому для данной ЛФ в раздел условия хранения в проекте НД на готовую ПЛФ «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» установлено требование: хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ГОТОВОЙ ПЛФ ОРМУСТИНА

5.1. Определение терапевтической дозы готовой ПЛФ ормустина

Изучение противоопухолевой активности готовой ПЛФ ормустина проводили в опытах *in vivo* на мышах в лаборатории экспериментальной химиотерапии и в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России.

Терапевтическую дозу препарата определяли при однократном внутривенном введении готовой ПЛФ в различных дозах мышам с асцитными вариантами лимфолейкозов Р-388 и L-1210.

Препарат вводили в дозах 50-175 мг/кг. По данным графиков представленных на рисунках 30-32 видно, что ПЛФ дозозависимо ингибирует рост изучаемых лейкозов. В дозах 50-100 мг/кг на обоих моделях наблюдался постепенный рост показателя УПЖ (с 70% до 242% для L-1210 и с 90% до 178% для Р-388) и излечения животных в опытных группах. Максимальное УПЖ (174% у мышей с лимфолейкозом Р-388 и 346% у мышей с L-1210) и излечение животных (33,3% у мышей с лимфолейкозом Р-388 и 66,7% у мышей с L-1210) достигнуто при однократном внутривенном введении в дозе 125 мг/кг. В более высоких дозах наблюдалось проявление токсичности, гибель испытуемых наблюдалась в 22,2-25% случаях.

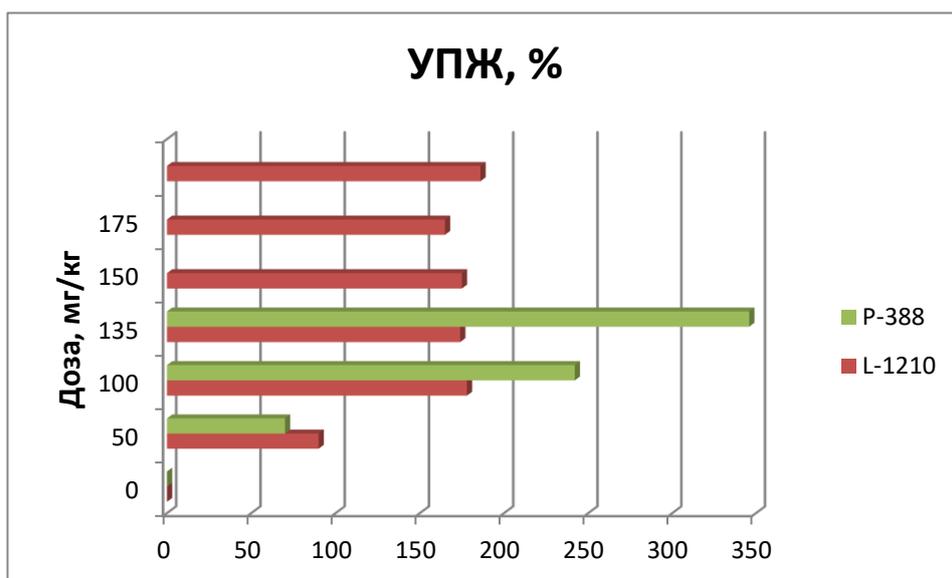


Рисунок 30 – УПЖ (%) мышей с лейкоцитарной лейкемией P-388 (асцитная опухоль) и лейкоцитарной лейкемией L-1210 (солидная опухоль)

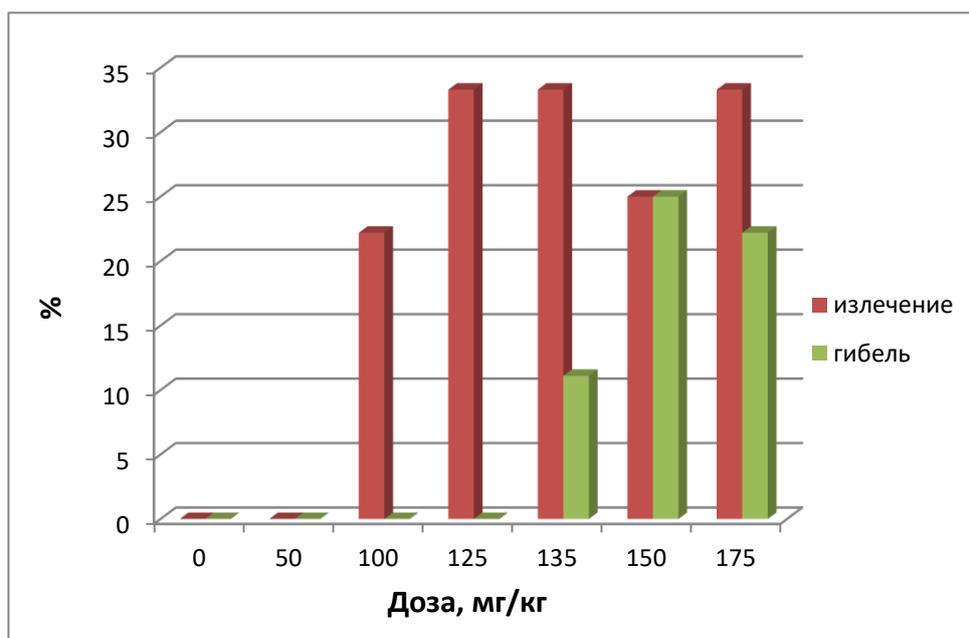


Рисунок 31 – Излечение и гибель мышей с лейкоцитарной лейкемией P-388

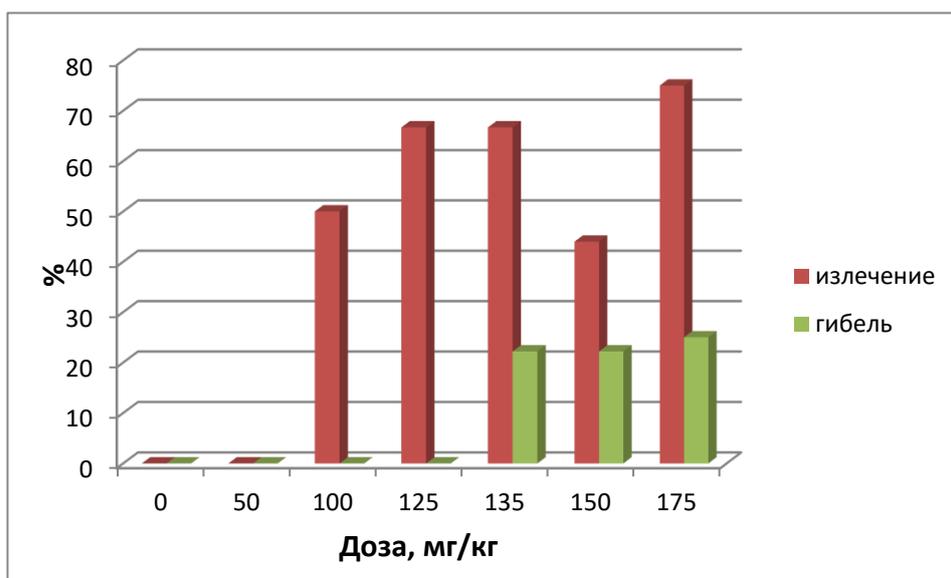


Рисунок 32 – Излечение и гибель мышей с лейкоцитарной лейкемией L-1210

На основании выше изложенных данных в качестве терапевтической дозы выбрана доза 125 мг/кг и именно её применяли в дальнейших исследованиях при исследовании противоопухолевой активности изучаемой ЛФ на различных опухолевых моделях.

5.2. Противоопухолевая активность ормустина на различных солидных опухолевых моделях

Определение противоопухолевой активности готовой ПЛФ ормустина проводили при однократном внутривенном введении в дозе 125 мг/кг мышам с солидными опухолями (карциноме легкого Льюиса LLC, раке шейки матки РШМ-5 и меланоме В-16).

Таблица 20 – Противоопухолевая активность ПЛФ ормустина при однократном введении мышам с солидными опухолями

Параметр	Опухолевая модель		
	карцинома легкого Льюиса LLC	рак шейки матки РШМ-5	меланома В-16
Торможение роста опухоли	93,0%	излечение 100%	84,0-91,0%

По данным таблицы 20 видно, что ормусти́н проявляет высокую противоопухолевую активность в ряду солидных опухолей. ТРО на всех изучаемых моделях солидных опухолей достигала 90%, на рак шейки матки РШМ-5 ормусти́н вызывает излечение всех мышей в опытной группе. Представленные данные указывают на перспективность применения изучаемого ЛП при лечении различных опухолей и его дальнейшее изучение, в том числе в комбинации с другими препаратами с целью повышения эффективности лечения рака.

