

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

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Бунятян Наталья Дмитриевна

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук, профессор

Оборотова Наталия Александровна

Официальные оппоненты:

Алексеев Константин Викторович – доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», заместитель директора по инновационной деятельности, главный научный сотрудник лаборатории готовых лекарственных форм

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

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации (ФГАОУ ВО «РУДН» Минобрнауки России)

Защита состоится «___» _____ 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.040.09,
доктор фармацевтических наук,
профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным ВОЗ рак является второй ведущей причиной смертности в мире, в 2015 г от злокачественных образований умерло около 8,8 млн. человек. Постоянно растет спрос на противоопухолевые препараты, по сообщению Росстата в период с января по сентябрь 2017 г. выпуск противоопухолевых лекарств 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 лекарственных препаратов (ЛП). 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. 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. 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. 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. Одним из таких соединений является ормустин, синтезированный в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского, показавший по данным биологических исследований высокую противоопухолевую активность.

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.

Цель и задачи исследования: разработка состава и технологии получения парентеральной лекарственной формы на основе противоопухолевого лекарственного средства ормустина из класса алкилнитрозомочевины.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие **задачи**:

1. Подобрать оптимальный состав лиофилизированной парентеральной лекарственной формы ормустина и разработать технологию ее получения.
2. Разработать методики качественного и количественного химико-фармацевтического анализа для контроля качества парентеральной лекарственной формы ормустина.
3. На основании экспериментальных данных обосновать диапазон допустимых значений в показателях качества для стандартизации парентеральной лекарственной формы ормустина, изучить стабильность лекарственной формы (ЛФ) и срок ее годности в процессе хранения.
4. Изучить противоопухолевую активность разработанной парентеральной лекарственной формы на нескольких моделях опухолей *in vivo*;
5. На основании результатов исследований разработать проект нормативного документа (НД) и лабораторный регламент на получение парентеральной лекарственной формы 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; предложена методика количественного анализа ормустина в составе ПЛФ ормустина, которая в отличие от липосомальной формы проводится в видимой области спектра. Определены допустимые диапазоны показателей качества и изучена стабильность готовой ЛФ ормустина при

хранении; изучена противоопухолевая активность ПЛФ ормустина на опухолевых моделях *in vivo*. Получен патент РФ №2569729 «Противоопухолевое средство».

Теоретическая и практическая значимость исследования

Представленные данные могут служить теоретической базой для разработки инъекционных препаратов на основе умеренно растворимых в воде АФИ. Обосновано применение лиофилизации для получения стабильной при хранении ЛФ ормустина.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Результаты исследования по подбору состава ПЛФ ормустина и разработки технологии получения ПЛФ ормустина.
- Методики химико-фармацевтического анализа ПЛФ ормустина: качественный хроматографический анализ компонентов ПЛФ и количественное спектрофотометрическое определение АФИ в ПЛФ.
- Результаты исследования противоопухолевой активности в опытах *in vivo*.
- Результаты определения стабильности готовой ПЛФ ормустина в процессе хранения.

Методология и методы исследования

В основе методологии исследований лежит многофакторный подход к разработке ПЛФ, включающий анализ данных, оценку степени разработки и актуальности темы исследования, постановку цели и задач исследования, проведение экспериментально-практических работ для достижения поставленной цели и обработке полученных результатов.

В ходе проведения исследований применяли: технологические, химико-фармацевтические, биологические и статистические методы.

Достоверность научных положений и выводов

Диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне. В ходе выполнения экспериментов использовались современные методы анализа (спектрофотометрия (СФМ), тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (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 производство и проект НД «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг».

Внедрение результатов исследования

Разработаны и внедрены в практику лабораторный регламент и проект НД на ПЛФ «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг».

Результаты исследований внедрены в научную и практическую деятельность лабораторий разработки лекарственных форм и химико-фармацевтического анализа НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; научную и

преподавательскую 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) ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 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.) и в рамках государственного контракта №13411.1008799.13.163 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства класса нитрозомочевин».

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 10 работ опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 2 статьи – в журналах, индексируемых в базе SCOPUS.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась АФИ ормустина (рис. 1), синтезированная в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН.

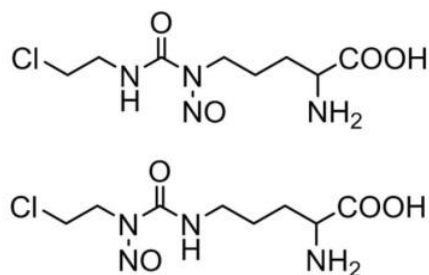


Рисунок 1. Структурная формула ормустина

В процессе проведения исследований использовали химические субстанции, растворители и реактивы, отвечающие требованиям различных НД (ГОСТ, ТУ, российской и зарубежных фармакопей).

