

УДК 577.352.2:615.45:615.015.44

А.В. Ланцова, Е.А. Котова, Е.В. Санарова, А.П. Полозкова, М.А. Барышникова, Н.А. Оборотова

РАЗРАБОТКА**ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЦИФЕЛИНА**

ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва

Контактная информация

Ланцова Анна Владимировна, к.фарм.н., старший научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел: +7(499)612-81-92

e-mail: lantsova1979@mail.ru

Статья поступила 04.03.2015, принята к печати 27.04.2015.

Резюме

Целью настоящего исследования является разработка стерически стабилизированной липосомальной формы цифелина. Субстанция цифелина получена в лаборатории химического синтеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Все используемые вспомогательные вещества и реактивы соответствовали НД. Способ получения липосом включает в себя: стадию получения многослойной, а затем однослойной липосомальной дисперсии. Для повышения стабильности липосом с цифелином в процессе хранения разработан режим лиофилизации, для этого использовали сублимационную сушку Эдвардс Minifast Do.2. Размер липосом определяли на автокорреляционном спектрофотометре «Наносайзер». Спектрофотометрический метод применили для количественного определения цифелина в липосомах. Кристаллы не включенного в липосомы препарата отделяли методом фильтрации с использованием фильтров с ϕ пор 0,22 мкм. Перекисное окисление липидов устанавливали по концентрации конечного продукта окисления – МДА. Для оценки цитотоксической активности исследуемых липосом цифелина *in vitro* использован МТТ-тест. Опыт проводили на клеточных линиях опухолей человека: SKOV-3 – аденокарцинома яичников и Jurkat – Т-клеточный лимфобластный лейкоз. Цифелин как гидрофобное вещество включали в состав липосомальной мембраны. Оптимальным по эффективности включения и внешнему виду выбран состав с молярным соотношением липидов фосфатидилхолин : холестерин : дистеароилфосфатидилэтаноламин-полиэтиленгликоль-2000 165 : 8 : 1 и соотношением «липид : цифелин» 12 : 1, включение ЛВ в котором составило 98 ± 1 %, средний размер липосом 136 ± 12 нм. На клеточных линиях опухолей человека SKOV-3 и Jurkat показана цитотоксическая активность ПЭГ-липосом цифелина. В результате исследований разработан лекарственный препарат «Цифелин липосомальный лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 17 мг».

Ключевые слова: липосомы, цифелин, лиофилизированная липосомальная форма, цитотоксическая активность, SKOV-3, Jurkat.

A.V. Lantsova, E. A. Kotova, E.V. Sanarova, A.P. Poloskova, M.A. Baryshnikova, N.A. Oborotova

DEVELOPMENT**OF LYOPHILIZED LIPOSOMAL PHARMACEUTICAL DOSAGE FORM CIFELIN**

FSBNI «N. N. Blokin Russian Cancer Research Center», Moscow

Abstract

This study objective has been to develop optimal composition of Cifelin sterically stabilized liposomal formulation. The substance of Cifelin synthesized in chemical synthesis laboratory FSBNI «N.N. Blokhin RCRC». All used excipients and reagents conform to the standard documentation. Method of obtaining liposomes includes: a method of obtaining Cifelin multilamellar and unilamellar liposomes dispersions. Liposomal dispersion has been lyophilized on freeze-dryer Edwards Minifast DO.2. Liposomes size has been measured by light diffusion dynamic spectrums copy on Nicomp 380 Submicron Particle Sizer. Quantitative measurement has been conducted by spectrometry in ultraviolet area. Crystals of unenclosed into lipid bilayer Cifelin have been separated by filtration through filter with pore diameter of 0,22 μ m. Lipids peroxidation has been estimated by concentration of oxidation final product – MDA. MTT-test has been used to estimate Cifelin LF cytotoxic activity *in vitro*. In this study the optimum molar ratio of components has been found for liposomal membrane composed of phosphatidylcholine, cholesterol and DSPE-PEG-2000. Composition with lipids molar ratio 165 : 8 : 1 and “lipid : Cifelin” ratio 12 : 1 has been chosen as optimal by entrapment efficiency and appearance, encapsulated API value in this composition has been 98 ± 1 %, liposomal size has been 136 ± 12 nm. On cell line SKOV-3 and Jurkat *in vitro* cytotoxic effect of Cifelin liposomal drug form has been highly increased. As a result of the study drug product “Cifelin lyophilized liposomal for injections 17 mg” has been developed.

