

Метод солеобразования в технологии получения инъекционных лекарственных форм плохо растворимых противоопухолевых соединений

О.Л. Орлова¹, Л.Л. Николаева^{1,2}, М.В. Дмитриева¹, А.В. Ланцова¹, А.П. Полозкова¹,
З.С. Шпрах^{1,2}, Н.Ю. Кульбачевская¹, О.И. Коняева¹, Н.А. Оборотова¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
им. Н.Н. Блохина» (НМИЦ) Минздрава России;

Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24;

²Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет);

Российская Федерация, 119048, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Орлова Ольга Львовна – ведущий научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина), кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 873-43-43. E-mail: orlovaol@mail.ru

Николаева Людмила Леонидовна – младший научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, ассистент кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института фармации Сеченовского Университета, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (915) 296-31-70. E-mail: alima91@yandex.ru

Дмитриева Мария Вячеславовна – научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 521-22-78. E-mail: mary.24@mail.ru

Ланцова Анна Владимировна – старший научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (903) 597-73-26. E-mail: lantsova1979@mail.ru

Полозкова Алевтина Павловна – научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Тел.: +7 (903) 213-21-69. E-mail: elevana@list.ru

Шпрах Зоя Сергеевна – ведущий научный сотрудник лаборатории химико-фармацевтического анализа Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, доцент кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института фармации Сеченовского Университета, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (903) 579-07-89. E-mail: z.shpprakh@ronc.ru

Кульбачевская Наталия Юрьевна – заведующая лабораторией фармакологии и токсикологии Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, кандидат медицинских наук. Тел.: +7 (903) 758-65-19. E-mail: natkulba@mail.ru

Коняева Ольга Ивановна – научный сотрудник лаборатории фармакологии и токсикологии Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, кандидат биологических наук. Тел.: +7 (903) 153-89-29. E-mail: olga@bk.ru

Оборотова Наталия Александровна – ведущий научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (903) 283-08-19. E-mail: oborotova@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Разработка лекарственного препарата – сложный многоступенчатый процесс, который начинается с изучения физико-химических свойств активной фармацевтической субстанции и подбора на основе полученной информации оптимальной лекарственной формы. Многие биологически активные вещества, в том числе противоопухолевые субстанции, мало раство-

римы в воде и высокотоксичны. К таким соединениям относятся широко применяемый при терапии рака антагонист фолиевой кислоты – метотрексат и новое производное алкилнитрозомочевины – ормустин. Одним из наиболее приемлемых способов преодоления низкой растворимости является солеобразование.

Цель исследования – создание инъекционных лекарственных форм противоопухолевых лекарственных средств путем перевода активного вещества в солевую форму на примере отечественной субстанции ормустина и воспроизведенного препарата метотрексата.

Материал и методы. Объекты исследования: субстанция метотрексата сер. EP 120813 (Ху Чжоу Чжаньван Фармасьютикал Ко., Лтд., Китай); субстанция ормустина (Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН, Россия). Для проведения исследования использовались различные химические вещества, растворители и реактивы, отвечающие требованиям нормативных документов (ГОСТ, ТУ, российской и зарубежных фармакопей).

Результаты. С учетом физико-химических свойств противоопухолевых субстанций разработана парентеральная лекарственная форма ормустина и воспроизведена технология получения растворов метотрексата. Получены водорастворимые соединения за счет солеобразования: для метотрексата в результате добавления гидроксида натрия, для ормустина – растворением в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты.

Заключение. Учитывая свойства активных фармацевтических субстанций, предложены: новая оригинальная лекарственная форма «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» и воспроизведенный «Метотрексат, раствор для инъекций 10 мг/мл и 100 мг/мл».

Ключевые слова: лекарственная форма, фармацевтическая технология, солеобразование, метотрексат, ормустин.

Для цитирования: Орлова О.Л., Николаева Л.Л., Дмитриева М.В., Ланцова А.В., Полозкова А.П., Шпрах З.С., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Оборотова Н.А. Метод солеобразования в технологии получения инъекционных лекарственных форм плохо растворимых противоопухолевых соединений. Фармация, 2019; 68 (4): 17–26. <https://doi.org/10/29296/25419218-2019-04-03>

A METHOD FOR SALIFICATION IN THE TECHNOLOGY OF PREPARING THE INJECTABLE FORMULATIONS OF POORLY SOLUBLE ANTITUMOR COMPOUNDS

O.L. Orlova¹, L.L. Nikolaeva^{1,2}, M.V. Dmitrieva¹, A.V. Lantsova¹, A.P. Polozkova¹,

Z.S. Shprakh^{1,2}, N.Yu. Kulbachevskaya¹, O.I. Konyaeva¹, N.A. Oborotova¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 24, Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russian Federation;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119048, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga L. Orlova – leading researcher of the Laboratory for the Development of Dosage Forms of the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Candidate of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (916) 873-43-43. E-mail: orlovaol@mail.ru

Ludmila L. Nikolaeva – junior researcher of the Laboratory for the Development of Dosage Forms of the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation; Assistant of the Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Institute of Pharmacy of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Candidate of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (915) 296-31-70. E-mail: alima91@yandex.ru

Maria V. Dmitrieva – researcher of the Laboratory for the Development of Dosage Forms of the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Candidate of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (916) 521-22-78. E-mail: mary.24@mail.ru

Anna V. Lantsova – senior researcher of the Laboratory for the Development of Dosage Forms of the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Candidate of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (903) 597-73-26. E-mail: lantsova1979@mail.ru

