

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*

*Бу Лугэнь*

Бу Лугэнь

**Разработка лекарственной формы противоопухолевого препарата на  
основе гликозидного производного индолокарбазола**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук, профессор

Краснюк Иван Иванович

Москва – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1.Современные противоопухолевые препараты.....	12
1.2. Производные индолокарбазола в лечении опухолей.....	21
1.2.1. Общая характеристика производных индолокарбазола.....	21
1.2.2. Противоопухолевая активность производных индолокарбазола.....	23
1.2.3. Производное индолокарбазола ЛХС-1269.....	25
1.3. Липосомальные противоопухолевые препараты.....	26
1.4. Приготовление липосом.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1. Материалы и реактивы.....	44
2.2. Оборудование.....	47
2.3. Методы исследований.....	48
2.3.1. Приготовление липосомальной дисперсии ЛХС-1269.....	48
2.3.2. Лиофилизация липосомальной дисперсии ЛХС-1269.....	49
2.3.3. Контроль качества и стандартизация ЛЛФ ЛХС-1269 и ее лиофилизата..	50
2.3.4. Статистическая обработка данных.....	55
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЛЛФ ЛХС-1269.....	56
3.1. План исследований по разработке ЛЛЛФ ЛХС-1269.....	56

3.2. Изучение растворимости исследуемой субстанции и выбор растворителей для применения в технологии получения ЛЛФ ЛХС-1269.....	57
3.3. Разработка состава ЛЛФ ЛХС-1269.....	59
3.4. Разработка технологии получения многослойных липосом ЛХС-1269.....	63
3.4.1. Особенности получения многослойных липосом ЛХС-1269.....	63
3.4.2. Сравнение методов получения однослойных липосом ЛХС-1269.....	65
3.5. Определение срока хранения липосомальной лекарственной формы ЛХС-1269.....	74
3.6. Стабилизация липосомальной лекарственной формы ЛХС-1269 посредством лиофилизации.....	76
3.6.1. Выбор криопротектора для получения лиофилизированной формы липосом ЛХС-1269.....	77
3.6.2. Выбор технологической стадии для введения криопротектора.....	80
3.6.3. Выбор объема наполнения флакона липосомальной дисперсией ЛХС-1269.....	81
3.7. Обобщение технологии получения ЛЛЛФ ЛХС-1269.....	82
3.8. Нарботка экспериментальных серий ЛЛФ ЛХС-1269 в лабораторных и опытно-промышленных условиях.....	85
3.8.1. Получение ЛЛФ ЛХС-1269 в лабораторных условиях.....	85
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЛЛФ ЛХС-1269.....	90
4.1. Разработка методики ТСХ-анализа ЛЛЛФ ЛХС-1269.....	90

4.1.1. Выбор подвижной фазы для хроматографического анализа ЛЛЛФ ЛХС-1269.....	90
4.1.2. Оценка пригодности хроматографических систем.....	92
4.2. Разработка и валидация методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1269 в ЛЛЛФ.....	97
4.2.1. Изучение спектральных характеристик ЛХС-1269 и вспомогательных веществ ЛЛЛФ.....	97
4.2.2. Количественное определение ЛХС-1269 в дисперсии и ЛЛЛФ.....	99
4.2.3. Валидация методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1269 в ЛЛЛФ.....	102
4.3. Стандартизация ЛЛЛФ ЛХС-1269.....	108
4.4. Исследование стабильности ЛЛЛФ ЛХС-1269 в процессе хранения.....	113
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	137
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	138

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Рак – вторая по значимости причина смертности во всем мире. Страны с низким и средним уровнем дохода являются очагом смертности от злокачественных новообразований – на их долю приходится примерно 70% смертей [126]. Рак возникает в результате измененной физиологии клетки, приводящей к самодостаточному потенциалу роста, потере контроля клеточного цикла, расширенному ангиогенезу, задержке репликативного старения, нерегулируемому апоптозу, инвазии и метастазированию [79, 123]. В настоящее время базовым методом лечения злокачественных опухолей является химиотерапия. Следовательно, создание новых противоопухолевых препаратов, действие которых направлено на избирательное разрушение опухолевой ткани, представляет актуальную задачу современной науки по всему миру. Традиционно открытие и разработка лекарственных препаратов от рака включает идентификацию и оптимизацию основных соединений с последующими доклиническими и клиническими исследованиями с целью всестороннего тестирования и характеристики их фармакологических свойств, противоопухолевых эффектов и токсичности [129]. В ходе клинических исследований производных индолокарбазола был определен перечень потенциальных показаний к их применению, в том числе и в сочетании с традиционными препаратами. Высокой противоопухолевой активностью, обусловленной способностью ингибировать фермент топоизомеразу I и/или II обладают соединения, в состав которых входят такие компоненты, как индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазольный хромофор с одной N-гликозидной связью, в частности, ребеккамицин и его аналоги [18].

В результате биологических исследований в рамках скрининга новых гликозидных производных индолокарбазола, синтезированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, для дальнейшего углубленного изучения отобрано соединение ЛХС-1269, которое показало высокую

противоопухолевую активность на моделях асцитных (Эрлиха, лимфолейкозе Р388) и солидных (меланоме В16, эпидермоидной карциноме легкого Льюис, аденокарциноме молочной железы Са755, раке шейки матки и раке толстого кишечника АКАТОЛ) опухолей. Отличительной особенностью механизма действия ЛХС-1269 является способность блокировать васкулогенную мимикрию, то есть оказывать антиангиогенное действие [3].

Исследуемая субстанция ЛХС-1269 практически нерастворима в воде и большинстве органических растворителей, что является существенной проблемой для разработки ее инъекционной лекарственной формы (ЛФ). В связи с этим для улучшения биологической и фармацевтической доступности данного ГПИ предложено использование современного технологического подхода – включение гидрофобной субстанции в липидные наночастицы – липосомы.

### **Степень разработанности темы исследования**

В лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработан метод синтеза гликозидов производных бисиндола и родственных им карбазолов [14]. При помощи данного метода был получен ряд гидрофобных производных индолокарбазола с различными углеводными остатками, два из которых – ЛХС-1208 и ЛХС-1269 показали наибольшую противоопухолевую активность и были отобраны для дальнейших исследований. В соответствии с планом научно-исследовательских работ по теме «Разработка лекарственных форм противоопухолевых препаратов с организацией лабораторного производства» (2014–2018 гг., Гос. рег. 012013713444) и в рамках Государственного контракта №13411.1008799.13.20 от 24.06.13 г. «Доклинические исследования инновационного лекарственного средства на основе производного индолокарбазола для лечения онкологических заболеваний» в лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проводились исследования по созданию инъекционной лиофилизированной ЛФ (ИЛФ-лио) ЛХС-1208 и ее доклиническому изучению (патент РФ №2572691 «Противоопухолевое средство»). В качестве солюбилизаторов гидрофобной субстанции ЛХС-1208 в

состав ИЛФ-лио включены такие вспомогательные вещества как органический растворитель диметилсульфоксид (ДМСО) и низкомолекулярный поливинилпирролидон Коллидон 17 PF [4, 19]. В качестве альтернативы ИЛФ-лио была разработана наноструктурированная лекарственная форма ЛХС-1208 на основе биосовместимой системы доставки лекарственного вещества (ЛВ) – липосом [6]. В настоящее время проводятся исследования по созданию рациональной ЛФ второго из указанных ГПИ – ЛХС-1269.

**Целью исследования** являлась разработка липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ) ЛХС-1269 для инъекционного введения.

#### **Задачи исследования**

- На основании технологических и химико-фармацевтических исследований установить оптимальный состав стерически стабилизированной инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269.
- Разработать технологию получения устойчивой при хранении ЛЛФ ЛХС-1269 для инъекционного введения.
- Разработать методики качественного и количественного анализа для контроля качества инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269.
- Выбрать показатели качества для стандартизации инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269 и изучить показатели ее стабильности в процессе хранения.
- Подготовить проект нормативной документации на разработанную ЛЛФ ЛХС-1269.

#### **Научная новизна работы**

В результате проведенных исследований впервые создана инъекционная ЛЛФ оригинального отечественного противоопухолевого препарата на основе ГПИ ЛХС-1269. Разработан оптимальный состав и способ получения инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269, которые имеют ряд особенностей, обусловленных наличием гидрофобных свойств у объекта исследования.

#### **Теоретическая значимость работы**

Теоретическая значимость данной диссертационной работы заключается в

обосновании выбора оптимального состава и способа получения стерически стабилизированной инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269, представляющего собой гидрофобное соединение. Доказано и экспериментально обосновано применение технологии лиофилизации для повышения стабильности при хранении ЛЛФ ЛХС-1269 для инъекционного введения. Приведенный в работе экспериментальный материал может служить теоретической базой для разработки ЛЛФ для инъекционного введения гидрофобных соединений.

### **Практическая значимость исследования**

В ходе реализации задач исследования создана лиофилизированная ЛЛФ (ЛЛЛФ) гидрофобного производного индолокарбазола ЛХС-1269, рекомендованная для дальнейших доклинических исследований. На основании выбранных показателей качества проведена стандартизация и составлен проект нормативной документации ЛФ «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг». Результаты диссертационного исследования внедрены в деятельность лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты исследований по разработке состава и технологии получения стабильной при хранении инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269.
2. Методики качественного и количественного анализа ЛЛФ ЛХС-1269 и ее лиофилизата.
3. Показатели качества для стандартизации ЛЛЛФ ЛХС-1269 и результаты изучения ее стабильности в процессе хранения.

### **Методология и методы исследования**

Методологическую основу диссертационной работы составили научные труды отечественных и зарубежных авторов в области фармацевтической технологии, в частности, в вопросах разработки липосомальных форм лекарственных средств. В процессе исследования использованы:

- фармакотехнологические методы: получение липосом, лиофилизация,



стерилизующая фильтрация;

- комплекс методов химико-фармацевтического анализа: лазерная спектроскопия рассеяния, определение электрофоретической подвижности частиц, потенциометрия, вискозиметрия, хроматография в тонком слое сорбента, спектроскопия в УФ и видимой области.

- математические методы анализа и обработки результатов экспериментальной работы.

### **Достоверность научных положений и выводов**

При проведении экспериментальных исследований использовано современное специализированное оборудование, имеющее действительные свидетельства о поверке. Посредством методов статистической обработки установлена точность и достоверность результатов проведенных исследований. Научные положения и выводы диссертационной работы, выносимые на защиту, логичны и обоснованы.

### **Апробация работы**

Результаты проведенных исследований представлены на научных мероприятиях международного и всероссийского уровня: на 4-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием МедХим-Россия 2019 (10–14 июня 2019 г., Екатеринбург, Россия), XXVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (6–9 апреля 2020 г., Москва, Россия); VII международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации», организованный советом по науке при Фонде Нурсултана Назарбаева и Южно-Казахстанской медицинской академией (10–11 декабря 2020 г., Шымкент, Казахстан). III Международном симпозиуме «Innovations in Life Sciences» (27–28 мая 2021 г., г. Белгород, Россия).

Апробация диссертационного исследования состоялась на кафедре фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский

Университет) 6 декабря 2021 г.

### **Личный вклад автора**

Вклад автора данного диссертационного исследования заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования и является определяющим. В частности, автором осуществлен выбор направления исследований, определены его цель и задачи с их последующей экспериментально-теоретической реализацией, вплоть до обсуждения их репрезентации в профильной научной литературе, а также внедрения в практику. Автору также принадлежит ведущая роль в реализации технологических и химико-фармацевтических экспериментальных исследований по разработке состава, технологии получения и методик анализа для контроля качества, аналитической и статистической обработке полученных результатов.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты исследований по разработке технологии получения и методик анализа ЛЛФ ЛХС-1269 успешно внедрены в работу лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Акты внедрения – Приложение Б ).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенных исследований соответствуют пунктам 3 и 4 паспорта специальности.

### **Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки**

Данное диссертационное исследование выполнено в соответствии с тематикой и планом научных исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), комплексная тема: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и

последипломного медицинского и фармацевтического образования». Номер государственной регистрации 01.2.011.68237.

### **Публикации**

По материалам данного исследования подготовлено и опубликовано 9 научных работ, в изданиях из Перечня Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки России - 2 статьи, в журналах, включенных в международную базу данных Scopus - 1 статья, в иных изданиях - 6 статей.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа представлена на 138 листах машинописного текста, содержащем 25 таблиц и 33 рисунков. Структура диссертации включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, две главы собственных экспериментальных исследований, общие выводы и список литературы, приложения. Список литературы состоит из 161 источника, в том числе 71 – на иностранных языках.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Современные противоопухолевые препараты

Согласно статистике ВОЗ за 2018 г., рак является основной причиной смерти людей, что сокращает продолжительность жизни и угрожает здоровью человека [37]. Методы противоопухолевого лечения включают хирургическое лечение, лучевую терапию, иммуно- и химиотерапию и т. д. Однако химиотерапия в настоящее время является основным методом лечения злокачественных опухолей. Сложность противоопухолевого лечения связана с низкой избирательностью действия и значительными побочными реакциями используемых препаратов. Поэтому особенно важно найти новые терапевтические мишени, эффективные противоопухолевые препараты и методы лечения. Основные источники для скрининга новых противоопухолевых препаратов включают использование активных ингредиентов натуральных продуктов, синтез новых химических веществ, применение биотерапевтических препаратов и новое использование старых лекарственных средств (ЛС) [145].

Основные типы химиотерапевтических препаратов включают алкилирующие агенты, противоопухолевые антибиотики и гормональные препараты, препараты платины, антиметаболиты, противоопухолевые препараты природного происхождения, молекулярно-направленные (таргетные) препараты, биоактивные пептиды [145].

#### 1. Алкилирующие агенты

Благодаря применению азотистого иприта гидрохлорида при лечении злокачественной лимфомы алкилирующие агенты стали наиболее важным и широко используемым классом химиотерапевтических препаратов. Азотные производные иприта по химическим свойствам являются высокоактивными соединениями и оказывают прямое токсическое действие на клетки независимо от фазы цикла, проявляя свою биологическую активность путем связывания с ДНК и необратимого сшивания ее цепей, в результате чего предотвращается

репликация ДНК, приводящая к гибели клеток по механизму апоптоза. Типичные ЛС алкилирующих агентов включают кармустин, азотистый гидрохлорид иприта, циклофосфамид, мелфалан и т.д. [99, 128].

## 2. Противоопухолевые антибиотики

Комбинированное применение нескольких противоопухолевых препаратов может повысить эффективность химиотерапии. В большинстве комбинированных химиотерапевтических процедур используются противоопухолевые антибиотики. Их можно разделить на классы антрациклинов, макролидов, гликопептидов, бензодипирролов и др. К противоопухолевым антибиотикам относятся митомицин, эпирубицин, адриамицин, блеомицин, доксорубицин и т. д. Среди них эпирубицин является одним из наиболее эффективных лекарств против остеосаркомы. Исследования показали, что эпирубицин может подавлять пролиферацию опухолевых клеток, регулируя уровень микро РНК-1301, тем самым повышая чувствительность к ЛС. Доксорубицин и митомицин чаще используются в составе комбинированной терапии для подавления пролиферации опухолевых клеток на молекулярном уровне [153, 155, 158].

## 3. Противоопухолевые гормональные препараты

При гормонозависимых злокачественных новообразованиях (таких как рак молочной железы, матки, предстательной железы) лечение обычно проводится адъювантной эндокринной терапией. Противоопухолевые гормональные препараты избирательно взаимодействуют с рецепторами конкретного гормона, блокируя его связывание с рецептором и тем самым подавляя рост опухоли. При этом данные препараты не оказывают ингибирующего действия на нормальные ткани. В настоящее время широко используемые в противоопухолевой терапии гормональные препараты в основном включают селективные модуляторы рецепторов эстрогена, аналоги гонадотропин-рилизинг-гормона, ингибиторы ароматазы, антиандрогенные препараты и др. [56]. К ним относятся тамоксифен,

дролоксифен, летрозол, аминоклутамин, лейпролид, гонарелин и др. В последние годы в связи с увеличением заболеваемости раком груди и другими заболеваниями, применение данных препаратов также значительно увеличилось.

#### 4. Препараты платины

Препараты платины широко используются в клинике для лечения различных злокачественных опухолей с 1979 г. На данный момент в мире применяют 3 препарата – цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин. Цисплатин был первым ЛС из группы, использованным в клинической практике, и признан препаратом первой линии для лечения рака яичников и яичек [109, 110]. Первоначально считалось, что карбоплатин (цис-диаммин-циклобутандикарбоксилато-платина (II)) обладает «сравнимой» терапевтической активностью с цисплатином, однако его действие связано со значительной миелотоксичностью (особенно тромбоцитопенией) и меньшей нефротоксичностью и неврологическими последствиями. Ключевым механизмом действия карбоплатина заключается в образовании перекрестных связей ДНК, которые прерывают функционирование клеточной ДНК и впоследствии индуцируют апоптоз [67]. В отличие от обычных противоопухолевых агентов, которые обладают иммунодепрессивным действием, оксалиплатин обладает способностью стимулировать иммунологические эффекты в ответ на представление молекулярных паттернов, связанных с повреждением, вызванных гибелью клеток. Однако влияние терапии оксалиплатином на системные иммунные реакции остается в значительной степени неизвестным [131].

#### 5. Антиметаболиты

Антиметаболиты – это класс противоопухолевых препаратов, которые действуют, вмешиваясь в основные биохимические процессы. К ним относятся ингибиторы тимидилатсинтазы, ДНК-полимеразы, дигидрофолатредуктазы, синтеза пуриновых нуклеотидов и др. Препараты-антиметаболиты включают 5-фторурацил, метотрексат, цитарабин, гемцитабин и пеметрексед и т. д. Среди

них 5-фторурацил и его пролекарство капецитабин широко используются для лечения различных солидных злокачественных опухолей – колоректальный рак, рак груди и головы и шеи [55, 59, 86, 119].

#### 6. Противоопухолевые препараты природного происхождения

В настоящее время широко применяемые в клинической практике противоопухолевые препараты природного происхождения включают алкалоиды, терпены, полифенолы, полисахариды и другие группы биологически активных веществ. Среди них алкалоидные противоопухолевые препараты, такие как камптотецин и винбластин, имеют большее клиническое применение. Камптотецин и его производные оказывают противоопухолевое действие, специфически ингибируя активность топоизомеразы I. Иринотекан представляет собой водорастворимое производное камптотецина с клинической активностью против колоректального рака и мелкоклеточного рака легких. Соединения винбластина обладают сильным противоопухолевым действием, обусловленным подавлением деления и пролиферации клеток, связываем тубулина за счет ингибирования полимеризации микротрубочек. Терпеноидные противоопухолевые препараты включают паклитаксел, артемизинин, элемене, кантаридин и др. Паклитаксел ингибирует синтез тубулина и затрудняет его деполимеризацию, тем самым подавляя деление опухолевых клеток; в клинике используется для лечения рака груди, яичников, легких и др. [117, 144].

Природные полифенолы по критерию их химического строения подразделяются на лигнаны, фенольные кислоты, флавоноиды, стильбены и др. Противоопухолевые свойства природных полифенолов были успешно документально подтверждены большим количеством научных исследований [82, 116,124]. Высокая противовоспалительная и антиоксидантная активность данных соединений, а также их способность к модуляции сигнальных путей и молекулярных мишеней весьма исчерпывающе объясняет противоопухолевую эффективность данных соединений. Данные молекулярные мишени и сигнальные пути имеют непосредственное отношение к таким свойствам, как

пролиферация, выживаемость, дифференцировка, миграция, ангиогенез, гормональная активность клеток и др. [83, 84]. Лигнаны содержатся в семенах льна, бобовых, зерновых, зерновых, фруктах, водорослях и некоторых овощах [91]. Растительный лигнин, дигликозид секоизоларицирезинола и его метаболиты показали многообещающие результаты в уменьшении злокачественных новообразований, в частности, гормоно-чувствительных, таких как опухоли груди, эндометрия и простаты [137].

Полисахарид – это своего рода природный высокомолекулярный полимер, который широко присутствует в растениях, микроорганизмах, водорослях и животных. Полисахариды различного происхождения могут оказывать противоопухолевое действие за счет ингибирования роста опухолевых клеток, индукции апоптоза, повышения иммунного ответа и др. На основе полисахаридов астрагала и женьшеня, лентинана, фукоидана разработаны препараты, которые уже представлены на фармацевтическом рынке [154, 157].

#### 7. Молекулярно-направленные (таргетные) препараты

Применение таргетных препаратов для подавления роста и пролиферации опухолевых клеток основано на различиях в молекулярной биологии между опухолевыми и нормальными клетками (включая гены, ферменты, передачу сигналов и другие различные характеристики). Попадая в организм человека, препараты данного типа могут избирательно и специфически связываться с мишенями и оказывать противоопухолевое действие, вызывая специфическую гибель раковых клеток без повреждения нормальных. Текущие сайты таргетной терапии опухолей в основном начинаются с семейства рецепторов тирозинкиназы (ErbB1, ErbB2, ErbB3 и ErbB4), антиангиогенеза и связанных внутри- и внеклеточных сигнальных путей. Типичные противоопухолевые препараты молекулярного таргетинга: эверолимус, иматиниб, ромидепсин, сунитиниб и др. [44, 73, 74].



## 8. Биоактивные пептиды

Пептиды представляют собой новый класс противоопухолевых агентов, которые могут специфически воздействовать на раковые клетки с более низкой токсичностью для нормальных тканей, что открывает новые возможности для профилактики и лечения рака. В природе биоактивные пептиды встречаются у животных, растений и микроорганизмов. Кроме того, пептиды можно получать путем искусственной модификации биологических материалов, например, протеолизом тканей и сыворотки животных и растений, или в результате химического синтеза и биологической инженерии. Существующие в природе биоактивные пептиды играют решающую роль в регулировании биологической активности, включая молекулярное распознавание, передачу сигналов, пролиферацию и дифференцировку клеток. Доказано, что пептиды обладают рядом преимуществ, включая благоприятные фармакокинетические профили и характер распределения в тканях, быстрое выведение из крови и здоровых тканей, низкую токсичность и иммуногенность, а также растворимость. Биоактивные пептиды могут оказывать противоопухолевое действие, главным образом, за счет подавления ангиогенеза опухоли; индукции апоптоза/некроза опухоли; ингибирования киназ. Благодаря исследованиям структур, функций и взаимодействий белков, участвующих в развитии рака, будет обнаружено и разработано большое количество многообещающих пептидов, которые могут специфически связываться с этими белками. В процессе лечения рака противоопухолевые пептиды сталкиваются с множеством терапевтических проблем, которыми не следует пренебрегать, включая плохую стабильность, низкую проницаемость мембран и восприимчивость к протеолитическому перевариванию. Для решения этих проблем были приняты 3 различных типа стратегии модификации пептидов, включая аминокислотную замену, структурное слияние функциональных пептидов и конъюгацию с химиотерапевтическими лекарствами, которые оказались эффективными в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Также при разработке пептидных препаратов могут быть использованы нанотехнологии, например, включение пептидов в

наноносители с замедленным высвобождением или нацеленные на ткани. С быстрым развитием протеомики, биоинформатики, пептидных библиотек и стратегий модификации биоактивные пептиды исследуются в качестве новых перспективных противоопухолевых препаратов [41, 132, 147].

Согласно приведенной выше классификации в таблице. 1 приведены примеры противоопухолевых препаратов различных классов. В заключение следует отметить, что разработка противоопухолевых ЛС направлена на решение 2-х основных задач: усиление нацеливания препаратов на опухолевые клетки, без повреждения нормальных, и уменьшение их токсичности, поскольку проявление побочных эффектов требует корректировки терапии или может привести к прекращению лечения, тем самым влияя на выживаемость пациентов [145].

Таблица 1 – Примеры противоопухолевых препаратов различных классов

Класс	Пример	Путь введения/ЛФ	Показания
Алкилирующие агенты	кармустин	1) инъекционный: лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 100 мг/флакон; 2) внутричерепной: имплантат, 7,7 мг	опухоли головного мозга, злокачественная лимфома и мелкоклеточный рак легкого
	мехлорэтами на гидрохлорид	1) местный: гель 0,016% м ехлорэтамина (эквивалент 0,02% мехлорэтами н HCl) в пробирках по 60 г; 2) инъекционный: лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 10 мг/флакон	злокачественная лимфома

Продолжение таблицы 1

Противоопухолевые антибиотики	митомицин	1) инъекционный: лиофилизат для приготовления раствора для внутрисосудистого и внутривенного введения; 5, 20 и 40 мг/флакон; 2) порошок для приготовления раствора для инъекций / инфузий или внутривенного применения, 40 мг/флакон	рак груди, легких, шейки матки, мочевого пузыря и органов желудочно-кишечного тракта
	эпирубицина гидрохлорид	1) эпирубицина гидрохлорид 2 мг / мл раствор для инъекций или инфузий, каждый флакон 5/10/25/50/100 мл содержит 10/20/50/100/200 мг гидрохлорида эпирубицина.	рак груди, яичников, желудка, толстой и прямой кишки, а также лейкемия, лимфома и множественная миелома
Противоопухолевые гормональные препараты	тамоксифен	1) пероральный: таблетки 20 мг; 2) пероральный: раствор 10 мг / 5 мл	рак груди
	диэтилstilьбестрол	1) инъекционный: раствор 0,2/0,5/1/5 мг/мл; 2) вагинальные, предназначенные для введения в вагину, суппозитории вагинал. 0,1/0,5 мг; 3) пероральный: таблетка 0,1/0,25/0,5/1/5 мг	рак груди
Препараты платины	цисплатин	1) инъекционный: лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 50 мг/флакон	рак яичек, яичников, шейки матки, груди, мочевого пузыря, головы и шеи, пищевода, легких, мезотелиома, опухоли головного мозга и нейробластома
	оксалиплатин	1) инъекционный: внутривенный 50 мг/10 мл (5 мг / мл)	колоректальный рак, рак яичников, желудка, неходжкинская лимфома

Продолжение таблицы 1

Антиметаболиты	цитарабин	1) инъекция:инъекционный 20 мг/мл; 2) порошок для приготовления раствора для внутривенного применения, 100/44 мг/флакон; 3) липосомная инъекция, инъекционная, 10 мг / мл	немелкоклеточный рак легкого, острый миелоидный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, злокачественная лимфома, рак легких, органов желудочно-кишечного тракта
	метотрексат	1) инъекция:инъекционный, 25 мг/10 мл; 2) пероральный: раствор, 20мг / 10ml; 3) растворенный:подкожная инъекция, 25 мг / 1 мл	острый лимфолейкоз, хориокарцинома и злокачественная родинка
Противоопухолевые препараты природного происхождения	паклитаксел	1) инъекция:инъекционный, 6 мг/мл	рак яичников, груди
	тенипозид	1) инъекция:инъекционный, 10 мг/мл	злокачественная лимфома, болезнь Ходжкина, острый лимфобластный лейкоз, внутричерепные злокачественные новообразования
	винбластин	1) инъекционный: лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 10 мг/флакон	злокачественная лимфома, хориокарцинома, опухоль яичка, рак легких, груди, яичников, моноцитарный лейкоз
	винкристин	1) липосомная инъекция, инъекционная, 5 мг/5 мл; 2) инъекционный : лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 5 мг/флакон	острый лимфолейкоз, острый миелоидный лейкоз, болезнь Ходжкина, нейробластома и мелкоклеточный рак легкого
Таргетные препараты	эрлотиниб	1) пероральный: таблетки 25, 100, 150 мг	немелкоклеточный рак легкого
	осимертиниб	1) пероральный: таблетки 40, 80 мг	немелкоклеточный рак легкого на поздней стадии

## 1.2. Производные индолокарбазола в лечении опухолей

### 1.2.1. Общая характеристика производных индолокарбазола

Исторически натуральные продукты играли ключевую роль в открытии новых лекарственных препаратов и вносили большой вклад в фармакотерапию различных заболеваний человека и животных, особенно злокачественных новообразований и инфекций. Среди множества соединений природного происхождения особый интерес представляют индолокарбазол и его производные [29, 66, 102, 103].

Первый выделенный индолокарбазол, получивший название стауроспорин, был получен в 1977 г. из культуры бактерий *Streptomyces staurosporeus*, обнаруженной в образце почвы из префектуры Иватэ в Японии [106, 140]. Ребеккамицин, родоначальник 2-го класса индолокарбазолов, был обнаружен в образце *Lechevalieria aerocolonigenes* в почве из Панамы. Соединения индолокарбазола также были выделены из штаммов *Actinomadura melliaura* из Бристольской бухты, Калифорния; *Streptomyces hygrosopicus* в префектуре Нумадзу, Япония; *Micromonospora sp.* L-31-CLO-002 с острова Фуэртевентура, Канарские острова, Испания; *Actinomadura sp.* 007 из залива Цзяочжоу в Китае и др.

Несмотря на открытие данных веществ, структура индолокарбазола была установлена лишь в 1994 г. [61, 105, 138]. По структуре скелета индолокарбазола выделяют 5 основных подклассов соединений: индоло[2,3-а]карбазол, индоло[2,3-б]карбазол, индоло[2,3-с]карбазол, индоло[3,2-а]карбазол, индоло[3,2-б]карбазол (рисунок. 1) [118]. Типичными представителями класса являются: производные ребеккамицина [39, 75, 101], стауроспорина [107], группа арциафлавина [130], типаназола [140] и АТ2433 [94] (рисунок. 2).

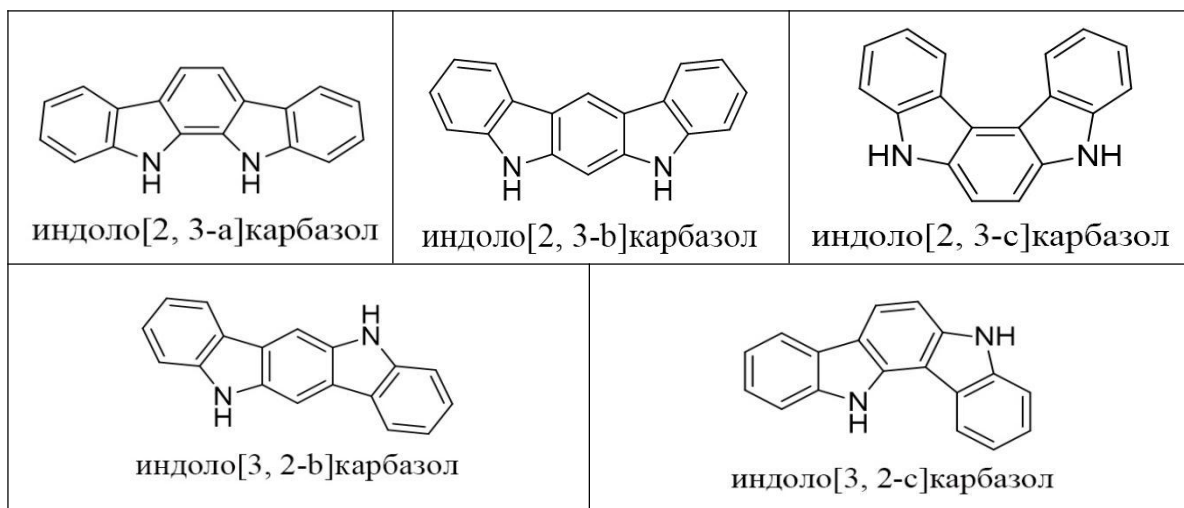


Рисунок 1 – Основные подклассы индолокарбазолов в зависимости от структуры

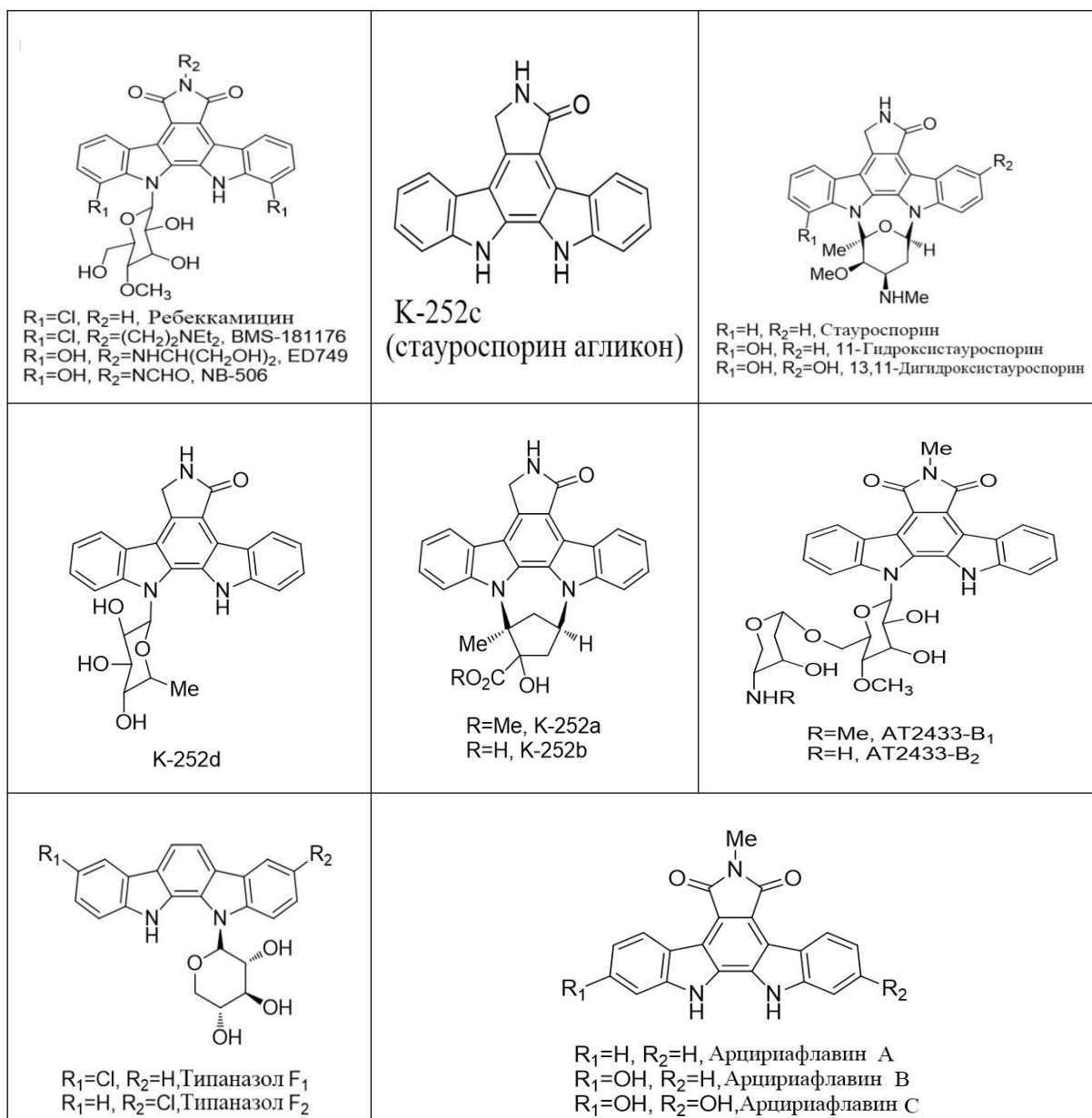


Рисунок 2 – Формулы типичных индолокарбазолов

На протяжении десятилетий производные индолокарбазола привлекали внимание научного сообщества благодаря их физиологической и фармакологической активности. Основные виды биологической активности индолокарбазолов:

1. Антигипертензивная [136].
2. Противогрибковая [98].
3. Противоопухолевая [36, 53, 98].
4. Антибактериальная [95].
5. Антитромбоцитарная [104].

