

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



Михел Иосиф Бениаминович

**Создание стимулочувствительной интраназальной системы доставки рибавирина
с улучшенными биофармацевтическими характеристиками**

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, доцент
Бахрушина Елена Олеговна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	14
1.1. Общая характеристика рибавирина.....	14
1.2. Возможности применения рибавирина в противоопухолевой терапии	15
1.3. Активность рибавирина в терапии опухолей головного мозга	18
1.4. Интраназальное введение лекарственных препаратов и доставка по механизму nose to brain.....	20
1.5. Стимулочувствительные системы для доставки препаратов по механизму из носа в мозг ..	26
1.5.1. Смарт-полимеры для разработки стимулочувствительных систем доставки.....	26
1.5.2. Опыт применения стимулочувствительных систем для интраназальной доставки	38
1.6. Существующие разработки интраназальной доставки рибавирина	40
1.7. Контроль качества стимулочувствительных интраназальных систем на этапах разработки и производства.....	42
1.8. Выводы к главе 1	52
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	54
2.1. Активная фармацевтическая субстанция.....	54
2.2. Вспомогательные вещества и реактивы.....	55
2.3. Исследуемые дозирующие устройства	57
2.4. Методика изготовления составов	58
2.5. Методы исследования.....	59
ГЛАВА 3. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА СТИМУЛОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ РИБАВИРИНА	69
3.1. Дизайн исследования	69
3.1.1. Обоснование выбора критических параметров качества лекарственного средства и ограничения использования изучаемой системы доставки	80
3.2. Разработка составов плацебо композиций стимулочувствительной системы доставки.....	82
3.3. Изучение составов плацебо композиций стимулочувствительной системы доставки	86
3.3.1. Изучение стимулочувствительности.....	86
3.3.2. Измерение pH	93
3.3.3. Определение реологических характеристик	94
3.3.4. Изучение температуры гелеобразования	96
3.3.5. Изучение pH гелеобразования	98
3.3.6. Изучение характера распыления.....	99

3.3.7. Анализ показателя назальной ретенции.....	103
3.4. Изучение свойств фармацевтических композиций стимулочувствительных систем доставки рибавирина.....	106
3.5. Изучение высвобождения рибавирина на ячейке Франца	110
3.5.1. Подходы к улучшению высвобождения из системы доставки рибавирина.....	111
3.5.2. Оценка высвобождения рибавирина из фармацевтических композиций.....	117
3.6. Введение консервантов и определение сроков годности.....	119
3.7. Результаты оценки степени влияния параметров состава и технологического процесса на качество разработанной системы доставки	120
3.8. Анализ различных видов упаковки при сравнении данных на SprayView и SprayTec	121
3.9. Технологическая схема производства лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза».....	128
3.10. Проект спецификации на разработанное лекарственное средство	131
3.11. Выводы к главе 3	133
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	134
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	136
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	138
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	139
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	140
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	142
Приложение А	162
Приложение Б.....	166
Приложение В.....	167
Приложение Г	169
Приложение Д.....	170

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Интраназальный путь введения лекарственных препаратов (ЛП) на протяжении последних десятилетий остается одним из самых востребованных способов доставки лекарств. В соответствии с данными Государственного реестра лекарственных средств, только за 2025 год было зарегистрировано 94 торговых наименования препаратов для назального применения на рынке Российской Федерации. Приверженность производителей и пациентов к лекарственной форме (ЛФ) «спрей назальный» обусловлена как оптимальными технологическими характеристиками для промышленного производства, так и несомненной простотой применения для пациентов. С точки зрения физиологии носовая полость является удобным местом экспозиции лекарственного средства (ЛС) для оказания не только местного фармакологического эффекта, но и системного воздействия. За счет плотной васкуляризации и иннервации слизистой оболочки носа становится возможной доставка молекул различных морфологических структур и фармакологических групп.

В рамках стратегии продвижения отечественных оригинальных препаратов на фармацевтический рынок разработка новых систем доставки лекарств становится приоритетной задачей фармацевтической промышленности. В жизненном цикле ЛП наиболее трудоемкой и времязатратной частью является поиск, скрининг и изучение самого действующего вещества – активной фармацевтической субстанции (АФС) – способной воздействовать на мишень в организме. Ввиду длительности этого процесса актуальной становится задача применения существующих АФС по новым показаниям к применению.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), статистика заболевания опухолями центральной нервной системы (ЦНС) равняется примерно 2% от всей массы клинических случаев выявления новообразований у населения. Несмотря на столь низкие значения заболеваемости, средняя выживаемость после постановки диагноза злокачественного новообразования ЦНС составляет не более 15 месяцев. В Российской Федерации каждый год регистрируется более 8000 новых случаев опухолевых заболеваний головного мозга (30000, включая доброкачественные). Ожидается, что общее число случаев рака головного мозга и ЦНС продолжит расти, что подчеркивает необходимость усиления мер по профилактике, ранней диагностике и лечению.

Рибавирин, являясь хорошо изученным, эффективным противовирусным препаратом, имеет широкий спектр фармакологического действия и в том числе ярко выраженную противоопухолевую активность. За счет многопрофильного воздействия на рост опухолевых

клеток применение рибавирина может также рассматриваться в терапии новообразований головного мозга. На 2026 год в мире проведено более двадцати исследований рибавирина в терапии различных видов онкологических патологий, включая опухоли мозга, среди которых *in silico*, *ex vivo*, *in vivo* исследования, а также восемь клинических исследований (I, II фазы).

Интраназальное введение рибавирина по сравнению с пероральным повышает биодоступность препарата и позволяет воздействовать на головной мозг по пути nose-to-brain (из носа в мозг, NTB), минуя гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

Учитывая все физиологические особенности носовой полости, как места введения препарата, требуется разработка ЛФ с улучшенными биофармацевтическими характеристиками, к примеру, способных увеличить время экспозиции АФС на поверхности слизистой оболочки. Такими ЛФ являются стимулочувствительные системы доставки – ЛС, претерпевающие фазовый переход в месте введения за счет воздействия физиологичных факторов среды (температура, ионный состав места аппликации, разница pH, смена растворителя, воздействие УФ-излучения).

За последние несколько лет интерес к стимулочувствительным системам доставки значительно вырос. Сталкиваясь с особенностями тех или иных патологий, исследователи все чаще для разработки выбирают именно стимулочувствительные системы, способные на долгосрочную перспективу обеспечить качественную терапию пациентов, снизить необходимость в инвазивных манипуляциях и достичь максимального комплаенса со стороны пациента.

Степень разработанности темы исследования

С момента начала разработки стимулочувствительных систем было опубликовано более пятидесяти тысяч научных исследований, посвященных созданию инновационных систем доставки лекарственных препаратов. До сих пор изучаемая тематика остается в активной фазе своего развития – с каждым годом растет научный интерес к разработке и исследованию новых видов систем доставки.

В числе множества видов стимулочувствительных систем изучение интраназальных препаратов активно началось в начале 2000-х. За счет своих преимуществ носовая полость стала использоваться в качестве места экспозиции широкого спектра АФС. Самым специфичным путем обеспечения фармакологического эффекта является доставка препаратов напрямую из носа в мозг, что позволило за последние несколько лет зарегистрировать новые препараты для лечения мигреней, а также проводить клинические исследования для оценки эффективности терапии онкологических заболеваний головного мозга при интраназальном введении препаратов.

Противовирусный препарат рибавирин с 1976 года активно изучается на предмет наличия противоопухолевых свойств. Клинические исследования в разных странах мира подтвердили его активность в ингибировании факторов роста опухолей в том числе головного мозга. На протяжении последних четырех десятилетий проблеме интраназальной доставки рибавирина посвящено более десяти исследований, в рамках которых апробирован широкий спектр лекарственных форм – от мелкодисперсных аэрозолей и липосомальных систем до растворов, комплексов с циклодекстринами, сухих порошков и полимерных микрочастиц. Тем не менее ни одна из предложенных форм не обеспечивает оптимального соотношения между удобством введения и эффективностью экспозиции препарата на слизистой оболочке: жидкие формы подвержены быстрой элиминации вследствие мукоцилиарного клиренса, что обуславливает низкую биодоступность; аэрозольные формы требуют специализированного оборудования и характеризуются недостаточной точностью дозирования; порошковые композиции и системы с содержанием микрочастиц, в свою очередь, осложняют дозирование и сопряжены с риском местного раздражения. Указанные ограничения определяют целесообразность применения назальных стимулочувствительных систем, которые вводятся в жидком агрегатном состоянии и претерпевают золь-гель переход в условиях слизистой оболочки, что обеспечивает пролонгацию контакта, контролируемое высвобождение действующего вещества и повышение биодоступности, в том числе по пути «нос — мозг». С использованием современных подходов к разработке, объединение преимуществ назальных стимулочувствительных систем доставки и доказанной противоопухолевой активности рибавирина способно привести к получению качественного, безопасного и эффективного лекарственного препарата.

При анализе патентной документации и международных баз данных научных публикаций eLibrary, PubMed, Scopus, Web of Science, Google Scholar не было выявлено данных об использовании стимулочувствительных систем для интраназальной доставки рибавирина. Таким образом, рассматриваемая тема актуальна для современной медицинской и фармацевтической науки.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационного исследования является разработка состава, технологии и изучение биофармацевтических характеристик стимулочувствительной системы для доставки рибавирина в мозг при интраназальном применении.

Для реализации поставленной цели необходимо решение следующих задач:

1. На основе литературных данных выявить наиболее перспективные группы стимулочувствительных полимеров для разработки препарата в форме назального стимулочувствительного спрея;
2. Обосновать и разработать дизайн исследования стимулочувствительной системы доставки рибавирина по механизму NTB, основанный на методологии «качество через дизайн» (качество через дизайн – Quality by Design – QbD), включающий определение целевого профиля качества разрабатываемого ЛС, критических параметров качества, а также критических параметров используемых материалов и технологического процесса;
3. Разработать экспериментальные композиции вспомогательных веществ для выбора оптимального состава лекарственного средства в форме стимулочувствительного назального спрея, провести их скрининг по критическим параметрам качества, определить влияние параметров состава и технологии на выбранные целевые биофармацевтические характеристики разрабатываемой ЛФ;
4. Предложить, обосновать и апробировать воспроизводимый и валидируемый способ оценки параметра стимулочувствительности для интраназальных *in situ* систем с помощью реометрии в среде симуляционной биологической жидкости носовой полости;
5. Обосновать оптимальный состав ЛС «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза», разработать методики оценки качества и изучить биофармацевтические характеристики полученного ЛС – показатель назальной ретенции с использованием модели носовой полости, а также степень высвобождения *in vitro*;
6. Подготовить проект спецификации на разработанное ЛС «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза», обосновать сроки хранения ЛС.

Научная новизна

Новизна диссертационного исследования заключается в том, что впервые разработаны состав и технология стимулочувствительного назального спрея рибавирина, согласно современной стратегии «качество через дизайн» определены и обоснованы целевой профиль качества препарата, критические показатели качества, критические параметры используемых материалов и технологического процесса.

Для оценки показателя назальной ретенции проведена разработка улучшенной эргономичной *in vitro* модели носовой полости, позволяющей проводить рутинный анализ для

скрининга фармацевтических композиций, предназначенных для интраназального введения, в условиях, приближенных к физиологическим.

Новизна диссертационной работы также заключается в предложенной воспроизводимой методике количественной оценки стимулочувствительности *in situ* систем – с применением модифицированного метода ротационной вискозиметрии в среде симуляционной назальной жидкости.

Впервые для стимулочувствительной системы в форме назального спрея проведен научно-обоснованный выбор упаковки путем изучения формы и геометрии факела распыления, анализа размера частиц в распылении.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическую значимость работы составляют результаты исследований по оценке взаимного влияния вспомогательных веществ в составе стимулочувствительных ионселективных назальных спреев, результаты оценки рисков для разработки и изготовления систем интраназальной доставки с фазовым переходом, а также обоснованного подбора оптимальной упаковки для направленного распыления ЛС по механизму NTV, что может быть использовано в дальнейших прочих разработках различных препаратов схожего механизма.

Сформулированы рекомендации по *in vivo* исследованиям интраназальных *in situ* систем, учитывая особенности механизма их образования, определены оптимальные диапазоны специфических показателей качества для стимулочувствительных систем доставки.

Практическая значимость диссертационной работы состоит в разработке состава и технологии ЛС «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза», разработке проекта спецификации, обосновании сроков годности.

Разработана и внедрена в дизайн исследований по фармацевтической разработке методика количественной оценки параметра стимулочувствительности с помощью метода ротационной вискозиметрии и вычисления индекса стимулочувствительности, что может быть в дальнейшем использовано при разработке и скрининге композиций для различного введения, отличающихся формированием по механизму *in situ*.

Практическая значимость заключается также в разработке и апробации на образцах назального стимулочувствительного спрея рибавирина *in vitro* модели носовой полости, обладающей улучшенными эксплуатационными характеристиками – позволяющей проводить изучение назальной ретенции для рутинного анализа.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертации стали работы российских ученых по изучению лекарственных средств, получаемых по технологии *in situ*, а также интраназальных препаратов и мукоадгезивных систем – Мустафина Р.И., Хуторянского В.В., Бахрушиной Е.О., Меньшутиной Н.В., а также труды, посвященные современным аспектам методологии фармацевтической разработки – Деминой Н.Б., Пятигорской Н.В.

Фармацевтическая разработка в настоящем исследовании проведена в соответствии с руководством ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» (Pharmaceutical Development). Проект спецификации на разработанное лекарственное средство составлен по требованиям Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 года №151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата». Оценка стабильности разработанного ЛС проводилась в соответствии с требованиями Решения Евразийской Экономической Комиссии от 10 мая 2018 года № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций».

Для оценки фармакопейных показателей качества (подлинность, pH, вязкость, однородность массы доставляемой дозы, количественное определение и микробиологическая чистота) были использованы методики, описанные в фармакопейных статьях Государственной Фармакопеи Российской Федерации XV издания. Также в рамках диссертационного исследования была разработана и апробирована методика оценки индекса стимулочувствительности реологическим методом. Оценка показателя назальной ретенции осуществлялась на разработанной и апробированной *in vitro* модели носовой полости. Анализ высвобождения АФС проводился после диализа через полупроницаемую мембрану на диффузионной ячейке Франца.

Экспериментальные работы выполнены на сертифицированном и поверенном оборудовании кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина, ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» и ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи».

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты обоснования дизайна фармацевтической разработки по методологии «качество через дизайн», включая целевой профиль качества, критические показатели качества,

критические характеристики материалов и параметры процесса, а также результаты оценки рисков при изготовлении лекарственного средства в лабораторных условиях;

2. Результаты разработки и внедрения методического обеспечения оценки качества интраназальных *in situ* систем – воспроизводимой методики определения индекса стимулочувствительности методом ротационной вискозиметрии и модифицированной *in vitro* модели носовой полости для оценки показателя назальной ретенции;

3. Результаты разработки качественного и количественного состава и технологии получения лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза», а также результаты изучения влияния компонентов состава и методов изготовления на критические показатели качества;

4. Результаты изучения биофармацевтических характеристик разработанного лекарственного средства: показателя назальной ретенции и высвобождения рибавирина *in vitro*, распределения рибавирина в обонятельных луковицах, ткани головного мозга и плазме крови и отсутствия цилиотоксического действия *in vivo*;

5. Результаты исследования стабильности разработанного лекарственного средства при хранении и обоснование срока годности.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается проведением всех исследований не менее чем в трех повторностях. Пул данных для анализа был подвержен обработке методами математической статистики. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций диссертационной работы обеспечены качеством исходных данных и методологией исследования. Применение сертифицированного оборудования и статистический анализ результатов подтвердили их воспроизводимость и правильность, что позволяет сделать вывод о надежности полученных данных.

Основные научные положения и результаты диссертационного исследования доложены на всероссийских и международных мероприятиях: 9-я Международная научно-методическая конференция «Фармобразование-2023» (28-29 сентября 2023 г., г. Воронеж); Всероссийская «Неделя фармации – 2023» (13-17 ноября 2023 г., г. Москва); XIV Всероссийская научная конференция с международным участием молодежного научного общества «Молодая фармация – потенциал будущего» (28 марта – 02 апреля 2024 г., г. Санкт-Петербург); Pharmaceutical Advancement Forum (11 сентября 2024 г., Москва); III Научно-практическая онлайн-конференция «Современные проблемы фармации» (18 ноября 2024 г., г. Самара); первая международная конференция «Инновационные лекарственные средства: от молекулы до пациента» (19–21

ноября 2024 г., г. Москва); Научно-методическая конференция с международным участием, посвященная памяти выдающегося отечественного ученого в области технологии лекарств Юрия Карловича Сандера (6 февраля 2025 г., г. Москва); VIII съезд физиологов СНГ, XV съезд аллергологов и иммунологов СНГ, Симпозиум «Белки и пептиды» (23–28 апреля 2025 г., г. Сочи); XIX конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» II Молодежная лига «Разработки и регистрации лекарственных средств», или Новые горизонты фармацевтической науки и практики (17-18 февраля 2026 г., г. Москва).

Апробация результатов диссертации состоялась на внутренней конференции кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 12 от 27 мая 2026 года.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в самостоятельном выполнении всех ключевых этапов диссертационного исследования, посвященного разработке стимулочувствительной интраназальной системы доставки рибавирина с улучшенными биофармацевтическими характеристиками. Автором проведен комплексный анализ отечественных и зарубежных литературных источников, патентной документации, а также международных баз данных PubMed, Scopus, Web of Science и Google Scholar, посвященных современным подходам к созданию *in situ* систем доставки, реализации механизма NTB и применению рибавирина в противоопухолевой терапии.

На основании проведенного анализа автором сформулированы цель и задачи исследования, разработан дизайн фармацевтической разработки в соответствии с концепцией Quality by Design (QbD), определены QTPP, CQA, CMA и CPP разрабатываемого лекарственного средства. Автором самостоятельно выполнен подбор и сравнительная оценка стимулочувствительных, мукоадгезивных и ионселективных полимеров, изучено их влияние на параметры гелеобразования, реологические характеристики, назальную ретенцию и высвобождение рибавирина.

Автором предложена и апробирована воспроизводимая методика количественной оценки индекса стимулочувствительности методом ротационной вискозиметрии в среде симуляционной назальной жидкости, а также разработана модифицированная *in vitro* модель носовой полости для оценки назальной ретенции исследуемых композиций. Все экспериментальные данные лабораторного этапа получены, систематизированы, статистически обработаны и интерпретированы автором самостоятельно. Доклинические исследования на животных моделях

выполнены в Центре доклинических исследований Сеченовского Университета. Вклад автора на этом этапе состоял в обосновании и разработке дизайна исследования, подготовке образцов лекарственного средства, статистической обработке результатов и формулировании выводов.

На основе литературных данных, результатов экспериментальных исследований и экспертного опроса автором выполнена оценка рисков разработки и производства лекарственного средства с ранжированием вероятности возникновения и степени критичности выявленных рисков. Все экспериментальные данные получены, систематизированы, статистически обработаны и интерпретированы автором самостоятельно. Автор принимал непосредственное участие в подготовке публикаций, апробации результатов исследования и формировании проекта спецификации на разработанное лекарственное средство.

Внедрение результатов в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по дисциплине «Частная фармацевтическая технология» программы специалитета 33.05.01 «Фармация» (акт № 904-У от 30.03.2026); в учебный процесс программы обучения по специальности 28.03.02 «Наноинженерия» Российского химико-технологического университета имени Д. И. Менделеева (акт б/н от 06.04.2026). Также основные положения и выводы диссертационного исследования внедрены в работу Дирекции по науке и разработкам ООО «Технология лекарств», ГК Р-Фарм (акт б/н от 26.03.2026).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям развития науки, техники и технологий в Российской Федерации. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований на долгосрочный период (2021–2030 гг.) и согласуется со Стратегией развития фармацевтической промышленности Российской Федерации до 2030 года. Исследование является составной частью плана научно-исследовательских работ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и выполнено

в составе комплексной темы «Развитие научных и научно–методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (гос. регистрация № 01201261653).

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертационного исследования автором опубликовано 13 научных работ, в том числе 2 научных статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в издании, индексируемом в международных базах Web of Science, Scopus; 1 статья в научном издании, включенном в RSCI, 3 иные публикации по результатам исследования, 6 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Структура диссертации включает введение, три главы, включая литературный обзор, материалы и методы, экспериментальные данные, список литературы, приложения. Диссертационная работа изложена на 183 страницах, включая приложения, содержит 32 рисунка, 51 таблица. Список литературы включает 208 источников, из которых 168 – на иностранном языке.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Общая характеристика рибавирина

Рибавирин – 1-(β-D-Рибофуранозил)-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид – активная фармацевтическая субстанция (АФС), разработанная еще в 1972 году коллективом ученых из ICN Pharmaceuticals (ICN Nucleic Acid Research Institute – Научно-исследовательский институт нуклеиновых кислот, США) [1–3]. В традиционной терапевтической практике рибавирин применяется в качестве противовирусного агента для лечения хронического вирусного гепатита С [4].

Ввиду стремительной мутации различных патогенов наиболее быстрой и простой альтернативой при разработке лекарственного препарата (ЛП) является использование уже существующей АФС по новому показанию к применению. За многие годы фармакологические свойства рибавирина были тщательно изучены и до сих пор появляются новые работы, посвященные off-label (вне показаний) применению рибавирина.

Сегодня перечень показаний рибавирина заметно шире: хронический гепатит Е, лихорадка Ласса, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом хантаанской этиологии, респираторно-синцитиальная и коронавирусная (COVID-19) инфекции; обсуждается роль рибавирина и при астровирусных гастроэнтеритах [5–8].

Рибавирин – вирусостатический химиотерапевтический препарат широкого спектра действия, не вызывающий выработку интерферона, который демонстрирует активность против широкого спектра РНК- и ДНК-вирусов, включая ретровирус, вызывающий синдром приобретенного иммунодефицита [9].

При пероральном применении рибавирин быстро всасывается в желудочно-кишечном тракте при возможной биодоступности более 45%. Далее АФС распределяется по большей части в плазме крови и эритроцитах, и в таком состоянии его концентрация сохраняется на относительно постоянном уровне несколько недель после введения. Выявлено, что молекулы рибавирина незначительно связываются с белками плазмы крови. Его биотрансформация происходит в печени, где впоследствии он фосфорилируется до фосфатов, являющихся активными метаболитами рибавирина, те в свою очередь метаболизируются до 1,2,4-триазолкарбоксамидов. Несмотря на быстрый период всасывания и распределения, рибавирин имеет очень длительный период полувыведения, который при приеме дозы в концентрации 200 мг продолжается в течение 1-2 часов, после окончания полноценного курса приема это время значительно увеличивается до 300 часов. Сами метаболиты и нативный рибавирин выводятся по большей части с мочой и на 10% – с калом [10–12].

Рибавирин также широко применяется в терапии респираторных вирусных заболеваний. С целью снижения частоты развития побочных эффектов было предложено два принципиально разных подхода. Первый из них нацелен на сочетание рибавирина с полимерными носителями. В исследовании Riber C.F. et al. осуществляется испытание высокомолекулярных соединений метакриловой кислоты на культурах клеток и тканей. Была отмечена активность полимеров в отношении респираторно-синцитиального вируса, вируса птичьего гриппа и вируса герпеса. Riber C.F. et al. описывают сохранение активности рибавирина в отношении гриппа типа А при снижении показателей митохондриальной токсичности [13].

1.2. Возможности применения рибавирина в противоопухолевой терапии

После открытия молекулы рибавирина исследования не остановились на изучении и применении противовирусных свойств. Интерес к АФС был достаточно высок, и уже в 1976 году был опубликован первый труд, описывающий возможности использования рибавирина в качестве противоопухолевого агента. Первыми в данной области стали ученые из Великобритании, которые доказали наличие воздействия рибавирина на рост опухолей на животных моделях [14]. Введение изучаемого препарата осуществлялось мышам в дозировке 100 мг/кг ежедневно на протяжении 21 дня. Эффективность оценивалась по пальпируемости трансплантированных опухолей в сравнении с контрольной группой животных. По окончании цикла терапии размер опухолей у мышей, получавших рибавирин, был значительно меньше, чем у контрольной группы. По результатам данного исследования было выдвинуто несколько гипотез о механизме противоопухолевого действия рибавирина.

Считается, что механизмы действия рибавирина опосредуются несколькими путями, включая внеклеточно регулируемые протеинкиназы (ERK) в пути митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), эукариотический фактор инициации трансляции 4E (eIF4E), митоген-активируемая протеинкиназа, взаимодействующая с протеинкиназой 1 (MNK1), инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа (IMPDH) и/или усилитель гомолога zeste 2 (EZH2). EZH2 также влияет на репрессию транскрипции путем триметилирования H3K27 и считается привлекательной эпигенетической мишенью для терапии рака [15–17].

Чтобы выяснить, является ли eIF4E механизмом химиорезистентности, Xi C. et al. исследовали влияние ингибирования eIF4E с использованием рибавирина на устойчивые к паклитакселу клетки рака шейки матки и 5-FU-устойчивые клетки рака толстой кишки. Было выявлено, что рибавирин в дозах 25, 50 и 75 μM значительно ингибировал рост и снижал жизнеспособность клеток CaSki-г, SiHa-г, SW620-г и HCT-116-г. Рибавирин в дозах 25 и 50 μM не влиял на пролиферацию и жизнеспособность клеток BJ-5ta (клетки фибробластов кожи

человека), тогда как 75 μ моль немного снижали пролиферацию и жизнеспособность клеток BJ-5ta. Однако рибавирин в дозе 75 μ моль ингибировал клетки BJ-5ta в меньшей степени, чем раковые клетки. Эти результаты свидетельствуют о том, что рибавирин проявляет преимущественную токсичность для раковых клеток по сравнению с нормальными клетками [18].

Исследование Kentsis et al., нацеленное на оценку механизмов действия рибавирина, показало, что изучаемый препарат эффективно подавлял онкогенную трансформацию мышинных клеток, опосредованную белком eIF4E, в лабораторных условиях *in vitro*, а также сдерживал рост опухоли в экспериментальной модели на мышах с зависимой от eIF4E человеческой плоскоклеточной карциномой *in vivo*. Кроме того, препарат препятствовал образованию колоний клеток острого миелоидного лейкоза, которые зависят от активности eIF4E. Приведенные данные подтверждают противоопухолевый эффект рибавирина сразу на нескольких биологических моделях и одновременно раскрывают его специфический механизм. Это позволяет рассматривать субстанцию как кандидата для терапии опухолей с гиперэкспрессией eIF4E либо нарушенной его регуляцией [19].

При изучении активности рибавирина против остеосаркомы у детей Chen J. et al. удалось подтвердить выраженное влияние АФС на eIF4E [16]. Эксперимент проводился с использованием клеточной линии MG-63 reIF4E(S209D) – линия рака костей. В сравнительном анализе комбинация рибавирина с доксорубицином продемонстрировала превосходящую эффективность относительно монотерапии каждым из агентов. В условиях *in vivo* совместное применение препаратов обеспечивало полную остановку роста остеосаркомы в течение всего периода терапии. Установлено, что рибавирин реализует свое действие в отношении остеосаркомы преимущественно через ингибирование eIF4E. Дополнительно отмечено модулирующее влияние рибавирина на фосфорилирование Erk и экспрессию EZH2 и Snail при отсутствии воздействия на пути Akt и mTOR. Выявлено повышение экспрессии и фосфорилирования eIF4E в клетках остеосаркомы относительно нормальных клеток, что обуславливает селективную антиостеосаркомную активность рибавирина. Деpletion eIF4E воспроизводила ингибирующий эффект рибавирина, подтверждая критическую роль данного белка как основной терапевтической мишени рибавирина при остеосаркоме [16].

Схема, описывающая механизм действия рибавирина, представлена на рисунке 1.1 [15–21].