Alevtina P. Polozkova – researcher of the Laboratory for the Development of Dosage Forms of the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation. Tel.: +7 (903) 213-21-69. E-mail: elevana@list.ru

Zoya S. Shprakh – leading researcher of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Analysis of the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation; Associate Professor of the Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Institute of Pharmacy of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). Candidate of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (903) 579-07-89. E-mail: z.shprakh@ronc.ru

Natalia Yu. Kulbachevskaya – head of the Laboratory of Pharmacology and Toxicology of the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Candidate of Medical Sciences. Tel.: +7 (903) 758-65-19. E-mail: natkulba@mail.ru

Olga I. Konyaeva – senior researcher of the Laboratory of Pharmacology and Toxicology of the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Candidate of Biological Sciences. Tel.: +7 (903) 153-89-29. E-mail: olga@bk.ru

Natalia A. Oborotova – leading researcher of the Laboratory for the Development of Dosage Forms of the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (903) 283-08-19. E-mail: oborotova@mail.ru

SUMMARY

Introduction. To design a drug is a complex multistep process that begins with studies of the physicochemical properties of an active pharmaceutical ingredient and with selection on an optimal formulation on the basis of the information obtained. Many biologically active substances, including antitumor agents, are poorly soluble in water and highly toxic. These compounds include the folic acid antagonist methotrexate that is widely used in the therapy of cancer and the new alkyl nitrosourea derivative ormustine. Salification is one of the most acceptable ways to overcome low solubility.

Objective: to design injectable formulations of antitumor drugs, by converting the active ingredient into the salt formulation, in case of the Russian substance ormustine and a generic version of methotrexate.

Material and methods. The investigation objects were methotrexate substance ser. EP 120813 (Hu Zhou Zhanwan Pharmaceutical Co., Ltd., China); ormustine substance (I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Russia). Various chemicals, solvents, and reagents, which met the requirements of regulatory documents (GOST, TU, Russian and foreign pharmacopoeias) were used in the investigation.

Results. Taking into account the physicochemical properties of antitumor substances, the investigators designed a parenteral ormustine formulation and reproduced a technology for obtaining methotrexate solutions. Water-soluble compounds were prepared through salification: by adding sodium hydroxide for methotrexate and by dissolving in 0.1 M hydrochloric acid for ormustine.

Conclusion. Considering the properties of active pharmaceutical ingredients, the authors proposed a new original Ormustin lyophilisate formulation to prepare an injectable solution 125 mg and generic methotrexate injectable solutions 10 and 100 mg/ml.

Key words: formulation, pharmaceutical technology, salification, methotrexate, ormustine.

For citation: Orlova O.L., Nikolaeva L.L., Dmitrieva M.V., Lantsova A.V., Polozkova A.P., Shprakh Z.S., Kulbachevskaya N.Yu., Konyaeva O.I., Oborotova N.A. A method for salification in the technology of preparing the injectable formulations of poorly soluble antitumor compounds. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 2019; 68 (4): 17–26. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-04-03>

Введение

Проблема создания новых противоопухолевых препаратов остается одной из самых актуальных в современной онкологии. Класс алкилнитрозомочевин (АНМ) нашел широкое применение в клинической практике при раковых заболеваниях различного генеза. Систематическое исследование препаратов этого класса началось после того, как было обнаружено супермутагенное и противоопухолевое действие 1-метил-3-нитро-1-нитрозогуанидина. АНМ отличаются от известных алкилирующих агентов отсутствием перекрестной устойчивости по отношению к другим препаратам этой группы, липофильностью и отсроченным миелосупрессивным действием (5–6 недель). АНМ используются при лечении опухолей центральной нервной системы, а также в комбинированной терапии некоторых солидных опухолей и гемобластозов [1]. Прочное место в химиотерапии различных форм злокачественных опухолей заняли зарубежные препараты – представители АНМ: «Ломустин», «Кармустин», «Нимустин» и «Фотемустин». Внедрены в клиническую практику и оригинальные отечественные препараты «Араноза» и «Лизомустин» [2, 3]. В целях расширения спектра действия АНМ при различных злокачественных новообразованиях в России и за рубежом продолжается поиск новых соединений

данного класса. Одним из представителей оригинальных субстанций является ормустин, синтезированный в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского; по результатам биологических исследований у ормустина была выявлена высокая противоопухолевая активность [4].

Тенденция к широкому применению высококачественных дженериков отчетливо проявляется во всем мире, включая экономически развитые страны. Использование качественных и чаще всего более дешевых, чем оригинальные бренды, дженериков существенно сокращает финансовые затраты, обеспечивая надлежащее качество лечения. В России более 75% рынка онкологических препаратов приходится на 10 ведущих мировых фармацевтических производителей. В целях совершенствования системы лекарственного обеспечения населения необходимо развивать отечественную фармацевтическую промышленность, создавая инновационные лекарственные препараты. Для снижения затрат на здравоохранение при поддержке Правительства РФ постоянно ведется разработка и внедрение в клиническую практику новых отечественных соединений и дженериков [5–8].

За последние 60 лет в клинической онкологии появилось много новых химиотерапевтических препаратов. Однако метотрексат, синтезирован-

ный в 1940-х годах сотрудником Лаборатории Ледерле (ныне – подразделение «Pfizer») Йеллапрагадой Суббарао, по-прежнему является важнейшим препаратом для лечения таких заболеваний, как острый лимфобластный лейкоз и неходжкинские лимфомы; трофобластические опухоли; грибовидный микоз в далеко зашедших стадиях; тяжелые формы псориаза; ревматоидный артрит (при неэффективности других методов терапии), он применяется в том числе и в детской онкологии [9, 10].