Заключение по главе 5

Проведены исследования по изучению противоопухолевой активности изучаемого ЛП на различных лейкозах и солидных моделях. В опытах *in vivo*, на мышах установлено, что ормусти́н дозозависимо ингибирует развитие опухолей. При исследовании его активности на двух лейкозах (P-388 и L-1210) была определена терапевтическая доза готовой ПЛФ ормустина – 125 мг/кг. Данная доза использовалась для изучения специфической активности ЛП на различных солидных моделях. При терапии солидных опухолей наблюдалось значительное ТРО и полное излечение при лечении рака шейки матки РШМ-5. Представленные данные указывают на перспективность дальнейшего изучения готовой ПЛФ ормустина.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на огромные достижения современной медицины, основными методами лечения рака до сих пор остаются использование хирургических операций, лучевой терапии и прием различных групп противоопухолевых препаратов. Препараты группы алкилирующих соединений, в том числе АНМ, нашли широкое применение в клинической практике при лечении злокачественных новообразований различного генеза. Для АНМ характерно отсутствие перекрестной резистентности с другими алкилирующими агентами и широкий спектр действия.

В Институте органической химии им. И.Я. Пастера проводили скрининг различных соединений класса АНМ, в результате изучения биологической активности новых веществ в качестве перспективного противоракового средства был отобран ормусти́н. Молекула ормустина в качестве функциональной группы содержит остатки аминокислот, которые более интенсивно поглощаются опухолевыми клетками по сравнению с нормальными. Наличие аминокислотного остатка обеспечивает более эффективный транспорт получаемых препаратов через ГЭБ, что служит перспективой для применения таких производных АНМ при первичных и метастатических опухолях головного мозга.

На первом этапе исследования по разработке состава ПЛФ изучалась растворимость ормустина в различных водных растворителях, содержащих спирт, ВМС, органическую и неорганическую кислоты, сахара. Использование 0,1М раствора хлористоводородной кислоты позволило получить прозрачный 2,5% раствор ормустина. Полученный раствор был нестабилен, при его хранении при комнатной температуре за 5 дней концентрация действующего вещества снижалась на 37%. Поэтому с целью получения ПЛФ с длительным сроком хранения проводили лиофилизацию.

Для получения лиофилизата надлежащего качества проводили исследовали влияние различных формообразователей на стабильность ормустина. Введение

поливинилпирролидона марки Kollidon 17PF в несколько раз снизило скорость разрушения действующего вещества в растворе.

Отобранный состав раствора после фильтрации подвергали лиофилизации с использованием трех температурных режимов. В качестве режима, позволяющего получить легко регидратируемый лиофилизат, выбран режим, при котором препарат замораживали до -45°C на полке сублимационной установки и выдерживали при данной температуре в течение 3-х ч, а затем включали вакуум. После выравнивания вакуума, температуры конденсатора и препарата проводили равномерный подъем температуры со скоростью $+2-3^{\circ}\text{C}/\text{ч}$.

На следующем этапе работы оценивали влияние растворителей для регидратации лиофилизированной ПЛФ ормустина на ее стабильность. Установлено, что растворителями, обеспечивающими наиболее длительную стабильность полученного раствора ЛФ, являются вода для инъекций, изотонический раствор натрия хлорида, 5% раствор глюкозы, фосфатный буферный раствор с $\text{pH}=6,6-7,1$.

Создание любой новой ЛФ предполагает разработку методик контроля качества и стандартизации. В качестве одного из методов определения подлинности изучено влияние различных систем растворителей на подвижность компонентов ЛФ при проведении ТСХ-анализа. Наиболее быстрое поднятие фронта растворителя наблюдалось в системе н-бутанол:ЛУК:вода (12:3:5) с R_f ормустина 0,42. Kollidon 17PF в практически во всех изучаемых системах, в том числе н-бутанол:ЛУК:вода (12:3:5), был мало подвижен, для его идентификации предложена система спирт 95%:аммиак водный (3:2) с R_f Kollidon 17PF- 0,78.

В процессе разработки и валидации метода количественного спектрофотометрического определения ормустина проводили изучение ЭСП субстанции и ПЛФ ормустина в диапазоне 350-450 нм. Спектры ПЛФ и субстанции ормустина идентичны, а ВВ не поглощают в данном диапазоне. Поглощения раствора ормустина до и после лиофилизации подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера. Валидация разработанной методики подтверждена такими параметрами, как специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

В качестве показателей качества, по которым проводили исследования заложенных на хранение при двух температурных режимах (-18 °С и +4 °С) трех серий готовой ПЛФ ормустина, выбраны: описание, подлинность, средняя масса и однородность по массе, прозрачность и цветность раствора, рН раствора, отсутствие механических включений, изомерный состав, посторонние примеси, количественное определение, потеря в массе при высушивании, пирогенность, аномальная токсичность и стерильность.

На основании проведенных исследований разработан проект НД на «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» и лабораторный регламент на получение.

Исследования по изучению противоопухолевой активности изучаемого ЛП на различных лейкозах и солидных моделях проводили *in vivo*. Ормустин дозозависимо ингибировал развитие опухолей. При исследовании его активности на двух лейкозах (Р-388 и L-1210) была определена терапевтическая доза готовой ПЛФ ормустина – 125 мг/кг. Данная доза использовалась для изучения специфической активности ЛП на ряде опухолевых моделей. При применении ПЛФ в различных лейкозах излечение достигало 33,3-66,7%, на солидных моделях наблюдается значительное ТРО и полное излечение при лечении рака шейки матки РШМ-5. Представленные данные указывают на перспективность дальнейшего изучения готовой ПЛФ ормустина.

Таким образом, по результатам проведения ряда исследований разработана готовая ЛФ ормустина для парентерального введения, которая в опытах *in vivo* продемонстрировала высокую дозозависимую противоопухолевую активность.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведения технологических исследований подобран состав и разработана технология получения ПЛФ «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг».
2. Изучена подвижность компонентов ЛФ при проведении ТСХ-анализа в различных системах растворителей с применением пластинок «Sorbfil». Разработана и валидирована методика количественного спектрофотометрического анализа ормустина в составе ЛФ при длине волны (396 ± 2) нм, в качестве раствора сравнения из-за отсутствия поглощения ВВ в диапазоне 350-450 нм использовали раствор 0,01 М хлористоводородной кислоты.
3. Определены нормы для показателей качества, вошедшие в проект НД на «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» и изучена стабильность готовой ПЛФ ормустина в процессе хранения при двух температурных режимах (минус 18°C и 4 °C).
4. Изучена специфическая активность ПЛФ ормустина на пяти экспериментальных опухолевых моделях. На лейкозах L-1210 и P-388 показана зависимость терапевтического и токсического действия ПЛФ ормустина от дозы.
5. На основании результатов проведенных исследований разработаны лабораторный регламент на получение готовой ПЛФ и проект НД на «Ормустин, лиофилизат для приготовления растворов для инъекций 125 мг».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алеева, Г.Н. Роль вспомогательных веществ в обеспечении фармацевтических и терапевтических свойств лекарственных препаратов (обзор) / Г.Н. Алеева, М.В. Журавлева, Р.Х. Хафизьянова // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – Т. 43, №4. – 51-56.
2. Алексеев, К.В. Технология повышения биологической и фармацевтической доступности лекарственных веществ / К.В. Алексеев [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. XIX, №4. – С. 43-47.
3. Аршинова, О.Ю. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов / О.Ю. Аршинова, Н.А. Оборотова, Е.В. Санарова // Разработка и регистрация лекарственных форм. – 2013. - №1(2). – С. 20-24.
4. Аршинова, О.Ю. Особенности лиофилизации липосомальных лекарственных препаратов (обзор) / О.Ю. Аршинова, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, Н.А. Оборотова // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46, № 4. – С. 29-34.
5. Багирова, В.Л. Современные аспекты использования вспомогательных веществ в технологии лекарственных препаратов / В.Л. Багирова [и др.] // Фарматека. – 1998. - №6. – С. 34-36.
6. Базин, И.С. Химиотерапия диссеминированного рака желудка / И.С. Базин // Автореф. дисс. канд. мед. наук – М., 1995. – 26 с.
7. Барышникова, М.А. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитрозоалкилмочевин / М.А. Барышникова [и др.] // Материалы Белорусско-Российской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» Минск, 23-25 мая. Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, №2. – С. 8.
8. Бедняк, А.Е. Некоторые итоги исследования по анализу и стабильности нитрозоалкилмочевин / А.Е. Бедняк и [и др.] // Тез. докл. IV Всероссийского съезда фармацевтов. – Казань, 1986. – С. 363-364.