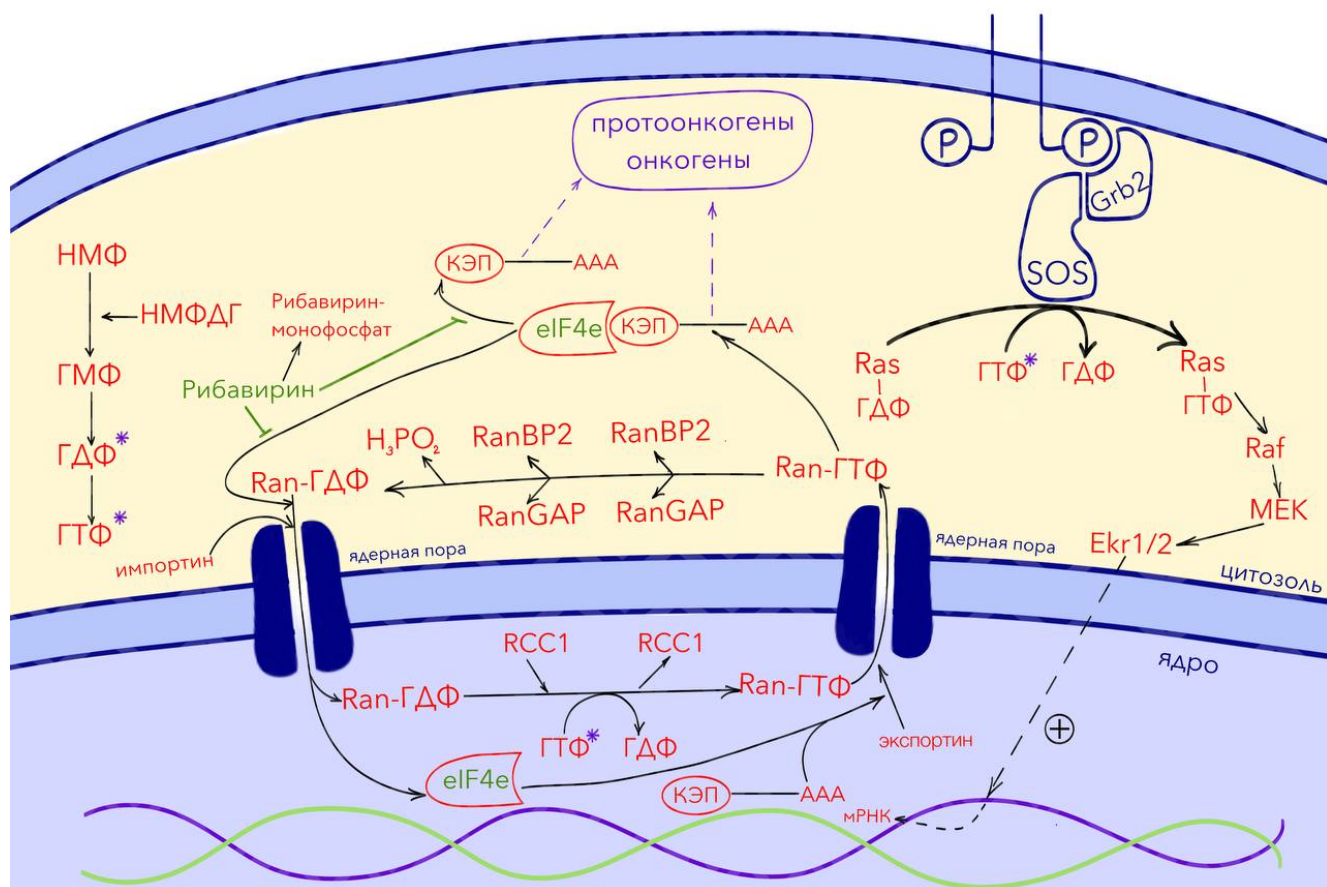


Рисунок 1.1 – Механизм противоопухолевого действия рибавирина

Помимо многочисленных *in vitro* исследований и испытаний *in vivo* на животных к 2025 году также сформировалась доказательная база, основанная на положительном опыте применения рибавирина у людей. По минимальным подсчетам известно 8 клинических исследований (I-III фазы), направленных на изучение противоопухолевой активности рибавирина как в монотерапии, так и в комбинированной.

Наиболее ранний отчет о результатах клинического исследования противоопухолевой активности рибавирина опубликован в 2009 году исследователями из Канады [22]. Испытание проводилось с участием 13 пациентов с острым миелоидным лейкозом (подтипы M4 и M5). Оценивалась эффективность терапии рибавирином в дозировках от 1000 до 2800 мг в день перорально на протяжении двух недель. По результатам лечения у семи пациентов был зафиксирован выраженный клинический ответ на терапию (полная или частичная ремиссия). Рибавирин проявлял выраженную активность в режиме монотерапии у пациентов с острым миелоидным лейкозом неблагоприятного прогноза, а терапия не сопровождалась значимой токсичностью. Дальнейшие исследования были направлены на повышение эффективности лечения при комбинировании рибавирина с другими химиотерапевтическими препаратами.

Другим примером успешного клинического отчета является многоцентровое открытое рандомизированное исследование (II фаза) с участием 23 пациентов с острым миелоидным лейкозом. В данном случае объектами исследования были две линии терапии: висмодегиб + рибавирин и висмодегиб + рибавирин + децитабин. По результатам исследования было выявлено наиболее эффективное сочетание препаратов для лечения патологии – висмодегиб + рибавирин + децитабин. Несмотря на достаточно высокую частоту проявления нежелательных явлений, соотношение польза/риск было расценено исследователями как положительное, так как достигался ответ от терапии и были выявлены случаи полной ремиссии [23].

Не менее масштабное исследование, посвященное изучению эффективности комбинированной терапии рефрактерной острой миелоидной лейкемии цитарабином и рибавирином, было проведено тем же коллективом ученых из Канады [24]. В данном исследовании участвовало 29 пациентов с острым миелоидным лейкозом. Как и в другом своем исследовании, ученые проводили эскалирование дозы рибавирина на всем протяжении лечения – от 1000 до 2200 мг в день. Цитарабин вводился подкожно дважды в день в дозировках 10-20 мг. Была оценена эффективность ответов на лечение в монотерапии и комбинированной в различных соотношениях препаратов. В результате наиболее подходящим вариантом терапии стал рибавирин и низкодозовый цитарабин в непрерывном режиме приема перорально по 1400 мг два раза в сутки и подкожно по 10 мг два раза в сутки, соответственно, в течение десяти дней 28-дневного цикла. Наилучшие ответы на терапию включали полную и частичную ремиссию. Также зафиксированы случаи бластных ответов.

По состоянию на 2026 год в мире проводятся еще два клинических исследования (США), нацеленных на оценку эффективности применения рибавирина в терапии мантийноклеточной лимфомы и рецидивирующего острого миелоидного лейкоза. Так как исследование стартовало только в 2024 году, результаты пока остаются неопубликованными.

1.3. Активность рибавирина в терапии опухолей головного мозга

Одной из свойственных особенностей рибавирина, как противоопухолевого агента, является его способность воздействовать на опухоли головного мозга. Первым изысканием в области изучения влияния рибавирина на опухоли головного мозга является исследование Ogino A. et al., датированное 2014 годом. Проводилось изучение воздействия рибавирина на различные клеточные линии злокачественной глиомы (A-172, AM-38, T98G, U-87MG, U-138MG, U-251MG и YH-13). Итоги настоящего исследования показывают, что рибавирин играет важную роль в ингибировании роста клеток злокачественной глиомы, вызывая остановку фазы деления G0/G1. По результатам исследования были выделены клеточные линии глиомы, подвергающиеся

терапии рибавирином и резистентные к нему. Однако, хотя связь между рибавирином и PDGFRA (рецептор альфа-фактора роста тромбоцитов) неясна, предположительно экспрессия PDGFRA может быть вовлечена в противоопухолевую эффективность рибавирина [25–27].

В недавнем исследовании Huq, S. et al. предложили совершенно новое показание к применению рибавирина – терапия медуллобластомы – наиболее распространенного вида злокачественных опухолей мозга у детей [28]. Новый метод химиотерапии был предложен вследствие отсутствия альтернатив хирургическому лечению. В ходе исследования было доказано воздействие рибавирина на эукариотический фактор инициации E (eIF4E) и ингибирование EZH2. Для начала испытания проводили на клеточных линиях медуллобластомы человека ONS-76 и D425. На 4 и 6 день введения в культуры клеток рибавирин продемонстрировал значительное снижение роста и размножения клеток по сравнению с контрольной группой. Испытания на животных моделях показали увеличение выживаемости мышей при внутрибрюшинном введении рибавирина в качестве монотерапии (100 мг/кг). Таким образом, рибавирин стал привлекательным кандидатом для дальнейшего изучения при терапии медуллобластом, учитывая его одобрение Food and Drug Administration (FDA), профиль безопасности, широкий спектр действия, а также радио- и химиосенсибилизирующие свойства [28–30].

При проведении *in vitro* и *in vivo* испытаний Volpin et al. описали влияние рибавирина на глиому человека. *In vitro* противоопухолевый эффект проявлялся за счет воздействия рибавирина на пролиферацию, жизненный цикл опухолевых клеток, их гибель и миграцию. При *in vivo* исследовании действия рибавирина (в монотерапии и комбинации с темозоломидом и радиацией) на животных моделях увеличивалась гибель клеток глиомы. Лечение рибавирином значительно улучшало эффективность химиолучевой терапии и повышало выживаемость крыс и мышей с глиосаркомой [29,31].

На основании существующих данных об ингибировании роста глиом головного мозга и с учетом того, что доклиническая модель применения рибавирина при атипичной тератоидно-рабдоидной опухоли (АТ/РТ) отсутствует, Casaos et al. приняли решение изучить влияние рибавирина на несколько линий человеческих клеток АТ/РТ (BT12, BT16 и BT37) как *in vitro*, так и *in vivo* [15]. Получены доказательства того, что рибавирин оказывает значительное воздействие на рост клеток АТ/РТ, усиливает остановку клеточного цикла и гибель клеток — предположительно, за счет модуляции сигнальных путей eIF4E и/или EZH2. При помощи анализа заживления ран и анализа в камере Бойдена выявлено нарушение рибавирином миграции, инвазии и адгезии клеток АТ/РТ, что снижает вероятность метастазирования и роста опухоли. Также было продемонстрировано, что рибавирин улучшает выживаемость мышей с ортотопической имплантацией клеток линии BT12.

В исследовании Kast R. E. et al. рассматривается возможность использования рибавирина в качестве ингибитора синтеза гранулоцитарно-колониестимулирующего фактора (G-CSF) и гранулоцитарно-моноцитарно-колониестимулирующего фактора (GM-CSF). При выявлении глиобластомы G-CSF и GM-CSF начинают синтезироваться активнее, тем самым отклоняя гемопоэз костного мозга от лимфоцитов в сторону гранулоцитов, создавая «лимфопенически-нейтрофильное состояние». В нескольких исследованиях было доказано, что рибавирин способен ингибировать действие данных факторов роста глиомы и улучшить иммунотерапию рака как в монотерапии, так и в комбинированном лечении [30,32].

При оценке эффективности применения рибавирина в качестве терапевтического агента в лечении новообразований головного мозга стоит также упомянуть научный труд коллектива ученых из Японии [33]. В 2020 году Ochiai et al. было проведено исследование эффекта рибавирина в терапии глиобластом, резистентных к темозоломиду – основной препарат выбора при лечении глиобластом. Сочетание рибавирина, темозоломида и интерферона- β продемонстрировало стремительное подавление роста злокачественных клеток глиомы. Эффект был дозозависимым по отношению к рибавирину — он проявлялся даже при использовании сравнительно низких концентраций вещества. Важно, что действие распространялось как на клетки, чувствительные к темозоломиду, так и на резистентные к нему. Оптимальным соотношением АФС при воздействии на клеточные линии было темозоломид 10 мкМ, интерферон- β 10 МЕ/мл и рибавирин 10 мкМ. Синергетический характер взаимодействия компонентов комбинации был подтвержден с помощью метода Chou-Talalay. Проточная цитометрия дополнительно показала, что в основе этого синергетического противоопухолевого эффекта лежит, в частности, активация процесса апоптоза – программируемой клеточной гибели.

Сводная информация по существующим исследованиям оценки противоопухолевой активности рибавирина *in vivo* приведена в Приложении А.

1.4. Интраназальное введение лекарственных препаратов и доставка по механизму nose to brain

Носовая полость – это одна из главных структур дыхательной системы организма человека. Она представляет собой полость, разделенную носовой перегородкой на два сегмента, и отвечает за обеспечение важных функций: обонятельной, дыхательной, речевой, увлажнение и согревание вдыхаемого воздуха [34–36]. Помимо стандартных физиологических функций носовая полость выступает в роли естественного защитного барьера за счет удаления патогенов и инородных тел с поверхности слизистой. Несмотря на небольшие видимые размеры носовой полости, она

занимает около 160 см². Внутренняя поверхность слизистой гистологически разделяется на 3 части: вестибулярная, респираторная и обонятельная (рисунок 1.2) [34,37].

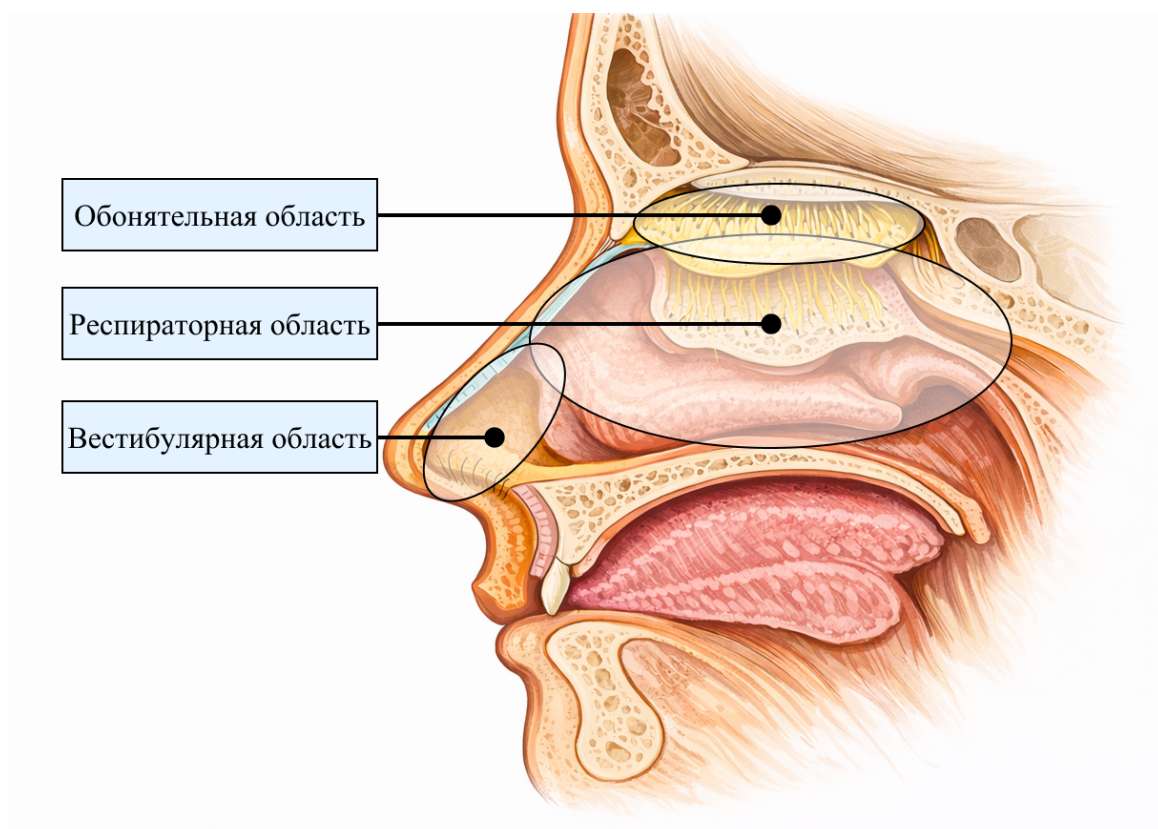


Рисунок 1.2 – Схематическое изображение анатомических областей носовой полости

Вестибулярная часть находится во входных воротах носовой полости и выстлана чешуйчатыми клетками и волосками. По площади вестибулярная область занимает небольшую часть всей носовой полости и выполняет функцию фильтра от больших частиц во вдыхаемом воздухе. Респираторный эпителий состоит из нескольких видов гистологических структур: базальные, бокаловидные, реснитчатые и нереснитчатые клетки [38,39]. Сочетанная работа всех видов клеток обеспечивает постоянное обновление слизистой оболочки носовой полости. С точки зрения физиологических особенностей респираторной области стоит рассмотреть вышеуказанные барьерные функции. Защита организма человека с помощью носовой полости происходит при постоянном выделении слизи секреторными клетками и движении ресничек, способных удалять чужеродные тела с поверхности слизистой. Процесс постоянного обновления слизистой называется мукоцилиарным клиренсом. Кроме большого количества клеток секреторного и реснитчатого эпителия респираторная часть носовой полости снабжена большим количеством кровеносных сосудов, чем обусловлена возможность всасывания веществ именно в этой части полости.

Главной отличительной чертой респираторной области носовой полости является наличие окончаний черепно-мозговых нервов – обонятельного и тройничного – отвечающих за иннервацию полости. В верхнем отделе носовой полости между верхним носовым гребнем и решетчатой пластинкой расположена обонятельная часть (обонятельная луковица) носовой полости. При достижении раздражителей обонятельной луковицы происходит передача сигналов в центральную нервную систему. Обонятельная луковица по площади занимает приблизительно 6% всей носовой полости [36,40–42].

Некоторые физиологические особенности носовой полости уже долгое время используются при разработке новых лекарственных средств (ЛС). Хорошая васкуляризованность слизистой дает возможность АФС проникать в системный кровоток и оказывать фармакологический эффект, минуя эффект первого прохождения через печень. За счет рассеянного распыления ЛС по поверхности слизистой носовой полости происходит быстрое всасывание. Другой причиной привлекательности носовой полости как пути введения препаратов является наличие иннервирующих полость черепно-мозговых нервов. Проникновение АФС по черепно-мозговым нервам непосредственно в головной мозг позволяет обойти гематоэнцефалический барьер – механизм доставки nose-to-brain (из носа в мозг – NTB). Распространение лекарственного вещества через обонятельный эпителий может происходить по трем путям [39]. Вещество может связываться с рецептором и интернализироваться, например, с помощью рецепторно-опосредованного эндоцитоза. Затем оно проходит через обонятельный сенсорный нейрон к обонятельной луковице. Другая возможность заключается в том, что вещество использует протекающие проходы в пределах обонятельного эпителия и перемещается в параклеточную пластинку. В-третьих, вещество также может транспортироваться через транспортные клетки (SUS) в пластинку слизистой оболочки. Пройдя мимо решетчатой пластины, вещество теоретически может также достигать спинномозговой жидкости и распространяться через различные области мозга [39,43]. Механизм проникновения АФС через слизистый эпителий носовой полости представлен на рисунке 1.3.

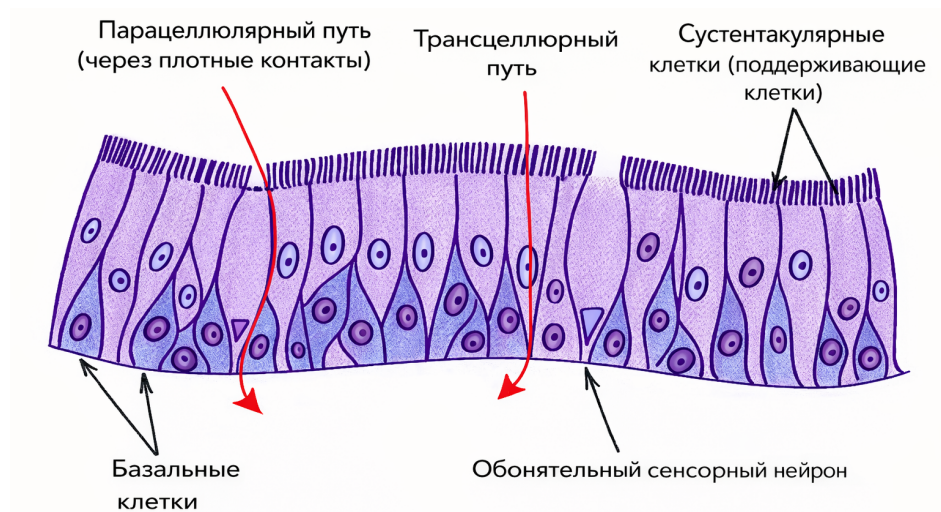


Рисунок 1.3 – Механизм проникновения лекарственного вещества через назальный эпителий

В сравнении с двумя наиболее распространенными путями введения лекарственных препаратов – пероральным и парентеральным – назальная доставка способна реализовать ряд преимуществ (таблица 1.1).

В начале 1990-х Уильям Фрей предложил патент на метод доставки назальных лекарств для лечения неврологических расстройств в головном мозге [44]. С тех пор было проведено большое количество клинических и доклинических исследований, показывающих большой потенциал методов доставки NTV для лечения различных заболеваний мозга [45–48]. Тем не менее, точные механизмы, с помощью которых молекулы транспортируются от слизистой оболочки носа к ЦНС, все еще недостаточно изучены.

Таблица 1.1 – Сравнительная характеристика различных путей введения лекарственных препаратов

Характеристики	Пероральное введение	Парентеральное введение	Интраназальное введение
Комплаенс пациентов	Высокий	Низкий	Высокий
Метаболизм первого прохождения через печень	Высокий	Отсутствует	Отсутствует
Ферментативная деградация в кишечнике	Высокая	Отсутствует	Отсутствует
Скорость проявления фармакологического эффекта	Сравнительно низкая	Высокая (возможна регуляция при подкожном и внутримышечном введении)	Высокая

Продолжение Таблицы 1.1

Проникновение через ГЭБ	ГЭБ является главным барьером. Требуется высокая липофильность и малый размер молекул (<500 Да)	Системная концентрация выше, чем при пероральном приеме, но барьер не преодолевается	АФС попадает в ЦНС по обонятельной луковице, минуя барьер
------------------------------------	--	--	--

Подходы к интраназальной доставке препаратов в головной мозг в основном сосредоточены на двух морфологических структурах – обонятельном и тройничном нервах. Пути, используемые вводимыми веществами, включают внутриклеточные, параклеточные и трансклеточные механизмы для транспортировки вдоль обонятельного и тройничного нервов к ЦНС. Внутриклеточный обонятельный нервный путь использует пиноцитоз и эндоцитоз для поглощения вещества в обонятельном сенсорном нейроне [49]. Впоследствии вещество транспортируется вдоль аксона обонятельного сенсорного нейрона в обонятельную луковицу. Как только молекулы доставляются к истокам нервов в мозге, они могут рассеяться по всему мозгу. Другим путем является путь обонятельного эпителия, где вещество всасывается и далее попадает в ЦНС с помощью зазоров, окружающих обонятельный нервный тракт [50,51]. Из лопастной пластинки вещество может быть поглощено местными кровеносными сосудами или лимфатическими сосудами, но большинство веществ транспортируются через периневральное пространство, между обонятельными клетками и фибробластами обонятельного нерва. Это пространство приводит к субарахноидному пространству мозга, откуда вещество может дальше распространяться по структурам головного мозга [39,49].

Несмотря на значительные преимущества носовой полости как пути введения ЛП, некоторые физиологические характеристики выступают значительными ограничивающими факторами для применения каждой группы АФС.

Мукоцилиарный клиренс, отвечающий за постоянное обновление слизистой оболочки и удаление инородных тел с ее поверхности, не позволяет ЛП удерживаться в носовой полости и в максимальной мере оказывать фармакологическое действие. Также стоит учитывать факт, что при частоте биения ресничек 10-15 взмахов в минуту, инородное тело, попавшее в носовую полость, пройдет путь от передних отделов до носоглотки за 5-20 минут [52]. С целью повышения вероятности получения нужного терапевтического эффекта некоторые ЛП выпускаются с заведомо завышенной дозой АФС [53–56].

Помимо мукоцилиарного клиренса на введенный ЛП могут влиять ферменты, находящиеся на поверхности слизистой. За счет сочетанного воздействия различных химических структур назального секрета – NaCl, KCl, CaCl₂, муцин, гликопротеиды, лактоферрин, лизоцим,

ингибиторы протеазы – возможна трансформация АФС и, как итог, недостаточный фармакологический эффект или полное его отсутствие [54,55,57].

Другим недостатком носовой полости, как пути доставки АФС, является ограниченная площадь аппликации препарата. Задействованная в пропускании препарата площадь лимитирована респираторной областью носовой полости – 130 см². В случае доставки препаратов по механизму NTV ограничения становятся более ощутимыми – обонятельная область занимает не более 10 см² (~5%) [58]. Также имеются ограничения по максимально допустимому объему препарата для единовременного введения в носовую полость – 200 мкл. Такие ограничения необходимы для обеспечения беспрепятственного вдоха и выдоха даже после введения лекарственного препарата. Также подобный лимит по объему дозы позволяет избежать неприятного эффекта стекания лекарственного препарата по носоглотке.

Проблему ограниченного объема для введения лекарственного препарата возможно решить при выборе АФС с высокой растворимостью. Малорастворимые вещества представляют особый интерес при разработке систем доставки. Для повышения их растворимости можно применять различные технологические методы, способные повысить вероятность внедрения в систему доставки для интраназального применения. К подобным методам относят: микронизация и аморфизация частиц субстанции, получение со-кристаллов, получение твердых дисперсий и один из простейших методов – солюбилизация. Последний метод не всегда будет подходить для получения препарата для назального введения, так как иногда требует применения химических веществ, способных вызвать цилиотоксическое воздействие на слизистую [59–63].

Выбор подходящей упаковки и распылительной системы для лекарственного препарата позволит повысить вероятность попадания препарата на запланированную дизайном исследования часть носовой полости. В случае с носовой полостью конечной целью для АФС может быть системное кровяное русло или головной мозг. При желании доставки препарата в системный кровоток следует выбрать распылительную систему с рассеянным факелом распыления для образования мелкой капельной фазы и хорошего распределения на поверхности слизистой. При таком выборе ЛП с максимальной скоростью попадет в кровь. Для доставки препарата к обонятельной луковице и затем в головной мозг следует подобрать распылительную систему с более узким факелом распыления для лучшего нацеливания на обонятельную область носовой полости.

Единственной до конца не решенной проблемой для интраназальной доставки препаратов остается мукоцилиарный клиренс. Замедлить его воздействие на лекарственный препарат возможно при повышении вязкости ЛФ. Однако введение вязкой текстуры в носовую полость снова ставит под вопрос возможность равномерного распыления и распределения препаратов по поверхности слизистой.

1.5. Стимулочувствительные системы для доставки препаратов по механизму из носа в мозг

Наиболее полную биодоступность АФС при интраназальном введении возможно достичь при увеличении времени экспозиции препарата на поверхности слизистой. Ввиду необходимости распыления препарата требуется лекарственная форма, имеющая в своем нативном состоянии форму жидкости с низкой вязкостью, а после распыления образующая вязкий, структурированный гель. Подобные системы называются стимулочувствительными (*in situ*) системами [53,64,65]. *In situ* системы представляют собой современные системы направленной доставки, изменяющие свое фазовое состояние при попадании в предполагаемое дизайном исследования место введения. Инициация фазового перехода осуществляется при воздействии различных физиологических и патологических стимулов. Термин *in situ*, как обозначение гелеобразующих систем доставки препаратов, был упомянут в 1984 году [66]. Развитие темы интраназальной доставки с помощью подобных систем было начато лишь в начале 2000-х [67]. Для разработки и производства подобных систем доставки используются так называемые смарт-полимеры.

1.5.1. Смарт-полимеры для разработки стимулочувствительных систем доставки

Смарт-полимеры классифицируют по типу стимула, запускающего *in situ* гелеобразование: термореверсивные, pH-чувствительные, фазоинверсионные, ионселективные, фоточувствительные, влагоактивируемые.

Наиболее изученной и распространенной группой полимеров, применяемой для разработки интраназальных *in situ* систем, являются термореверсивные. Как понятно из названия, стимулом для золь-гель перехода у этих полимеров является температура – ее повышение и понижение.

Класс pH-чувствительных (pH-селективных) полимеров часто используется в процессе разработки *in situ* систем для внутриопухолевого введения (внутриопухолевые имплантаты). Инициация золь-гель перехода в случае pH-чувствительных осуществляется при значительном изменении показателя pH. Применение подобных систем доставки для интраназальных форм возможно при условии отсутствия цитоотоксического воздействия композиции и способности полимера образовывать гель при значении pH носовой полости (5,0-6,5).

Ионселективные (ион-чувствительные, ион-триггерные) полимеры на сегодняшний день являются самыми многообещающими полимерами. Стимулом гелеобразования в данной группе полимеров является состав секрета носовой полости. Содержащиеся в слизи ионы Na^+ , K^+ , Ca^{2+} связываются с полимерами и образуют структурированные и устойчивые гели.

Полимеры, способные обеспечивать фазоинверсионный золь-гель переход, чаще всего находят свое применение в разработке лекарственных препаратов для имплантации. Стимулом гелеобразования является диффузия растворителя из системы в окружающие ткани, после чего происходит формирование нерастворимой матрицы в месте введения. Использование данного вида смарт-полимеров в назальных лекарственных формах не представляется возможным в связи с наличием органического растворителя и необходимостью его проникновения в ткани слизистой носа. В случае поглощения растворителей тканями слизистой оболочки носовой полости высок риск нарушения процессов дыхания и обоняния.

Эксплуатация фоточувствительных полимеров возможна как при разработке систем для наружного применения, так и для парентеральных систем доставки. За счет воздействия энергии ультрафиолетового излучения происходит сшивание цепей полимера и образование устойчивой матрицы, способной высвобождать лекарственный препарат. Помимо УФ-излучения стимулов для фоточувствительных полимеров можно использовать свет в ближней инфракрасной области. К сожалению, на сегодняшний день применимость данной группы полимеров для интраназального применения не изучена.