К настоящему моменту результаты фармацевтической разработки в обязательном порядке входят в регистрационное досье на готовые лекарственные препараты [11]. Неотъемлемая часть фармацевтической разработки – создание лекарственной формы (ЛФ), требующее знания и учета особенностей биологического действия исходного лекарственного вещества, механизма его взаимодействия с физиологическими субстратами организма, тропности к отдельным тканям и органам, его фармакокинетики и фармакодинамики [2, 12]. С точки зрения фармакокинетики инъекционная ЛФ – оптимальна для достижения терапевтической дозы в системном кровообращении, поскольку биодоступность препарата при внутривенном пути введения достигает 100%. Однако основные проблемы при создании ЛФ – это низкая растворимость действующих веществ в воде, недостаточная стабильность полученных растворов, а также слабая трансмембранная проходимость и высокая токсичность активных субстанций. К таким соединениям относятся ормустины – производное алкилнитрозомочевины (АНМ) и антагонист фолиевой кислоты – метотрексат.

Для повышения растворимости активных субстанций можно использовать явление полиморфизма и другие методы модификации структуры, например образование солевой формы за счет растворения в веществах кислого или основного характера. Многие малорастворимые соединения за счет ионного состояния функциональных групп молекул (NH_2 , COOH и др.) обладают кислотными или основными свойствами и способны к ионизации в водных растворах и образованию соответствующих солей. Как правило, ионизированная форма является более гидрофильной и имеет более высокую водорастворимость, поэтому ряд веществ выпускаются в солевых формах. Так, субстанции, имеющие основной характер, производят в виде гидрохлоридов, а органические кислоты – в виде солей металлов или органических оснований. В соответствии с данным методом

были разработаны ЛФ для таких противоопухолевых препаратов, как эпирубицин, флударабин, пэгаспаргаза, которые применяются при раке молочной железы, раке яичников, раке легкого [13]. Среди всех существующих препаратов приблизительно 2/3 являются либо слабой кислотой, либо слабым основанием [14]. Поэтому данная стратегия весьма актуальна.

Структура, физико-химические и биологические свойства ормустина и метотрексата указывают на то, что одним из наиболее удобных способов преодоления низкой растворимости в процессе создания ЛФ данных соединений является солюбилизация путем перевода веществ в солевые формы [15, 16].

Цель исследования – создание противоопухолевых инъекционных ЛФ на примере отечественной субстанции ормустина и дженерика метотрексата путем перевода действующего вещества в солевую форму.

Материал и методы

Препараты и реактивы: субстанция метотрексата сер. EP 120813 (Ху Чжоу Чжаньван Фармасьютикал Ко., Лтд., Китай); вода для инъекций (ФС.2.2.0019.15), натрия хлорид (ФС.2.2.0014.15), натрия гидроксид (ос.ч. ГОСТ 2263-79); ормустин (Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург); Kollidon 17 PF, Kollidon 12 PF, Kollisoln PEG-400 (BASF The Chemical Company, Германия); декстран 70000 (Sigma-Aldrich GmbH, Германия); калия фосфорнокислый однозамещенный, х.ч. («Химмед», Россия); кислота лимонная («Цитробел», Россия), лактоза безводная («Химмед», Россия), ГОСТ 33567-2015; маннит («Химмед», Россия), кислота хлористоводородная х.ч. (ЗАО «Мосреактив», Россия), ГОСТ 3118-77; метотрексат-Эбеве (EBEWE Pharma, Австрия); Гемодез-Н, раствор для инфузий («Биок», Россия); глюкоза, раствор для инфузий 5% («Биосинтез», Россия); натрия хлорид, раствор для инфузий 0,9% («Биохимик», Саранск); Рингер, раствор для инфузий (ЗАО «Рестер», Россия).

Приборы и аппаратура: фильтрующая система «Стерикап» с фильтрами диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США); нейлоновые мембранные фильтры «Pall» N66 с размером пор 0,22 мкм (Pall Corporation, США; ООО «Палл Евразия», Россия); стеклянный фильтродержатель в комплекте с колбой Millipore (Millipore, Франция); весы лабораторные Sartorius LA1200S (Sartorius AG, Германия); дозатор механический 0,5–10,0 мл (БИОНТ, Финляндия); полуавтомат для завальцовывания

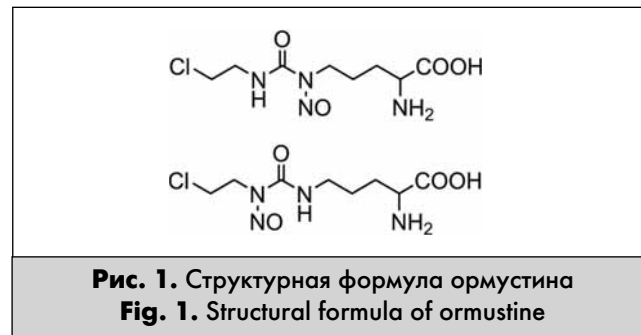
колпачков ПЗР-34-ВИПС-МЕД (завод технологического оборудования г. Фрязино, Россия); установка сублимационной сушки «Edwards Minifast DO.2» (Ego Electronic S.p.A., Италия).