### **1.2.2. Противоопухолевая активность производных индокарбазола**

Соединения индокарбазола представляют собой класс алкалоидов, экстрагируемых посредством микробной ферментации. Эти соединения, включая их производные, такие как стауроспорин, ED-110, NB-506, ребеккамицин, азаиндокарбазол, гликозиды индокарбазолов и бисиндолилмалеимиды, оказывают противоопухолевый эффект, воздействуя на многие мишени. В настоящее время известно, что индокарбазолы являются эффективными топоизомеразными ядами, а также ингибируют протеинкиназы путем конкурентного объединения специальных аминокислотных групп АТФ-кармана, что впоследствии вызывает остановку деления клеток в фазе G1 [44].

Антибиотик ребеккамицин представляет собой ингибитор топоизомеразы I. Он проявляет широкий спектр воздействия против лимфоцитарного лейкоза P-388, а также активен против клеток меланомы B-16. В силу того, что ребеккамицин плохо растворим, был синтезирован бекатекарин – его водорастворимое производное. В условиях монотерапии, а также в ходе комбинированной терапии, направленной на лечение мелкоклеточного и немелкоклеточного рака груди, легкого, тонкой кишки, нейробластомы, почки, яичников, лимфомы, лейкемии, колоректального рака бекатекарин успешно

прошел I–II этап клинических испытаний [120]. В середине 1980-х годов компания Kyowa Hakko Co. (Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd., Токио, Япония) показала, что стауроспорин и родственный ему индолокарбазол K252 являются мощными ингибиторами протеинкиназ [76, 134].

В результате изучения *in vitro* нового индолокарбазола ZW2-1 (4-(5,7-дигидроиндоло[2,3-*b*]карбазол-6-ил)фенол) на линии клеток лейкемии человека HL-60 и NB4 было показано, что исследуемое соединение подавляет рост популяции путем индукции как апоптоза, так и аутофагии. Согласно полученным данным, ZW2-1 может эффективно блокировать пролиферацию клеток HL-60 и NB4, но проявляет незначительное цитотоксическое действие на клетки HaCaT в той же концентрации [143].

ЕС-70124 представляет собой гибрид индолокарбазола, полученного в ходе комбинированного биосинтеза генов ребеккамицина и стауроспорин. В исследованиях *in vivo* он показал значительную противоопухолевую активность, способствующую лечению широкого спектра масштабных опухолей благодаря ингибированию в наномолярном диапазоне ключевых сигнальных узлов [50].

Аналоги индолокарбазолов РКС-412 и СЕР-701 были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в качестве орфанных препаратов для лечения острого миелоидного лейкоза с мутацией *Flt3-ITD* или без нее, соответственно [34, 62, 114, 115, 139].

Недавно сообщалось, что индолокарбазол-3-гидроксихолирин проявляет сильную цитотоксичность в отношении 2-х клеточных линий рака желудка AGS и MKN45. Это соединение сильно ингибировало активность топоизомеразы II $\alpha$ , приводя к повреждению ДНК и тем самым вызывая апоптотическую гибель клеток [47].

9 новых индолокарбазолов были выделены из морских *Streptomyces sp.* DT-A61. Установлено, что одно из соединений с молекулярной формулой



$C_{28}H_{24}N_4O_4$  проявляет значительную активность в отношении раковых клеток РС-3 предстательной железы человека со значением  $IC_{50}$  0,16 мкм [142].

Изученные производные N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов с углеводным остатком ксилозой, независимо от заместителя при малеимидном атоме азота, показали противоопухолевую активность на гормоночувствительных опухолевых моделях РШМ-5 (с высокой дифференцированностью и медленным ростом) и Са-755 (наиболее чувствительная из опухолевых моделей к химиотерапевтическим препаратам с разными механизмами действия) [7].

Благодаря разнообразию модификаций индолокарбазолов, появляется возможность выявления зависимости их противоопухолевых проявлений от структуры и агликона, и гликозидного остатка. Результаты исследования продемонстрировали, что модификации внутри структуры агликона приводят к изменениям противоопухолевых свойств индолокарбазолов. Сформулированные положения, касающиеся модификационных особенностей в структуре производных индолокарбазола, в перспективе могут быть применены для создания еще более активных соединений, обладающих высокой избирательностью действия [12].

### 1.2.3. Производное индолокарбазола ЛХС-1269

Оригинальный метод синтеза N-гликозидов производных индолокарбазола был разработан в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. С помощью данного метода стало возможно получение аналогов с различными углеводными остатками и/или модифицированным индолокарбазольным агликоном. Данные вещества, являясь производными малеимидаиндоло[2,3-а]карбазола, в котором один из индольных атомов азота связан гликозидной связью с остатками различных моносахаров, содержат различные заместители по имидному атому азота (общая формула представлена на рисунке 3) [15].

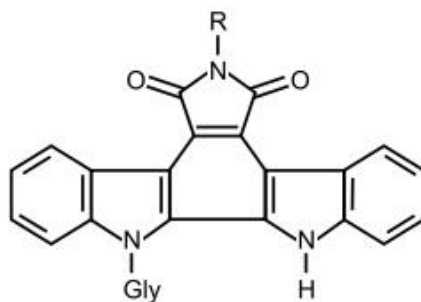


Рисунок 3 – Общая формула производных индолокарбазола, где Gly – остатки пентоз и гексоз, R – представляет аминогруппу, бензамидогруппу, (пирид-2-ил)аминогруппу, ацетамидогруппу или карбамидогруппу [15]

Соединение ЛХС-1269 выявило увеличение продолжительности жизни (УПЖ) опытных животных, а также эффект высокого торможения роста опухоли (ТРО), который сохранялся в течение длительного промежутка времени. По итогам практических исследований была выявлена высокая противоопухолевая активность соединения ЛХС-1269: на опухоли Эрлиха она достигала 337% УПЖ животных; на штамме лимфолейкоза Р388 – 93% УПЖ мышей. Кроме того, на раке толстого кишечника АКАТОЛ был обнаружен непосредственный эффект 90% ТРО, сохраняемый до 26-го дня на уровне 62% в условиях наблюдения после завершения лечения. На раке шейки матки РШМ-5 для субстанции был продемонстрирован непосредственный эффект 80% ТРО, сохраняемый на уровне 50% до 15-го дня наблюдения [4, 22].

### 1.3. Липосомальные противоопухолевые препараты

В настоящее время липосомы – одни из наиболее исследованных наночастиц. Липосомы считаются наиболее успешной из известных на сегодняшний день систем-носителей благодаря своим уникальным свойствам: их морфология сходна со структурой клеточных мембран, они биосовместимы и биodeградируемы, обладают низкой токсичностью и иммуногенностью, способны включать в себя как гидрофобные, так и гидрофильные вещества [35].

Липосомы имеют широкий диапазон применений, в том числе используются для визуализации и диагностики патологических очагов в

организме, доставки вакцин и генного материала, терапии различных заболеваний в области онкологии, пульмонологии, дерматологии, неврологии, инфекционных болезней и др. [27, 80]. Среди них значительный прогресс достигнут в применении липосомальных препаратов при лечении злокачественных новообразований. Липосомальные наноносители обладают потенциалом повышения терапевтической эффективности противоопухолевых ЛВ за счет увеличения их накопления в опухолевой ткани и уменьшения неселективного распределения в нормальных тканях, что известно как эффект повышенной проницаемости и удержания [69, 156].

Для классификации липосом можно использовать множество различных подходов, при этом размер и структура являются наиболее широко используемыми параметрами для их типологизации [35]. В данном обзоре приводится классификация липосом по составу и функциям.

#### *Классические липосомы*

Классические липосомы состоят из натуральных фосфолипидов (которые могут быть нейтральными или отрицательно заряженными) и холестерина. Эти липосомы часто используются для таргетирования на ретикуло-эндотелиальную систему (РЭС), что существенно сокращает время циркуляции липосом. Примерами официальных препаратов на основе классических липосом являются Myocet® и Daunoxome®, в состав которых включены доксорубин и даунорубин, соответственно. Липосомальная форма винкристина, показавшая эффективность при лечении рецидивирующей неходжкинской лимфомы, основана на однослойных везикулах из сфингомиелина и холестерина [28, 58]. Препарат OSI-211™, исследуемый при раке яичника, представляет собой липосомальную форму водорастворимого ингибитора топоизомеразы I луртотекана, везикулы которого состоят из гидрогенизированного соевого фосфатидилхолина и холестерина. Клинические результаты показали, что включение OSI-211 в подкисленное водное ядро везикулы, помимо предоставления известных терапевтических преимуществ липосомального

носителя, также может способствовать сохранению закрытой формы лактонового кольца луртотекана (активная форма), что увеличивает стабильность активного соединения и, следовательно, повышает его противоопухолевую активность [51, 121]. Ароплатин представляет собой липосомальный препарат цис-бис-неодекааноато-транс-R,R-1,2-диаминоциклогексан платины (II), гидрофобного структурного аналога оксалиплатины, который состоит из многослойных везикул размером от 1 до 3 мкм в диаметре, полученных с использованием смеси липидов 1,2-димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) и 1,2-димиристоилфосфатидилглицерина (DMPG) с подкисленным солевым раствором. Было показано, что ароплатин эффективен при лечении солидных опухолей и В-клеточной лимфомы [87]. Цитарабин – это антиметаболическое противоопухолевое средство, используемое в клинике при остром лимфоидном, миелоидном и менингеальном лейкозе. Цитарабин инкапсулируется в водный компартмент сферической матрицы размером 20 мкм, состоящей из липидов, биохимически сходных с липидами клеточных мембран человека (фосфолипиды, триглицериды и холестерин), также называемых DeroFoam™ [92].

#### *Липосомы с длительной циркуляцией*

Другим более продвинутым направлением исследований в липосомологии в начале 1990-х годов было открытие липосом с длительной циркуляцией, которые не поглощаются клетками РЭС, благодаря чему могут накапливаться в опухолях. Липосомы проходят через высокопроницаемые микрососуды опухолей и остаются заблокированными в отделении интерстициальной жидкости из-за отсутствия функционального лимфатического дренажа. Это способствует преимущественному накоплению липосом в опухолях по сравнению с нормальными тканями. Этот процесс, известный как эффект усиленного удерживания проницаемости, также характерен для других макромолекулярных носителей. Интактные липосомы могут проникать через отверстия в эндотелии путем пассивного конвективного транспорта в

интерстиций: микроскопические исследования с использованием метки из коллоидного золота показали, что везикулы обнаруживаются в интерстициальных пространствах вне опухолевых клеток. Высвобождение препарата в опухолевые клетки будет происходить в основном в опухолевой интерстициальной жидкости, где накапливаются липосомы. Нацеливание липосомальных носителей на опухоль также в значительной степени зависит от их размера. Результаты экспериментов над мышами с привитыми опухолями и исследований с использованием радиоизотопных изображений показали, что значительное таргетирование на опухоль возможно при условии использования стабильных и небольших везикул. Также критическим параметром является размер везикул: чем меньше липосомы, тем дольше период их циркуляции в кровотоке. Преимущество использования небольших длительно циркулирующих стабильных липосом в терапии злокачественных новообразований также заключается в минимизации токсических эффектов, возникающих в результате проникновения липосом в здоровые ткани, такие как сердце или органы желудочно-кишечного тракта [30, 40, 49, 64, 70].

Для получения липосом с длительной циркуляцией применяют stealth-технологии, заключающейся в прикреплении к молекулам фосфолипида нитей полимера. Обычно в качестве полимера используется полиэтиленгликоль (ПЭГ), и этот процесс называется ПЭГилированием. Ковалентное связывание липосомы с ПЭГ защищает от иммунной системы реципиента, что приводит к снижению иммуногенности и антигенности. Также пэгилирование вызывает изменения физико-химических свойств носителя, включая изменения гидродинамического диаметра. Эта технология позволила создать очень успешный липосомальный продукт – препарата Doxil<sup>®</sup> для внутривенного введения для лечения распространенного рака яичников, множественной миеломы и ВИЧ-ассоциированной саркомы Капоши [38]. Структура липосом с длительной циркуляцией на примере везикул доксорубина показана на рисунке 4.

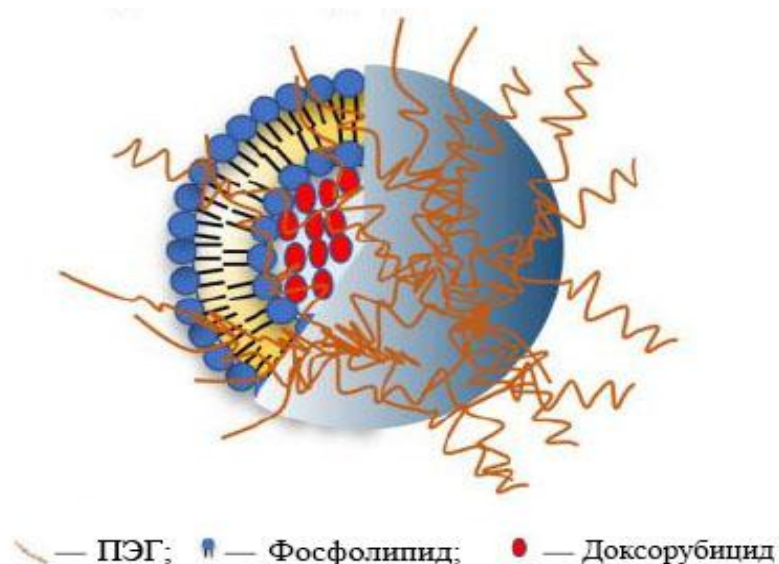


Рисунок 4 – Структура липосом доксорубицина с длительной циркуляцией

Daunoxome<sup>®</sup> в настоящее время является единственным липосомальным препаратом для инъекционного применения на основе классических липосом с небольшим диаметром – около 45 нм, практически не подверженных захвату мононуклеарными фагоцитами. Daunoxome<sup>®</sup> одобрен в США и Европе для лечения ВИЧ-ассоциированной саркомы Капоши. Ранние исследования также показывают, что даунорубицин в составе липосом защищен от связанной с Р-гликопротеином (PGP) множественной лекарственной устойчивости и может быть использован при лечении PGP-положительного острого лейкоза [25, 97].

#### *Липосомы для активного нацеливания (иммунолипосомы)*

Пассивное нацеливание (опосредованное эффектом повышенной проницаемости и удержания) требует длительной циркуляции фармацевтического носителя в кровотоке и его накопления в патологических участках, кроме того оно не обеспечивает достаточной интернализации липосом клеткой-мишенью. Поэтому для преодоления этих ограничений поверхность липосом модифицируют путем прикрепления специфического лиганда, обладающего аффинностью к конкретным рецепторам опухолевой клетки (рисунок 5). Применение данного подхода позволяет улучшить свойства липосомального носителя, такие как способность к таргетированию, увеличенная

селективность и клеточная интернализация, длительная продолжительность действия, минимизация побочных эффектов и повышение терапевтического индекса. Объединение концепции пассивного и активного нацеливания липосом показало многообещающие результаты с точки зрения снижения системной токсичности, увеличения клеточного поглощения, селективного нацеливания лекарств и контролируемого высвобождения ЛВ [32, 113, 127, 146, 150].

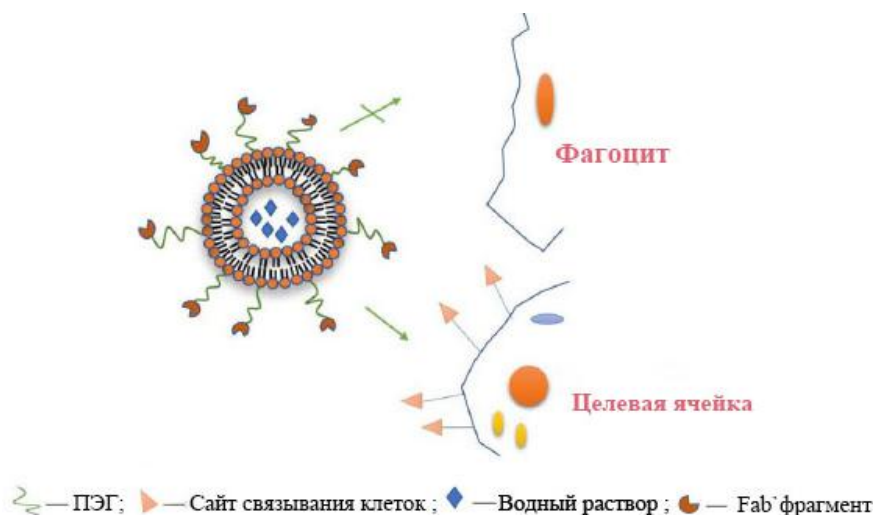


Рисунок 5–Структура иммунолипосом

Hirai M. et al. создали новый подход к противоопухолевой терапии посредством конъюгации цисплатин-нагруженной липосомы с углеводным фрагментом антигена Sialyl-Lewis<sup>X</sup> для селективного таргетирования опухолей и существенного снижения токсических побочных эффектов, вызванных применением высоких доз цисплатина [65]. Lv Q. et al. исследовали липосомы цисплатина, модифицированные трансферрином для активного нацеливания на глиому агрессивного типа первичного внутричерепного новообразования. Данная система доставки *in vitro* продемонстрировала потенциальную способность проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) путем клатрин-опосредованного эндоцитоза и селективность взаимодействия с клетками глиомы, а также более высокую цитотоксичность в отношении клеток-мишеней [88].

Паклитаксел показан в терапии немелкоклеточного рака легких, рака молочной железы, яичников, толстой кишки, головы и шеи [112]. Липосомальная

форма паклитаксела, нацеленная на рецептор фолиевой кислоты, показала высокую коллоидную стабильность и благоприятные фармакокинетические свойства [148]. В другом исследовании нагруженные паклитакселом анти-HER2-пэгелированные иммунолипосомы продемонстрировали эффективную и специфическую доставку ЛВ к злокачественным клеткам со сверхэкспрессией HER2, а также способствовали значительному увеличению поглощения лекарственного препарата за счет HER2-опосредованного эндоцитоза [150].

Tian W. et al. разработали новый тип функционализированных липосом эпирубицина, модифицированных двумя целевыми лигандами – тамоксифеном и трансферрином, для транспортировки ЛС через ГЭБ и последующего воздействия на клетки глиомы головного мозга *in vitro* и *in vivo* [135]. Также была получена липосомальная наноконструкция эпирубицина, модифицированная аминофенилглюкозой и циклическим пентапептидом для лечения глиобластомы головного мозга. Данный препарат продемонстрировал способность проникать через ГЭБ посредством транспортера глюкозы-1 и эффективность в уничтожении клеток глиобластомы и разрушении неоваскулярной сети опухоли *in vitro* и *in vivo* [159].

#### *Липосомы для ингаляционного введения*

Установлено, что липосомы, благодаря своей безопасности и способности обеспечивать контролируемое высвобождение препаратов в ткани-мишени, также могут применяться для доставки ЛВ в легкие [57]. Препарат Arikace® представляет собой липосомальную форму аминогликозидного антибиотика широкого спектра действия амикацина с пролонгированным высвобождением для ингаляции с целью его целенаправленной доставки в легочную ткань. В составе Arikace® амикацин инкапсулирован в липосомы, состоящие из природных липидов дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) и холестерина. Липосомный амикацин был одобрен FDA в сентябре 2018 года и получил статус орфанного препарата для лечения инфекций *Pseudomonas aeruginosa*, не связанных с муковисцидозом. При приеме Arikace® возможно усиление



респираторных побочных реакций, например, гиперчувствительного пневмонита, кровохарканья, бронхоспазма, и обострение основного легочного заболевания [33, 125]

### *Липосомы, реагирующие на раздражители*

Сосудистая проницаемость опухоли также значительно варьируется в зависимости от типа опухоли, что приводит к непредсказуемому проникновению липосом в опухолевую ткань [26]. Чтобы устранить эти недостатки, были использованы новые стратегии для разработки липосомальных систем, которые остаются стабильными в кровотоке, но активируются в ответ на внутренние или внешние раздражители и высвобождают свою полезную нагрузку в целевом участке [52].

#### ✧ Термочувствительные липосомы

Издавна легкая гипертермия, под которой понимается повышение температуры тканей до 43 °С, применяется вместе с химиотерапией и лучевой терапией с целью повышения эффективности лечения рака [46]. В сочетании с термочувствительными липосомами (ТЧЛ) гипертермия может повысить терапевтическую эффективность препаратов за счет: 1) увеличения проницаемости сосудов опухоли и, таким образом, накопления в ней липосом; 2) стимулирования высвобождения ЛС из ТЧЛ в сосудистую сеть опухоли и интерстиций; 3) увеличения локального кровотока в зоне воздействия; 4) увеличения проницаемости клеток-мишеней для высвобождаемых ЛС и 5) прямого цитотоксического воздействия на раковые клетки. Хотя раковые клетки по своей природе восприимчивы к тепловым воздействиям не более, чем нормальные клетки, в микросреде опухоли они подвергаются стрессу из-за низкого уровня кислорода, более высоких концентраций кислоты и недостаточного количества питательных веществ, и, таким образом, могут быть менее способны переносить дополнительный стресс тепла. Поскольку опухоли имеют неорганизованную и компактную сосудистую структуру, рассеивание

тепла в опухолевой ткани часто затруднено, что дает возможность избирательного воздействия тепла на раковые клетки. ТЧЛ разделяются на 3 типа: традиционные ТЧЛ, состоящие из липидов, которые претерпевают температурно-зависимые фазовые переходы; лизолипидсодержащие ТЧЛ и полимермодифицированные ТЧЛ [133].

Chelvi и Ralhan разработали ТЧЛ декарбамина на основе яичного фосфатидилхолина и холестерина с добавлением этанола 6%, которые в сочетании с гипертермией продемонстрировали высокую эффективность *in vivo* при фибросаркоме мышей [43]. Zhu et al. получены модифицированные лизином и содержащие однослойные углеродные нанотрубки ТЧЛ доксорубицина, которые по сравнению со свободным доксорубицином легко проникают через клеточные мембраны и обеспечивают более высокую противоопухолевую эффективность в отношении клеток линии карциномы печени человека (SMMC-7721) *in vitro*. Исследование показало, что ЛВ высвобождается быстрее при 42 °С, чем при 37 °С [160].

Сочетание метода высокоинтенсивного сфокусированного ультразвука под контролем магнитно-резонансной томографии (МРТ) с ТЧЛ обеспечивает локальную химиотерапию с одновременным количественным определением высвобождения ЛВ в опухоли. Данный способ мониторинга в реальном времени является перспективным инструментом контроля доставки ЛС для повышения их эффективности [96].

#### ✧ рН-чувствительные липосомы

Для специфического высвобождения ЛС могут быть использованы рН-чувствительные липосомы. Поскольку некоторые патологические участки имеют профили рН, отличные от нормальных тканей (например, опухоли часто немного более кислые, чем здоровые ткани, значения внеклеточного рН в среднем составляют 6,8–7,0, а некоторые – 5,7). Эти изменения рН могут вызвать изменения проницаемости липосомальной мембраны путем

протонирования/депротонирования функциональных групп, которые индуцируют морфологические изменения липидных бислоев [81]. Yatvin и др. обнаружили, что высвобождение ЛВ из рН-чувствительных липосом можно контролировать, используя изменение рН в сыворотке теленка, лошади или человека при 37 °С. Такие липосомы были нацелены на первичные или метастатические опухоли из-за более низкого рН в опухолевых областях по сравнению с физиологическим рН и другими частями тела [151]. Vandekar et al. разработали рН-чувствительные липосомы с перестраиваемыми и обратимыми изолированными липидными доменами. В процессе циркуляции в крови везикулы маскируют функциональные лиганды и стабильно удерживают их содержимое. При проникновении в интерстиций опухоли липиды, меченые лигандами, открываются и отделяются внутри липидных доменов, инициируя нацеливание на опухолевые клетки с последующей интернализацией. В кислой среде эндосомы липосомы высвобождают инкапсулированное ЛВ через неплотные границы вокруг липидных доменов [31].

#### ✧ Магнито-чувствительные липосомы

Активное нацеливание противоопухолевых препаратов с использованием магниточувствительных носителей является перспективным подходом к лечению солидных опухолей. Результаты исследования магнитных липосом адриамицина, вводимых внутривенно, показали, что данные носители можно использовать для эффективной доставки противоопухолевого антибиотика к остеосаркоме, а также в легкое, куда обычно метастазирует опухоль. Введение магнитных липосом под действием магнитной силы с использованием имплантированного в солидную опухоль постоянного магнита (0,4 тесла) способствовало увеличению концентрации ЛВ в месте действия примерно в 4 раза, чем при использовании свободного адриамицина [78]. Yan и др. разработали ПЭГилированные магнитолипосомы на основе суперпарамагнитных наночастиц оксида железа ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) с биотинилированными моноклональными антителами, нацеленными на  $\alpha\text{v}\beta_3$ -интегрин, который является высокоселективным биомаркером ангиогенеза

опухоли. Результаты исследования данных липосом показали, что стратегия МРТ-визуализации  $\alpha v\beta 3$ -интегрина является эффективным средством для чувствительного обнаружения ангиогенеза опухоли и может обеспечить систему нацеленной доставки противоопухолевых препаратов [149].

#### ✧ Свето-чувствительные липосомы

Многообещающая разработка липосом, чувствительных к свету, может открыть новые перспективы для доставки ЛС. Это может быть достигнуто путем рационального конструирования и модификации липидных компонентов, светочувствительных молекул и других активных ингредиентов. Светочувствительные липосомы обеспечивают желаемый вариант контролируемого высвобождения полезной нагрузки в целевом участке. Поскольку цитотоксические препараты могут накапливаться только в зоне облучения светом, токсичность для здоровых тканей будет значительно снижена. Кроме того, пространственный и временной контроль источников света дает дополнительное преимущество для точной настройки высвобождения ЛВ [45]. В работе [152] представлены фото- и термочувствительные липосомы, содержащие цисплатин и фототермический агент индоцианиновый зеленый (ИДЗ). Эти липосомы селективно высвобождают противоопухолевый препарат посредством фототермической стимуляции, опосредованной ИДЗ при освещении ближним инфракрасным светом. Эта липосомальная система доставки продемонстрировала повышенную эффективность на моделях опухолей мышей по сравнению с химиотерапией или фототермической терапией.

Экспериментальная разработка липосом, запускаемых светом, идет быстрыми темпами. Тем не менее, существует много препятствий для клинической реализации, и некоторые факторы должны быть приняты во внимание при разработке триггерной липосомы [93].

Помимо упомянутых выше типов триггерных липосом также существуют фосфолипидные носители, чувствительные к ферментам, окислительно-

восстановительному потенциалу и т. д. [72].

#### 1.4. Приготовление липосом

Существует множество способов приготовления липосом. В процессе изготовления противоопухолевых препаратов комбинация и изменения могут быть выборочно произведены в соответствии с реальной ситуацией, что помогает уменьшить ограничение липосом как носителей ЛС [24].

Выбор подходящего метода зависит от нескольких факторов [35, 42, 63, 100, 141]:

- 1) физико-химической характеристики липосомальных компонентов и загружаемого ЛС;
- 2) токсичности и концентрации загружаемого вещества;
- 3) типа среды, в которой диспергированы липосомы;
- 4) дополнительных процессов при нанесении/доставке липосом;
- 5) размера и периода полураспада, требуемые для успешного применения;
- 6) стоимости, воспроизводимости и применимости в отношении крупномасштабного производства для клинических целей и вопросов, связанных с надлежащей производственной практикой.

Способы получения липосом включают метод тонкопленочного диспергирования, впрыска растворителя, испарения с обращенной фазой, двойной эмульсии, замораживания-оттаивания, сверхкритический метод, технологию микрожидкостной жидкости и др.

##### *Метод тонкопленочного диспергирования*

Метод тонкопленочного диспергирования в основном используется для приготовления многослойных или больших однослойных везикул и является

относительно простым и распространенным методом получения липосом. Данный метод заключается в растворении липидных компонентов (и гидрофобных ЛВ) в хлороформе или других органических растворителях, удалении растворителя с использованием роторного испарителя при пониженном давлении до формирования тонкой липидной пленки на поверхности круглодонной колбы. Затем пленку гидратируют буферным раствором, содержащим гидрофильное ЛВ, с образованием неоднородных по размеру МСЛ. Для получения ОСЛ используют методы ультразвуковой обработки, гомогенизации или экструзии дисперсии МСЛ [68].

#### *Метод впрыска (инъекции) растворителя*

Традиционные методы приготовления и уменьшения размера липосом остаются популярными, поскольку они просты в применении и не требуют сложного оборудования. Однако проблемы, связанные с увеличением масштабов промышленного производства липосомальных препаратов, способствовали усовершенствованию традиционных процессов и разработке новых способов получения липосом. Легко масштабируемым способом получения липосом является метод впрыскивания или инъекции растворителя. Обычно в качестве растворителя используется этанол или эфир. Сначала липид и жирорастворимый препарат смешиваются и растворяются в органическом растворителе, а затем полученный раствор вводится в большое количество водной фазы и органический растворитель удаляют путем интенсивного перемешивания. При введении этанола, он растворяется в воде, и разбавление этанола ниже критической концентрации способствует самоорганизации растворенных фосфолипидов в водной фазе и образованию малых однослойных липосом (МОЛ). В то же время, образование МОЛ при впрыскивании эфирного раствора фосфолипидов в воду происходит при испарении эфира [71, 111].

Maitani и др. представили модифицированный метод впрыска этанола, в котором водную фазу впрыскивают в липидную фазу (липид–этанол) при температуре около 70 °С и удаляют этанол на роторном испарителе. Разбавление

водой вызывает спонтанное образование мелких (50–200 нм) и однородных однослойных везикул из мицеллярной системы. При этом размер везикул можно регулировать соотношением этанола к воде [90]. В недавнем исследовании Shaker и др. использовали спиртовой раствор липидов, холестерина и поверхностно-активного вещества, который вводили в горячую воду ( $60 \pm 5$  °C) через иглу. Было обнаружено, что концентрации липидов и холестерина способствовало увеличению размера везикул, в то время как добавление поверхностно-активного вещества его снижало [122].

Метод впрыска эфира прост в эксплуатации, эфир летуч и легко удаляется. Растворимость мембранных липидов (фосфолипидов, холестерина и др.) в эфире выше, чем в этаноле, и подходит для приготовления липосом жирорастворимых ЛВ [54].

#### *Метод испарения с обращенной фазой*

При использовании метода испарения с обращенной фазой сначала липиды растворяют в органической фазе, затем добавляют полученный раствор в водную фазу, содержащую ЛВ, и обрабатывают ультразвуком до тех пор, пока смесь не образует в эмульсию вода/масло. Органический растворитель удаляют с использованием роторного испарителя с образованием липосом [111].

