

На правах рукописи



Каргин Владимир Сергеевич

Разработка состава и технологии получения лекарственного ранозаживляющего средства пролонгированного действия на основе биоразлагаемых полимеров

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2022

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, член-корреспондент РАН

Пятигорская Наталья Валерьевна

Официальные оппоненты:

Суслина Светлана Николаевна – доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Медицинский институт, кафедра общей фармацевтической и биомедицинской технологии, заведующий кафедрой

Полковникова Юлия Александровна – кандидат фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии, доцент

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Курский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «23» декабря 2022 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСУ 208.002.02
доктор фармацевтических наук, профессор



Дёмина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

К основным задачам развития медицинских наук, решение которых требует принципиально новых подходов для получения ожидаемых прорывных результатов, в соответствии с Программой фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы), утвержденной распоряжением Правительства РФ (№ 3684-р от 31.12.2020) относятся, в том числе, получение новых данных о возможности использования природных (натуральных), синтетических и гибридных структур, разработка фармакологических подходов стимуляции функций регенерации тканей, разработка оригинальных по структуре и механизму действия лекарственных средств.

В настоящее время во всем мире отмечается возрастание интереса специалистов к препаратам на основе хитина (в основном получаемого путем переработки ракообразных), его производным и возможностям их использования в различных областях медицины и биотехнологии. Это связано с биологическими свойствами данного полимера, которые позволяют его отнести к группе веществ, обладающих выраженной фармакологической активностью. Производные хитина биосовместимы и биоразрушаемы до низкомолекулярных соединений (N-ацетилглюкозамин или глюкозамин).

В последнее десятилетие значительно расширились области применения хитозана. Хитин и хитозан по своему строению очень близки к целлюлозе, они так же обладают пленко- и волокнообразующими свойствами. Особое место данные полимеры занимают в медицине благодаря своим свойствам: низкая токсичность, биосовместимость с человеческими тканями, биodeградируемость и ускорение процессов заживления ран путем грануляции ткани в ответ на воспалительные процессы. Они способны стимулировать пролиферацию фибробластов, ангиогенез, синтез и нарастание коллагеновых волокон. Хитозан обладает антисептической активностью по отношению к наиболее часто встречающимся возбудителям гнойных осложнений. По силе действия он уступает антибиотикам, но при контакте с микробной флорой в жидкой среде сохраняет свою бактериостатическую активность в течение 2-2,5 суток. Особенно хитозан активен в кислой среде, характерной для начальных этапов любого раневого процесса.

Известны исследования растворимых и нерастворимых структур хитозана, которые обладают различными физико-химическими свойствами и применяются в разработке таких лекарственных форм, как растворы, гели, пленки, которые влияли на процесс заживления кожной раны у крыс и кроликов, и показали, что их применение обеспечивает достоверное ускорение процессов репарации кожи. Все это подтверждает необходимость продолжения фундаментальных и прикладных исследований, направленных на изучение возможностей применения хитозана в медицинских целях.

Анализ процессов разработки и их понимание, оперативный контроль и управление процессом с помощью методов многофакторного анализа осуществляются в некоторых отраслях промышленности уже в течение нескольких десятилетий. Они являются неотъемлемой частью эмпирического и гибридного моделирования. В фармацевтической промышленности многофакторный анализ используется для связывания качества лекарственного средства (ЛС) со свойствами сырья и технологическим процессом, а также для его управления, масштабирования и трансфера.

Понимание многофакторной сущности качества имеет очень большое значение. Качество продукта определяется одновременно правильными значениями всех измеренных свойств, т.е. это признак, характеризующийся многими переменными. ЛС является результатом многофакторного совмещения свойств сырья и условий процесса, которые включают производство фармацевтической субстанции (ФС) и производство лекарственной формы. Эти процессы сказываются не только на одном или нескольких показателях качества готового продукта, но также и на его стабильности.

Направлением исследований была разработка ЛС на основе хитозана и ферментов, с использованием многофакторных методов планирования и математического анализа, которое должно обладать ранозаживляющим действием за счет ферментативных веществ. Применение разрабатываемого ЛС возможно при терапии длительно не заживающих ран, как в острой, так и хронической фазе, а также при гнойно-воспалительном процессе.

Степень разработанности темы исследования

Интерес к хитозансодержащим продуктам за счет их уникальных физико-химических и биологических свойств проявляют фармацевтическая, медицинская, химическая, биотехнологическая и пищевая промышленности. Несмотря на многочисленные исследования хитозана и его производных, и имеющиеся внедрения в практику, проблема создания лекарственной формы (ЛФ), содержащей производное хитозана, выступающего в качестве носителя лекарственного средства, оказывающего продолжительный антибактериальный эффект, является актуальной задачей и предметом многочисленных работ (И.И. Краснюка, С.А. Кедика, Н.Б. Дёминой, А.И.Сливкина, Р.А. Абрамович, Е.О. Медушевой, А.А. Белова и др.). Подтверждается также значительный уровень изобретательской активности в области технологии получения соединений, их производных, а также фармацевтических композиций и технологии получения ЛС на основе хитозана. В связи с этим, разработка составов ЛС на основе хитозана является актуальным направлением.

В Центре фармацевтических технологий Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) был разработан, теоретически и экспериментально обоснован рациональный состав

и оптимальная технология получения ЛС пролонгированного действия на основе биоразлагаемого полимера хитозана.

Целью исследования является научно-обоснованная разработка состава и технологии получения лекарственного ранозаживляющего средства пролонгированного действия на основе хитозана и ферментов для лечения длительно не заживающих ран.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Провести анализ исследований в области разработок лекарственных средств на основе биоразлагаемых полимеров
2. Научно обосновать выбор лекарственной формы, определить основные факторы, влияющие на ее фармацевтическую разработку.
3. Используя многофакторный анализ, научно обосновать состав лекарственного средства для наружного применения.
4. Разработать технологию получения лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения».
5. Разработать методики контроля качества и провести их валидацию, разработать проект спецификации для лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения».

Научная новизна

Впервые использованы методы многофакторного анализа для ускорения процесса разработки оптимального состава ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения».

Методом многофакторного планирования эксперимента на основе функции желательности Харрингтона и других методов анализа теоретически обосновано и экспериментально доказано влияние изменения физико-химических и биофармацевтических показателей на качество ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» в зависимости от молекулярной массы полимера хитозана, что позволило выбрать оптимальный состав для создания лекарственной формы.

Теоретическая и практическая значимость

На основании физико-химических и биофармацевтических исследований разработана стабильная в процессе хранения лекарственная форма – порошок для местного применения на основе хитозана и ферментов.

Проведена апробация технологии получения и методик контроля качества лекарственного средства на ООО «Тульская фармацевтическая фабрика». Результаты исследований вошли в комплексный отчет о проделанной работе в рамках конкурса «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (УМНИК) при поддержке Фонда содействия инновациям.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили работы зарубежных и российских ученых в области фармацевтической технологии, в частности, в вопросах фармацевтической разработки лекарственных средств.

Для оценки взаимосвязи между технологическими и биофармацевтическими факторами при выполнении экспериментов были использованы математические методы исследования, такие как корреляционный анализ, метод построения диаграммы Исикавы, метод дисперсионного анализа и метод многофакторного анализа на основе функции желательности Харрингтона для осуществления выбора оптимального состава ЛС.

В диссертационной работе использованы фармакопейные методы, включенные в Государственную Фармакопею РФ и Фармакопею ЕАЭС, Решение Коллегии ЕЭК от 10.05.2018 № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций», Решение Коллегии ЕЭК от 17.07.2018 № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств», Рекомендация Коллегии ЕЭК от 29.01.2019 № 3 «О Руководстве по производству готовых лекарственных форм лекарственных препаратов».

Основные положения, выносимые на защиту

- оптимальный состав носителя на основе хитозана для получения лекарственной формы;
- результаты изучения физико-химических, биофармацевтических и технологических свойств состава ЛФ;
- результаты выбора оптимального состава лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»;
- технология получения лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»;
- результаты по разработке методик контроля качества лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»;
- результаты изучения стабильности лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения».