Исследования безопасности. Экспериментальные работы на животных проводились согласно этическим правилам исследований на биомоделях и лабораторных животных [17], принятым в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Животных содержали на брикетированном корме с постоянным доступом к воде. Исследования проводили на 80 мышках-самцах B6D2F1, массой 20–26 г и 250 неинбредных белых крысах-самцах, массой 200–350 г, полученных из разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

Статистическую обработку результатов анализа, полученных при разработке лекарственной формы, проводили с помощью пакета программы Microsoft Office Excel 2007, результаты токсикологических исследований рассчитывали методом пробит-анализа (статистический пакет «Biostat Professional»).

боксильная группы, определяющие основные биохимические свойства аминокислот, в том числе их транспорт через клеточные мембраны, сохранены.

Субстанция ормустина умеренно растворима в воде. Солюбилизаторами служили растворы маннита, высокомолекулярных соединений (Kollidon 12PF, Kollidon 17PF, декстран 7000, ПЭГ-1500, Kollisolv PEG-400), органической (лимонная) и неорганической (хлористоводородная) кислот, сахара (лактоза). Повышение раствори-



Результаты и обсуждение

Ормустин представляет собой смесь 2 изомеров по положению нитрозо-группы (рис. 1). В структуре ормустина цитотоксическая группа присоединена к боковой цепи аминокислоты L-орнитин, а α-амино- и кар-

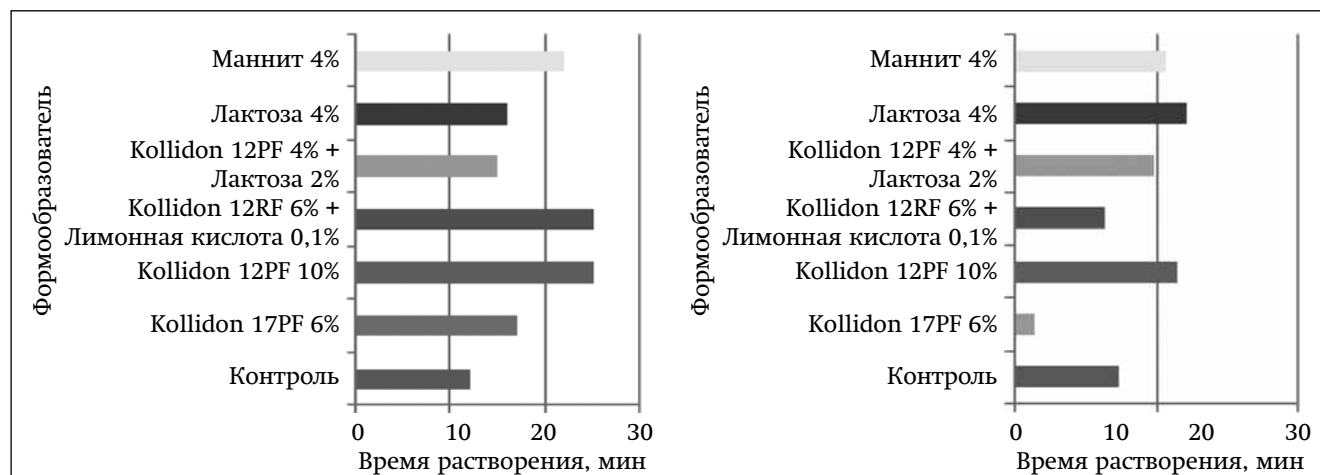
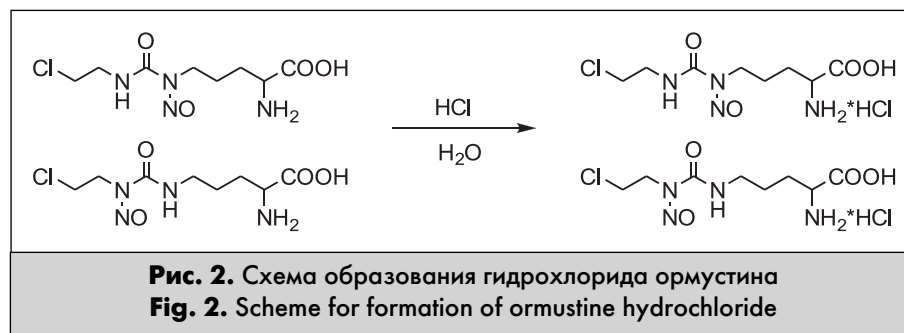


Рис. 3. Влияние формообразователя на время растворения и % потерь ормустина за 3 ч после полного растворения
Fig. 3. Effect of a shape-shifter on the time of dissolution and % loss of ormustine after 3-hour complete dissolution

мости в 2 и более раза удалось достичь только при растворении действующего вещества в 2–6% растворах лимонной и 0,1 М хлористоводородной кислот. В предварительных биологических исследованиях при внутривенном введении раствора ормустина с лимонной кислотой наблюдали гибель животных, поэтому в качестве растворителя ормустина выбрали 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты, при использовании которого происходило образование соли (рис. 2).

Полученный раствор ормустина был нестабилен при хранении. Для повышения срока годности препарата проводили лиофилизацию. В связи с этим изучали влияние введения в состав раствора ормустина формообразователей, которые в процессе сублимационной сушки отвечают за формирование пористой лиофильной массы. В качестве формообразователя к раствору ормустина добавляли 1 или смесь вспомогательных веществ: Kollidon 12PF и 17PF, лактозу, маннит, лимонную кислоту в различных концентрациях.