1. Изучение растворимости субстанции ормустина

Изучение растворимости субстанции ормустина проводили визуально при температуре 20 ± 2 °C (согласно ОФС.1.2.1.0005.15) и выражали в процентном соотношении.

2. Приготовления ПЛФ «Ормустин, лиофилизат для приготовления

раствора для инъекций 125 мг»

Получение концентрата

Субстанцию ормустина растворяли на ультразвуковой (УЗ) бане TranssonicT310 (Elma, Германия) в заранее приготовленном растворе 0,1 М кислоты хлористоводородной, охлажденном до 15 °C. К полученному раствору добавляли частями Kollidon 17 PF (BASF The Chemical Company, Германия) до получения светло-желтого прозрачного раствора.

Стерилизация ПЛФ ормустина

Стерилизацию раствора ормустина проводили под вакуумом через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм.

Лиофилизация 2,5% раствора ормустина

Лиофилизацию проводили на сублимационной сушке MinifastDO.2. При этом раствор ормустина дозировали по 5 мл во флаконы объемом 20 мл, загружали на полки сублимационной сушки и лиофилизировали с использованием различных температурных режимов.

3. Методы анализа ПЛФ ормустина

3.1. Определение подлинности ормустина

Для установления подлинности компонентов изучаемой ЛФ использовали ТСХ, СФМ и ВЭЖХ.

ТСХ проводили с использованием стандартных образцов (СО) по методики рекомендованной российской фармакопеей. Электронный спектр поглощения в области 200-450 нм должен содержать два максимума при 229 ± 2 нм и при 396 ± 2 нм. При определении методом ВЭЖХ (ВЭЖХ хроматограф Agilent 110 с колонкой Phenomenex Luna C 18(2), Agilent, США) 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).

3.2. Количественный спектрофотометрический анализ ормустина в ПЛФ

Количественное содержание ормустина в ЛФ определяли методом СФМ в видимом диапазоне при длине волны 396 ± 2 нм с использованием спектрофотометра Cary 100 (Varian, Inc., Австралия).

3.3. Определение pH в концентрате и ПЛФ ормустина

Определение pH концентрата и лиофилизата (после его регидратации) ормустина проводили потенциометрически на pH-метре HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Германия). Все измерения проводили в интервале температур от 20 до 25°C.

3.4. Определение изомерного состава методом 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.

Подвижная фаза: 10 мл спирта 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.

Проведение анализа: хроматографируют испытуемый раствор, получая не менее 5 хроматограмм. На хроматограмме определяются два пика, соотношение площадей которых соответствует соотношению изомеров в ормустине.

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.

4. Исследование противоопухолевой активности ПЛФ ормустина в опытах *in vivo*

Противоопухолевую активность ПЛФ ормустина изучали 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 с перевитыми опухолями: лимфоцитарной лейкемией P-388, лимфоидной лейкемией L-1210,

эпидермоидной карциномой легкого Льюис (LLC), меланомой В-16, раком шейки матки РШМ-5. 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.

Результаты собственных исследований

1. Разработка состава и технологии получения ПЛФ ормустина

1.1. Изучение растворимости субстанции ормустина

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 высокомолекулярных соединений (ВМС), органической и неорганической кислот, сахара, маннита (табл. 1).

Оказалось, что повышение растворимости субстанции ормустина более чем в 1,5 раза наблюдается 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.

Таблица 1

Изучение растворимости АФИ ормустина в различных растворителях

№ п/п	Растворитель	рН	Концентрация ормустина, %
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 Kollisol 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

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 раствор 0,1 М хлористоводородной кислоты.

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

После выбора растворителя изучали влияние различных методик интенсификации растворимости – нагревание на водяной бане при 60°C, обработка УЗ, перемешивание на магнитной или пропеллерной мешалке с целью уменьшения времени растворения и недопущения значительного снижения концентрации действующего вещества в растворе. При этом проводили растворение 2,5 г АФИ в 100 мл раствора 0,1 М хлористоводородной кислоты, после получения прозрачного раствора определяли содержание действующего вещества (табл. 2).

Наиболее быстро процесс растворения проходит при использовании нагревания на водяной бани и обработке УЗ, однако применение нагревания нецелесообразно из-за значительного снижения на 20% концентрации ормустина в растворе.