Методы испарения с обращенной фазой и впрыска растворителя обеспечивают гидратацию липидов непосредственно из органического растворителя и получение водной суспензии однослойных и многослойных липосом, соответственно. На использование этих методов влияет растворимость липидов в органическом растворителе и удаление последних из продуктов. Тем не менее, эти процедуры гарантируют более высокую эффективность инкапсуляции, чем тонкопленочная гидратация [35].

#### *Метод двойной эмульсии*

Сначала водная фаза, содержащая ЛВ, добавляется к большему количеству липидной фазы и эмульгируют с образованием эмульсии типа вода/масло. Затем

полученную эмульсию добавляют к большому количеству водной фазы, эмульгируют с получением комбинированной эмульсии типа вода/масло/вода. Органический растворитель удаляют испарением при пониженном давлении с получением липосом [111].

Ван и соавторы предложили новую схему, включающую сублимационную сушку двойной эмульсии вода<sub>1</sub> / масло / вода<sub>2</sub>, где вода<sub>1</sub> и вода<sub>2</sub> представляют собой водные фазы, а масло – органическую фазу с растворенным фосфолипидом. Полученные липосомы имели размер менее 200 нм, в то время как эффективность включения варьировала в зависимости от типа инкапсулированных ЛВ [111]. Также успешно разработана мультикомпарментная система на основе липидов для пероральной доставки вакцины путем оптимизации рецептуры двойной эмульсии вода/масло/вода. Во внутреннюю водную фазу включили ПЭГиленную липосому, полученную с использованием гидрогенизированного фосфатидилхолина, в качестве носителя для модельного белка, овальбумина, меченного FITC. Исследователи оптимизировали соотношение поверхностно-активных веществ Span/Tween и объемную долю воды, чтобы получить стабильную двойную эмульсионную систему [85].

### *Сверхкритический метод*

Сверхкритические жидкости (СКЖ) обладают свойствами как жидкостей, так и газов. Например, небольшое изменение давления или температуры приводит к большим изменениям плотности СКЖ и растворимости различных частиц в них [111].

В последнее время технология СКЖ диоксида углерода (СКЖ-СО<sub>2</sub>) стала основным методом приготовления липосом. Свойства растворителя СКЖ можно регулировать, изменяя экспериментальные условия – температуру и давление. В частности, СО<sub>2</sub> обладает значительным потенциалом в качестве экологически чистого альтернативного растворителя, который может заменить органические



растворители, поскольку имеет низкую критическую температуру (31 °С) и давление (7,38 МПа), а также нетоксичен, негорючий и недорогой. Метод также имеет значительное преимущество в том, что позволяет контролировать физико-химические свойства липосом, включая их размер и форму, и получать более стабильные при хранении липосомы [89].

Исследователи Castor и Chu предложили два метода, в которых фосфолипид, органический соразтворитель и СКЖ приводят в контакт с водной фазой. В первом способе сжатую смесь фосфолипида, СКЖ и органического соразтворителя вводят в водную фазу через сопло. Во втором методе водную фазу сначала смешивают со смесью фосфолипидов, СКЖ и соразтворителей, а затем декомпрессируют путем распыления через сопло. Размер полученных липосом составляет 0,2–4 мкм. Подобно методу декомпрессии, Otake et al. предложили метод сверхкритического испарения с обращенной фазой. Эти два метода различаются по скорости, с которой происходит декомпрессия смеси фосфолипидов, воды, СКЖ и органического соразтворителя. В то время как Castor и Chu предлагают быструю декомпрессию смеси путем распыления через сопло, Otake и его коллеги используют камеру переменного объема для постепенного снижения давления в системе. Эффективность инкапсуляции ЛС в липосомы, полученные с использованием технологии СКЖ, была выше, чем у традиционных методов приготовления липосом [111].

#### *Технологии микрофлюидики*

Микрогидродинамика включает течение жидкости в каналах с размерами поперечного сечения, обычно в диапазоне 5–500 мкм. Для производства липосом было разработано несколько основанных на микрофлюидике методов. К особенностям микрофлюидных систем, которые могут быть использованы в производстве липосом, относятся способность точно распределять нанолитровые объемы, управление положением границы раздела, осевое перемешивание с преобладанием диффузии и непрерывный режим работы при малых объемах [111].

Получение липосом с использованием метода микрогидродинамической фокусировки (МГФ) было впервые предложено Jahn и соавторами. МГФ – это наиболее широко изученный микрофлюидный метод, позволяющий получать монодисперсные популяции однослойных и многослойных липосом с точным контролем размера. В этом методе водный буфер протекает вдоль двух противоположных стенок прямоугольного канала, в то время как раствор фосфолипида в изопропиловом спирте течет между водными слоями вдоль оси канала. Встречная диффузия воды и изопропилового спирта приводит к участкам с низким содержанием спирта, где фосфолипиды самоорганизуются в бислои, которые в конечном итоге закрываются в липосомы [111].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 1

В настоящее время химиотерапия представляет один из основных методов лечения злокачественных опухолей. Среди ряда химиотерапевтических препаратов особый интерес представляют производные индолокарбазола. Их противоопухолевая активность может быть вызвана различными механизмами действия, включая интеркаляцию ДНК, ингибирование ДНК-топоизомераз и протеинкиназ. Большая часть этих соединений характеризуется наличием индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с] карбазолового ядра с присоединенным сахаром. Соединение ЛХС-1269 было синтезировано в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и на сегодняшний день один из наиболее перспективных представителей класса производных индолокарбазола, обладая значительным ингибирующим эффектом на рост опухоли в исследованиях *in vivo*.

Липосомы вследствие их универсальной применимости представляют собой привлекательные системы доставки ЛВ. Возможные для композиций наполнителей и химических модификаций, липосомы применяются для доставки различных типов ЛС и безопасно вводятся различными путями. Начиная с момента открытия липосом и благодаря разработке новых липидных компонентов и процедур приготовления, технология их производства претерпела значительные изменения. Сегодня на рынке существует множество терапевтических препаратов на основе липосом, одобренных FDA, новые препараты находятся в стадии активной разработки. Тем не менее, можно сказать, что клинические потребности в терапии на основе липосом полностью еще не удовлетворены.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы и реактивы

При проведении технологических и химико-фармацевтических исследований ЛЛЛФ ЛХС-1269 использовали химические субстанции и реактивы, которые соответствовали требованиям нормативной документации (ГОСТы, ТУ, фармакопейные статьи ГФ XIV издания, Ph Eur 10.0, USP33-NF28).

#### *Действующее вещество:*

ЛХС-1269 – аморфный порошок оранжевого цвета без запаха (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)

#### *Компоненты липосомальной мембраны:*

- ✧ Яичный фосфатидилхолин (ФХ) E PC S (Lipoid, Германия) – порошок белого цвета с желтоватым оттенком; растворим в хлороформе, метаноле, этаноле, толуоле, эфире; не растворим в воде и ацетоне. Молярная масса (M) = 761 г/моль. На рисунке 6 представлена структурная формула ФХ.

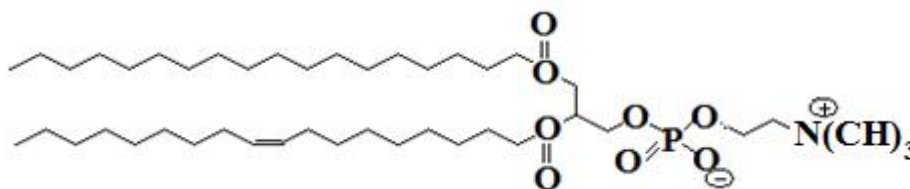


Рисунок 6 – Структурная формула ФХ

- ✧ Холестерин,  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, Япония) – кристаллический порошок от белого до бледно-желтого цвета без запаха или со слабым запахом, чувствителен к действию света. Легко растворим в хлороформе и диэтиловом эфире, растворим в 1,4-диоксане, умеренно растворим в ацетоне и этаноле, практически не растворим в воде и метаноле. M = 386,7 г/моль. Структурная формула холестерина представлена на рисунке 7.

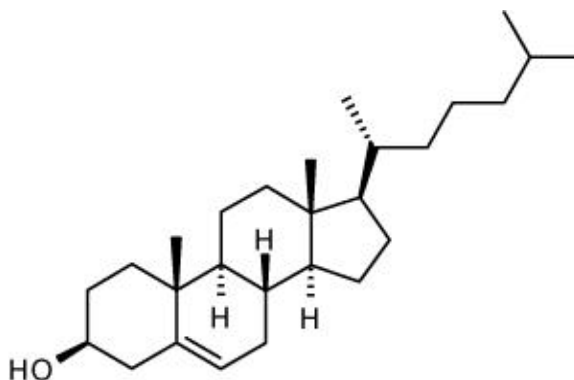


Рисунок 7 – Структурная формула холестерина

- ✧ Полиэтиленгликоль-2000-дистеароил-фосфатидилэтаноламина (ПЭГ-ДФФА, Lipoid, Германия) – порошок белого цвета, растворим в хлороформе, толуоле, метаноле и этаноле, не растворим в воде и ацетоне.  $M = 2787,49$  г/моль. Структурная формула ПЭГ-ДФФА показана на рисунке 8.

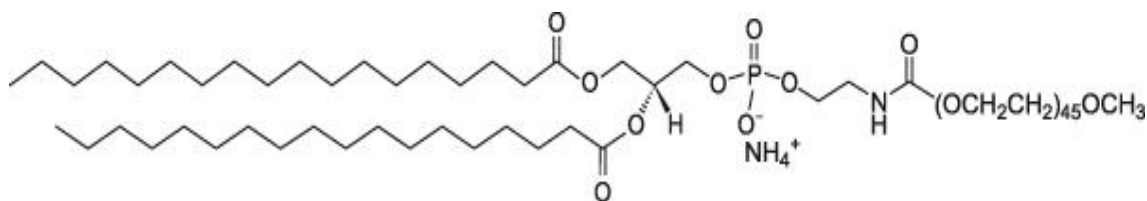


Рисунок 8 – Структурная формула ПЭГ-ДФФА

### ***Криопротекторы:***

- ✧ сахароза, ГОСТ 5833-75 (Химмед, Россия);
- ✧ манноза-D(+), 99% (Kaden, Германия);
- ✧ трегалозы дигидрат ОСЧ (Химмед, Россия).

### ***Растворители:***

- ✧ аммиак водный 25 % ОСЧ, ГОСТ 24147-80 (Химмед, Россия);
- ✧ ацетон ЧДА, ГОСТ 2603-79 изм. 1, 2 (Химмед, Россия);
- ✧ вода очищенная, ФС.2.2.0019.18;
- ✧ вода для инъекций, ФС.2.2.0019.18;
- ✧ н-бутанол ЧДА, ГОСТ 6006-78 (ЗАО ЭКОС-1, Россия);

- ✧ ледяная уксусная кислота ХЧ, ГОСТ 61–75, изм. 1–3 (ЗАО «Мосреактив», Россия);
- ✧ метанол ХЧ, ГОСТ 6995-77 (Химмед, Россия);
- ✧ гексан «ХЧ», ТУ 2631-006-29483781-2008 (Химмед, Россия);
- ✧ пропанол-2 (изопропиловый спирт) ОСЧ, ТУ-6-09-07-1718-91 (Химмед, Россия);
- ✧ спирт этиловый 95 %, ФС.2.1.0036.15 (ОАО «Флора Кавказа», Россия);
- ✧ хлороформ (трихлорметан) стабилизированный ХЧ, ТУ 2631-001-29483781-04 изм. 1,2 (Химмед, Россия);
- ✧ этилацетат (этиловый эфир уксусной кислоты) ХЧ, ГОСТ 22300-76 (Химмед, Россия).

***Иные реактивы:***

- ✧ йод кристаллический Ч, ГОСТ 4159-79 (Химмед, Россия);
- ✧ кислота серная «ОСЧ 11-5», ГОСТ 14262-78 (ООО «Сигма Тек», Россия);

***1) для фильтрации и экструзии:***

- ✧ нейлоновые фильтры «Pall» N66 диаметром 25, 47 и 90 мм с размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (ООО Палл Евразия, Россия);
- ✧ фильтры из полиэфирсульфона диаметром 25 мм с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd, Ireland);
- ✧ фильтры из сложных эфиров целлюлозы диаметром 25 мм с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd, Ireland);
- ✧ поливинилденфторидовые фильтры диаметром 25 мм с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd, Ирландия);
- ✧ поликарбонатные фильтры диаметром 25, 47 и 90 мм с размером пор 0,2 мкм (Whatman, Великобритания).

## 2) для проведения ТСХ:

- ❖ Пластинки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А. Тип сорбента – силикагель СТХ-1ВЭ. Зернение – 5–17 мкм. Толщина слоя – 90–120 мкм. Связующее вещество – силиказоль. Тип подложки – алюминий. Размер пластин – 10 × 15 см.
- ❖ Пластинки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А-УФ. Тип сорбента – силикагель СТХ-1ВЭ. Зернение – 5–17 мкм. Толщина слоя – 90–120 мкм. Связующее вещество – силиказоль. Индикатор УФ возбуждения — 254 нм. Тип подложки – алюминий. Размер пластин – 10 × 15 см.
- ❖ Стеклокамера с крышкой для ТСХ-анализа (Россия).

## 3) кюветы:

- ❖ кварцевые с крышкой для спектрофотометрии размером 10 × 10 мм (Россия).
- ❖ одноразовые культурные трубы боросиликатное стекло размером 6 × 50 мм (KIMBLE Glass Inc. США)
- ❖ Кюветы полистирол размером 10 × 10 × 45 мм (SARSTEDT, Германия)

## 2.2. Оборудование

- ❖ весы электронные DL-120 (A&DCo., LTD, Япония),
- ❖ весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия);
- ❖ испаритель роторный Heidolph Hei-VAP Advantage с отгонной колбой на 2 л (Heidolph, Германия);
- ❖ испаритель роторный Heidolph Laborota 20 control safety с отгонной колбой на 20 л (Heidolph, Германия);
- ❖ экструдер Lipex<sup>TM</sup> на 10, 100 и 800 мл (Northern Lipids, Канада);
- ❖ ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия);
- ❖ гомогенизатор Microfluidizer M-110S (Microfluidics, США);
- ❖ спектрофотометр Cary 100 (Agilent Technologies, Австралия);
- ❖ дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern, Великобритания);

- ✧ наносайзер Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США);
- ✧ вискозиметр Vibro Viscometer SV-10 (A&D Company Limited, Япония);
- ✧ облучатель хроматографический УФС 254/365 (Россия);
- ✧ вакуумно-сушильный шкаф (Binder VD 23, Германия);
- ✧ рН-метр HANNA HI 2211 (Hanna Instruments, Румыния);
- ✧ моечно-дезинфекционная машина Lancer 1400 UP DIN (Lancer, Франция);
- ✧ полуавтомат ПЗР-34-ВИПС-МЕД для укупорки флаконов колпачками К-3-34 (ООО «Фирма «ВИПС-МЕД», Россия);
- ✧ система получения воды для инъекций УВОИ-М-Ф/1812 (МедианаФильтр, Россия);
- ✧ сублимационная сушка «Edwards Minifast DO.2» (Ero Electronic S.p. A., Италия);
- ✧ стерилизатор сухожаровой Binder ED (Binder, Германия).

### **2.3. Методы исследований**

#### **2.3.1. Приготовление липосомальной дисперсии ЛХС-1269**

- ✧ Метод получения многослойных липосом (МСЛ) ЛХС-1269

Липосомы ЛХС-1269 получали методом гидратации липидной пленки в модификации для гидрофобных субстанций. Отвешивали ФХ, холестерин и ПЭГ-ДГФА и растворяли в хлороформе. К навеске ЛХС-1269 добавляли ацетон и обрабатывали УЗ в течение 10–15 мин для ускорения процесса растворения. Полученные растворы компонентов ЛФ смешивали и количественно переносили в круглодонную колбу. Далее органический растворитель отгоняли на роторном испарителе при температуре водяной бани  $37 \pm 1$  °С под вакуумом до получения однородной полупрозрачной липидной пленки. После формирования липидной пленки ее досушивали под вакуумом ( $< 200$  мбар) до полного удаления остатков органического растворителя. Затем пленку гидратировали водой для инъекций с получением дисперсии МСЛ ЛХС-1269.



### ❖ Методы получения однослойных липосом (ОСЛ) ЛХС-1269

Для получения однослойных и однородных по размеру везикул использовали следующие методы: экструзию и гомогенизацию. Дисперсию МСЛ перед измельчением для освобождения от механических включений фильтровали под давлением через фильтры с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм.

1) Экструзия. Липосомальная дисперсия была экструдирована посредством пропускания через мембранные фильтры различного типа с диаметром пор 0,2–0,22 мкм.

2) Гомогенизация. Профильтрованная липосомальная дисперсия ЛХС-1269 в объеме 60 мл измельчалась в течение 1–5 минут на гомогенизаторе Microfluidizer под давлением 40 psi (280 кПа).

«Пустые» липосомы получали тем же способом, что и липосомы с действующим веществом, исключая добавление субстанции ЛХС-1269 в состав хлороформного раствора вспомогательных компонентов.

### **2.3.2. Лиофилизация липосомальной дисперсии ЛХС-1269**

С целью повышения стабильности и продления срока хранения ЛЛФ ЛХС-1269 предложен способ сублимационной сушки. Основной задачей этапа лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1269 являлся выбор криопротектора, который бы обеспечивал получение лиофилизата надлежащего качества, стабильного в течение длительного срока хранения.

С целью определения эвтектической температуры липосом ЛХС-1269 использовали термический способ, в основе которого лежит фиксирование температуры образца, замороженного ниже эвтектической точки, в процессе быстрого оттаивания.

### 2.3.3. Контроль качества и стандартизация ЛЛФ ЛХС-1269 и ее лиофилизата

#### *Качественный хроматографический анализ ЛЛФ и ЛЛЛФ ЛХС-1269*

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием хроматографических пластин «Sorbfil» был применен с целью установления подлинности компонентов препарата.

#### ❖ **Методика ТСХ-анализа ЛЛЛФ ЛХС-1269**

*Приготовление исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1269 для анализа действующее вещество (ДВ) и липидных компонентов (раствор А).*

К лиофилизату добавляют 1 мл воды, перемешивают. Затем к полученной смеси добавляют 7 мл 95% спирта, перемешивают. В полученном образце концентрация ЛХС-1269 составляет 0,25 мг/мл.

*Приготовление исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1269 для анализа сахарозы (раствор Б).*

В колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл раствора А и доводят водой до метки. Концентрация сахарозы в полученном образце составляет 1 мг/мл.

*Приготовление стандартных образцов веществ-свидетелей (СОВС)*

СОВС-1 – ацетоновый раствор ЛХС-1269 1 мг/мл. В 1 мл ацетона с использованием УЗ-ванны растворяют навеску субстанции ЛХС-1269 1,0 мг.

СОВС-2 – спиртовой раствор лецитина 25 мг/мл. В 1 мл спирта 95 % растворяют навеску лецитина 25 мг.

СОВС-3 – спиртовой раствор холестерина 8,3 мг/мл. В 1 мл спирта 95 % растворяют навеску холестерина 8,3 мг.

СОВС-4 – водный раствор сахарозы 1 мг/мл. В 10 мл воды растворяют навеску сахарозы 10,0 мг.

*Подготовка хроматографической камеры.* Растворители, входящие в состав подвижной фазы, смешивают в отдельной емкости. Полученной смесью заполняют хроматографическую камеру, внутренние стенки которой, с целью насыщения парами смеси растворителей обкладывают фильтровальной бумагой, смоченной подвижной фазой. Плотную закрытую камеру оставляют на 25–30 мин.

*Подготовка йодной камеры.* В тигель, установленный на дно эксикатора, насыпают 2,0 г йода и оставляют на 10–15 мин для возгонки.

*Приготовление 20% серной кислоты.* К 100 мл воды при осторожном помешивании приливают 25 мл концентрированной серной кислоты.

*Приготовление раствора  $\alpha$ -нафтола.* В 50 мл смеси спирта 95 % и концентрированной серной кислоты в соотношении 19:1 по объему, растворяют 0,5 г  $\alpha$ -нафтола и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки.

*Нанесение проб.* На линию старта хроматографической пластинки №1 (тип ПТСХ-АФ-А-УФ) наносят 2 мкл раствора А, 0,5 мкл СОВС-1 (0,5 мкг ЛХС-1269) и 2 мкл СОВС-3 (16,6 мкг холестерина); пластинки №2 (тип ПТСХ-АФ-А) — 1 мкл раствор А и 2 мкл СОВС-2 (50 мкг ФХ); на пластинку №3 (тип ПТСХ-АФ-А) — по 1 мкл раствора Б и СОВС-4 (1 мкг сахарозы).

*Хроматографирование.* Подсушенная на воздухе пластинка с нанесенными пробами помещается в хроматографическую камеру с элюентом, плотно закрывается крышкой и хроматографируется восходящим способом. После достижения фронтом элюента линии финиша (пробег 12 см) пластинка извлекается из камеры и высушивается в потоке теплого воздуха с целью полного удаления запаха растворителей [19].

*Идентификация.* При облучении УФ длиной волны 254 нм, ЛХС-1269 визуально идентифицируется на пластинке по характерным желтым пятнам. С целью обнаружения лецитина пластинку необходимо поместить в насыщенную парами йода камеру и выдерживать до появления желтых пятен данного

вещества на протяжении 1 минуты. Совместно с лецитином также проявляются и быстро исчезают светло-желтые пятна холестерина[19]. С целью обнаружения последнего производят опрыскивание пластинки 20 % серной кислотой с последующим ее нагреванием до возникновения характерных розово-фиолетовых пятен. Сахарозу идентифицируют по наличию темно-фиолетовых пятен, которые проявляются после обработки пластинки раствором  $\alpha$ -нафтола и нагревания [21].

Проявившиеся пятна в липосомальных образцах необходимо идентифицировать относительно пятен СОВС. Их характеризуют по величине удерживания  $R_f$ , которая рассчитывается по формуле [21]:

$$R_f = L_B / L_\Phi,$$

где:

– $L_B$  – расстояние от линии старта до центра хроматографической зоны исследуемого вещества, мм;

– $L_\Phi$  – расстояние от линии старта до линии финиша элюента, мм.

✧ Количественный спектрофотометрический анализ ЛХС-1269 в ЛЛФ и ЛЛЛФ

Количественное содержание ЛХС-1269 было определено при помощи метода спектрофотометрии в УФ- и видимой области (ГФ XIV ОФС.1.2.1.1.0003.15) с применением рабочего стандартного образца (СО) при длине волны ( $320 \pm 2$  нм) на спектрофотометре Cary 100. Оптическая плотность анализируемого образца измерялась с использованием спирта 95 % в качестве раствора сравнения. Результаты исследования по разработке методики количественного спектрофотометрического анализа ЛЛЛФ ЛХС-1269 приведены в разделе 4.2.[19, 21].

✧ Валидация методики количественного спектрофотометрического анализа

## ЛХС-1269 в составе ЛЛЛФ

- ✧ Валидационная оценка методики количественного спектрофотометрического анализа ЛХС-1269 в составе ЛЛЛФ осуществлялась с опорой на ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», согласно характеристикам линейности, специфичности, правильности, диапазона применения или аналитической области, прецизионности.
- ✧ Методика определения эффективности включения ЛХС-1269 в липосомы

По причине гидрофобных свойств ЛХС-1269 и непосредственного включения в липидный бислой при получении липосомы, количество включенного препарата (КВП) определялось как отношение концентрации препарата в липосомальной дисперсии после фильтрации через фильтр диаметром пор 0,22 мкм к концентрации ЛХС-1269 в дисперсии, полученной после гидратации липидной пленки. Показатель выражается в процентах:

$$\text{КВП} = C_{\text{ф}} / C_{\text{п}} \times 100 \%$$

где: КВП – количество включенного препарата, %;

$C_{\text{ф}}$  – концентрация ЛХС-1269 в дисперсии после фильтрации, мг/мл;

$C_{\text{п}}$  – концентрация ЛХС-1269 в дисперсии после получен

- ✧ Методика определения размера, значения  $\zeta$ -потенциала и индекса полидисперсности (PDI) липосом ЛХС-1269

Применяющийся для определения распределения частиц по размеру метод лазерной дифракции света базируется на анализе профиля рассеяния света, возникающего при освещении частицы коллимированным лазерным лучом [5, 19]. PDI представляет собой меру ширины распределения частиц по размерам,  $\zeta$ -потенциал представляет собой меру поверхностного потенциала частицы, чаще всего используют методы общего динамического светорассеяния [8].

*Методика разведения образца:* Отмеренные автоматической пипеткой 100 мкл исследуемого образца свежеприготовленных липосом или ЛЛЛФ ЛХС-1269 через 10 минут после регидратации помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводя водой до метки [21].

*Измерение размера липосом:* разведенный образец переносится в стеклянную кювету, помещаемую в ячейку анализатора Никомп и измеряется не менее трех раз.

❖ *Измерение значения  $\zeta$ -потенциала и индекса полидисперсности (PDI):* разведенный образец переносится в полистирольную кювету, помещаемую в ячейку анализатора Дзета-сайзер, с последующим троекратным измерением показателей.

❖ *Методика определения значения рН липосомального ЛХС-1269*

Определение рН осуществлялось потенциометрически. Предварительно производилось измерение значения рН воды для инъекций. Измерения проводились в диапазоне температур 20–25 °С.

*Методика определения значения рН ЛХС-1269 липосомальной дисперсии.* Не разбавляя анализируемый образец, измеряют значение рН липосомальной дисперсии.

*Методика определения значения рН ЛЛЛФ ЛХС-1269.* Воду для инъекций в объеме 10 мл добавляют к содержимому флакона, до образования однородной дисперсии перемешивают течение 15 мин, после чего измеряют значение рН.

❖ *Методика определения динамической вязкости липосомальной дисперсии ЛХС-1269*

В интервале температур 21–25 °С, с применением вибрационного вискозиметра анализировали динамическую вязкость липосомальной дисперсии, полученной ЛХС-1269 липосомальной дисперсии, а также при регидратации лиофилизата ЛЛЛФ ЛХС-1269.

✧ Методика определения потери в массе при высушивании

Потеря в массе при высушивании (влажность) определялась на основании ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании». Результат выражали в виде массовой доли в процентах [4, 21].

Точную навеску препарата (0,5 г) с целью проведения анализа помещали в предварительно высушенный и взвешенный бюкс, после чего сушили до постоянной массы в вакуумном сушильном шкафу над пятиокисью фосфора при комнатной температуре и остаточном давлении 5 мм рт. Ст [21].

#### **2.3.4. Статистическая обработка данных**

Процесс статистической обработки данных, которые были получены в ходе эксперимента, осуществлялся в таких компьютерных программах, как Excel, GraphPad Prism 8, опираясь на ОФС.1.1.0013.15 (Взамен ст. ГФ XI, вып.1) «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

## Глава 3. Разработка состава и технологии получения ЛЛФ ЛХС-1269

### 3.1. План исследований по разработке ЛЛФ ЛХС-1269

Для обеспечения возможности введения гидрофобного ЛВ внутривенно, а также уменьшения показателей токсичности и повышения параметров биодоступности противоопухолевого препарата было предложено инкапсулирование производного индолокарбазола ЛХС-1269 в липосомы. План исследований по разработке стабильной ЛЛФ ЛХС-1269 показан на рисунке 9.

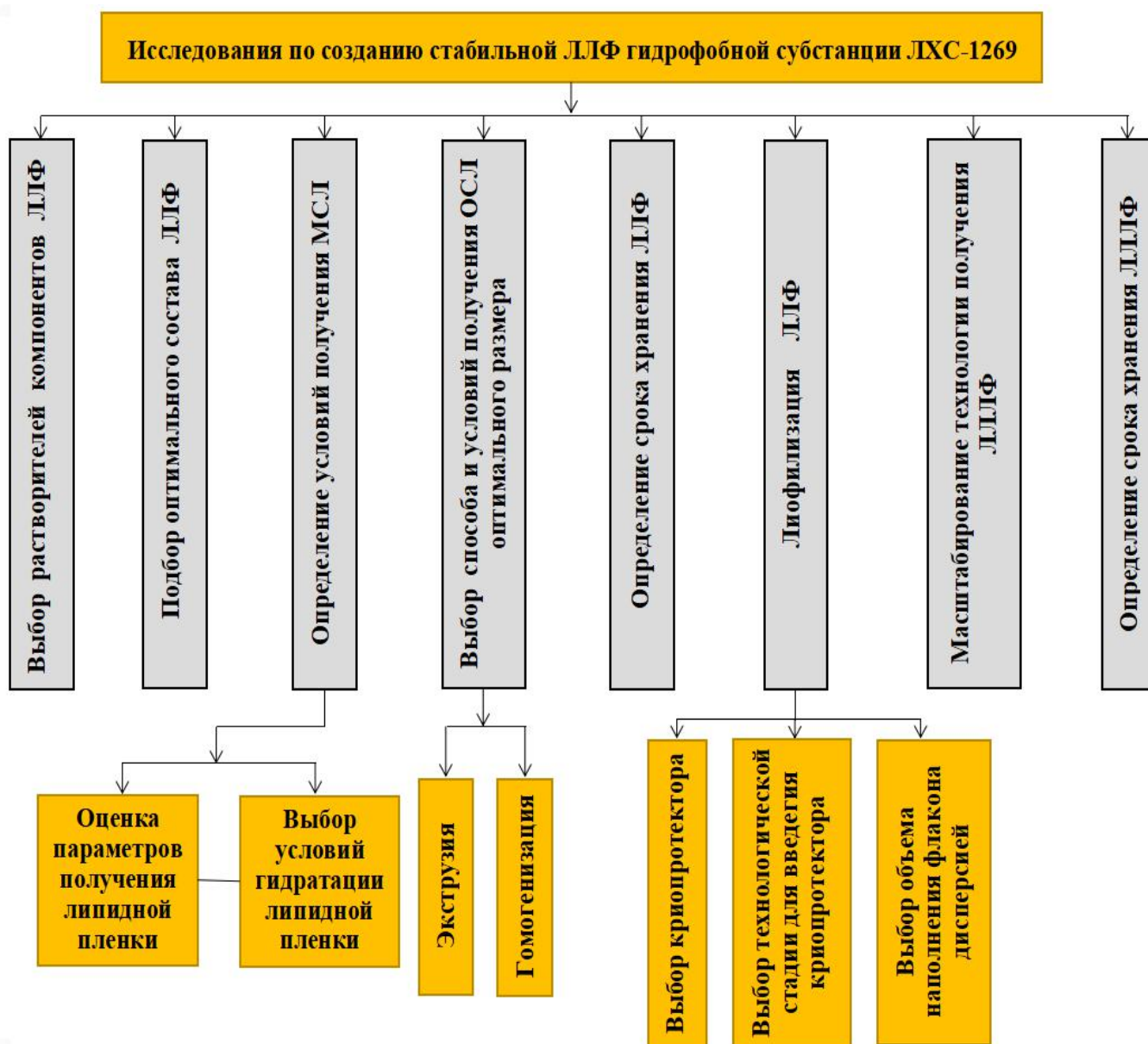


Рисунок 9 – План исследований разработки ЛЛФ ЛХС-1269



### **3.2. Изучение растворимости исследуемой субстанции и выбор растворителей для применения в технологии получения ЛЛФ ЛХС-1269**

Растворимость – это одно из важнейших свойств фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, определяющее выбор технологических подходов при разработке лекарственной формы. Поэтому на первоначальном этапе исследования оценивали растворимость субстанции ЛХС-1269 и липидов (ФХ, холестерин, ПЭГ-ДГФА) в различных органических растворителях, применяемых в фармацевтической технологии, в частности при получении липосомальных препаратов.

В качестве растворителей компонентов ЛФ исследовали ацетон, хлороформ, бензол и этанол, поскольку данные растворители являются летучи и легко отгоняются в условиях пониженного давления. В дополнение к указанным растворителям для ЛХС-1269 оценивали также растворимость в ДМСО, который является эффективным растворителем соединений класса индолокарбазолов. Для проведения анализа к навеске ДВ или липидного компонента (1 мг) постепенно добавляли один из данных растворителей до получения прозрачного раствора. Степень растворения веществ определяли согласно обозначению растворимости фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ по ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость». Результаты исследования представлены в таблице 2.

Согласно полученным данным субстанция ЛХС-1269 среди летучих растворителей наиболее растворима в ацетоне и бензоле. Поскольку ацетон менее токсичен, чем бензол, и имеет меньшую температуру кипения, данный растворитель выбран для растворения ЛХС-1269 при получении липидной пленки. ДМСО является подходящим растворителем ДВ при спектрофотометрическом анализе.