При добавлении к раствору ормустина смеси 6% Kollidon 12PF и 0,1% лимонной кислоты происходило незначительное снижение потери ормустина, тогда как добавление 10% Kollidon 12PF, 4% лактозы, 4% маннита или смеси 4% Kollidon 12PF с 2% лактозой наоборот приводило к ускорению деструкции действующего вещества примерно в 1,5–2,5 раза. Добавление в состав модельного раствора в качестве соразтворителя и формообразователя Kollidon 17PF в концентрации до 6% значительно снижало потерю действующего вещества с 7,3 до 1,4% в процессе приготовления концентрата. Поэтому в качестве формообразователя в растворе ормустина в 0,1 М хлористоводородной кислоте растворяли Kollidon 17PF в концентрации 6%.

Перед розливом раствора ормустина во флаконы проводили стерилизацию раствора путем фильтрования через нейлоновые и полиэфирсульфоновые мембранные фильтры (табл. 1).

При использовании полиэфирсульфоновых фильтров более чем на 40% снижалось содержание действующего вещества в растворе, а при использовании нейлоновых филь-

тров потери не превышали 2%. Согласно анализу полученных данных, возможно взаимодействие субстанции или хлористоводородной кислоты с полиэфирсульфоновыми мембранами. Поэтому их дальнейшее применение в технологии получения инъекционной ЛФ ормустина не целесообразно. Так как применение нейлоновых фильтров не приводит к существенному снижению содержания ормустина, решено было их использовать в дальнейших исследованиях.

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 [18]. Эвтектическая температура раствора ормустина находится в диапазоне -26 – -23°C .

Лиофилизацию проводили на сублимационной сушке Minifast DO.2, при этом раствор ормустина

Влияние фильтрующего материала на содержание ормустина в растворе

Effect of filter material on the content of ormustine in solution

Фильтрующий материал	Содержание ормустина в растворе, мг/мл	
	до фильтрации	после фильтрации
Нейлон	$25,0 \pm 0,3$	$24,8 \pm 0,5$
Полиэфирсульфон	$25,0 \pm 0,3$	$14,0 \pm 0,5$

Таблица 1

Table 1

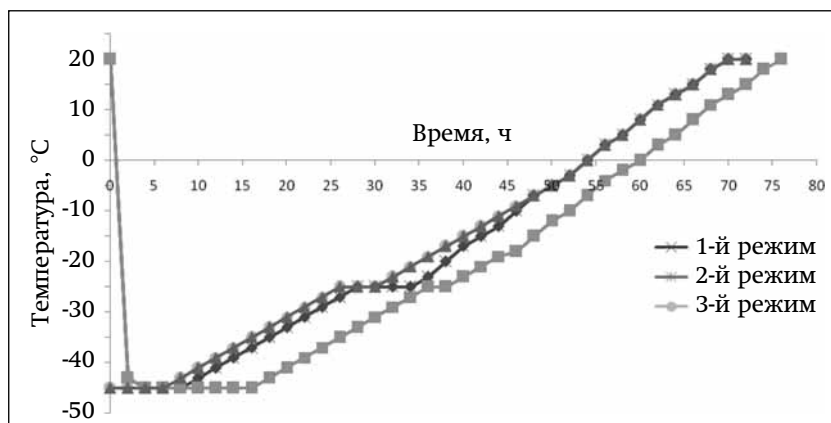


Рис. 4. Три режима лиофилизации раствора ормустина
Fig. 4. Three lyophilization modes for ormustine solution

дозировали по 5 мл во флаконы объемом 20 мл, загружали на полки сублимационной сушки и лиофилизировали при различных температурных режимах (рис. 4).

При 1- и 2-м режимах флаконы загружали на теплые полки (20–22°C), быстро замораживали до -45°C, выдерживали при данной температуре в течение 3 ч при 1-м режиме и в течение 10 ч при 2-м режиме, далее проводили равномерный подъем температуры. В 3-м режиме флаконы загружали на холодные полки (-45°C) с целью быстрого замораживания. Оценивали эффективность предложенных режимов по качеству лиофилизата – внешний вид, регидратируемость, изменение pH, потери действующего вещества при лиофилизации (табл. 2).

При использовании 1- и 2-го режимов удалось получить легкорастворимые лиофилизаты, так как 1-й режим требует меньших затрат времени, он предложен для получения ЛФ ормустина. Быстрое замораживание на полке (3-й режим) привело к образованию кристаллов ормустина, которые затрудняли последующую регидратацию готового препарата.

На завершающем этапе технологических исследований следовало подобрать растворитель для регидратации полученного лиофилизата. С этой целью оценивали влияние наиболее часто применяемых растворителей для инъекционного пути введения (вода для инъекций, изотонический раствор хлорида натрия, 5% раствор глюкозы, раствор Рингера, Гемодез-Н и фосфатный буферный раствор с pH=6,8-7,1) на значение pH и физическую стабильность раствора, получаемого после регидратации лиофилизата ормустина. Все растворители обеспечивали получение истинного раствора, но значительное повышение pH (до 6,5) наблюдали только при применении фосфатного буферного раствора. При использовании растворов Рингера и Гемодеза-Н уже через 1 ч после регидратации лиофилизата наблюдали снижение содержания действующего вещества на 4 и 8% соответственно. В течение суток в растворах с упомянутыми растворителями концентрация ормустина падала на 40% от пер-

воначальной. Такие растворители, как вода для инъекций, изотонический раствор хлорида натрия и фосфатный буферный раствор, позволили сохранить исходную концентрацию ормустина в течение 1 ч, а 5% раствор глюкозы – в течение 3 ч. Наименьшие потери действующего вещества на всех этапах эксперимента были зафиксированы при растворении лиофилизата в 5% растворе глюкозы и в растворе фосфатного буфера; поэтому их использовали в доклинических исследованиях.