Степень достоверности и апробация результатов проведенных исследований

Достоверность полученных результатов обусловлена необходимым объемом экспериментального материала, однородностью выборки объектов эксперимента, применением современных методов исследования, сертифицированного оборудования, валидацией разработанных методик, применением методов математической статистики, теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных. При проведении экспериментальной

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

Основные положения работы и результаты диссертационного исследования доложены на следующих конференциях: II Международная Научно-практическая конференция (14.11.2019 г. Москва); Межвузовский научный конгресс (24.01.2020 г., Москва); Международная научно-практическая конференция «Актуальные аспекты химической технологии биологически-активных веществ» (26.05.2020 г., Москва), XI всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармацевтика – потенциал будущего» (23.04.2021 г., Санкт-Петербург)

Апробация результатов диссертации состоялась на межкафедральной конференции кафедры промышленной фармации и кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования, кафедры фармацевтической технологии Института фармации имени А.П. Нелюбина, Центра доклинических исследований и Центра фармацевтических технологий Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), кафедры биотехнологии и промышленной фармации института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова МИРЭА - Российского технологического университета, протокол № 05 от 18 мая 2022 года.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в постановке задач и их реализации в экспериментальной части. Автором лично проведена разработка состава, проведены исследования физико-химических, биофармацевтических и технологических характеристик лекарственного средства, выбор оптимального состава ЛС, а также разработка технологии получения оригинального ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения». Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе, получены автором самостоятельно и внедрены в практику.

Внедрение результатов в практику

Научно-практические результаты исследования – ОПР на производство (Акт внедрения №128 от 26 апреля 2022) и методики контроля качества (Акт внедрения №129 от 26 апреля 2022) лекарственного средства внедрены в работу ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»; результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре промышленной фармации Института профессионального образования (Акт внедрения в учебный процесс от 18 февраля 2022).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств, пунктам 2, 3, 4.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в рамках Государственной программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации», является результатом проделанной работы в рамках конкурса «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (УМНИК) при поддержке Фонда содействия инновациям.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и является фрагментом исследования по теме «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01.2.012.61653).

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 8 работ, в том числе 3 научных статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer, 4 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 220 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), выводов, списка литературы, приложений. Работа иллюстрирована 97 таблицами, из них 18 таблиц в приложениях, 38 рисунками. Библиографический указатель включает 150 источников, из них 51 на иностранных языках.

В приложениях вынесен титульный лист ОПР получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения», Акт внедрения ОПР получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения», Акт внедрения методик контроля качества ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения», Акт внедрения научных результатов в учебный процесс кафедры промышленной фармации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Анализ исследований в области разработок лекарственных средств на основе биоразлагаемых полимеров показал, что использование препаратов должно быть обусловлено высокой концентрацией действующих веществ в месте непосредственного воздействия. Использование хитозана в качестве носителя действующих веществ подтверждает интерес к данному полимеру, принимая во внимание его физико-химические свойства, возможность модификации и низкую токсичность.

Материалы и методы исследований

Для оценки взаимосвязи между технологическими и биофармацевтическими факторами для осуществления выбора оптимального состава ЛС при выполнении экспериментов были использованы математические методы исследования: корреляционный анализ с определением причинно-следственных взаимосвязей (диаграмма Исикавы), дисперсионный и многофакторный анализы на основе функции желательности Харрингтона. В экспериментальных исследованиях по разработке методик качественного и количественного определения ЛС были использованы фармацевтические субстанции, вспомогательные вещества и реактивы, соответствующие Государственной Фармакопее Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ) и национальным стандартам (ГОСТ). Наполнителями при разработке ЛС служили биоразлагаемые полимеры хитозана с молекулярной массой (ММ) 200 и 500 кДа (производитель ООО «Биопрогресс», Россия). В качестве антислеживающего вещества был использован AEROSIL® 150 (Evonic Operations GmbH, Германия), аскорбиновая кислота (ООО «Бадразвес», Россия), уксусная кислота (Merk, Германия). Для изучения высвобождения ферментативных систем ЛФ в качестве референтных образцов использовались лекарственные препараты (ЛП) «Химопсин» (ООО «Самсон-Мед», Россия) и «Лидаза» (АО «НПО «Микроген»», Россия).

Для выбора модификации биоразлагаемого носителя были применены следующие методы экспериментальных исследований: динамическую вязкость определяли на вибрационном вискозиметре (A&D, Япония); потенциметрическое определение показателя pH устанавливали при помощи высокоомного pH-метра (Mettler Toledo, США); органолептическую оценку прозрачности раствора проводили визуальным органолептическим методом на белом фоне; определение показателя «Влажность» (Mettler Toledo, США); размер частиц и дисперсность порошка устанавливали микроскопически с помощью оптического микроскопа (Микромед-1, Китай). Для разработки состава ЛС были применены следующие методы экспериментальных исследований: насыпная плотность определялась при помощи тестера насыпной плотности (Electrolab, Индия); сыпучесть и угол естественного откоса определялась при помощи воронки (Electrolab, Индия) с использованием насадки 1 с диаметром отверстия $10 \pm 0,01$ мм.

Валидация разработанных методик проведена согласно требованиям Решения Коллегии ЕЭК от 17.07.2018 № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств» и ГФ РФ. Изучение высвобождения ферментативных систем ЛФ проведено согласно Решению совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Изучение микробиологической чистоты проводили согласно методикам ГФ РФ, а также Фармакопеи ЕАЭС. Срок годности определяли согласно ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств». Статистическая обработка данных была проведена при помощи Microsoft Office в среде Windows 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационная работа основывалась на применении принципа QbD (с англ. Quality by design) «качество, запланированное при разработке», требующем использование методов планирования экспериментов (многофакторного анализа). Для выбора ЛФ, разработки состава ЛС и условий технологического процесса были использованы методы планирования экспериментов.

Эксперимент проводился в 6 этапов, включающих выбор направления экспериментальной работы, материалов и методов, с помощью которых проводилась разработка и контроль качества ЛС; разработку методик анализа, оценку технологических характеристик составов и количественного определения активных компонентов; обоснование выбора состава ЛС с помощью математических методов исследования; разработки технологии получения; исследования стабильности и определение сроков годности ЛС на основе критериев, которые были выбраны на предыдущих этапах, а также разработку проекта спецификации на ЛС. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Прогнозирование осуществлялось с использованием принципа QbD для выбора биофармацевтических и технологических аспектов, влияющих на качество разрабатываемого ЛС, которое основывалось на литературных данных и накопленных результатах экспериментальных исследований.

Для моделирования состава ЛФ необходимо было провести разработку носителя, отвечающего требованиям будущего ЛС. Для снижения влажности носителя, как ключевого фактора для автолиза ферментативных систем, был разработан способ получения твердых форм аскорбата хитозана с ММ 200 и 500 кДа в условиях сублимационной сушки с конечным содержанием влаги 0,30 и 0,50 % соответственно (Таблица 1). Результаты фракционного анализа порошков аскорбата хитозана представлены на рисунке 2.