9. Беляев, А.А. Нитрозоалкилмочевины на основе алкилендиаммониевых солей и их противоопухолевая активность / А.А. Беляев [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1988. – Т.22, №2. – С. 180-185.
10. Береговых, В.В. Валидация аналитических методик для производителей лекарств / В.В. Береговых. – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.
11. Береговых, В.В. Перенос технологии при создании производства лекарственного средства / В.В. Береговых, О.Р. Спицкий // Вестник РАМН. – 2013. - №12. – С. 49-57.
12. Бернштейн, И.Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Бернштейн, Ю.Л. Каминский. – Л.: Наука, 1986. – 186 с.
13. Блынская, Е.В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов / Е.В. Блынская, С.В. Тишков, К.В. Алексеев // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т.16, №1. – С. 6-11.
14. Боева, С.А. Валидация УФ-спектрофотометрической методики количественного определения винпоцетина в суппозиториях / С.А. Боева, В.Ф. Дзюба, А.И. Сливкин, Ю.А. Полковникова // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2009. - №2. – С. 157-160.
15. Боровский, Б.В. Разработки методики количественного определения «Фенигаммы» методом УФ-спектрофотометрии / Б.В. Боровский, Д.Д. Шабардина // Фармация и фармакология. – 2015. - №1(8). – С. 34-37.
16. Бычков, М.Б. Нидран в современной лечении рака легкого, меланомы и опухолей мозга / М.Б. Бычков [и др.] // Тезисы III Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М, 1996. – С. 87.
17. Гаврилин, М.В. Разработка и изучение стабильности инфузионной формы ципрофлоксацина гидрохлорида / М.В. Гаврилин, Л.С. Ушакова, С.А. Гонян // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37, №2. – С. 53-56.
18. Галан, М. Измеритель динамических параметров / М. Галан // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2009. - №5. – С. 28-30.

19. Гармонов, С.Ю. Спектрофотометрическое и хроматографическое определение 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуросана в биологически активной смеси / С.Ю. Гармонов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37, № 4. – С. 52-53.
20. Гонко, Ф.С. Получение водорастворимых солей нитруллина и изучение их противоопухолевой активности / Ф.С. Гонко [и др.] // Химиотерапия опухолей в СССР. – 1983. – вып. 38. – С. 12.
21. Гопко, В.Ф. Изучение продуктов распада нитруллина в нейтральных и основных водных растворах / В.Ф. Гопко, Л.Б. Радина // Химиотерапия опухолей в СССР. – 1982. – вып. 36. – С. 236-240.
22. Горбунова, В.А. Лизомустин – отечественный препарат из группы производных нитрозомочевины в лечении меланомы кожи / В.А. Горбунова, Л.В. Манзюк, Л.В. Демидов, Г.Ю. Харкевич // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т.13, №1. – С. 55-56.
23. Горошко, О.А. Сорбенты для тонкослойной хроматографии в фармацевтическом анализе / О.А. Горошко [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – №9. – С. 53-56.
24. Государственная фармакопея РФ. 13-ое издание. (электронный ресурс) URL: <http://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/> (дата обращения 05.02.2017).
25. Гришаков, А.Н. Количественное определение содержания изомеров в субстанции и лекарственной форме препарата Лизомустин методом ВЭЖХ / А.Н. Гришаков [и др.] // Аналитика и контроль. – 2001. – Т. 5, №2. – С. 143-145.
26. Гришаков, А.Н. Получение изомеров, входящих в состав препарата Лизомустин, методом ВЭЖХ / А.Н. Гришаков [и др.] // Материалы Белорусско-Российской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» Минск, 23-25 мая. Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, №2. – С. 24.

27. Грищенко, Н.В. Липосомальные противоопухолевые препараты не используют CD95-зависимый сигнальный путь апоптоза / Н.В. Грищенко [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, №1. – С. 37-41.
28. Грищенко, Н.А. Сравнение цитотоксического действия лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины / Н.А. Грищенко [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, №1. – С. 49-53.
29. Груздев, Д.А. Синтез новых карборанилпроизводных α -аминокислот / Д.А. Груздев [и др.] // Известия академии наук. Серия химическая. – 2010. - №1. – С. 110.
30. Гулякин, И.Д. Особенности создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для парентерального применения / И.Д. Гулякин [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. - №11. – С. 96-112.
31. Гулякин, И.Д. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолокарбазола ЛХС-1208 / И.Д. Гулякин [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, №2. – С. 55-60.
32. Гулякин, И.Д. Солюбилизация гидрофобных противоопухолевых препаратов (обзор) / И.Д. Гулякин, Н.А. Оборотова, В.М. Печенников // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т. 48, №3. – С. 46-50.
33. Гусаров, Д.А. Лиофилизация биофармацевтических белков (миниобзор) / Д.А. Гусаров // Биофармацевтический журнал. – 2010. – Т. 2, №5. – С. 3-7.
34. Дементьева, Н.П. Нитрозометилмочевина – 30 лет изучения и применения для лечения онкологических больных / Н.П. Дементьева, Д.Б. Корман // Вопросы онкологии. – 2001. – Т. 47, №6. – С. 3-11.
35. Друзева М.А. Анализ рынка алкилирующих препаратов / М.А. Друзева, П.М. Карлов // Научные труды sworld. – Т. 30, №1. – С. 94-95. заболеваний (электронный ресурс). URL: <http://www.sworld.com.ua/index.php/ru/veterinary->

medicine-and-pharmaceuticals-112/pharmaceutical-chemistry-and-pharmacognosy-112/12836-112-683 (дата обращения 05.02.2017).

36.Зими́на, И.А. Разработка инъекционной лекарственной формы препарата Ноопепт и оценка его нейропротективной активности / И.А. Зими́на [и др.] // Вестник РУДН. Сер. Медицина. Специальность «Фармация». – 2004. - №4. – С. 192-196.

37.Злокачественные новообразования в 2010 году (заболеваемость и смертность) / под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. – 260 с

38.Клочкова, Т.И. Определение посторонних примесей в препарате лизомустин / Т.И. Клочкова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, №5. – С. 45-47.

39.Клочкова, Т.И. Организация, масштабирование и оптимизация производства лиофилизированных препаратов / Т.И. Клочкова, З.С. Шпрах // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, №3. – С. 115-122.

40.Комиссаров, А.В. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины / А.В. Комиссаров [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. - №1. – С. 90-93.

41.Корянова, К.Н. Разработка и валидационные характеристики методики количественного определения содержания димебона в дерматологическом геле / К.Н. Корянова [и др.] // Фармация и фармакология. – 2015. - №4(11). – С. 11-14.

42.Краснов, В.П. Спектрофотометрическое определение содержание основного вещества в субстанции противоопухолевого препарата Лизомустин / В.П. Краснов [и др.] // Аналитика и контроль. – 2001. – Т. 5, №2. – С. 168-170.

43.Краснов, В.П. Нитрозомочевины на основе аминокислот. Оригинальный противоопухолевый препарат Лизомустин / В.П. Краснов [и др.] // Материалы Белорусско-Российской научно-практической конференции с международным

участием «Отечественные противоопухолевые препараты» Минск, 23-25 мая. Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, №2. – С. 46.

44. Крысанова, Т.А. Спектрофотометрическое определение натриевой соли цефотаксима в водном растворе / Т.А. Крысанова [и др.] // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2015. - №2. – С. 13-16.

45. Лавренчук, Р.А. Контроль качества лекарственных форм для парентерального применения: современное состояние / Р.А. Лавренчук, И.В. Сакаева, Е.И. Саканян // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2012. - №2. – С. 40-42.

46. Лавренчук, Р.А. Актуальные вопросы классификации лекарственных форм для парентерального применения / Р.А. Лавренчук, И.В. Сакаева, Е.И. Саканян // Современная медицина: актуальные вопросы: сборник статей по материалам IX международной научно-практической конференции. – Новосибирск: СибАК, 2012. – С. 52-58.

47. Ланцова, А.В. Сравнительное изучение противоопухолевой активности липосомальных лекарственных форм препаратов производных нитрозоалкилмочевины / А.В. Ланцова [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2005. - №2(14). – С. 25-29.

48. Ланцова, А.В. Противоопухолевые препараты, производные нитрозоалкилмочевины, применяемые для лечения новообразований различного генеза / А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, Н.А. Оборотова // Биофармацевтический журнал. – 2014. – Т. 6, №5. – С. 38-51.

49. Левит, Г.Л. N-алкилнитрозокарбамоилпроизводные аминокислот. Синтез, свойства и противоопухолевая активность (обзор) / Г.Л. Левит [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1995. – Т.29, №8. – С. 10-17.

50. Левковский, Ю.Л. Влияние турбулентности потока на возникновение и развитие кавитации / Ю.Л. Левковский, А.В. Чалов // Акустический журнал. – 1978. – Т.24, №2. – С. 221-227.

51. Ляпунов, Н.А. Методология фармацевтической разработки лекарственных препаратов в Украине / Н.А. Ляпунов // Фармация. – 2013. - №7. – С. 44-49.