Согласно рекомендациям Государственной фармакопеи РФ, в определенные сроки проводили мониторинг стабильности 3 серий ЛФ ормустина, заложенных на хранение при 2 температурных режимах (4°C и -18°C). В течение 2 лет не наблюдалось существенных изменений в химико-фармацевтических показателях качества, поэтому в проект нормативной документации (НД) на ЛФ ормустина в раздел условия хранения установили требование: хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C.

Результаты изучения стабильности полученного лиофилизата при хранении, а также данные по доклиническому изучению специфической активности и безопасности препарата [19, 20] позволяют говорить, что при проведении экспериментов была разработана ЛФ «Ормустин, лиофилизат для приготовления инъекционного раствора 125 мг» следующего состава: ормустин – 125 мг; Kollidon 17PF – 300 мг; кислота хлористоводородная – 16 мг.

Метотрексат – один из самых эффективных цитостатических препаратов (рис. 5). Антиметаболит из группы структурных аналогов фолиевой

Таблица 2

Сравнение параметров качества лиофилизатов ормустина, полученных при различных режимах лиофилизации

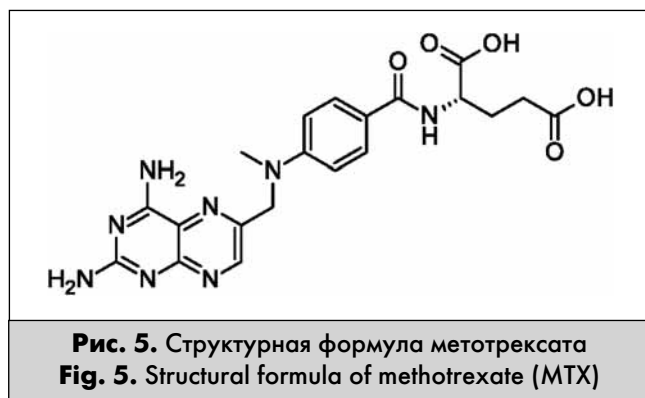
Table 2

Comparison of the quality parameters of ormustine lyophilisates obtained with different modes of lyophilization

Параметр	Режим лиофилизации		
	1-й	2-й	3-й
Внешний вид лиофилизата	Однородная пористая «таблетка»		«Таблетка» с кристаллической структурой
Регидратируемость водой	Проходит легко	Проходит легко	Затруднена
Потеря содержания ормустина при лиофилизации, %	0,6	1,4	1,1

кислоты представляет собой желтый или оранжево-желтый кристаллический порошок практически не растворимый в воде и спирте, гигроскопичный и неустойчивый к действию света.

Оригинальный препарат метотрексат-Эбеве (МТХ-Эбеве) содержит в своем составе натрия хлорид и натрия гидроксид. Как видно из химической структуры метотрексата, натрия хлорид не влияет на растворимость, а образование соли происходит при постепенном подщелачивании раствором натрия гидроксида (18%) до pH=8,0. При



Состав лекарственной формы раствора метотрексата в 1 флаконе

Composition of methotrexate solution formulation in a vial

Состав в 1 флаконе	Метотрексат, раствор для инъекций 10 мг/мл	Метотрексат, раствор для инъекций 100 мг/мл
Метотрексат, мг	50,0	500,0
Натрия хлорид, мг	38,5	24,5
Натрия гидроксид, мг	до pH=8,0	до pH=8,0
Вода для инъекций, мл	5,0	5,0

Расчетные токсические дозы МТХ-В и МТХ-Эбеве на мышах и крысах

Calculated toxic doses of MTX-B and MTX-Ebewe in mice

Препарат	Вид животного	ЛД ₁₀ , мг/кг	ЛД ₁₆ , мг/кг	ЛД ₅₀ , мг/кг	ЛД ₈₄ , мг/кг
МТХ-В	Мыши	242	254	298 (256÷346)	350
МТХ-Эбеве		245	261	322 (248÷420)	399
МТХ-В	Крысы	20	24	42 (34 ÷ 50)	73
МТХ-Эбеве		25	28	41 (34 ÷ 48)	61

приготовлении раствора метотрексата с концентрацией 10 мг/мл наблюдали образование прозрачного, желтого раствора, а при концентрации метотрексата 100 мг/мл – образование оранжевого раствора. Добавление воды для инъекций не влияло на изменение pH и на внешний вид растворов. Растворы метотрексата (табл. 3) готовили в соответствии с прописью, указанной в документации на препарат МТХ-Эбеве (EBEWE Pharma, Австрия). Стерилизацию полученных растворов проводили под давлением с помощью одноразовых фильтров с диаметром пор 0,22 мкм. Готовые растворы разливали по 5 мл во флаконы из темного стекла вместимостью 10 мл, укупоривали пробками и завальцовывали алюминиевыми колпачками.

Безопасность дженерика подтверждали путем изучения изменений химико-фармацевтических параметров в процессе хранения и сравнительного исследования токсичности воспроизведенной ЛФ метотрексата (МТХ-В) и МТХ-Эбеве (препарат сравнения) на стандартных животных. Установлено, что при хранении препарата химико-фармацевтические показатели не изменялись. По вели-

Таблица 3

Table 3

чине расчетных токсических доз, как воспроизведенного МТХ-В, так и МТХ-Эбеве, можно сделать вывод о том, что оба препарата показывают практически одинаковую количественную токсичность на мышах и крысах (табл. 4). На основании результатов, полученных при сравнительном изучении «острой» токсичности на мышах и крысах по показателям количественной и качественной токсичности, установлено, что МТХ-В и МТХ-Эбеве практически не отличаются друг от друга.