Key words: liposomes, Cifelin, lyophilized liposomal drug, cytotoxic activity, SKOV-3, Jurkat.

Введение

Наряду с хирургическими и лучевыми методами лечения широко применяется химиотерапия злокачественных опухолей, которая получила научное обоснование в 40-х гг. XX в. В ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» синтезированы первые отечественные препараты – производные бис-(β -хлорэтил)-амин, которым наряду с высокой клинической эффективностью присуща высокая токсичность. Наименее токсичным производным является цифелин – оригинальный отечественный препарат [8; 13; 15; 16; 20–22].

Для устранения побочных эффектов, повышения биодоступности за счет возможности внутривенного введения гидрофобного ЛВ, сокращения вводимых доз разработана ЛЛФ цифелина [8; 21; 22]. При изучении спектра специфического действия на ряде перевиваемых опухолей мышей при внутрибрюшинном введении показано, что ЛФ превосходит субстанцию по противоопухолевому действию на модели аденокарциномы молочной железы (ТРО 84 и +26 %, УПЖ 25 и 9 % соответственно). Введение липосомального цифелина беспородным крысам с перевиваемой карциносаркомой Уокера вызывало излечение 89 % животных при пероральном (для субстанции 13 %) и 100 % – при внутривенном введении [8; 21; 22].

Наряду с положительными свойствами «обычных» липосом, таких как защита от биодegradации, постепенное высвобождение ЛВ, снижение токсичности, пассивное нацеливание в «горячие точки», появляется нежелательное взаимодействие липосом с белками плазмы, в результате которого полученные комплексы захватываются из кровотока макрофагами ретикуло-эндотелиальной системы [10–12].

Для того, чтобы лекарственный препарат, вводимый внутривенно, достиг в организме клеток-мишеней, предлагаются различные способы снижения опсонизации:

- введение в состав липосомальной мембраны холестерина, липидов с высокой температурой фазового перехода,
- получение везикул с размером не более 100 нм.

Однако наиболее эффективным методом оказалась модификация поверхности липосом гликوليдами, например, моносиалоганглиозидами, фосфатидилинозитолом, цереброзида сульфатом и липидными производными полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Наибольшую популярность, благодаря дешевизне и простоте синтеза, получили гидрофильные полимеры ПЭГ, обладающие длительным временем циркуляции в кровотоке за счет блокирования механизма поглощения липосом клетками ретикуло-эндотелиальной системы (создают избыточное осмотическое давление в примембранной области везикулы) [9; 14; 16–19; 23; 25; 31]. Период полувыведения таких липосом достигает 24 ч у мышей и крыс и до двух дней в организме челове-

ка. Данное явление гарантированно способствует локализации лекарственного препарата в опухоли или других поврежденных тканях с повышенной проницаемостью сосудов.

Целью данного исследования явилась разработка оптимального состава стерически стабилизированной липосомальной формы цифелина.

Материалы и методы

Лекарственное вещество – цифелин синтезировано в НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» (рис. 1). Для получения липосом использовали фосфатидилхолин (ФХ, E PC S Lipoid GmbH, Германия), холестерин (Хол, SIGMA, Германия), дистеароилфосфатидилэтанолламин-полиэтиленгликоль-2000 (ДСФЭ-ПЭГ-2000, Lipoid GmbH, Германия).

Методика изготовления дисперсии МСЛ цифелина. Изготовление МСЛ цифелина проводили методом гидратации липидной пленки. Точные навески ФХ, Хол, ДСФЭ-ПЭГ-2000 и цифелина растворяли в хлороформе и переносили в круглодонную колбу. Раствор упаривали на ротаторном испарителе (BÜCHI Rotavapor R-200) при температуре водяной бани 35 ± 2 °C (BÜCHI Heating Bath B-490, BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария) и давлении 24 мм рт. ст. до образования тонкой пленки на стенках колбы с последующим досушиванием в течение 50 минут под вакуумом. Липидную пленку гидратировали 0,9% раствором натрия хлорида до полного смывания со стенок колбы.