Довольно новой и интересной подгруппой являются полимеры, совершающие фазовый золь-гель переход при взаимодействии с определенными классами ферментов в организме человека [68]. В зависимости от типа полимера можно выделить системы для назального, кишечного, желудочного, глазного применения. Так как каждая система органов специфична собственным набором активных ферментов, то и состав полимеров возможно подобрать для обеспечения конкретной локализации высвобождения АФС. Но подобные системы достаточно сложны для синтеза и в итоге не будут обладать столь явной селективностью к стимулам носовой полости. Главным ограничением в производстве фермент-активируемых систем является низкая экономическая целесообразность, так как при меньших затратах можно получить более стоящий и эффективный продукт. В сравнительном анализе фермент-активируемые полимеры явно проигрывают другим видам стимулочувствительных систем для интраназального введения [68–70].

Влагоактивируемые полимеры чаще всего представлены порошками и при взаимодействии с водой на поверхности слизистой начинают набухать. Главным недостатком данной группы полимеров является высокий риск раздражения слизистой и инициации естественного механизма защиты организма от инородных тел в носовой полости – чихание. При чихании внушительная часть лекарственного препарата будет удаляться со слизистой и никакого фармакологического эффекта не проявится. Сравнительная характеристика различных типов стимулочувствительных систем приведена в таблице 1.2.

	S	W	O	T
Термореверсивные	- Быстрое гелеобразование - Хорошо изучена - Простота производства - Совместимость с множеством АФС	- Требует холодовой цепи - Сложность транспортировки - Ограниченная пролонгированность - Высокая стоимость производства	- Возможность использования полимеров как многофункциональных вспомогательных веществ - Влияние на t гелеобразование при коррекции составов	- Изменение t гелеобразование при хранении - Регуляторные требования - Высокие затраты = высокая стоимость для потребителя - Преждевременное гелеобразование
Ионселективные	- Мгновенное гелеобразование - Стабильны при комнатной температуре - Естественный триггер - Хорошая биосовместимость	- Непредсказуемость из-за вариабельности ионов - Сложность контроля - Ограниченный выбор полимеров - Сложность стандартизации	- Повышенный интерес к природным полимерам - Одобрение большинства полимеров как для пищевой, так и для фармацевтической промышленности	- Аллергические реакции - Взаимодействие с компонентами системы
pH-чувствительные	- Контролируемое гелеобразование - Стабильны при кислом pH - Широкий выбор полимеров	- Вариабельность pH назальной жидкости - Преждевременное гелеобразование - Сложность стабилизации	Использование в качестве носителей для АФС с низким pH	- Вариабельность pH между пациентами - Взаимодействие с буферами - Сложность регуляторного одобрения - Цилютоксичность
Фазоинверсионные	- Формирование устойчивых гелей - Возможность создания имплантатов	- Необходимость использования органических растворителей - Дорогостоящие полимеры	*	- Цилютоксичность - Высокие затраты на создание - Низкая стабильность при хранении - Сложность удаления полимеров с поверхности носовой полости
Влагоактивизируемые	- Стабильны при хранении - Не требуют холодовой цепи - Простота производства - Длительный срок годности	- Медленное гелеобразование - Непредсказуемость из-за влажности - Требует влагостойкой упаковки - Ощущение сухости	- Стабильны при хранении - Не требуют холодовой цепи - Простота производства - Длительный срок годности	- Вариабельность влажности - Преждевременное гелеобразование - Дегградация полимеров - Нарушение условий хранения и дальнейшая непригодность препарата
Фоточувствительные	- Точный пространственный контроль - Не зависит от физиологии - Неинвазивное управление - Локальная активация	- Требует специального оборудования - Ограниченное проникновение света - Фотодеградация лекарства - Высокая стоимость	- Тренд на развитие фоточувствительных полимеров - Слабая изученность темы дает почву для множества исследований	- Сложность регуляторного одобрения - Высокие затраты - Риск фотодеградации - Ограниченный рынок
Фермент-активируемые	- Высокая ферментативная специфичность и селективность - Протеазоустойчивые формулировки - Возможность ковалентного присоединения лекарств	- Сложность стандартизации - Высокие производственные затраты - Ограниченный клинический опыт	- Спрос на долгодействующие формулировки - Достижения в синтезе пептидов	- Вариабельность наличия ферментов в носовой полости разных пациентов - Трудности масштабирования производства
* - в данной категории стимулочувствительных систем нет возможностей для развития в области назальной доставки лекарственных препаратов				

Рисунок 1.4 – SWOT-анализ назального применения различных классов стимулочувствительных полимеров

Представленная схема SWOT-анализа на рисунке 1.4 аккумулирует данные по характеристикам всех известных стимулочувствительных полимеров и по возможностям их применения в технологии изготовления интраназальных систем доставки. В схеме использованы следующие обозначения: S (strength – сильные стороны) – преимущества для производства и применения; W (weakness – слабые стороны) – технологические и регуляторные ограничения; O (opportunities – возможности) – перспективные направления развития; T (threats – угрозы) – риски при масштабировании и клиническом применении.

В зависимости от места аппликации лекарственного препарата возможно подобрать полимер, удовлетворяющий всем требованиям дизайна исследования и желаемой системы доставки.

В некоторых публикациях описаны термореверсивные способности хитозана в *in situ* гелеобразовании, при использовании его в комбинации с поллоксамерами, комплексы с которыми характеризуются улучшенными биофармацевтическими свойствами – добавление хитозана обеспечивает прочную мукоадгезию геля на слизистой оболочке носовой полости, за счет чего снижается действие мукоцилиарного клиренса на экспонируемую лекарственную форму.

Хитозан — это линейный полисахарид, полученный из хитина путем деацетилирования. Его основная структура состоит из единиц D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, связанных β -1,4-гликозидными связями. Хитозан хорошо известен своей способностью к биологическому разложению, биосовместимостью и мукоадгезивными свойствами. Мукоадгезивность хитозана можно объяснить электростатическим взаимодействием между положительно заряженной молекулой хитозана катионной природы и отрицательно заряженным муцином [67,72–77]. По классификации, принятой среди специалистов в области *in situ* систем, хитозан относится к pH-зависимым полимерам – применяемый в качестве основы в растворимой солевой форме (чаще формиата, сукцината, лактата и др.), при повышении pH на месте применения, образует гелевый матрикс (рисунок 1.5).

Таблица 1.2 – Сравнительная характеристика стимулочувствительных систем для назального применения

[illegible]

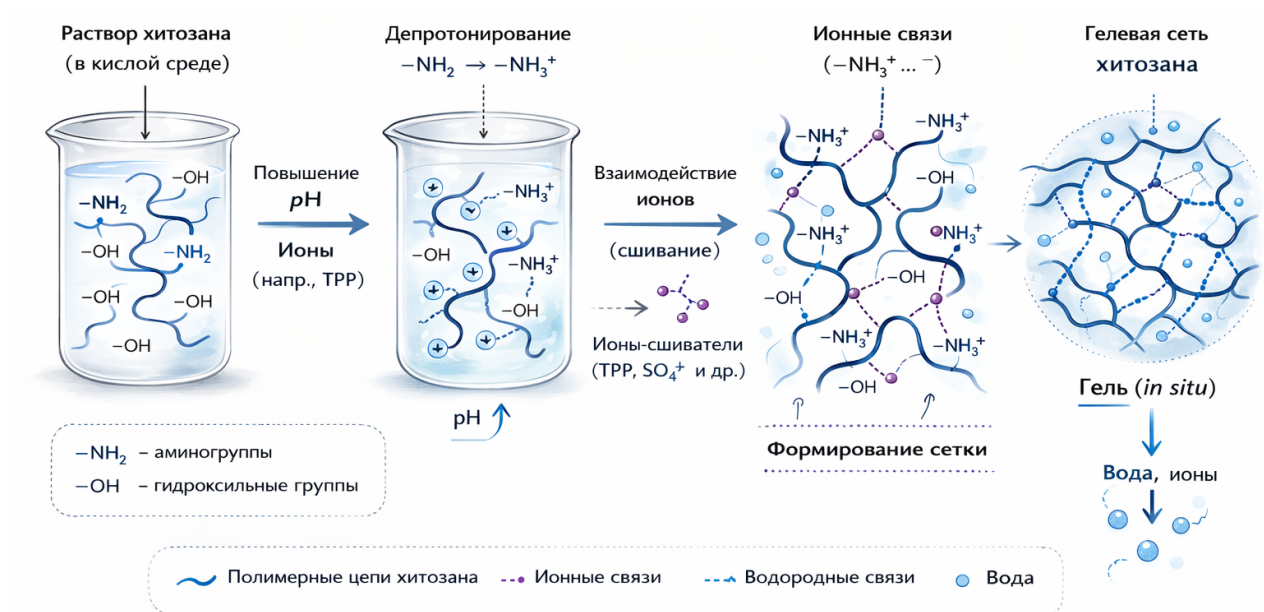


Рисунок 1.5 – Схема стимулочувствительного гелеобразования раствора хитозана (рисунок сгенерирован с использованием ИИ – ChatGPT-5.5)

Еще одним свойством хитозана является его широкий спектр фармакологического действия. Он обладает гемостатической, гипотензивной, противоподагрической, антисептической, антибактериальной активностью. Также в недавних исследованиях было изучено свойство ингибирования вальпроата при применении препаратов с содержанием хитозана [78]. Наиболее выраженным и изученным фармакологическим эффектом хитозана является его антимикробная активность. Полианионы и поликатионы (такие как хитозан) благодаря способности к многоточечному кооперативному взаимодействию с иммунокомпетентными клетками, могут обеспечить модуляцию различных звеньев иммунной системы. В связи с этим поликатионные полисахариды, широко представленные в морских водорослях и ракообразных, могут рассматриваться как потенциальные иммуномодуляторы [79]. Наличие этих преимуществ делает хитозан перспективным полимером для его использования в качестве *in situ* полимера.

Полоксамеры представляют собой неионные триблок-сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена, окруженной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксид)-b-поли(пропиленоксид)-b-поли(этиленоксид) (ПЭО-ППО-ПЭО) [67,72–77]. Полоксамеры имеют различные соотношения оксипропиленовых и оксиэтиленовых блоков, а также молекулярные массы, что объясняет различные свойства конкретных полимеров и их широкое использование в медицине и других сферах.

Полоксамеры амфифильны и в воде образуют мицеллы, где гидрофобные домены ППО, взаимодействуя друг с другом посредством ван-дер-ваальсовых сил, формируют гидрофобное

ядро, а гидрофильные домены ПЭО занимают гидрофильную оболочку, образуя с молекулами воды водородные связи.

В фармацевтической технологии наиболее широко используемыми являются полуксамеры 188 (Мм 8000, процент полипропиленоксидного блока около 80%), 407 (Мм 12600, процент полипропиленоксидного блока около 73%), 124 (Мм в среднем 2500, процент полипропиленоксидного блока около 46%).

В исследованиях для водного раствора полуксамера 407 показан *in situ* фазовый переход и возникновение гелеобразования при повышении температуры в концентрациях полимера больше 15%, когда объемная доля мицелл увеличивалась до критического значения (0,5) для кристаллических образований твердой сферы. При дальнейшем повышении температуры агрегационная конформация гидрогелей полуксамера изменилась со сферических мицелл, плотно упакованных в кубическую решетку, на стержнеобразные мицеллы, упакованные в гексагональную систему, что привело к уменьшению межмицеллярных взаимодействий (рисунок 1.6). При дальнейшем повышении температуры происходил переход из золя в гель из-за уменьшения межмолекулярных взаимодействий, вызванных частичной дегидратацией блоков полиэтиленоксида [80].

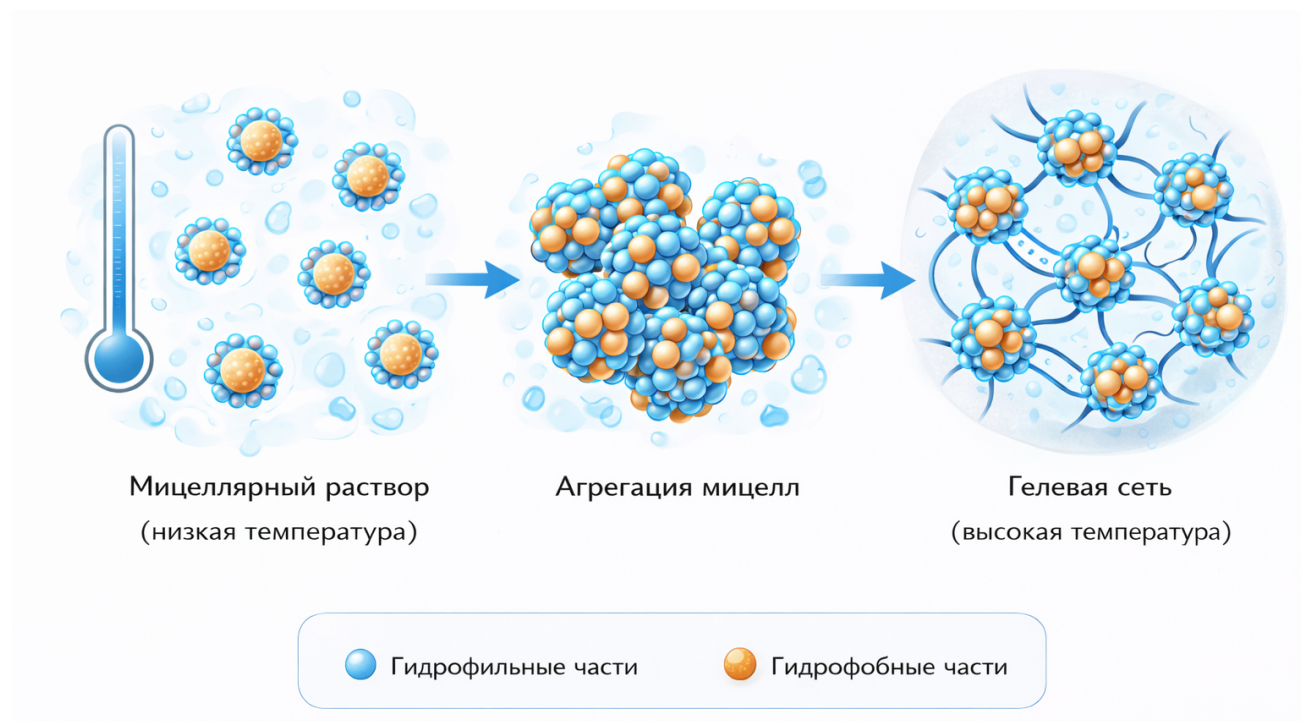


Рисунок 1.6 – Схема стимулочувствительного гелеобразования раствора полуксамера 407 (рисунок сгенерирован с использованием ИИ – ChatGPT-5.5)

Полуксамер 188 является одобренным FDA (Food and Drug Administration) коммерчески доступным биосовместимым триблок-сополимером, обладает наименьшей токсичностью среди

соединений Pluronic® и используется в качестве солюбилизатора, эмульгатора и носителя генерических препаратов во многих системах доставки лекарств. Поллоксамер 188 — это безопасный биосовместимый полимер, который может быть использован в системе доставки белковых лекарств [81]. Полимер широко используется в современных биотехнологических препаратах, благодаря своей способности стабилизировать клеточные мембраны. В последнее десятилетие стали активно изучать фармакологическую активность поллоксамера 188, и было доказано, что он может использоваться в лечении серповидноклеточной анемии [82]. Также стоит упомянуть гемореологические, антитромботические, противовоспалительные свойства поллоксамера 188, которые сейчас очень активно исследуются [83].

Из перечисленных ранее триблок-сополимеров поллоксамер 124 единственный имеет жидкое агрегатное состояние при комнатной температуре. Поллоксамер 124 является рекомендованным производителем эксципиентом для биотехнологии. С точки зрения фармацевтической технологии, поллоксамер 124 может использоваться как солюбилизатор, пластификатор и эмульгатор. Также важным свойством в производстве лекарственных форм для местного применения является свойство поллоксамера 124 улучшать мукоадгезию [84]. В частности, поллоксамер 124 является одним из соединений с меньшей молекулярной массой в серии поллоксамеров, однако его фармакокинетические свойства *in vivo* все еще неясны [85,86].

Популярность использования поллоксамеров в технологии *in situ* систем объясняется селективной чувствительностью композиций на их основе к определенной температуре, характерной для слизистой в месте применения. Как уже отмечалось, основным термочувствительным компонентом является поллоксамер 407, однако введение как других поллоксамеров, так и вспомогательных веществ иной природы (карбопола, хитозана, альгинатов, камедей) способно регулировать температуру фазового перехода в необходимых диапазонах значений. Кроме того, введение в состав комплекса с поллоксамером 407 других эксципиентов способно повысить стабильность композиции, улучшить биофармацевтические свойства [87].

Для получения *in situ* систем изучено использование также трех видов **камедей**: геллановой, ксантановой и гуаровой [88–92]. Камеди в составе *in situ* систем реализуют ионселективный фазовый переход, что может быть эффективно использовано для интраназального введения, учитывая, что назальный секрет содержит ионы кальция, натрия и калия (pH 6±0,1) [93].

Геллановая камедь (геллан) — это биополимер, синтезируемый бактерией *Sphingomonas elodea*, который широко применяется в фармацевтике, пищевой промышленности и биотехнологии благодаря своей способности к обратимому золь-гель переходу [94]. Нативный (природный) геллан состоит из основной цепи, образованной повторяющимся звеном: [β -1,3-D-глюкоза, β -1,4-D-глюкуроновая кислота, β -1,3-D-глюкоза, α -1,4-L-рамноза]. Кроме того, он содержит две ацильные группы — ацетатную и глицератную, которые связаны с остатком

глюкозы, соседствующим с глюкуроновой кислотой. Геллановая камедь легко комбинируется с другими полимерами, что расширяет ее область применения [95].

Гуаровая камедь — неионный гидрофильный биополимер — считается ценным сырьем благодаря своей длинной молекулярной цепи, высокой молекулярной массе и широкой доступности по сравнению с другими биополимерами, используемыми при разработке новых «умных» материалов для очистки воды. Гуаровая камедь отличается своей низкой себестоимостью, возможностью масштабирования культивации и отличной растворимостью в воде [96].

Ксантановая камедь — анионный полисахарид микробного происхождения (продуцируется бактериями *Xanthomonas*). Будучи природным полимером, она находит широкое применение не только в пищевой и косметической промышленности, но и в фармацевтике, где ее физико-химические свойства способствуют созданию и оптимизации систем доставки лекарств. Последние исследования подтверждают перспективность использования ксантановой камеди в разработке носителей для противовирусных и антибактериальных препаратов, трансдермальных терапевтических систем, вагинальных лекарственных форм и средств для терапии онкологических заболеваний [97].

Золь-гель переход геллановой камеди в водных растворах представляет собой двухстадийный процесс, общий для ряда гидроколлоидов. На первой стадии происходит конформационное упорядочение макромолекул из случайной спиральной формы в зоны двойного спирального соединения, после чего осуществляется агрегация образовавшихся двойных спиралей с формированием узлов сшивания (точек соединения), что инициирует гелеобразование. Ключевыми механизмами стабилизации геля являются ионное сшивание посредством комплексообразования с катионами и образование водородных связей с молекулами воды. Двухвалентные катионы (например, Ca^{2+}) существенно повышают прочность геля по сравнению с одновалентными (Na^+ , K^+), особенно при использовании низкоацилированных форм геллана, что объясняется их способностью образовывать более прочные ионные мостики между карбоксилатными группами полимерных цепей (рисунок 1.7). Предложенный механизм гелеобразования идентичен таковому у пектина, где также доминируют ионное сшивание через катионы (Ca^{2+}) и водородные связи, что подчеркивает общие принципы структурообразования в системах с полиуронидами и позволяет прогнозировать поведение геллана на основе хорошо изученной модели пектиновых гелей [94].

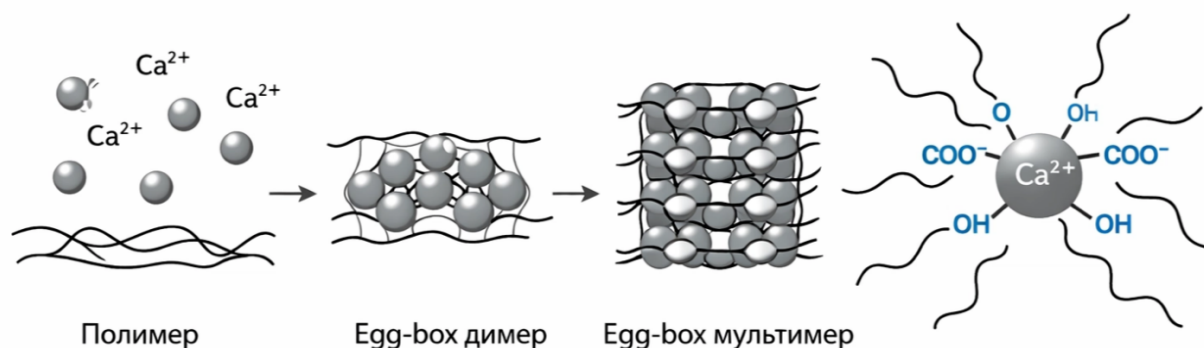


Рисунок 1.7 – Механизм гелеобразования ионселективных полимеров (рисунок сгенерирован с использованием ИИ – ChatGPT-5.5)

В числе изучаемых полимеров камеди являются представителями природных полисахаридов с выраженной селективностью к ионам кальция при гелеобразовании. Круг высвобождаемых из таких матриц объектов не ограничивается синтетическими субстанциями и охватывает белки, клетки, факторы роста; этим обусловлена востребованность камедей в тканевой инженерии. При совместном введении геллановой и ксантановой камедей в идентичных концентрациях структурирование завершается практически мгновенно. Производные ксантановой камеди, кроме того, служат для инкапсулирования АФС и переноса хондроцитов при реконструкции хрящевой ткани [94]. Важным преимуществом всех видов камедей является их широкая доступность на российском и мировом рынке эксципиентов.

Также в ряде фармацевтических *in situ* композиций для интраназальной доставки АФС используется пектин.

Под **пектином** понимают группу гетерогенных полисахаридов, скелет которых образован остатками галактуроновой кислоты, связанными α -1,4-связями; преобладают в нем именно остатки α -галактуроновой кислоты. В состав этого гетерополисахарида входит не менее 17 моносахаридов, среди которых доминируют d-галактуроновая кислота, d-галактоза и l-арабиноза [58,98–100]. В пищевой и фармацевтической отраслях пектин считается общепризнанным безопасным веществом GRAS (Generally Regarded as Safe – общепризнанно безопасный). Типичная для стимулочувствительных систем концентрация пектина составляет 20 мг/мл; небольшое ее превышение на реологию раствора существенно не влияет.

Роль пектина, как и роль хитозана, не сводится к функции индифферентного носителя. Наибольшая антимикробная активность зарегистрирована для его цинковых комплексов; свободный пектин, в свою очередь, обнаруживает антиканцерогенное действие при раке толстой кишки [101]. Фармацевтическая промышленность оперирует пектином пищевого качества, различающимся степенью этерификации. Основное мировое производство и рынок как

пищевого, так и фармацевтического пектина сосредоточены в Европе, Южной Америке, Китае и Иране. На данный момент в России не налажено собственное производство пектина [102].

К smart-полимерам, находящим применение в технологии интраназальных стимулочувствительных систем, относятся и редкосшитые акриловые полимеры – карбомеры (карбополы).

Карбомеры представляют собой высокомолекулярные сшитые полимеры полиакриловой кислоты. Карбопол проявляет золь-гель-переход в водных растворах при повышении pH (pH-зависимый фазовый переход) выше его pKa примерно на 5,5. Кислотные карбоксильные группы полимера частично диссоциируют в воде и начинают разматываться, образуя гибкую спиральную структуру. В кислых условиях небольшая доля карбоксильных групп, присутствующих в полимере, диссоциирует, образуя гибкую спиральную структуру (рисунок 1.8) [77,103].

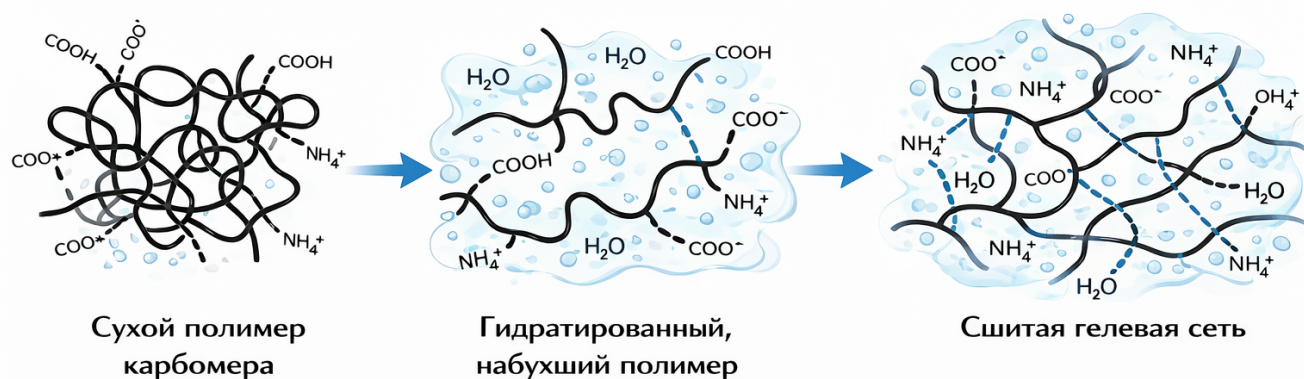


Рисунок 1.8 – Механизм гелеобразования карбомеров (рисунок сгенерирован с использованием ИИ – ChatGPT-5.5)

В медицинской практике водные растворы карбомеров используют в терапии офтальмологических заболеваний (спреи, гели, мази, слезные вкладыши, муколитические средства), а также как физический контрацептив – используется вагинально в качестве спермицида, который также защищает от ВИЧ-инфекции и, возможно, других заболеваний, передающихся половым путем [104]. Сравнительная характеристика наиболее часто используемых полимеров в создании назальных стимулочувствительных систем доставки приведена в таблице 1.3.

Примечание: * - зависит от солевой формы полимера; ** - набухающий полимер.

1.5.2. Опыт применения стимулочувствительных систем для интраназальной доставки

На сегодняшний день путь доставки NTB очень часто применяется для лечения неврологических заболеваний и других нарушений функций головного мозга. Использование композиций вышеперечисленных смарт-полимеров значительно облегчает разработку систем доставки АФС в головной мозг.

В исследовании Тао, Т. et al. проводилась разработка *in situ* геля для доставки гуперзина А напрямую в головной мозг через носовую полость [105]. Гуперзин А – природный алкалоид, используемый в китайской медицине для лечения деменции [106]. Сегодня эта субстанция применяется при болезни Альцгеймера, а носителем для нее послужил ион-чувствительный полимер – геллановая камедь.

В опытах *in vivo* на крысах интраназальное введение обеспечивало AUC в плазме крови на уровне 0,94 от внутривенного, тогда как в спинномозговой жидкости этот показатель превышал внутривенный и желудочный варианты в 1,3 и 2,3 раза. AUC гиппокампа, мозжечка, левой и правой обонятельных луковиц после введения в нос составляет 1,5, 1,3, 1,0, 1,2 и 1,0, а после внутривенного введения, 2,7, 2,2, 1,9, 3,1 и 2,6 раза больше, чем после желудочного введения, соответственно. Интраназальное введение 17,5–35 мкг/кг показало равный эффект после перорального введения 70 мкг/кг коммерческих таблеток. Интраназальное введение гуперзина А улучшило распределение АФС в тканях мозга, особенно в гиппокампе [105].

Перспективный термореверсивный гель, содержащий генипозид, был разработан исследовательской группой больницы города Цзинин (Китай) [107]. В состав матрицы *in situ* геля входили полоксамер 407, полоксамер 188 и гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) – композиция из термочувствительного и мукоадгезивных полимеров. Исследование было посвящено изучению *in vitro* характеристик разрабатываемого геля. В качестве критических показателей для анализа были выбраны: прозрачность композиции, pH, температура гелеобразования, прочность геля, сила мукоадгезии, высвобождение АФС *in vitro*. По результатам проведенных испытаний было выделено 3 оптимальных состава с различным соотношением полоксамеров 407 и 188 и ГПМЦ. Было отмечено, что ГПМЦ значительно повышает прочность образуемого геля. При исследовании *ex vivo* кумулятивное высвобождение генипозиды из оптимизированного термореверсивного назального геля *in situ* составило 83,1–89,8%, что дает отличную почву для проведения доклинических исследований на животных моделях [107].

Препараты для лечения шизофрении, как и другие АФС для лечения психических расстройств, могут с большей эффективностью оказывать фармакологическое действие при их доставке непосредственно в головной мозг. В экспериментальном исследовании Sherje A. P. et al.