Таблица 2–Растворимость\* ДВ и липидных компонентов ЛЛФ ЛХС-1269 в органических растворителях

Органический растворитель		Ацетон	Бензол	Хлороформ	Этанол	ДМСО
Температура кипения, °С		56,1	80,1	61,2	78,4	189
Класс токсичности остаточного органического растворителя		3	1	2	3	3
Объем растворителя (мл), необходимый для растворения 1 мг ДВ и растворимость ДВ		0,92	0,96	Более 10	7,6	0,01
		Мало растворим		Практически не растворим	Очень мало растворим	Легко растворим
Объем растворителя (мл), необходимый для растворения 1 мг липидных компонентов и растворимость их	ФХ	Более 10	0,18	0,10	0,01	Более 10
		Практически нерастворим	Растворим	Легко растворим	Легко растворим	Практически не растворим
	холестерин	0,14	0,22	0,08	1,3	Более 10
		Мало растворим	Растворим	Легко растворим	Очень мало растворим	Практически не растворим
	ПЭГ-ДГФА	Более 10	0,07	0,13	0,03	0,2
		Практически нерастворим	Легко растворим	Растворим	Легко растворим	Растворим

Обобщая результаты растворимости липидных компонентов, можно сделать вывод, что хлороформ является наиболее оптимальным растворителем на стадии приготовления органического раствора, а ДМСО и этанол – при анализе ЛФ.

### 3.3. Разработка состава ЛЛФ ЛХС-1269

С целью формирования липидного бислоя был применен яичный фосфатидилхолин. Фосфатидилхолины по своим характеристикам биосовместимы, биodeградируемы, нетоксичны и являются одними из самых распространенных молекул клеточных мембран. Добавление холестерина в модельные составы было обусловлено задачей повышения показателей стабильности липосомальной конструкции посредством увеличения жесткости липидного бислоя и ее механической устойчивости. Добавление в состав липосом конъюгированного гидрофильным полимером фосфатилэтанолamina (ПЭГ-ДФА) производилось для предотвращения опсонизации и поглощения липосом клетками ретикулоэндотелиальной системы. Липосомы, содержащие пегилированные липиды и холестерин в биологической жидкости (сыворотке), сохраняют такие характеристики как физическую стабильность и размер [60]. Оптимальный размер липосом, содержащих максимальные в количественном отношении показатели активного компонента, для терапии не должен превышать 200-200 нм [1].

С целью решения данных задач было необходимо определить оптимальные молярные отношения активного вещества к фосфолипиду и липидных компонентов, входящих в состав липосомальной конструкции.

Для проведения анализа были взяты модели липосомального ЛХС-1269 в количестве семи экспериментальных составов, которые имели различные молярные соотношения компонентов (Таблица 3). Оценка полученных образцов липосомальной дисперсии проводилась относительно критических показателей – вязкость липосомальной дисперсии, включение ЛВ в липосомы (КВП), размеры,  $\zeta$ -потенциал и PDI липосом [13].

Исследуемое ЛВ представляет собой гидрофобное вещество. Это означает, что для его эффективного включения в липосомальный бислой необходимо следить за концентрацией фосфолипида, который является связующим элементом, удерживая липосомы внутри вещества – т.е. за соотношением ЛХС-1269/ФХ. В составах 2, 4 и 7 было произведено снижение отношения ЛВ к фосфолипиду – от 1:150 до 1:170, что, в свою очередь, способствовало повышению (от 93, 5 до 97, 0 %) уровня включения ЛХС-1269 (рисунок 10). Представленные результаты демонстрируют, что эффективность инкапсуляции гидрофобного вещества в липосомы обусловлена количественным соотношением липидных компонентов бислоя – ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА. Следовательно, удержание ЛВ внутри везикулы обусловлено увеличением доли холестерина в липосомальной мембране, стабилизирующего ее структуру. Так, в составе 6 повышение концентрации холестерина до 25% от общего содержания липидов способствовало получению липосом, значения КПВ которых было порядка 98%. более высокое содержание ПЭГ-ДГФА в композиции (состав 5) привело к снижению уровня включения ЛХС-1269, что вероятно обусловлено частичным вытеснением ЛВ из мест связывания в бислое пегилированным липидом [13].

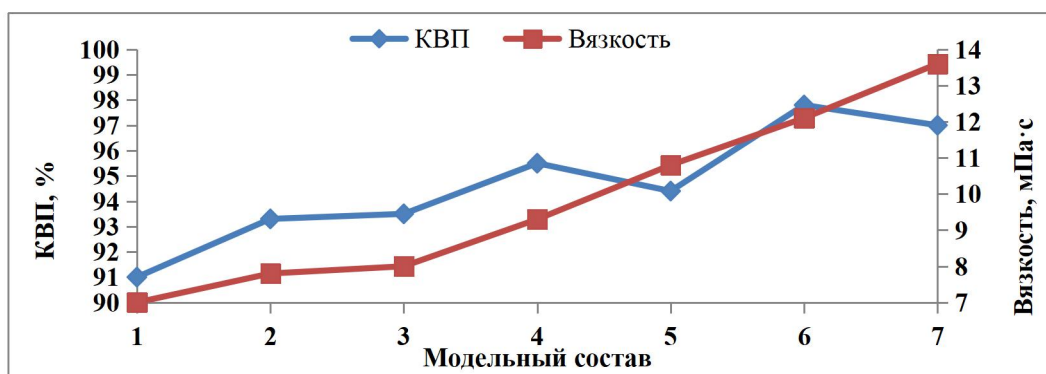


Рисунок 10 – Уровень включения ЛХС-1269 в липосомы и вязкость липосомальной дисперсии при приготовлении с использованием модельных составов

Параметры, которые делают возможным инъекционное введение ЛВ, напрямую обусловлены динамической вязкостью неньютоновских жидкостей [2]. В ходе исследования была установлена корреляция вязкости дисперсии ЛХС-1269 с общей концентрацией липосомальных липидов, значения которой колеблются в

диапазоне от 7,0 до 13,6 мПа·с [13].

Данные, приведенные в таблице 3, показывают, что средний диаметр модельных липосом, вне зависимости от соотношения липидов в липосомальной мембране и ЛХС-1269/ФХ и липидов в липосомальной мембране, не превышает размер везикул 220 нм. Об узком распределении частиц по размеру свидетельствует значение PDI менее 0,3 [161]. Более высокое содержание ПЭГ-ДГФА в составе 5 позволяет квалифицировать его в качестве исключения по причине увеличенного размера везикул, равного 236 нм. Анализ измерения электрофоретической подвижности показал, что липосомы ЛХС01269, приготовленные по исследуемым составам, обладают высоким отрицательным зарядом с наибольшим значением  $\zeta$ -потенциала для 6-й композиции -33,0 мВ. Высокое (более 30 мВ) абсолютное значение  $\zeta$ -потенциала может спровоцировать сильное электростатическое отталкивание везикул, повышая тем самым показатели стабильности липосомальной системы [13].

Таким образом, в результате обобщения полученных данных из исследуемых составов выбрана композиция 6 с молярным соотношением ЛХС-1269/ФХ = 1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА= 1:0,33:0,003, которая обеспечивает включение ЛХС-1269 на уровне 98% и приемлемые физико-химические характеристики [13].

Таблица 3–Модельные составы липосомальной ЛФ ЛХС-1269

Состав	Молярное соотношение		Общая концентрация липидов в дисперсии, мг/мл	Размер липосом, нм	PDI	ζ-потенциал липосом, мВ
	ЛХС-1269/ФХ	ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА				
1	1:150	1:0,1:0,003	64,2	208±12	0,297±0,021	-(25,0±1,5)
2		1:0,2:0,003	67,2	191±9	0,206±0,012	-(27,0±2,4)
3		1:0,33:0,003	71,2	192±14	0,283±0,015	-(26,0±1,8)
4	1:160	1:0,2:0,003	71,6	197±12	0,239±0,024	-(24,3±2,1)
5		1:0,2:0,004	71,8	236±15	0,105±0,013	-(27,9±1,8)
6		1:0,33:0,003	75,8	190±11	0,172±0,016	-(33,0±2,5)
7	1:170	1:0,2:0,003	76,0	190±10	0,185±0,019	-(28,1±2,2)

### 3.4. Разработка технологии получения многослойных липосом ЛХС-1269

Технологический процесс получения липосом с гидрофобным веществом по методу Бенгхема включает следующие основные стадии:

- получение липидной пленки из органического раствора компонентов ЛЛФ,
- формирование многослойных липосом (МСЛ) посредством гидратации пленки,
- получение дисперсии однослойных липосом (ОСЛ) приемлемого размера.

#### 3.4.1. Особенности получения многослойных липосом ЛХС-1269

Субстанцию ЛХС-1269, ФХ, холестерин и ПЭГ-ДГФА отвешивают в соответствии с навесками, указанными в таблице 4.

Таблица 4 – Навески компонентов ЛЛФ ЛХС-1269 для однократной загрузки круглодонной колбы 1 л

Компонент	ЛХС-1269	ФХ	Холестерин	ПЭГ-ДГФА
Масса, мг	3	645	106	7

С учетом растворимости компонентов ЛЛФ для получения раствора ЛХС-1269 используют ацетон, липидов – хлороформ. Смешанные растворы переливают в круглодонную колбу вместимостью 1 л. На роторном испарителе в условиях пониженного давления органические растворители отгоняют при температуре водяной бани выше  $T_{ф.п. ФХ} + (37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  и начальной скорости вращения ротора  $90 \pm 5$  оборотов в минуту, что обеспечивает образование равномерной пленки на внутренних стенах колбы [19]. По мере загущения раствора скорость плавно снижают. Поскольку ацетон и хлороформ являются токсичными растворителями необходимо добиться их полного удаления из липидной пленки в процессе получения липосом. Для этого пленку «досушивают» при давлении  $< 200$  мбар до постоянной массы содержимого колбы – суммарной массы лекарственного и вспомогательных веществ ЛФ (761 мг) и фиксируют ее изменение через определенные промежутки времени. Как показано

на рисунке 11, масса содержимого остается постоянной после выдерживания полученной липидной пленки в течение 30 мин.

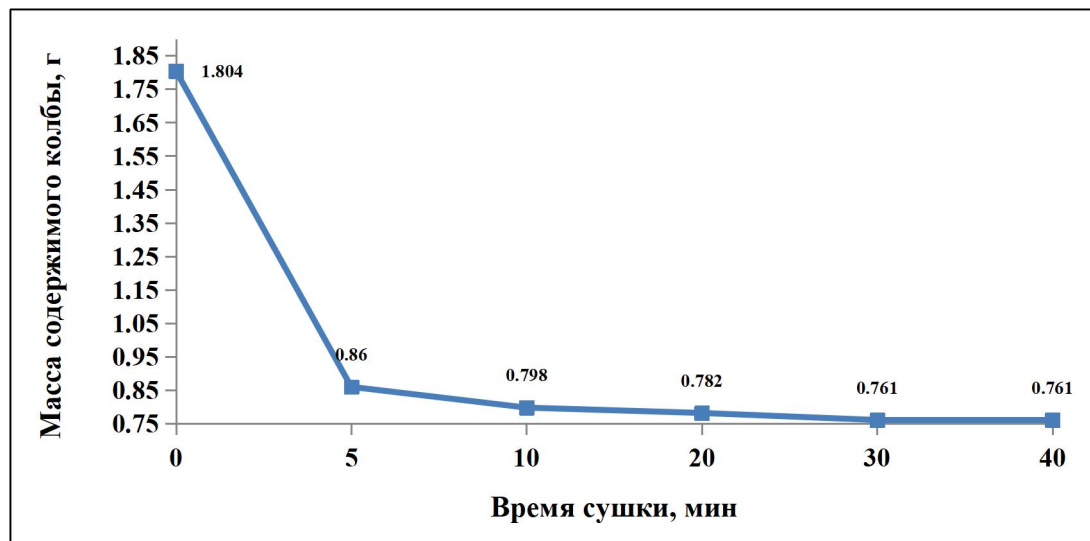


Рисунок 11–Изменение массы содержимого колбы при выдерживании под вакуумом

После получения и сушки липидную пленку гидратируют с получением дисперсии МСЛ ЛХС-1269. На характеристики получаемых липосом могут влиять различные факторы, в частности температура и давление процесса. Поэтому для установления оптимальных условий гидратации липидной пленки сравнивали показатели качества МСЛ (КВП, размер и  $\zeta$ -потенциала липосом, PDI, вязкость), получаемых при температуре 20, 30 и 37 °С и при значениях давления 1000 и 150 мбар.

Согласно данным, представленным в таблице 5, с повышением температуры воды для инъекций отмечается увеличение размера и  $\zeta$ -потенциала МСЛ и вязкости дисперсии, а при температуре выше 30 °С – снижение уровня включения ДВ в бислой. Однако образование более крупных везикул не является ограничивающим фактором для гидратации пленки при температуре, отличной от 20 °С: их можно измельчить путем экструзии до требуемого диаметра.

Таблица 5 – Зависимость показателей дисперсии МСЛ ЛХС-1269 от температуры воды для инъекций

Температура, °С	20±1	30±1	37±1
КВП, %	98,9±1,5	99,0±1,2	88,5±1,9



Продолжение таблицы 5

<b>Вязкость, мПа·с</b>		6,7±1,6	8,5±0,5	10,2±1,3
<b>Размер, нм</b>	<b>МСЛ</b>	219±18	661±25	652±21
	<b>после экструзии</b>	195±10	190±14	191±11
<b>ζ-потенциал, мВ</b>	<b>МСЛ</b>	-(26,0±0,5)	-(32,3±0,3)	-(29,9±0,9)
	<b>после экструзии</b>	-(29,7±1,7)	-(25,5±1,9)	-(22,8±0,8)
<b>PDI</b>	<b>МСЛ</b>	0,701±0,065	0,495±0,046	1,000±0,012
	<b>после экструзии</b>	0,160±0,025	0,080±0,047	0,241±0,092

Как показано в приведенной таблице 6, гидратация в условиях пониженного давления способствует получению менее вязкой и гомогенной дисперсии. Однако в данном случае отмечается более низкий показатель КВП – 94,5% против 99,6% у МСЛ, полученных в нормальных условиях.

Таблица 6–Зависимость показателей дисперсии МСЛ ЛХС-1269 от уровня давления

<b>Значение давления, мбар</b>		<b>1000</b>	<b>150</b>
<b>КВП, %</b>		99,6±0,4	94,5±1,3
<b>Вязкость, мПа·с</b>		9,8±1,1	6,3±1,7
<b>Размер, нм</b>	<b>МСЛ</b>	379±20	523±23
	<b>после экструзии</b>	188±5	189±4
<b>ζ-потенциал, мВ</b>	<b>МСЛ</b>	-(25,4±1,2)	-(24,6±2,0)
	<b>после экструзии</b>	-(23,0±1,3)	-(24,9±0,7)
<b>PDI</b>	<b>МСЛ</b>	0,766±0,084	0,426±0,059
	<b>после экструзии</b>	0,195±0,024	0,176±0,025

Таким образом, гидратацию липидной пленки, содержащей ЛХС-1269, следует проводить в условиях атмосферного давления и при температуре не выше 30 °С.

### 3.4.2. Сравнение методов получения однослойных липосом ЛХС-1269

Размер липосом является одним из жизненно важных факторов, который следует контролировать, особенно когда эти препараты предназначены для парентерального применения (местное, инъекционное и ингаляционное). Для контроля размера липосом доступны многочисленные процедуры, например, экструзия и гомогенизация [23]. Поэтому целью данного этапа исследования являлась оценка возможности применения данных способов для уменьшения диаметра липосом ЛХС-1269 и выбор оптимальных условий процесса.

Экструзия липосом осуществляется путем проталкивания дисперсии МСЛ

через полупроницаемые мембраны с различным диаметром пор. Процесс экструзии, в ходе которого происходит уменьшение размеров липосом, обладает рядом таких преимуществ, как незначительное окисление липосомальных фосфолипидов, получение однородных по размеру везикул, регулировка температуры процесса, обеспечение стерильности, однородное распределение гидрофобного лекарственного вещества в структуре бислоя [10, 108, 161]. Эффективности экструзии липосом способствует совокупность таких факторов как размер пор фильтра, количество циклов экструзии, разновидность материала для фильтра.

Для уменьшения размера МСЛ и удаления возможных механических включений, дисперсия ЛХС-1269 была предварительно отфильтрована через мембраны с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм. В этом исследовании сравнивали 5 типов фильтрующих мембран – нейлоновые, полиэфирсульфоновые, поликарбонатные, на основе сложных эфиров целлюлозы и поливинилиденфторидовые с размером пор 0,2–0,22 мкм. Липосомальную дисперсию пропускали по 7 раз через каждый из указанных фильтров. Смену фильтра проводили после 3 циклов пропускания.

Эффективность экструзии оценивали по четырем основным показателям – размер и  $\zeta$ -потенциал везикул, PDI, КВП.

*Размер липосом.* Согласно данным диаграммы (рисунок. 12) из 5 типов фильтров наиболее результативной оказалась мембрана из поликарбоната – за 7 циклов экструзии диаметр везикул уменьшается от 262 до 158 нм. При этом значения показателя практически не изменяются спустя сутки хранения при температуре +4 °С. Схожая динамика изменения размеров отмечается при использовании полиэфирсульфоновых фильтров, однако диаметр получаемых ОСЛ составляет в среднем 200 нм и для получения наименьших значений требуется не менее 7 пропусканий. Экструзия с нейлоновыми, поливинилиденфторидовыми и целлюлозными фильтрами оказалась наименее эффективной, поскольку образующиеся липосомы характеризуются более

крупными и нестабильными во времени значениями размера.

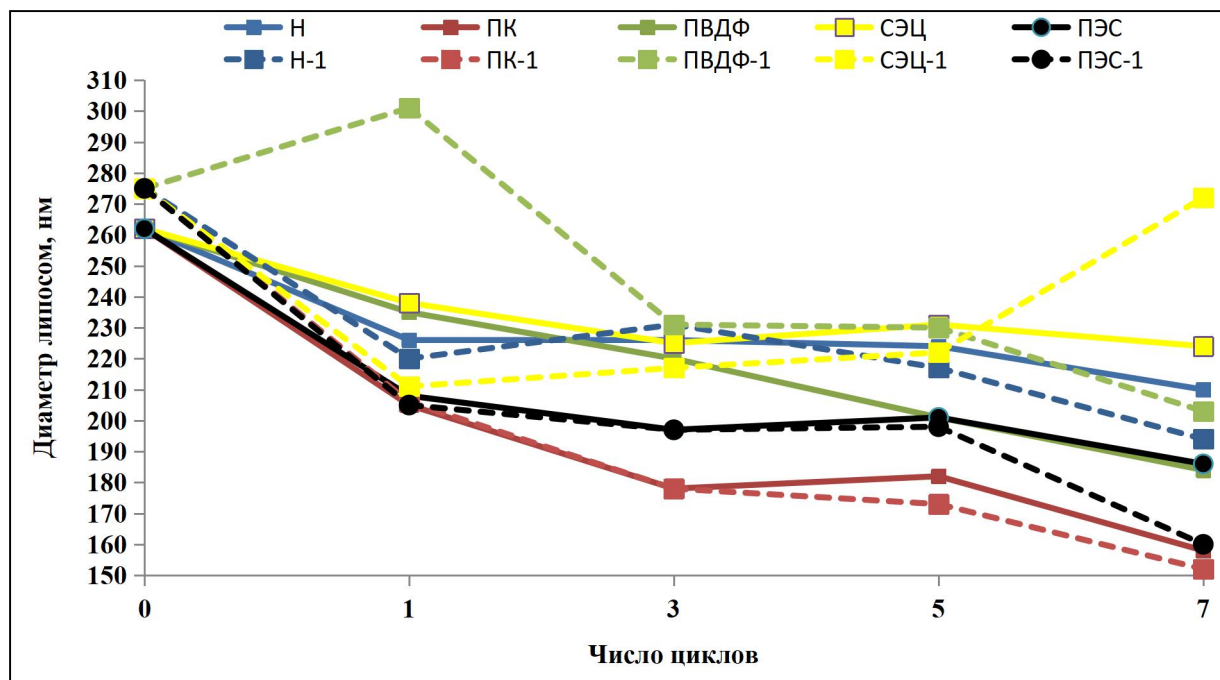


Рисунок 12–Диаметр липосом ЛХС-1269 при экструзии. Обозначения: сплошные линии обозначают динамику изменения размеров везикул сразу после экструзии, штриховые линии – спустя сутки после экструзии, Н — нейлоновые, ПК — поликарбонатные, ПВДФ — поливинилиденфторидовые, СЭЦ — целлюлозные, ПЭС — полиэфирсульфоновые фильтры

**PDI.** Несмотря на низкую эффективность поливинилиденфторидовых и целлюлозных фильтров при получении ОСЛ оптимального размера, их использование способствует формированию наиболее однородных липосомальных дисперсий – у всех отобранных для анализа образцов PDI не превышает 0,3 (рисунок 13). PDI образцов дисперсии, полученных при экструзии с поликарбонатными фильтрами, постепенно снижалось от 0,439 при однократном пропускании до 0,276 после 7 циклов экструзии, при этом через сутки отмечалось уменьшение данных значений, что вероятно обусловлено стабилизацией липосом. Наименее однородные дисперсии с большим разбросом значений PDI отмечались при использовании нейлоновых и полиэфирсульфоновых мембран.

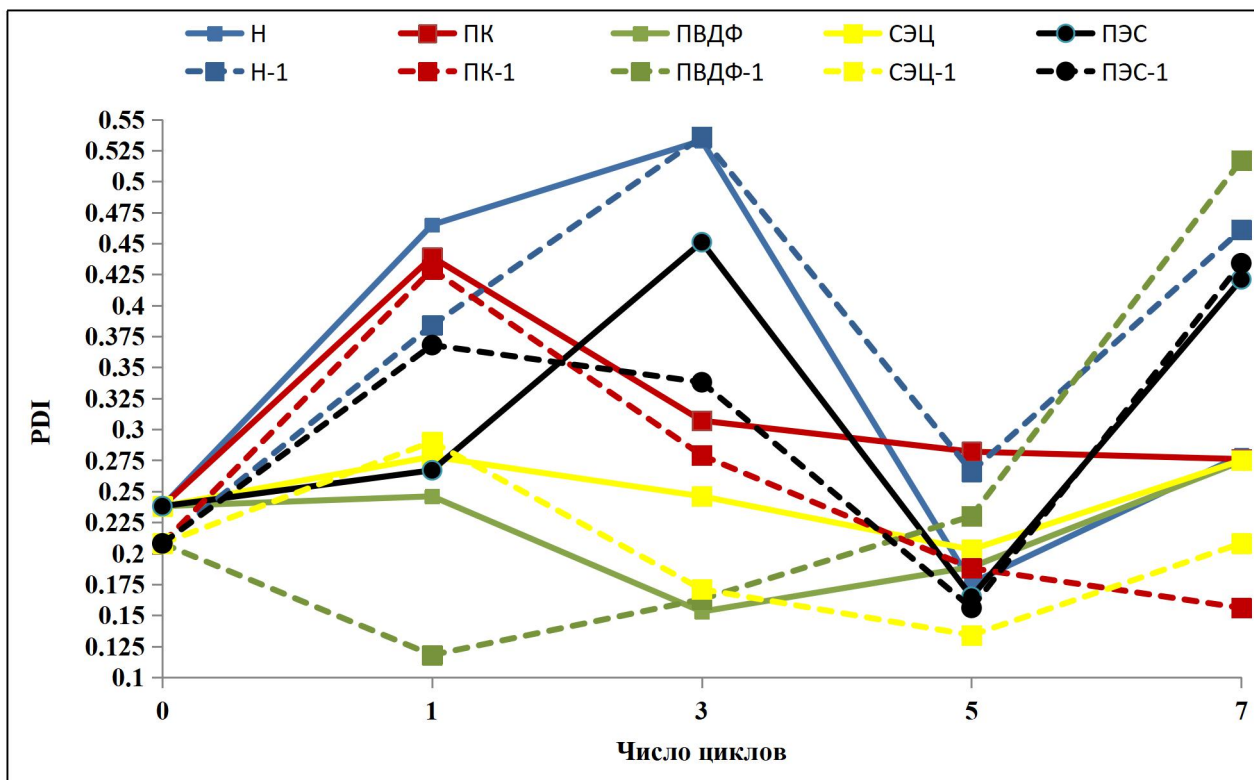


Рисунок 13– PDI дисперсии ЛХС-1269 при экструзии. Обозначения: сплошные линии обозначают динамику изменения размеров везикул сразу после экструзии, штриховые линии – спустя сутки после экструзии, Н — нейлоновые, ПК — поликарбонатные, ПВДФ — поливинилиденфторидовые, СЭЦ — целлюлозные, ПЭС — полиэфирсульфоновые фильтры

Установлено, что  $\zeta$ -потенциал липосом ЛХС-1269 практически не зависит от материала применяемого фильтра и количества циклов экструзии (рисунок 14). Значения поверхностного заряда везикул варьируется в диапазоне от -17 до -29 мВ. При этом наибольшие по модулю наблюдаются у образцов дисперсии спустя сутки после экструзии с нейлоновыми мембранами.

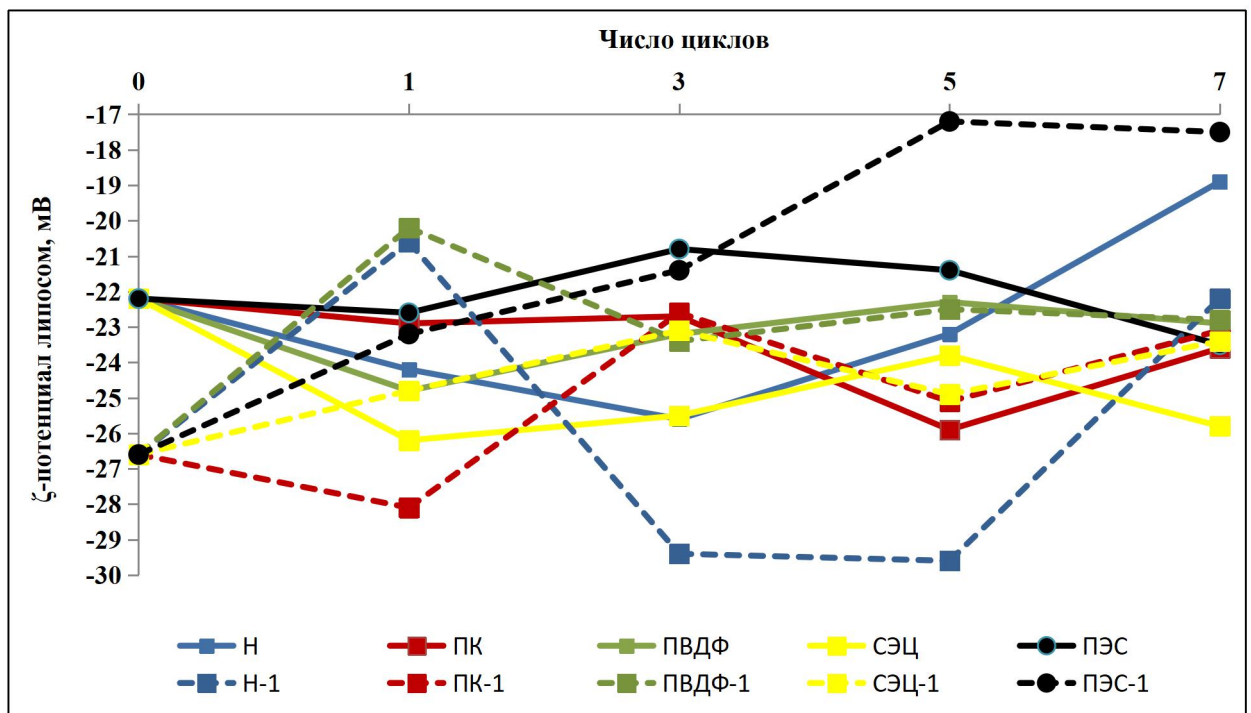


Рисунок 14— $\zeta$ -потенциал липосом ЛХС-1269 при экструзии. Обозначения: сплошные линии обозначают динамику изменения размеров везикул сразу после экструзии, штриховые линии — спустя сутки после экструзии, Н — нейлоновые, ПК — поликарбонатные, ПВДФ — поливинилиденфторидовые, СЭЦ — целлюлозные, ПЭС — полиэфирсульфоновые фильтры

**Уровень включения ЛХС-1269 в липосомы** (рисунок 15). При использовании нейлоновой фильтрующей мембраны наблюдается значительное снижение концентрации ЛХС-1269 и после 7 циклов экструзии эффективность включения составляет менее 90%. В таблице. 7 видно, что Н-фильтры имеют наиболее интенсивное желтое окрашивание, обусловленное высокой степенью сорбции ДВ с данным материалом. Также существенное уменьшение уровня КВП отмечается при экструзии дисперсии через целлюлозные и полиэфирсульфоновые фильтры. Незначительная сорбция ЛХС-1269 отмечена при пропускании липосомальной дисперсии через фильтры из поликарбоната и поливинилиденфторида — общие потери ЛВ составляют не более 4% от первоначального количества.

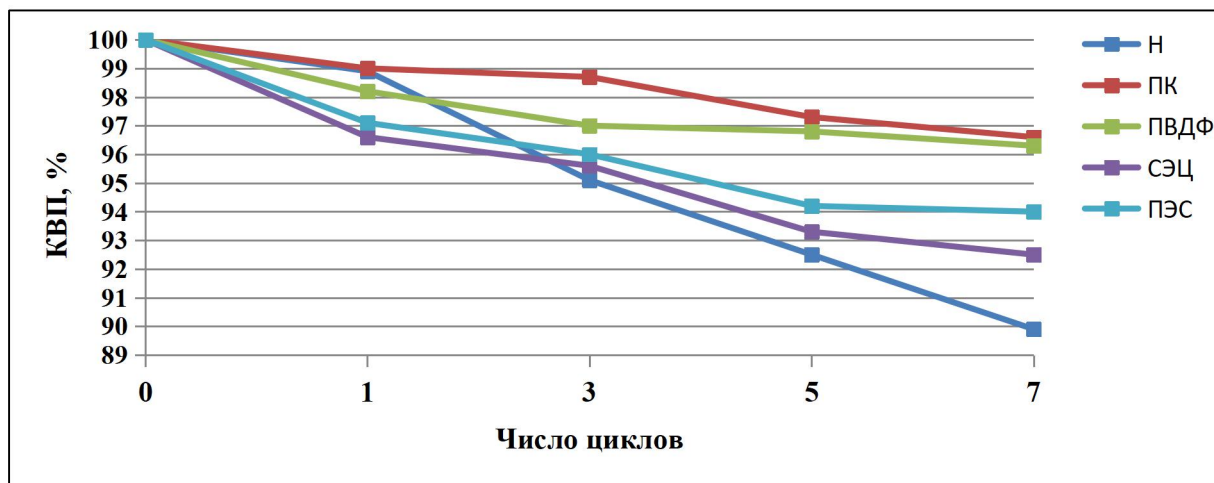












Рисунок 15—Значения КВП при экструзии с использованием различных типов фильтров. Обозначения фильтров: Н — нейлоновые, ПК — поликарбонатные, ПВДФ — поливинилиденфторидовые, СЭЦ — целлюлозные, ПЭС — полиэфирсульфоновые

Таблица 7—Окрашивание фильтров при экструзии

Тип мембраны	Н	ПЭС	ПК	СЭЦ	ПВДФ
После 3-его цикла					
После 7-ого цикла					

Подведем итоги исследования. Обобщая данные по 4 исследуемым показателям качества, можно сделать следующий вывод: экструзия с применением поликарбонатных фильтров способствует получению наиболее качественной липосомальной дисперсии, обладающей оптимальным размером везикул и сохраняющей высокий уровень включения активной субстанции.

**Гомогенизация.** К ключевым целям гомогенизации относятся: получение липосом, обладающих малым размером, а также характеристиками однородности по размеру; улучшение макроскопического вида препарата; улучшение показателей физической стабильности везикул; получение препарата, который в силу своих параметров может быть отфильтрован через антимикробные фильтры.

В отличие от экструзии, измельчение в условиях высокого давления в гомогенизаторах характеризуется более высокой производительностью. Это позволяет получать гораздо большие объемы стабильных липосомальных дисперсий за короткий промежуток времени [17, 21].

Эффективность измельчения в гомогенизаторе зависит от множества факторов, в том числе давления и количества циклов или продолжительности рециркуляции. В ходе эксперимента дисперсию МСЛ гомогенизировали с забором образцов для анализа через определенное число циклов от запуска. Контроль образцов получаемой дисперсии проводили путем сравнительного анализа среднего размера и  $\zeta$ -потенциала липосом и PDI сразу после гомогенизации и спустя сутки. Контрольным показателем приемлемости использования данного метода являлся уровень включения ЛВ.

Гомогенизацию липосомальной дисперсии ЛХС-1269 проводили при рабочем давлении прибора 40 psig, поскольку более низкое давление (20 psig) не обеспечивает требуемое «проталкивание» дисперсии через узлы гомогенизатора, а ведение процесса в условиях высоких значений данной величины (60 psig) способствует сильному разогреванию обрабатываемого образца.

Как показали результаты продолжительность цикла гомогенизации 60 мл дисперсии липосом исследуемого гликозидного производного составляет 20 сек. При этом с каждым циклом пропускания дисперсия нагревается в среднем на 2–3 °С. В отличие от экструзии при гомогенизации липосомальной дисперсии ЛХС-1269 отмечалось образование не менее 2 фракций везикул (рисунок 16). При однократном пропускании свежеприготовленной дисперсии через гомогенизатор **средний размер липосом** преобладающей фракции (более 80%) увеличился с 206 до 279 нм. В то же время при измерении показателя тех же образцов дисперсии спустя сутки после получения значения составили 368 и 218 нм, что обусловлено стабилизацией липосомальной системы. При последующей циркуляции отмечалось постепенное снижение диаметра, при этом липосомы с требуемыми значениями показателя – менее 200 нм – были получены уже спустя 1 мин

обработки. Размер липосом второй (меньшей) фракции везикул ЛХС-1269 на протяжении всего периода гомогенизации находился в диапазоне 22–58 нм.