- 52.Макиева, М.С. Разработка норм качества, изучение стабильности и установление сроков годности космецевтических форм лимонника китайского / М.С. Макиева, Ю.А. Морозов // Фармация и фармакология. – 2015. - №1(8). – С. 38-42.
- 53.Манзюк, Л.В. Препарат араноза. Результаты клинических испытаний. / Л.В. Манзюк, Г.Ю. Харкевич // Вестник Московского онкологического общества. – 2004. - №11. – С. 5-6.
- 54.Миронов, А.Н. Стандартные образцы в практике зарубежного и отечественного фармацевтического анализа / А.Н. Миронов [и др.] // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2012. - №3. – С. 56-60.
- 55.Митькина, Л.И. Лекарственные средства для парентерального применения / Л.И. Митькина, З.С. Шпрах, Е.Л. Ковалева // Фармация. – 2011. - №1. – С. 3-5.
- 56.Мкртчян, Т.В. Изыскание лекарственных форм новых противоопухолевых производных нитрозомочевины и их технология / Т.В. Мкртчян // Дисс. канд. фарм. наук. – М., 1987. – 203 с.
- 57.Могилюк, В. Аспекты лиофилизационной сушки водных растворов / В. Могилюк // Фармацевтическая отрасль. – 2014. - №5(46). – С. 46-53.
- 58.Молчанов, Г.И. Ультразвук в фармации / Г.И. Молчанов. – М.: Медицина, 1980. – 176 с.
- 59.Несчисляев, В.А. Универсальный режим сублимационного высушивания пробиотиков / В.А. Несчисляев, Е.В. Орлова, И.А. Бахтин // Сибирский медицинский журнал. – 2009. –№ 4. – С. 74-75.
- 60.Несчисляев, В.А. Универсальная защитная среда для лиофилизации пробиотических препаратов / В.А. Несчисляев, Е.В. Орлова, И.А. Бахтин // Казанский медицинский журнал. – 2010. – Т. 91, № 1. – С. 122-124.
- 61.Оборотова, Н.А. Основные проблемы создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для внутривенного введения / Н.А. Оборотова // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, №2. – С. 27-31.

- 62.Олефир, Ю.В. Определение видимых механических включений в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах / Ю.В. Олефир [и др.] // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2016. - №1. – С. 37-40.
- 63.Орел, Н.Ф. Новые производные нитрозомочевины / Н.Ф. Орел // В сборнике «Новые цитостатики в лечении злокачественных опухолей». – М, 1998. – С. 25-39.
- 64.Пахомов, В.П. Хроматография в химико-фармацевтических исследованиях (к столетию открытия хроматографии М.С. Цветом) / В.П. Пахомов // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37, №8. – С. 55-56.
- 65.Полозкова, С.А. Химиотерапия метастатических нейроэндокринных опухолей аранозой в монорежиме и в комбинации с капецитабином и темозоломидом / С.А. Полозкова [и др.] // Журнал «Злокачественные опухоли». – 2013. –№1(5). – С. 47-55.
- 66.Полозкова, С.А. Факторы прогноза эффективности терапии нейроэндокринных новообразований режимами на основе аранозы / С.А. Полозкова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т.16, №1. – С. 38-46.
- 67.Пятигорская, Н.В. Вода для инъекций / Н.В. Пятигорская [и др.] // Фармация. – 2010. - №5. – С. 3-7.
- 68.Рудакова, Л.В. Определение парацетамола и салицилата натрия с применением ТСХ, фотометрии и цифровой цветометрии / Л.В. Рудакова, О.Б. Рудаков // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2015. - №2. – С. 35-41.
- 69.Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
- 70.Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Под ред. Н.И. Переводчиковой, В.А. Горбуновой. – 4-е изд., расширенное и дополненное. – М.: Практическая медицина, 2015. – 688 с.

71. Рыбакова, О.В. Определение токоферолов методом хроматографии в тонком слое сорбента / О.В. Рыбакова, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42, № 8. – С.31-34.
72. Рынок препаратов для лечения онкологических заболеваний (электронный ресурс). URL: <http://www.healthconomics.ru/item/10409-rynok-preparatov-dlya-lecheniya-onkologicheskikh-zabolevanij> (дата обращения 05.05.2016 г.).
73. Рышкова, Н.Е. Совершенствование методов стандартизации лиофильно высушенных лекарств на примере противоопухолевого препарата из класса нитрозомочевины / Н.Е. Рышкова // Дисс. канд. фарм. наук: 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – М., 2000. – 150 с.
74. Сакаева, И.В. Определение требований, предъявляемых к ряду стерильных лекарственных форм / И.В. Сакаева, К.А. Биченова, Р.А. Лавренчук, Е.И. Саканян // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – Т.18-2, №10(129). – С. 70-75.
75. Сакаева, И.В. Основные подходы к изучению стабильности лекарственных средств: отечественный и международный опыт / И.В. Сакаева [и др.] // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2013. - №3. – С. 8-11.
76. Салий, Е.А. Разработка технологии получения и масштабирование процесса производства капсул рибавирина / Е. А. Салий, В. В. Литка, А. В. Лось // Украинский биофармацевтический журнал. – 2010. - № 1(6). – С. 4-9.
77. Сеткина, С.Б. Биофармацевтические аспекты технологии лекарственных средств и пути модификации биодоступности / С.Б. Сеткина, О.М. Хишова // Вестник ВГМУ. – 2014. – Т. 13, №4. – С. 162-172.
78. Сидорин, Г.И. Токсикологическая характеристика противоопухолевого препарата Лизомустина / Г.И. Сидорин [и др.] // Медицина труда и промышленная экология. – 2010. - №4. – С. 19-24.
79. Скачилова, С.Я. Биофармацевтические аспекты фармакопейных субстанций / С.Я. Скачилова [и др.] // Фармация. – 2012. - №8. – С. 29-32.

- 80.Скачилова, С.Я. Проблема совместимости и безопасности вспомогательных веществ и субстанций в парентеральных (инъекционных) лекарственных формах / С.Я. Скачилова [и др.] // Фармация. – 2015. - №8. – С. 33-37.
- 81.Собин, Ф.Б. Разработка оптимальных параметров определения новых производных 4-(гет)арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот в тонком слое сорбента / Ф.Б. Собин [и др.] // Фармация и фармакология. – 2014. - №6(7). – С. 59-61.
- 82.Степанова, Е.В. Перспективы использования ингибиторов NFκB в клинической практике / Е.В. Степанова, М.Е. Абрамов, М.Р. Личиницер // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, №4. – С. 27-30.
- 83.Стуков, А.Н. Изучение комбинированного действия гемцитабина и ломустина у мышей с лимфосаркомой Лио-1 / А.Н. Стуков [и др.] // Вопросы онкологии. – 2011. – Т. 57, №2. – С. 221-224.
- 84.Тенцова, А.И. Современные биофармацевтические аспекты вспомогательных веществ / А.И. Тенцова [и др.] // Фармация. – 2012. - №7. – С. 3-6.
- 85.Терёшкина, О.И. Проблемы доклинической оценки безопасности компонентов готовых лекарственных форм препаратов / О.И. Терёшкина, Т.А. Гуськова // Фармация. – 2007. - №4. – С. 8-11.
- 86.Терёшкина, О.И. К вопросу о безопасности вспомогательных веществ в аспекте создания проектов общих фармакопейных статей на лекарственные формы Фармакопеи России XII издания / О.И. Терёшкина, И.П. Рудакова, И.А. Самылина // Сборник материалов XVIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М.: РИЦ «Человек и лекарство», 2008. – С.565.
- 87.Терёшкина, О.И. Особенности доклинической оценки безопасности вспомогательных веществ в составе лекарственных препаратов / О.И. Терёшкина // Токсикологический вестник. – 2010. - №5. – С. 23-25.
- 88.Титова, А.В. Вспомогательные вещества, используемые в производстве лекарственных препаратов. Стандартизация и методы контроля / А.В. Титова // Дисс. докт. фарм. наук. – М., 2006. – 4123 с.

- 89.Томашевская, Н.В. Технологические возможности сублимационной сушки фармацевтических препаратов / Н.В. Томашевская, Н.А. Оборотова, И.И. Краснюк // Фармация. – 2007 - №2. – С. 25-26.
- 90.Уварова, Ю. Рынок препаратов для лечения онкологических заболеваний / Ю. Уварова // Ремедиум. – 2010. - №10. – С. 16-18. (электронный ресурс). URL: <http://www.remedium.ru/state/detail.php?ID=41110> (дата обращения 08.03.2017).
- 91.Фармакологическая группа — Алкилирующие средства (электронный ресурс). URL: http://www.rlsnet.ru/fg_index_id_268.htm (дата обращения 01.02.2017).
- 92.Химиотерапия при раке мозга – Глиадел (электронный ресурс). URL: <http://oncogu.com/gliadel> (дата обращения 02.02.2017).
- 93.Холмберг, К. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах / К. Холмберг [и др.]. – М.: Бином, 2007. – 211 с.
- 94.Шарф, В.Г. Биотрансформация алкилнитрозомочевин // Химико-фармацевтический журнал. – 1989. – Т.23, № 10. –С. 1157-1172.
- 95.Шашкина, М.Я. Физико-химические и биологические особенности противоопухолевых соединений из класса нитрозоалкилмочевин, имеющие наибольшее значение при разработке готовых противоопухолевых лекарств / М.Я. Шашкина, П.В. Лопатин, Т.В. Мкртчян // Химиотерапия опухолей в СССР. – 1989. – вып. 54. – С. 92-98.
- 96.Шпрах, З.С. Химико-фармацевтическое исследование лекарственной формы 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевины (БХНМ) методом ТСХ / З.С. Шпрах, О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т.3, №2. – С. 42-43.
- 97.Экспериментальная онкология на рубеже веков / под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. – М.: Изд. группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2003. – 552 с.
- 98.Эпштейн, Н.А. Определение внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) при валидации методик в фармации / Н.А. Эпштейн //

Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. - №1(14). – С. 106-117.