Таблица 4

Table 4

Клиническая картина интоксикации у мышей и крыс после введения МТХ-В и МТХ-Эбеве аналогична: уменьшение массы тела на 10–20%, пилоэрекция, сужение глазных щелей, гиподинамия, диарея, анорексия и т.д. Динамика изменения массы тела при действии обоих препаратов практически одина-

Литература

кова. Признаки макроскопических изменений внутренних органов павших животных после введения воспроизведенного МТХ (сукровичные выделения из носа, атрофия тимуса, поджелудочная железа – рыхлая кроваво-красного цвета, изменения в ЖКТ; остальные органы – без видимых изменений) также не отличались от таковых после введения МТХ-Эбеве. При изучении субхронической токсичности при ежедневном 3-кратном внутривенном введении крысам-самцам МТХ-В и МТХ-Эбеве установлено, что препараты проявляют практически равную токсичность по показателям: летальность, биомаркеры токсичность, морфометрия органов и результатам сравнительного патоморфологического изучения. Результаты токсикологических исследований подтверждают воспроизведение технологии получения препарата «Метотрексат, раствор для инъекций 10 мг/мл и 100 мг/мл».

Воспроизведенная технология производства метотрексата была масштабирована и передана на производство в филиал «Наукопрофи» НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина; дженерик был зарегистрирован под торговым названием «Метотрексат-РОНЦ®, раствор для инъекций 10 мг/мл и концентрат для приготовления раствора для инфузий 100 мг/мл» (регистрационный номер ЛП-002821).

Заключение

Таким образом, в ходе проведенных исследований подобраны условия солеобразования для ормустина (растворение в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты, лиофилизация, применение Kollidon 17 PF в качестве формирующего компонента) и метотрексата (подщелачивание гидроксидом натрия). По изученным токсическим свойствам полученная солевая форма метотрексата не отличалась от зарубежного аналога.

С учетом свойств активных фармацевтических субстанций предложены новая оригинальная лекарственная форма «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» и воспроизведенный «Метотрексат, раствор для инъекций 10 мг/мл и 100 мг/мл».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

1. Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. Противоопухолевые препараты, производные нитрозоалкилмочевины, применяемые для лечения новообразований различного генеза. *Биофармацевтический журнал*, 2014; 6 (5): 38–51.

2. Оборотова Н.А., Лопатин П.В. 30 лет лаборатории разработки лекарственных форм РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. *Российский биотерапевтический журнал*, 2004; 3 (4): 3–7.

3. Барышников А.Ю., Шпрах З.С. Отечественные противоопухолевые препараты. В кн.: Рациональная фармакотерапия в онкологии: руководство для практикующих врачей. Под ред. М.И. Давыдова, В.А. Горбуновой. М.: Изд-во Литтерра, 2015: 95–101.

4. Барышникова М.А., Альбассит Б., Сапрыкина Н.С., Левит Г.Л., Матвеева Т.В., Краснов В.П. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитрозоалкилмочевин. *Российский биотерапевтический журнал*, 2013; 12 (1): 8.

5. IMS Institute, Innovation in cancer care and implications for health systems. *Global oncology trend report*, 2014.

6. Соколов А.В. Оригинальные препараты и дженерики: качество, возможные пути решения проблемы. *Медицинские технологии. Оценка и выбор*, 2012; (3): 52–6.

7. Ишмухаметов А. Генерическая экспансия на фармрынке ЕС. *Ремедиум*, 2011; 1: 8–13.

8. Соколов А.В., Липатова В.С. Оригинальные препараты и дженерики: проблема выбора. *Рецепт*, 2011; 3: 28–35.

9. Кузнецова Е.И., Горбачевская Н.Л., Байкова В.Н., Иванов А.В. Связи ЭЭГ и биохимических показателей у детей с лимфобластными опухолями. *Нейрохимия*, 2005; 22 (2): 131–138.

10. Иванов А.В., Родионова Г.М., Байкова В.Н., Арзамасцев А.П. Сравнительная оценка методов количественного определения концентрации метотрексата в биологической жидкости и лекарственных формах. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2004; (3): 49–52.

11. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли. Под ред. С.Н. Быковского С.Н., И.А. Василенко, Н.Б. Деминой, И.Е. Шохина, О.В. Новожилова, А.П. Мешковского, О.Р. Спицкого. М.: Изд-во Перо, 2015: 472.

12. Nishiyama M., Eguchi H. Recent advances in cancer chemotherapy: current strategies, pharmacokinetics and pharmacogenomics. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2009; 61 (5): 367–8. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.11.001>

13. Душкин А.В., Сунцова Л.П., Халиков С.С. Механохимическая технология для повышения растворимости лекарственных веществ. *Фундаментальные исследования*, 2013; (1): 448–57.

14. Williams H.D., Trevaskis N.L., Charman S.A., Shanker R.M., Charman W.A., Pouton C.W., Porter C.J.H. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacological reviews*, 2013; 65 (1): 315–499. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005660>

15. Gulyakin I.D., Oborotova N.A., Pechennikov V.M. Solubilization of Hydrophobic Antitumor Drugs (Review). *Pharm. Chem. J.*, 2014; 48(3): 209–13. <https://doi.org/10.1007/s11094-014-1078-7>

16. Makary P. Principles of salt formation. UK. J. Pharm & Biosci, 2014; 2 (4): 1–4.

17. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабахян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и лабораторных животных. Качественная клиническая практика, 2002; 1: 58–61.

18. Могилуек В. Аспекты лиофилизационной сушки водных растворов. Фармацевтическая отрасль, 2014; 5 (46): 46–53.