проводилась разработка pH-чувствительного геля на основе карбопола 934 и ГПМЦ. В качестве изучаемого АФС был выбран палиперидон – препарат для облегчения симптомов шизофрении. Также для улучшения высвобождения АФС в систему доставки дополнительно вводили гидроксипропил- β -циклодекстрин. Данные *in vitro* и *ex vivo* исследований показали, что разработанный *in situ* гель не оказывает токсического воздействия на слизистую оболочку носовой полости. Также было отмечено повышение биодоступности АФС при добавлении гидроксипропил- β -циклодекстрина [108].

В своем исследовании 2020 года коллектив ученых из Пекинского и Шандуньского университетов Китая провел сравнительное изучение назального и перорального пути доставки пуэрарина для профилактики травм головного мозга, вызванных гипобарией и гипоксией [109]. В качестве интраназальной формы пуэрарина был использован термореверсивный *in situ* гель на основе полксамеров 407 и 188. Пероральная форма была использована в виде суспензии пуэрарина. По результатам *in vivo* испытаний ученые доказали, что биодоступность при введении в полость носа на 300% превосходила биодоступность перорального приема пуэрарина. Данные показатели были получены после вскрытия крыс и оценки концентрации АФС в головном мозге животного [109].

Так как мозг является главным пораженным органом при посттравматическом стрессовом расстройстве, Pang et al. разработали новый лекарственный препарат для доставки каннабидиола в обход ГЭБ [110]. Традиционными методами введения АФС трудно было добиться требуемой биодоступности для оказания терапевтического эффекта. С целью увеличения времени экспозиции и полноты высвобождения АФС было принято решение использовать интраназальную *in situ* систему для NTV доставки препарата. Матрицу формировали из смеси полксамеров 407 и 188 – композиции с термореверсивными свойствами, способной прямо в месте аппликации переходить из раствора в структурированный гель. При сравнении биодоступности интраназального *in situ* геля и перорального пути введения, концентрация первого оказалась выше на 313% и 693% в головном мозге и крови соответственно [110].

Полксамеры как наиболее изученные и распространенные *in situ* полимеры были использованы и в исследовании Zhang et al. в комбинации с гидроксипропил- β -циклодекстрином. Термореверсивные свойства полксамеров были применены для разработки *in situ* геля с тетрандрином – АФС, получаемой из растения *Stephania tetrandra*, – для лечения повреждений мозга, вызванных микроволновым излучением. Во время *in vivo* испытаний на крысах было достигнуто 70% высвобождения АФС из матрицы *in situ* геля за 6 часов [111].

Также доставка NTV была исследована у Wafaa Alabsi et al. для более качественной и быстрой доставки пептидов в виде назальных аэрозолей. Ввиду того, что инвазивные методики доставки пептидов в мозг связаны с высокими рисками развития воспалений, повышенного

внутричерепного давления, инфекций, изначально были выбраны альтернативные способы, такие как диффузия, эндоцитоз, опосредованный рецепторами, и поглощение, опосредованное переносчиками. Было доказано, что слабость потенциала водородных связей, липофильность и малый размер молекул с отсутствием свободных вращающихся связей и площадью полярной поверхности $< 60\text{-}70 \text{ \AA}$ (будучи в основном неполярной) благоприятны для проникновения через ГЭБ путем диффузии [112].

В университетах США в 2023 году был разработан *in situ* гель для доставки кветиапина гемифумарата NTB. Высвобождение кветиапина гемифумарата из системы *in vitro* показало постоянное высвобождение из ЛС действующего вещества в мозг. Исследование гемолиза *ex vivo* показало, что разработанный гель не проявлял гемолитических симптомов по сравнению с чистым кветиапина гемифумаратом и отрицательным контролем. Тесты на цитотоксичность *in vitro* против эпителиальных клеток носа человека RPMI-2650 показали безопасность геля по сравнению с чистым действующим веществом [113].

Исследование Badran M. et al. было направлено на создание покрытых хитозаном наночастиц поли-ε-капролактона, нагруженных бромцептина мезилатом, для прямого воздействия на мозг через нос. Были исследованы независимые параметры состава для атрибутов наночастиц, включая полезную нагрузку PCL, концентрацию D-α-токоферол-полиэтиленгликоля 1000 сукцината и время обработки ультразвуком. Зависимыми переменными были размер наночастиц, дзета-потенциал, эффективность захвата и скорость высвобождения лекарственного средства. Наночастицы, покрытые 0,25% хитозаном, показали высокий уровень проникновения через слизистую оболочку носа козла с мукоадгезивной прочностью [114].

1.6. Существующие разработки интраназальной доставки рибавирина

Первыми исследовать возможность доставки рибавирина через носовую полость стали ученые из Италии. Пилотный эксперимент на крысах линии Sprague Dawley (10 мг/кг) показал, что уже через 10, 20 и 30 минут после интраназального введения рибавирина определялся в мозжечке, обонятельной луковице, коре головного мозга, базальных ганглиях и гиппокампе – максимум приходился на обонятельную луковицу, – а также в спинномозговой жидкости и плазме [115].

В двух последующих экспериментах *in vivo* сравнивали назальный путь (раствор рибавирина) с внутривенным применением; назальное введение раствора рибавирина – с порошком рибавирина (10 мг/кг). Было обнаружено, что через 20 мин после введения концентрация рибавирина в обонятельной луковице была одинаковой после внутривенного или назального введения раствора рибавирина, тогда как использование твердого носителя

приводило к значительно более высоким концентрациям. Например, в обонятельной луковице количества составили 1123 ± 409 и 3255 ± 1003 нг/г соответственно, точно так же уровни рибавирина были значительно выше после введения в форме порошка для ингаляций в коре головного мозга, гиппокампе и базальных ганглиях, тогда как в случае плазмы достоверных различий не наблюдалось (124 ± 26 и 140 ± 21 нг/мл соответственно).

Авторы исследования предположили, что причиной столь существенной разницы концентраций после интраназального введения рибавирина в форме раствора и порошка является более сильный и продолжительный контакт между порошком и слизистой оболочкой и, как следствие, более высокий градиент концентрации. По сравнению с внутривенным введением рибавирина в аналогичной концентрации, интраназальное введение порошковой формы рибавирина было существенно ниже, за исключением обонятельной луковицы, где концентрация после введения порошка была в 1,5 раза выше (3255 ± 1003 и 2236 ± 171 нг/г), чем после внутривенной инъекции. В ходе исследований также было показано, что независимо от пути введения рибавирин присутствовал в гиппокампе и базальных ганглиях – двух более глубоких отделах мозга спустя 20 минут после введения. Авторы исследования считали, что это могло быть связано не только с циркулирующей спинномозговой жидкостью, но и с пассивной диффузией внутри паренхимы, за счет создаваемого градиента концентрации от накопленного рибавирина в обонятельной луковице [115].

Исследования порошковой формы для интраназальной доставки рибавирина в мозг, минуя ГЭБ, были продолжены. И в 2018 году опубликовано исследование, посвященное разработке микрочастиц рибавирина с полимерным покрытием, призванным усилить абсорбцию [116].

Была разработана порошковая формула в форме агломератов, содержащая микронизированный рибавирин и высушенные распылением микрочастицы, содержащие маннит, хитозан и α -циклодекстрин.

В ходе исследования пенетраторы хитозан и маннитол показали меньшее количество рибавирина, проникающего через иссеченную ткань носа, тогда как α -циклодекстрин оказался превосходящим другие составы и соответствовал высокорастворимому микронизированному порошку рибавирина, взятому в качестве эталона. Назальное введение крысам *in vivo* агломератов, содержащих α -циклодекстрин, показало в целом более высокое накопление рибавирина во всех проанализированных отделах мозга по сравнению с микронизированным рибавирином, вводимым без вспомогательных микрочастиц [116].

Vasa D. et al. были предложены микрочастицы рибавирина с полуксамером 188, использующимся в качестве интраназального пенетратора. Композиционные твердые микрочастицы, пригодные для интраназального введения, получали путем суспендирования мелких кристаллов рибавирина в матрице полуксамера 188, которые криогенно измельчали и

характеризовали для обеспечения того, чтобы рибавирин оставался стабильным на протяжении всего приготовления. Диффузия рибавирина *in vitro* через полупроницаемую регенерированную целлюлозную мембрану показала сопоставимое кумулятивное высвобождение лекарственного средства через 180 мин как из мелких твердых частиц (<20 мкм), так и из микрочастиц рибавирин:полоксамер 1:1 ($d_{50} = 20$ мкм). Однако первоначальное высвобождение из полимерных микрочастиц происходило медленнее из-за образования геля на поверхности мембраны. Когда твердый рибавирин непосредственно осаждали на иссеченной обонятельной слизистой оболочке либо в виде мелких частиц лекарственного средства, либо в виде микрочастиц рибавирина:полоксамера 1:1, проникновение было значительно увеличено от микрочастиц, содержащих полоксамер 188, что свидетельствует о дополнительных взаимодействиях между полимером и обонятельной слизистой оболочкой. Эти данные указывают на то, что для хорошо растворимых в воде лекарств, таких как рибавирин, или лекарств, подверженных оттоку слизистой оболочкой носа, состав микрочастиц, содержащих полоксамер, может повысить проницаемость обонятельного эпителия и может улучшить прямой транспорт от носа к мозгу [117].

В большинстве клинических исследований механизма доставки НТВ изучали влияние препаратов в форме раствора. Вместе с этим проводится множество доклинических исследований с тестированием различных типов лекарственных форм и их составов, например, растворы и дисперсии частиц. Большинство исследований на животных проводилось на грызунах, а клинические исследования обычно включали использование назального устройства для доставки [118–121].

1.7. Контроль качества стимулочувствительных интраназальных систем на этапах разработки и производства

В процессе фармацевтической разработки стимулочувствительные системы для интраназальной доставки подвергаются всестороннему анализу по показателям качества. Учитывая специфику разрабатываемой лекарственной формы, а именно два ее состояния – нативное, в котором препарат производится, хранится, реализуется; и *in situ* – которое препарат принимает *in vivo*, после введения пациентом, – не все методы исследования приводятся в общепринятых нормативных документах. Все испытания для подтверждения качества можно условно разделить на две группы: фармакопейные и частные (индивидуальные).

Стимулочувствительные интраназальные системы могут быть представлены различными лекарственными формами в своем нативном состоянии до фазового перехода. В зависимости от

этого будут подбираться различные методы для анализа. Чаще всего стимулочувствительные системы доставки представлены в форме спреев.

Требования государственной фармакопеи в отношении спреев описаны в [122]. Перечень испытаний для дозированных спреев без суспензии в составе достаточно ограничен: pH, однородность массы дозы, количество доз в упаковке, однородность дозирования.

Перечисленные показатели не могут в полной мере удостоверить разработчика и производителя в надлежащем качестве стимулочувствительной системы доставки, поскольку не описывают качество образуемой *in situ* формы – гель, а также не учитывают параметры осуществления фазового перехода. В таком случае требуется разработка частных (индивидуальных) методов оценки качества новой лекарственной формы.

Определение pH системы

Одним из самых важных показателей для назальных лекарственных препаратов является показатель pH (испытание проводят, если указано в фармакопейной статье или нормативной документации). Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС "Ионометрия". Значение pH указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. Уже было упомянуто, что носовая полость сочетает в себе несколько важнейших физиологических функций, в число которых входит обоняние. Введение лекарственных препаратов в носовую полость без контроля их кислотности может оказать цилиотоксическое воздействие на слизистую оболочку. В среднем pH назального секрета имеет значение 6,3 (слабокислая) и в связи с этим производство препаратов для назального применения осуществляется в приближенном диапазоне (4,5-6,5). Соблюдение данных норм требуется для минимизации раздражения слизистой и поддержания нормального мукоцилиарного клиренса. Помимо pH лекарственного препарата на мукоцилиарный клиренс оказывает влияние осмолярность препарата – лекарственное ингибирование биения ресничек приводит к многочисленным локальным нежелательным явлениям [39,123–125]. Самым простым и достоверным методом измерения pH является анализ с помощью pH-метра. Подавляющее большинство исследователей пользуются именно этой методикой для определения кислотности разработанных систем доставки [126].

Определение способности к стимулочувствительному гелеобразованию

Основное преимущество использования интраназальных стимулочувствительных систем заключается в увеличении времени удерживания препарата на поверхности слизистой за счет образования геля в носовой полости. В зависимости от стимула гелеобразования, каждая *in situ* система должна подвергаться определению способности к фазовому золь-гель переходу. Система помещается в условия, приближенные к условиям носовой полости (температура, влажность,

ионный состав), и по истечении времени анализируется на предмет образования геля. Для облегчения методики подобные испытания нередко проводятся в пробирке [127–130].

Самым простым и логичным методом оценки образования геля является визуальный анализ. В исследовании Cao, S. et al. при разработке ионселективной системы доставки мометазона фууроата для оценки характера гелеобразования смешивали *in situ* гель с симуляционной назальной жидкостью (СНЖ) в пропорции 1:1. Благодаря тому, что смарт-полимер – геллановая камедь – вступала в реакцию с ионами Ca^{2+} СНЖ, происходило образование структурированного геля [92].

Схожая методика определения указана в исследовании способности гелеобразования для pH-чувствительного *in situ* геля для глазного применения [131]. Потенциал фазового перехода был оценен путем помещения одной капли исследуемого образца во флакон, содержащий 2 мл свежеприготовленной искусственно смоделированной слезной жидкости (STF, pH 7,4) при 37 °C. Оценка гелеобразования проводилась визуально.

Подобным образом проводилась оценка гелеобразования ион-чувствительного геля в исследовании коллектива ученых из Египта. Помимо визуальной оценки в пробирке, ученые предложили метод оценки с помощью распыления геля на пропитанную назальной жидкостью ткань. С помощью данной методики возможно наглядно оценить состояние геля, образуемого на поверхности слизистой оболочки носовой полости [127].

Анализ стимулочувствительности – один из самых простых методов оценки качества *in situ* систем. Оценка этого показателя не отличается сложностью и в термореверсивных системах. Чаще всего исследователи помещают определенное количество испытуемого образца в прозрачную тару, затем нагревают его на водяной бане или при помощи других нагревательных приборов и фиксируют температуру визуального гелеобразования. Таким образом, в исследовании Menshutina N et al. анализировали температуру гелеобразования.

Альтернативный метод оценки температуры гелеобразования предложен в недавнем исследовании Nair et al. 5 мл геля помещали в стеклянный флакон с металлической бусиной. Флакон погружали в термостатированную водяную баню с постепенным повышением температуры. За температуру гелеобразования принимали момент прекращения движения бусины в образце [130,132].

Также стоит отметить, что отдельная характеристика стимулочувствительности в термореверсивных композициях зачастую просто не применима. Многие исследователи пользуются заведомо известными данными о термочувствительности образцов и опускают этап проверки селективности к стимулу. Показатель стимулочувствительности в данных системах заменяется на температуру и время гелеобразования, что является достаточно равнозначной альтернативой и никак не снижает достоверность экспериментов [107,133–135].

Определение температуры и времени гелеобразования

Термореверсивные системы доставки требуют особого подхода в исследовании гелеобразующих свойств [107,130,133,134]. Наиболее распространенным остается подход Gilbert et al., предложенный еще в 1987 году. Аликвоту состава объемом 2 мл вносят в пробирку вместимостью 10 мл и диаметром 1,0 см, герметизируют крышкой либо пленкой PARAFILM® и выдерживают в водяной бане при 8°C. Далее температуру бани поднимают ступенчато: до 18°C – с шагом 2°C, затем с шагом 1°C каждые 10 мин. Моментом гелеобразования считают состояние, при котором мениск перестает смещаться при переводе пробирки в горизонтальное положение [136].

Реологический анализ

Всесторонний анализ реологических показателей стимулочувствительных систем позволяет максимально подробно описать поведение композиции на месте применения. Естественно, все измерения должны проводиться в условиях, идентичных месту применения. Прочность образуемых гелей, их текучесть и вязкость наиболее точно характеризуются реологическими методами исследования. Реологические характеристики лекарственных форм для назального применения напрямую связаны с факелом распыления и размерами частиц распыляемого препарата. Системы доставки с высокой вязкостью не способны проходить через распылительные системы для равномерного распыления на слизистую. В свою очередь факел распыления влияет на площадь распределения лекарственной формы.

Анализ вязкости стимулочувствительных систем возможен путем измерения как кинематической, так и динамической вязкости. В соответствии с [137] определение кинематической вязкости проводится при помощи стеклянных вискозиметров различных типов (Оствальда, вискозиметр с висячим уровнем, вискозиметр с обратным истечением). Данный метод исследования вязкости достаточно прост для многократного воспроизведения и не требует дорогостоящего оборудования в эксплуатации. Однако стеклянные вискозиметры позволяют определить вязкость системы только в ее нативном состоянии. У описанных приборов отсутствует возможность термостатирования и определения вязкости в момент гелеобразования. Подобный метод анализа можно считать предварительным.

Полноценная характеристика реологических свойств системы возможна при анализе динамической вязкости композиции на реометрах. Помимо определения вязкости состава реометры позволяют определить характер кривых течения, а также значения динамической вязкости и предел текучести – напряжение сдвига (прочность) образуемого геля. Преимуществом подобного анализа также является возможность реологического обоснования гелеобразования во времени – как быстро меняется вязкость системы при воздействии стимула золь-гель перехода [92].

Методической основой таких испытаний выступает ротационная вискозиметрия. В работе Wang Q et al. скорость вращения шпинделя реометра последовательно повышали в интервале от 0,3 до 100 об/мин; при 20°C использовали шпиндель SC4-29 с малым адаптером для образца, при 32°C – шпиндель RV7. Скорость и напряжение сдвига, равно как и вязкость, регистрировали на каждой ступени. Прочность геля является показателем, позволяющим доказать способность состава противодействовать мукоцилиарному клиренсу [74].

Определение силы мукоадгезии

После образования геля на слизистой недостаточно лишь его нахождения на поверхности полости благодаря увеличению вязкости – необходимо связывание полимеров с молекулами муцина. Способность полимерных структур связываться со слизистой оболочкой называется мукоадгезией. Сила мукоадгезии во многом определяет время нахождения стимулочувствительной системы внутри носовой полости. Существуют как *in vitro*, так и *ex vivo* методы оценки данного показателя [133,138]. Несложный, но воспроизводимый способ *in vitro* оценки мукоадгезии после гелеобразования в полости носа разработан канадскими учеными из Университета Макмастер [138]. Испытуемую полимерную композицию распыляют на две пластины, поверхность которых покрыта 2% раствором муцина, и складывают их внахлест. Сформировавшуюся конструкцию закрепляют в приборе, растягивающем пластины в противоположных направлениях с заданным усилием и интервалом релаксации. Силу мукоадгезии рассчитывали путем построения градуировочного графика зависимости силы натяжения от конечного положения пластин, а также зависимость силы от расстояния, на которое удалось сдвинуть пластины относительно друг друга.

Определение характера распыления лекарственного препарата

Факел распыления – показатель, характеризующий условную степень распределения препарата на поверхности носовой полости. Естественно, данный показатель критичен в анализе именно нативного раствора до *in situ* гелеобразования.

Понятие факела распыления включает в себя множество характеристик: угол распыления, форма и диаметр распыла, ширина столба распыления, овальность, периметр и площадь распыления [139]. Совокупность данных величин дает понимание о пригодности той или иной системы доставки для применения в необходимых целях. При анализе назальных ЛП стоит делать акцент на требуемой локализации аппликации препарата. В зависимости от финальной локализации ЛП – мозг или системный кровоток – возможно подобрать желаемую распылительную систему с нужным факелом распыления [135]. Достижение обонятельной луковицы реализуемо с помощью узкого, направленного потока распыления. Подобное нацеливание дает возможность АФС проникать в нужные ткани для оказания целевого эффекта. Для всасывания препарата в системный кровоток стоит подбирать композицию матрицы и

распыляющее устройство, способное обеспечить более рассеянное распыление с достаточно мелким размером частиц. Но факел также должен обладать умеренным диаметром, чтобы не произошло оседания основной массы препарата на вестибулярной части носовой полости.

Обязательным для регулирования также является размер частиц лекарственного препарата в распылении. Данный показатель в сочетании с факелом распыления предоставляет более ясную картину о возможном поведении разрабатываемого ЛП в реальных условиях. Как известно, чем больше площадь соприкосновения лекарственного препарата с местом аппликации, тем выше скорость и полнота оказания эффекта. Дифференцирование частиц по размеру осуществляется с помощью специального оборудования, которое высчитывает процентное соотношение частиц различного размера в столбе распыла [140]. Определенный максимальный размер частиц не регламентируется, однако многими исследованиями и разработчиками аналитического оборудования выставляется минимальный размер частиц – 10 мкм. Данный минимум необходим для выявления доли препарата, которая может попасть в нижние дыхательные пути вместе со вдыхаемым воздухом.

Регулирование описанных показателей возможно при выборе биофармацевтически правильной упаковки. Но исключительно упаковка не может гарантировать требуемый факел распыления лекарственного препарата. Факел распыления и размер частиц находятся в определенной зависимости от вязкости системы доставки. Чем выше вязкость, тем уже будет факел и тем больше размер частиц в распылении. При понижении вязкости поведение системы будет кардинально меняться [135].

3D-моделирование носовой полости

Скрининг интраназальных ЛП проводится *ex vivo* и *in vivo* методами диагностики. Однако, в силу дороговизны и сложной валидации процессов исследования, возникает потребность в доступных *in vitro* методах анализа. 3D-моделирование носовой полости – относительно простой и дешевый способ, который может стать оптимальным решением для проведения *in vitro* исследований. Он позволяет не только воспроизводить геометрию носовой полости, но и одновременно учитывать несколько параметров при оценке биофармацевтических свойств интраназальных лекарственных форм.

In vitro модели носовой полости используются как для анализа удерживания и распределения традиционных назальных препаратов, так и для определения специфических параметров термо-, ионо-, pH- и влагоактивизируемых *in situ* систем. Исходными данными для их 3D-печати служат результаты компьютерной и магнитно-резонансной томографии, а также акустической ринометрии здоровых пациентов. Для воспроизведения физиологических условий внутренняя полость таких *in vitro* моделей обрабатывается растворами электролитов в смеси с муцином, а сама модель термостатируется [53,141,142].

Для полного соответствия *in vitro* модели всем физиологическим условиям носовой полости помимо моделирования геометрических особенностей требуется имитация всех процессов, происходящих на слизистой. Постоянный вдох и выдох, обновление слизистой оболочки, движение ресничек, выделение слизи могут в различной степени влиять на скорость выведения лекарственного препарата с поверхности слизистой. Перед внедрением подходящего инструментального оснащения необходимо построение математической модели с предварительными расчетами скорости выделения слизи, движения воздушных потоков и других непрерывных процессов в носовой полости.

Для полной имитации потоков слизи в носовой полости ученые из Китая создали компьютерную модель, позволяющую в полной мере учитывать воздействие мукоцилиарного клиренса на ЛП [143]. Движение слизи на стенке носовой полости человека было смоделировано с помощью вычислительной гидродинамики, включающей построение двух моделей: двумерная модель с развернутой поверхностью и 3D-модель поверхности оболочки носовой полости. Модели были созданы с использованием КТ-снимков азиатского мужчины 48 лет. В результате своего исследования Shang, Y. et al. разработали рабочую модель, которая визуализирует распределение слизи по стенкам носовой полости. Ожидаемым результатом исследования стало превосходство трехмерной модели над двумерной, которая не обеспечивала достаточно реалистичной картины распределения слизи по поверхности носовой полости [143].

На сегодняшний день уже существуют зарубежные коммерчески доступные *in vitro* модели носовой полости, позволяющие проводить значимые испытания систем доставки для интраназального применения – так, модель носовой полости Кокен (Koken LM-005) является единственной доступной моделью носовой полости [144]. Она выполнена из силикона и разделена на две половины. Благодаря съемной перегородке и прозрачному материалу становится возможным визуализировать внутренние структуры носа.

При проведении испытания профиля отложения нагруженных мелатонином микросфер пектина/гипромеллозы модель Koken LM-005 использовалась с небольшой модификацией [145]. В частности, модель носовой полости размещалась на подставке и подключалась к дыхательному насосу (Respiratory Pump Model 613, Harvard Apparatus). Насос обеспечивал имитацию дыхания при скорости инспираторного потока 0 л/мин (отсутствие дыхания) или 20 л/мин (скорость умеренного вдоха человека). Для достижения более точной симуляции инспирации в носовой полости объемная скорость потока оценивалась инспираторным расходомером (In-Check Nasal). Во время испытания порошковый состав распылялся с глубиной введения 5 мм при заложенной одной ноздре в свободную ноздрю под углом 60° от горизонтальной плоскости и 0 градусов от вертикальной плоскости. Далее для качественной оценки профиля осаждения модель

фотографировали на темном фоне. Для количественного определения собирались осажденные частицы и рассчитывалось их содержание от общей дозы введенного лекарственного препарата.

В исследовании Le Guellec, S. et al. анализировалось распределение аэрозоля по поверхности носовой полости. Использовались два типа небулайзера для ввода препарата (струйный и сетчатый) и две модели носовой полости – 3D-модель и пластилиновый слепок головы. Обе модели подключались к дыхательному насосу (Harvard Apparatus): дыхательный объем (ДО) = 500 мл, отношение вдоха и выхода (I/E) = 40/60, 15 вдохов/мин через ринофарингоскоп. Между дыхательным насосом и моделью устанавливался специальный односторонний клапан, оснащенный абсолютным фильтром, трубкой (15 см) и вторым абсолютным фильтром, которые имитировали мягкое небо и рот, трахею и легкие, соответственно. Эксперименты *in vitro* были построены таким образом, чтобы воспроизвести условия введения аэрозоля *in vivo* с помощью обоих небулайзеров: носовой вдох и ротовое дыхание с помощью струйного небулайзера и только ротовое дыхание с помощью сетчатого небулайзера [146].

Хотя исследования *in vitro* не могут полностью заменить исследования *in vivo*, они служат ценным инструментом в разработке и оптимизации интраназальных лекарственных форм, предоставляя важные предварительные данные, которые могут направить дальнейшие исследования и разработки [143,147].

***In vitro* анализ высвобождения АФС из системы доставки**

Финальным подтверждением пригодности системы (перед доклиническими исследованиями) можно считать анализ биодоступности лекарственного препарата *in vitro*. Во многих зарубежных исследованиях часто упоминается диффузионная ячейка Франца, позволяющая проводить непрерывный анализ высвобождения действующего вещества из матрицы системы доставки. Ячейка Франца может использоваться для анализа биодоступности лекарственных форм и систем доставки для наружного и местного применения. Ячейка включает в себя две основные составляющие: камера для образцов, называемая донорной или пробоотборной камерой, а также рецепторная камера с рецепторным раствором. Эти две части разделены специальной полупроницаемой мембраной, которая служит поверхностью раздела для обеспечения диффузии. Мембрана подбирается исследователями в зависимости от целей эксперимента. Чаще всего мембраны изготовлены из синтетического инертного материала, который удерживает образец и обеспечивает контакт с рецепторной средой [133,148,149].

В своем исследовании Inoue D. et al. разработали наиболее простой тестер растворения, позволяющий изучать биодоступность твердых лекарственных форм для интраназального введения [147]. Основой для эксперимента послужила ячейка, напечатанная на 3D-принтере. По сути процесса данная система повторяет принцип работы диффузионной ячейки Франца,

используемой для анализа высвобождения АФС из мягких лекарственных форм. Напечатанная ячейка помещалась в среду, имитирующую электролитный состав слизистой носовой полости человека. Перед проведением испытания твердая лекарственная форма (порошок) все равно требовала растворения в соответствующем объеме растворителя. После растворения препарат помещался на полупроницаемую мембрану, где и происходило высвобождение АФС. Данный метод позволяет проводить оценку биодоступности как для твердых, так и для мягких и жидких лекарственных форм. Данная методика является аналогом метода анализа высвобождения по Кривчинскому, широко известного в странах постсоветского пространства [150].

В исследовании Calixto G.M. et al. проводилась оценка высвобождения тетракаина из термореверсивного геля [133]. Прибором для оценки биодоступности была выбрана диффузионная ячейка Франца. В качестве полупроницаемой мембраны отобрали эпителий носовой полости свиньи. Эксперимент проводился суммарно в течение 5 часов. Отобранные пробы анализировались методом ВЭЖХ для количественного определения тетракаина в аликвотах.

Новый метод анализа биодоступности для стимулочувствительных систем был предложен в научном труде Teaima, M. H. et al. Для оценки полноты высвобождения АФС из приготовленного ионселективного геля на основе геллановой камеди был выбран аппарат 1 для осуществления теста растворения в соответствии с фармакопеей Соединенных Штатов Америки (USP) [127]. Методика работы с данным аппаратом также описана в Государственной фармакопее (ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм», аппарат 1 – Вращающаяся корзинка). Средой для высвобождения служила симуляционная назальная жидкость. Скорость вращения была установлена на 100 об/мин. Отбор проб проводился каждый час в течение 12 часов. Отобранные аликвоты анализировались спектрофотометрическим методом [127].