99. Agarwal, A. Approaches for enhancement of solubility to improve the absorption and bioavailability of poorly soluble drugs / A. Agarwal, B.K. Singh, N. Trivedi, K.K. Jha // Journal of biopharmaceuticals. – 2015. – V. 7, №2. – P. 3-8.

100. Bansal, A.K. Salt selection in drug development / A.K. Bansal, L. Kumar, A. Amin // Pharmaceutical Technology. – 2008. – V.32, №3 (электронный ресурс). URL: <http://www.pharmtech.com/salt-selection-drug-development> (дата обращения 05.05.2016).

101. Berd D, Mastrangelo MJ: Combination chemotherapy of metastatic melanoma / D. Berd, M.J. Mastrangelo // Journal of clinical oncology. – 1995. – V. 13. – P.796-797.

102. Betageri, G.V. Water soluble polymers for pharmaceutical applications / V.G. Kadajji, G.V. Betageri // Polymers. – 2011. – V.3(4). – P. 1972-2009.

103. Bibby, M.C. Anti-tumour activity of TCNU in a panel of transplantable murine colon tumours / C.M. Bibby, J.A. Double, C.M. Morris // European journal of cancer and clinical oncology. – 1988. – V.24. – P. 1361-1364.

104. Bohanec, S. Using different experimental designs in drug-excipient compatibility studies during the preformulation development of a stable solid dosage formulation / S. Bohanec [et al.] // Acta Chimica Slovenica. – 2010. – V. 57. – P. 895-903.

105. Buckner, J.C. A phase III study of radiation therapy plus carmustine with or without recombinant interferon-alpha in the treatment of patients with newly diagnosed high-grade glioma / J.C. Buckner [et al.] // Cancer. – 2001. – V. 92, №2. – P. 420-433.

106. Cancer Fact sheet (электронный ресурс). URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (дата обращения 05.02.2017).

107. Chadha, R. Drug-excipient compatibility screening - role of thermo analytical and spectroscopic techniques / R. Chadha, S. Bhandari // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2014. – V. 87. – P. 82-97.

108. Chaudhari, S.P. Pharmaceutical excipients: a review / S.P. Chaudhari, P.S. Patil // International journal of advances in pharmacy, biology and chemistry. – 2012. – V.1, №1. – P. 21-34.
109. Chollet, P. Results of two phase II trials with cystemustine in advanced malignant melanoma / P. Chollet [et al.] // Annals of oncology. – 1994. – V. 5. – P. 144a.
110. Dal Pan, G. Preliminary analysis of the Gliadel treatment protocol / G. Dal Pan, L. Butler, M. Schactman // Abstract presented at the ASCO annual meeting. – 1997. – P. 338A.
111. Dhakane, V.D. A validated stability-indicating HPLC related substances method for carmustine in bulk drug / V.D. Dhakane, M.B. Ubale // Elixir Applied Chemistry. – 2012. – V. 50. – P. 10383-10386.
112. Favier, M. Stability of carmustine in polyvinyl chloride bags and polyethylene-lined trilayer plastic containers / M. Favier [et al.] // American journal of health-system pharmacy. – 2001. – V. 58. – P. 238-241.
113. Fisusi, F.A. Lomustine nanoparticles enable both bone marrow sparing and high brain drug levels – a strategy for brain cancer treatments / F.A. Fisusi [et al.] // Pharmaceutical research. – 2016. – V. 33. – P. 1289-1303.
114. Frederiksson K., Lundgren P., Landersjoe L. Stability of carmustine kinetics and compatibility during administration / K. Frederiksson, P. Lundgren, L. Landersjoe // Acta pharmaceutica suecica. – 1986 –V.23. – P. 115-124.
115. Friedman, H.S. Can alkylguanine-DNA alkyltransferase depletion enhance alkylator activity in the clinic? / H.S. Friedman // Clinical cancer research. – 2000. – V. 6. – P. 2967-2968.
116. Gliadel Wafer (polifeprosan 20 with carmustine implant) (электронный ресурс). URL: <http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/drug/237/gliadel-wafer-polifeprosan-20-with-carmustine-implant> (дата обращения 01.02.2016).

117. Gorbunova, V.A. Therapeutic results in small cell lung cancer with extensive disease / V.A. Gorbunova [et al.] // International congress for Lung Cancer. – Athens, 1994. – P. 177.
118. Hadji-Minaglou-Gonzalvez, M.F. Effects of temperature, solution composition, and type of container on the stability and absorption of carmustine / M.F. Hadji-Minaglou-Gonzalvez, A. Gayte-Sorbier, C.B. Airauto, M. Verdier // Clinical therapeutics. – 1992. – V.14. – P. 821-824.
119. Hardwicka, L.M. A proposed rationale and test methodology for establishment of acceptance criteria for vacuum integrity testing of pharmaceutical freeze dryers / L.M. Hardwicka [et al.] // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2013. – V. 85, №2. – P.236–239.
120. Harris, T. How freeze-drying works / T. Harris // (электронный ресурс). URL: <http://science.howstuffworks.com/innovation/edible-innovations/freeze-drying2.htm> (дата обращения 01.05.2016).
121. Hartley-Asp, B. Anti-tumor, toxicological and pharmacokinetic properties of a novel taurine-based nitrosourea (TCNU) // B. Hartley-Asp [et al.] // Investigation new drugs. – 1998. – V. 6. – P. 19-30.
122. Heitz, E. Filtermedien und Umkehrsmase – «Sauberes» Wasser // Pharm. Ind. – 1988. – №2. – P. 53-54.
123. Iliadis, A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nitrosourea fotemustine: a French Cancer Centre Multicentric study / A. Iliadis [et al.] // European journal of cancer. – 1996. – V. 32A. – P. 445-460.
124. Jacquillat, C. Final report of the phase II study of the nitrosourea fotemustine in 153 patients with dissiminated malignant melanoma including brain metastases / C. Jacquillat [et al.] // Proc. AACR. – 1989. – V. 30. – P. 1088.
125. Kitajima, K. Chemotherapy of chronic myelogenous leukemia--VP(M) regimen initiated during its chronic phase, and evaluation of MCNU in the phase of blastic crisis / K. Kitajima [et al.]// Gan To Kagaku Ryoho. – 1989. – V. 16, №11. – P. 3573-3579.

126. Kornblith, P.L. Response of cultured human brain tumors to nitrosoureas: correlation with clinical data / P.L. Kornblith, B.H. Smith, L.A. Leonard // *Cancer*. – 1981. – V.47, №2. – P. 255-265.
127. Kraan, H. Development of thermostable lyophilized inactivated polio vaccine / H. Kraan, P. van Herpen, G. Kersten, J.-P. Amorij // *Pharmaceutical research*. – 2014. – V. 31. – P. 2618-2629.
128. Laquerriere, A. Nitrosoureas lomustine, carmustine and fotemustine induced hepatotoxic perturbations in rats: biochemical, morphological and flow cytometry studies / A. Laquerriere [et al.] // *European journal of cancer and clinical oncology*. – 1991. – V. 27, №5. – P. 630-638.
129. Laskar, P.A. Degradation of carmustine in aqueous media / P.A. Laskar, J.W. Ayres // *Journal of pharmaceutical science*. – 1977. – V. 66, №8. – P. 1073-1076.
130. Laskar, P.A. Degradation of carmustine in mixed solvent and nonaqueous media / P.A. Laskar, J.W. Ayres // *Journal of pharmaceutical science*. – 1977. – V. 66, №8. – P. 1076-1078.
131. Levit, G.L. N^ω-alkylnitrosocarbomoyl- α,ω -diaminocarboxylic acids. 3. Synthesis and antitumor activity of N^ε-nitroso-N^ε-[N'-2chloroethyl)carbomoyl]-L-lysine and N^ε-[N'-2chloroethyl)-N-nitroso-carbomoyl]-L-lysine // G.L. Levit [et al.] // *Pharmaceutical chemistry journal*. – 1996. – V. 30, №5. – P. 306-309.
132. Loftsson, T. Degradation of lomustine (CCNU) in aqueous solutions / T. Loftsson, H. Fridriksdottir // *International journal of pharmaceutics*. – 1990. – V. 62, №2-3. – P. 243-247.
133. Loftsson, T. Degradation of tauromustine (TCNU) in aqueous solutions / T. Loftsson, J. Baldvinsdottir // *Acta Pharmaceutica Nordica*. – 1992. – V. 4, №3. – P. 129-132.
134. Ludlum, D.B. Mechanism of action of the nitrosoureas—II. Formation of fluoroethylguanosine from the reaction of bis-fluoroethyl nitrosourea and guanosine / D.B. Ludlum, W.P. Tong // *Biochemical pharmacology*. – 1978. – V. 27, №20. – P. 2391-2394.