Методика изготовления дисперсии однослойных липосом цифелина. Полученную дисперсию МСЛ цифелина фильтровали через нейлоновые мембранные фильтры Pall N66 (ООО «Палл Евразия», Россия) с ϕ пор 1,2 и 0,45 мкм, после чего измельчали на гомогенизаторе Microfluidizer M-110S (Microfluidics, США) под давлением 40 psig (280 кПа) в течение 1–6 мин (в зависимости от объема) и фильтровали через мембраны с ϕ пор 0,22 мкм.

Лиюфизацию липосомальной дисперсии проводили на установке лиофильной сушки Edwards Minifast DO.2 (Ero Electronic S.p.A., Великобритания) после добавления криопротектора в экспериментально подобранной концентрации.

Для достижения поставленной цели исследования использовали следующие методы анализа:

- Размер липосом определяли методом динамической спектроскопии светорассеяния на наносайзере Nicomp 380 Sub-micron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США).
- Количественное определение проводили методом спектрофотометрии в УФ-области на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Inc., Австралия).
- Кристаллы не включенного в липидный бислой цифелина отделяли с помощью фильтрации через фильтр с ϕ пор 0,22 мкм.

- Перекисное окисление липидов устанавливали по концентрации конечного продукта окисления – МДА, образующегося после взаимодействия липосом с трихлоруксусной и тиобарбитуровой кислотами.

Для оценки цитотоксической активности исследуемой ЛЛФ цифелина *in vitro* использован МТТ-тест. Опыт проводили на клеточных линиях опухолей человека: SKOV-3 – клетки аденокарциномы яичников и Jurkat – Т-клеточный лимфобластный лейкоз. ЛЛФ цифелина исследовали в концентрациях 0,4 мкг/мл, 4,7 мкг/мл, 47 мкг/мл и 426 мкг/мл. Клетки инкубировали с препаратом в течение 24, 48 и 72 часов, затем добавляли МТТ, через 4 ч образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде и измеряли оптическую плотность на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций «АИФР-01 Униплан» (ЗАО «Пикон», Россия).

Результаты и обсуждение

Разработка состава липосомальной формы цифелина

Цифелин как гидрофобное вещество включали в состав липосомальной мембраны, основным компонентом которой выбран липид – фосфатидилхолин. Холестерин добавляли для придания жесткости структуре бислоя. Такие липосомы легко подвергаются захвату из кровотока клетками ретикуло-эндотелиальной системы, поэтому для увеличения продолжительности циркуляции липосом в состав вводили дистеароилфосфатидилэтаноламин-полиэтиленгликоль-2000. Липидное производное ПЭГ, повышая осмотическое давление в примембранной области, препятствует поглощению липосом макрофагами и обеспечивает доставку ЛВ в опухолевый очаг путем пассивного нацеливания [1–7].

Изготавливали составы с различными молярными соотношениями «ФХ : Хол : ДСФЭ-ПЭГ-2000», а также изменяли соотношение «липид : цифелин».

Основным параметром выбора явилась эффективность включения ЛВ. По результатам проведенного исследования установлено, что избыточное количество Хол не включается в бислой, и на стадии получения МСЛ образовывался обильный кристаллический осадок. В образцах с высоким содержанием ДСФЭ-ПЭГ-2000 наблюдали низкое включение цифелина в мембрану. Оптимальным по ЭВ и внешнему виду выбран состав с молярным соотношением липидов 165 : 8 : 1 и соотношением «липид : цифелин» 12 : 1, включение ЛВ в котором составило 98±1 %.

При гомогенизации быстрее и без особых усилий удалось получить липосомы меньшего размера, чем при экструзии. Как видно из табл. 1, для ЛЛФ цифелина сохраняется оптимальный размер везикул и величина ЭВ равная 97±1 % при измельчении 100 мл в течение 3–4 минут.

Стабилизация липосомальных дисперсий цифелина

При длительном хранении дисперсии происходит изменение бислойной структуры, липосомы начинают агрегировать, «вытекает» внутреннее содержимое. Для повышения срока годности их стабилизируют лиофилизацией [24; 26–30].