Несмотря на разнообразие различных приборов для оценки высвобождения АФС *in vitro*, в исследовании Wang, Y. et al. был использован метод безмембранного определения высвобождения АФС. Термореверсивную *in situ* систему помещали в стеклянную трубу и нагревали до 37 °C [107]. После гелеобразования 500 мкл фосфатного буфера наносили на поверхность составов. После полного удаления среды через заранее определенные промежутки времени добавляли новую порцию среды для высвобождения (фосфатного буфера). Впоследствии количество АФС, выделяемого из гелей, определяли путем ВЭЖХ-анализа аликвот высвобождаемой среды.

Исследования на животных моделях

Крысы являются наиболее частой биологической моделью для проведения доклинических исследований стимулочувствительных систем доставки [74,92,151–154]. В основном ученые

выбирают крыс линий Wistar, Sprague Dawley и Albino. В исследовании Shi-lei Cao et al. для *in vivo* оценки биодоступности интраназального *in situ* геля на основе геллановой камеди были отобраны мужские особи крыс линии Wistar [92].

Во избежание перекрытия дыхательных путей испытуемых животных, дозировки препарата были пересчитаны и вводилось по 10 мкл в каждую ноздрю с помощью пипетки. В другом исследовании, где также использовали крыс линии Wistar (весом 200-250 г), проводилась разработка интраназальных *in situ* гелей для доставки инсулина [151]. Препарат вводили крысам по 10-13 мкл *in situ* геля в зависимости от веса особи. Обязательный пересчет вводимого объема необходим для свободного дыхания у испытуемых животных. В зависимости от размеров особей возможно варьирование дозы.

С наибольшей эффективностью крыс Wistar используют в исследовании интраназального *in situ* геля ципрофлоксацина [153]. Были выбраны инбредные крысы весом 290-340 г (2 группы по 24 особи обоего пола). Сравнение высвобождения препарата проводили с внутривенным введением. Перед введением препарата в носовую полость (23-27 мкл в обе ноздри) крыс анестезировали. Перед отбором проб крыс обезглавливали с последующим обескровливанием (по 4 крысы из группы). Образцы крови немедленно собирали в пробирки с гепарином. Мозг удаляли из черепа для обнажения обонятельной луковицы (собирали и взвешивали). Также разрезали носовую перегородку для оголения полости. Подобной методикой возможно проведение наиболее разностороннего исследования действия препарата на организм животной модели.

Альтернативой крысам могут служить морские свинки. Их использовали при анализе биодоступности интраназальной *in situ* порошковой вакцины. Было отобрано 7 групп по 4 женские особи: шесть различных дозировок и одна плацебо-группа. Введение препарата проводили под наркозом (от 5 до 100 мкг). Образцы биоматериалов (кровь и вагинальные смывы) собирали в 0, 21, 42, 56 дни испытания. На 56 день морских свинок умерщвляли и обескровливали с целью количественной оценки проникновения препарата в мозг [98].

Более крупную животную модель использовали при *in vivo* исследовании высвобождения аликсана из *in situ* геля. Были выбраны кролики весом 1,5-2,2 кг (4 группы по 3 особи обоего пола) [155,156]. Образцы *in situ* геля вводили в ноздри кроликам пипеткой. Во временные точки 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6 часов проводили забор крови из ушной вены. Главным преимуществом выбора кроликов в качестве модели для доклинических испытаний является отсутствие необходимости умерщвления животного. Другие ученые используют более крупных кроликов для проведения испытаний (2,5-3 кг) и вводят больше исследуемого препарата (200 мкл).

Немаловажным испытанием является изучение цилиотоксичности разработанной интраназальной системы доставки. Цилиотоксичностью называют свойство препарата вызывать

чувство жжения, сухости и раздражения на слизистых. Чаще всего проводят анализ с использованием модели неба жабы. Верхнее небо жаб (30–40 г, 6 особей обоего пола) обнажают и обрабатывают ~0,5 мл испытуемого *in situ* геля на 4 часа. Затем испытуемый состав удаляют промыванием неба физиологическим раствором. Рассекают 5 мм × 3 мм неба и исследуют мукоцилии с помощью электронного микроскопа при увеличении в 400 раз, регистрируют продолжительность движения ресничек. Солевой раствор и дезоксихолат натрия использовали в качестве отрицательного и положительного контроля соответственно [92,157,158].

1.8. Выводы к главе 1

1. Противовирусная активность рибавирина уже давно известна в медицинском сообществе, и данный препарат активно используется по всему миру для лечения ряда патологий вирусного генеза. Недавние исследования доказали способность АФС оказывать ингибирующее воздействие на рост опухолевых образований, в том числе злокачественных новообразований головного мозга. За последние несколько лет интерес к рибавирину, как противоопухолевому агенту, возрос. Проведенные наблюдательные исследования доказали ожидаемый эффект ингибирования эукариотического фактора инициации трансляции 4E (eIF4E) при применении рибавирина в специально рассчитанных дозировках.

2. Доставка ЛВ через носовую полость обладает большим количеством преимуществ, но в то же время имеет особенности, лимитирующие расширение при различных нозологиях. Основной интересующий фактор заключается в возможности доставки АФС напрямую из носовой полости в головной мозг. Для нивелирования ограничений перспективным направлением является разработка стимулочувствительных систем доставки. Соединение возможностей стимулочувствительных систем доставки, носовой полости и противоопухолевого действия рибавирина становится отличной перспективой для разработки лекарственного препарата, нацеленного на опухоли головного мозга.

3. Термореверсивные, ионселективные и pH-чувствительные полимеры являются наиболее приемлемыми для создания назальных *in situ* систем доставки. Проведенный SWOT-анализ исключил возможность применения других систем для разработки эффективного, безопасного препарата. Использование упомянутых типов полимеров также обеспечивает оптимальное соотношение затрат и результатов разработки.

4. Исследования в области стимулочувствительных систем доказывают, что подходы к дизайну и разработке инновационных систем доставки достигли определенных успехов, но все еще изучены частично. Методология качественного анализа стимулочувствительных систем вовсе очень разнится от исследования к исследованию. Несмотря на развитие фармацевтической

технологии, открытие новых инструментальных и аналитических методов анализа, множество трудов все еще сконцентрировано на классических испытаниях, за исключением единичных случаев использования современных способов оценки качества разработанных препаратов.

5. Установлено, что целевые биофармацевтические характеристики интраназальных стимулочувствительных систем – удерживание на поверхности слизистой оболочки и полнота высвобождения действующего вещества – определяются главным образом параметрами состава: типом и концентрацией стимулочувствительного полимера, задающими природу и условия фазового перехода, а также наличием мукоадгезивных компонентов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Активная фармацевтическая субстанция

Главным объектом исследования является субстанция рибавирина (1-(β-D-Рибофуранозил)-1H-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) – действующее вещество разрабатываемой стимулочувствительной системы доставки (HANGZHOU LEAP CHEM CO., LTD., Ханчжоу, Китай). Химическая структура представлена на рисунке 2.1. Фармацевтическая субстанция была использована в виде порошка, по качественным и количественным показателям соответствующего требованиям спецификации. Степень чистоты – химически чистый (содержание рибавирина не менее 99%).

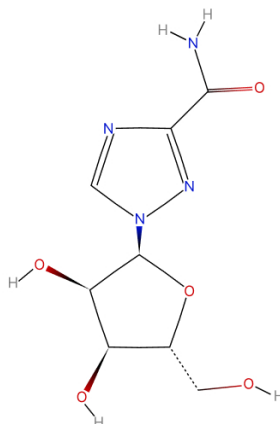


Рисунок 2.1 – Химическая структура рибавирина (1-(β-D-Рибофуранозил)-1H-1,2,4-триазол-3-карбоксамид)

Основные физико-химические характеристики используемой АФС перечислены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Физико-химические свойства рибавирина

Описание	Белый или почти белый кристаллический порошок (ФС)
Молекулярная масса	244,2
Растворимость	Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %, мало или очень мало растворим в метиленхлориде
Температура плавления	198–199 °C
Максимум поглощения	206–230 нм
Кислотно-основные свойства, рКа	12,95 ± 0,70

2.2. Вспомогательные вещества и реактивы

Наименования и производители использовавшихся в исследованиях вспомогательных веществ и реактивов приведены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Используемые в работе вспомогательные вещества и реактивы

Наименование	Сокращение	Торговая марка и производитель	Нормативный документ
Блоксополимер полиэтиленоксида и полипропиленоксида с (Мм12700), полксамер 407	Pol407	Kolliphor® P407, BASF, Германия	(0288) Фармакопея Евразийского экономического союза, Фармакопея США
Блоксополимер полиэтиленоксида и полипропиленоксида с (Мм 8400), полксамер 188	Pol188	Kolliphor® P188, BASF, Германия	(0671) Фармакопея Евразийского экономического союза, Фармакопея США
Блоксополимер полиэтиленоксида и полипропиленоксида с (Мм 2500), полксамер 124	Pol124	Kollisolv® P 124, BASF, Германия	(0288) Фармакопея Евразийского экономического союза, Фармакопея США
Полиэтиленгликоль (ПЭГ) 400	ПЭГ400	ПЭГ 400 ООО «НОРКЕМ», Россия	(0190) Государственная Фармакопея Республики Беларусь, Государственная Фармакопея Республики Казахстан, Европейская Фармакопея, Фармакопея США
Полиэтиленгликоль (ПЭГ) 40	ПЭГ40	ПЭГ 40 ООО «НОРКЕМ», Россия	(0190) Государственная Фармакопея Республики Беларусь, Государственная Фармакопея Республики Казахстан, Европейская Фармакопея, Фармакопея США
Полиэтиленгликоль (ПЭГ) 1500	ПЭГ1500	ПЭГ 1500 ООО «НОРКЕМ», Россия	(0190) Государственная Фармакопея Республики Беларусь, Государственная Фармакопея Республики Казахстан, Европейская Фармакопея, Фармакопея США
Карбомер 980	Карб	Carbopol 980, Lubrizol, США	(0152) Фармакопея Евразийского экономического союза, Фармакопея США
Гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ)	ГПМЦ	Benecel® K100M PHARM, Ashland, США	(0427) Фармакопея Евразийского экономического союза, Фармакопея США

Продолжение Таблицы 2.2

Пектин	Пектин	Molecularmeal, Китай	(0273) Фармакопея США
Геллановая камедь	ГК	GELRITE™, Duchefa Biochemie, Нидерланды	(71010–52–1) Фармакопея США
Ксантановая камедь	КК	Vanzan® NFC, Vanderbilt Minerals, США	(0148) Государственная Фармакопея Республики Беларусь, Фармакопея США
Гуаровая камедь	ГуК	Molecularmeal, Китай	(0101) Фармакопея Евразийского экономического союза
Хитозан 200 кДа	Хитозан	ООО «Биопрогресс», Россия	(9012–76–4) Фармакопея США
Бензалкония хлорид	БХ	Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd. (SRL), Индия	(ЕМА/CHMP/495737/2013) Европейское агентство лекарственных средств
Диэтиленгликоля моноэтиловый эфир (Транскутол®)	Транскутол	Транскутол® НР, Gattefossé, Франция	(111-90-0) Фармакопея США Фармакопея Европейского союза
Макрогол цетостеариловый эфир 12	CS12	Kolliphor® CS15, BASF, Германия	(68439-49-6) Фармакопея США Фармакопея Европейского союза
Полиэтиленгликоль- 15-гидроксистеарат	HS15	Kolliphor® HS15, BASF, Германия	(70142-34-6) Фармакопея США Фармакопея Европейского союза
Поливинилпироллид он (ПВП) 10000	ПВП10000	HiMedia Laboratories, Индия	(9003-39-8) Фармакопея США
Натрия хлорид	NaCl	ООО «Уссолье Сибирское», Россия	(0254) Фармакопея Евразийского экономического союза, Государственная Фармакопея Республики Беларусь, Государственная Фармакопея Республики Казахстан, Фармакопея США
Кальция хлорид	CaCl ₂	АО «Химмед», Россия	ГОСТ 450–77 МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ [159]
Калия хлорид	KCl	АО «Химмед», Россия	ГОСТ 4234-77 МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ [160]
Калия дигидрофосфат	KH ₂ PO ₄	АО «Химмед», Россия	ГОСТ 2493–75 МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ [161]
Калия гидрофосфат	K ₂ HPO ₄	АО «Химмед», Россия	ГОСТ 2493–75 МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ [161]

Продолжение Таблицы 2.2

Вода очищенная	ВО	Собственного получения	(0065) Фармакопея Евразийского экономического союза, Государственная Фармакопея Республики Беларусь, Государственная Фармакопея Республики Казахстан, Фармакопея США
----------------	----	------------------------	--

2.3. Исследуемые дозирующие устройства

Наименования и производители использованных в рамках исследования дозирующих устройств (ДУ) приведены в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Типы и наименования исследуемых дозирующих устройств

№	Наименование	Производитель	Тип	Высвобождаемый объем, мкл
0	Шприц с распылительной насадкой	ООО «МПК «Елец», Россия	Многодозовый	До 1000 (объем шприца)
1	Распылитель назальный 18/410 (001)	ООО "Лемун", Россия	Многодозовый	100
2	Распылитель назальный 021 - 18/410	ООО "ЭСТРОКОМ", Россия	Многодозовый	100
3	Распылитель назальный с КПВ 072 - 18/410	ООО "ЭСТРОКОМ", Россия	Многодозовый	100
4	Распылитель с имитацией КПВ 029 - 18/415	ООО "ЭСТРОКОМ", Россия	Многодозовый	150
5	Распылитель назальный 027 - 18/410	ООО "ЭСТРОКОМ", Россия	Многодозовый	50
6	Шприц-спрей (Disposable Intranasal Atomization Device)	Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd, Китай	Однодозовый Двухдозовый Многодозовый (в зависимости от использования ограничителя в комплектации)	До 1000 (объем шприца)

Ввиду невозможности использования ДУ 0 как потребительской упаковки за счет хрупкости конструкции, оно было использовано только в рамках первичного скрининга всех

разработанных композиций. В дальнейшем, с целью выбора удовлетворительной биофармацевтической упаковки, была проанализирована пригодность ДУ 1-6.

В качестве первичной упаковки были выбраны флаконы из светозащитного стекла объемом 15 мл (ООО "Лемун", Россия).

2.4. Методика изготовления составов

В зависимости от состава стимулочувствительной системы подбиралась собственная методика изготовления композиции.

Изготовление составов на основе полоксамеров

Для образцов на основе полоксамеров применяли «холодную» технологию. В очищенную воду последовательно вводили навеску полоксамера (м/V) и навеску дополнительного ингредиента (м/V); диспергирование осуществляли магнитной мешалкой IKA® C-MAG HS 7 digital (Германия), причем после внесения второго компонента перемешивание продолжали 30 минут. Процесс завершало выдерживание в холодильнике при температуре 5–8 °С в течение 24 часов, обеспечивавшее растворение компонентов и образование гомогенного прозрачного раствора.

Составы с содержанием ионселективных полимеров

Ионселективные матрицы получали диспергированием матрицеобразователя в воде очищенной на магнитной мешалке IKA® C-MAG HS 7 digital при средней скорости перемешивания; температурный режим задавали в соответствии с рекомендациями производителя полимера. Геллановую камедь диспергировали при нагревании до 80 °С в течение 20 минут, ксантановую и гуаровую — при 60 °С в течение 20 минут. Пектины предварительно оставляли набухать на 60 минут в половине объема растворителя, нагретого до 50 °С, после чего порциями вводили оставшийся растворитель и диспергировали при 40 °С. Далее во всех случаях при непрерывном перемешивании вносили остальные компоненты и доводили систему до полного растворения и равномерного распределения, а полученный раствор выдерживали для структурирования при комнатной температуре 2–3 часа.

Методика изготовления составов с содержанием твердых дисперсий

Для повышения биодоступности рибавирина готовили составы с твердой дисперсией действующего вещества. АФС и полимер брали в соотношениях 1:1 и 1:2 и диспергировали в 15 мл очищенной воды магнитной мешалкой IKA® C-MAG HS 7 digital вплоть до полного растворения навесок и получения гомогенного прозрачного раствора. Далее раствор наносили ровным слоем на поверхность стеклянного планшета, а растворитель отгоняли в постоянном потоке воздуха при 60±5 °С на протяжении 2 часов; формировалась однородная пленка твердой

дисперсии рибавирин:полимер. Роль полимеров-носителей выполняли поливинилпирролидон-1000 (ПВП), полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ-400) и полиэтиленгликоль-1500 (ПЭГ-1500). Пленку измельчали на настольной ножевой мельнице IKA® basic A11, чем и завершалось получение твердой дисперсии.

Методика изготовления составов с содержанием рибавирина

Образцы с содержанием рибавирина или твердой дисперсии с рибавирином готовились при предварительном растворении субстанции/твердой дисперсии в части воды очищенной. Матрицеобразователи и другие вспомогательные вещества растворялись и набухали в оставшемся объеме воды очищенной на магнитной мешалке IKA® C–MAG HS 7 digital в соответствующем полимерам температурном режиме. После получения двух однородных систем раствор рибавирина прибавлялся к раствору полимеров и вспомогательных веществ. Перемешивание продолжалось в температурном режиме, при котором изготавливали раствор вспомогательных веществ.

2.5. Методы исследования

Изучение стимулочувствительности *in situ* систем

Для анализа стимулочувствительности разработанных композиций применялось два метода: классический – визуальная оценка совершения фазового золь-гель перехода; и собственная разработанная методика реологической оценки.

Визуальная оценка

Стимулочувствительность служила первичным скрининговым признаком и оценивалась визуально для всех образцов независимо от природы стимула: систему помещали в прозрачную пробирку Эппендорфа и подвергали действию ведущего стимула. В ионселективные и pH-чувствительные композиции вносили 0,1–0,15 мл симуляционной назальной жидкости (СНЖ) с физиологической концентрацией ионов Na^+ (8,77 мг/мл), K^+ (2,98 мг/мл) и Ca^{2+} (0,59 мг/мл) (pH $6,5 \pm 0,5$).

Способность термореверсивных композиций к золь-гель переходу *in situ* оценивали путем нагревания на водяной бане с фиксацией температуры фазового перехода. После ручного суспендирования продолжительностью 60 секунд о гелеобразовании судили по тому, как состав стекает по стенке пробирки; осмотр выполняли поочередно на черном и белом фоне.

Для регистрации результата применяли четырехуровневую градацию: «+++» присваивали при максимально выраженном стимулочувствительном переходе, «++» – при состоявшемся переходе, «+» – при одних лишь изменениях структуры и консистенции, свидетельствующих о

слабых стимулочувствительных свойствах, «—» — при несоответствии образца дизайну эксперимента [162].

Реологическая оценка стимулочувствительности

В рамках диссертационного исследования была разработана новая методика оценки стимулочувствительности системы посредством реологического анализа. Определение реологических характеристик проводили с использованием реометра Anton Paar MCR 302 (Anton Paar GmbH, Австрия) с коаксиальным цилиндром (CC27 SN68636). В качестве программного обеспечения применяли RheoCompass™ (Anton Paar GmbH, Австрия). Параметры измерений были заданы следующим образом: температура — 32°C, скорость сдвига — 1–150 с⁻¹, программа — «viscosity curve», профиль жидкости — «low viscosity». В коаксиальный цилиндр вносили 20 мл образца (без СНЖ), избегая образования пузырьков. Продолжительность измерения составляла 110 секунд.

При исследовании образцов с добавлением СНЖ использовали 17 мл анализируемого образца и 3 мл СНЖ (для соблюдения физиологического соотношения препарата и назальной жидкости). Перед началом измерений образцы выдерживали в коаксиальном цилиндре при температуре 32°C в течение 5 минут для формирования структуры геля, после чего приступали к анализу.

Каждое измерение выполняли в трехкратной повторности (n=3), затем с помощью программного обеспечения строили усредненные реограммы.

На основании полученных данных о динамической вязкости до и после добавления СНЖ рассчитывали индекс стимулочувствительности по формуле:

$$I_{\text{стимулочувствительности}} = \frac{\mu_{\text{(образца+СНЖ)}}}{\mu_{\text{(образца)}}}, \text{ где}$$

$\mu_{\text{(образца+СНЖ)}}$ — динамическая вязкость образца после добавления СНЖ и повышения температуры системы; $\mu_{\text{(образца)}}$ — динамическая вязкость образца до добавления СНЖ и повышения температуры системы.

Изучение pH

Испытание выполняли по [163]. Анализу подвергали нативные жидкие образцы. Для измерений служил прибор Starter 2100 (ОНАУС, США). Проводилось 5 измерений каждого образца. Анализировалось усредненное значение пяти экспериментов.

Реологические характеристики

К реологическим характеристикам в данном исследовании относили форму кривых течения и кривых вязкости, а также рассчитанные по реологической модели значения динамической вязкости и предела текучести.

Для измерений применяли ротационный коаксиальный вискозиметр RM 200 (Lamy Rheology, Франция) с термостатом EVAMS–DIN (Lamy Rheology, Франция) под управлением программного обеспечения RheoTech.

Измерения выполняли в коаксиальной геометрии DIN 1 со шпинделем DIN 33 при объеме пробы 15–30 мл ($n=5$). Задавали два температурных режима: 20 °С, отвечающий комнатным условиям, и 37 °С, моделирующий условия *in vivo*. Программа нагружения строилась как цикл «малый сдвиг → большой сдвиг → малый сдвиг» со скоростями сдвига в пределах 0–300 с⁻¹. Данная методика позволяет диагностировать гелеобразное состояние системы после фазового перехода на основе характерной тиксотропии. Динамическую вязкость и прочностные характеристики геля рассчитывали, аппроксимируя полученные кривые течения моделью Кэссона:

$$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + \eta^{1/2} \times \dot{\gamma}^{1/2}, \text{ где}$$

(τ) – напряжение сдвига, (τ_0) – предел текучести, (η) – постоянная, называемая кажущейся вязкостью или индексом консистенции, ($\dot{\gamma}$) – скорость сдвига, а (n) – показатель текучести

Итоговое значение получали программно по пяти последовательным измерениям образца в идентичных условиях.

Изучение температуры образования *in situ* гелей

Температуру гелеобразования определяли у тех образцов, для которых предполагались термореверсивные свойства. Предварительно образцы хранили при температуре 5–8 °С. Термостатирование осуществляли в водяной бане, температуру которой поддерживали на уровне 50 °С; регистрацию показаний вели погружным измерительным термозондом. Фиксировалась температура, при которой образец переставал обладать текучестью и формировал устойчивый гель.

Изучение pH *in situ* гелеобразования

pH фазового перехода регистрировали pH-метром (Starter 2100 pH Bench pH Meter ST2100-F, China). Сначала измеряли pH золя, затем к композиции малыми порциями прибавляли щелочной агент при перемешивании на магнитной мешалке (IKA C-mag Hs7 digital, Germany). Отмечали то значение pH, при котором весь объем пробы (1 мл) переходил из золя в гель.

Измерение формы и геометрии факела распыла

Форма и геометрия факела распыла относятся к критическим показателям качества назальных лекарственных форм, вводимых распылением. Регистрацию проводили на приборе SprayVIEW (Proveris Scientific, США). Анализ и обработка данных осуществлялись с помощью программного обеспечения Viota® (Proveris Scientific, США).

В программном интерфейсе центр системы координат на экране был совмещен с центром кончика дозирующего устройства.

Перед выполнением измерений для корректной работы прибора проводилась обязательная калибровка. В процессе эксперимента после каждого цикла распыления и перед ним осуществлялась очистка кончика дозирующего устройства от остатков *in situ* гелей.

Флакон с дозирующим устройством фиксировался в специализированном держателе, смонтированном непосредственно над приводом.

Для анализа геометрии распыления системы SprayVIEW применялась методика, предусматривающая:

- предварительную характеризацию дозирующего устройства для определения начальных и конечных положений устройства для автоматического срабатывания;
- трехкратную активацию для каждого тестируемого образца с целью заполнения дозирующего устройства для постоянной подачи дозы.

Расположение оборудования при регистрации продольного (Plume Geometry) и поперечного (Spray Pattern) сечений факела распыла приведено в таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Параметры расположения оборудования SprayVIEW

Параметр	Plume Geometry	Spray Pattern
Камера по горизонтали, см	23,0	20,0
Камера по вертикали, см	14,0	7,0
Диафрагма объектива	2,0	2,0
Лазер, по горизонтали, см	4,0	5,0
Лазер, по вертикали, см	14,0	–
Держатель лазера, см	5,5	5,5
Угол наконечника к лучу, °	0	–
Расстояние от наконечника до луча, мм	–	60,0

В продольном сечении определяли угол и ширину факела распыла, в поперечном – его диаметр и площадь. Для каждого образца выполняли по три повторности.

Изучение показателя назальной ретенции

Для анализа показателя назальной ретенции была разработана анатомически точная *in vitro* 3D-модель носовой полости. Сама модель была напечатана из прозрачной фотополимерной смолы (рисунок 2.2).



Рисунок 2.2 – Внешний вид сборной модели носовой полости, сконструированной для исследования

Приближение к физиологическим условиям достигалось орошением внутренней поверхности модели симуляционной назальной жидкостью, содержавшей NaCl 8,77 мг/мл, KCl 2,98 мг/мл и CaCl_2 0,59 мг/мл при $\text{pH}=6\pm0,1$. Раствор для орошения модели содержал 4 % (m/V) муцина свиного желудка типа II (Sigma Aldrich, кат. номер M 2378), представляющего собой смесь гликопротеидов, выделяемых пищеварительными железами свиньи с содержанием 0,5 % N-ацетил-нейраминовой кислоты. С другого конца – на выходе в носоглотку – закреплялся сборник для улавливания части образца, который не задержался на поверхности слизистой носа.

В модель вводили 1,00 мл ($\pm 0,05$ мл) исследуемой системы доставки. Затем модель термостатировали в климатической камере Binder FD 115 (Binder, Германия) в течение 5 минут при температуре $37\pm0,5^\circ\text{C}$.

После термостатирования измеряли объем истекания части испытуемого образца для расчета показателя назальной ретенции (ПНР) – коэффициент, отображающий процентное содержание системы доставки, которая осталась в носовой полости после введения и выдерживания в течение 5 минут.

Расчет ПНР проводился по формуле:

$$\text{ПНР} = 100\% - \left(\frac{V_{\text{истек}}}{V_{\text{общ}}} \times 100\% \right), \text{ где}$$

($V_{\text{общ}}$) – общий объем введенной системы доставки, ($V_{\text{истек}}$) – объем истекания – количество препарата, покинувшего *in vitro* модель носовой полости.

Каждый эксперимент проводился в пяти повторностях ($n=5$).

Диализ через полупроницаемую мембрану

Изучение высвобождения действующего вещества опиралось на метод диализа через полупроницаемую мембрану: разрабатываемые стимулочувствительные системы помещали в диффузионную ячейку Франца трансдермального тестера с твердотельным нагревом Logan DHS-6TA (Logan Instruments Corp., США). Для исследования использовали целлюлозные мембраны Logan PB-M с размером пор 12–14 кДа (Logan Instruments Corp., США). Перед проведением эксперимента диализную пленку предварительно замачивали в среде для высвобождения – растворе, содержащем ионы Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ($\text{pH}=6,0\pm0,1$).

При сборке ячейки мембрана помещалась между донорной и акцепторной камерой. Акцепторную камеру предварительно снабжали магнитным мешальником. Конструкцию фиксировали специальным зажимом. Акцепторные камеры (ячейки) заполняли средой для высвобождения. На этапе заполнения обязательно удаление пузырьков между акцепторной камерой и мембраной. Стадия является критической, так как наличие пузырьков воздуха снижает площадь прямого контакта мембраны и образца стимулочувствительной системы.

Перед началом эксперимента ячейки, заполненные средой для высвобождения, нагревались до температуры $37\pm0,2$ °C. Температура поддерживалась твердотельным нагревателем на протяжении всего эксперимента. На поверхность мембраны наносилась одна доза исследуемой системы доставки – 100 мкл.

Отсчет времени высвобождения начинался с момента нанесения точного количества образца и начала перемешивания. Перемешивание осуществлялось при скорости 600 оборотов в минуту на все время эксперимента до момента отбора аликвот. Всего проводилось 5 отборов проб на временных точках в 15 минут, 30 минут, 60 минут, 120 минут и 180 минут. Эксперимент проводился в 5 повторностях.

Количественное определение

Содержание рибавирина в пробах, отобранных после диализа через полупроницаемую мембрану, устанавливали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по методике [164]. Дополнительная пробоподготовка аликвот не проводилась, так как вспомогательные вещества в составе лекарственного средства не определяются в условиях детекции для рибавирина.