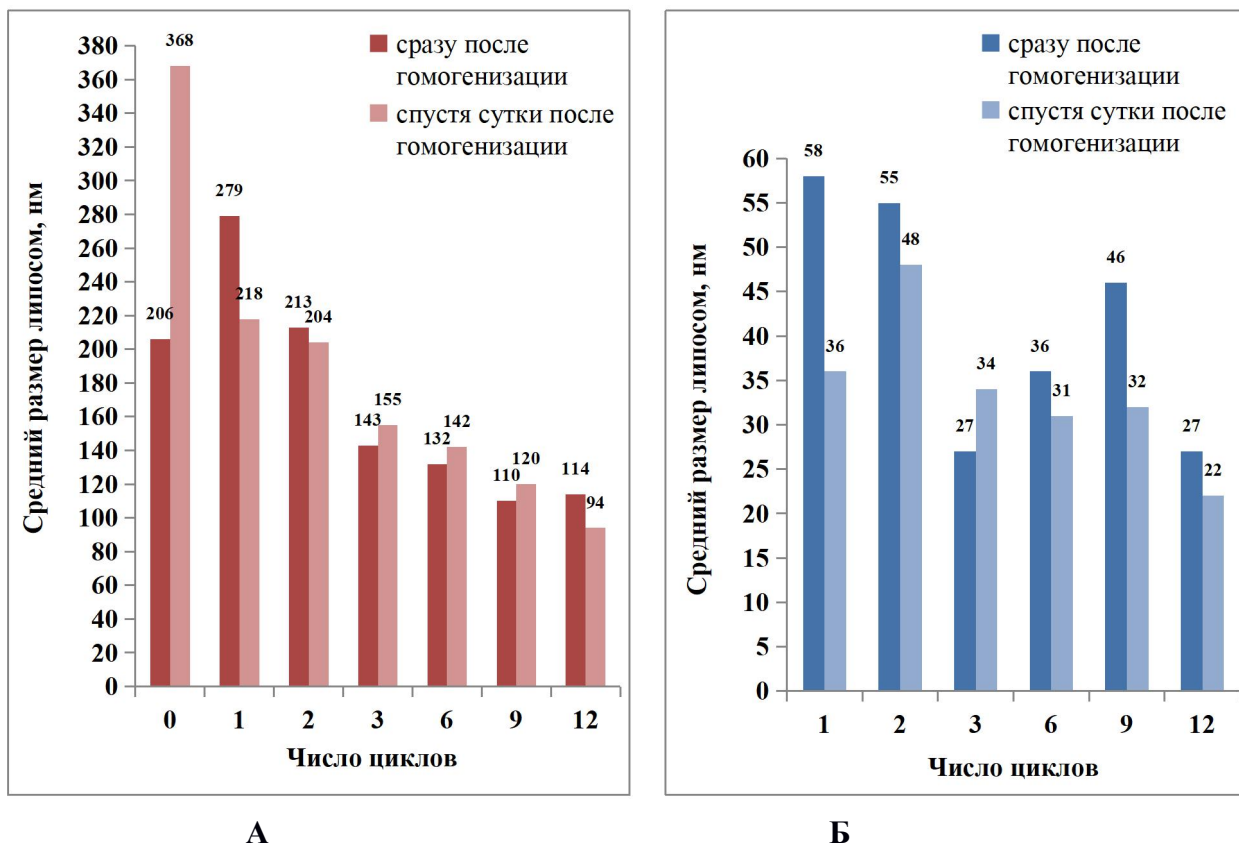


Рисунок 16 – Средний размер липосом сразу и спустя сутки после гомогенизации: А – 1-я фракция (преобладающая), Б – 2-я фракция

В то же время согласно графикам, представленным на рисунке 17 (А и Б), время циркуляции напрямую не влияет на поверхностный заряд фосфолипидных везикул и дисперсность образца. В течение всего периода гомогенизации независимо от количества циклов значения  $\zeta$ -потенциала липосом ЛХС сразу после получения варьировались от -13,9 до -21,1 мВ и спустя сутки после обработки – от -15,6 до -21,3 мВ. При этом PDI всех анализируемых образцов составил менее 0,3, что свидетельствует о формировании в процессе гомогенизации однородных дисперсий.



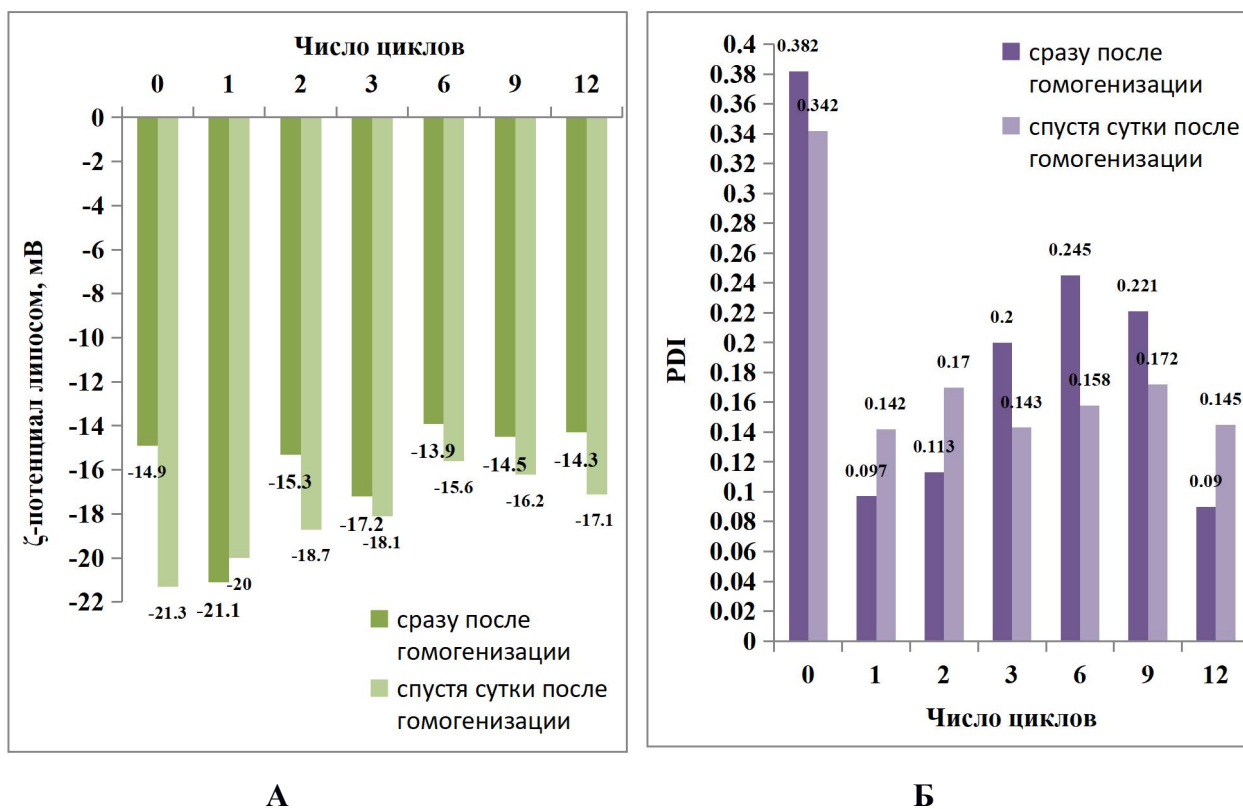


Рисунок 17–  $\zeta$ -потенциал липосом ЛХС-1269 и PDI дисперсии при гомогенизации

При оценке *уровня включения* ДВ было установлено, что количество ЛХС-1269 в липосомах значительно снижалось с каждым циклом гомогенизации. Так, через 1 мин гомогенизации дисперсии, в результате которой образуются липосомы оптимального размера, КВП индокарбазола в везикулы составило 92,3%. (Рисунок 18).

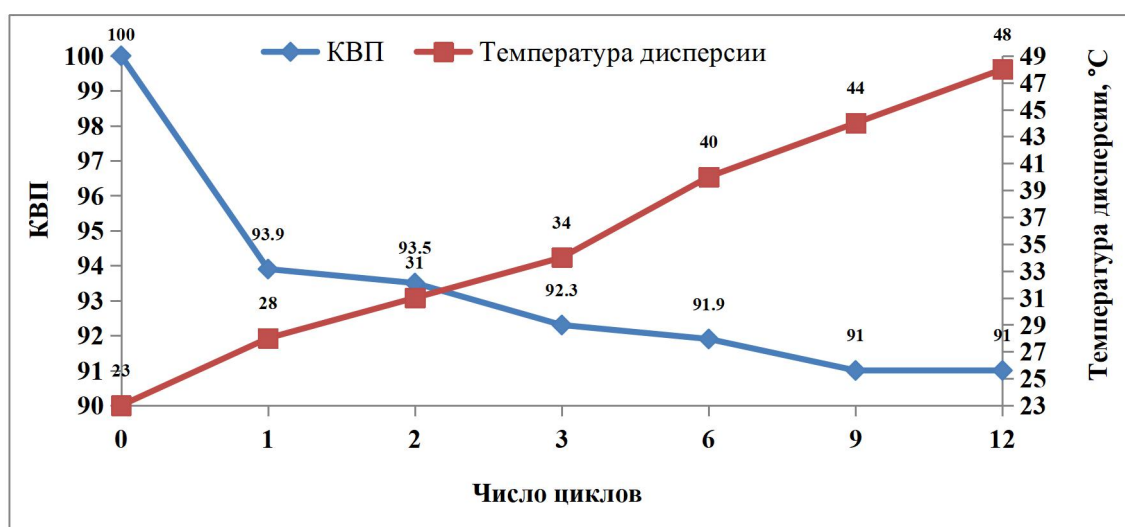


Рисунок 18–Графики изменения уровня включения ЛХС-1269 в липосому и температуры дисперсии при гомогенизации

В результате сравнительного анализа полученных данных по двум вышеуказанным методам установлено, что 3-х-кратная экструзия под давлением с применением поликарбонатных фильтров является более щадящим методом получения ОСЛ ЛХС-1269. В связи с этим метод гомогенизации при дальнейших технологических исследованиях не использовали.

### **3.5. Определение срока хранения липосомальной лекарственной формы ЛХС-1269**

Качество, безопасность и терапевтическая эффективность ЛС в процессе хранения находятся в прямой зависимости от способности ЛС сохранять свои свойства в пределах, заданных требованиями нормативной документации, в течение определенного срока при соответствующих условиях транспортировки и хранения, т. е. от его стабильности [16]. Поэтому целью данного эксперимента являлось установление срока годности разработанной модели липосомальной лекарственной формы ЛХС-1269 в форме водной дисперсии при условии ее хранения в холодильной камере при температуре  $+(4\pm 2)$  °С.

Для оценки стабильности препарата в процессе хранения проводили мониторинг качества дисперсии ОСЛ ЛХС-1269 с отбором проб через определенные промежутки времени от начала эксперимента. В качестве контрольных показателей разработанной ЛЛФ выбраны такие характеристики как внешний вид, вязкость и рН дисперсии, КВП, размер и  $\zeta$ -потенциал везикул, PDI.

Общий период наблюдения составил 2 месяца. На протяжении всего периода не отмечалось расслоения и изменения окрашивания дисперсии, однако снижались значения ее вязкости и рН (рисунок 19). Вероятно частичное окисление липидов липосомального бислоя в процессе хранения способствовало высвобождению ДВ, что характеризовалось постепенным снижением КВП (рисунок 19).

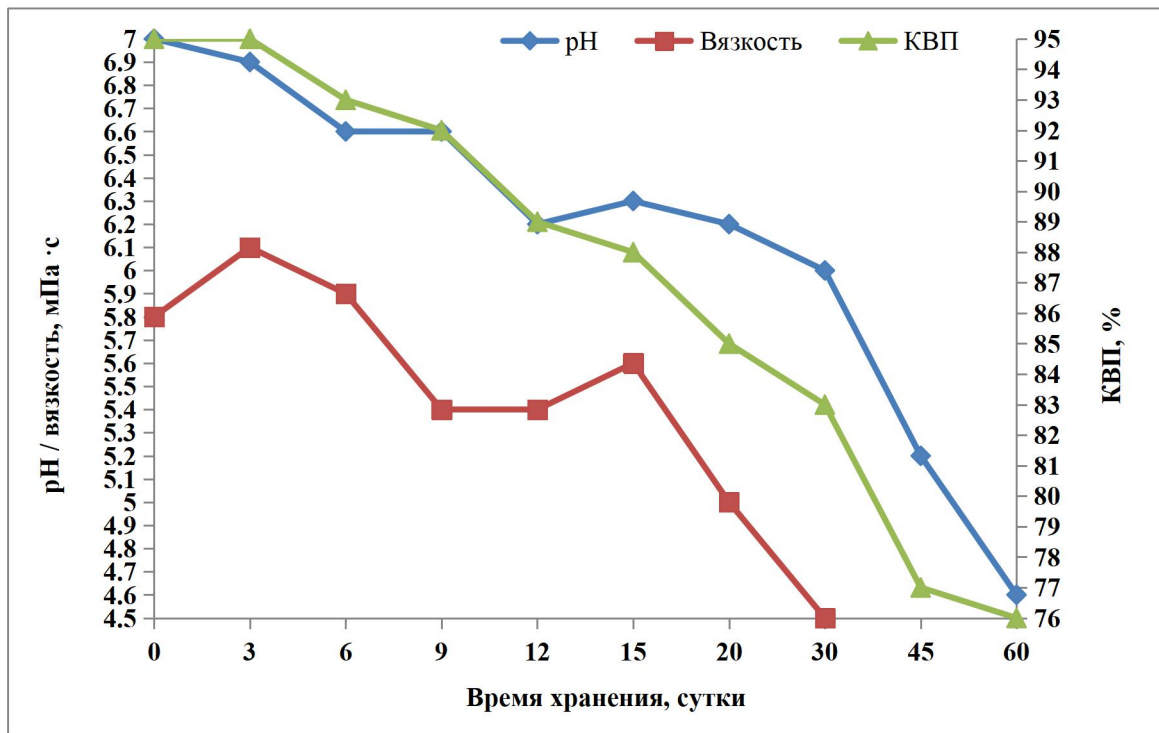


Рисунок 19 –Графики изменения pH, вязкости и КВП ЛХС-1269 в течение хранения ЛЛФ

Наряду с падением pH и уровня инкапсуляции ДВ в липосомы, о низкой стабильности водной дисперсии ОСЛ ЛХС-1269 свидетельствует значительное снижение поверхностного заряда везикул. Как представлено на диаграмме на рисунке за 3 суток хранения значение данного показателя изменилось с  $-(28,7 \pm 0,5)$  до  $-(20,4 \pm 0,7)$  мВ и далее не превышал  $-20,0$  мВ. (рисунок 20)

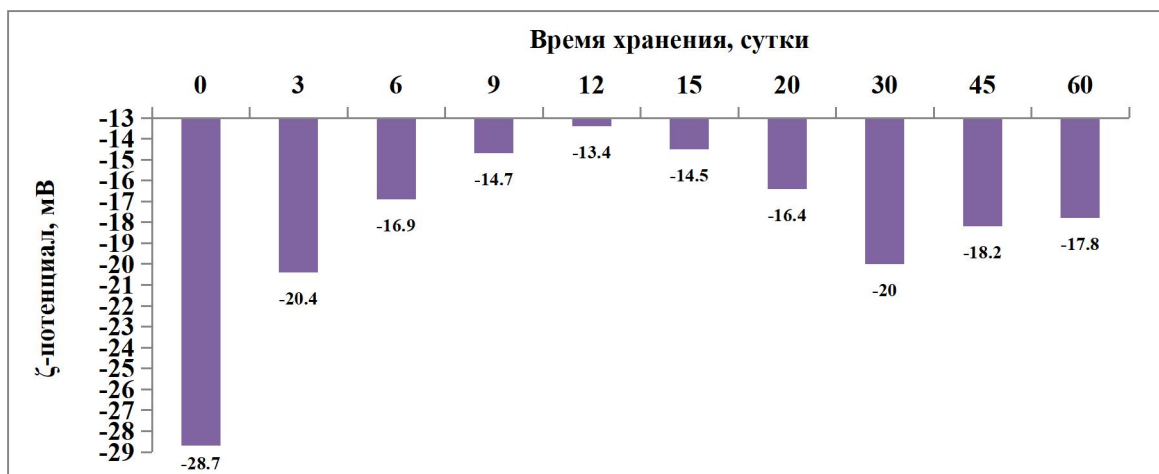


Рисунок 20 – График изменения ζ-потенциала ОСЛ ЛХС-1269 в течение хранения

В то же время мониторинг размера везикул показал, что в течение 30 суток наблюдались колебания средних значений данного параметра в пределах нормы –

от 150 до 188 нм и только спустя 45 и 60 суток хранения фиксировалось значительное укрупнение липосом (рисунок 21). При этом на всем промежутке исследования отмечались более низкие значения PDI в отличие от первоначального 0,287, что свидетельствует о высокой степени однородности липосомальной дисперсии ЛХС-1269.

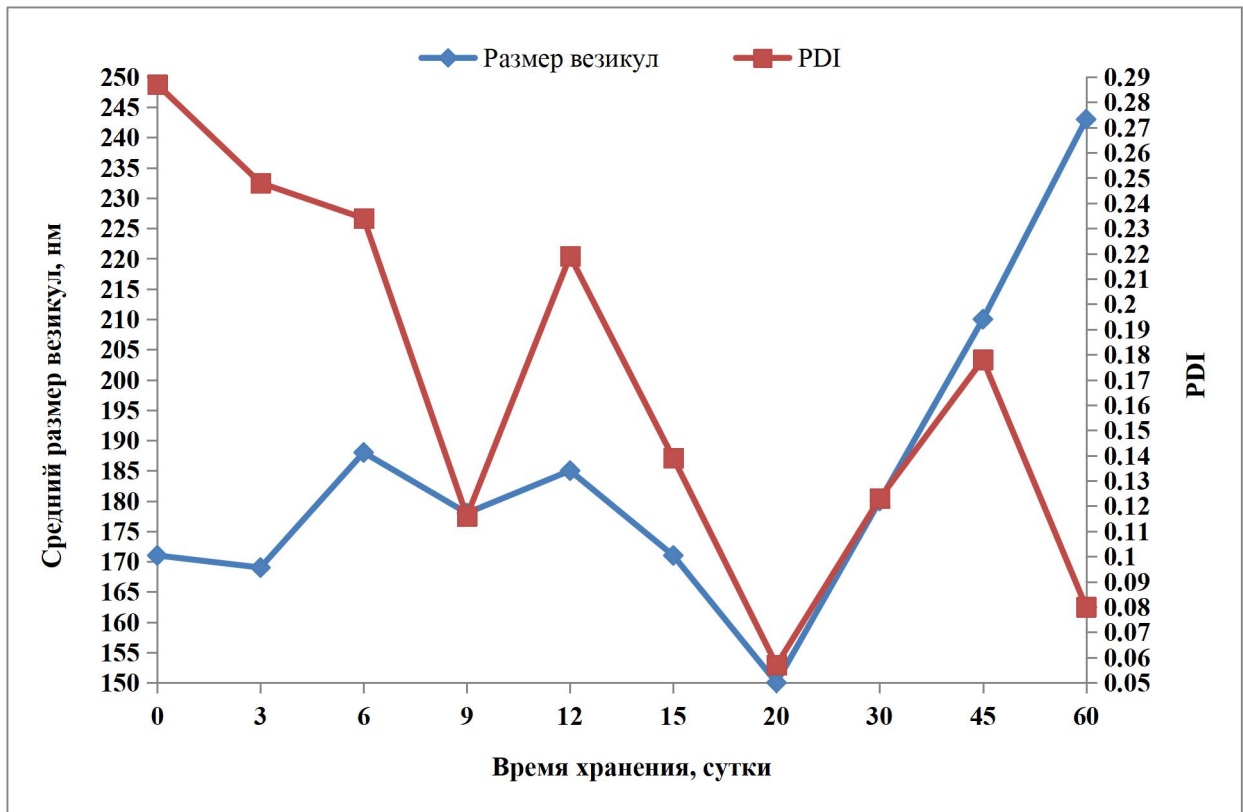


Рисунок 21–Графики изменения среднего размера везикул и PDI липосомальной дисперсии ЛХС-1269

Таким образом, представленные результаты исследования указывают на низкую стабильность водной дисперсии ОСЛ ЛХС-1269. Следовательно, требуется разработать более устойчивую при хранении лекарственную форму липосом изучаемого индолокарбазола.

### 3.6. Стабилизация липосомальной лекарственной формы ЛХС-1269 посредством лиофилизации

Сублимационная сушка или лиофилизация – один из наиболее часто используемых методов сушки и повышения стабильности некоторых фармацевтических продуктов, включая липосомы. Данный метод сушки

заключается в удалении воды из замороженного материала путем сублимации кристаллов льда. Процесс лиофилизации включает три отдельных этапа: замораживание, сублимация льда (первичная сушка) и, наконец, десорбция связанной воды (вторичная сушка). В лиофилизированном твердом состоянии химические или физические реакции подавляются или значительно замедляются, что приводит к улучшенной долгосрочной стабильности [77].

### **3.6.1. Выбор криопротектора для получения лиофилизированной формы липосом ЛХС-1269**

На всех этапах лиофилизации могут происходить физические модификации фосфолипидных везикул – изменение их размера и потеря включенного агента. Эти проблемы были решены с помощью специальных защитных веществ – криопротекторов (КП), например, сахарозы, глюкозы, трегалозы, маннитола, лактозы, которые обладают способностью взаимодействовать с головными группами фосфолипида посредством образования Н-связей, что приводит к снижению температуры фазового перехода. Следовательно, фазовые переходы во время дегидратации и регидратации будут исключены, а потеря инкапсулированных веществ будет предотвращена. Чтобы гарантировать успех процесса сублимации должны быть тщательно исследованы многие факторы, а именно тип фосфолипида, концентрация и тип конъюгированных полимеров, тип и точная концентрация КП, взаимодействие между КП и липосомами и др. [23].

С целью выбора оптимального КП для получения лиофилизата липосом ЛХС-1269 был проведен эксперимент, в рамках которого были исследованы такие углеводы, как манноза, сахароза и трегалоза. Известно, что за счет связывания с фосфолипидами, лиопротектор обладает защитными функциями в отношении липидного бислоя липосомы. Особое внимание следует обратить на тот факт, что именно соблюдение молярного соотношения фосфолипид/КП, а не конечная концентрация лиопротектора в дисперсии является одним из условий успешной лиофилизации. Исходя из особенностей химического строения и молекулярной массы соединений, маннозу в липосомальную дисперсию ЛХС-1269 вводили в

молярных соотношениях КП/ФХ 8:1 и 10:1, дисахара – 4:1 и 5:1. Не содержащая КП липосомальная дисперсия была использована в качестве контроля. На основании таких параметров как описание, регидратируемость/редиспергируемость, средний размер и  $\zeta$ -потенциал липосом была проведена сравнительная оценка качества полученных лиофилизатов до сублимационного высушивания (Таблица 8) и после регидратации в воде через определенные промежутки времени – 5, 15, 30, 60 и 180 минут [9].

Таблица 8– Средние значения размера и  $\zeta$ -потенциала липосом ЛХС-1269 до лиофилизации с различными КП

КП	Молярное соотношение КП/ФХ	Средний размер липосом, нм	Среднее значение $\zeta$ -потенциала липосом, мВ
Контроль	-	169	-22,3
Манноза	8:1	166	-16,4
	10:1	155	-24,6
Сахароза	4:1	146	-23,2
	5:1	146	-25,5
Трегалоза	4:1	153	-22,3
	5:1	155	-24,2

В процессе редиспергирования в воде для инъекций, исследуемые образцы контрольного лиофилизата, изначально представлявшие собой сухую пористую таблетированную массу, образовали неоднородную вязкую массу с двумя фракциями везикул. В течение исследуемого периода времени средний размер везикул для преобладающей фракции (90 и более %) варьировал в диапазоне 276–833 нм, для меньшей фракции – 21–56 нм. Значение  $\zeta$ -потенциала находилось в пределах от -26,6 до -28,9 мВ [9].

В ходе сравнения образцов лиофилизата с маннозой, сахарозой и трегалозой установлено, что в формировании лиофилизата роль химической природы углевода представляется незначительной, поскольку в процессе лиофилизации исследуемых липосом все вышеуказанные сахара проявили необходимые криопротекторные свойства. В сравнении со значениями, полученными до

лиофилизации, незначительное уменьшение или укрупнение среднего диаметра везикул и повышение  $\zeta$ -потенциала по модулю (рисунок 22 и 23) после регидратации наблюдалось во всех 6 образцах, за исключением лиофилизата с сахарозой 4:1, где в течение контрольного периода времени (180 мин) наблюдались существенные колебания размера везикул (рисунок 22) [9].

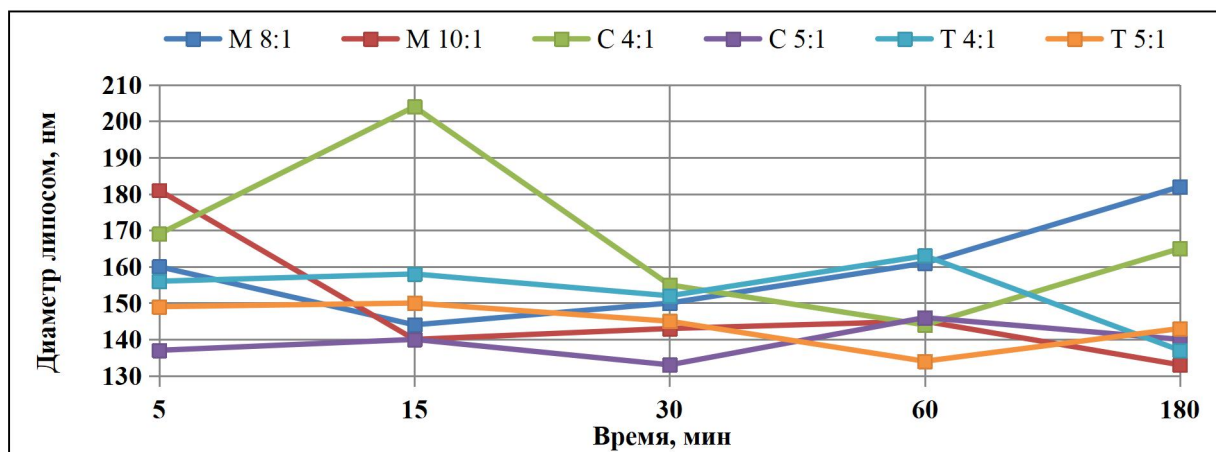


Рисунок 22 – Среднее значение размера липосом ЛХС-1269 через 5, 15, 30, 60 и 180 мин после редиспергирования в воде для инъекций лиофилизатов, содержащих исследуемые КП. Обозначения: М – манноза, С – сахароза, Т – трегалоза

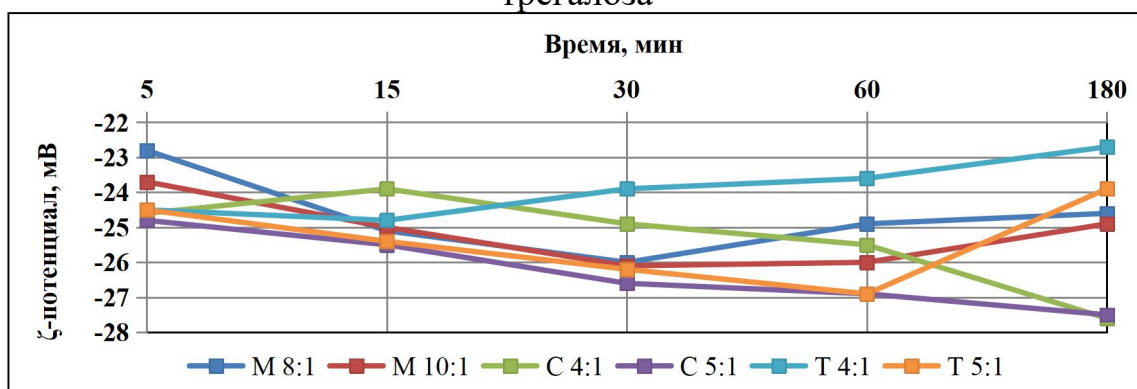


Рисунок 23 – Среднее значение  $\zeta$ -потенциала липосом ЛХС-1269 через 5, 15, 30, 60 и 180 мин после редиспергирования в воде для инъекций лиофилизатов, содержащих исследуемые КП. Обозначения: М – манноза, С – сахароза, Т – трегалоза

Неустойчивые во времени липосомальные дисперсии были получены при редиспергировании образцов с маннозой 8:1 и трегалозой 4:1. Минимальные значения диаметра и  $\zeta$ -потенциала везикул были зафиксированы спустя 15–30 мин после добавления воды для инъекций. Однако, впоследствии наблюдалось их укрупнение и снижение поверхностного заряда по модулю. При использовании КП в большей концентрации удалось повысить стабильность дисперсий.

Сохранение среднего размера липосом, содержащих маннозу 10:1, сахарозу 5:1 и трегалозу 5:1, отмечалось на протяжении 3 ч после редиспергирования лиофилизатов (рисунок 23). В то же время, устойчивое повышение уровня  $\zeta$ -потенциала с -24,8 до -27,5 мВ на протяжении 180 мин наблюдалось только для дисперсии, содержащей сахарозу в молярном соотношении КП/ФХ 5:1, что является доказательством стабильности липосомальной структуры и снижения риска слияния и/или агрегации везикул [9].

Таким образом, в ходе исследования образцов лиофилизированных липосом ЛХС-1269 с маннозой, сахарозой и трегалозой в двух молярных соотношениях КП/ФХ было установлено приоритетное влияние концентрации используемого углевода на качество продукта и незначительное влияние его структуры. Сравнительная оценка полученных лиофилизатов по показателям качества продемонстрировала, что сахароза, вводимая в состав ЛЛФ ЛХС-1269 в молярном соотношении сахароза/ФХ 5:1, обладает оптимальными криопротективными свойствами [9].

### **3.6.2. Выбор технологической стадии для введения криопротектора**

КП может быть введен в липосомальную дисперсию на различных технологических стадиях – при гидратации липидной пленки и после экструзии, непосредственно перед дозированием. В первом случае навеску сахарозы растворяли в предназначенной для смыва липидной пленки воде для инъекций. Полученный раствор фильтровали и использовали для получения дисперсии МСЛ ЛХС-1269. Во втором случае навеску сахарозы растворяли в готовой дисперсии ОСЛ и проводили стерилизующую фильтрацию.

Для выбора стадии введения КП дисперсии МСЛ и ОСЛ, полученных обоими способами, сравнивали значения вязкости, КВП, PDI, размера и  $\zeta$ -потенциала липосом. Результаты представлены в таблице 9.



Таблица 9 – Оценка показателей качества липосомальных дисперсий ЛХС-1269 для выбора стадии введения КП

Стадия введения КП	Образец для анализа	Показатель качества				
		средний размер везикул, нм	$\zeta$ -потенциал, мВ	PDI	КВП, %	вязкость, мПа·с
Гидратация липидной пленки	МСЛ	378±34	-(20,7±1,1)	0,396±0,020	91,0±0,9	12,3±1,8
	ОСЛ	195±7	-(21,5±0,4)	0,374±0,042	87,8±1,1	-
Экструзия	МСЛ	523±27	-(24,9±1,4)	0,549±0,046	97,9±1,0	7,9±1,2
	ОСЛ	175±9	-(26,7±0,5)	0,122±0,031	94,3±0,7	-

Согласно полученным данным, при использовании раствора сахарозы для гидратации липидной пленки отмечается значительное снижение уровня включения ДВ в липосомы и формирование более вязкой дисперсии МСЛ. Также при данном пути введения КП образующиеся МСЛ и ОСЛ в отличие характеризуются меньшими значениями поверхностного заряда, что свидетельствует об их более низкой стабильности. Растворение сахарозы в дисперсии ОСЛ ЛХС-1269 обеспечивает получение полупродуктов с лучшими показателями качества, поэтому для введения КП в состав лекарственной формы выбрана стадия экструзии.

### 3.6.3. Выбор объема наполнения флакона липосомальной дисперсией ЛХС-1269

С целью установления наибольшего возможного объема наполнения флакона был проведен процесс лиофилизации липосомальной дисперсии ЛХС-1269, при дозировании ее по 4, 5, 6 и 7 мл во флаконы вместимостью 20 мл и диаметром 30 мм [19]. Эффективность сублимационного высушивания ЛЛФ в различных объемах загрузки флакона оценивали по внешнему виду лиофилизата, его способности к редиспергируемости и физическим характеристикам дисперсии.