19. Чалей В.А., Коняева О.И., Ермакова Н.П., Николина А.А., Бухман В.М., Кульбачевская Н.Ю. Доклиническое изучение токсичности нового противоопухолевого препарата ормустина на мелких лабораторных животных. Российский биотерапевтический журнал, 2015; 14 (4): 65–72.

20. Сапрыкина Н.С., Борисова Л.М., Киселева М.П., Смирнова З.С., Краснов В.П., Левит Г.Л., Мусияк В.В., Барышников М.А., Бухман В.М., Шпрах З.С., Давыдов М.М. Противоопухолевая активность ормустина на перевиваемых лейкозах мышей. Российский биотерапевтический журнал, 2016; 15 (2): 24–31.

References

1. Lantsova A.V., Sanarova E.V., Oborotova N.A.

Antineoplastic preparations derivative of nitrosoalkylurea for treatment of cancer neoplastic of different genesis. Russian Journal of Biopharmaceuticals, 2014; 6 (5): 38–51 (in Russian).

2. Oborotova N.A., Lopatin P.V. 30 years of the laboratory for the development of dosage forms N.N. Blokhin GU RONC RAMS. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal, 2004; 3(4): 3–7 (in Russian).

3. Baryshnikov A.Yu., Shprakh Z.S. Domestic antitumor drugs. In: Rational Pharmacotherapy in Oncology: A Guide for Practitioners (ed. M.I. Davydov, V.A. Gorbunova). Moscow: Izd-vo Litterra, 2015: 95–101 (in Russian).

4. Baryshnikova M.A., Albatssit B., Saprykina N.S., Levit G.L., Matveeva T.V., Krasnov V.P. The antitumor activity of the new compound from the class of nitrosoalkyl ureas. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal, 2013; 12 (1): 8 (in Russian).

5. IMS Institute, Innovation in cancer care and implications for health systems. Global oncology trend report, 2014.

6. Sokolov A.V. Original drugs and Generics: Quality, the Possible Methods of Solution of the Problem. Medicinskie tekhnologii. Ocenka i vybor, 2012; (3): 52–6 (in Russian).

7. Ishmukhametov A. Generic expansion in the EU pharmaceutical market. Remedium, 2011; 1: 8–13 (in Russian).

8. Sokolov A.V., Lipatova V.S. Original drugs and generics: the problem of choice. Recept, 2011; 3: 28–35 (in Russian).

9. Kuznetsova E.I., Gorbachevskaya N.L., Baykova V.N., Ivanov A.V. Correlations between EEG and biochemical parameters in children lymphoblastic tumors. Correlations between EEG and biochemical parameters in children with lymphoblastic tumors. Neyrokimiya, 2005; 22 (2): 131–8 (in Russian).

10. Ivanov A.V., Rodionova G.M., Baikova V.N., Arzamastsev A.P. Comparative evaluation of methods for quantitative determination of methotrexate concentration in biological fluid and dosage forms. Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy khimii, 2004; (3): 49–52 (in Russian).

11. Pharmaceutical development: the concept and practical recommendations. Scientific and practical guide for the pharmaceutical industry (ed. S.N. Bykovsky, I.A. Vasilenko, N.B. Demina, I.E. Shokhin, O.V. Novozhilova, A.P. Mashkovsky, O.R. Spitskiy). Moscow: Izdatel'stvovo Pero, 2015; 472 (in Russian).

12. Nishiyama M., Eguchi H. Recent advances in cancer chemotherapy: current strategies, pharmacokinetics and pharmacogenomics. Adv. Drug. Deliv. Rev, 2009; 61 (5): 367–8. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.11.001>

13. Dushkin A.V., Sunstova L.P., Khalikov S.S. Mechanochemical technology for improving solubility of drugs. Fundamental'nye issledovaniya, 2013; (1): 448–57 (in Russian).

14. Williams H.D., Trevaskis N.L., Charman S.A., Shanker R.M., Charman W.A., Pouton C.W., Porter C.J.H. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. Pharmacological reviews, 2013; 65 (1): 315–499. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005660>

15. Gulyakin I.D., Oborotova N.A., Pechennikov V.M. Solubilization of Hydrophobic Antitumor Drugs (Review). Pharm. Chem. J., 2014; 48(3): 209–213. <https://doi.org/10.1007/s11094-014-1078-7>

16. Makary, P. Principles of salt formation. UK J. Pharm & Biosci, 2014; 2 (4): 1–4.

17. Bolshakov O.P., Neznanov N.G., Babakhyan R.V. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and laboratory animals. Kachestvennaya klinicheskaya praktika, 2002; 1: 58–61 (in Russian).

18. Mohylyuk V. Aspects of lyophilization drying of aqueous solutions. Farmaceuticheskaya otrasl, 2014; 5 (46): 46–53 (in Russian).

19. Chaley V.A., Konyaeva O.I., Ermakova N.P., Nikoliva A.A., Bukhman V.M., Kul'bachevskaya N.Yu. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal, 2015; 14 (4): 65–72 (in Russian).

20. Saprykina N.S., Borisova L.M., Kiseleva M.P., Sмирнова Z.S., Krasnov V.P., Levit G.L., Musiyak V.V., Baryshnikova M.A., Bukhman V.M., Shprakh Z.S., Davydov M.M. Antitumor activity of ormustine against transplanted leukemia of mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal, 2016; 15 (2): 24–31 (in Russian).

Поступила 24 сентября 2018 г.

Received 12 September 2018

Принята к публикации 19 ноября 2018 г.

Accepted 19 November 2018