Применимость фармакопейной методики к анализу разработанной лекарственной формы и проб, отобранных после диализа через полупроницаемую мембрану, обоснована составом

анализируемой матрицы. В состав лекарственного средства входят три вспомогательных вещества – геллановая камедь, полоксамер 124 и бензалкония хлорид. Все соединения не элюируются в области времени удерживания рибавирина в используемых хроматографических условиях. Среда для высвобождения представляет собой водный раствор ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} и не содержит компонентов, поглощающих в области детектирования. Максимумы поглощения вспомогательных веществ находятся вне диапазона длин волн, используемого для детектирования рибавирина, вследствие чего интерференция при количественном определении исключена, а хроматографические условия фармакопейной методики применены без изменений.

После отбора аликвот пробы были профильтрованы и затем подвержены анализу на ВЭЖХ. Содержание рибавирина $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$ в одной дозе лекарственного средства (мг/мл) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times a_0 \times P}{S_0 \times V_0 \times 100}, \text{ где}$$

S_1 – площадь пика рибавирина на хроматограмме испытуемого раствора;

a_0 – навеска фармакопейного стандартного образца рибавирина, мг;

P – содержание рибавирина в фармакопейном стандартном образце рибавирина, %;

S_0 – площадь пика рибавирина на хроматограмме раствора стандартного образца рибавирина;

V_0 – объем мерной колбы для приготовления раствора фармакопейного стандартного образца, мл

Хроматограмма раствора стандартного образца рибавирина приведена на рисунке 2.3.

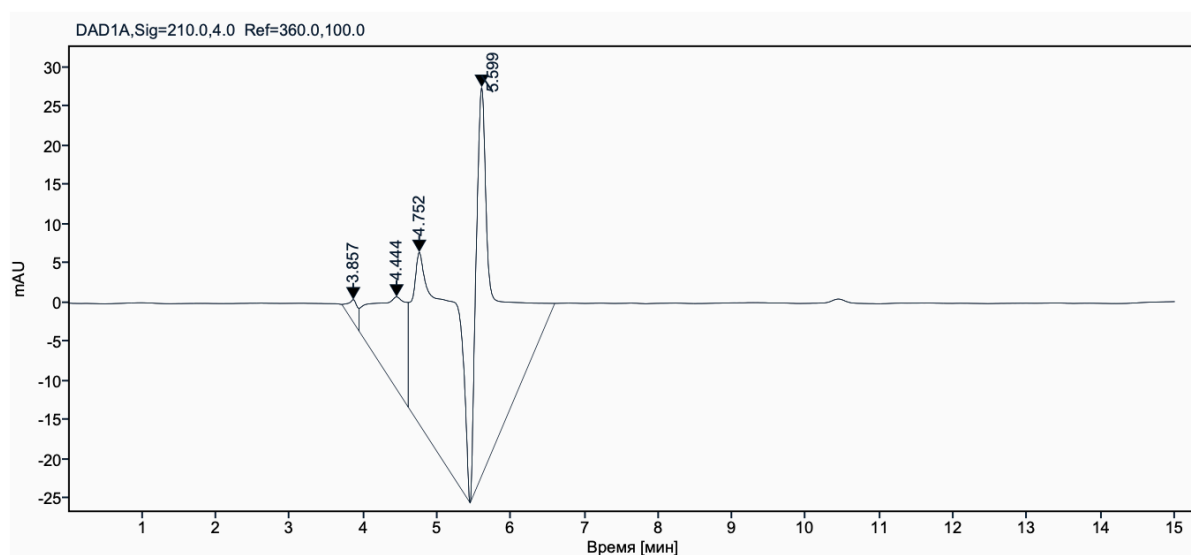


Рисунок 2.3 – Хроматограмма стандартного раствора рибавирина

Анализ размера частиц в распылении

Изучение размера частиц в распылении являлось частью анализа пригодности упаковочных решений для разрабатываемой системы доставки [135]. Исследование проводилось на анализаторе размера частиц в распылении Malvern Spraytec (Malvern Panalytical, Великобритания). Для измерения частиц стимулочувствительной системы в распылении используется метод лазерной дифракции (рисунок 2.4).

Лазерный луч из трансмиттера (1) формируется коллимирующей оптической системой (2) в широкий параллельный пучок, который рассеивается каплями спрея (3). Рассеянный свет фокусируется линзовой системой (4) и регистрируется детекторной матрицей (5). Нерассеянный свет, пройдя через линзу (4) и микродиафрагму, попадает на нулевой детектор в центре матрицы. Его показания фиксируют трансмиссию (пропускание света, %). Угол преломления света частицей обратно пропорционален ее размеру. Детекторная матрица включает более 30 отдельных детекторов — каждый регистрирует рассеянный свет в своем угловом диапазоне, имея собственный канал данных.

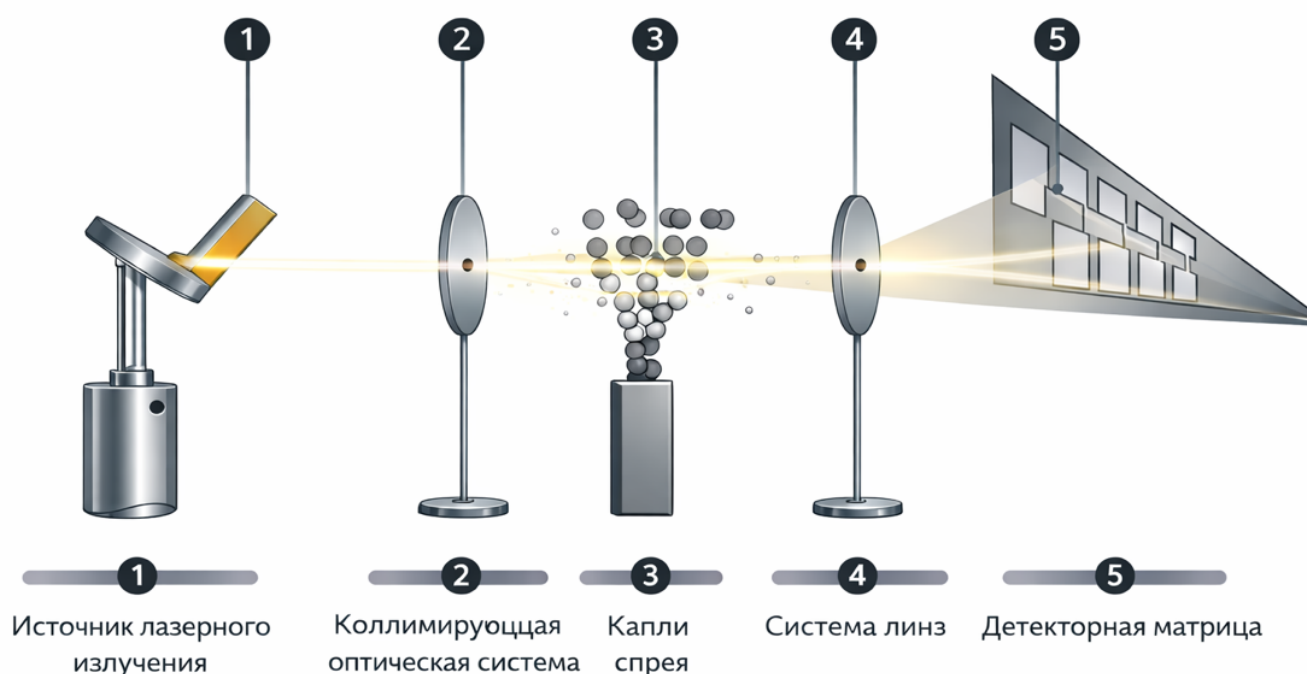


Рисунок 2.4 – Схема регистрации рассеянного света

Флакон с дозирующим устройством фиксировался в специализированном держателе, смонтированном непосредственно над приводом.

Для анализа геометрии распыления системы Malvern Spraytec применялась методика, предусматривающая:

- предварительную характеристику дозирующего устройства для определения начальных и конечных положений устройства для автоматического срабатывания;
- трехкратную активацию для каждого тестируемого образца с целью заполнения дозирующего устройства для постоянной подачи дозы.

Интерпретация полученных результатов представляет собой анализ следующих величин: D_v (10), (50), (90) – 10, 50 и 90% частиц соответственно, имеют средний размер, указанный в результатах, мкм; %V <10 μm – процентная доля частиц, имеющих размер меньше 10 мкм (данный лимитирующий фактор установлен программным обеспечением, так как частицы меньше 10 мкм могут попасть в нижние дыхательные пути вместе со вдыхаемым воздухом), %; Трансмиссия – процент лазерного излучения, достигающего детектора после прохождения через столб спрея при распылении (значение трансмиссии позволяет сделать вывод об однородности распыла), %. Каждый эксперимент проводился в трех повторностях ($n=3$).

Микробиологическая чистота

Микробиологическая чистота анализировалась согласно требованиям [165]. Лекарственное средство как нестерильный жидкий препарат для интраназального применения отнесено к категории 2, определение общего числа аэробных микроорганизмов и общего числа дрожжевых и плесневых грибов проводили чашечным агаровым методом (глубинный посев). Базой для испытаний послужили микробиологические лаборатории НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи; применявшиеся тест–штаммы микроорганизмов также принадлежат этому учреждению. Посев образцов производили в жидкую тиогликолевую среду в соотношении 1:20, инкубацию – при температуре $32\pm 0,5$ °C на протяжении 14 суток.

Для анализа брали 10,0 мл нативных жидких растворов стимулочувствительных систем и выполняли прямой глубинный посев.

Статистическая обработка результатов

Каждый эксперимент воспроизводили в 3–5 повторностях. Для полученного массива рассчитывали среднее значение и дисперсию случайной величины, принимая дисперсию за меру стабильности образцов.

Достоверность различий между группами устанавливали однофакторным дисперсионным анализом; расчеты выполняли в программе GraphPad Prism 8 для Windows (GraphPad Software Inc., Ла-Хойя, Калифорния, США).

Силу связи изучаемых характеристик с переменными факторами описывали коэффициентом регрессии R^2 при оценке уровня значимости p , для чего привлекали программу Minitab® 19.0 (Minitab, Чикаго, Иллинойс, США). Значения R^2 интерпретировали по шкале Чеддока, относя 0,7–0,9 к высокому влиянию, 0,3–0,5 к среднему, 0–0,1 к низкому.

Стандартное отклонение (SD, standard deviation) для генеральной совокупности данных (σ) рассчитывалось по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{N}}, \text{ где:}$$

σ — стандартное отклонение генеральной совокупности;

x_i — отдельное значение в наборе данных;

μ — среднее арифметическое всех значений генеральной совокупности, рассчитываемое как $\mu = \sum x_i / N$;

N — общее количество наблюдений в генеральной совокупности.

ГЛАВА 3. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА СТИМУЛОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ РИБАВИРИНА

3.1. Дизайн исследования

Ключевыми показателями успешной фармацевтической разработки ЛП являются качество, эффективность и безопасность конечного продукта [166]. Традиционный подход к исследованию лекарственных препаратов заключается в создании бесчисленных комбинаций веществ и поиске состава с удовлетворительными характеристиками (QbT – Quality by Test). Чаще всего реализация подобного подхода приводит к неразумным временным затратам человеческих ресурсов ради сомнительного и негарантированного результата. Еще одним лимитирующим фактором является экономическая нецелесообразность процесса и, впоследствии, отсутствие возможности коммерциализации за счет несоизмеримых затрат в R&D период. Процесс на пути к созданию ЛП должен следовать четкому и логичному алгоритму. Данная последовательность действий определяется дизайном исследования, который проектируется с целью упрощения выполнения комплекса сложных задач [167]. Как раз для достижения трех ключевых характеристик ЛП была создана концепция дизайна исследования «качество через дизайн» (QbD).

Основная цель QbD концепции заключается не просто в проверке пригодности конечного продукта, а в активном управлении и контроле качества начиная с проектирования ЛС и на протяжении всего процесса производства. Уже в истоках формирования методологии фармацевтическая индустрия стала одним из главных потребителей подхода QbD за счет возможности рационализации трудоемких этапов производства ЛП. За счет столь быстрого внедрения методологии в рутинную практику фармацевтической разработки QbD был стандартизован Food and Drug Administration (FDA) для использования в проектировании исследований и включен в стандарты ICH Q8(R2), Q9 и Q10.

Главное отличие QbD подхода заключается в появлении дополнительных контрольных точек оценки качества на протяжении всего процесса разработки. Данная особенность приходит на замену анализа продукта лишь на финальной стадии, когда внести корректировки в состав и технологию производства становится невозможным.

Концепция QbD хорошо зарекомендовала себя в процессе разработки стимулочувствительных систем доставки лекарств по следующим причинам [74,168–170]:

- прозрачность оценки совместимости вспомогательных и действующих веществ в стимулочувствительных системах;

- параллельное обеспечение совершенствования состава матрицы и производственного процесса;
- снижение регуляторных рисков;
- приведение к единообразию процесса разработки разных типов стимулочувствительных систем;
- минимизация модификаций после выхода на рынок.

Однако, несмотря на преимущества, существует несколько проблем, которые ограничивают применение данного подхода для разработки стимулочувствительных систем доставки:

- снижение экономической целесообразности и увеличение времени на исследования и разработки за счет необходимости анализа каждой рецептуры по всем критическим показателям качества;
- высокая стоимость АФС;
- проблемы, связанные со стабильностью стимулочувствительных систем;
- необходимость увеличения экспериментальных циклов.

В связи с этим концепции QbT и QbD являются двумя взаимодополняющими подходами с определенными преимуществами и не являются заменой друг другу. Применение знаний современного и консервативного подходов позволяет разработать качественный препарат с минимальными рисками.

В первую очередь для построения верной цепочки исследования необходимо определить целевой профиль качества препарата (QTPP) – подробная характеристика финального ЛП, которая в итоге определяет эффективность и безопасность продукта. QTPP должны в равной степени учитывать особенности системы доставки и активной фармацевтической субстанции. Так как главным объектом фармакотерапии является действующее вещество, оказывающее фармакологический эффект на мишень в организме, то и целевой профиль качества должен формироваться на основе исходных характеристик субстанции (рисунок 3.1).

Каждый пункт характеристики должен быть достоверно обоснован и отражать необходимость выполнения. Лишние показатели или их недостаточность могут привести к нарушению процесса разработки и в дальнейшем усложнить разработку. В таблице 3.1 перечислены все факторы QTPP, взятые за основу для разработки стимулочувствительной системы доставки рибавирина из носа в мозг.

Дизайн исследования разработки стимулочувствительной интраназальной системы доставки рибавирина (концепция QbD)

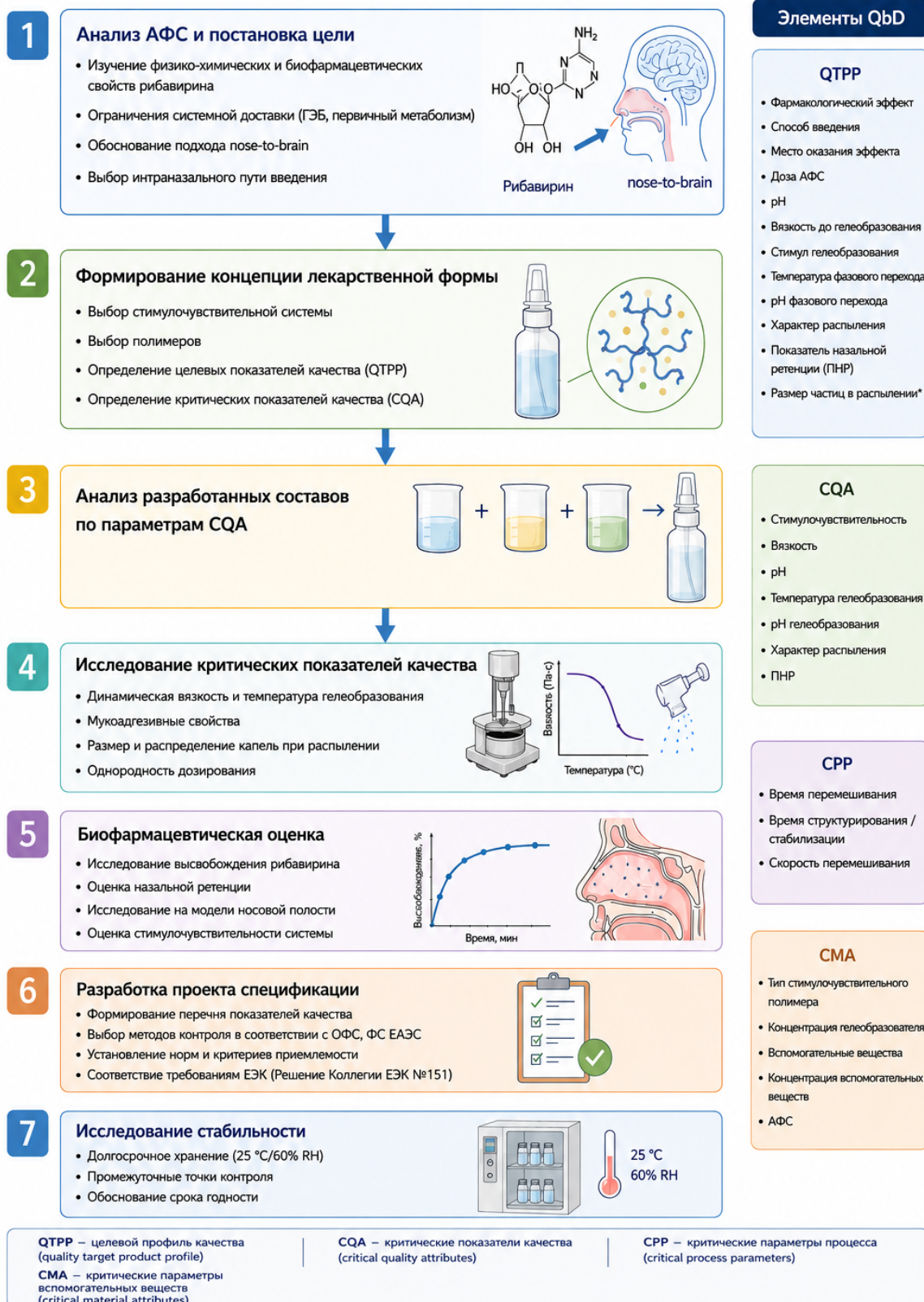


Рисунок 3.1 – Построение дизайна исследования разработки стимулочувствительной системы доставки рибавирина (рисунок сгенерирован с использованием ИИ – ChatGPT-5.5)

Таблица 3.1 – Целевой профиль качества стимулочувствительной системы доставки (QTPP)

Фактор	Целевой показатель	Обоснование
Фармакологический эффект	Противоопухолевый	Способность рибавирина ингибировать eIF4E и подавлять рост злокачественных новообразований различного генеза, в том числе и опухолей головного мозга
Способ введения	Интраназально	Направленная доставка в головной мозг (NTB)
Место оказания эффекта	Головной мозг	Транспорт АФС по ЧМН в головной мозг минуя ГЭБ
Доза АФС	200-250 мг/мл	При пероральном применении рибавирина в дозе 1000-1400 мг (доза необходимая для оказания противоопухолевого эффекта) системная биодоступность составляет 45–50% (~475 мг), однако проникновение в ЦНС ограничено ГЭБ. Интраназальное введение обеспечивает частичный прямой транспорт в ЦНС по обонятельному и тройничному путям, минуя ГЭБ. Выбранная доза 250 мг/мл для интраназального введения обеспечивает системную экспозицию на уровне ~42% от перорального стандарта, при этом ожидаемая концентрация препарата в ЦНС сопоставима или превышает достигаемую при пероральном применении за счет прямого NTB транспорта. Такой режим позволяет достичь целевого фармакодинамического эффекта при сниженной системной нагрузке.
pH	4,5-7,5	Оптимальный диапазон pH лекарственного средства для интраназального введения, сохранения стабильности АФС и отсутствия раздражающего эффекта на слизистую носовой полости
Вязкость до гелеобразования	20-100 мПа·с	Вязкость, способствующая удовлетворительному распылению лекарственного препарата по поверхности носовой полости
Стимул гелеобразования	Физиологическая температура, pH, ионный состав слизи	Физиологические стимулы для совершения фазового перехода в носовой полости
Температура фазового перехода	30-32°C	Оптимальный диапазон для фазового перехода при температуре носовой полости
pH фазового перехода	4,5-6,5	Соответствует pH назального секрета

Продолжение таблицы 3.1

Характер распыления	Ширина распыла 20-40, мм	Для оказания нацеленного воздействия на обонятельную луковицу и снижения вероятности повреждения слизистой
	Угол распыления 20-40°	
	Диаметр распыла 20-30, мм	
	Площадь распыления > 200 мм ²	
Показатель назальной ретенции (ПНР)	> 80%	Подобный процент удерживания соответствует высокоадгезивным композициям
Размер частиц в распылении*	Dv (10) ¹ > 10 мкм	Оптимальные показатели для своевременного гелеобразования и обеспечения достаточной площади распределения для дальнейшего высвобождения АФС
	Dv (50) ² < 150 мкм	
	Dv (90) ³ < 450 мкм	
	%V <10 ⁴ < 0,2000%	
	Трансмиссия ⁵ > 80%	
Примечание: *оценка показателя необходима в рамках анализа различных распылительных систем; ¹ – 10% частиц соответственно, имеют средний размер, указанный в результатах, мкм; ² – 50% частиц соответственно, имеют средний размер, указанный в результатах, мкм; ³ – 90% частиц соответственно, имеют средний размер, указанный в результатах, мкм; ⁴ – %V <10 μm – процентная доля частиц, имеющих размер меньше 10 мкм, %; ⁵ – Трансмиссия – процент лазерного излучения, достигающий детектора после прохождения через столб спрея при распылении, %.		

Следующим важным этапом было выделение основных рисков при разработке стимулочувствительной системы доставки. Основные риски сформированы на основе экспертного мнения крупных разработчиков и производителей назальных систем доставки. Результаты оценки рисков и вероятности их возникновения представлены в таблице 3.2.

За счет поэтапного формирования целевых показателей финального продукта, показателей качества вспомогательных материалов и производственного процесса QbD, а также конкретного формирования перечня вероятных рисков появляется возможность сконцентрироваться не только на отдельных этапах разработки, но и на дальнейшем масштабировании производства ЛП.

Таблица 3.2 – Оценка вероятности возникновения, серьезности возникновения и вероятности обнаружения рисков при разработке стимулочувствительной системы доставки рибавирина

Риск	Причина возникновения	Метод оценки	Стратегия минимизации / управления риском	Вероятность возникновения	Серьезность возникновения	Вероятность обнаружения
Нестабильность АФС в технологическом процессе	Изготовление части матриц требует нагревания до высоких температур. АФС может подвергнуться частичному разрушению или модификации, что приведет к снижению биодоступности и нарушению эффективности конечного ЛП	Количественный определение (ВЭЖХ)	Изменение технологического процесса изготовления. Разделение объема на части и объединение полупродуктов при комнатной температуре	Низкая	Высокая	Высокая
Недостаточная растворимость АФС	Предел растворимости АФС ниже. Необходимого для достижения запрограммированного фармакологического эффекта	Фармакопейные методы оценки растворимости веществ	Изменение состава ВВ и добавление солюбилизаторов для повышения растворимости АФС	Средняя	Высокая	Высокая

Продолжение таблицы 3.2

Несовместимость АФС и ВВ (консерванты, стабилизаторы рН, антиоксиданты)	Физико-химические взаимодействия, вызывающие снижение растворимости АФС, нарушение стимулочувствительности системы и изменение качества финального продукта	Проведение анализа по показателям СQA после изготовления и на протяжении хранения при исследовании стабильности	Замена вспомогательных веществ и подбор оптимальной формуляции	Низкая	Высокая	Средняя
Потеря стимулочувствительности <i>in situ</i> системы	- Мешающие эксципиенты - Нарушение технологического процесса производства - Изменение стабильности ЛС в период хранения - Нарушение условий хранения ЛС	Визуальное и/или реологическое подтверждение сохранения чувствительности к стимулам	- Выбор наиболее стабильной композиции - Использование не взаимодействующих эксципиентов	Средняя	Высокая	Высокая

Продолжение таблицы 3.2

Большой размер капель лекарственного средства при распылении (сниженная площадь соприкосновения ЛП с поверхностью слизистой носовой полости)	- Высокая вязкость лекарственного средства - Неподходящее дозирующее устройство с неудовлетворительными факелом и геометрией распыления	SprayТес (Анализ на специальном оборудовании)	- Модификация состава с изменением концентрации <i>in situ</i> матрицеобразователей - Подбор дозирующего устройства для обеспечения запланированного распыления	Средняя	Средняя	Высокая
Сниженная биодоступность АФС	- Нарушение проникновения АФС через биологические мембраны (сниженная всасываемость) - Большая молекулярная масса молекул АФС и сниженная проходимость через биологические мембраны слизистой носовой полости - Быстрое удаление ЛП с поверхности носовой полости	- Количественно на ВЭЖХ в соответствии с фармакопейными методами - Анализ ПНР с использованием <i>in vitro</i> модели носовой полости	- Модификация состава лекарственного средства с помощью солюбилизаторов и активаторов всасывания - Микронизация частиц - Выбор композиции матрицеобразователя с наибольшим ПНР на поверхности <i>in vitro</i> модели носовой полости	Высокая	Высокая	Высокая

Продолжение таблицы 3.2

Цилиотоксическое воздействие ЛП	Содержание в составе веществ токсичных относительно клеток слизистой носовой полости (АФС или ВВ)	- <i>In vivo</i> на аутбредных крысах или <i>ex vivo</i> на хориоаллантоисной мембране - Постоянный контроль pH как непосредственно после изготовления, так и на протяжении периода хранения	Исключение веществ, способных вызывать цилиотоксическое действие на слизистую оболочку носа	Средняя	Высокая	Высокая
---------------------------------	---	---	---	---------	---------	---------

Продолжение таблицы 3.2

Нарушение стабильности ЛП во время хранения	- Неправильно выбранное упаковочное решение, не способное обеспечить требуемый уровень защиты препарата от воздействия факторов окружающей среды - Неподходящий состав консервантов, вызывающий осаждение АФС / нарушение микробиологической чистоты / нарушение структуры нативного раствора и/или <i>in situ</i> геля - Неподходящий состав антиоксидантов	Определение стабильности на протяжении хранения ЛП в соответствии с ФС по СQA на контрольных точках анализа	Модификация состава вспомогательных веществ и поиск подходящих в случае нарушения стабильности	Средняя	Средняя	Высокая
---	--	---	--	---------	---------	---------

Продолжение таблицы 3.2

Нарушение локализации распыления и не достижение запланированного фармакологического эффекта	- Неудовлетворительная вязкость ЛП - Неправильный выбор дозирующего устройства	- Оценка на <i>in vitro</i> модели носовой полости - Математическое моделирование локализации распыления на основе данных, полученных при анализ факела и геометрии распыления (Plume geometry, Spray pattern)	- Контроль факела и геометрии распыла - Выбор дозирующего устройства с направленным факелом распыления	Средняя	Средняя	Низкая
--	---	---	---	---------	---------	--------

3.1.1. Обоснование выбора критических параметров качества лекарственного средства и ограничения использования изучаемой системы доставки

Под критическими показателями качества понимают физические, химические, биологические и микробиологические характеристики ЛС, которые должны строго соответствовать определенному интервалу допустимых значений для поддержания качества финального продукта. CQA формируются на основе QTPP и являются основой для контроля процесса разработки. Формирование перечня показателей качества необходимо на первоначальном этапе исследования, чтобы в дальнейшем была возможность определить состав-лидер. Итогом анализа является вывод о надлежащем или ненадлежащем качестве ЛП [166,171,172].

Оценка и управление CQA начинаются на ранних этапах разработки продукта и продолжаются на протяжении всего жизненного цикла, включая масштабирование производственных процессов и коммерциализацию. Так как CQA напрямую связаны с АФС, вспомогательными веществами, промежуточными продуктами и лекарственной формой, то и критерии оценки финального продукта будут составляться на основе отдельных спецификаций каждой составляющей ЛП. Полученная череда испытаний позволяет в полной мере удостовериться в эффективности и безопасности полученного продукта, а также визуализировать корреляцию между *in vitro* и *in vivo* испытаниями. Важно отметить, что контроль CQA — это непрерывный процесс, который обеспечивает высокое качество лекарственного препарата на всех этапах его существования на рынке.

Критические характеристики используемых материалов (CMA)

Критические характеристики используемых материалов подразумевают физические, химические, биологические и микробиологические характеристики исходного сырья, которое было задействовано в технологическом процессе производства лекарственного препарата. К такого рода сырью относят АФС, вспомогательные вещества и полупродукты производства. Концепция QbD предполагает определение критических характеристик исходных материалов и параметров процесса для понимания их влияния на эффективность конечного продукта. Установление четкой взаимосвязи между этими характеристиками и качеством готового продукта имеет решающее значение для оптимального выбора методов синтеза и технологий.