В результате данного процесса при объемах наполнения флакона от 4 до 6 мл была получена качественная продукция с отсутствием бракованных флаконов. При увеличении объема дисперсии до 7 мл после лиофилизации фиксировали

образование лиофилизата в виде неоднородной таблетки, не способной к регидратации [19]. Таким образом, максимально возможным объемом наполнения флакона липосомальной дисперсией для получения лиофилизированной формы является 6 мл, что соответствует содержанию ЛХС-1269 1,8 мг/флакон.

### **3.7. Обобщение технологии получения ЛЛЛФ ЛХС-1269**

В результате проведенных исследований разработана технология получения стерически стабилизированной ЛЛЛФ ЛХС-1269 для инъекционного применения, которая включает следующие стадии:

#### **1. Получение липидной пленки.**

Компоненты ЛЛФ – ЛХС-1269 и липиды – отвечают в требуемых количествах в соответствии с молярными соотношениями ЛХС-1269/ФХ=1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА=1:0,33:0003. С учетом растворимости веществ ЛХС-1269 смешивают с ацетоном и для увеличения скорости процесса растворения обрабатывают УЗ в течение 10–15 мин, липидные компоненты растворяют в хлороформе. Полученные растворы смешивают, затем переносят в колбу с круглым дном. После этого с использованием роторного испарителя при температуре водяной бани  $37 \pm 1$  °С под вакуумом органические растворители выпаривают из раствора до отложения на стенках колбы липидной пленки. Далее содержимое колбы досушивают под вакуумом (<200 мбар) до постоянной массы с целью полного удаления остатков ацетона и хлороформа.

#### **2. Гидратация липидной пленки.**

С использованием воды для инъекций липидную пленку гидратируют при температуре не выше 30 °С в условиях атмосферного давления с получением дисперсии МСЛ ЛХС-1269.

#### **3. Экструзия дисперсии МСЛ ЛХС-1269 и введение криопротектора**

С целью получения ОСЛ ЛХС-1269 свежеприготовленную дисперсию МСЛ фильтруют через нейлоновые мембранные фильтры с диаметром пор 1,2 и 0,45

мкм, затем пропускают не менее 3 раз через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм [11]. В дисперсию ОСЛ ЛХС-1269 добавляют сахарозу в молярном соотношении КП/ФХ 5:1, проводят стерилизующую фильтрацию с помощью нейлонового фильтра с диаметром пор 0,22 мкм.

#### 4. Дозирование и лиофилизация липосомальной дисперсии.

Стерильную дисперсию отмеривают во флаконы по 6 мл, которые затем помещают в камеру сублимационной сушки с последующей лиофилизацией. После окончания процесса флаконы укупоривают резиновыми пробками и закатывают алюминиевыми колпачками.

Обобщенная схема технологии получения ЛФ показана на рисунке 24.



Рисунок 24–Схема технологии получения ЛЛЛФ ЛХС-1269

В результате представленной технологии получена лекарственная форма «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для

инъекций 1,8 мг» следующего состава:

ЛХС-1269	1,8 мг
Яичный фосфатидилхолин	380 мг
Холестерин	64 мг
Пегелированный фосфатидилхолин	4,2 мг
Сахароза	855 мг
<b>Общая теоретическая масса во флаконе</b>	<b>1305 мг.</b>

Внешний вид лекарственной формы представлен на рисунке 25.



Рисунок 25–Внешний вид флакона с препаратом «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг»

### 3.8. Нарботка экспериментальных серий ЛЛФ ЛХС-1269

#### 3.8.1. Получение ЛЛФ ЛХС-1269 в лабораторных условиях

С целью отработки разработанной технологии и обеспечения проведения биологических исследований ЛФ *in vivo* получали *ex tempore* 3 опытные серии ЛЛФ ЛХС-1269 в малых объемах. В работе использовано лабораторное оборудование – испаритель роторный с отгонной колбой на 2 л и экструдер на 100 мл. Сравнительные характеристики серий представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Технологические и аналитические параметры экспериментальных серий ЛЛФ ЛХС-1269

Параметр сравнения		Серия		
		010119	020119	030219
Объем наработки, мл		67	59	46
Навески компонентов, мг	ЛХС-1269	23	18	14
	ФХ	4945	3870	3010
	холестерин	813	636	495
	ПЭГ-ДГФ	54	42	33
Объем воды для инъекций, мл		65	57	44
Объем дисперсии, мл	после гидратации	67	59	46
	после экструзии	64	54	41
Контроль качества дисперсии ОСЛ	концентрация ДВ, мг/мл	0,303	0,310	0,300
	размер везикул, нм	178±6	172±1,3	175±0,8
	ζ-потенциал, мВ	-(24,8±1,9)	-(22,5±1,1)	-(20,5±0,5)
	PDI	0,159±0,014	0,072±0,019	0,105±0,012

Для масштабирования технологии получения и стандартизации ЛЛЛФ ЛХС-1269 проводили наработку 3-х экспериментальных серий препарата с использованием опытно-промышленного оборудования – роторного испарителя с отгонной колбой объемом 20 л и экструдера с однократной загрузкой 800 мл. В таблице 11 приведены технологические параметры процесса получения экспериментальных серий ЛЛЛФ ЛХС-1269.

Таблица 11–Технологические параметры на этапах получения экспериментальных серий ЛЛЛФ ЛХС-1269

Этап/стадия	Операция	Параметр сравнения	Серия ЛЛЛФ		
			010319	020419	030419
Получение липидной пленки и ее гидратация	1. Взвешивание компонентов ЛЛФ	ЛХС-1269, мг	96		
		ФХ, мг	20640		
		Холестерин, мг	3392		
		ПЭГ-ДГФА, мг	224		
	2. Приготовление раствора компонентов ЛЛФ	Ацетон, мл	90	85	91
		Хлороформ, мл	200		
	3. Сушка липидной пленки	Значения давления, мбар – время, ч	220 – 1		
			190 – 1		
			150 – 1		
	4. Гидратация пленки	Объем воды для инъекций, мл	280		300
		Скорость ротора, об/мин – время	20 – 2 ч		30 – 1 ч 25 – 40 мин 18 – 1 ч 25 мин 8 – 35 мин
		Общее время гидратации	2 ч		3 ч 40 мин
Получение ОСЛ	1. Фильтрация дисперсии	Нейлоновые фильтры — диаметр пор, мкм	1,2 (1 раз) и 0,45 (1 раз)		
	2. Экструзия	Поликарбонатные фильтры — диаметр пор, мкм	0,2 – 3 раза		
Введение КП и лиофилизация ЛЛФ	1. Взвешивание КП	Сахароза, мг	45580		
	2. Стерилизующая фильтрация	Нейлоновые фильтры — диаметр пор, мкм	0,22 – 1 раз		
	3. Дозирование	Объем наполнения флакона, мл	6		
	4. Лиофилизация	Режим представлен в разделе 2.3.2			

Результаты анализа качества промежуточных и готового продуктов на стадиях технологии получения готовой ЛФ ЛХС-1269 отражены в таблице 12.

Таблица 12–Контроль качества промежуточных и готового продуктов на этапах получения экспериментальных серий ЛЛЛФ ЛХС-1269

Параметр сравнения		Серии		
		010319	020419	030419
<b>Гидратация липидной пленки</b>				
Объем дисперсии МСЛ, мл		290	282	300
Показатели качества	Концентрация, мг/мл	0,335	0,339	0,321
	Вязкость, мПа·с	23,0	22,7	32,3
	Размер, нм	551	197	181
	PDI	0,431	-	-
	ζ-потенциал, мВ	-24,8	-19,7	-16,0
<b>Экструзия</b>				
Объем дисперсии ОСЛ, мл		286	280	275
Показатели качества	Концентрация, мг/мл	0,312	0,320	0,315
	Вязкость, мПа·с	4,0	4,81	5,01
	Размер, нм	144	192	187
	PDI	0,125	-	-
	ζ-потенциал, мВ	-20,1	-25,8	-16,9
<b>Введение КП и стерилизующая фильтрация</b>				
Объем стерильной дисперсии, мл		310	290	270
Показатели качества	Концентрация, мг/мл	0,301	0,311	0,304
	Вязкость, мПа·с	3,89	5,18	4,94
	Размер, нм	137	185	179
	PDI	0,100	-	-
	ζ-потенциал, мВ	-22,5	-18,2	-25,0
<b>Контроль качества готовой ЛФ</b>				
Показатели качества	Концентрация, мг/мл	1,81	1,864	1,82
	Вязкость, мПа·с	3,26	4,29	3,32
	Размер, нм	138	170	175
	PDI	0,058	0,142	0,348
	ζ-потенциал, мВ	-23,2	-18,0	-25,5
	Средняя масса содержимого флакона, г	1,321	1,394	1,291



### ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 3

Разработаны состав и технология получения ЛЛЛФ ЛХС-1269. Установлено, что рациональным для технологии растворителем субстанции ЛХС-1269 является ацетон, а липидных компонентов – хлороформ. Для получения липосом ЛХС-1269 выбран состав с молярным соотношением компонентов ЛХС-1269/ФХ=1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА=1:0,33:0,003.

Оптимальное время сушки липидной пленки для удаления остаточных растворителей составляет не менее 30 мин, а условия ее гидратации – при температуре не выше 30 °С и атмосферном давлении. В результате сравнительного анализа типов мембранных фильтров при экструзии липосом ДВ определено, что 3-кратное пропускание дисперсии через поликарбонатные мембраны с диаметром пор 0,2 мкм – наиболее эффективный метод уменьшения размера везикул.

В связи с низкой стабильностью ЛЛФ ЛХС-1269 разработана технология ее лиофилизации. Установлено, что наилучшими криопротективными свойствами в отношении липосом ЛХС-1269 обладает сахароза, вводимая в дисперсию ОСЛ в молярном соотношении КП/ФХ 5:1 после стадии экструзии. Оптимальный объем дозирования липосомальной дисперсии во флаконы составляет 6 мл.

Для обеспечения проведения биологических исследований по предложенной технологии получены 3 опытные серии ЛЛФ ЛХС-1269 в малых объемах. Также произведены экспериментальные серии препарата с целью стандартизации ЛЛЛФ ЛХС-1269 и отработки ее технологии получения в условиях масштабирования.

## Глава 4. Разработка методик контроля качества и стандартизация ЛЛЛФ ЛХС-1269

### 4.1. Разработка методики ТСХ-анализа ЛЛЛФ ЛХС-1269

#### 4.1.1. Выбор подвижной фазы для хроматографического анализа ЛЛЛФ ЛХС-1269

Для изготовления элюента использовались растворители, которые широко применяются в рамках химико-фармацевтического анализа: пропанол-2, н-бутанол, метанол, хлороформ, этанол 95%, бензол, этилацетат, ацетон, аммиак водный 25%, гексан, ледяная уксусная кислота (ЛУК) и вода.

Оценка эффективности системы растворителей выполнялась по таким параметрам как:

- число зон адсорбции (пятен) веществ, образующихся в процессе разделения смеси компонентов;
- значение фактора удерживания  $R_f$  анализируемых веществ;
- время пробега подвижной фазы.

Всего нами было изучено 16 элюирующих систем, обладающих различным качественным и количественным составом. В таблице 13 представлены результаты исследования по выбору подвижной фазы.

Системы 1, 3, 6, 11, 12, 16 не применимы для ТСХ-анализа компонентов ЛЛЛФ ЛХС-1269, поскольку определяемые вещества не отрывались от линии старта либо обнаруженные пятна имели значения  $R_f$  менее 0,3 и более 0,7 и/или накладывались друг на друга. Из приведенной выше таблицы видно, что ни одна система не может анализировать всех определяемых компонентов ЛФ одновременно. Для идентификации ЛХС-1269 можно использовать элюэнт 4, 5, 8, 9, 10, 12, ФХ – 2, 7 и 15, холестерина – 4, 5, 9, 14. Смеси растворителей 4, 5 и 9 можно использовать для одновременного анализа ЛХС-1269 и холестерина.

Таблица 13–Оценка эффективности различных систем растворителей при ТСХ-анализе ЛЛЛФ ЛХС-1269

№	Система растворителей	Значение R <sub>f</sub>								Время/мин
		ЛХС-1269		ФХ		Холестерин		Сахароза		
		ЛФ	СОВС-1	ЛФ	СОВС-2	ЛФ	СОВС-3	ЛФ	СОВС-4	
1	хлороформ–ЛУК–бутанол–аммиак (12:6:3:1)	0,72	0,68	0,72	0,60	0,87	0,87	-	-	260
2	хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)	0,78	0,83	0,58	0,54	0,88	0,86	0,31	0,34	120
3	бутанол–гексан (1:1)	старт	старт	0,85	0,92	0,85	0,73	-	-	127
4	бутанол–ЛУК–вода (9:3:2)	0,58	0,44	старт	старт	0,68	0,61	-	-	244
5	бутанол–ЛУК–вода (6:3:2)	0,62	0,56	0,11	0,10	0,67	0,62	-	-	210
6	хлороформ–этанол (1:1)	0,79	0,78	0,08	0,14	0,79	0,78	-	-	122
7	хлороформ–этанол–ЛУК–ацетон–вода (6 : 2 : 2 : 1 : 1)	0,84	0,84	0,55	0,50	0,85	0,85	-	-	220
8	пропанол–ЛУК–вода (12 : 3: 1)	0,67	0,61	старт	старт	0,72	0,52	-	-	231
9	этанол	0,59	0,58	Старт	старт	0,66	0,65	0,23	0,31	145
10	бутанол–ЛУК–гексан (1 : 1: 1)	0,41	0,55	0,08	0,06	0,9	0,88	-	-	151
11	Ацетон–этилацетат–ЛУК–вода (15 : 10 : 3 : 5)	0,85	0,83	старт	старт	0,94	0,82	0,18	0,21	77
12	хлороформ–этанол–ЛУК ( 8 : 4 : 1)	0,70	0,70	0,08	0,08	0,88	0,81	-	-	120
13	Ацетон–ЛУК–вода(15 : 3 : 2)	0,92	0,90	0,08	0,08	0,97	0,68	0,65	0,61	99
14	пропанол–хлороформ–ЛУК–вода (27 : 23 : 3: 1)	0,69	0,73	0,18	0,10	0,50	0,50	-	-	130
15	хлороформ–этанол–ЛУК–вода (40 : 7 : 7 : 5 )	0,93	0,93	0,38	0,38	0,97	0,97	-	-	149
16	этилацетат–этанол–аммиак (9 : 1 : 2)	0,23	0,23	0,76	0,83	0,76	0,71	-	-	52

Поскольку из указанных смесей система 9 на основе этанола характеризуется наименьшим временем пробега и близкими значениями фактора удерживания анализируемых веществ в ЛЛФ и стандартов, она выбрана для ТСХ-анализа ЛХС-1269 и холестерина. Для определения ФХ наиболее подходит подвижная фаза «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)», поскольку при ее использовании анализ занимает наименьшее время, а  $R_f$  анализируемого вещества близок к значению 0,5. Система 13 «ацетон–ЛУК–вода (15:3:2)» выбрана для ТСХ-анализа сахарозы.

#### **4.1.2. Оценка пригодности хроматографических систем**

С целью оценки пригодности выбранной хроматографической системы, мы определили предел обнаружения анализируемых веществ. С этой целью мы провели испытания образцов с различными количественными показателями анализируемого вещества (ЛХС-1269, холестерин, ФХ и сахароза) и установили минимальное значение. Согласно результатам исследования, предел обнаружения ЛХС-1269 в системе «этанол» составил 0,1 мкг, холестерина – 0,5 мкг. Предел обнаружения ФХ в системе «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)» составил соответственно 0,5 мкг, сахарозы в системе «ацетон–ЛУК–вода (15:3:2)» – 0,1 мкг[19].

##### ***Оценка пригодности системы «этанол»***

*Приготовление исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1269* – методика показана в разделе 2.3.3.

*СОВС-1 – ацетоновый раствор ЛХС-1269 1 мг/мл* – методика показана в разделе 2.3.3.

*СОВС-3 – спиртовой раствор холестерина 4,15 мг/мл* – методика показана в разделе 2.3.3.

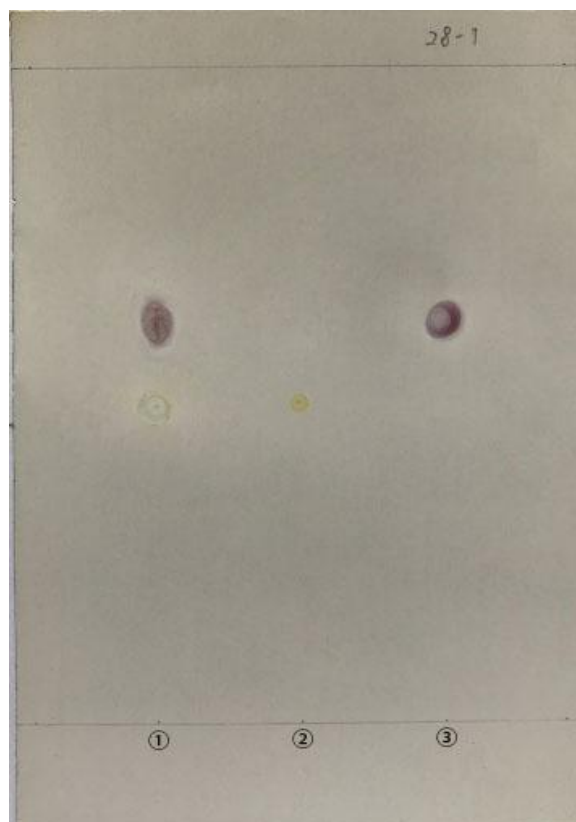
*Приготовление 20% серной кислоты* – методика показана в разделе 2.3.3.

На линию старта хроматографической пластинки наносят пробы: 2 мкл

исследуемого образца ЛФ (ЛХС-1269 – 0,5 мкг, холестерин – 16,6 мкг), 0,5 мкл СОВС-1 (ЛХС-1269 – 0,5 мкг), 4 мкл СОВС-3 (холестерин 16,6 мкг). Подсушенную на воздухе пластинку с нанесенными пробами помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей этанол, плотно закрывают крышкой и хроматографируют восходящим способом. По достижении фронтом элюента линии финиша пластинку вынимают из камеры и высушивают до полного удаления запаха растворителей в потоке теплого воздуха [19]. При облучении пластинки светом длиной волны 254 нм, ЛХС-1269 идентифицируют по характерным ярко-желтым пятнам. Обнаружение холестерина проводят, опрыскивая пластинку 20% серной кислотой с последующим нагреванием в сушильном шкафу до появления характерных розово-фиолетовых пятен[20]. На рисунке 26 представлены фото хроматографических пластинок с идентификацией ДВ и холестерина.



А: пластинки ПТСХ-АФ-А-УФ



Б: пластинки ПТСХ-АФ-А

Рисунок 26–Вид хроматограммы при ТСХ-анализе ЛХС-1269 и холестерина: ① – исследуемый образец ЛФ, ② – СОВС-1, ③ – СОВС-3

Значения Rf при проверке пригодности системы растворителей «этанол»:

– образец ЛФ: ЛХС-1269 – 0,58, холестерин – 0,66;

– СОВС-1 – 0,57;

– СОВС-3 – 0,65;

Таким образом, хроматографическая система «этанол» может быть признана пригодной при условии проявления округлого желтого пятна на пластинке напротив СОВЗ-1 (ЛХС-1269) и розового пятна напротив СОВЗ-3 при проявлении 20% серной кислотой.

***Оценка пригодности системы «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)»***

*Приготовление исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1269* – методика показана в разделе 2.3.3.

*СОВС-2 – спиртовой раствор ФХ 12,5 мг/мл* – методика показана в разделе 2.3.3.

*Подготовка йодной камеры* – методика показана в разделе 2.3.3.

На линию старта хроматографической пластинки наносят пробы: 2 мкл исследуемого образца ЛФ (ФХ – 25 мкг), 2 мкл СОВС-2 (ФХ – 25 мкг). После подсушивания на воздухе пластинки с нанесенными пробами помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1), плотно закрывают крышкой и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом элюента линии финиша пластинки вынимают из камеры и высушивают в потоке теплого воздуха до полного удаления запаха растворителя[19]. Для обнаружения ФХ пластинку помещают в камеру, насыщенную парами йода, и выдерживают около 1 мин до появления желтых пятен ФХ (рисунок 27). Совместно с ФХ проявляются светло-желтые быстро исчезающие пятна холестерина[11].

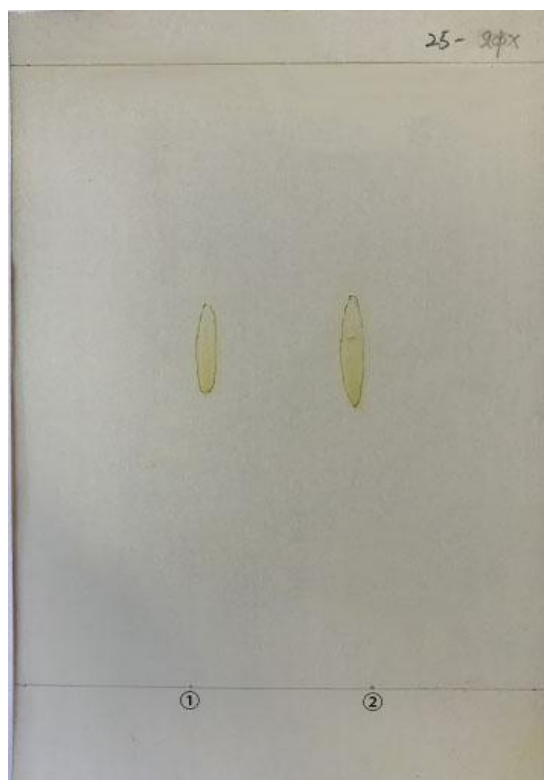


Рисунок 27–Вид хроматограммы при ТСХ-анализе ФХ: ① – исследуемый образец ЛФ, ② – СОВС-2

Значения  $R_f$  при проверке пригодности системы растворителей «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)»:

– образец ЛФ: ФХ – 0,58;

– СОВС-2 – 0,54;

Хроматографическую систему «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)» можно считать пригодной, если на пластинке СОВС-2 (ФХ) при проявлении параами йода детектируется пятно светло-желтого цвета.

#### ***Оценка пригодности системы «ацетон-ЛУК–вода (15:3:2)»***

*Приготовление исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1269 для анализа сахарозы – методика показана в разделе 2.3.3.*

*СОВС-4 – водный раствор сахарозы 1 мг/мл – методика показана в разделе 2.3.3.*

*Приготовление раствора  $\alpha$ -нафтола – методика показана в разделе 2.3.3.*

На линию старта хроматографической пластинки наносят пробы: 2 мкл исследуемого образца ЛФ (сахароза – 2,0 мкг), 2 мкл СОВС-4 (сахароза – 2,0 мкг).

После подсушивания на воздухе пластинки с нанесенными пробами помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей ацетон-ЛУК-вода (15:3:2), плотно закрывают крышкой и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом элюента линии финиша пластинки вынимают из камеры и высушивают в потоке теплого воздуха до полного удаления запаха растворителя. Пластинку опрыскивают раствором  $\alpha$ -нафтола и нагревают до появления темно-фиолетовых пятен сахарозы [11](рисунок 28).



Рисунок 28–Вид хроматограммы при ТСХ-анализе сахарозы: ① – исследуемый образец ЛФ, ② – СОВС-4

Значения  $R_f$  при проверке пригодности системы «ацетон-ЛУК-вода (15:3:2)»:

– образец ЛФ: сахароза – 0,65;

– СОВС-4 – 0,61;

Хроматографическую систему «ацетон-ЛУК-вода» можно считать пригодной в случае обнаружения розово-фиолетового пятна на пластинке напротив СОВС-4 (сахароза) при проявлении раствором  $\alpha$ -нафтола.



## 4.2. Разработка и валидация методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1269 в ЛЛЛФ

### 4.2.1. Изучение спектральных характеристик ЛХС-1269 и вспомогательных веществ ЛЛЛФ

Спектральные характеристики ЛВ и вспомогательных веществ были изучены в рамках первого этапа разработки методики количественного спектрофотометрического определения ЛХС-1269 в ЛЛЛФ [21].

В анализируемом диапазоне 200-800 нм электронного спектра поглощения спиртового раствора субстанции ЛХС-1269 при длинах волн  $(203\pm3)$ ,  $(285\pm3)$ ,  $(317\pm3)$  и  $(408\pm3)$  нм было обнаружено 4 максимума (Рисунок 29). Для проведения количественного анализа липосомального ЛХС-1269 был выбран наибольший по интенсивности пик при 317 нм [21].

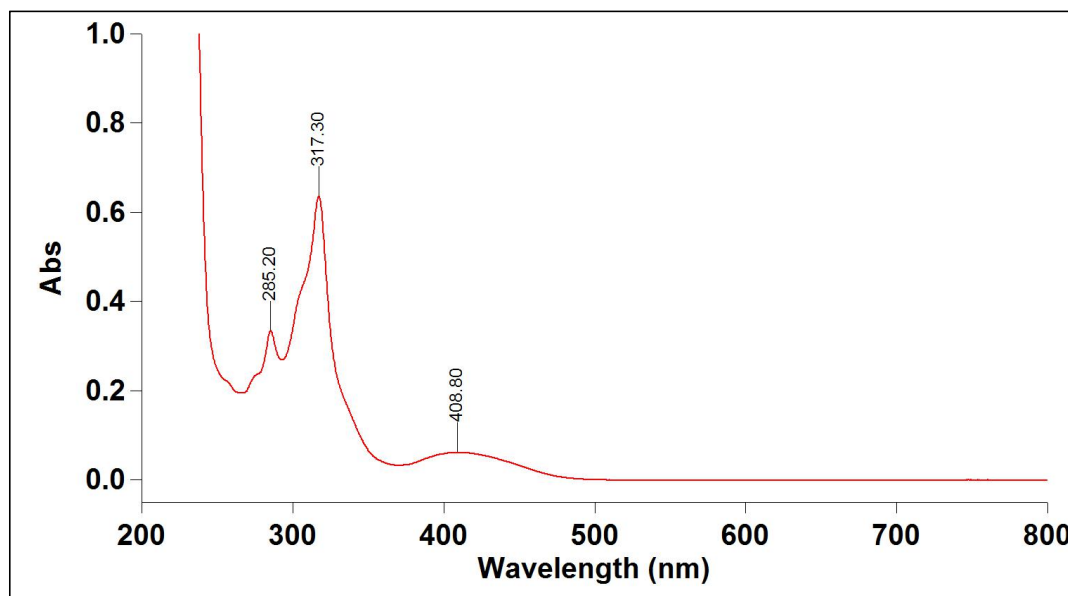


Рисунок 29–Электронный спектр поглощения спиртового разведения субстанции ЛХС-1269

Спектр поглощения «пустых» липосом без ДВ был исследован с целью изучения влияния вспомогательных веществ на абсорбционные характеристики ЛХС-1269 в ЛЛЛФ и ЛЛЛФ. В ходе исследования было зарегистрировано два пика – при  $(268\pm3)$  и  $(279\pm3)$  нм в диапазоне 200–400 нм, которые соответствовали максимумам поглощения вспомогательных ингредиентов ЛФ [21](Рисунок 30).

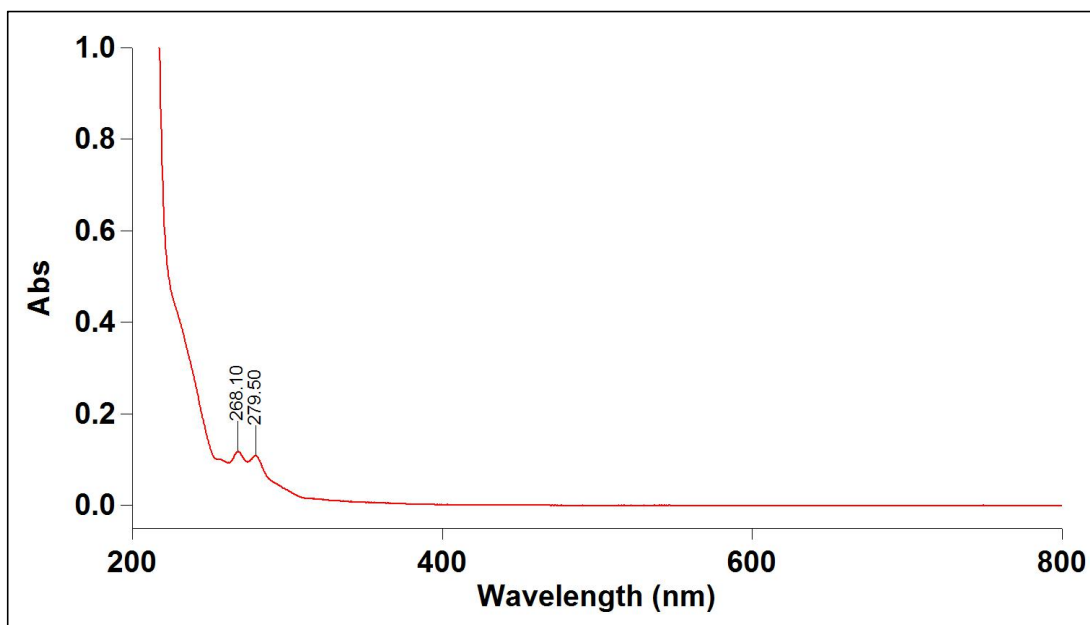


Рисунок 30 –Электронный спектр поглощения «пустых» липосом

С целью определения рабочей концентрации и контроля за соблюдением закона Бугера-Ламберта-Бера при длине волны 317 нм в диапазоне концентраций 0,001-0,010 мг/мл были изготовлены спиртовые разведения субстанции ЛХС-1269. Для этого к 1,0 мг субстанции ЛХС-1269 добавляли 1 мл ДМСО, после растворения добавляли 95% спирт[19]. Определенное количество образовавшегося раствора (раствор А) переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили спиртом до метки (раствор Б). Из полученного раствора Б с концентрацией ЛХС-1269 0,01 мг/мл были изготовлены спиртовые разведения согласно таблице 14 и измерена их оптическая плотность относительно спирта 95 %[19].

Таблица 14–Проверка соблюдения закона Бугера-Ламберта-Бера спиртовых растворов ЛХС-1269 при длине волны 317 нм

№	Спиртовой раствор		Концентрация ЛХС-1269 в растворе, мг/мл	Оптическая плотность
	Взятый объем раствора А, мл	Добавленный объем спирта 95 %, мл		
1	-	-	0,010	1,072
2	9	1	0,009	0,950
3	8	2	0,008	0,830
4	7	3	0,007	0,742
5	6	4	0,006	0,631
6	5	5	0,005	0,534
7	4	6	0,004	0,422

Продолжение таблицы 14

8	3	7	0,003	0,317
9	2	8	0,002	0,220
10	1	9	0,001	0,117

Во всем исследуемом диапазоне при длине волны 317 нм в спиртовых разведениях субстанции ЛХС-1269 наблюдалась линейная зависимость оптической плотности от концентрации (Рисунок 31), что свидетельствует о соблюдении закона Бугера-Ламберта-Бера [19]. Согласно ГФ 14, для количественного определения значение оптической плотности должно составлять не менее 0,2 и не более 0,9 (среднее 0,5–0,6). Исходя из этого, с целью получения анализируемых спиртовых растворов, проводили подбор разведения липосомальной дисперсии ЛХС-1269 и ее лиофилизата. В результате анализируемый образец разводим до получения спиртового раствора с теоретической концентрацией ДВ 0,0064 мг/мл, характеризующегося средним значением поглощения 0,648. Методики разведения приведены в разделе 4.2.2.

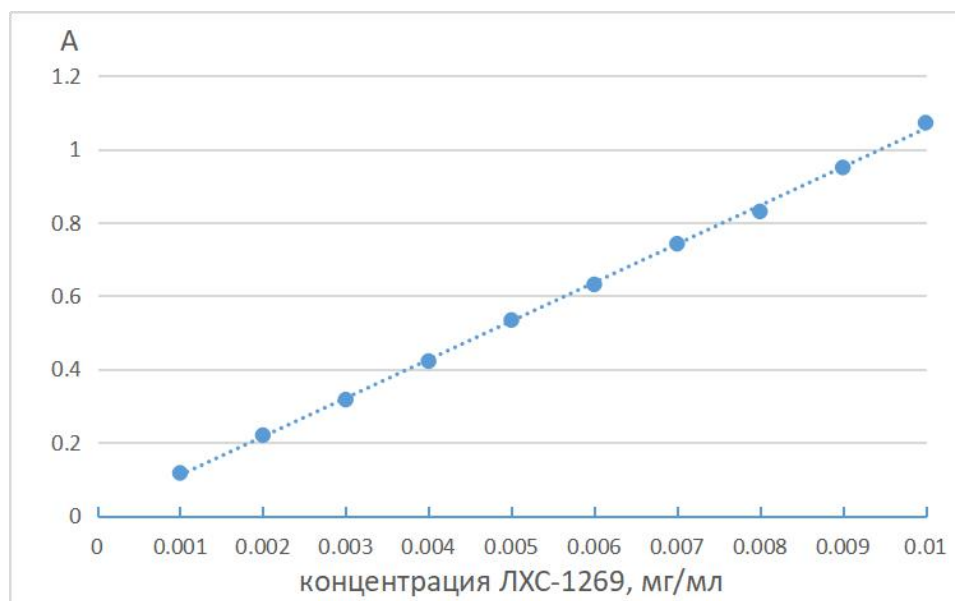


Рисунок 31–Оценка соблюдения закона Бугера-Ламберта-Бера спиртовых растворов ЛХС-1269 при длине волны 317 нм

#### 4.2.2. Количественное определение ЛХС-1269 в дисперсии и ЛЛЛФ

##### *Приготовление стандартного образца (СО)*

1 мг субстанции ЛХС-1269 растворяют в 1 мл ДМСО, добавляют 10–15 мл

95% спирта. В мерную колбу вместимостью 25 мл полученный спиртовой раствор количественно переносится и доводится спиртом до метки (раствор А). Для получения раствора Б, 4 мл раствора А отбирают в колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом до метки. Полученный раствор Б используется свежеприготовленным.