Таблица 2

Влияние различных методик на скорость растворения ормустина

Показатель качества	Методика растворения			
	нагревание при 60 °C	УЗ- обработка	перемешивание на магнитной мешалке	перемешивание на пропеллерной мешалке
средняя скорость растворения, г/мин	0,7	0,89	0,16	0,35
содержание ормустина в растворе после полного растворения, % от теоретического	80±4	99±1	85±2	89±1

Представленные данные указывают на то, что использование УЗ в технологическом процессе получения ЛФ позволяет значительно снизить продолжительность растворения АФИ и при этом обеспечивает сохранение концентрации активного вещества практически на исходном уровне.

1.3. Изучение влияние УЗ обработки на изомерный состав ормустина

Субстанция ормустина представляет собой смесь двух изомеров (неактивного и активного). От стабильности изомерного состава зависит противоопухолевая активность разрабатываемого препарата. В процессе растворения 10 г АФИ под действием УЗ исследовали влияния времени и температуры, при которых происходит растворение, на изомерный состав ормустина (табл. 3).

Таблица 3

Влияние УЗ на изомерный состав ормустина

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

Из данных, представленных в табл. 3, видно, что непродолжительное воздействие УЗ (до 48 мин при 20±2 °C) 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.

1.4. Изучение стабильности раствора ормустина в процессе хранения

Изучали стабильности 2,5% раствора ормустина в процессе хранения течение 5 суток. При этом свежеприготовленный раствор ормустина хранили при комнатной температуре (22°C) и в холодильнике (4°C). В определенные промежутки времени оценивали внешний вид растворов и контролировали содержание действующего вещества (рис. 2) и pH раствора.

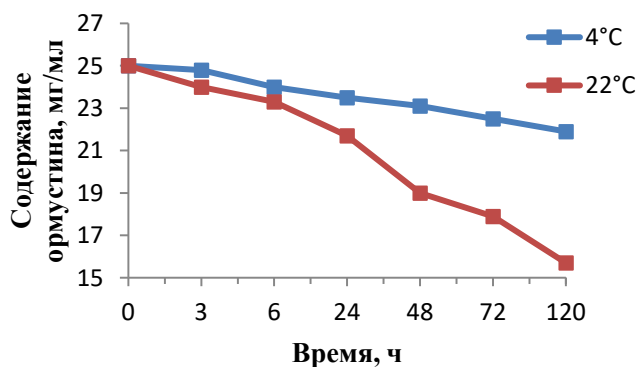


Рисунок 2. Изменение содержания ормустина в растворе в процессе хранения

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.

1.5. Изучение влияния формообразователей на стабильность ормустина в растворе

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.

Готовили ряд модельных составов: 2,5 г субстанции ормустина растворяли в 10 мл 0,1 М хлористоводородной кислоты под действием УЗ, к полученному раствору добавляли одно или смесь вспомогательных веществ (ВВ) в различных концентрациях и фильтровали полученные растворы.

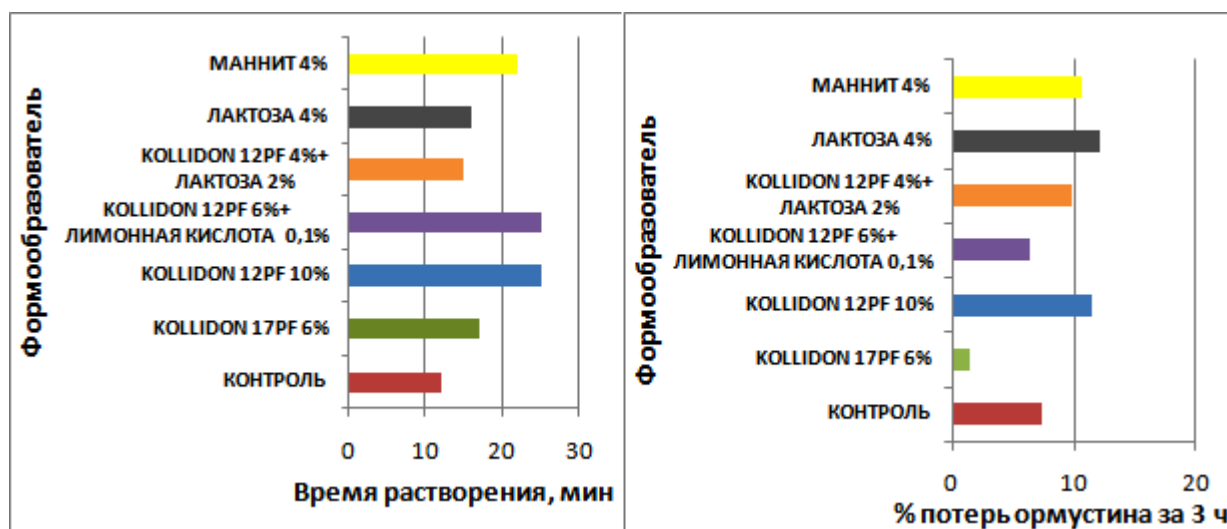


Рисунок 3. Влияние формообразователя на время растворения и % потерь ормустина за 3 ч после полного растворения