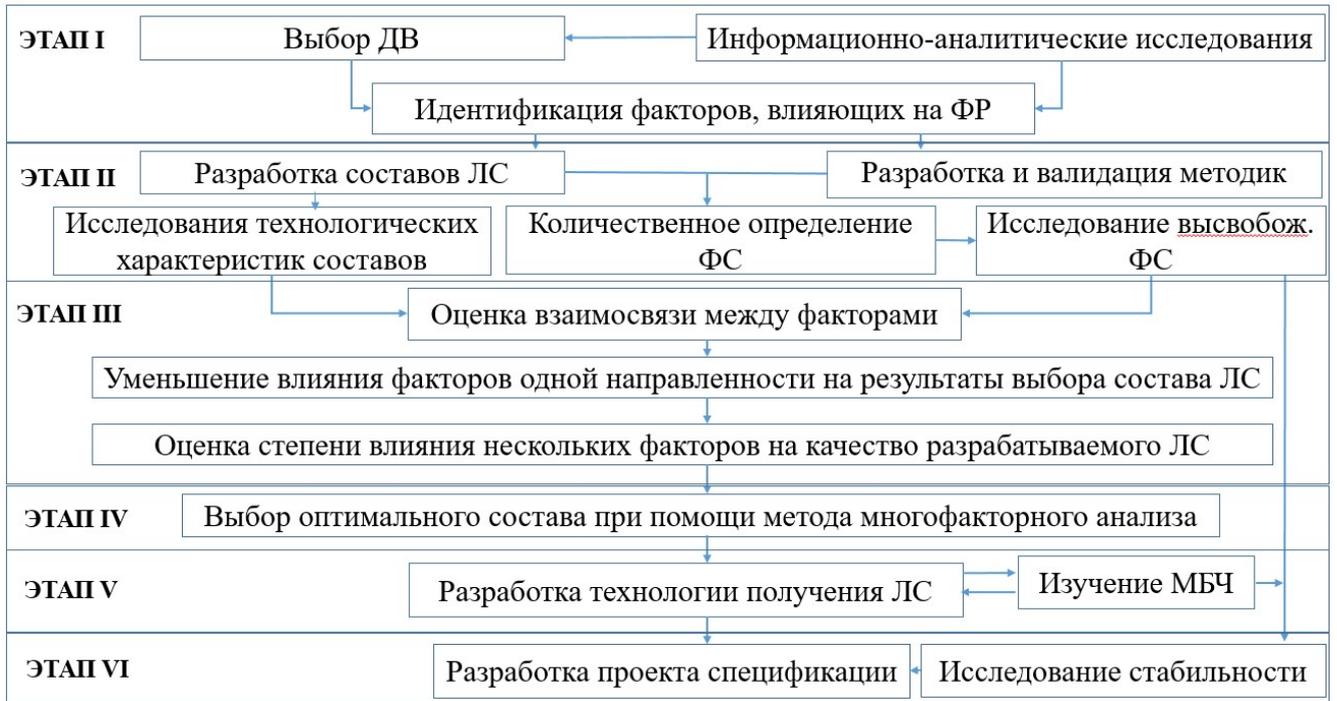


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Таблица 1 – Оценка влажности в зависимости от времени сублимационной сушки

Режим сублимационной сушки	№ раствора	Влажность, %
Режим 1 (12 ч)	5	3,10
	4	3,50
Режим 2 (24 ч)	5	1,30
	4	1,70
Режим 3 (48 ч)	5	0,30
	4	0,50
Режим 4 (72 ч)	5	0,25
	4	0,47

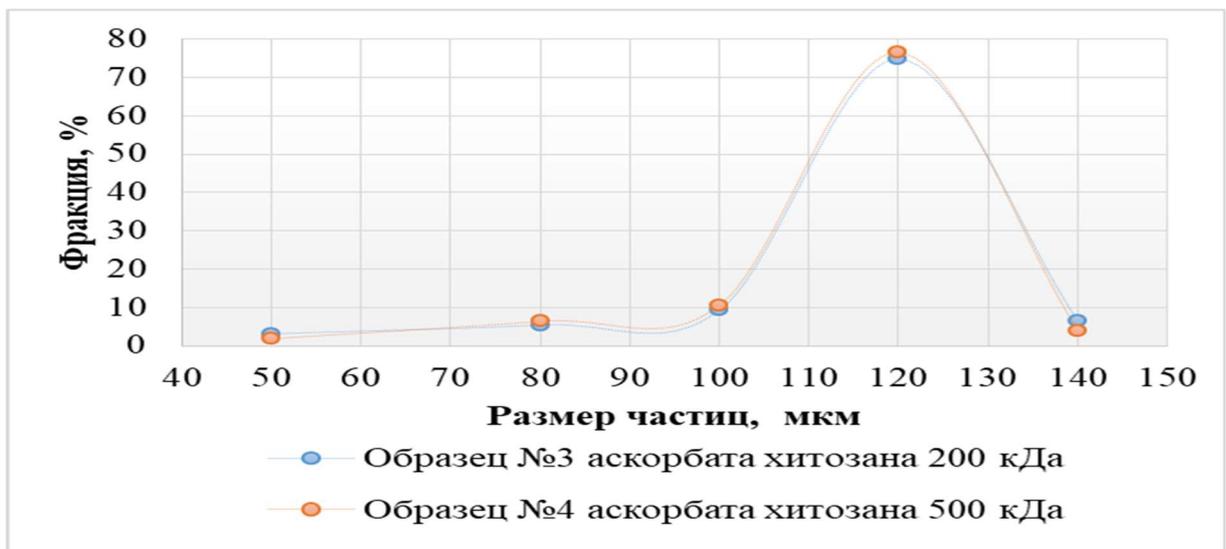


Рисунок 2 – Гистограмма фракционного анализа порошков аскорбата хитозана

Было установлено, что преобладающей фракцией носителя для осуществления разработки ЛФ является размер частиц 120-140 мкм. После осуществления фракционного анализа были разработаны 8 составов ЛС (Таблица 2), с которыми были проведены экспериментальные исследования по изучению насыпной плотности, сыпучести составов и высвобождения действующих веществ.

Таблица 2 – Разработанные составы лекарственных средств

№ состава	Химопсин, мг	Гиалуронидаза, мг	Аскорбат хитозана, мг (ММ, кДа)	Кремния диоксид, мг (%)
1	10,00	1,00	120,00 (200)	-
2	10,00	1,00	118,61 (200)	1,32 (1)
3	10,00	1,00	117,38 (200)	2,62 (2)
4	10,00	1,00	116,07 (200)	3,93 (3)
5	10,00	1,00	125,00 (500)	-
6	10,00	1,00	123,75 (500)	1,25 (1)
7	10,00	1,00	122,50 (500)	2,50 (2)
8	10,00	1,00	121,25 (500)	3,75 (3)

Определение насыпной плотности является одной из важнейших характеристик дозированных порошков, и характеризует прессуемость состава, что является важным фактором при хранении ЛС, так как порошок может слежаться, изменить насыпную плотность и снизить значения показателя однородности дозирования. Анализ полученных данных показал, что вариабельность результатов исследований насыпной плотности до механического воздействия на порошок не превышает 5 %, что существенно не влияет на точность дозирования (Рисунок 3).

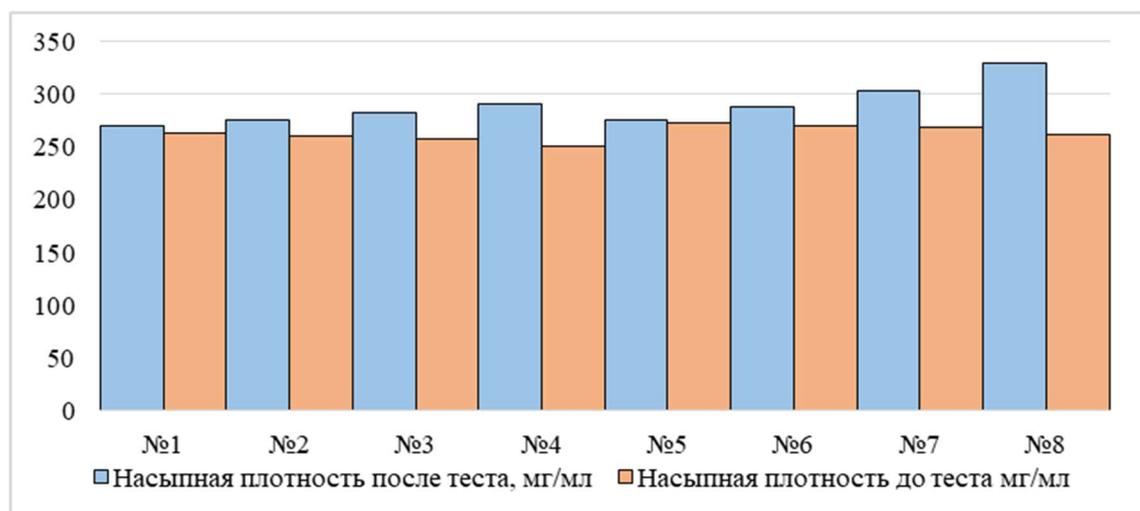


Рисунок 3 – Гистограмма результатов исследования насыпной плотности образцов составов лекарственного средства до и после проведения теста

Проведенные исследования по показателю «Скорость протекания через воронку» свидетельствовали о стабильных показателях сыпучести, различия которых не превышало 10 %, что соответствовало требованиям ГФ РФ. Анализ данных показал корреляцию данных для обоих

образцов аскорбата хитозана, демонстрируя самую лучшую сыпучесть у образцов, содержащих 2 % кремния диоксида (Составы 3 и 7). Однако при дальнейшем увеличении количества кремния диоксида наблюдалось снижение данного показателя (Таблица 3).