Критические параметры процесса (CPP)

Критические параметры процесса (CPP) представляют собой важнейшие переменные производственного процесса, которые существенно влияют на характеристики и качество фармацевтического продукта, включая его безопасность, эффективность и общие показатели работы.

Эти параметры требуют тщательного контроля и поддержания в установленных пределах или диапазонах для обеспечения достижения желаемых стандартов качества в процессе производства. СРР определяются посредством оценки рисков и экспериментальных исследований.

Контроль СРР в определенном диапазоне, часто в рамках Design Space, обеспечивает стабильное качество выпускаемой продукции и является ключевым элементом надежной стратегии контроля.

Определение критичности параметров процесса осуществляется с помощью предварительных знаний и аналитических методов, позволяющих оценить вероятность влияния каждого параметра на критические показатели качества (CQA) как индивидуально, так и в сочетании с другими параметрами.

Это включает использование статистических методов, анализа рисков и экспериментальных данных. Такой подход позволяет делать более точные прогнозы того, как изменения в СРР могут повлиять на конечный продукт.

Важно отметить, что эффективное управление СРР не только обеспечивает соответствие нормативным стандартам, но и повышает общую эффективность производства, снижая риск возникновения дефектов и гарантируя стабильность качества продукта на протяжении всего его жизненного цикла (таблица 3.3).

Все полученные составы испытывали по критическим параметрам качества, а результаты обрабатывали в программе MiniTab 19.0. Степень влияния СМА и СРР на критические показатели качества программа относила к «высокой», «средней» или «низкой».

Таблица 3.3 – Перечень критических параметров

CQA	СМА	СРР
Стимулочувствительность	Тип стимулочувствительного полимера	Время перемешивания
Вязкость	Концентрация гелеобразователя	
pH	Вспомогательные вещества	
Температура гелеобразования	Концентрация вспомогательных веществ	Время структурирования / стабилизации
pH гелеобразования		
Характер распыления	АФС	Скорость перемешивания
ПНР		

3.2. Разработка составов плацебо композиций стимулочувствительной системы доставки

Одним из основных критериев качества лекарственного препарата является физико-химическая и фармакологическая индифферентность вспомогательных и действующих веществ в его составе. Выявление подобных взаимодействий на этапе производства или хранения лекарственного препарата является критически важным этапом разработки лекарственного препарата.

В процессе разработки новых лекарственных препаратов этап подбора оптимальной лекарственной формы и вспомогательных веществ имеет критическое значение для обеспечения безопасности, стабильности и терапевтической эффективности АФС. С целью минимизации рисков и повышения экономической эффективности на начальных стадиях R&D-процесса широко применяется метод создания плацебо композиций.

Такой подход позволяет детально изучить физико-химические и технологические свойства разрабатываемой матрицы, не расходуя при этом дорогостоящую или дефицитную АФС. В конечном итоге использование плацебо-моделей позволяет значительно сократить финансовые и временные затраты. Подобный подход предоставляет возможность оптимизации параметров технологического процесса и состава матрицы без риска потери действующего вещества, что обеспечивает более высокую вероятность успеха при переходе к финальным стадиям производства и последующим доклиническим и клиническим испытаниям.

В таблице 3.4 приведены разработанные составы полимеров проанализированных плацебо композиций. Составы сгенерированы на основе исследованной литературы и рекомендаций производителей вспомогательных веществ.

Продолжение Таблицы 3.4

[illegible]

Продолжение Таблицы 3.4

№	Pol 407, %	Pol 188, %	Pol 124, %	ГК, %	Хитозан, %	PBS, %	КК, %	ГуК, %	ПВС, %	ГПМЦ, %	Пектин, %	Карб, %	ПЭГ 1500, %
50	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
51	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
52	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
55	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-
58	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-
59	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-
60	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-
63	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

3.3. Изучение составов плацебо композиций стимулочувствительной системы доставки

3.3.1. Изучение стимулочувствительности

Ключевым свойством разрабатываемого препарата изначально считалась чувствительность к физиологическим стимулам носовой полости, поэтому первым изучали гелеобразование в смоделированных условиях – при температуре поверхности слизистой оболочки, pH и ионном составе назального секрета. Согласно дизайну исследования, данный эксперимент проводился в первую очередь, чтобы сразу сформировать понимание о наиболее подходящих полимерных композициях и их рабочих концентрациях.

Стимулочувствительность или, другими словами, способность к гелеобразованию оценивалась на всех разработанных плацебо композициях после структурирования и стабилизации при условиях, описанных в методике изготовления. В таблице 3.5 приведены результаты проведения визуальной и реологической оценки стимулочувствительности разработанных плацебо композиций.

Уже на первом этапе скрининга были выявлены плацебо композиции, которые не способны к стимулочувствительному фазовому переходу при моделировании физиологичных условий носовой полости *in vitro*. Результаты продемонстрировали, что практически все термореверсивные составы (№1-№22) формировали очень устойчивые гели при достижении запланированной температуры гелеобразования. Другой вопрос о времени, которое потребовалось на формирование гелевой матрицы при повышении температуры. Время гелеобразования температурозависимых композиций было значительно выше, чем у ионселективных и pH-чувствительных.

Таблица 3.5 – Визуальная оценка стимулочувствительности плацебо композиций

№	Результат визуальной оценки	Динамическая вязкость до гелеобразования (SD±5,76)	Динамическая вязкость после гелеобразования (SD±25,12)	Индекс стимулочувствительности	№	Результат визуальной оценки	Динамическая вязкость до гелеобразования (SD±5,76)	Динамическая вязкость после гелеобразования (SD±25,12)	Индекс стимулочувствительности
1	+++	45,6	1672,8	36,69	33	+	40,1	77,2	1,92
2	+++	41,3	1131,8	27,40	34	++	32,2	103,2	3,21
3	+++	69,1	1787,4	25,87	35	++	40,1	103,8	2,59
4	+++	62,4	1281,3	20,53	36	++	75,3	171,5	2,28
5	+++	45,7	1492,0	32,65	37	-	138,9	129,2	0,93
6	+++	42	1617,1	38,50	38	+	134,2	177,1	1,32
7	+++	82,6	1558,5	18,87	39	+	129,9	231,2	1,78
8	+++	32,8	1863,2	56,80	40	-	131,2	103,6	0,79
9	+++	28,2	1348,0	47,80	41	+	59,8	66,4	1,11
10	+++	24,3	1080,0	44,44	42	+	59,7	70,3	1,18
11	+++	29,3	949,1	32,39	43	++	54,1	123,5	2,28
12	+++	27,2	1217,9	44,77	44	++	58,2	137,9	2,37
13	+++	41,0	1100,3	26,84	45	++	39,8	111,9	2,81
14	+++	39,8	867,5	21,80	46	++	42,2	109,3	2,59
15	+++	42,3	1328,3	31,40	47	+++	39,7	322,8	8,13
16	+++	40,9	1634,4	39,96	48	+++	45,6	357,0	7,83
17	+++	21,2	1218,1	57,46	49	++	27,4	39,2	1,43
18	+++	29,2	1503,5	51,49	50	++	27,5	48,4	1,76
19	+++	59,9	670,4	11,19	51	+++	28,7	103,2	3,60

Продолжение таблицы 3.5

20	+++	59,1	900,6	15,24	52	+++	29,9	91,1	3,05
21	+++	53,3	1023,3	19,20	53	+	12,7	20,0	1,57
22	+++	84,5	1131,8	13,39	54	++	19,4	52,3	2,69
23	++	40,5	115,5	2,85	55	-	22,2	11,5	0,52
24	+++	61,1	359,9	5,89	56	-	29,7	23,4	0,79
25	++	56,8	199,9	3,52	57	-	69,7	51,4	0,74
26	++	54,8	152,3	2,78	58	-	94,6	84,2	0,89
27	+++	30,1	162,5	5,40	59	-	115,1	104,9	0,91
28	+++	33,3	214,1	6,43	60	+	106,9	155,1	1,45
29	++	27,1	70,3	2,59	61	-	54,1	49,8	0,92
30	++	28,0	69,0	2,46	62	+	64,5	83,2	1,29
31	+++	27,8	275,0	9,89	63	-	12,7	10,4	0,82
32	+++	59,8	217,1	3,63	64	-	10,1	8,1	0,80

По полученным данным удалось выявить рабочую концентрацию ГК для формирования стабильной ионселективной *in situ* системы – 0,5% (w/v). Растворы с концентрацией ГК 0,25% были незначительно менее вязкими и обладали сниженной чувствительностью к ионам назального секрета. С целью улучшения мукоадгезивных и гелеобразующих свойств были использованы дополнительные полимеры и вспомогательные вещества. Из них наиболее эффективными оказались Pol124, ГПМЦ и Карб, которые не изменили чувствительности геллановой камеди к ионам. В то же время Карб, как монокомпонентный состав, показал себя не столь хорошо (образцы 53 и 54). Это может быть связано с отсутствием щелочной среды (pH=6-8), которая необходима производным акриловой кислоты для формирования гелей. Поливиниловый спирт в целом изменил структуру геля и снизил гелеобразующую способность геллановой камеди.

По данным литературы совместное использование различных видов камедей в определенных концентрациях дает удовлетворительные результаты при создании стимулочувствительных систем для назального применения. Однако при анализе композиции геллановой и ксантановой камедей изначально был получен достаточно плотный гель, еще до помещения в биорелевантную среду для фазового перехода. На основании этого был сделан вывод о непригодности подобной композиции, так как гель с такой текстурой невозможно дозировать с помощью распылительного устройства. Сам раствор ксантановой камеди не показал никаких признаков гелеобразования в пробирке при прибавлении раствора ионов, содержащихся в назальном секрете. При первичном анализе смеси геллановой и гуаровой камедей видна опалесценция раствора. Любая концентрация ГуК в растворе не позволяла составу совершать фазовый переход, а также распыляться через шприц-спрей. Такой эффект ГуК можно объяснить только ее неограниченным набуханием.

Из исследованных полимеров наихудшие результаты показали низкоэтерифицированный пектин и хитозан. При изучении раствора пектина было обнаружено, что любая концентрация полимера не позволяет обеспечить нужные свойства ЛФ. Главным недостатком пектина является неспособность образовывать гели в среде носовой полости. Пектин был испытан в смеси с геллановой камедью для возможного улучшения мукоадгезии, но состав был слишком вязким еще до прибавления симуляционной назальной жидкости. Также пектин угнетал гелеобразующие свойства геллановой камеди.

Чистый раствор хитозана не проявил себя как *in situ* полимер. Первый недостаток, который не позволил провести дальнейшие практические исследования с хитозаном – его нерастворимость в воде. Так как хитозан является достаточно специфичным полимером в силу наличия множества различных конфигураций, то и анализировался он различными методами. К сожалению, результаты были отрицательные при испытании хитозана в условиях как

термореверсивного полимера, так и pH-чувствительного. Возможно, это было связано с использованием малочувствительной соли хитозана.

При расчете индекса стимулочувствительности появилась возможность провести корреляцию между визуальным и реологическим методами оценки селективности разработанных плацебо композиций. На рисунках 3.2–3.7 приведены усредненные реограммы измеряемых образцов до и после добавления СНЖ. Приведены реограммы для композиций различных классов стимулочувствительных систем с разной интенсивностью фазового перехода.

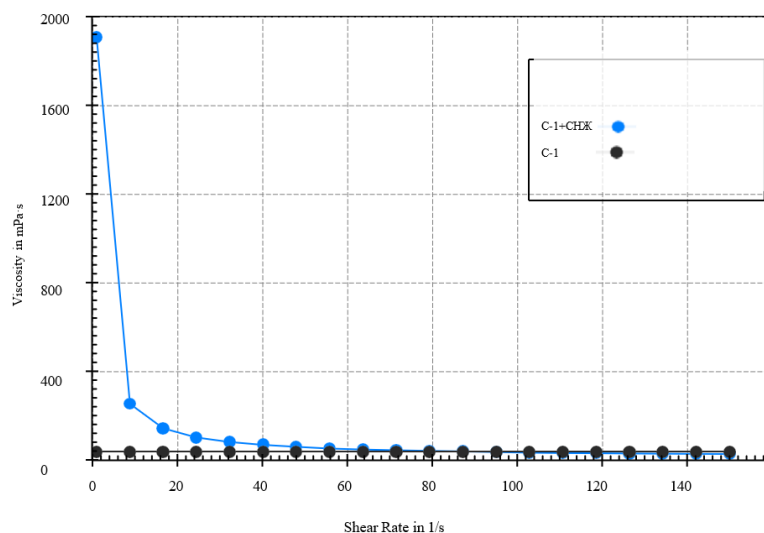


Рисунок 3.2 – Сравнение реограмм состава №24 до и после добавления СНЖ, снятых в диапазоне от 1 до 150 с⁻¹ при температуре 32°C

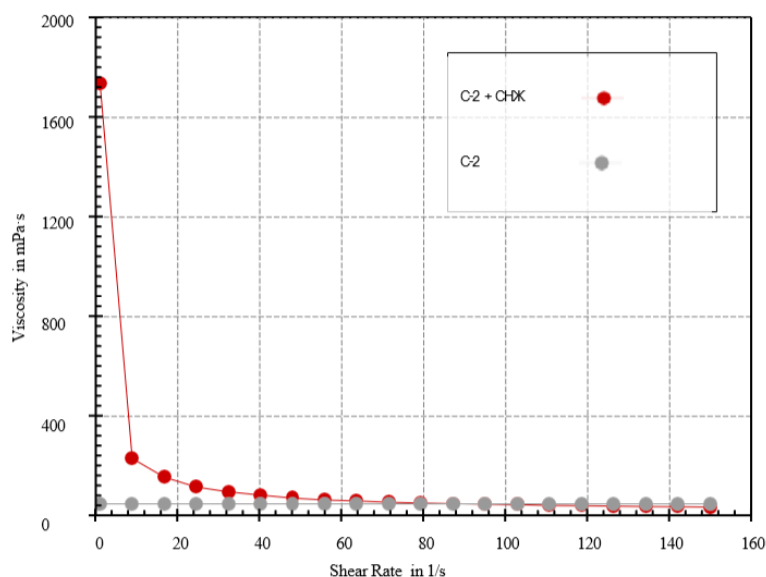


Рисунок 3.3 – Сравнение реограмм состава №31 до и после добавления СНЖ, снятых в диапазоне от 1 до 150 с⁻¹ при температуре 32°C

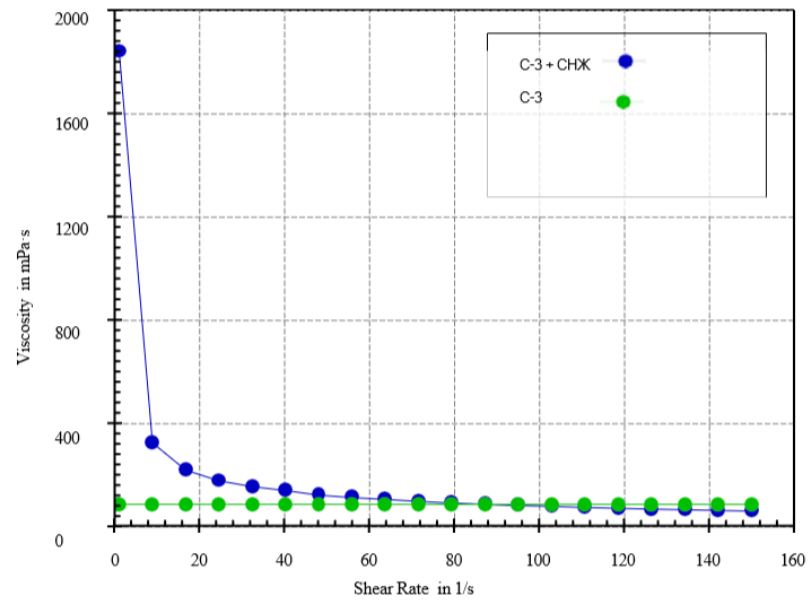


Рисунок 3.4 – Сравнение реограмм состава №47 до и после добавления СНЖ, снятых в диапазоне от 1 до 150 с^{-1} при температуре 32°C

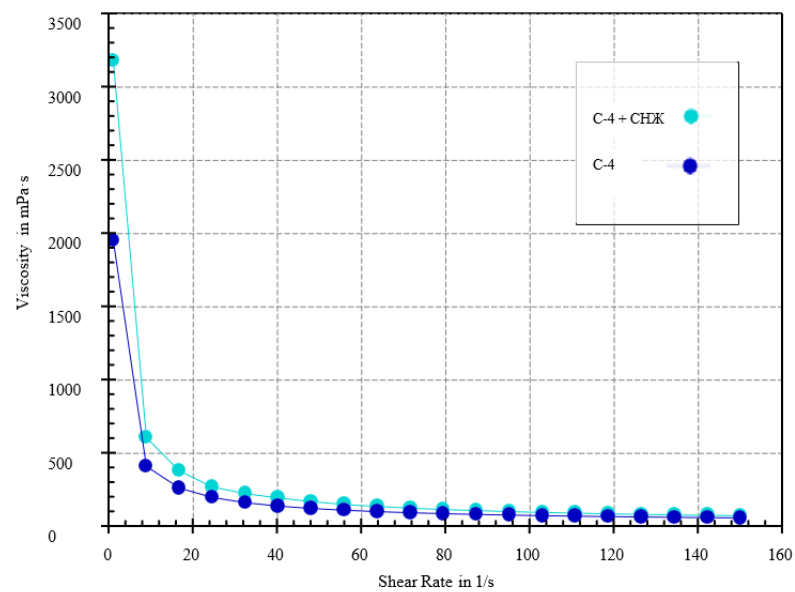


Рисунок 3.5 – Сравнение реограмм состава №35 до и после добавления СНЖ, снятых в диапазоне от 1 до 150 с^{-1} при температуре 32°C

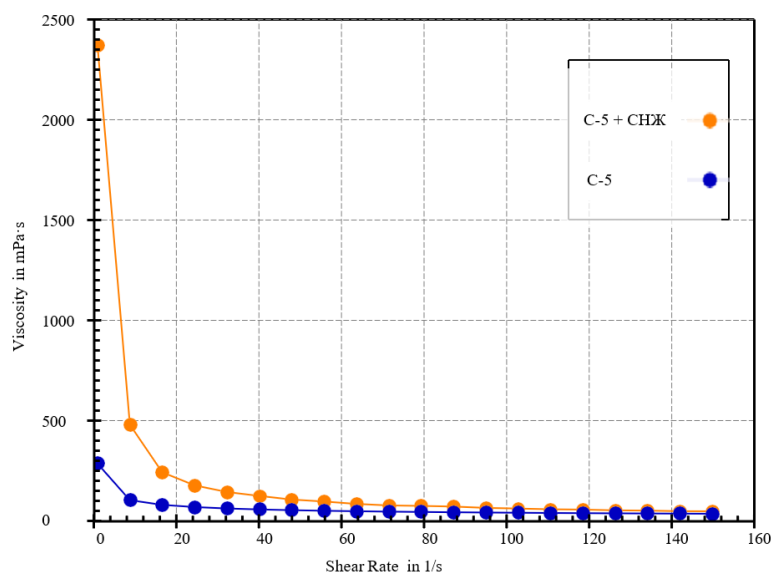


Рисунок 3.6 – Сравнение реограмм состава №60 до и после добавления СНЖ, снятых в диапазоне от 1 до 150 с⁻¹ при температуре 32°C

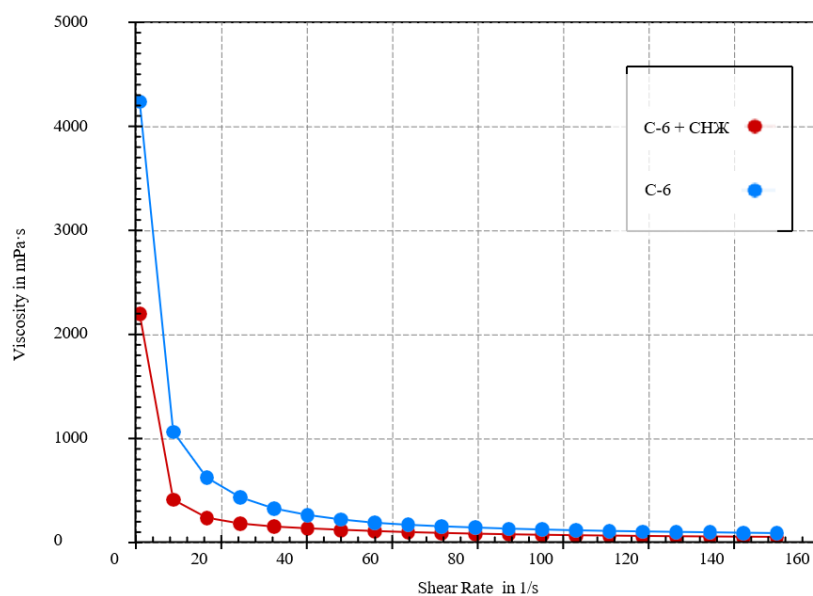


Рисунок 3.7 – Сравнение реограмм состава №53 до и после добавления СНЖ, снятых в диапазоне от 1 до 150 с⁻¹ при температуре 32°C

При помещении составов №1–№22, №24, №27, №28, №31, №32, №47, №48, №51 и №52 в физиологические условия носовой полости их кривые динамической вязкости демонстрировали характеристики, типичные для неньютоновских жидкостей с псевдопластическим течением. В состоянии покоя вращающейся геометрии и при низких скоростях ее вращения динамическая вязкость достигала 2000 мПа·с. Когда скорость вращения превышала 60 оборотов в минуту, течение образца становилось пластическим. Данное наблюдение соответствовало визуальной оценке систем с максимально выраженным стимулочувствительным переходом (+++) при

визуальной оценке. В случае же с образцами, не обладающими стимулочувствительными свойствами (-) при добавлении СНЖ и повышении температуры камеры реометра, динамическая вязкость образцов только снижалась. Скорее всего, такой обратный эффект был обоснован разбавлением состава СНЖ.

В результате проведения реологического анализа стимулочувствительности была создана шкала с целью установить корреляцию между двумя методами оценки изучаемого показателя. Результат проведения взаимосвязи приведен в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Взаимосвязь показателей визуальной и реологической оценки стимулочувствительности

Визуальная шкала	Индекс стимулочувствительности
+++	>3
++	2-3
+	1-2
-	<1

3.3.2. Измерение pH

После получения данных о стимулочувствительности испытуемых образцов было проведено исследование pH исследуемых композиций. В соответствии с QTPP, целевым показателем данного параметра являлось приблизительное соответствие кислотности слизистой носовой полости. Критическое отклонение pH от физиологического зачастую может приводить к раздражающему эффекту на ткани слизистой – цилиотоксическое воздействие. Но не только pH лекарственного препарата является мерой его цилиотоксичности. Подобного рода токсичность проявляется защитными функциями организма (чихание, кашель, гиперемия и др.), нацеленными на скорейшее удаление инородного агента [173,174]. Результаты проведенных испытаний приведены в таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Показатели pH плацебо составов

№	Значение pH (SD±0,05)	№	Значение pH (SD±0,05)
1	6,32	33	7,21
2	6,71	34	7,11
3	6,34	35	7,3
4	6,51	36	6,99
5	6,96	37	6,76
6	6,84	38	6,6
7	6,89	39	6,89
8	7	40	6,91
9	6,7	41	6,54
10	6,44	42	6,77

Продолжение Таблицы 3.7

11	6,58	43	6,72
12	6,7	44	6,81
13	6,51	45	7,49
14	6,1	46	7,62
15	6,12	47	6,61
16	6,3	48	6,58
17	7,52	49	4,32
18	8,04	50	4,21
19	7,92	51	4,15
20	8,1	52	4,25
21	7,89	53	3,22
22	7,3	54	2,91
23	6,93	55	6,75
24	6,9	56	6,88
25	6,95	57	6,92
26	7,02	58	7,07
27	7,14	59	7,04
28	7,21	60	6,89
29	7,04	61	6,51
30	6,98	62	6,29
31	6,89	63	5,45
32	6,91	64	5,21

Результаты анализа подтвердили данные из литературы о кислотности используемых полимеров. Практически все композиции обладали приемлемыми показателями pH и укладывались в целевой диапазон, заложенный дизайном исследования.

Как и ожидалось, все составы, содержащие Карб, имели низкие значения pH (№49-№54), способные вызвать раздражение слизистой носовой полости. При включении в композицию желлановой камеди удалось незначительно нейтрализовать кислотность карбомера (№49-№52), но подобные значения все еще дают сомнительную гарантию отсутствия токсичности на слизистой оболочке.

Среди прочих внимание привлекли составы №18-№21, обладающие более щелочным pH, чем ранее было описано в литературе. Повышение pH можно связать с физико-химическими изменениями вспомогательных веществ, в частности Pol407, при хранении или приготовлении образцов.

3.3.3. Определение реологических характеристик

Вязкость лекарственного препарата является неотъемлемым показателем качества, отображающим технологическую пригодность к применению и оказанию запланированного эффекта в запланированном объеме. От вязкости интраназального лекарственного препарата

зависит его распыляемость из дозирующего устройства, факел и геометрия распыления, а также впоследствии биодоступность. Более вязкие композиции заведомо легче будут удерживаться на слизистой оболочке за счет противостояния мукоцилиарному клиренсу. Невозможность распыления заведомо вязких препаратов ограничивает их применение в терапии путем доставки через носовую полость. Помимо прочего, стимулочувствительность подобных систем ставится под вопрос. Из-за ограниченной распыляемости вязких структур вытекает другой недостаток – большой размер капель при нанесении лекарственного препарата. Как известно, при увеличении площади соприкосновения лекарственного препарата со слизистой возрастает и биодоступность. В случае с нераспыляемыми составами кратно снижается их эффективность. Собственно, дизайном исследования был заложен подходящий для интраназальных *in situ* систем интервал значений динамической вязкости, позволяющий в дальнейшем получить систему с удовлетворительным факелом распыления. Результаты приведены в таблице 3.8.

При первичном скрининге была выявлена прямая зависимость вязкости композиции от концентрации гелеобразователя. В большинстве своем вспомогательные агенты, не обладающие гелеобразующими свойствами, не повышали вязкость составов. На основе реологического анализа удалось подтвердить, что критически высокой вязкостью обладали составы с пектином (59, 60) и ГуК (37-40) в качестве дополнительных ингредиентов. Данные эксципиенты добавлялись в составы для потенцирования ионселективных свойств ГК, однако они только повысили вязкость и ухудшили полноту фазового золь-гель перехода. Остальные составы соответствовали заложенному целевому профилю качества продукта по исследуемому показателю.

Таблица 3.8 – Динамическая вязкость по модели Кэссона плацебо составов

№	Динамическая вязкость, mPa·s (SD±0,95)	№	Динамическая вязкость, mPa·s (SD±0,95)
1	45,6	33	40,1
2	41,3	34	32,2
3	69,1	35	40,1
4	62,4	36	75,3
5	45,7	37	138,9
6	42	38	134,2
7	82,6	39	129,9
8	32,8	40	131,2
9	28,2	41	59,8
10	24,3	42	59,7
11	29,3	43	54,1
12	27,2	44	58,2
13	41	45	39,8
14	39,8	46	42,2
15	42,3	47	39,7
16	40,9	48	45,6

Продолжение Таблицы 3.8

17	21,2	49	27,4
18	29,2	50	27,5
19	59,9	51	28,7
20	59,1	52	29,9
21	53,3	53	12,7
22	84,5	54	19,4
23	40,5	55	22,2
24	61,1	56	29,7
25	56,8	57	69,7
26	54,8	58	94,6
27	30,1	59	115,1
28	33,3	60	106,9
29	27,1	61	54,1
30	28	62	64,5
31	27,8	63	12,7
32	59,8	64	10,1

3.3.4. Изучение температуры гелеобразования

Чувствительность к соответствующему стимулу гелеобразования позволила первично оценить пул композиций, но помимо собственно селективности необходимо иметь ее числовое выражение. Для составов с планируемым ионселективным фазовым переходом подобное выражение неприменимо, так как при анализе их стимулочувствительности прибавлялся объем СНЖ, соответствующий примерному объему назального секрета в здоровой носовой полости человека (200 мкл). Если произошло *in situ* гелеобразование, то состав чувствителен к ионам, содержащимся в СНЖ. С термореверсивными и pH-чувствительными композициями складывается иная картина, так как дизайном эксперимента и местом аппликации ЛП регулируются диапазоны температуры и pH фазового перехода. В таблицах 3.9 и 3.10 приведены результаты экспериментов по определению температуры (таблица 3.9) и pH (таблица 3.10) гелеобразования. Оценка температуры и pH-гелеобразования проводилась в соответствии с методикой, описанной в главе 2.