С целью защиты мембраны липосом от повреждения при лиофильной сушке в состав необходимо добавлять криопротектор, в связи с этим изучили влияние криопротекторов на показатели качества ЛЛФ цифелина. Для этого использовали представителей класса углеводов: глюкозу, сахарозу, лактозу и класса многоатомных спиртов – маннит (табл. 2).

Как видно из данных этой таблицы, при добавлении в состав ЛЛФ криопротектора в молярном соотношении «суммарный липид : криопротектор» 1 : 1,6 липосомы с маннитом сильно укрупнялись, а с сахарами, наоборот, размер везикул уменьшался, и вместе с ним снижалась эффективность включения ЛВ в бислой. Лучшие результаты получены с криопротектором сахарозой – стабильный размер липосом и ЭВ 97±1 %.

Изменение в дисперсии цифелина концентрации сахарозы от 4 до 12 % незначительно влияло на величину рН и размер везикул после лиофилизации. В итоге выбран состав ЛЛФ со значением рН 5,3 и размером везикул 130±12 нм, в котором концентрация криопротектора составила 8 %, а молярное соотношение «липид : сахароза» – 1 : 1,4.

При хранении ЛЛФ может протекать деструкция липидной мембраны за счет окисления ФЛ, поэтому исследовано влияние добавления антиоксиданта – α-токоферола (табл. 3).

По результатам, представленным в этой таблице, видно, что антиоксидант не способствует снижению окисления липидов в ЛЛФ цифелина при хранении при (+4° С). Содержание продуктов окисления (C_{MDA}) в таких составах выше, чем в составе без антиоксиданта. При сравнении дисперсий по внешнему виду наблюдали выпадение осадка и расслоение в процессе хранения липосом с антиоксидантом в результате дестабилизации липосомальной мембраны. По результатам проведенного эксперимента обнаружили, что добавление в липосомальный состав цифелина α-токоферола в качестве агента, препятствующего перекисному окислению, привело к возникновению прооксидантного действия, поэтому выбран состав липосомальной дисперсии без добавления антиоксиданта.

Так, в результате исследования разработан лекарственный препарат «Цифелин липосомальный лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 17 мг». Для ЛЛФ разработаны методики количественного определения разведений ЛЛФ и субстанции цифелина в 95 %-ном этиловом спирте методом спектрофотометрии в УФ-области при 260±2 нм (рис. 2). По представленным на рис. 1 кривым видно, что «пустые» липосомы не поглощают в области максимума, поэтому количественное определение можно проводить относительно растворителя.

Таблица 1

Изменение размера везикул цифелина при гомогенизации

Параметр качества	Время измельчения (объем 100 мл)					
	1 мин	2 мин	3 мин	4 мин	5 мин	6 мин
Размер, нм	190±10	147±9	131±14	120±12	104±15	136±18

Таблица 2

Влияние криопротекторов на размер и эффективность включения цифелина в липосомы после лиофильной сушки

Криопротектор	Размер везикул, нм			Эффективность включения после лиофилизации, %
	До лиофилизации	После лиофилизации	Через 2 недели после лиофилизации	
Глюкоза	158±14	126±20	124±23	74±2
Сахароза	154±9	137±15	136±12	97±1
Лактоза	160±17	129±22	138±18	82±1
Маннит	160±24	225±41	387±49	–
Контроль	158±15	195±27	332±38	–

Таблица 3

Характеристика ЛЛФ цифелина при добавлении α-токоферола

Параметр качества	Состав 1 (без α-токоферола)			Состав 2 (с добавлением 6,5 мг α-токоферола)			Состав 3 (с добавлением 13 мг α-токоферола)		
	До	После	Через 6 мес после	До	После	Через 6 мес после	До	После	Через 6 мес после
	Лиофилизации								
Размер везикул, нм	157±11	130±13	131±10	171±8	145±17	152±18	165±14	134±22	182±31
Значение pH	5,4±0,3	5,3±0,4	5,3±0,1	5,6±0,2	5,7±0,3	5,3±0,5	5,6±0,3	5,6±0,5	5,1±0,4
C _{мдл} , нмоль/мл	2,73±0,14	2,76±0,06	3,07 ±0,10	2,70±0,09	2,76±0,07	3,08 ±0,12	2,64±0,15	2,66±0,12	3,11 ±0,19

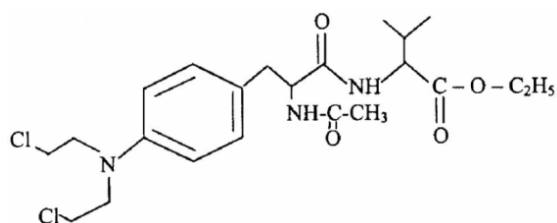


Рис. 1. Структурная формула цифелина.