135. Makary, P. Principles of salt formation / P. Makary // UK journal of pharmaceutical and biosciences. – 2014. – V. 2, №4. – P. 1-4.
136. Meulemans, A. Comparative diffusion study of two nitrosoureas: carmustine and fotemustine in normal rat brain, human and rat brain biopsies / A. Meulemans [et al.] // Chemotherapy. – 1991. – V. 37. – P. 86-92.
137. Mohanachandran, P.S. Enhancement of solubility and dissolution rate an overview / P.S. Mohanachandran, P.G. Sindhumol, T.S. Kiran // Pharmacie globale: international journal of comprehensive pharmacy. – 2010. – V.1. – Is. 4. – P. 1-10.
138. Molineux, G. Hematopoietic effects of TCNU in mice / G. Molineux, R. Schofield, N.G. Testa // Cancer treatment reports. – 1987. – V.71, №9. – P. 837-841.
139. Nagai, M. Therapeutic effect of ranimustine (MCNU) on essential thrombocythemia and polycythemia vera / M. Nagai [et al.] // Gan To Kagaku Ryoho. – 1989. – V. 15, №12. – P. 3267-3270.
140. Nishath, F. Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development / F. Nishath [et al.] // Journal of applied pharmaceutical science. – 2011. – V. 1, № 06. – P. 66-71.
141. Patel, H. New pharmaceutical excipients in solid dosage forms – A review / H. Patel, V. Shah, U. Upadhyay // International journal of pharmacy & life sciences. – 2011. – V. 2, №8. – 1006-1019.
142. Patel, P. Drug-excipient compatibility studies: first step for dosage form development / P. Patel [et al.] // The pharma innovation journal. – 2015. – V. 4, №5. – P. 14-20.
143. Parr, A. The effect of excipients on the permeability of BCS class III compounds and implications for biowaivers // A. Parr [et al.] // Pharmaceutical research. – 2016. – V. 33. – P. 167-176.
144. Perevodchikova, N.I. Aranoza – a new nitrosourea derivative with antitumor action. Phase I-II trials / N.I. Perevodchikova [et al.] // International journal clinical chemotherapy. – 1992. – V. 5, №4. – P. 231-236.
145. Petit, T. Complete remission seven years after treatment for metastatic malignant melanoma / T. Petit [et al.] // Cancer. – 1996. – V. 77. – P. 900-902.

146. Riviere, A. Cisplatin-fotemustine combination in operable non-small cell lung cancer: preliminary report of a French multicentre phase II trial / A. Riviere [et al.] // *European journal of cancer*. – 1994. – V. 30A. – P. 587-590.
147. Rixe, O. Fotemustine plus dacarbazine, vindesine combination chemotherapy in advanced malignant melanoma: a phase II study of 43 patients / O. Rixe [et al.] // *Melanoma research*. – 1995. – V. 5, №6. – P. 419-424.
148. Rossi, A.D. Focus on fotemustine / A.D. Rossi [et al.] // *Journal of experimental & clinical cancer research*. – 2006. – V. 25. - №4. – P. 461-468.
149. Rubb, R. Phase II study of fotemustine in untreated inoperable non-small cell lung cancer / R. Rubb [et al.] // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 1994. – V. 34. – P. 444-446.
150. Samuel, L.M. Phase II trial of procarbazine, vincristine and lomustine (POC) chemotherapy in metastatic cutaneous malignant melanoma / L.M. Samuel // *European journal of cancer*. – 1994. – V. 30A. – P. 2054-2056.
151. Schallreuter, K.U. The mechanism of action of the nitrosourea anti-tumor drugs on thioredoxin reductase, glutathione reductase and ribonucleotide reductase / K.U. Schallreuter, F.K. Gleason, J.M. Wood // *Biochimica et biophysica acta (BBA) - molecular cell research*. – 1990. – V. 1054, №1. – P. 14-20.
152. Seidegård, J. Increased degradation rate of nitrososureas in media containing carbonate / J. Seidegård, H. Grönquist, H. Tuveesson, P.-O. Gunnarsson // *In vitro cellular & developmental biology – animal*. – 2009. – V.45, №1. – P. 32-34.
153. Serajuddin, A.T. Salt formation to improve drug solubility / A.T. Serajuddin // *Advanced drug delivery reviews*. – 2007. – V. 59, №7. – P. 603-616.
154. Sewbo, K.A. Phase II study of fotemustine, cisplatin and tamoxifen in metastatic malignant melanoma / K.A. Sewbo [et al.] // *3rd International conference on melanoma*. – Venice, 1993.
155. Smyth, I.F. Phase I study of TCNU, a novel nitrosourea / I.F. Smyth [et al.] // *European journal of cancer and clinical oncology*. – 1987. – V. 12. – P. 1837-1843.

156. Thivat, E. Phase II trial of the association of a methionine-free diet with cystemustine therapy in melanoma and glioma / E. Thivat [et al.] // *Anticancer research*. – 2009. – V. 29, №12. – P. 5235-5240.
157. Tong, W.P. Mechanism of action of the nitrosoureas—V: Formation of O6-(2-fluoroethyl) guanine and its probable role in the crosslinking of deoxyribonucleic acid / W.P. Tong, M.C. Kirk, D.B. Ludlum // *Biochemical pharmacology*. – 1983. – V. 32, №13. – P. 2011-2015.
158. Trantum, B.L. A phase II study of methyl CCNU in the treatment of solid tumors and lymphomas: a Southwest Oncology Group study / B.L. Trantum [et al.] // *Cancer*. – 1975. – V.35, №4. – P. 1148-1153.
159. Turriziani M. O(6)-(4-bromothienyl)guanine (PaTrin-2), a novel inhibitor of O(6)-alkylguanine DNA alkyl-transferase, increases the inhibitory activity of temozolomide against human acute leukaemia cells in vitro / M. Turriziani [et al.] // *Pharmacological research*. – 2006. – V. 53. – P. 317-323.
160. Van Gorp, J.A. Evaluation of electrical conductivity-temperature curves using a mathematical model: Temperature-dependent changes during thawing of frozen aqueous pharmaceuticals / J.A. Van Gorp [et al.] // *Journal of pharmacy and pharmacology*. – 1987. –V.39. №2. –P. 73-78.
161. Walker, M.D. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery / M.D. Walker [et al.] // *The new England journal of medicine*. – 1980. – V. 303, №23. – P. 1323-1329.
162. Wasserman, T.H. Clinical comparison of the nitrosoureas / T.H. Wasserman, M. Slavik, S.K. Carter // *Cancer*. – 1975. – V. 36, №4. – P. 1258-1268.
163. Williams, H.D. Strategies to address low drug solubility in discovery and development / H.D. Williams [et al.] // *Pharmacological reviews*. – 2013. – V. 65, №1. – P. 315-499.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

Список рисунков

Рисунок 1 – Группы ПЛФ

Рисунок 2 – Доля ПЛП в Государственном реестре ЛС

Рисунок 3 – Некоторые растворители, разрешенные для применения в составе ПЛФ

Рисунок 4 – Типовое устройство сублимационной установки

Рисунок 5 – Структура продукта во время первичной сушки

Рисунок 6 – Долевое соотношение различных групп противоопухолевых препаратов по объему продаж

Рисунок 7 – Введение пластинок Gliadel в полость

Рисунок 8 – Структурная формула ормустина

Рисунок 9 – Цитотоксическая активность АФИ ормустина на клеточных линиях диссеминированной меланомы человека Mel Kog и Т-лимфобластного лейкоза человека Jurkat

Рисунок 10 – Три режима лиофилизации раствора ормустина

Рисунок 11 – Типичная хроматограмма ПЛФ ормустинов

Рисунок 12 – Схема образования гидрохлорида ормустина

Рисунок 13 – Влияние различных методик на скорость растворения субстанции ормустина

Рисунок 14 – Влияние различных методик на содержание ормустина в растворе после полного растворения

Рисунок – 15. Изменение концентрации ормустина в растворе в процессе хранения

Рисунок 16 – Влияние формообразователя на время получения прозрачного раствора

Рисунок 17 – Влияние формообразователя на стабильность ормустина в растворе

Рисунок 18 – Изменение содержания действующего вещества в ПЛФ после заморозки

Рисунок 19 – График изменения температуры на препарате в процессе лиофилизации

Рисунок 20 – Стабильность растворов ормустина после регидратации при использовании различных растворителей

Рисунок 21 – Технологическая схема получения ПЛФ ормустина

Рисунок 22 – Время подъема фронта в различных системах растворителей

Рисунок 23 – Хроматограмма системы н-бутанол: ЛУК: вода (12:3:5): 1 – испытуемый раствор (50 мкг ормустина), 2 – СО-1 (50 мкг ормустина), 3 – ПР-1 (1 мкг ормустина), 4 – ПР-2 (2 мкг ормустина)

Рисунок 24 – Хроматограмма системы спирт 95%: аммиак водный (3:2) после йодной камеры: 1 – испытуемый раствор (120 мкг Kollidon 17PF), 2 – СО-2 (120 мкг Kollidon 17PF), 3 – ПР-3 (2 мкг Kollidon 17PF), 4 – ПР-4 (1 мкг Kollidon 17PF)

Рисунок 25 – Хроматограмма системы спирт 95%: аммиак водный (3:2): 1 – испытуемый раствор (50 мкг ормустина, 120 мкг Kollidon 17PF), 2 – СО-2 (120 мкг Kollidon 17PF), 3 – ПР-3 (2 мкг Kollidon 17PF), 4 – ПР-4 (1 мкг Kollidon 17PF).