Таблица 3 – Результаты исследования сыпучести составов лекарственного средства

№ состава	\bar{v}_c	$k_{\bar{\alpha}}$	Степень сыпучести
1	1,56	44,19	Удовлетворительная
2	1,70	37,19	Удовлетворительная
3	1,81	34,12	Хорошая
4	1,76	37,86	Удовлетворительная
5	1,35	46,25	Удовлетворительная
6	1,60	37,61	Удовлетворительная
7	1,71	33,85	Хорошая
8	1,65	37,80	Удовлетворительная

Примечания: \bar{v}_c – среднее значение скорости протекания образцов ЛС через отверстие воронки; $k_{\bar{\alpha}}$ – среднее значение угла естественного откоса образцов ЛС

Исследования по показателю «Естественный угол откоса» продемонстрировали влияние кремния диоксида на ЛФ. Все порошки имели стабильные показатели сыпучести, различия которых не превышали 10 %, что отражало однородность смешивания составов. Анализ экспериментальных данных показал корреляцию факторов для обоих образцов аскорбата хитозана, демонстрирующих самую лучшую степень сыпучести с содержанием кремния диоксида 2 % (Составы 3 и 7).

Исследования поверхностной электризуемости составов ЛС были проведены из-за возможности пылить и неблагоприятных свойств компенсации и перераспределения зарядов у кремния диоксида. Данное физическое явление оказывает влияние на сыпучесть через отверстия потребительской упаковки. Поэтому было решено провести дополнительные исследования сыпучести через нестандартизированную воронку, чтобы оценить влияние присутствия кремния диоксида на состав ЛФ. Для образцов на основе аскорбата хитозана с ММ 500 кДа требовалось механическое воздействие для проведения исследования через воронки с диаметром отверстий 6 и 3 мм.

Одним из методов исследования высвобождения действующих веществ является тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР), позволяющий доказать эквивалентность высвобождения ЛС, следовательно, качество для разрабатываемых ЛФ. Исследование высвобождения проводилось для каждого состава ЛС и референтного лекарственного препарата (ЛП) в 12 повторностях. Для математической оценки эквивалентности высвобождения были рассчитаны факторы подобия для разработанных составов в сравнении с референтным ЛП. Эквивалентным считалось высвобождение ферментов, при котором значение фактора подобия составляло больше 50. При проведении дальнейшего исследования было решено разделить

анализ факторов подобия на две группы, соответствующие интервалам времени высвобождения до 45 мин, что соответствовало начальному промежутку времени и после 60 мин – фаза плато или конечный промежуток времени.

Исследование высвобождения протеолитического фермента проводили в среде субстрата со значением $pH=6,2\pm 0,2$, что соответствовало оптимуму проведения ферментативной реакции химопсина. Оценку высвободившегося протеолитического фермента устанавливали согласно разработанной и валидированной аналитической методике спектрофотометрического определения по значениям оптической плотности продуктов ферментативной реакции, после проведения реакции с реактивом Фолина. Результаты оценки высвобождения протеолитического фермента представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты оценки высвобождения протеолитического фермента

Образец №	f_2 (до 45 мин)	f_2 (после 60 мин)	Образец №	f_2 (до 45 мин)	f_2 (после 60 мин)
1	41,90	63,73	5	36,87	59,20
2	45,44	68,65	6	41,43	63,06
3	57,78	68,65	7	43,56	73,83
4	50,96	73,43	8	42,10	66,26

Из таблицы 4 видно, что значения факторов подобия составов **1** и **2**, которые рассчитаны для начального промежутка времени, показывают, что данные составы обладают близкими к эквивалентному высвобождению по отношению к референтному препарату. Значение факторов подобия для составов **3** и **4** показывают, что данные составы обладают эквивалентным высвобождением. Значения фактора подобия для всех составов на основе аскорбата хитозана с ММ 200 кДа, которые рассчитаны для конечного промежутка времени, демонстрируют, что составы обладают эквивалентным высвобождением в сравнении с референтным препаратом. Результаты представлены на рисунках 4 и 5 и в таблице 4.

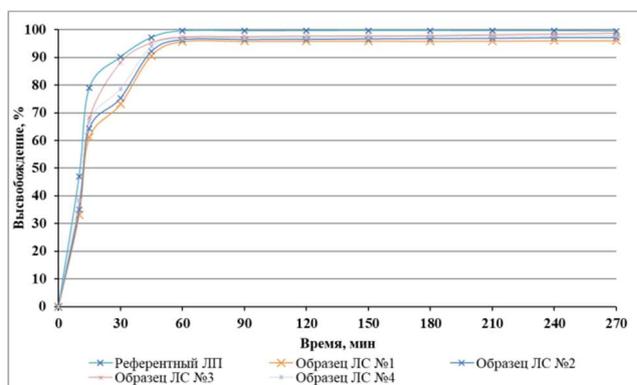


Рисунок 4 – Средние значения высвобождения протеолитического фермента для ЛС на основе аскорбата хитозана с ММ 200 кДа

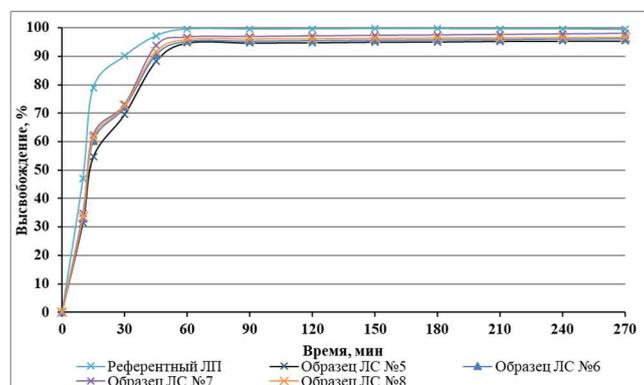


Рисунок 5 – Средние значения высвобождения протеолитического фермента для ЛС на основе аскорбата хитозана с ММ 500 кДа

Исследование высвобождения амилолитического фермента проводили в среде субстрата со значением $pH=7,2\pm 0,2$, что соответствовало оптимуму проведения ферментативной реакции гиалуронидазы, а также кислотности экссудативной жидкости раны. Результаты исследования высвобождения амилолитического фермента представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты оценки высвобождения амилолитического фермента

Образец №	f_2 (до 45 мин)	f_2 (после 60 мин)	Образец №	f_2 (до 45 мин)	f_2 (после 60 мин)
1	38,56	51,36	5	32,89	42,83
2	40,76	59,83	6	38,14	46,36
3	46,76	72,98	7	31,34	43,40
4	44,11	55,09	8	37,34	48,13

Из таблицы 5 видно, что значение факторов подобия для всех составов ЛС, которые рассчитаны для начального промежутка времени, показывают, что данные составы обладают неэквивалентным высвобождением в сравнении с референтным препаратом. Значение фактора подобия для составов 2, 3, 4, 7, которые рассчитаны для конечного момента времени, показывают, что данные составы ЛС обладают эквивалентным высвобождением. Результаты представлены на рисунках 6 и 7 и в таблице 5.