По результатам определения специфичности, линейности, правильности, прецизионности и аналитической области разработанные методики количественного определения применимы в диапазоне концентраций ЛВ от 80 до 120 %.

Стандартные серии ЛЛФ цифелина хранили в морозильной камере при -18°C , поскольку такая температура установлена для хранения липидов. Согласно требованиям нормативной документации, определяли показатели качества сразу после изготовления, через 3; 6 и 12 месяцев.

Продолжаются исследования для установления максимального срока годности.

Изучение цитотоксической активности ЛЛФ цифелина в опытах *in vitro*

В ходе исследования цитотоксического эффекта определяли количество опухолевых клеток, погибших под воздействием ЛЛФ цифелина.

Цитотоксический эффект характеризует ИК_{50} – ингибирующая концентрация препарата, при которой наблюдается гибель 50 % опухолевых клеток. В ходе исследования отмечена тенденция к ее снижению при увеличении времени инкубации с ЛЛФ цифелина от 24 до 72 ч (рис. 3). На клеточной линии SKOV-3 величина ИК_{50} при 24 ч инкубации не была достигнута, при инкубации 72 ч она составила 47 мкг/мл (рис. 3, А). Клеточная линия Jurkat оказалась более чувствительной к препарату, ИК_{50} при 24ч инкубации – 47 мкг/мл и ее значение снижалось при 48 и 72 ч инкубации (рис. 3, Б).

Таким образом, на клеточных линиях опухолей человека выявили цитотоксическую активность ЛЛФ цифелина, которая оказалась более выраженной на клетках лейкоза. Снижение ИК_{50} при увеличении времени инкубации доказывает теорию о пролонгированном действии ПЭГилированных липосом.

Заключение

Разработана стерически стабилизированная ЛЛФ цифелина: «Цифелин липосомальный лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 17 мг», обладающая длительным временем циркуляции в кровотоке. На клеточных линиях опухолей человека SKOV-3 и Jurkat выявили возрастание цитотоксичности стерически стабилизированных липосом цифелина при увеличении времени инкубации.

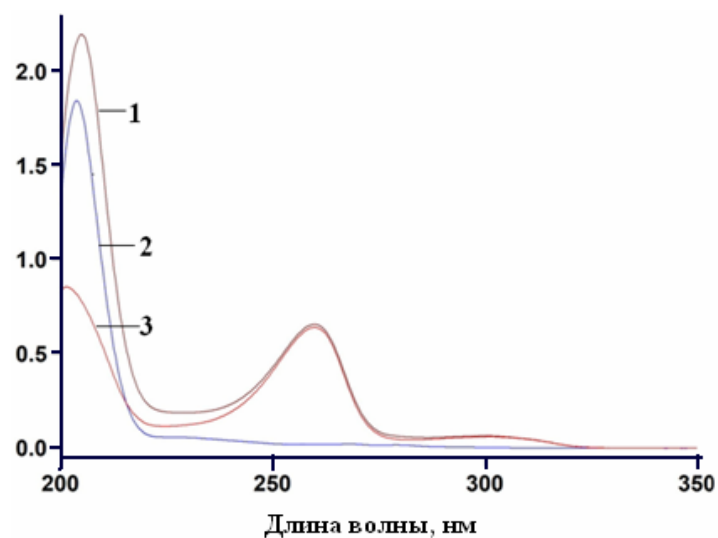


Рис. 2. Электронные спектры поглощения спиртовых разведений ЛЛФ (1), «пустых» липосом (2) и субстанции цифелина (3).