*Методика количественного спектрофотометрического анализа ЛХС-1269 в липосомальной дисперсии*

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл липосомальной дисперсии ЛХС-1269 и добавляют небольшое количество 95 %-го спирта, перемешивают, доводят спиртом до метки и вторично перемешивают. Величину оптической плотности полученного спиртового разведения измеряют в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм в максимуме поглощения (317±3) нм относительно раствора сравнения. Одновременно проводят измерение оптической плотности спиртового раствора СО относительно раствора сравнения [19].

Концентрация ЛХС-1269 в липосомальной дисперсии (С, мг/мл) рассчитывается по следующей формуле [19]:

$$C = A \times a_0 \times V / A_0 \times V_0,$$

где: – А и А<sub>0</sub> – оптические плотности растворов образца липосомальной дисперсии и СО ЛХС-1269, соответственно;

– а<sub>0</sub> – навеска СО ЛХС-1269, в мг;

– V и V<sub>0</sub> – разведения образца липосомальной дисперсии и СО ЛХС-1269, соответственно.

Согласно данным таблицы 15, относительная погрешность количественного определения ЛХС-1269 в липосомальной дисперсии составляет 0,27%.

Таблица 15–Результаты количественного определения ЛХС-1269 в липосомальной дисперсии

№ образца ЛЛФ ЛХС-1269	Оптическая плотность исследуемого раствора	Концентрация ЛХС-1269 в образце ЛЛФ	Статистические характеристики
1	0,754	0,373	$n=6; f=5;$ $X_{cp}=0,372;$ $S^2=1,6 \times 10^{-6};$ $S=1,26 \times 10^{-3};$ $Sx_{cp.}=5,14 \times 10^{-4};$ $t(95\%,9)=2,57;$ $\Delta x=0,001; \varepsilon=0,27\%$
2	0,750	0,371	
3	0,753	0,372	
4	0,755	0,373	
5	0,751	0,371	
6	0,756	0,374	

*Методика количественного спектрофотометрического анализа ЛХС-1269 в лиофилизате*

С целью получения гомогенного состояния липосомальной дисперсии, в содержимое флакона ЛЛЛФ ЛХС-1269 добавляют 5 мл воды и тщательно перемешивают. В мерную колбу вместительностью 25 мл переносят полученную дисперсию, добавляют небольшое количество спирта 95%, перемешивают и доводят спиртом до метки (раствор А). Далее, необходимо отобрать 4 мл раствора А в колбу вместимостью 50 мл и довести спиртом до метки (раствор Б). Затем, в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм измеряют величину оптической плотности полученного спиртового разведения в максимуме поглощения относительно раствора сравнения. Одновременно измеряют оптическую плотность спиртового раствора СО относительно раствора сравнения [19].

Содержание ЛХС-1269 во флаконе (X, мг) необходимо рассчитывать по формуле [19]:

$$X=A \times a_0 \times V / A_0 \times V_0,$$

где: – А и А<sub>0</sub> – оптические плотности растворов образца ЛЛЛФ и СО ЛХС-1269, соответственно;

– а<sub>0</sub> – навеска СО ЛХС-1269, в мг;

–  $V$  и  $V_0$  – разведения образца ЛЛЛФ и СО ЛХС-1269, соответственно.

Относительная погрешность количественного определения ЛХС-1269 в ЛЛЛФ составляет 0,43% (Таблица 16).

Таблица 16–Результаты количественного определения ЛХС-1269 в ЛЛЛФ

№ флакона ЛЛЛФ ЛХС-1269	Оптическая плотность исследуемого раствора	Содержание ЛХС-1269 во флаконе	Статистические характеристики
1	0,612	1,87	$n=6; f=5;$ $X_{cp}=1,86;$ $S^2=0,6 \times 10^{-4};$ $S=7,75 \times 10^{-3};$ $Sx_{cp.}=3,16 \times 10^{-3};$ $t(95\%,9)=2,57;$ $\Delta x=0,008; \varepsilon=0,43\%$
2	0,607	1,86	
3	0,608	1,86	
4	0,606	1,85	
5	0,611	1,87	
6	0,609	1,86	

#### 4.2.3. Валидация методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1269 в ЛЛЛФ

Специфичность. С целью подтверждения специфичности методики спектрофотометрического определения ЛХС-1269 в ЛФ были сравнены электронные спектры поглощения спиртовых разведений субстанции ДВ, ЛЛЛФ ЛХС-1269 и вспомогательных веществ [19]. Рисунок 32 наглядно демонстрирует схожесть максимумов кривых раствора субстанции (1) и ЛЛЛФ по форме и положению (3). Кроме того, рисунок 32 наглядно демонстрирует стремление к нулю оптической плотности вспомогательных веществ что в условиях рабочей длины волны, равной 317 нм. (кривая 2). Это свидетельствует о том, что она не оказывает значительного влияния на значение концентрации ДВ в ЛФ. Таким образом, электронный спектр поглощения липосомального ЛХС-1269 может быть использован с целью определения подлинности ЛХС-1269 в ЛФ, а методика может считаться специфичной [19].

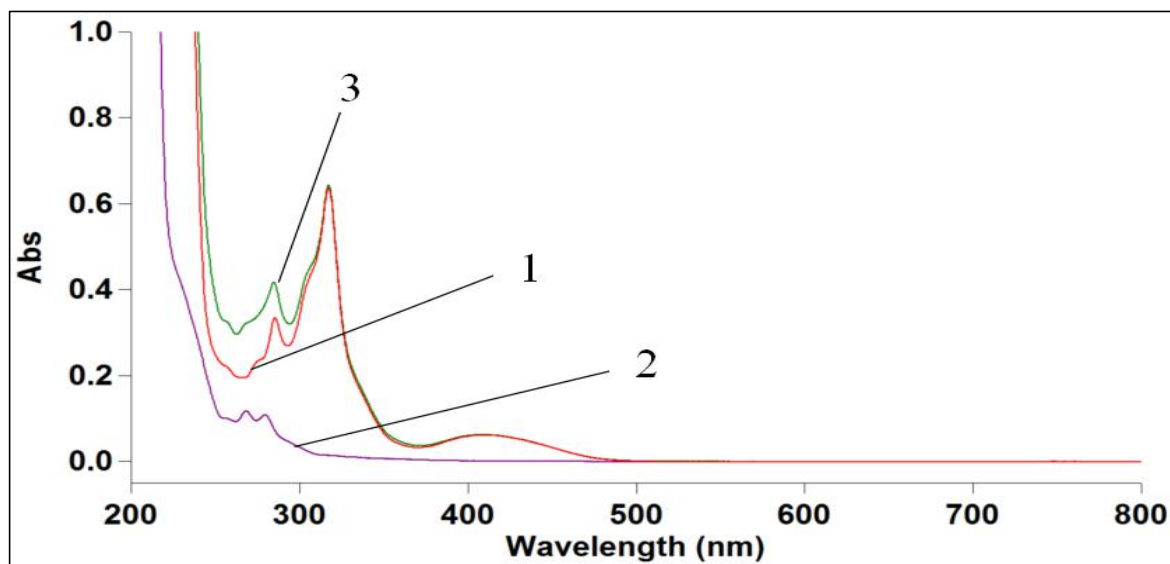


Рисунок 32–Электронные спектры поглощения спиртовых разведений субстанции ЛХС-1269 (1), вспомогательных веществ (2), ЛЛЛФ ЛХС-1269 (3)

*Диапазон применения.* Диапазон применения 80–120% от искомой концентрации аналитического раствора (1,8 мг/флакон) установлен для применения методики количественного определения ЛХС-1269 в ЛЛЛФ. Получаемые с использованием валидируемой методики результаты в пределах данного интервала должны соответствовать приемлемому уровню линейности, прецизионности и правильности [11, 19].

*Линейность.* Линейность заключается в потенциальном получении контрольным исследованием результатов испытаний (фактор отклика), значения которых прямо пропорциональны концентрации анализируемого вещества в пробе. Определение данного параметра способствует уточнению диапазона измерений конкретного аналитического испытания. Экспериментальные данные обрабатывают при помощи метода наименьших квадратов с использованием линейной модели [19]:

$$y=b \times x+a$$

где:  $y$  – величина отклика,  $x$  – количество или концентрация определяемого вещества,  $b$  – угловой коэффициент,  $a$  – свободный член, а также рассчитывают величину коэффициента корреляции  $r$  [19].

Линейность разработанной методики количественного определения ЛХС-1269 в ЛЛЛФ подтверждали на 5 уровнях концентрации веществ в пробе – 80, 90, 100, 110 и 120 % в заданном диапазоне применения при помощи измерения оптической плотности анализируемого раствора [19].

Аналитические растворы ЛЛЛФ, представляющие собой спиртовые растворы вспомогательных (кроме сахарозы) и действующего веществ с различными концентрациями ЛХС-1269, готовили для проведения исследования (Таблица 17). Добавление сахарозы в модельные смеси посчитали нецелесообразным в силу ее крайне плохой растворимости в спирте. Установлено, что при используемой в анализе длине волны ( $317 \pm 3$ ) нм, сахароза не поглощает излучение [19].

Таблица 17 – Навески ЛХС-1269 и вспомогательных веществ ЛЛЛФ, используемые для приготовления анализируемых растворов при валидации методики количественного анализа по характеристикам «линейность» и «правильность»

Состав		Модельная смесь				
		1	2	3	4	5
ЛХС-1269	%	80	90	100	110	120
	мг/мл (спиртовой раствор компонентов ЛФ)	0,24	0,27	0,3	0,33	0,36
	мг	1,44	1,62	1,8	1,98	2,16
ФХ, мг		387				
холестерин, мг		64				
ПЭГ-ДГФА, мг		4,2				

*Приготовление аналитического раствора.* Навески ФХ, холестерина и ПЭГ-ДГФА, указанные в таблице 18, растворяли в 20 мл спирта 95%. К точной навеске ЛХС-1269 (1,44; 1,62; 1,80; 1,98 или 2,16 мг) добавляли 2 мл ДМСО [19]. Полученные растворы необходимо количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили спиртом до метки (Раствор А). 4 мл раствора А переносится в колбу вместимостью 25 мл и доводили спиртом до метки (Раствор Б).

Величина оптической плотности полученного спиртового разведения была



измерена в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм в максимуме поглощения относительно спирта 95%. Значение оптической плотности для каждого аналитического раствора (№1–5) получали путем расчета среднего значения из нескольких измерений [19]. Результаты исследования приведены ниже в таблице 18.

Таблица 18–Оценка линейности методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1269

Концентрация ЛХС-1269		Значение оптической плотности, А	Регрессия
%	мг/мл		
80	0,24	0,474	0,477
90	0,27	0,530	0,527
100	0,30	0,580	0,578
110	0,33	0,628	0,628
120	0,36	0,676	0,678
<i>Статистические характеристики</i>			<i>Результаты</i>
Наклон прямой ( <i>b</i> )			1,673
Отрезок на оси ординат ( <i>a</i> )			0,076
Коэффициент корреляции <i>r</i>			0,999

В заданном диапазоне применения 80-120%, значение коэффициента корреляции более 0,999 свидетельствует о наличии тесной линейной зависимости между оптической плотностью и концентрацией ЛХС-1269. Примененное к результатам, уравнение линейной регрессии имеет вид  $y=1,673x+0,076$ .

*Правильность* методики количественного определения ЛХС-1269 в ЛЛЛФ была оценена с использованием 9 определений на 3-х концентрациях ДВ, которые охватывают диапазон применения 80–120%. Как и при оценке «линейности», готовили по 3 анализируемых раствора для каждой из 3-х концентраций – 80, 100 и 120% [19](в Таблице 19 соответственно растворы №1, 3 и 5). Опираясь на результаты 9 измерений, рассчитывали процентное отношение разности величин заданной и истинной к заданной величине (отклик), доверительный интервал и относительную погрешность среднего результата. Результаты исследования представлены в таблице 20. Разработанную методику количественного определения ЛХС-1269 в ЛЛЛФ можно квалифицировать как правильную, поскольку получаемые результаты близки к истинному значению и относительная погрешность среднего результата не превышает 0,37% [19].

Таблица 19–Оценка правильности методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1269

Концентрация, %	№ пробы	Содержание ЛХС-1269, мг		Отклик, %
		экспериментальное значение	действительное значение	
80	1	1,62	1,61	100,62
	2	1,62	1,62	100,00
	3	1,63	1,62	100,62
100	1	1,87	1,88	99,47
	2	1,89	1,88	100,53
	3	1,88	1,89	99,47
120	1	2,39	2,40	99,58
	2	2,39	2,39	100,00
	3	2,39	2,38	100,42
Статистические характеристики, %				Результаты
Среднее значение				100,08
Стандартное отклонение				0,238
Доверительный интервал (P=95 %)				100,08±0,37
Относительная погрешность среднего результата				0,37

*Повторяемость* методики оценивалась на основании результатов, полученных независимо в одной лаборатории (один исполнитель, одно оборудование) при одинаковых условиях в пределах короткого промежутка времени на 6 определениях при 100% концентрации аналитического раствора (1,8 мг/флакон). Полученные в условиях повторяемости результаты исследования методики представлены в таблице 20. Разработанная на основании полученных данных методика количественного анализа, в условиях повторяемости может быть признана прецизионной, поскольку коэффициент вариации показывает значение менее 10% (0,528%), вследствие чего изменчивость вариационного ряда может быть квалифицирована как незначительная [19].

Таблица 20–Оценка сходимости методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1269

Концентрация, %	№ пробы (флакона)	Содержание ЛХС-1269 в пробе, мг
100	1	1,901
	2	1,901
	3	1,898
	4	1,895
	5	1,885
	6	1,876
Статистические характеристики		Результаты
Среднее значение, мг/флакон		1,893

## Продолжение таблицы 20

Стандартное отклонение, мг/флакон	$1,0 \times 10^{-2}$
CV, %	0,528
Доверительный интервал (P=95%), мг/флакон	$1,893 \pm 0,007$
Относительная погрешность среднего результата, %	1,0

*Внутрилабораторная прецизионность* валидируемой методики была оценена на 6 определениях при 100% концентрации аналитического раствора (1,8 мг/флакон) в различных условиях работы (разные дни, разные исследователи) одной лаборатории.

В ходе сравнения результатов количественного определения ЛХС-1269 в ЛЛЛФ, которые были получены двумя исследователями, было установлено, что  $F_{расч} < F_{табл}$  и  $t_{расч} < t_{табл}$ . Это означает, что различия между средними значениями и стандартными отклонениями результатов можно признать случайными, а методику считать прецизионной в условиях внутрилабораторной прецизионности [19](Таблица 21).

Таблица 21–Оценка внутрилабораторной прецизионности методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1269

Концентрация, %	№ пробы (флакона)	Содержание ЛХС-1269 в пробе, мг	
		Исследователь 1	Исследователь 2
100	1	1,876	1,898
	2	1,895	1,885
	3	1,885	1,897
	4	1,898	1,902
	5	1,901	1,899
	6	1,901	1,889
Статистические характеристики		Результаты	
Среднее значение, мг/флакон		1,893	1,895
Стандартное отклонение, мг/флакон		$1,0 \times 10^{-2}$	$7,0 \times 10^{-3}$
Коэффициент вариации, %		0,528	0,369
Доверительный интервал (P=95%), мг/флакон		$1,893 \pm 0,01$	$1,895 \pm 0,007$
Относительная погрешность среднего результата, %		0,95	1,35
$F_{табл}(5\%; 5)=5,05$		0,42	
$t_{табл}(95\%; 10)=2,23$		0,4	

### 4.3. Стандартизация ЛЛЛФ ЛХС-1269

Для стандартизации ЛЛЛФ с целью изучения их стабильности после изготовления, равно как и в процессе хранения, используются такие базовые показатели как описание, количественное определение, подлинность, однородность дозирования, редиспергируемость (растворимость лиофилизата), размер липосом, однородность массы дозированных ЛФ, вязкость, значение рН,  $\zeta$ -потенциал везикул, а также потеря в массе при высушивании [21].

#### Описание и редиспергируемость

Все анализируемые образцы ЛЛЛФ представляли собой светло-желтую сухую пористую массу, при регидратации которой в течение 15 мин получалась однородная светло-желтая дисперсия.

#### *Подлинность*

*ТСХ-анализ (методика представлена в разделе 4.1.)* На хроматограмме при использовании системы «этанол» на пластинке напротив СОВС-1 (ЛХС-1269) видно округлое пятно желтого цвета при облучении УФ с длиной волны 254 нм, а напротив СОВС-3 при воздействии 20 % серной кислотой обнаруживается пятно розового цвета[11]. В системе «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)» на пластинке СОВС-2 (ФХ) при проявлении парами йода определяется желтое пятно. На хроматограмме при помощи системы «ацетон–ЛУК–вода (15:3:2)» на пластинке напротив СОВС-4 (сахароза) под воздействием раствора  $\alpha$ -нафтола образуется пятно фиолетово-розово цвета[11].

*Спектрофотометрический анализ (методика в разделе 4.2.)* Подлинность препарата может быть подтверждена при помощи электронного спектра поглощения спиртового раствора, приготовленного согласно методике количественного определения ЛЛЛФ ЛХС-1269. Описанный процесс привел к обнаружению трех максимумов – при длинах волн  $(285\pm 3)$ ,  $(317\pm 3)$  и  $(408\pm 3)$  нм[21] (Рисунок 33).

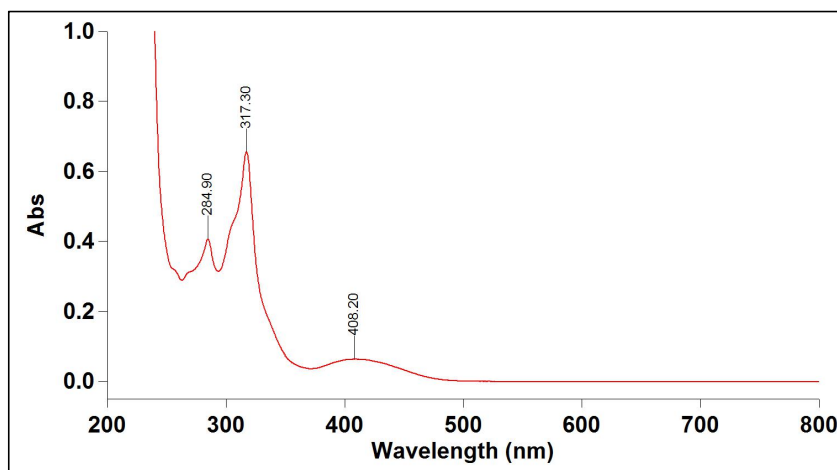


Рисунок 33–Спектр поглощения спиртового раствора ЛЛЛФ ЛХС-1269

### Количественное определение и однородность дозирования

При помощи метода спектрофотометрии в УФ- и видимой области с использованием рабочего стандартного образца при длине волны 317 нм определяли количественное содержание ЛХС-1269 в ЛФ. В ходе исследования было установлено, что входящие в состав ЛЛЛФ вспомогательные вещества не имеют собственного поглощения и не влияют на положение аналитического максимума в спектре ЛВ. По этой причине оптическую плотность аналитов измеряли с использованием спирта 95% в качестве раствора сравнения.

Оценка качества препарата по показателю «однородность дозирования» была проведена при помощи метода случайной выборки 10 флаконов от каждой испытуемой серии, а также количественного определения содержания ЛХС-1269 в каждом отобранном образце. Результаты анализа отражены в процентных показателях от номинального содержания ЛХС-1269 в одном флаконе – 1,8 мг (100%)[19]. Результаты оценки количественного содержания ЛХС-1269 в ЛЛЛФ приведены в таблице 22. Содержание ЛХС-1269 исследуемых образцов ранжировалось от 1,659 до 1,965 мг во флаконе, что представляет собой допустимую норму отклонения от номинала – 1,8 мг.

Таблица 22-Оценка качества ЛЛЛФ ЛХС-1269 по показателям «Количественное определение» и «Однородность дозирования»

Серия препарата	№ образца	Содержание ЛХС-1269		Статистические характеристики
		мг/флакон	% от номинала	
010319	1	1,78	98,9	$n=10; f=9;$ $X_{cp}=1,806; S^2=2,5 \times 10^{-4};$ $S=1,57 \times 10^{-2};$ $Sx_{cp.}=4,98 \times 10^{-3};$ $t(95\%,9)=2,26; \Delta x=0,011;$ $\varepsilon=0,55\%$
	2	1,81	100,6	
	3	1,82	101,1	
	4	1,81	100,6	
	5	1,79	99,4	
	6	1,83	101,7	
	7	1,82	101,1	
	8	1,79	99,4	
	9	1,81	100,6	
	10	1,80	100,0	
020419	1	1,82	101,1	$n=10; f=9;$ $X_{cp}=1,813; S^2=5,3 \times 10^{-4};$ $S=2,31 \times 10^{-2};$ $Sx_{cp.}=7,31 \times 10^{-3};$ $t(95\%,9)=2,26; \Delta x=0,017;$ $\varepsilon=0,91\%$
	2	1,81	100,6	
	3	1,78	98,9	
	4	1,80	100,0	
	5	1,83	101,7	
	6	1,79	99,4	
	7	1,84	102,2	
	8	1,85	102,7	
	9	1,82	101,1	
	10	1,79	99,4	
030419	1	1,78	98,9	$n=10; f=9;$ $X_{cp}=1,801; S^2=3,7 \times 10^{-4};$ $S=1,92 \times 10^{-2};$ $Sx_{cp.}=6,08 \times 10^{-3};$ $t(95\%,9)=2,26; \Delta x=0,013;$ $\varepsilon=0,56\%$
	2	1,81	100,6	
	3	1,82	101,1	
	4	1,80	100,0	
	5	1,83	101,7	
	6	1,78	98,9	
	7	1,82	101,1	
	8	1,81	100,6	
	9	1,79	99,4	
	10	1,77	98,3	

### Размер везикул

Анализ диаметра липосом ЛХС-1269 был проведен при помощи метода корреляционной спектроскопии светорассеяния. Из таблицы 23 видно, средний размер липосом для трех исследуемых серий ЛЛЛФ не превышал 190 нм.

Таблица 23–Оценка качества ЛЛЛФ ЛХС-1269 по показателям «Размер везикул», « $\zeta$ -потенциал везикул», «рН» и «вязкость»

Показатель	№ флакона	Серия		
		010319	020419	030419
Размер везикул, нм	1	138±5	170±7	187±6
	2	129±4	178±4	192±10
	3	126±5	187±6	195±7
	4	150±5	185±8	183±6
	5	132±7	184±8	191±7
	Среднее	135±5	181±7	190±7
$\zeta$ -потенциал везикул, mV	1	-(22,8±2,4)	-(28,2±1,8)	-(26,7±1,9)
	2	-(24,4±0,1)	-(30,1±0,8)	-(23,6±1,5)
	3	-(23,3±0,3)	-(25,4±0,6)	-(25,3±0,7)
	4	-(21,6±0,8)	-(24,4±1,1)	-(26,6±0,8)
	5	-(23,2±0,6)	-(21,3±1,2)	-(18,6±1,4)
	Среднее	-(23,1±0,8)	-(25,9±1,1)	-(24,2±1,3)
рН	1	7,1	6,2	6,6
	2	7,0	6,1	6,6
	3	7,0	6,1	6,5
	4	6,9	6,1	6,6
	5	7,0	6,1	6,6
	Среднее	7,0	6,1	6,6
Вязкость, мПа·с	1	3,26	4,29	3,32
	2	4,30	4,62	4,80
	3	4,17	4,42	3,85
	4	3,18	3,86	3,51
	5	3,47	4,68	3,88
	Среднее	3,68	4,37	3,87

### $\zeta$ -потенциал везикул

$\zeta$ -потенциал везикул был определен при помощи измерения электрофоретической подвижности липосом. В результате анализа установлено, что поверхностный заряд липосом ЛХС-1269 после лиофилизации находился в диапазоне  $-(18,6-30,1)$  мВ. Результаты показаны в таблице 23.

### Вязкость дисперсии

Динамическую вязкость липосомальной дисперсии, полученной при регидратации лиофилизата, анализировали с использованием вибрационного вискозиметра в интервале температур 21–25 °С. Средняя значения вязкости образцов находились в диапазоне 3,18–4,80 мПа·с. Результаты показаны в таблице 23.

## Значение рН

С целью потенциометрического определения показателя к содержимому флакона предварительно добавлялось 10 мл воды для инъекций, после чего полученная смесь в течение 15 мин перемешивалась до получения однородной дисперсии [11]. Для всех наработанных серий ЛЛЛФ ЛХС-1269 значение рН располагалось в диапазоне 6,1–7,0. Результаты показаны в таблице 23.

## Однородность массы дозированных ЛФ

Каждый из 20 флаконов каждой серии был проанализирован относительно средней массы содержимого. Согласно ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм» допустимый диапазон отклонения от средней массы составляет  $\pm 10\%$ [19]. Колебания массы содержимого исследуемых флаконов указанных серий ЛЛЛФ ЛХС-1269 составляли разброс в пределах 1,289–1,371 г. Результаты показаны в таблице 24.

Таблица 24–Оценка качества ЛЛЛФ ЛХС-1269 по показателю «Масса содержимого флакона»

№ флакона	Масса содержимого, г			№ флакона	Масса содержимого, г		
	Серия				Серия		
	010319	020419	030419		010319	020419	030419
1	1,367	1,324	1,294	11	1,324	1,298	1,294
2	1,371	1,325	1,297	12	1,345	1,319	1,301
3	1,368	1,321	1,306	13	1,351	1,335	1,297
4	1,333	1,325	1,304	14	1,339	1,299	1,314
5	1,324	1,324	1,289	15	1,327	1,296	1,319
6	1,321	1,326	1,299	16	1,335	1,318	1,319
7	1,329	1,330	1,301	17	1,337	1,305	1,296
8	1,319	1,331	1,312	18	1,328	1,322	1,296
9	1,319	1,324	1,321	19	1,347	1,316	1,318
10	1,323	1,312	1,319	20	1,325	1,318	1,310
				<b>Средняя</b>	1,337	1,318	1,305

## Потеря в массе при высушивании

Анализ препарата относительно содержания влаги проводился в соответствии с методикой, представленной в разделе 2.3.3. Во всех исследованных образцах потеря в массе в ходе высушивания не превышала



показателя 2,4%.

На основании проведенных исследований выбраны показатели качества и их нормативные значения для стандартизации ЛЛЛФ ЛХС-1269 и последующей разработки проекта НД. Спецификация на «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» представлена в Приложении А.

#### **4.4. Исследование стабильности ЛЛЛФ ЛХС-1269 в процессе хранения**

С целью определения срока годности препарата «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» были изучены показатели стабильности 3 экспериментальных серий 010319, 020419 и 030419, заложенных после получения на хранение в морозильную камеру с температурой -18...-20 °С[19].

Согласно требованиям ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств», оценка качества образцов препарата проводилась в течение первого года хранения через каждые 3 месяца и через каждые 6 месяцев – на второй год хранения после получения. Контроль качества экспериментальных серий ЛЛЛФ ЛХС-1269 производился в установленные сроки по показателям качества, которые были предложены для стандартизации разработанного препарата [19, 21]. Результаты контроля качества заложенных на хранение серий ЛФ «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» представлены в таблице 25.

Таблица 25–Изучение стабильности ЛФ «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг»

Наименование показателя	Норма	Срок хранения, мес.	Результаты контроля качества		
			Серии		
			010319	020419	030419
1. Описание 2. Редиспергируемость 3. Подлинность	1.Сухая пористая масса желтого цвета 2.При добавлении к содержимому флакона 5 мл воды 3.ЭСП/ТСХ	0	Соответствует норме		
		3			
		6			
		9			
		12			
		18			
		24			
		30			
Содержание цифетрилина во флаконе, мг	1,75–1,91	0	1,76	1,86	1,82
		3	1,78	1,83	1,81
		6	1,78	1,75	1,75
		9	1,78	1,82	1,89
		12	1,79	1,82	1,89
		18	1,75	1,86	1,91
		24	1,76	1,77	1,83
		30	1,74	1,81	1,78
Однородность массы содержимого флакона, г	1,294–1,434	0	1,371	1,434	1,293
		3	1,367	1,325	1,294
		6	1,326	1,331	1,304
		9	1,333	1,319	1,312
		12	1,329	1,335	1,300
		18	1,324	1,318	1,296
		24	1,326	1,319	1,296
		30	1,325	1,317	1,292
Размер липосом, нм	не более 195	0	138 ± 0,5	170 ± 0,8	187 ± 2,0
		3	129 ± 2,6	178 ± 4,3	192 ± 1,6
		6	126 ± 1,1	187 ± 2,4	195 ± 0,7
		9	194 ± 1,2	185 ± 0,8	183 ± 0,4
		12	150 ± 0,5	184 ± 0,8	191 ± 2,9
		18	132 ± 2,3	184 ± 5,3	178 ± 2,7
		24	127 ± 1,6	169 ± 0,8	177 ± 1,6
		30	172 ± 0,4	193 ± 2,4	187 ± 2,3
Значение pH	6,1-7,0	0	7,05	6,15	6,60
		3	6,95	6,10	6,62
		6	7,00	6,12	6,55
		9	6,90	6,05	6,61
		12	6,96	6,09	6,58
		18	6,91	6,13	6,66
		24	6,79	6,07	6,52
		30	6,66	6,52	6,76

## Продолжение таблицы 25

ζ-потенциал везикул, mV	-(18,6–30,1)	0	-(22,8±2,4)	-(28,2±1,8)	-(26,7±1,9)
		3	-(24,4±0,1)	-(30,1±0,8)	-(23,6±1,5)
		6	-(23,3±0,3)	-(25,4±0,6)	-(25,3±0,7)
		9	-(21,6±0,8)	-(24,4±1,1)	-(26,6±0,8)
		12	-(23,2±0,6)	-(21,3±1,2)	-(18,6±1,4)
		18	-(21,0±1,1)	-(20,5±0,3)	-(21,5±0,8)
		24	-(19,7±0,7)	-(19,0±1,7)	-(21,7±1,2)
		30	-(19,0±1,3)	-(18,1±1,4)	-(18,8±1,4)
Вязкость, мПа·с	3,2–4,2	0	3,26	4,29	3,32
		3	4,30	4,62	4,80
		6	4,17	4,42	3,85
		9	3,18	3,86	3,51
		12	3,47	4,68	3,88
		18	-	-	-
		24	3,57	3,88	3,41
		30	3,76	-	4,09
Потеря в массе при высушивании, %	не более 3,00	0	0,31	0,51	0,26
		3	0,42	0,42	0,24
		6	0,41	0,53	0,37
		9	0,33	0,45	0,22
		12	0,39	0,46	0,31
		18	0,32	0,32	0,39
		24	0,40	0,43	0,30
		30	0,43	0,55	0,36

Данные таблицы свидетельствуют об отсутствии значимых изменений в качестве препарата и разработанная ЛЛЛФ ЛХС-1269 сохраняет стабильность в течение 24 месяца хранения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 4

С целью контроля качества ЛЛФ ЛХС-1269, а также ее лиофилизата были разработаны методики качественного ТСХ-анализа компонентов препарата и количественного спектрофотометрического определения содержания ДВ. Для достижения поставленной цели были выбраны системы растворителей, способные обеспечить оптимальные условия разделения компонентов ЛФ. Для анализа ЛХС-1269 и холестерина предложена система «этанол», ФХ – «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)», сахарозы – «ацетон–ЛУК–вода (15:3:2)». Проведена оценка пригодности выбранных хроматографических систем.

Для количественного определения ЛХС-1269 в ЛФ в качестве рабочей длины волны была выбрана полоса поглощения высокой интенсивности с показателем максимума  $317 \pm 3$  нм, в условиях которой вспомогательные компоненты не поглощают излучение. Относительная погрешность количественного анализа концентрации ЛХС-1269 в липосомальной дисперсии до и после лиофилизации составила менее, чем 1%. Исходя из результатов валидационной оценки можно сделать вывод о том, что разработанная методика является правильной, прецизионной, специфичной и линейной.