Все растворы были прозрачные, светло-желтого цвета. pH сразу после растворения и через 3 ч оставалось постоянным и составляло для всех растворов 2,0-2,1. Результаты измерений, представленные на рис. 3, 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 приводило к ускорению разрушения действующего вещества в 1,5 раза. Введение в состав 4% лактозы

и 4% маннита привело к усилению деструкции ормустина примерно в 2,5 раза. В связи с вышесказанным, в качестве наиболее оптимального формообразователя, стабилизирующего раствор ормустина, выбран Kollidon 17PF в концентрации 6%.

1.6. Изучение влияния фильтрующего материала на содержание ормустина в растворе

Для растворов термолабильных веществ, к которым относится ормустин, наиболее эффективным методом стерилизации, оказывающим наименьшее негативное воздействие на качество ЛП, является стерилизующая фильтрация. Для определения наиболее подходящего фильтрующего материала проводили фильтрацию раствора ормустина через нейлоновые («Pall»N66 с диаметром 25, 47 мм и размером пор 0,22 мкм, Pall Corporation, США; ООО Палл Евразия, Россия); и полиэфирсульфоновые (Фильтрационная система Stericup GP Millipore Express Plus, Merk Millipor) мембранные фильтры.

Таблица 4

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±0,3	14±0,5

При использовании полиэфирсульфоновых фильтров наблюдалось значительное снижение, более чем на 40% содержание ормустина в растворе, тогда как при использовании нейлоновых фильтров потери не превышали 2% (табл. 4). 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. На основании вышеизложенного сделан вывод об использовании нейлоновых мембранных фильтров для получения стерильного раствора.

1.7. 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 минус 18°C в течение 24 ч. Заморозка приводила к незначительному снижению содержания ормустина, потери не превышали 1-1,5%, следовательно, данный раствор можно лиофилизировать.

В процессе выбора режима сушки сравнивали данные по качеству полученного лиофилизата трех режимов лиофилизации на сублимационной сушке «Edwards Minifast DO.2» (Ero Electronic S.p. A., Италия):

- 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;
- 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/;
- загрузка раствора во флаконах на холодные полки (минус 45 °С) с быстрым замораживанием продукта до минус 45 °С и равномерным подъемом температур со скоростью 2-3 °С/ ч.

Использование 1 и 2 режимов позволяет получить лиофилизат надлежащего качества с незначительными потерями действующего вещества (до 1,4%), однако т.к. 1 режим требует меньших затрат времени, он предложен для получения ПЛФ ормустина.

Таблица 5

Сравнение 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»	однородная пористая «таблетка»	«таблетка» с кристаллической структурой
регидратируемость водой	проходит легко	проходит легко	затруднена

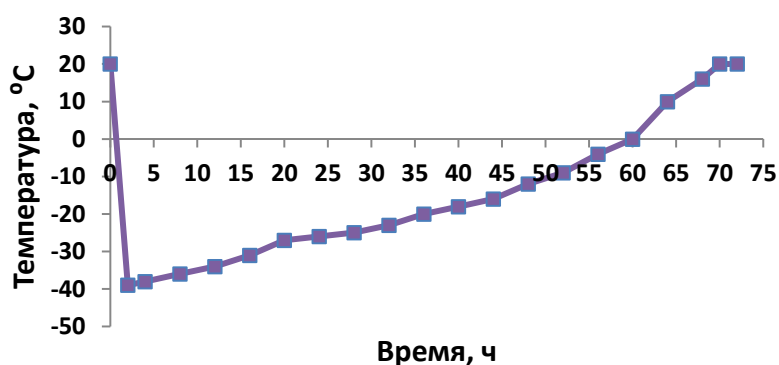


Рисунок 4. График изменения температуры на препарате в процессе лиофилизации по 1-му режиму

1.8. Выбор растворителя для регидратации лиофилизированной ПЛФ ормустина перед введением

На завершающем этапе технологических исследований подбирали 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 pH=6,8-7,1) на значение pH и стабильность раствора, получаемого после регидратации лиофилизата ормустина (табл. 6 и рис. 5).