Исследования высвобождения протеолитического и амилолитического фермента из ЛС показывали, что состав ЛФ на основе аскорбата хитозана вызывал пролонгацию в высвобождении как протеолитического, так и амилолитического фермента. Полученные данные отражали зависимость между ММ модифицированного биоразлагаемого полимера и содержанием кремния диоксида в ЛФ.

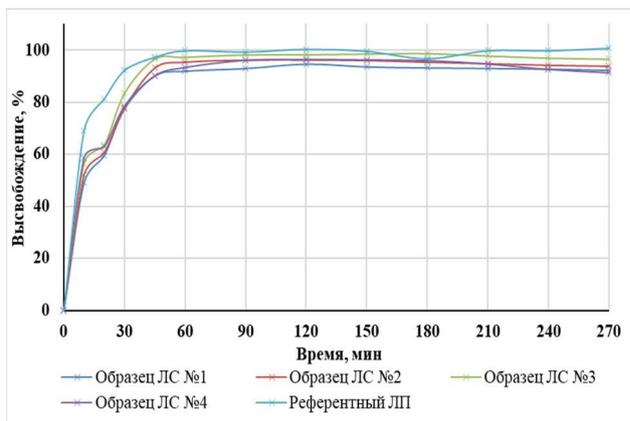


Рисунок 6 – Средние значения высвобождения амилолитического фермента для ЛС на основе аскорбата хитозана с ММ 200 кДа

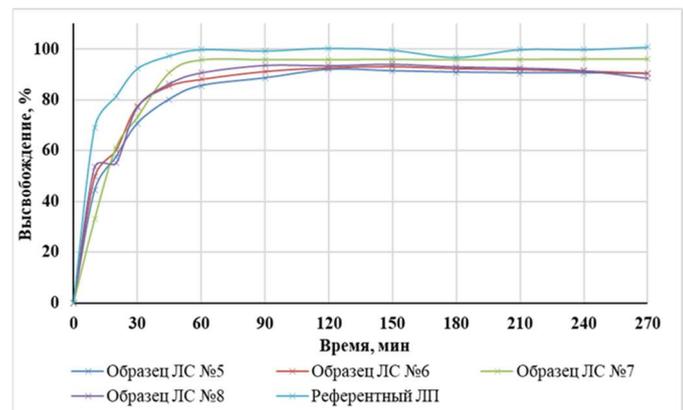


Рисунок 7 – Средние значения высвобождения амилолитического фермента для ЛС на основе аскорбата хитозана с ММ 500 кДа

Аналитические методики количественного определения были валидированы. Результаты валидации методик представлены в таблице 6, оценка характеристики линейности представлена на рисунках 8 и 9.

Таблица 6 – Результаты валидации аналитических методик

Характеристика	Критерий анализа	Допустимый предел	Методика протеолитической активности		Методика амилолитической активности	
Специфичность	Длина волны	760 ±1/594 ±1 нм	+		+	
Диапазон применения	Допустимый предел анализа	60-120 %	50-120 %		50-120 %	
Повторяемость	Допустимая неопределенность результатов	Не более 0,32	КО1	0,00198	КО1	0,00109
			КО3	0,00229	КО3	0,00131
			КО6	0,01627	КО6	0,00155
			МО	0,00189	МО	0,00310
Промежуточная прецизионность	Критерий Фишера	Не более 5,05	КО1	0,8756	КО1	0,5621
			КО3	0,9837	КО3	0,7899
			КО6	0,8553	КО6	0,6665
			МО	0,6178	МО	0,8047
Правильность	Допустимая неопределенность результатов	Не более 0,32	КО1	0,00266	КО1	0,00205
			КО3	0,00286	КО3	0,00170
			КО6	0,01627	КО6	0,00199
			МО	0,00244	МО	0,00351
Линейность	Коэффициент корреляции	Не менее 0,99	0,9983		0,9998	

Данные полученные в ходе проведения разработки состава ЛС, представляют собой большой набор количественных и качественных характеристик, и критериев приемлемости. Для оценки межфакторной взаимосвязи характеристик были использованы два критерия: дисперсионный анализ при помощи метода ANOVA (с англ. Analysis of Variance) для определения взаимосвязи характеристик и корреляционный анализ с определением веса каждого фактора.

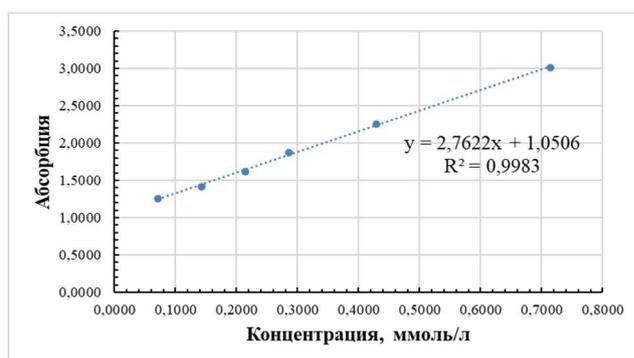


Рисунок 8 – Калибровочная кривая анализа протеолитической активности

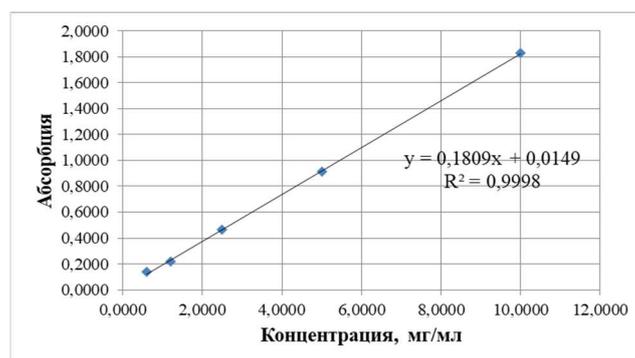


Рисунок 9 – Калибровочная кривая по комплексу йод-крахмал

Самым зависимым фактором, который выступал в качестве фактора сравнения, было выбрано высвобождение амилолитического фермента, так как его значение зависит не только от структурно-механических свойств состава, но и от высвобождения протеолитического фермента. После установления зависимости и веса факторов, для выбора наиболее оптимального состава

ЛС, была выбрана функция желательности Харингтона, как наиболее подходящая для визуализации оценки влияния нескольких факторов.

Наиболее важным при качественной оценке коэффициента корреляции является установление силы корреляционной взаимосвязи. Для этого использовалась шкала Чеддока, которая оценивает тесноту взаимосвязи между сравниваемыми факторами и показывает, насколько сильно изменится фактор сравнения при изменении фактора признака.

В начальный момент времени высокую взаимосвязь имели факторы: насыпная плотность, молекулярная масса полимера, а также фактор подобия протеолитической активности (Рисунок 10). В конечный момент времени высокую взаимосвязь имели факторы: сыпучесть, угол естественного откоса, фактор подобия (Рисунок 11).

Для уменьшения влияния одного типа фактора на дальнейший выбор, они были разделены на группы согласно физико-химическим, технологическим свойствам и факторам высвобождения. Так как на качество ЛС влияет высвобождение в начальных и конечных временных интервалах, они были рассмотрены по отдельности.