Рисунок 26 – Спектры поглощения ПЛФ ормустина (1), субстанции ормустина (2), 6% раствора Kollidon 17PF (3) и раствора 0,1 М хлористоводородной кислоты (4)

Рисунок 27 – Соблюдение закона Бугера-Ламберта-Бера для АФИ ормустина при длине волны 396 ± 2 нм в растворе 0,01 М хлористоводородной кислоты

Рисунок 28 – Соблюдение закона Бугера-Ламберта-Бера для ПЛФ ормустина при длине волны 396 ± 2 нм в растворе 0,01 М хлористоводородной кислоты

Рисунок 29 – График регрессивная прямая

Рисунок 30 – УПЖ (%) мышей с лейкоцитарной лейкемией Р-388 (асцитная опухоль) и лейкоцитарной лейкемией L-1210 (солидная опухоль)

Рисунок 31 – Извлечение и гибель мышей с лейкоцитарной лейкемией Р-388

Рисунок 32 – Излечение и гибель мышей с лейкоцитарной лейкемией L-1210

Список таблиц

Таблица 1 – Некоторые примеры несовместимости компонентов ЛФ

Таблица 2 – Основные группы ВВ, вводимых в состав растворов подлежащих сублимационному высушиванию

Таблица 3 – Изучение растворимости АФИ ормустина в различных растворителях

Таблица 4 – Влияние УЗ на изомерный состав ормустина

Таблица 5 – Влияние фильтрующего материала на содержание ормустина в растворе

Таблица 6 – Сравнение параметров лиофилизатов ормустина, полученных при различных режимах лиофилизации

Таблица 7 – Изменение рН при добавлении различных объемов растворителей к ПЛФ ормустина

Таблица 8 – Значение показателей R_f ормустина и Kollidon 17PF в различных системах растворителей

Таблица 9 – Результаты количественного определения ормустина в свежеприготовленном растворе

Таблица 10 – Результаты количественного определения ормустина в лиофилизате

Таблица 11 – Расчет линейности методики количественного определения ормустина в ПЛФ

Таблица 12 – Результаты исследования правильности методики количественного спектрофотометрического определения ормустина в ПЛФ

Таблица 13 – Сходимость аналитической методики количественного определения ормустина в ПЛФ

Таблица 14 – Результаты определения промежуточной прецизионности

Таблица 15 – Состав модельных смесей растворов ормустина для оценки селективности методики количественного определения

Таблица 16 – Определение содержания ормустина в модельных смесях

Таблица 17 – Стандартизация ПЛФ ормустина по показателю «количественное определение»

Таблица 18 – Стандартизация ПЛФ ормустина по показателю «средняя масса и однородность по массе»

Таблица 19 – Изучение стабильности серий ПЛФ ормустина после получения и в процессе хранения

Таблица 20 – Противоопухолевая активность ПЛФ ормустина при однократном введении мышам с солидными опухолями

Приложение 1

Противоопухолевые препараты из группы алкилирующих агентов, зарегистрированные в государственном реестре ЛС

Группа	Действующее вещество	Торговое наименование	Производитель	Форма выпуска
хлорэтиламины	хлорамбуцил	лейкеран	Аспен Фарма Трейдинг Лимитед (Ирландия); ЗАО ГласкоСмитКляйн Трейдинг (Россия)	таблетки покрытые оболочкой
	мелфалан	алкеран	Аспен Фарма Трейдинг Лимитед (Ирландия); ЗАО ГласкоСмитКляйн Трейдинг (Россия)	лиофилизат для приготовления раствора для внутрисосудистого введения таблетки покрытые пленочной оболочкой
	циклофосфамид	циклофосфан	ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО» (Россия); ОАО «Биохимик» (Россия); ООО «Промомед Рус» (Россия)	порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения
		эндоксан	Бакстер Онкология ГмбХ (Германия)	порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения таблетки покрытые оболочкой
		циклофосфан	ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО» (Россия)	порошок для приготовления раствора для инъекций
		циклофосфан-ЛЭНС быстрорастворимый	ООО «ЛЭНС-Фарм» (Россия); ОАО «ВЕРОФАРМ» (Россия)	лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения
	ифосфамид	ифосфамид	ОАО «Биохимик» (Россия); ООО «Промомед Рус» (Россия)	порошок для приготовления раствора для инфузий
		веро-ифосфамид	ОАО «ВЕРОФАРМ» (Россия)	
		холоксан	Бакстер Онкология ГмбХ (Германия)	порошок для приготовления раствора для инфузий порошок для приготовления раствора для внутривенного введения
	бендамустин	рибомустин	Астеллас Фарма Броп Б.В. (Нидерланды)	порошок для приготовления раствора для инъекций
азиридины	тиотепа	тепадина	АДИЕННЕ С.р.л. (Италия); Римзер Арцнаймиттель АГ (Германия)	лиофилизат для приготовления раствора для инфузий
	алтретамин	гексален	Эм-Джи-Ай Фарма Инкорпорейтед (США)	капсулы
эфирь дисульфоновых кислот	бусульфан	милеран	Аспен Фарма Трейдинг Лимитед (Ирландия); ЗАО ГласкоСмитКляйн Трейдинг Россия)	таблетки покрытые оболочкой
	треосульфан	треосульфан медак	медак ГмбХ (Германия)	порошок для приготовления раствора для инфузий

производные нитрозомочевин	кармустин	ВiCNU	ООО «Бристол-Майерс Сквибб» (Франция, США); Экмюр Фармасьютикалз Лтд (Индия)	лиофилизат для приготовления раствора для инфузий
	ломустин	ломустин медак	медак ГмбХ (Германия)	капсулы
		SeeNU	Бристол-Майерс Сквибб С.р.л. (Италия)	
	фотемустин	мюстофоран	Лаборатории Сервье (Франция)	порошок для приготовления раствора для инфузий
	лизомустин	лизомустин	ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО» (Россия)	лиофилизат для приготовления раствора для инфузий
арабино-пиранозилметил нитрозомочевина	араноза	ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО» (Россия), филиал Научпрофи ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (Россия)	лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения	
комплексные соединения платины	цисплатин	цисотер	ООО «АРС» (Россия)	концентрат для приготовления раствора для инфузий
		цисплатин-РОНЦ	филиал Научпрофи ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (Россия)	
		цисплатин-ЛЭНС	ООО «ЛЭНС-Фарм» (Россия); ОАО «ВЕРОФАРМ» (Россия)	
		диспланор	АО «Активис Групп» (Исландия)	
		кемоплат	Фрезениус Каби Дойчланд ГмбХ (Германия)	
		цисплатин-Тева	Тева Фармацевтические Предприятия Лтд. (Израиль)	
		платидиам	Плива-Лахема АО (Чешская Республика)	
		цитоплатин	Ципла Лимитед (Индия)	
		цисплатин-Эбеве	Эбеве Фарма Гес.м.б.Х. Нфг. КГ (Австрия)	
		платинол	Бристол-Майерс Сквибб С.р.л. (Италия)	
		цисплатин	Окаса Фарма Лтд (Индия)	
	цисплатин-Тева	Тева Фармацевтические Предприятия Лтд. (Израиль)	лиофилизат для приготовления раствора для инфузий	
	цисплатин-Тева	Тева Фармацевтические Предприятия Лтд. (Израиль)	раствор для инъекций	
	карбоплатин	карбоплатин-РОНЦ	филиал Научпрофи ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (Россия)	концентрат для приготовления раствора для инфузий
		карбоплатин ВМ	ООО «Париаль» (Россия)	
		кемокарб	Фрезениус Каби Дойчланд ГмбХ (Германия)	
		карбоплатин-ЛЭНС	ООО «ЛЭНС-Фарм» (Россия); ОАО «ВЕРОФАРМ» (Россия)	
карбоплатин		ЗАО «Биокад» (Россия)		
карбоплатин-Тева	Тева Фармацевтические			