Все растворители обеспечивали получение истинного раствора, но значительное повышение pH наблюдалось только при регидратации лиофилизата фосфатным буфером. При использовании растворов Рингера и Гемодеза-Н уже через 1 ч после регидратации лиофилизата наблюдали снижение содержания действующего вещества на 4 и 8%, соответственно. Применение в качестве растворителей воды для 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. 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.

Таблица 6

Изменение pH при добавлении различных объемов растворителей к лиофилизированной ПЛФ ормустина

Объем добавляемого растворителя, мл	Значение pH 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	-

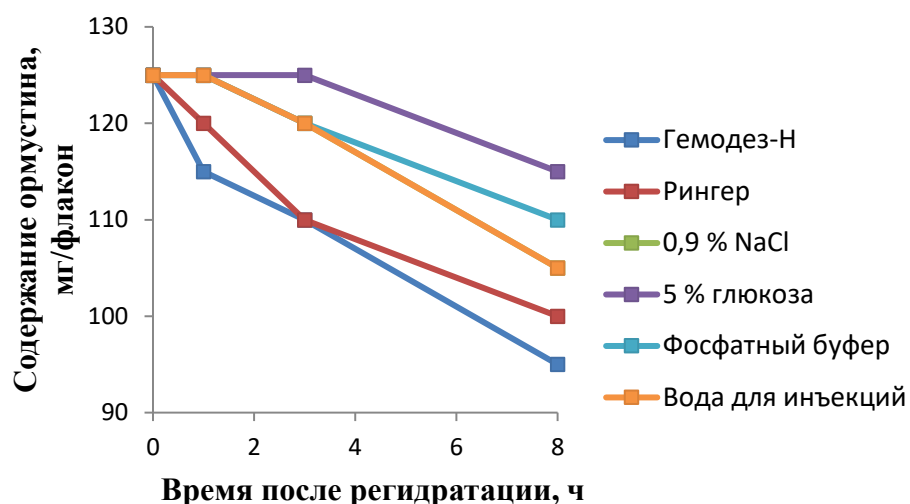


Рисунок 5. Стабильность растворов ормустина после регидратации при использовании различных растворителей

2. Разработка методов контроля качества ЛФ ормустина

2.1. Качественное определения компонентов ЛФ методом ТСХ

После изучение литературных данных по проведению ТСХ-анализа препаратов группы АНМ остановились на ряде подвижных систем, которые приведены в табл. 7.

Таблица 7

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

№ п/п	Подвижная фаза		Время подъема фронта растворителя, мин	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	90	0,07	0,07	0	0
2	н-бутанол: ЛУК: вода	12:3:5	90	0,42	0,42	0	0
3	пропанол-2: аммиак водный	3:2	240	0,5	0,5	0,63	0,63
4	спирт 95%: аммиак водный	3:2	150	0,61	0,61	0,78	0,78
5	н-бутанол: аммиак водный	3:2	180	0,07	0,07	0	0
6	н-бутанол: аммиак водный	2:1	240	0	0	0	0
7	этилацетат: спирт 95%: аммиак водный	10:4:1	160	0,34	0,35	0,08	0,09
8	хлороформ: спирт 95%	7:1	180	0,63	0,63	0	0

Из всех приведенных систем наиболее быстрое (90 мин) поднятие фронта растворителя с достаточно высоким показателем фактора удерживания (R_f) для ормустина 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 этанол 95%: аммиак водный (3:2). Для идентификации Kollidon 17PF следует применять систему этанол 95%: аммиак водный (3:2). Для детектирования ормустина использовали раствор нингидрина, Kollidon 17PF проявляли парами йода.

2.2. Разработка и валидация количественного определения ормустина методом СФМ

Электронный спектр субстанции ормустина 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 поглощают в этой области спектра. По этой причине определение содержания ормустина в ЛФ проводили при $\lambda = 396 \pm 2$ нм.

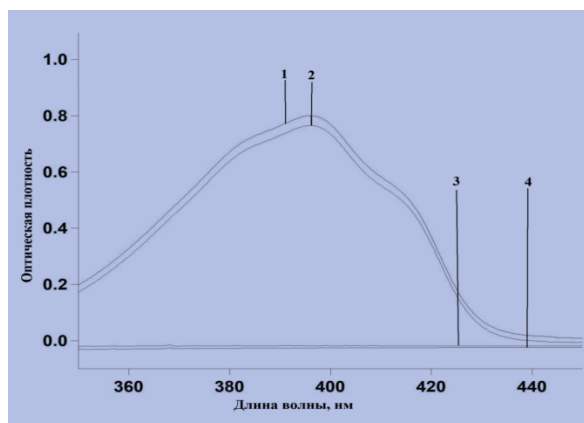


Рисунок 6. Спектры поглощения ПЛФ ормустина (1), субстанции ормустина (2), 6% раствора Kollidon 17PF (3) и раствора 0,1 М хлористоводородной кислоты (4)

Для изучения влияния ВВ (Kollidon 17PF и 0,1 М хлористоводородной кислоты), входящих в состав ПЛФ исследовали их спектры поглощения. В диапазоне 350-450 нм показано, что ВВ не поглощают в данной области (рис. 6) и, таким образом, не влияют на спектральные характеристики ормустина. Поэтому чтобы упростить процесс измерения Kollidon 17PF не использовали при создании СО и раствора сравнения.