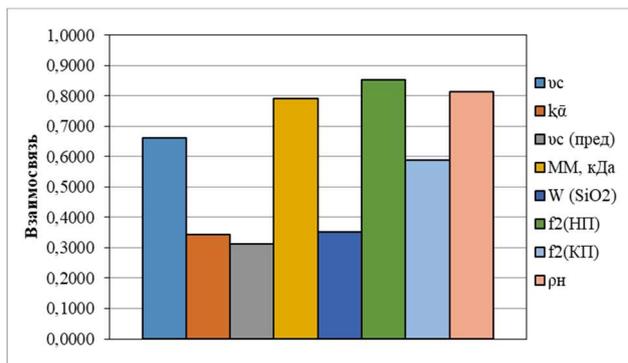


Рисунок 10 – Взаимосвязь в начальный момент времени

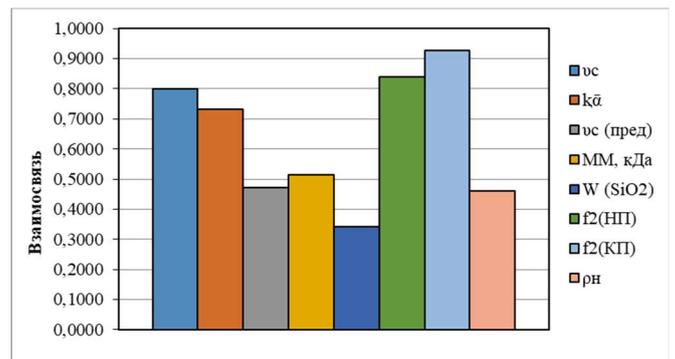


Рисунок 11 – Взаимосвязь факторов в конечный момент времени

Для построения диаграммы Исикавы факторы были разделены на 3 группы: технологические свойства ЛФ, влияние состава вспомогательных веществ и влияние высвобождения протеолитического фермента. При построении диаграммы не отражены данные высвобождения амилолитического фермента, так как этот фактор является фактором сравнения и находится в основном скелете диаграммы (Рисунок 12). Результаты выбора факторов, влияющих на качество ЛС, представлены в таблице 7.

Для оценки степени влияния нескольких факторов на разрабатываемое ЛС был проведен дисперсионный анализ, результаты которого были получены для факторов в конечный момент времени. Они показали отсутствие значимого различия дисперсий при проведении анализа, так как критерий значимости был меньше 0,05 при исследовании выборки, но в 10 раз больше, чем для начального момента времени. Фактический критерий Фишера был больше табличных

значений, что доказывало высокое сродство выбранных факторов с обеспечением качества лекарственного средства.

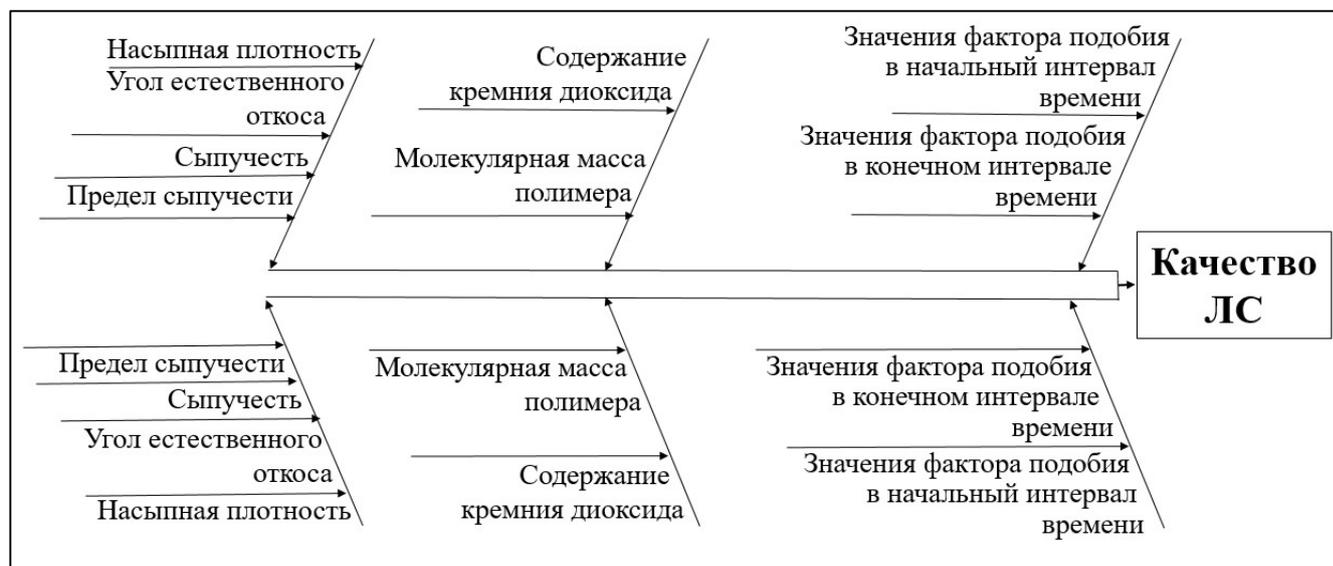


Рисунок 12 – Факторы, влияющие на качество разрабатываемого ЛС

После установления зависимости и веса факторов осуществлен выбор наиболее оптимального состава ЛС методом многофакторного анализа при помощи построения функции желательности Харрингтона (Рисунок 13).

Таблица 7 – Результаты выбора факторов, влияющих на качество лекарственного средства

Группа факторов	Фактор	Коэффициент корреляции
<i>Эффективность высвобождения амилолитического фермента в начальный интервал времени</i>		
Технологические свойства лекарственной формы	Насыпная плотность	- 0,8139
Влияние состава вспомогательных веществ	ММ полимера	- 0,7893
Влияние высвобождения протеолитического фермента	Фактор подобия в начальный момент времени	0,8536
<i>Эффективность высвобождения амилолитического фермента в конечный интервал времени</i>		
Технологические свойства лекарственной формы	Сыпучесть	0,8010
Влияние состава вспомогательных веществ	ММ полимера	- 0,5149
Влияние высвобождения протеолитического фермента	Фактор подобия в конечный момент времени	0,9281

Отклики функций для составов были получены в узком диапазоне значений, что свидетельствовало о правильном подходе к фармацевтической разработке. Все составы на основе аскорбата хитозана с ММ 500 кДа обладали более низким откликом в сравнении с аналогичными составами на основе аскорбата хитозана с ММ 200 кДа.

Наибольшим откликом при построении функции желательности Харрингтона обладал состав **3**, поэтому он был выбран в качестве ЛС для дальнейшей разработки технологии и проведения исследования на стабильность (Рисунок 13). Состав **4** в конечный момент времени (в

фазу пролонгации) обладал более низкими показателями, чем состав 3 и его значения функции отклика находились ближе к составу 2.

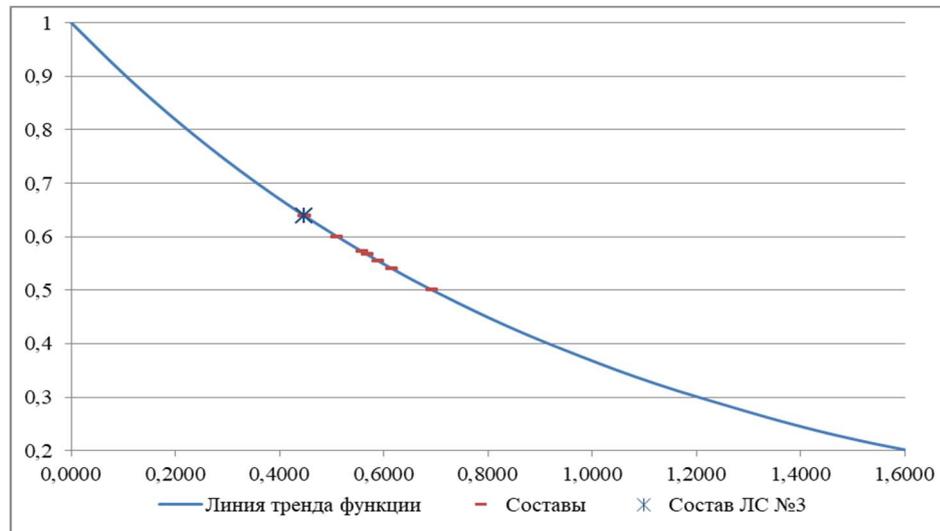


Рисунок 13 – Визуализация результатов функции желательности Харрингтона

Для выбора оптимального состава ЛС использование функции желательности Харрингтона оказалось недостаточным для визуализации результатов исследования. Поэтому было построено проектное поле «рабочего окна разработки», которое представлено на рисунке 14.