			Предприятия Лтд. (Израиль)	лиофилизат для приготовления раствора для инфузий	
		циклоплатин	Плива-Лахема АО (Чешская Республика)		
		карбоплатин-Эбеве	Эбеве Фарма Гес.м.б.Х. Нфг. КГ (Австрия)		
		паракт	АО «Активис Групп» (Исландия)		
		карботера	Лаборатория Тьютор С.А.С.И.Ф.И.А. (Аргентина)		
		карбоплатин-Тева	Тева Фармацевтические Предприятия Лтд. (Израиль)		
		бластокарб	Лемери С.А. де С.В. (Мексика)		
	оксалиплатин	тексалок	ЗАО ГласкоСмитКляйн Трейддинг Россия)	лиофилизат для приготовления раствора для инфузий	
		экзорум	ООО «ЛЭНС-Фарм» (Россия); ОАО «ВЕРОФАРМ» (Россия)		
		оксатера	Лаборатория Тьютор С.А.С.И.Ф.И.А. (Аргентина)		
		гесседил	ЗАО «Фармацевтический завод ЭГИС» (Венгрия)		
		оксиплат	Сан Фармасьютикал Индастриз Лтд (Индия)		
		платикад	ЗАО «Биокад» (Россия)		
		оксалиплатин-Филаксис	ООО Цефарма (Россия)		
		оксалиплатин-Эбеве	Эбеве Фарма Гес.м.б.Х. Нфг. КГ (Австрия)		
		оксалиплатин-Медак	медак ГмбХ (Германия)		
		плаксат	АО «Активис Групп» (Исландия)		
		оксалиплатин-РОНЦ	филиал Научнопрофи ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (Россия)		концентрат для приготовления раствора для инфузий
		окситан	Фрезениус Каби Дойчланд ГмбХ (Германия)		
оксалаплатин-Тева	Тева Фармацевтические Предприятия Лтд. (Израиль)				
триазины	дакарбазин	дакарбазин Медак	медак ГмбХ (германия)	лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения	
		дакарбазин-ЛЭНС	ООО «ЛЭНС-Фарм» (Россия); ОАО «ВЕРОФАРМ» (Россия)		
		дакарбазин Лахема	Плива-Лахема АО (Чешская Республика)		
	прокарбазин	натулан	Сигма-Тау Объединенные фармацевтические Индустрии С.п.А. (Италия)	капсулы	
	темозолomid	темодал	Шеринг-Плау Лабо Н.В. (Бельгия)	лиофилизат для приготовления раствора для инфузий	
темозолomid		ООО «НьюВак» (Россия);	капсулы		

			ЗАО «Биокад» (Россия); ООО «АРС» (Россия); ООО «Пси-Фарма» (Россия); М.Биотек Лимитед (Великобритания)	
		астроглиф	ОАО «ВЕРОФАРМ» (Россия)	
		темозоломид-ТЛ	ООО «Технология лекарств» (Россия)	
		тезалом	ООО «КРКА-РУС» (Россия)	
		тезмозоломид-РУС	ООО «Манас Мед» (Россия)	
		темозоломид-Тева	Тева Фармацевтические Предприятия Лтд. (Израиль)	
		темомид	ЗАО «Фармартис» (Россия); ООО «Санрайз» (Россия); ООО «Джодас Экспоим» (Россия)	
		темцитал	«Анстар АГ» (Швейцария)	
		темодал	Шеринг-Плау Лабо Н.В. (Бельгия)	

Приложение 2

СПЕЦИФИКАЦИЯ

на «Ормустин,

лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг»

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
1	2	3
Описание	Визуальный	Пористая масса белого цвета с желтоватым оттенком
Подлинность	СФМ	ЭСП испытуемого раствора и раствора СО ормустина, приготовленных для количественного определения, в области от 350 до 450 нм должны иметь максимум поглощения при одной и той же длине волны (396±2) нм
	ВЭЖХ	На хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для определения изомерного состава, должны обнаруживаться два последовательно элюирующихся пика: неактивный изомер 1 (время выхода 8,0-9,0 мин) и активный изомер 2 (время выхода 11,3-12,8 мин)
	ТСХ	На полученных хроматограммах пятна ормустина идентифицируют по характерной фиолетовой окраске, пятна Kollidon 17PF – по желтой окраске
Средняя масса и однородность по массе	ГФ XIII	От 0,42 до 0,46 г; отклонение от средней массы 10%
Прозрачность раствора	ГФ XIII	Раствор содержимого флакона в 20 мл воды должен быть прозрачным
Цветность раствора	ГФ XIII	Интенсивность окрашивания раствора, полученного в испытании на прозрачность, не должна превышать эталон GY ₄
pH раствора	ГФ XIII, потенциметрически	От 2,0 до 2,5 (раствор содержимого флакона в 20 мл воды)
Механические включения	РД 42-501-98, визуально	Должен выдерживать требования: частиц ≥ 10 мкм - не более 6000/флакон
Изомерный состав	ВЭЖХ	Содержание изомера (2) в препарате не менее 20,0 % и не более 24,0 %

Посторонние примеси	ТСХ	Содержание единичной примеси - не более 1,0 %, суммарное содержание примесей - не более 3,0 %
Хлориды	ГФ XIII	От 2,6% до 3,3%
Потеря в массе при высушивании	ГФ XIII	Не более 3%
Пирогенность	ГФ XIII	Препарат должен быть апиrogenен
Аномальная токсичность	ГФ XIII	Препарат должен быть не токсичен
Стерильность	ГФ XIII, метод прямого посева	Препарат должен быть стерилен
Количественное определение	СФМ	От 116 мг до 134 мг
Упаковка	По 125 мг активного вещества во флаконах из нейтрального стекла, вместимостью 20 мл, закупоренных пробками из резины под обкатку алюминиевыми колпачками. 10 флаконов с препаратом с инструкцией по применению в картонную пачку	
Маркировка	В соответствии с НД	
Хранение	При температуре не выше от 2 до 8 °С в сухом защищенном от света месте	
Срок годности	Устанавливается	

Приложение 3

Патент РФ «Противоопухолевое средство»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 569 729** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 31/17 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014128255/15, 10.07.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.07.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.07.2014

(45) Опубликовано: 27.11.2015 Бюл. № 33

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: RU 2503657 C1, 10.01.2014.
 Аминокислоты в регио- и стереонаправленном
 синтезе физиологически активных соединений
 / Левит Г.Л. // автореферат, Екатеринбург " "
 2009. RU 2144821 C1, 27.01.2000.

Адрес для переписки:

115478, Москва, Каширское ш., 24, ФГБНУ
 "Российский онкологический научный центр
 имени Н.Н. Блохина", патентно-лицензионное
 отделение

(72) Автор(ы):

Санарова Екатерина Викторовна (RU),
 Ланцова Анна Владимировна (RU),
 Барышникова Мария Анатольевна (RU),
 Оборотова Наталия Александровна (RU),
 Орлова Ольга Львовна (RU),
 Полозкова Алевтина Павловна (RU),
 Краснов Виктор Павлович (RU),
 Игнатъева Елена Владимировна (RU),
 Смирнова Зоя Сергеевна (RU),
 Левит Галина Львовна (RU),
 Мусяк Вера Васильевна (RU),
 Николаева Людмила Леонидовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 учреждение науки Институт органического
 синтеза им. И.Я. Пастера Уральского
 отделения Российской академии наук (ИОС
 УрО РАН) (RU),
 Федеральное государственное бюджетное
 научное учреждение "Российский
 онкологический научный центр имени Н.Н.
 Блохина" (ФГБНУ "РОНЦ им. Н.Н.
 Блохина") (RU)

(54) ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ СРЕДСТВО

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтике, в
 частности к противоопухолевому средству,
 содержащему N^δ-нитрозо-N^δ-[(2-хлорэтил)
 карбамоил]-L-орнитин, поливинилпирролидон
 низкомолекулярный M_w=7000-11000 и кислоту
 хлористоводородную. Осуществление

изобретения позволяет получить
 противоопухолевое средство из класса НАМ,
 удобное в употреблении, обладающее хорошей
 растворимостью, стабильностью при хранении и
 обладающее высоким цитостатическим эффектом.
 3 табл., 3 пр.

RU 2 569 729 C 1

RU 2 569 729 C 1

Приложение 4

Лабораторный регламент на получение готовой ЛФ «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг»

Для служебного пользования. Экз. №

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора по научной
работе ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина»
Минздрава России -
директор НИИ ЭДиТО

З.С.Шпрах 3.С.Шпрах
16 сентября 2015 г.

**Лабораторный регламент
НА ПРОИЗВОДСТВО ГОТОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ
«Ормустин лиофилизат для приготовления раствора
для инъекций 125 мг»**

ЛР -2015

Москва 2015 г.