2.3. Стандартизация ПЛФ ормустина

В соответствии с требованиями ГФ XIII для составления проекта НД на готовую ЛФ «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» 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.

Три серии ПЛФ ормустины были заложены на хранения при двух температурных режимах (4 °С и минус 18 °С). Мониторинг стабильности данных серий осуществлялся по срокам установленным в ГФ: первый год – сразу после получения и через каждые 3 мес; второй год и третий год – через каждые 6 мес (табл. 8).

Во время всего срока хранения (2 года) трех серий при обоих температурных режимах не наблюдаются значительные изменения в показателях качества, поэтому в проект НД на ПЛФ ормустина в раздел условия хранения установили требование: хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Изучение стабильности препарата в процессе хранения продолжается.

Таблица 8

Изменение показателей качества трех серий ПЛФ ормустина в процессе хранения

Показатель качества	Пределы по проекту НД	Срок хранения, мес	Режим хранения, °С	Серия ПЛФ ормустина		
				0903	1004	1204
количественное определение, мг/флакон	116-134	-	-	124,7	125,0	125,1
		3	минус 18	124,8	124,9	125,0
			4	124,8	125,0	125,1
		6	минус 18	124,8	124,9	125,1
			4	124,8	124,9	125,1
		9	минус 18	124,7	125,0	125,1
			4	124,8	125,0	125,0
		12	минус 18	124,7	125,0	125,0
			4	124,8	124,9	125,1
		18	минус 18	124,8	124,9	125,1
			4	124,8	124,9	125,1
		24	минус 18	124,8	125,0	125,1
			4	124,8	124,9	125,1
средняя масса, мг	420-460	-	-	440,0	440,9	440,7
		3	минус 18	440,2	441,7	441,6
			4	440,2	441,8	441,6
		6	минус 18	441,7	442,5	442,4
			4	441,5	442,6	442,3
		9	минус 18	441,6	443,1	443,1
			4	441,8	443,0	443,0
		12	минус 18	443,0	443,7	443,8
			4	442,9	443,6	443,7

рН	2,0-2,5	18	минус 18	443,5	444,8	444,8
			4	443,6	444,7	444,8
		24	минус 18	444,8	445,9	445,7
			4	444,8	446,1	445,9
		-	-	2,0	2,1	2,1
		3	минус 18	2,1	2,1	2,1
			4	2,1	2,0	2,1
		6	минус 18	2,1	2,0	2,1
			4	2,0	2,0	2,1
		9	минус 18	2,1	2,1	2,1
			4	2,1	2,0	2,1
		12	минус 18	2,1	2,1	2,1
			4	2,1	2,1	2,1
		18	минус 18	2,0	2,0	2,0
			4	2,1	2,1	2,1
		24	минус 18	2,1	2,1	2,1
			4	2,1	2,1	2,1

3. Изучение противоопухолевой активности готовой ЛФ ормустина

3.1. Определение терапевтической дозы

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

Препарат вводили в диапазоне 50-175 мг/кг, по данным графиков представленных на рис. 7 видно, что ормустин дозозависимо ингибирует рост изучаемых лейкозов. В дозах 50-100 мг/кг на обоих моделях наблюдался постепенный рост показателей: увеличение продолжительности жизни (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.