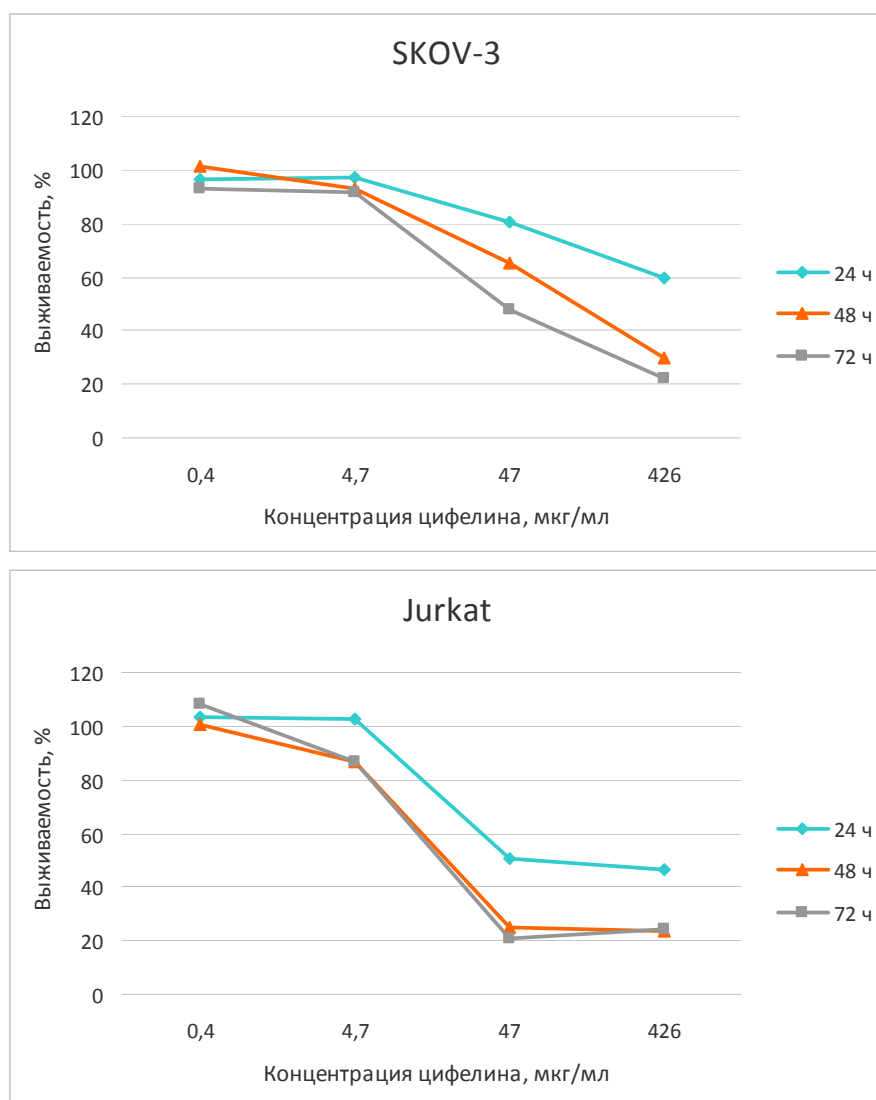


Рис. 3. Цитотоксическая активность ЛЛФ цифелина.

А: на клеточной линии SKOV-3

Б: на клеточной линии Jurkat.