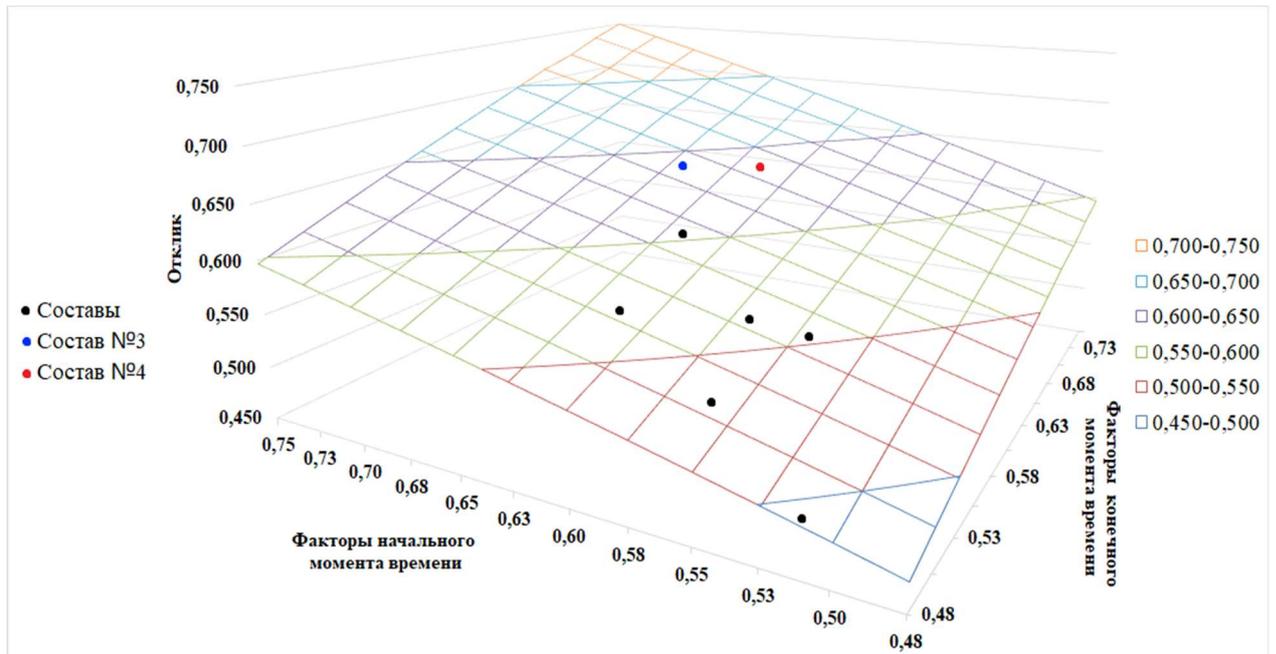


Рисунок 14 – Трехмерная визуализация проектного поля «рабочего окна разработки»

Для дальнейшего проведения исследований был подтвержден состав 3 с содержанием аскорбата хитозана с ММ 200 кДа и кремния диоксида 2 %.

Разработка технологии получения лекарственного средства

«Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Многофакторный подход выбора оптимального состава позволил разработать технологию получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» (Рисунок 15), а также идентифицировать факторы системы ЛФ и установить их взаимосвязь, влияющие на технологический процесс и работоспособность методики. Были установлены и проанализированы критические контрольные точки производства, включающие анализ химических, технологических и микробиологических характеристик в процессе получения.

Для осуществления трансфера методик и технологии был применен анализ рисков с помощью диаграммы Исикавы, позволивший выявить критические параметры. Среди критических параметров, оказывающих влияние на получение ЛФ, были определены: подготовка сырья и оборудования, получение раствора носителя (гелеобразование и фильтрование раствора), получение носителя в форме порошка (замораживание, сублимационная сушка, измельчение и фракционирование аскорбата хитозана), получение ЛС, фасовка и упаковка. Характеристика и состав ЛС представлен в таблице 8.

С помощью разработанных и валидированных методик оценки протеолитической и амилолитической активности, методик качественного определения аскорбиновой кислоты и хитозана, были установлены требования к качеству и разработан проект спецификации на ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» (таблица 9).

Исследование стабильности ЛС проводили согласно показателям, регламентированным проектом спецификации. На основании проведенных исследований стабильности при помощи метода долгосрочного испытания был установлен срок годности 2 года.

Таблица 8 – Состав лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Показатель качества	Результат исследования	
Описание	Мелкокристаллический порошок белого цвета со слегка желтоватым оттенком, со слабым характерным запахом	
Размер частиц	Размер частиц основной фракции: 120-140 мкм (75 %)	
Потеря массы при высушивании	Показатель «Влажность»: 0,30±0,1 %	
Насыпная плотность	Показатель «Насыпная плотность»: 0,26 г/мл ±1,50 %	
Состав на 1 грамм ЛС	<i>Компоненты</i>	<i>Содержание, мг</i>
	Гиалуронидаза	7,60 (100 МЕ)
	Химопсин	76,30 (6400 МЕ)
	Аскорбат хитозана	886,10
	Кремния диоксид	30,00