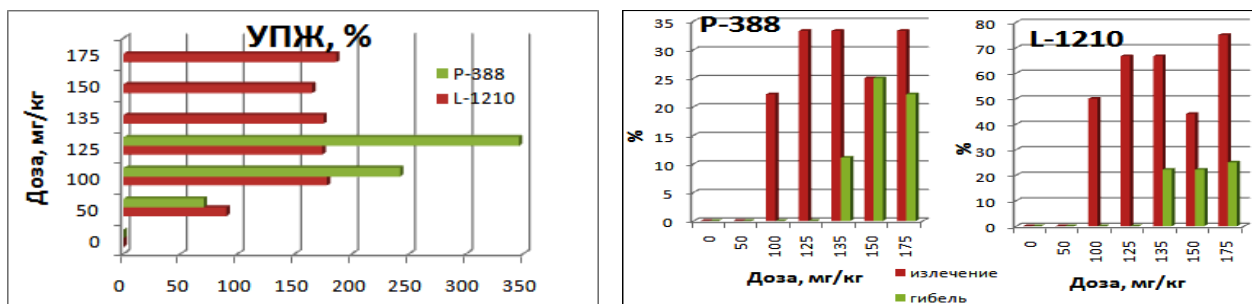


Рисунок 7. Противоопухолевая активность ПЛФ ормустина при однократном внутривенном введении на лейкозах в диапазоне доз 50-175 мг/кг

В качестве терапевтической дозы ПЛФ ормустина выбрана доза 125 мг/кг.

3.2. Противоопухолевая активность ормустина на различных солидных моделях

Определение противоопухолевой активности готовой ЛФ ормустина на различных солидных опухолях проводили при однократном введении ЛФ в дозе 125 мг/кг.

Таблица 9

**Противоопухолевая активность ПЛФ ормустина
на различных солидных моделях опухолей**

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%

Как видно, по данным табл. 9, ормустин оказывает высокую противоопухолевую активность при лечении солидных опухолей, при терапии рака шейки матки РШМ-5 излечение достигает 100%. Представленные данные указывают 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.

Общие 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 0,01М 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 °С и 4 °С).

4. Изучена специфическая активность ПЛФ ормустина на пяти экспериментальных опухолевых моделях. На лейкозах L-1210 и Р-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», получен патент РФ №2569729 «Противоопухолевое средство».

Практические рекомендации

Разработанные проект НД на «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» и лабораторный регламент на получение ЛФ могут быть внедрены в производственный процесс фармацевтических предприятий. Результаты диссертационных исследований могут быть внедрены в учебный процесс для студентов по дисциплинам «Фармацевтическая технология». Разработанная лекарственная форма может служить в качестве замены зарубежных препаратов класса АНМ для существующих режимов химиотерапии.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Высокая противоопухолевая активность инъекционной ЛФ ормустина указывает на перспективность дальнейшего её доклинического и клинического изучения, в том числе в комбинации с другими препаратами с целью повышения эффективности лечения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Санарова, Е.В. Изучение растворимости нового соединения из класса нитрозоалкилмочевины с целью создания инъекционной лекарственной формы / Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, **Л.Л. Николаева**, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова, В.В. Мусияк, Г.Л. Левит, В.П. Краснов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике». **Российский биотерапевтический журнал**. – 2014. – Т. 13, №1. – С. 125.
2. **Николаева, Л.Л.** Влияние вспомогательных веществ на процесс лиофилизации ЛХС-1208 и OR-2011 / **Л.Л. Николаева**, И.Д. Гулякин, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова, Н.Д. Бунятян // Материалы I Международной научно-практической Интернет-конференции «Технологические и биофармацевтические аспекты растворения лекарственных препаратов разной направленности действия». – Харьков: НФУ Минздрава Украины, 2014. – С. 216.
3. **Николаева, Л.Л.** Изучение влияние фильтрующего материала на содержание действующего вещества при разработке лекарственной формы нового соединения из класса алкилнитрозомочевины / **Л.Л. Николаева**, И.Д. Гулякин, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова, Н.Д. Бунятян // Материалы I Международной научно-практической Интернет-конференции «Технологические и биофармацевтические аспекты растворения лекарственных препаратов разной направленности действия». – Харьков: НФУ Минздрава Украины, 2014. – С. 217.
4. Гулякин И.Д. Применение фармацевтической технологии для повышения биодоступности лекарственных веществ / И.Д. Гулякин, **Л.Л. Николаева**, Е.В. Санарова,