На основании таких показателей качества, как регидратируемость, подлинность, описание, однородность массы дозированных лекарственных форм, количественное определение, размер везикул, рН,  $\zeta$ -потенциал везикул, вязкость и потеря в массе при высушивании была проведена стандартизация ЛЛЛФ ЛХС-1269. На основании показателей качества стандартизации, была изучена стабильность трех экспериментальных серий ЛЛЛФ ЛХС-1269 в процессе хранения, что способствовало установлению срока годности для препарата «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» 24 месяца.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Установлен оптимальный состав стерически стабилизированной ЛЛФ ЛХС-1269 для внутривенного введения с молярным соотношением компонентов ЛХС-1269/ФХ=1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА= 1:0,33:0,003.
2. Разработана технология получения устойчивой при хранении ЛЛЛФ ЛХС-1269 для внутривенного введения. Подобран эффективный КП – сахараза, вводимая в состав ЛФ в молярном соотношении КП/ФХ 5:1 с целью обеспечения максимальной стабилизации липосом в процессе лиофилизации.
3. Разработана методика качественного хроматографического анализа компонентов ЛФ ЛХС-1269 с использованием хроматографических пластинок «Sorbfil». Для обнаружения ЛХС-1269 и холестерина выбрана и протестирована система на основе этанола, ФХ – «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)», сахарозы – «ацетон–ЛУК–вода (15:3:2)». Разработана и валидирована методика количественного спектрофотометрического анализа липосомального ЛХС-1269 при длине волны  $317 \pm 3$  нм с использованием стандартного образца.
4. Выбраны показатели качества для стандартизации ЛЛЛФ ЛХС-1269 для инъекционного введения. В результате изучения параметров ее стабильности установлен предварительный срок хранения препарата – 24 месяца.
5. Подготовлен проект нормативной документации на ЛФ «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг».

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ГПИ – гликозидное производное индолокарбазола

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДВ – действующее вещество

ДМСО – диметилсульфоксид

ИДЗ – индоцианиновый зеленый

КВП – количество включенного препарата

КП – криопротектор

ЛВ – лекарственное вещество

ЛЛЛФ – лиофилизированная липосомальная лекарственная форма

ЛЛФ – липосомальная лекарственная форма

ЛС – лекарственное средство

ЛУК – ледяная уксусная кислота

ЛФ – лекарственная форма

М – молярная масса

МГФ – микрогидродинамическая фокусировка

МОЛ – малые однослойные липосомы

МРТ – магнитно-резонансная томография

МСЛ – многослойные липосомы

Н – нейлоновый

ОСЛ – однослойные липосомы

ПВДФ – поливинилиденфторидовый

ПЭС – полиэфирсульфоновый

ПК – поликарбонатный

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭГ-ДФА–полиэтиленгликоль-2000-дистеароил-фосфатидилэтаноламин

РЭС – ретикуло-эндотелиальная система

СЭЦ – сложный эфир целлюлоза

СКЖ – сверхкритические жидкости

СО – стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТЧЛ – термочувствительная липосома

ТРО – торможения роста опухоли

УПЖ – увеличение продолжительности жизни

ФХ – фосфатидилхолин

DMPC – димиристоилфосфатидилхолин

DMPG – димиристоилфосфатидилглицерин

DPPC – дипальмитоилфосфатидилхолин

PDI – индекса полидисперсности

PGP – P-гликопротеин

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов. Вестник РАМН 2012;(3):23–30.
2. Вискозиметр в кармане – это реальность... Лаборатория и производство. Исследователю и инженеру 2018;(4):52–3.
3. Вартамян А.А., Барышникова М.А., Еремина В.А. и др. Производные индолокарбазолов, блокирующие васкулогенную мимикрию в опухоли, Российская федерация, федеральная служба по интеллектуальной собственности. Патент РФ №2557554С1, 27.07.2015 Бюл. № 21.
4. Голубева И.С., Еремина В.А., Моисеева Н.И. и др. Производное класса п-гликозидов индоло[2,3-а] пирроло[3,4-с] карбазол-5,7-дионон-п- {12-(β-d-ксилопиранозил)-5,7-диоксо-индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-6-ил} пиридин-2-карбоксамид, обладающее цитотоксической и противоопухолевой активностью. Российская федерация, федеральная служба по интеллектуальной собственности. Патент РФ № 2667906, 11.09.2017 Бюл. № 27.
5. Государственная фармакопея РФ, ОФС.1.2.1.0008.15
6. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Дмитриева М.В. и др. Разработка лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1208. Фармацевтическое дело и технология лекарств 2020;(с):66–78.
7. Голубева И.С., Яворская Н.П., Эктова Л.В. и др. Противоопухолевая активность некоторых производных п-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов с углеводным остатком ксилозой. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4):86–93.



8. Дмитриева М.В., Тимофеева Т.А., Оборотова Н.А. и др. Характеристика и оценка стабильности липосомальных препаратов. Разработка и регистрация лекарственных средств 2018;3(24):36–44.
9. Дмитриева М.В., Лугэнь Бу., Полозкова А.П. и др. Выбор криопротектора для получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1269. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1):74–9.
10. Дмитриева М.В., Лугэнь Бу, Оборотова Н.А., Краснюк И.И. и др. Метод экструзии в технологии получения липосом // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. 2020, № 3: 88–97.
11. Дмитриева, Мария Вячеславовна. Создание липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора на основе борированного хлорина Е6 : диссертация кандидата фармацевтических наук : 14.04.01 . Российская государственная библиотека, Москва, 2016.
12. Киселева М.П., Покровский В.С., Борисова Л.М. и др. Влияние химической структуры производных п-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]-карбазолов на противоопухолевую активность. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(2):32–9.
13. Лугэнь Б., Дмитриева М.В., Орлова О.Л., Краснюк И.И. Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индолокарбазола. Разработка и регистрация лекарственных средств 2020;9(3):21–6.
14. Мельник С.Я. Синтез и изучение гликозидов, производных бисиндола и родственных индоло[2,3-а]карбазолов. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова // М.: Изд-е РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. С. 281–92.
15. Мельник С.Я., Власенкова Н.К., Гараева Л.Д. и др. Способ получения N-гликозидов производных индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с] карбазол-5,7-дионон,

обладающих цитотоксической и противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2427585 от 10.12.2009 г.

16. Сакаева И.В., Бунятян Н.Д., Ковалева Е.Л. и др. Основные подходы к изучению стабильности лекарственных средств: отечественный и международный опыт. Вестник НЦЭСМП 2013;№3:8–11.
17. Санарова Е.В., Чжан Си, Дмитриева М.В. и др. Особенности технологии получения липосомальной лекарственной формы аналога гипоталамического гормона соматостатина. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(4):78–84.
18. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Поиск ингибиторов топоизомераз I и/или II среди N-гликозидов производных индоло-[2,3-а]карбазолов для лечения злокачественных опухолей. Материалы симпозиума «Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств»(Москва, 9–11 июня 2008 г.), 191-2.
19. Хашем Али, Создание и биофармацевтические исследования липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола: диссертация кандидата фармацевтических наук : 14.04.01, Российская государственная библиотека, Москва, 2019.- 139 с.
20. Хашем, Али, Создание и биофармацевтические исследования липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола : автореферат кандидата фармацевтических наук : 14.04.01, Российская государственная библиотека, - Москва, 2020. - 24 с.
21. Чжан, Си. Разработка инъекционных лекарственных форм цифетрилина : диссертация кандидата фармацевтических наук : 14.04.01, Российская государственная библиотека, Москва, 2018.- 24 с.- 151 с.
22. Яворская Н.П., Голубева И.С., Эктова Л.В. и др. Противоопухолевая активность индолокарбазола ЛХС-1269. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):125–6.

23. Ahmed KS, Hussein SA, Ali AH et al. Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *J Drug Target* 2019;27(7):742–61.
24. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):102.
25. Alberts DS, Muggia FM, Carmichael J et al. Efficacy and safety of liposomal anthracyclines in phase I/II clinical trials. *Semin Oncol*. 2004;31(Suppl 13):53–90.
26. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 2004;303(5665):1818–22.
27. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):36–48.
28. Anonymous. Vincristine liposomal--INEX: lipid-encapsulated vincristine, onco TCS, transmembrane carrier system--vincristine, vincacine, vincristine sulfate liposomes for injection, VSLI. *Drugs R D* 2004;5:119–23.
29. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM. International Natural Product Sciences Taskforce, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(3):200–16.
30. Awasthi VD, Garcia D, Goins BA et al. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various size in rabbits. *Int J Pharm*. 2003;253(1–2):121–32.
31. Bandekar A, Zhu C, Gomez A et al. Masking and triggered unmasking of targeting ligands on liposomal chemotherapy selectively suppress tumor growth in vivo. *Mol Pharm* 2013;10(1):152–60.
32. Bardania H, Tarvirdipour S, Dorkoosh F. Liposome-targeted delivery for highly potent drugs. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017;45(8):1478–89.
33. Berlinski A. 2019 Year in Review: Aerosol Therapy. *Respir Care* 2020;65(5):705–12.

34. Bharate SB, Sawant SD, Singh PP, Vishwakarma RA. Kinase Inhibitors of Marine Origin. *Chem. Rev.* 2013;113:6761–815.
35. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedicine devices. *Int J Nanomedicine* 2015;10:975–99.
36. Brunetti M, Mascetra N, Manarini S, Martelli N, et al. Inhibition of cGMP-dependent protein kinases potently decreases neutrophil spontaneous apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297(3):498–501.
37. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global Cancer Statistics 2018: Global Estimates of Incidence and Mortality from 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424.
38. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* 2017;9(2):12.
39. Bush JA. Production and biological activity of rebeccamycin, a novel anticancer agent. *J. Antibiot.* 1987;40:668–78.
40. Cattel L, Ceruti M, Dosio F. From conventional to stealth liposomes: a new Frontier in cancer chemotherapy. *J Chemother.* 2004;16 Suppl 4:94–7.
41. Celay J, Lozano T, Concepcion AR, et al. Targeting the anion exchanger 2 with specific peptides as a new therapeutic approach in B lymphoid neoplasms. *Haematologica* 2018;103(6):1065–72.
42. Chatterjee S, Banerjee DK. Preparation, isolation, and characterization of liposomes containing natural and synthetic lipids. *Methods Mol Biol.* 2002;199:3–16.
43. Chelvi TP, Ralhan R. Designing of thermosensitive liposomes from natural lipids for multimodality cancer therapy. *Int J Hyperthermia* 1995;11(5):685–95.
44. Chen Suting, You Qidong. Anti-tumor activity of indolecarbazole compounds and their derivatives. *Progress in chemistry* 2008;20(2/3):367–74.

45. Chen W, Goldys EM, Deng W. Light-induced liposomes for cancer therapeutics. *Prog Lipid Res.* 2020;79:101052.
46. Cihoric N, Tsikkinis A, van Rhoon G et al. Hyperthermia-related clinical trials on cancer treatment within the ClinicalTrials.gov registry. *Int J Hyperthermia* 2015;31(6):609–14.
47. Cong Wang, Adeep Monger, Liping Wang Peng Fu. Precursor-Directed Generation of Indolocarbazoles with Topoisomerase II $\alpha$  Inhibitory Activity. *Mar. Drugs* 2018;16:168.
48. Cousin Joe. Cancer Sharpshooters rely on DNA tests for a better target. *Pharmacogenomics* 2004;305(5688):1222–3.
49. Crosasso P, Ceruti M, Brusa P et al. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *J Controlled Release* 2000;63(1):19–30.
50. Cuenca-Lopez MD, Serrano-Heras G, Montero JC et al. Antitumor activity of the novel multi-kinase inhibitor EC-70124 in triple negative breast cancer. *Oncotarget* 2015;29(6):27923–37.
51. Dark GG, Calvert AH, Grimshaw R et al. Randomized trial of two intravenous schedules of the topoisomerase I inhibitor liposomal lurtotecan in women with relapsed epithelial ovarian cancer: a trial of the national cancer institute of Canada clinical trials group.[see comment]. *J Clin Oncol* 2005;23:1859–66.
52. DASS CR, Walker TL, Burton MA, Decruz EE. Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes. *Journal of pharmacy and pharmacology* 1997;49(10):972–5.
53. Davis PD, Bit RA, Hurst SA. A convenient synthesis of bisindolyl- and indoyle-maleic anhydrides. *Tetrahedron Lett.* 1990;31:2353–6.
54. Deamer D, Bangham AD. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta.* 1976;443(3):629–34.

55. Depetris I, Marino D, Bonzano A et al. Cardiotoxicity caused by fluoropyrimidine. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;124:1–10.
56. Dondoo TO, Fukumori T, Daizumoto K et al. Galectin-3 Is Implicated in Tumor Progression and Resistance to Anti-androgen Drug Through Regulation of Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer. *Anticancer Res*. 2017;37(1):125–34.
57. Elhissi A. Liposomes for Pulmonary Drug Delivery: The Role of Formulation and Inhalation Device Design. *Curr Pharm Des*. 2017;23(3):362–72.
58. Fassas A, Buffels R, Anagnostopoulos A et al. Safety and early evaluation of the efficacy of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in adults with refractory or recurrent acute myeloid leukemia: a phase I-II study. *British Journal of Hematology* 2002;116(2):308–15.
59. Focaccetti C, Bruno A, Magnani E et al. Influence of 5-fluorouracilone morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy, and OS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PLoS One* 2015;10(2):e0115686.
60. Foteini P, Pippa N, Naziris N, Demetzos C. Physicochemical study of the protein–liposome interactions: influence of liposome composition and concentration on protein binding. *Journal of Liposome Research* 2019;29(4):313–21.
61. Furusaki A, Hashiba N, Matsumoto T et al. X-ray crystal structure of staurosporine, a novel alkaloid from streptomyces strain. *J. Chem. Soc. Chem Commun*. 1978;800–1.
62. Fuse E, Kuwabara T, Sparreboom A et al. Review of UCN-01 Development: A Lesson in the Importance of Clinical Pharmacology. *J. Clin. Pharmacol*. 2005;45:394–403.
63. Gómez-Hens A, Fernández-Romero JM. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *Trends Analyt Chem*. 2006;25:167–78.

64. Harashima H, Kiwada H. Liposomal targeting and drug delivery; kinetic consideration. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996;19:425–44.
65. Hirai M, Minematsu H, Hiramatsu Y et al. Novel and simple loading procedure of cisplatin into liposomes and targeting tumor endothelial cells. *Int J Pharm.* 2010;391:274–83.
66. Hirofumi Nakano, Satoshi Omura. Chemical biology of natural indolocarbazole products: 30 years since the discovery of staurosporine. *Journal of Antibiotics* 2009;62:17–26.
67. Ho GY, Woodward N, Coward JI. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;102:37–46.
68. Hongwei Zhang. Thin Film Hydration Followed by Extrusion to Produce Liposomes. *Liposomes: methods and protocols, methods in molecular biology* 2017;1522:17–22.
69. Hyodo K, Yamamoto E, Suzuki T et al. Development of liposomal anticancer drugs. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(5):703–7.
70. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine* 2006;1(3):297–315.
71. Jaafar-Maalej C, Diab R, Andrieu V et al. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *J Liposome Res.* 2010;20(3):228–43.
72. Jain A, Jain SK. Stimuli-responsive Smart Liposomes in Cancer Targeting. *Curr Drug Targets* 2018;19(3):259–70.
73. Kadioglu O, Cao J, Said ME et al. Effects of phytochemicals on epidermal growth factor receptors and downstream signaling pathways in cancer. *Target Oncol.* 2015;10(3):337–53.

74. Kajitani T, Makiyama A, Arita S et al. Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody Readministration in Chemorefractory Metastatic Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2017;37(11):6459–68.
75. Kaneko T., Wong H., Okamoto K.T., Clardy J. Two synthetic approaches to rebeccamycin. *Tetrahedron Lett.* 1985;26:4015–8.
76. Kase H, Iwahashi K, Matsuda Y. K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *J. Antibiot.* 1986;(39):1059–65.
77. Khairnar Sandip, Kini Rajesh, Harwalkar Mallinath et al. A Review on Freeze Drying Process of Pharmaceuticals. *International Journal of Research in Pharmacy and science* 2013:76–94.
78. Kubo T, Sugita T, Shimose S et al. Targeted delivery of anticancer drugs with intravenously administered magnetic liposomes in osteosarcoma-bearing hamsters. *Int J Oncol* 2000;17(2):309–15.
79. Kumar S, Ahmad MK, Wasim M, Pandey AK. Targeted drugs for cancer treatment: an overview. *Med. Chem.* 2015;5:115–23.
80. Lamichhan N, Udayakumar TS, D'Souza WD et al. Liposomes: clinical applications and potential for imaging-guided drug delivery. *Molecules* 2018;23(2):288.
81. Lee Y, Thompson DH. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2017;9(5):10.1002/wnan.1450.
82. Li AN, Li S, Zhang Y et al. Resources and biological activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* 2014;6:6020–47.
83. Li F, Li S, Li H et al. Antiproliferative activities of tea and herbal infusions. *Food Funct.* 2013;4:530–8.
84. Li F, Li S, Li H et al. Antiproliferative activity of peels, pulps and seeds of 61 fruits. *J. Funct. Foods* 2013;5:1298–1309.



85. Liao JJ, Hook S, Prestidge CA, Barnes TJ. A lipid based multi-compartmental system: Liposomes-in-double emulsion for oral vaccine delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;97(Pt A):15–21.
86. Lim H, Kim SI, Lee Ae et al. Gender-related side effects of 5-fluorouracil drugs in colorectal cancer. *Biol Farm Bull* 2019;42(4):594–600.
87. Lu C, Perez-Soler R, Piperdi B et al. Phase II study of a liposome entrapped cisplatin analog (L-NDDP) administered intrapleurally and pathologic response rates in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*, 2005;23:3495–501.
88. Lv Q, Li LM, Han M et al. Characteristics of sequential targeting of brain glioma for transferrin modified cisplatin liposome. *Int J Pharm.* 2013;444:1–9.
89. Macbool Faheem, Moyle Peter M., Turecht Christopher J., Falconer James R.. Phospholipid Dispersion and Optimization for Efficient Liposome Production Using Supercritical Fluid Technology. *International Journal of Pharmacy* 2019;563:174–83.
90. Maitani Yoshie, Soeda Hiroshi, Junping Wan et al. Modified ethanol injection method for liposomes containing b-sitosterol b-D-glucoside. *Journal of liposome research* 2001;11(1):115–25.
91. Manach C, Scalbert A, Morand C et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;79:727–47.
92. Mantripragada S. A lipid based depot (DepoFoam technology) for sustained release drug delivery. *Prog Lipid Res.* 2002;41:392–406.
93. Massiot J, Rosilio V, Makky A. Photo-triggerable liposomal drug delivery systems: from simple porphyrin insertion in the lipid bilayer towards supramolecular assemblies of lipid-porphyrin conjugates. *J Mater Chem B.* 2019;7(11):1805–23.
94. Matson JA, Claridge C, Bush JA, Titus J et al. AT 2433-A1, AT 2433A2, At 2433-B1 and AT 2433-B2, novel anti-tumor antibiotic compounds produced by *actinomadura melliandra*. *J. Antibiot.* 1989;42:1547–56.

95. Matsuura Nobuyasu, Tamehiro Norimasa, Andoh Tsutomu et al. Indocarbazostain and indocarbazostain B, novel inhibitors of NGF-induced neuronal differentiation in PC12 cells- I. Screenoning, taxomy,fermentation and biological activities. J Antibiot. 2002;55(4):355–62.
96. May JP, Li SD. Hyperthermia-induced drug targeting. Expert Opin Drug Del 2013;10(4):511–27.
97. Michieli M, Damiani D, Ermacora A et al. Liposome-encapsulated daunorubicin for PGP-related multidrug resistunce. Br J Haematol. 1999;106:92–9.
98. Moody CJ, Rahimtoola Kulsum F, Porter Barry, Ross Barry C. Synthesis of the staurosporine agglklycon. J Org Chem.1992;57:2105–14.
99. More GS, Thomas AB, Chitlange SS et al. Nitrogen Mustards as Alkylating Agents: A Review on Chemistry, Mechanism of Action and Current USFDA Status of Drugs. Anticancer Agents Med Chem. 2019;19(9):1080–102.
100. Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. J Liposome Res. 2008;18:309–27.
101. Nettleton DE. Doyle TW. Krishnan B. et al. Isolation and structure of rebeccamycin, a novel antineoplastic agent from nocardia acrocoligenes. Tetrahedron Lett. 1985;26:4011–4.
102. Newman David J., Cragg Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products 2016;79:629–61.
103. Newman David J., Cragg Gordon M. Natural products as sources of new drugs in nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. Journal of Natural Products. 2020;83:770–803.
104. Oka S, Urayama K, Inamatsu T et al. Biol Chem. 1986;50:2723–6.
105. Omura S, Iwai Y, Hirano A et al. New alkaloid AM-2282 from taxonomic fermentation of strptomyces origin, isolation and preliminary characterization. J. Antibiot. 1977;30:275–8.

106. Omura S, Sasaki Y, Iwai Y, Takeshima H. Staurosporin, a potentially important gift of the microorganism. *J. Antibiot.* 1995;48:535–48.
107. Onaka H. Biosynthesis of indolocarbazole and goadsporin, two different heterocyclic antibiotics produced by actinomycetes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009;73(10):2149–55.
108. Ong SG, Chitneni M, Lee KS et al. Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics* 2016;8(4):36.
109. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. Side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *DaltonTrans* 2018;47(19):6645–53.
110. Oun R, Rowan E. Cisplatin induced arrhythmia; electrolyte imbalance or disruption of the CA node? *Eur J Pharmacol.* 2017;811:125–8.
111. Patil YP, Jadhav S. New methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids* 2014;177(8–18).
112. Peltier S, Oger JM, Lagarce F et al. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res.* 2006;23:1243–50.
113. Rahman M, Kumar V, Beg S et al. Emergence of liposome as targeted magic bullet for inflammatory disorders: current state of the art. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;44:1597–1608.
114. Rasko JEJ, Hughes TP. First Approved Kinase Inhibitor for AML. *Cell* 2017;171:981.
115. Rewcastle GW. Becatecarin (Helsinn Healthcare). *IDrugs* 2005;8:838–47.
116. Rigalli JP, Tocchetti GN, Arana MR et al. The phytoestrogen genistein enhances multidrug resistance in breast cancer cell lines by translational regulation of ABC transporters. *Cancer Lett.* 2016;376:165–72.

117. Sajdky TJ, Boyle FA, Foran KS et al. Obesity as a Potential Risk Factor for Vincristine-induced Peripheral Neuropathy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2019;10:1.
118. Sanchez C, Mendez C, Salas JA. Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity. *Nat Prod Rep.* 2006;23(6):1007–45.
119. Sarah JD, Kaur J, Hodadadi R et al. 5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review. *Ther Adv Med Oncol* 2018;10:1758835918780140.
120. Schwandt A, Mekhail T, Halmos B et al. Phase- II trial of rebeccamycin analog, a dual topoisomerase-I and -II inhibitor, in relapsed “sensitive” small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012;7(4):751–4.
121. Seiden MV, Muggia F, Astrow A et al. A phase II study of liposomal lurtotecan (OSI-211) in patients with topotecan resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2004;93:229–32.
122. Shaker S, Gardu AR, Gorab M. M-Factors affecting the particle size of liposomes obtained by ethanol injection. *Res Pharm Sci.* 2017;12(5):346–52.
123. Sharma UK, Sharma AK, Pandey AK. Medicinal attributes of major phenylpropanoids present in cinnamon. *BMC Complement. Altern. Med.* 2016;16:156.
124. Shi J, Liu F, Zhang W et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits nicotine-induced migration and invasion by the suppression of angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells. *Oncol. Rep.* 2015;33:2972–80.
125. Shirley M. Amikacin Liposome Inhalation Suspension: A Review in Mycobacterium avium Complex Lung Disease. *Drugs* 2019;79(5):555–62.
126. Singh AK, Bishayee A, Pandey AK. Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. *Nutrients* 2018;10(6):731.

127. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol.* 2009;86:215–23.
128. Singh RK, Kumar S, Prasad DN, Bhardwaj TR. Therapeutic journey of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: Historic to future perspectives. *Eur J Med Chem.* 2018;151:401–33.
129. Sleirea Linda , Førdea Hilde Elise , Netlanda Inger Anne . Drug repurposing in cancer. *Pharmacological Research* 2017;(124):74–91.
130. Steglich Wolfgang, Steffan Bert, Kopanski Lothar et al. Indole Pigments from the Fruiting Bodies of the Slime Mold *Arcyria denudata*. *Angew Chem Znt Ed Engl.* 1980;19:459.
131. Stojanovska V, Prakash M, McQuade R et al. Oxaliplatin Treatment Alters Systemic Immune Responses. *Biomed Res Int.* 2019:4650695.
132. Su X, Dong C, Zhang J et al. Combination therapy of anti-cancer bioactive peptide with Cisplatin decreases chemotherapy dosing and toxicity to improve the quality of life in xenograft nude mice bearing human gastric cancer. *Cell Biosci.* 2014;4(1):7.
133. Ta T, Porter TM. Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. *Journal of controlled release* 2013;169(1–2):112–25.
134. Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I et al. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup> dependent protein kinase. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1986;135:397–402.
135. Tian W, Ying X, Du J et al. Enhanced efficacy of functionalized epirubicin liposomes in treating brain glioma-bearing rats. *Eur J Pharm Sci.* 2010;41:232–43.
136. Toullec D, Pianetti P, Coste H et al. The bisindolymaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem.* 1991;266:15771–8.
137. Toure A, Xuemin X. Flax lignans: Source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components, and health benefits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2010;9:261–9.

138. Tsubotani S, Tanida S, Harada S et al. Determination of the structure of indolocarbazole alkaloids by NMR spectroscopy. *Tetrahedron* 1991;47:3565–74.
139. Undevia SD, Vogelzang NJ, Mauer AM et al. Phase I clinical trial of CEP-2563 dihydrochloride, a receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with refractory solid tumors. *Investig. New Drugs* 2004;22:449–58.
140. Wada Yasuhiro, Nagasaki Hideo, Tokuda Masao, Orito Kazuhiko. Synthesis of N-Protected Staurosporins. *J. Org. Chem.* 2007;72(6):2008–14.
141. Wagner A, Vorauer-Uhl K. Liposome technology for industrial purposes. *J Drug Deliv.* 2011;591325.
142. Wang JN, Zhang HJ, Li JQ et al. Bioactive Indolocarbazoles from the Marine-Derived *Streptomyces* sp. DT-A61. *J Nat Prod.* 2018;81(4):949–56.
143. Wang W, Lv M, Zhao X, Zhang J. Developing a novel indolocarbazole as histone deacetylases inhibitor against leukemia cell lines. *Journal of analytical methods in chemistry* 2015:9.
144. Waterhouse DN, Sutherland BW, Santos ND et al. Irinophore CTM, a lipid nanoparticle formulation of irinotecan, abrogates the gastrointestinal effects of irinotecan in a rat model of clinical toxicities. *Invest New Drugs* 2014;32(6):1071–82.
145. Wei Qihong, Liu Xiaoyu, Wang Pan, Zhang Wenrui. Research progress in the classification and pharmacodynamics of anticancer drugs. *Medical recapitulate* 2020;26(18):3707–11.
146. Wei Yang, Sharon See Leung, Kenneth Qu To. An Update on the Use of Liposomes for Active Tumor Targeting in Cancer Therapy. *Nanomedicine (London)* 2020;15(3):303–18.
147. Wu D, Gao Y, Qi Y et al. Peptide-based cancer therapy: opportunity and challenge. *Cancer Lett.* 2014;351(1):13–22.

148. Wu J, Liu Q, Lee RJ. A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel. *Int J Pharm.* 2006;316:148–53.
149. Yan C, Wu Y, Feng J et al. Anti- $\alpha$ v $\beta$ 3 antibody guided three-step pretargeting approach using magnetoliposomes for molecular magnetic resonance imaging of breast cancer angiogenesis. *Int J Nanomedicine* 2013;8:245–55.
150. Yang T, Choi MC, Kui FD et al. Antitumor effect of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposomes against human breast cancer cells. *Pharmaceutical Research* 2007;24(12):2402–11.
151. Yatvin MB, Kreutz W, Horwitz B, Shinitzky M. Induced drug release from lipid vesicles in serum by pH-change. *Biophys Struct Mech* 1980;6(3):233–4.
152. Yoon HJ, Lee HS, Jung JH et al. Photothermally amplified therapeutic liposomes for effective combination treatment of cancer. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018;(10):6118–23.
153. Yu L, Meng M, Bao Y et al. miR-1301/TRIAP1 axis is involved in epirubicin-mediated antiproliferation and proapoptosis in osteosarcoma. *Yonsei Med J.* 2019;60(9):832–41.
154. Yu Q, Nie SP, Wang JQ et al. Toll-like receptor 4 mediates the antitumor host response induced by *Ganoderma atrum* polysaccharide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2015;63(2):517–25.
155. Yu Yuanyuan, Feng Liu, Liu Jingjing et al. Analysis of the world market for anticancer drugs. *Chinese Pharmaceutical Journal* 2013;48(2):155–8.
156. Yue Xiuli, Dai Zhifei. Liposomal nanotechnology in cancer therapy. *Curr Med Chem.* 2018;25(12):1397–1408.
157. Yue Yua, Mingyue Shena, Qianqian Song. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydrate Polymers* 2018;(183):91–101.

158. Zeng Yong, Su Xianxiu, Sun Jiajing et al. Analysis of the use of anticancer antibiotics in 21 Chengdu hospitals from 2011 to 2016. *China Pharmaceuticals* 2018;27(21):86–8.
159. Zhang CX, Zhao WY, Liu L et al. A nanostructure of functional targeting epirubicin liposomes dually modified with aminophenyl glucose and cyclic pentapeptide used for brain glioblastoma treatment. *Oncotarget* 2015;6:32681.
160. Zhu X, Xie Y, Zhang Y et al. Thermo-sensitive liposomes loaded with doxorubicin and lysine modified single-walled carbon nanotubes as tumor-targeting drug delivery system. *J Biomater Appl* 2014;29(5): 769–79.
161. Zweers ML, Grijpma DW, Engbers GH, Feijen J. The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2003;66:559–66.



**Приложение А**  
**СПЕЦИФИКАЦИЯ**  
на «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат  
для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг»  
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМА
Описание	Визуальный	Сухая пористая масса светло-желтого цвета
Редиспергируемость	Визуальный, ГФ XIV	При добавлении к содержимому флакона 5 мл воды и перемешивании в течение 10 мин должна образовываться однородная светло-желтая дисперсия.
Подлинность	Спектрофотометрия	Электронный спектр поглощения испытуемого раствора в области от 200 до 800 нм должен иметь максимумы поглощения при длинах волн (285±3) нм, (317±3) нм, (408±3) нм.
	Хроматографический, ТСХ	На полученных хроматограммах пятна ЛХС-1269 идентифицируют по характерной желтой окраске при облучении УФ с длиной волны 254 нм, яичного фосфатидилхолина – по желтой окраске, холестерина – по розовой окраске, сахарозы – по розово-фиолетовой окраске.
Средняя масса и однородность по массе	ГФ XIV	1,294 до 1,434 г Отклонение от средней массы ±10%
рН	ГФ XIV потенциометрический	От 6,1 до 7,0 (дисперсия содержимого флакона в 10 мл воды)
Потеря в массе при высушивании	ГФ XIV	Не более 2,4%
Пирогенность	ГФ XIV	Препарат должен быть апиrogenным
Аномальная токсичность	ГФ XIV	Препарат должен быть нетоксичным
Стерильность	ГФ XIV, метод прямого посева	Препарат должен быть стерильным
Количественное определение	Спектрофотометрия	От 1,659 до 1,965 мг
Размер везикул	Спектроскопия динамического светорассеяния	Не более 200 нм
Упаковка	По 1,8 мг активного вещества во флаконах вместимостью 20 мл, укупоренных пробками из резины под обкатку алюминиевыми колпачком. По 10 флаконов вместе с инструкцией по применению укладывают в картонную пачку.	
Маркировка	В соответствии с ФСП	
Хранение	В защищенном от света месте при температуре -18 °С	
Срок годности	24 мес, исследования продолжаются	

## Приложение Б

УТВЕРЖДАЮ

Директор НИИ ЭДиТО ФГБУ  
«НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России

Ю.Н. В.С. Коворухов

\_\_\_\_\_

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

### АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных достижений


Мы, члены комиссии в составе: зав. лабораторией разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, к.фарм.н. О.Л. Орлова; в.н.с. лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, к.фарм.н. А.В. Ланцова; ст.н.с. лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, к.фарм.н. Е.В. Санарова, составили настоящий акт, о том что

наше подразделение лаборатория разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России использует в повседневной работе

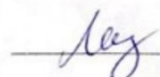
следующее предложение: использование результатов диссертационной работы Бу Лугэнь «Разработка лекарственной формы противоопухолевого препарата на основе гликозидного производного индолокарбазола», в том числе технологию изготовления лекарственного препарата «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг».

Авторы предложения: ст.н.с. лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, к.фарм.н. М.В. Дмитриева и соискатель ученой степени кандидата фармацевтических наук Бу Лугэнь.

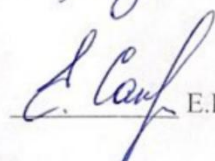
Зав. лабораторией разработки лекарственных форм  
НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России, к.фарм.н.

 О.Л. Орлова

В.н.с. лаборатории разработки лекарственных форм  
НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России, к.фарм.н.

 А.В. Ланцова

Ст.н.с. лаборатории разработки лекарственных форм  
НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России, к.фарм.н.

 Е.В. Санарова