Литература

1. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–30.
2. Барышников А.Ю., Блохина Н.Г., Кадагидзе З.Г. и др. Моноклональные антитела ИКО-1 против константной части Ia-подобных антигенов // Экспериментальная онкология. – 1984. – № 6. – С. 123–5.
3. Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. Иммунолипосомы – новое средство доставки лекарственных препаратов // Современная онкология. – 2001. – Т. 3, №2. – С. 4.
4. Безруков Д.А., Королева А.И., Ланцова А.В. и др. Оптимизация метода получения стерически стабилизированных термочувствительных липосом с активной загрузкой доксорубицином // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 79–83.
5. Гулякин И.Д., Санарова Е.В., Ланцова А.В. и др. Разработка наноструктурированной модели лекарственной формы производного индолкарбазола – ЛХС-1208 // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 78.
6. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. и др. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов. // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, №4. – С. 21–7.
7. Каплун А.П., Шон ЛеБанг, Краснополский Ю.М. и др. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ // Вопросы мед. химии. – 1999. – Т. 45, № 1. – С. 3–12.
8. Котова Е.А., Полозкова А.П., Денисова Т.В. и др. Оптимизация состава и технологии изготовления stealth липосом цифелина // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 12. – С. 37–40.
9. Ланцова А.В., Барышникова М.А., Санарова Е.В. и др. Изучение активности в системе *in vitro* наноструктурированной лекарственной формы лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 31.
10. Ланцова А.В., Оборотова Н.А., Перетолчина Н.М. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности липосомальных лекарственных форм препаратов производных нитрозоалкилмочевины // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – № 2. – С. 25–9.
11. Ланцова А.В., Сапрыкина Н.С., Оборотова Н.А. и др. Противоопухолевая активность наноструктурированной формы лизомустина на мышах с солидной опухолью меланомой В-16 // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 52.
12. Ланцова А.В., Сапрыкина Н.С., Санарова Е.В. и др. Изучение противоопухолевой активности наноструктурированной липосомальной формы лизомустина *in vivo* // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 32.
13. Оборотова Н.А. Достижения в области современных лекарственных форм противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 61.
14. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
15. Оборотова Н.А., Лопатин П.В., Барышников А.Ю. Биофармацевтические аспекты создания лекарственных форм противоопухолевых соединений // Российский онкологический журнал. – 2002. – № 5. – С. 8–11.
16. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 33–40.
17. Санарова Е.В., Оборотова Н.А., Смирнова З.С. и др. Применение липосомальных систем доставки для создания нового эффективного противоопухолевого фотосенсибилизатора // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 72.
18. Санарова Е.В., Оборотова Н.А., Смирнова З.С. и др. Химико-фармакологическая и биологическая стандартизация липосомальной лекарственной формы противоопухолевого фотосенсибилизатора тиосенса // Биофармацевтический журнал. – 2013. – Т. 5, № 3. – С. 31–5.
19. Санарова Е.В., Полозкова А.П., Орлова О.Л. и др. Разработка плана валидации технологического процесса получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы тиосенса // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 46.
20. Смирнова Л.И., Оборотова Н.А., Зимакова Н.И. и др. Доклинические и клинические исследования нового противоопухолевого препарата – таблетки цифелина // Российский онкологический журнал. – 2001. – № 5. – С. 46–8.
21. Чикинева Н.А. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Москва. – 2002. – 24 с.
22. Чикинева Н.А., Смирнова З.С., Орлова О.Л. и др. Создание и изучение липосомальной лекарственной формы цифелина // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 4, № 8. – С. 19.
23. Шадрин А.В., Перетолчина Н.М., Полозкова А.П. и др. Биофармацевтические исследования липосомального лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 49–53.
24. Arshinova O.Y., Sanarova E.V., Lantsova A.V. et al. Drug synthesis methods and manufacturing technology lyophilization of liposomal drug forms (review) // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2012. – 46(4). – P. 228–33.
25. Gregoriadis G. (ed.). Liposome Technology Vol. 3. –New York: Informa Healthcare USA, 2007. – P. 49–65.
26. Lantsova A., Kotova E., Sanarova K. et al. Biopharmaceutical study of nanostructured formulation of the anticancer drug derivative of nitrosoalkylurea Lysomustine // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2012. – 22(6). – P. 469–72.
27. Sanarova E.V., Kotova E.A., Lantsova A.V. et al. Quality of liposomal phospholipids at different stages in the manufacturing process // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2012. – 46(3). – P. 192–5.
28. Sanarova E.V., Polozkova A.P., Meerovich I.G. et al. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control: quantitative determination of Thiosens in a new liposomal drug a form // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2012. – 46(6). – P. 386–8.
29. Sanarova E.V., Polozkova A.P., Meerovich I.G. et al. Quantitative determination of Thiosens in a new liposomal drug form // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2011. – 45. – P. 1–3.
30. Sanarova E.V., Kotova E.A., Lantsova A.V. Technology of liposomal thiosens, Cifelin and Lysomustin for industrial purposes // Journal of Physics: Conference Series. – 2012. – 345(1). – P. 012045.
31. V.P. Torchilin (ed.). Nanoparticulates as Drug Carriers. – London: Imperial College Press, 2006. – P. 437–62.