- А.В. Ланцова, Н.А. Оборотова // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 101–108.
5. **Николаева, Л.Л.** Влияние различных технологических приемов на стабильность ормустина в растворе / **Л.Л. Николаева**, А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова, В.В. Мусияк, Г.Л. Левит, В.П. Краснов, Н.Д. Бунятян // Материалы XII Международной научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». **Российский биотерапевтический журнал**. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 112.
6. **Николаева, Л.Л.** Парентеральная лекарственная форма нового соединения из класса алкилнитрозомочевины / **Л.Л. Николаева**, А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова, В.В. Мусияк, Г.Л. Левит, В.П. Краснов, Н.Д. Бунятян // Материалы XII Международной научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». **Российский биотерапевтический журнал**. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 113.
7. Гулякин И.Д. Особенности создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для парентерального применения / И.Д. Гулякин, **Л.Л. Николаева**, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, Н.А. Оборотова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – № 2 (11). – С. 96–110.
8. **Николаева, Л.Л.** Подбор растворителя для регидратации лиофилизата в парентеральной лекарственной форме ормустина / **Л.Л. Николаева**, А.В. Ланцова, И.Д. Гулякин, Н.А. Оборотова // Материалы научно практической конференции с международным участием «Фармацевтическая наука и практика: достижения, инновации, перспективы». Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2015. – №16. – С. 84-86.
9. Гулякин, И.Д. Применение мембранных фильтров в технологии получения стерильных лекарственных форм / И.Д. Гулякин, **Л.Л. Николаева**, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, Н.А. Оборотова // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2016. – Т. 50, №1. – С. 28-32.
10. Игнатьева, Е.В. Количественное определение ормустина в лекарственной форме / Е.В. Игнатьева, Н.А. Дмитричева, И.В. Ярцева, М.А. Барышникова, Н.А. Машалова, **Л.Л. Николаева**, З.С. Шпрах // Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова. **Российский биотерапевтический журнал**. – 2016. – Т. 15, №1. – С. 43-44.
11. **Николаева, Л.Л.** Качественный анализ ормустина в лиофилизированной лекарственной форме / **Л.Л. Николаева**, А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, И.Д. Гулякин, Н.А. Оборотова, Е.В. Игнатьева, Н.А. Дмитричева, И.В. Ярцева, Н.Д. Бунятян, В.В. Мусияк, Г.Л. Левит, В.П. Краснов // Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова. **Российский биотерапевтический журнал**. – 2016. – Т. 15, №1. – С. 75.
12. **Николаева, Л.Л.** Определение Kollidon 17 PF в лиофилизированных лекарственных формах / **Л.Л. Николаева**, И.Д. Гулякин, А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, Н.А. Оборотова, Е.В. Игнатьева, Н.А. Дмитричева, И.В. Ярцева, Н.Д. Бунятян // Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием

«Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова. **Российский биотерапевтический журнал.** – 2016. – Т. 15, №1. – С. 75.

13. **Николаева, Л.Л.** Исследование стабильности модельного состава лекарственной формы ормустина / **Л.Л. Николаева** // Сборник тезисов XI международной (XX всероссийской Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – М., 2016. – С. 615-616.

14. Гулякин, И.Д. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ / И.Д. Гулякин, **Л.Л. Николаева**, Н.А. Оборотова, М.В. Дмитриева, А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, Н.И. Лаврухин, Н.Д. Бунятян // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2016. - №2(15). – С. 52-59.

15. **Николаева, Л.Л.** Анализ поливинилпирролидона в лекарственных формах / **Л.Л. Николаева**, И.Д. Гулякин, Н.А. Оборотова, Н.Д. Бунятян // Фармация и фармакология. – 2016. – Т. 4, №2. – С. 88-94.

16. **Nikolaeva, L.** The development of a parenteral pharmaceutical formulation of a new class of compounds of nitrosourea / **L. Nikolaeva**, N. Oborotova, N. Bunyatyan, Xi Zhang, E. Sanarova, A. Lantsova, O. Orlova and A. Polozkova // **Pharmaceuticals.** – 2016. – V. 9, issue 4, 68. – 1-9 p. DOI: 10.3390/ph9040068.

17. **Николаева, Л.Л.** Лиофилизация как способ стабилизации лекарственных препаратов (обзор) / **Л.Л. Николаева**, И.Д. Гулякин, О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, В.В. Хламов, Н.Д. Бунятян // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2017. – Т. 51, №4. – С. 54-58.

18. Бунятян, Н.Д. Валидация методики количественного определения ормустина в лиофилизированной лекарственной форме / Н.Д. Бунятян, **Л.Л. Николаева**, Ю.В. Олефир, Е.В. Санарова, Н.А. Оборотова, А.Б. Прокофьев, Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева, И.Д. Гулякин // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2017. – Т. 51, №11. – С. 53-56.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АНМ – класс алкилнитрозомочевин

АФИ – активная фармацевтическая субстанция

ВВ – вспомогательное вещество

ВМС – высокомолекулярные соединения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ЛП – лекарственный препарат

ЛУК – ледяная уксусная кислота

ЛФ – лекарственная форма

НД – нормативный документ

ПЛФ – парентеральная лекарственная форма

ПЭГ – полиэтиленгликоль

СО – стандартный образец

СФМ – спектрофотометрия

ТСХ – тонкослойная хроматография

УЗ – ультразвук

УПЖ – увеличение продолжительности жизни