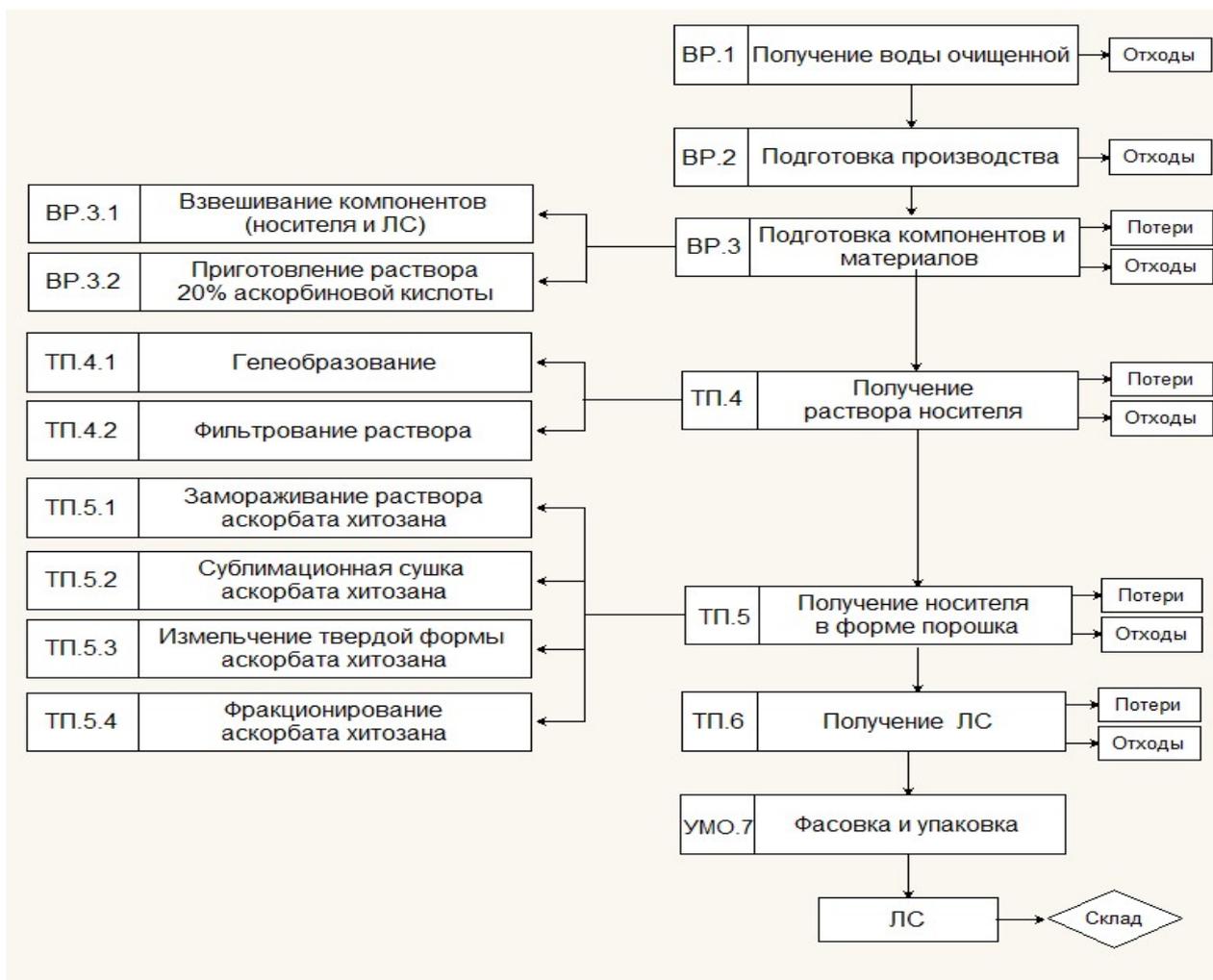


Рисунок 15 – Технологическая схема получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Таблица 9 – Проект спецификации на ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Показатель качества	Метод	Требования
Описание	Органолептический ОФС.1.1.0001.18	Мелкокристаллический порошок белого цвета со слегка желтоватым оттенком, со слабым характерным запахом
Подлинность	ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в УФ и видимой областях Органолептический ОФС.1.1.0001.18	ЛС должно давать положительный результат на качественное определение хитозана и аскорбиновой кислоты
Размер частиц	ОФС.1.1.0015.15 Ситовой анализ	При ситовом анализе размер частиц должен быть не более 160 мкм
Потеря массы при высушивании	ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании»	Показатель «Влажность» должен составлять $0,30 \pm 0,1$ %
Насыпная плотность	ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков»	Показатель «Насыпная плотность» должен составлять $0,26 \text{ г/мл} \pm 1,50$ %

Продолжение Таблицы 9

Однородность дозирования	ОФС.1.4.2.0008.18 Однородность дозирования	Результат удовлетворительный, если при $n = 10$ первый показатель приемлемости $AV \leq L1$). Масса содержимого одной упаковки $10,00 \pm 0,50$ г
Микробиологическая чистота	ОФС.1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность»	Категория 1
Количественное определение	ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в УФ и видимой областях	Активность ферментов должна составлять 95,00-105,00 %
Упаковка	Флакон из полиэтиленового пластика (ПЭ) с крышкой под присыпку и внешней крышкой с контролем первого вскрытия.	
Маркировка	На первичной упаковке на русском языке указывают торговое наименование лекарственного средства, группировочное название, наименование лекарственной формы, дозировку, предприятие - производитель, его товарный знак, номер серии, дату изготовления и срок годности.	
Хранение	В сухом, защищенном от света месте не выше 25 °С Хранить в недоступном для детей месте	
Срок годности	2 года	

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Анализ исследований в области разработок лекарственных средств на основе биоразлагаемых полимеров показал, что использование препаратов должно быть обусловлено сочетанием местного и резорбтивного действия при обеспечении высокой концентрации действующих веществ в месте непосредственного воздействия и безопасным. Использование хитозана в качестве носителя действующих веществ подтверждает интерес к данному полимеру, принимая во внимание его физико-химические свойства, возможность модификации и низкую токсичность.

2. Научно обоснован и экспериментально подтвержден выбор лекарственной формы – порошок для наружного применения. Установлены основные факторы, влияющие на фармацевтическую разработку ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»: сыпучесть, оценка высвобождения при помощи фактора подобия, молекулярная масса хитозана, насыпная плотность.

3. На основании многофакторного анализа осуществлен выбор оптимального состава, проведены физико-химические, фармацевтико-технологические и биофармацевтические исследования свойств лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения». При планировании эксперимента был использован последовательный

многофакторный анализ для установления зависимости между факторами и откликами для выбора оптимальной композиции. Была выбрана лекарственная форма в виде порошка для наружного применения, состоящего из гиалуронидазы и химопсина, и аскорбата хитозана в качестве биоразлагаемого полимера.

4. По результатам изучения фармацевтико-технологических характеристик предложена оптимальная технологическая схема получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения». Для установления причинно-следственных связей между факторами производственного процесса и результатом была построена диаграмма Исикавы. При разработке ОПР были учтены критические параметры производственного процесса при переносе технологии.

5. Были разработаны и валидированы аналитические методики подлинности и количественного определения протеолитической и амилолитической активности ферментов, входящих в состав лекарственного средства. Проведены исследования стабильности, и установлен срок годности. Разработан проект спецификации, включающий следующие показатели: описание; подлинность; размер частиц; потеря массы при высушивании; насыпная плотность; однородность дозирования; микробиологическая чистота; количественное определение.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Проведенные исследования позволили разработать технологию получения ЛФ – порошок для местного применения, содержащие в качестве действующего вещества ферментативные ФС и носителя биоразлагаемого компонента аскорбата хитозана, которая может быть масштабирована для промышленного производства с дальнейшей подачей документов на государственную регистрацию.

ПЕРСПЕКТИВОЙ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективой дальнейшей разработки темы является наработка образцов ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» для проведения клинического исследования терапевтической эффективности и безопасности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Каргин, В. С.** Хитозан и его возможности применения в медицинской и фармацевтической практике / **В. С. Каргин**, Н. В. Пятигорская, Г. Э. Бркич // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке : сборник тезисов II Международной научно-практической конференции, Москва, 14 ноября 2019 года. – Москва: Российский университет дружбы народов (РУДН), 2019. – С. 139-142.

2. **Каргин В.С.** Сравнительная характеристика нормативных требований к показателям качества субстанций хитозана / **Каргин В.С.**, Пятигорская Н.В., Бркич Г.Э. // Актуальные аспекты химической технологии биологически активных веществ: сб. научных трудов. Вып. 190 / под общ. ред. А. Е. Коваленко. М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2020. С. 163-164.

3. **Каргин В. С.** Различные свойства хитозана и возможности его использования в медицинской сфере / **В. С. Каргин**, Н. В. Пятигорская, Г. Э. Бркич // Высшая школа: научные исследования : Материалы Межвузовского научного конгресса, Москва, 24 января 2020 года. – Москва: Инфинити, 2020. – С. 72-78.

4. Пятигорская, Н. В. Виды модификации хитозана путем использования различных дериватирующих агентов / Н. В. Пятигорская, **В. С. Каргин**, Г. Э. Бркич // **Медико-фармацевтический журнал Пульс**. – 2021. – Т. 23. – № 4. – С. 23-30. – DOI 10.26787/nydha-2686-6838-2021-23-4-23-30.

5. **Каргин, В. С.** Применение различных растворимых форм хитозана для разработки состава лекарственных форм / **В. С. Каргин**, Г. Э. Бркич // Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием, Санкт-Петербург, 15 марта – 23 2021 года. – Санкт-Петербург: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2021. – С. 160-163.

6. Пятигорская, Н. В. Научно-обоснованный подход к выбору компонентов лекарственного средства для лечения ран различного генеза / Н. В. Пятигорская, **В. С. Каргин**, Г. Э. Бркич // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2021. – Т. 24. – № 8. – С. 34-41. – DOI 10.29296/25877313-2021-08-05.

7. Бркич Г.Э., Пятигорская Н.В., **Каргин В.С.**, Зырянов О.А. Разработка дизайна исследований по определению эффективности и безопасности инновационного лекарственного средства // **Медикофармацевтический журнал Пульс**. - 2022. - Т.24. №5. - С. 19-23. Doi: <http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-5-17-21>.

8. Science-based approach to the experimental development of a biodegradable chitosan based carrier / **V. Kargin**, N. Pyatigorskaya, G. Brkich, [et al.] // Georgian Medical News. – 2022. – No 324. – P. 164-169. [Scopus]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЕЭК	–	Евразийская экономическая комиссия
ЕАЭС	–	Евразийский экономический союз
ЛС	–	Лекарственное средство
ЛФ	–	Лекарственная форма
ANOVA	–	(с англ. Analysis Of Variance) Дисперсионный анализ
QbD	–	(с англ. Quality by Design) «Качество, запланированное при разработке»