Постоянные потоки воздуха снижают физиологическую температуру поверхности слизистой оболочки носовой полости примерно до 34°C. В связи с этим QTRP предполагалось гелеобразование термореверсивных композиций в температурном диапазоне ниже этой температуры. Но также был выбран и нижний порог температуры формирования гелевой матрицы, чтобы полученный состав не менял агрегатное состояние еще до введения в носовую полость при температуре, близкой к комнатной. По итогам проведенных исследований было выявлено, что из двадцати четырех термореверсивных плацебо композиций лишь девять

обладали приемлемыми температурами гелеобразования (№1, №2, №4, №5, №8, №9, №14, №20, №22).

Несмотря на многочисленные упоминания термореверсивных свойств хитозана, проведенные исследования доказали его нечувствительность к повышению температуры. Композиции на основе монополимера – хитозана – показали отсутствие гелеобразования при повышении температуры до любых значений. Как упоминалось ранее, это может быть связано с особенностями разных солей хитозана, обладающих диаметрально противоположными свойствами.

Таблица 3.9 – Температура гелеобразования плацебо составов

№	Температура гелеобразования, °C (SD±3,42)	№	Температура гелеобразования, °C (SD±3,42)
1	31,2	33	-
2	30,9	34	-
3	39,9	35	-
4	33,1	36	-
5	32,3	37	-
6	34,7	38	-
7	35,3	39	-
8	31,2	40	-
9	31,4	41	-
10	35	42	-
11	34,6	43	-
12	36,6	44	-
13	36	45	-
14	31,1	46	-
15	28,1	47	-
16	29,2	48	-
17	27,6	49	-
18	28,5	50	-
19	36,4	51	-
20	32,1	52	-
21	27,4	53	-
22	28,3	54	-
23	-	55	-
24	-	56	-
25	-	57	-
26	-	58	-
27	-	59	-
28	-	60	-
29	-	61	-
30	-	62	-
31	-	63	Не совершает термореверсивного фазового перехода
32	-	64	Не совершает термореверсивного фазового перехода

Что касается композиций на основе Pol407 – самого известного термореверсивного полимера – температура фазового перехода чистого раствора полуксамера была крайне низкой, что соответствовало данным из литературных источников [175,176]. С целью повысить температуру были созданы композиции с добавлением различных агентов, способных изменить чувствительность состава к изменению температуры. Pol188 и Pol124, ПЭГ-1500 и геллановая камедь смогли повысить температуру фазового перехода до оптимальных значений, но только в определенных концентрациях и пропорциях с Pol407 (№1, №2, №4, №5, №8, №9, №14, №20, №22). Изменение концентраций привело к резко отрицательному эффекту.

3.3.5. Изучение pH гелеобразования

Аналогично термореверсивным композициям были проанализированы показатели pH гелеобразования pH-чувствительных. Даже при получении неудовлетворительных результатов с некритичными отклонениями есть возможность коррекции состава и улучшения селективности к стимулу. Результаты анализа pH фазового перехода представлены в таблице 3.10.

Как и с термореверсивными композициями, были проанализированы составы, предположительно обладающие pH-чувствительными свойствами. Композиции подвергались воздействию щелочного агента до совершения золь-гель трансформации и образования структурированного, тиксотропного геля. Основным наблюдением стало то, что все pH-чувствительные композиции (№13-№16, №49-№54, №63, №64) не обладали селективностью в диапазоне pH назального секрета (pH=5,5-6,5). Самым низким pH гелеобразования обладал состав на основе Карб в концентрации 0,1%.

Также важным наблюдением стало полное отсутствие гелеобразования под влиянием изменения pH в композициях, состоящих из смеси полуксамера 407 и хитозана.

Таблица 3.10 – pH гелеобразования плацебо составов

№	pH гелеобразования (SD±0,05)	№	pH гелеобразования (SD±0,05)
1	-	33	-
2	-	34	-
3	-	35	-
4	-	36	-
5	-	37	-
6	-	38	-
7	-	39	-
8	-	40	-
9	-	41	-
10	-	42	-
11	-	43	-
12	-	44	-

Продолжение Таблицы 3.10

13	Не совершает рН-чувствительного фазового перехода	45	-
14	Не совершает рН-чувствительного фазового перехода	46	-
15	Не совершает рН-чувствительного фазового перехода	47	-
16	Не совершает рН-чувствительного фазового перехода	48	-
17	-	49	8,9
18	-	50	9,32
19	-	51	8,52
20	-	52	8,63
21	-	53	6,9
22	-	54	7,23
23	-	55	-
24	-	56	-
25	-	57	-
26	-	58	-
27	-	59	-
28	-	60	-
29	-	61	-
30	-	62	-
31	-	63	8,32
32	-	64	8,3

Несмотря на это хитозан как монокомпонент проявлял рН-чувствительность при кислотности $\sim 8,3$ (№63, №64). Такое различие в селективности к стимулу может быть обусловлено влиянием высоких концентраций полоксамера на хитозан и угнетением его рН-чувствительных свойств. В целом все проведенные исследования, нацеленные на оценку температуры и рН матрицеобразования, полностью коррелируют с первым из пула исследований тестом оценки стимулочувствительности композиций. При помещении рН-чувствительных композиций в условия, имитирующие среду носовой полости, все показали себя как стандартные растворы/золи без всякой стимулочувствительности. Подобная ситуация возникла при анализе термореверсивных составов. Высокая температура гелеобразования не позволила образовать гель при физиологической температуре носовой полости (34°C).

3.3.6. Изучение характера распыления

Критически важной для назальных систем доставки является оценка факела распыления лекарственного препарата. Данный показатель позволяет спрогнозировать локализацию осаждения частиц на поверхности слизистой носовой полости. В случае с назальными

лекарственными препаратами именно место седиментации может определить его биодоступность.

Так как именно в респираторной части носовой полости содержится высокая концентрация кровеносных сосудов и доступ к окончаниям черепно-мозговых нервов, то эта область и является наиболее приоритетной для нацеливания лекарственного препарата. Дизайном исследования было запланировано, что рибавирин должен доставляться по механизму NTV путем прохождения через обонятельный и тройничный нервы, которые находятся в обонятельной луковице верхнего носового хода. Собственно, целевым показателем для плацебо композиций являлись средние значения (25-40 мм), позволяющие лекарственному препарату попасть в обонятельную щель без задержки в вестибулярной части носа (видимая часть). Но также стоит отметить, что и слишком узкий факел распыления (3-10 мм) будет свидетельствовать о непригодности состава. Такое направленное и резкое воздействие на чувствительную слизистую носа может вызвать быстрое удаление препарата с поверхности слизистой, раздражение и болевые ощущения пациента, что в свою очередь снизит комплаенс к терапии.

В целом распыление лекарственного препарата включает в себя множество параметров, позволяющих сделать вывод о пригодности той или иной системы доставки и распылительной системы. К этим показателям относятся: геометрия распыления (угол и ширина распыла), факел распыления (площадь и диаметр распыла). Именно эти значения являются наиболее репрезентативными характеристиками для анализа эффективности распыления препарата. Совокупность данных результатов позволяет в полной мере спрогнозировать поведение системы при ее распылении на поверхность слизистой носовой полости.

Стоит отметить, что значение факела распыления должно находиться в разумном интервале. Выбор системы с очень широким факелом может привести к недостижению терапевтического эффекта, так как основной массив лекарственного препарата распылится в вестибулярной части полости, которая не способна всасывать АФС. Другая крайность – слишком узкий факел распыления. Сильная, направленная струя препарата однозначно вызовет раздражение, а, возможно, и повреждение мягкой структуры слизистой носовой полости. За основу стоит брать средние значения в самой широкой точке распыления, чтобы препарат не оставался на чешуйчатых клетках с минимально возможной биодоступностью, но, в то же время, не повреждал слизистую за счет нацеленного распыления. Результаты всех измерений представлены в таблице 3.11.

Таблица 3.11 – Факел распыления (угол, ширина, диаметр и площадь распыла) плацебо составов

№	Угол, ° (SD±10,19)	Ширина, мм (SD±12,25)	Диаметр, мм (SD±6,90)	Площадь, мм² (SD±183,03)	№	Угол, ° (SD±10,19)	Ширина, мм (SD±12,25)	Диаметр, мм (SD±6,90)	Площадь, мм² (SD±183,03)
1	35,98	40,22	19,50	269,13	33	34,53	37,38	28,38	635,29
2	38,23	41,73	20,42	290,30	34	33,70	36,47	27,89	615,90
3	30,02	32,41	20,63	300,85	35	32,88	35,55	27,40	596,52
4	21,80	23,09	20,84	311,41	36	32,06	34,64	26,91	577,14
5	22,34	23,69	*	*	37	31,24	33,73	26,42	557,76
6	22,88	24,29	21,27	332,52	38	30,42	32,81	25,93	538,37
7	23,42	24,89	21,48	343,07	39	29,60	31,90	25,44	518,99
8	23,96	25,49	21,69	353,63	40	28,77	30,98	24,95	499,61
9	24,50	26,09	21,90	364,18	41	27,95	30,07	24,46	480,23
10	25,04	26,69	22,11	374,74	42	27,13	29,15	23,97	460,84
11	25,58	27,29	22,32	385,29	43	26,31	28,24	23,48	441,46
12	26,12	27,89	22,53	395,85	44	25,49	27,33	22,99	422,08
13	26,66	28,49	22,75	406,40	45	24,67	26,41	22,50	402,70
14	27,20	29,09	22,96	416,95	46	23,84	25,50	22,01	383,31
15	27,74	29,70	23,17	427,51	47	23,02	24,58	21,52	363,93
16	28,28	30,30	23,38	438,06	48	22,20	23,67	21,03	344,55
17	28,82	30,90	23,59	448,62	49	30,71	34,21	19,01	303,75
18	29,36	31,50	23,80	459,17	50	29,23	24,75	17,00	262,95
19	29,90	32,10	24,01	469,73	51	27,74	25,29	14,98	222,15
20	30,44	32,70	24,22	480,28	52	36,26	32,86	12,96	181,35
21	30,98	33,30	24,44	490,84	53	64,77	76,37	*	*
22	31,52	33,90	24,65	501,39	54	45,04	65,83	*	*
23	32,06	34,50	24,86	511,95	55	25,30	29,34	6,92	58,95
24	32,60	35,10	25,07	522,50	56	5,57	5,83	4,90	18,15
25	33,11	35,69	25,68	544,15	57	5,20	4,92	4,99	17,21
26	33,62	36,27	26,30	565,80	58	4,83	4,01	5,08	16,27
27	34,13	36,86	26,91	587,45	59	4,46	3,10	5,17	15,33

Продолжение таблицы 3.11

28	34,64	37,45	27,52	609,10	60	4,09	2,19	5,26	13,34
29	35,15	38,04	28,13	630,75	61	3,72	2,78	5,35	12,51
30	35,66	38,62	28,75	652,40	62	3,35	4,01	5,44	14,39
31	36,17	39,21	29,36	674,05	63	32,49	32,41	27,07	500,50
32	35,35	38,30	28,87	654,67	64	32,60	32,22	23,35	492,62

Примечание: * – необрабатываемые результаты

Многопрофильная оценка плацебо композиций с помощью анализатора SprayVIEW в большинстве случаев позволила выявить зависимость факела распыления от вязкости распыляемого состава. Композиции со сравнительно низкой вязкостью обладали очень широким распылением (составы №53 и №54). В случае с составами №53 и №54 – их ширина распыления была настолько большой, что тестер не смог корректно обработать результаты по программе Spray Pattern (анализ диаметра и площади распыла) ввиду отсутствия краев потока препарата. Обратным примером являются составы №55-№62. Несмотря на то, что часть этих составов обладала вполне приемлемой вязкостью для удовлетворительного распыления, во всех случаях были получены очень узкие факелы (4,90–6,92) с минимальной площадью распыла (12,51–58,95).

В массиве положительных результатов стоит дополнительно отметить интересный случай нарушения измерений в составе №5 на основе Pol407 и Pol124. Несмотря на многообещающие данные по результатам анализа Plume Geometry композиции все измерения Spray Pattern оказались недоступны для обработки оборудованием. В каждой повторности исследования именно эта композиция в отличие от других не имела четких границ на снимках SprayVIEW. При «ручном» анализе снимков основным предположением отклонения стало наличие слишком большого количества капель неопределенной формы, в связи с чем и нарушилось очерчивание границ факела распыления.

3.3.7. Анализ показателя назальной ретенции

В рамках проведенного исследования одним из завершающих *in vitro* экспериментов проводилась оценка показателя назальной ретенции (ПНР) – характеристика удерживания композиции на *in vitro* модели носовой полости. Рассчитанная величина позволяла с максимальной точностью определить, какое количество лекарственного препарата способно задержаться в носовой полости, совершить фазовый переход и начать высвобождать АФС. Как было ранее описано, самым главным ограничивающим фактором использования назального пути введения является мукоцилиарный клиренс, способный быстро удалять инородные агенты с поверхности носовой полости. Для противостояния этому физиологическому барьеру требуются механизмы, не предотвращающие клиренс, а замедляющие его – создание стимулочувствительной системы доставки. Лекарственная форма, способная быстро менять текстуру при распылении в носовой полости, может нивелировать влияние мукоцилиарного клиренса и обеспечить высокую полноту высвобождения АФС.

Для анализа ПНР была специально разработана *in vitro* модель носовой полости, с высокой точностью повторяющая анатомические особенности места аппликации. Созданная модель была напечатана на 3D-принтере фотополимерной смолой методом стереолитографии (SLA). Данная

комбинация полимера и метода печати была выбрана с целью получения прозрачной, гладкой модели с минимальной пористостью и высокой точностью воспроизведения анатомической структуры носовой полости. Проведение релевантного исследования невозможно при воссоздании только анатомии полости. Помимо этого, необходимо моделировать физиологические условия поверхности слизистой носовой полости – температура поверхности ($\sim 34^{\circ}\text{C}$), ионный состав слизи (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) и концентрация муцина. Соблюдение комплекса естественных условий в носовой полости позволило получить наиболее приближенную модель пути введения лекарственного препарата. Результаты с усредненными значениями пятикратного анализа каждого состава приведены в таблице 3.12.

Полученные результаты анализа термореверсивных композиций (№1-№22) коррелируют с предыдущими исследованиями по оценке времени и температуры фазового перехода. За счет содержания в составах №5-№8 и №13-№16 мукоадгезивных компонентов – Pol124 и хитозана – удалось повысить ПНР до более приемлемых значений, несмотря на некоторые неподходящие температуры гелеобразования. В данных составах ретенция была улучшена благодаря формированию связей с муцином, входящим в состав назального секрета. Также удалось повысить удерживание композиций на основе смеси Pol407 и ГК. Сочетанный эффект термо- и ион-чувствительности значительно повысил ПНР в сравнении с термореверсивными составами с монотриггерным гелеобразованием.

Таблица 3.12 – Показатель назальной ретенции плацебо составов на поверхности *in vitro* модели носовой полости (n=5)

№	Показатель назальной ретенции, %	SD, ±	№	Показатель назальной ретенции, %	SD, ±
1	33	0,029	33	15	0,029
2	30	0,102	34	25	0,102
3	10	0,154	35	20	0,154
4	18	0,154	36	23	0,154
5	64	0,058	37	29	0,058
6	68	0,200	38	35	0,200
7	70	0,176	39	35	0,176
8	70	0,058	40	40	0,058
9	39	0,058	41	55	0,000
10	31	0,200	42	49	0,000
11	37	0,115	43	65	0,115
12	35	0,000	44	63	0,000
13	72	0,231	45	53	0,231
14	76	0,104	46	87	0,104
15	85	0,000	47	87	0,104
16	80	0,115	48	90	0,000
17	35	0,000	49	10	0,000
18	39	0,144	50	15	0,144

Продолжение таблицы 3.12

19	70	0,104	51	15	0,104
20	72	0,029	52	17	0,029
21	65	0,076	53	5	0,000
22	60	0,100	54	10	0,100
23	67	0,029	55	15	0,029
24	70	0,058	56	18	0,058
25	70	0,029	57	20	0,029
26	77	0,102	58	18	0,029
27	85	0,144	59	18	0,076
28	90	0,000	60	20	0,000
29	80	0,058	61	8	0,076
30	75	0,100	62	6	0,102
31	95	0,000	63	20	0,058
32	90	0,000	64	15	0,144

Стоит отметить, что из всех исследуемых составов ионселективные композиции обладали наиболее высокими ПНР. Из проанализированных полимеров геллановая камедь как в монокомпозиции, так и в сочетании с некоторыми другими полимерами продемонстрировала наивысшие показатели ретенции. Как и в случае с термореверсивными составами, добавление мукоадгезивов значительно улучшило ретенцию. И снова использование Pol124 показало самые внушительные результаты – ПНР достиг 95% (состав №31), что впоследствии может придать лекарственному препарату наиболее приемлемые фармакокинетические характеристики.

Помимо Pol124 был выявлен еще один очень перспективный мукоадгезивный полимер – ГПМЦ. Полученные составы в композиции с ГК обладали ПНР до 90%, что также дает перспективу для дальнейшего изучения.

Необходимо акцентировать внимание также на составах, состоящие из ГК в сочетании с PBS. Помимо обеспечения удовлетворительного уровня кислотности эти композиции обладали очень высокими показателями ретенции на поверхности слизистой модели носовой полости (70-90%). Предположительно это может быть связано с предварительным гелеобразованием еще до распыления состава. Предварительный фазовый переход настолько незначителен, что критически не изменил вязкость и распыляемость состава и даже позволил системе в полной мере осадиться на поверхности слизистой.

Благодаря скринингу на основе анализа ПНР были выбраны и самые неудачные композиции, неспособные удерживаться на поверхности слизистой носа. К таким композициям можно отнести все составы, содержащие рН-чувствительные полимеры – Карб, хитозан. Что интересно, данные полимеры не только самостоятельно не обеспечивали золь-гель перехода, но и мешали полимерам других групп. Также любые концентрации пектина, ГуК и КК не дали требуемых значений удовлетворительной стимулочувствительной матрицы. ПНР

перечисленных составов едва превышал 25%, что абсолютно неприемлемо при разработке *in situ* систем для назального применения.

3.4. Изучение свойств фармацевтических композиций стимулочувствительных систем доставки рибавирина

Проведенные предварительные исследования продемонстрировали пригодность небольшой выборки плацебо составов для анализа их в композиции с рибавирином. В таблице 3.13 приведены составы, отобранные из пула 64 образцов, для анализа с изучаемой АФС.

Таблица 3.13 – Составы композиций, прошедших первичный скрининг по критическим показателям качества (CQA)

№	Состав
15	Pol407 18% + Хитозан 2%
16	Pol407 18% + Хитозан 1%
27	ГК 0,5% + PBS 10%
28	ГК 0,5% + PBS 15%
31	ГК 0,5% + Pol124 2%
32	ГК 0,5% + Pol124 1%
46	ГК 0,25% + ГПМЦ 0,2%
47	ГК 0,5% + ГПМЦ 0,1%
48	ГК 0,5% + ГПМЦ 0,2%

Ввиду риска нарушения технологических характеристик по критическим показателям качества после добавления рибавирина в концентрации 250 мг/мл (Приложение Д) все отобранные составы были проанализированы в соответствии с CQA.

Композиции с рибавирином изготавливались в соответствии с методикой, описанной в Главе 2. Температурный режим получения исследуемых составов оставался неизменным. При получении ионселективных композиций на основе ГК этот момент является критическим, так как полное набухание камеди возможно лишь при повышении температуры системы до 80°C.

Как и ранее, в соответствии с дизайном исследования композиции анализировались по определенному алгоритму, начиная с определения стимулочувствительности. Результаты определения стимулочувствительности для композиций, нагруженных АФС, представлены в таблице 3.14. Для облегчения анализа и отображения изменений в таблице указаны данные по исследованию каждого показателя у композиций с АФС и плацебо составами.

Ожидалось, что высокая концентрация действующего вещества может изменить вязкость смеси и нарушить полноту и контрастность фазового золь-гель перехода *in situ* систем. Однако полученные результаты первого исследования продемонстрировали отсутствие всякого воздействия рибавирина на стимулочувствительность систем доставки.

Таблица 3.14 – Стимулочувствительность композиций с содержанием рибавирина 250 мг/мл

№	Плацебо составы		Составы с рибавирином	
	Стимулочувствительность	Индекс стимулочувствительности	Стимулочувствительность	Индекс стимулочувствительности
15	+++	31,40	+++	33,09
16	+++	39,96	+++	38,56
27	+++	5,40	+++	5,99
28	+++	6,43	+++	6,21
31	+++	9,89	+++	11,21
32	+++	3,63	+++	4,22
46	++	2,59	++	2,39
47	+++	8,13	+++	9,01
48	+++	7,83	+++	7,65

Все результаты соответствовали данным стимулочувствительности до загрузки АФС в лекарственную форму. Расчет индекса стимулочувствительности количественно подтвердил отсутствие значимых изменений *in situ* свойств отобранных композиций при добавлении рибавирина.

Таблица 3.15 – Определение pH композиций с содержанием рибавирина (250 мг/мл)

№	pH состава с АФС (SD±0,05)	pH плацебо композиций (SD±0,05)
15	5,99	6,12
16	6,08	6,3
27	6,69	7,14
28	7,00	7,21
31	6,82	6,89
32	6,32	6,91
46	6,47	7,62
47	6,44	6,61
48	6,53	6,58

Так как стандартный водный раствор рибавирина имеет pH в диапазоне от 4,5 до 6, то и воздействие на кислотность системы доставки ожидалось минимальное. В случае разработки назальной системы доставки оказанный эффект рибавирина являлся лишь преимуществом конечного препарата, так как удалось снизить pH композиций до еще более оптимальных значений. Все отобранные составы обладали показателями pH в удовлетворительном для назальной доставки диапазоне.

Таблица 3.16 – Динамическая вязкость композиций с содержанием рибавирина (250 мг/мл), рассчитанная по модели Кэссона

№	Динамическая вязкость с АФС, mPa·s (SD±0,95)	Динамическая вязкость плацебо композиций, mPa·s (SD±0,95)
15	27,1	42,3

Продолжение Таблицы 3.16

16	39,9	40,9
27	37,8	30,1
28	30,2	33,3
31	28,1	27,8
32	24,1	59,8
46	29,4	42,2
47	35,1	39,7
48	29,9	45,6

Добавление рибавирина в композицию привело к изменению вязкости различных композиций. Отследить определенную тенденцию по полученным данным достаточно сложно, но у основного массива составов вязкость понизилась. Так же как и в предыдущих исследованиях, все значения динамической вязкости оставались в пределах целевых и сильно не повлияли на общий профиль качества составов.

Таблица 3.17 – Температура гелеобразования композиций с содержанием рибавирина (250 мг/мл)

№	Температура гелеобразования составов с АФС, °C (SD±1,28)	Температура гелеобразования плацебо композиций, °C (SD±3,42)
15	25	28,1
16	24,6	29,2
27	-	-
28	-	-
31	-	-
32	-	-
46	-	-
47	-	-
48	-	-

Влияние АФС на полимерную композицию оказалось критичным. Стандартные условия хранения лекарственного препарата ограничены 25°C, вследствие чего смещение температуры гелеобразования ниже физиологического уровня создает риск структурирования системы непосредственно в первичной упаковке. Естественно, решить данную проблему можно изменением условий хранения (2-8°C), но охлажденный лекарственный препарат при распылении на поверхность слизистой может вызвать дискомфорт для пациента, что в целом снижает комплаенс потребителя терапии.

Стоит отметить, что в пуле отобранных композиций не было pH-чувствительных композиций, поэтому оценка pH фазового перехода в этой выборке не проводилась.

Добавление рибавирина к плацебо составам в большинстве своем не изменило факел распыления композиций. Так как рибавирин особо не повлиял на вязкость, то и факелы

распыления оставались в пределах допустимых значений. Интересным наблюдением стало резкое уменьшение диаметра и площади распыла у композиций, содержащих Pol124 в составе (№31 и №32).

Таблица 3.18 – Характер распыления композиций с содержанием рибавирина (250 мг/мл)

Характер распыления составов с АФС				
№	Угол, ° (SD±4,32)	Ширина, мм (SD±5,26)	Диаметр, мм (SD±3,44)	Площадь, мм² (SD±101,05)
15	28,86	30,82	24,29	428,63
16	29,40	28,38	24,50	439,18
27	36,35	39,42	25,24	501,20
28	32,50	35,07	21,35	562,88
31	28,65	30,72	21,72	348,70
32	24,80	26,37	13,59	199,25
46	24,96	26,62	23,13	414,31
47	24,14	22,66	22,64	394,93
48	23,32	24,79	22,15	375,55
Характер распыления плацебо композиций				
№	Угол, ° (SD±10,19)	Ширина, мм (SD±12,25)	Диаметр, мм (SD±6,90)	Площадь, мм² (SD±183,03)
15	27,74	29,70	23,17	427,51
16	28,28	30,30	23,38	438,06
27	34,13	36,86	26,91	587,45
28	34,64	37,45	27,52	609,10
31	36,17	39,21	29,36	674,05
32	35,35	38,30	28,87	654,67
46	23,84	25,50	22,01	383,31
47	23,02	24,58	21,52	363,93
48	22,20	23,67	21,03	344,55

В случае с данными составами точно обозначить причину значительного снижения части показателей не представляется возможным. Изменение вязкости композиций было настолько минимальным, что связь между этими двумя показателями становится нелогичной в рамках анализа составов №31 и №32. В то же время назвать полученные данные неудовлетворительными нельзя, так как по сравнению с плацебо составами факел распыления после добавления АФС стал более направленным и все еще укладывался в CQA.

Как было ранее упомянуто, одним из самых критических показателей доставки интраназальных стимулочувствительных систем является ретенция композиции на поверхности слизистой носовой полости. В случае с плацебо композициями все отобранные составы обладали ПНР $\geq 80\%$, как и запланировано дизайном исследования.

Таблица 3.19 – Показатель назальной ретенции композиций с содержанием рибавирина (250 мг/мл)

№	ПНР составов с АФС, %	SD±	ПНР плацебо композиций, %	SD±
15	45	0,231	85	0,000
16	60	0,104	80	0,115
27	80	0,000	85	0,144
28	85	0,115	90	0,000
31	98	0,029	95	0,000
32	90	0,144	90	0,000
46	85	0,104	87	0,104
47	83	0,029	87	0,104
48	85	0,076	90	0,000

Полученные результаты анализа ПНР после добавления АФС выявили некую зависимость ретенции от стимула гелеобразования полимера. Несмотря на низкую температуру гелеобразования, приемлемые вязкость и факел распыления, ПНР у термореверсивных композиций резко снизился ($\Delta > 20\%$) после введения в систему рибавирина. Такой эффект был непредвиденным, так как ожидалось повышение ПНР за счет снижения температуры гелеобразования и уменьшения времени, необходимого для совершения фазового перехода. Необходимо учесть, что в коллекторе для сбора не удержавшегося состава, композиция все же находится в состоянии геля, что подтверждает его чувствительность к температуре. Скорее всего, такой низкий ПНР связан с нарушением равномерности распыления и распределения по поверхности носовой полости.

В случае с ионселективными композициями выявлен тренд снижения ПНР у композиций на основе геллановой камеди в сочетании с ГПМЦ или фосфатным буфером. Уменьшение ретенции не критично и вполне укладывается в стандартное отклонение измерений. Однако в то же время ПНР у композиций, содержащих Pol124 вместо PBS и ГПМЦ, возрос практически до 100%. Наибольшим ПНР обладал состав №31, состоящий из ГК 0,5% и Pol124 2%.

На основе проведенного анализа по всем CQA и совокупной оценке результатов именно состав №31 был выбран в качестве контрольного образца для дальнейшей модификации и *in vitro* анализа биодоступности.

3.5. Изучение высвобождения рибавирина на ячейке Франца

На сегодняшний день Государственная Фармакопея XV выделяет 4 статьи для проведения теста растворения. Данные статьи включают описание методик проведения испытаний для твердых лекарственных форм, пластырей трансдермальных, резинок жевательных и

суппозиторийев на липофильной основе. Методика проведения *in vitro* анализа высвобождения АФС из мягких лекарственных форм не описана в фармакопее.

Ассортимент тестеров растворения для *in vitro* оценки биодоступности лекарственных препаратов, апплицируемых на слизистую, в целом достаточно невелик. Анализ разрабатываемого лекарственного препарата усложняется особенностью изменения агрегатного состояния системы доставки при нанесении на слизистую, что не позволит использовать стандартные фармакопейные *in vitro* методы анализа. Несмотря на это многие зарубежные исследователи используют аппараты для испытаний на твердых лекарственных формах с целью проведения теста растворения термореверсивных *in situ* гелей [177–179]. Но стоит отметить, что подобный подход используется в методах оценки систем для парентерального введения (внутримышечные и подкожные).

Оборудование для анализа назальных лекарственных форм должно обязательно включать полупроницаемую мембрану для имитации слизистой оболочки. Наиболее простым и репрезентативным методом анализа является диализ на приборе Кривчинского. Минусом методики является отсутствие перемешивания в акцепторной камере, что снижает эффективность исследования. Модификацией прибора Кривчинского является диффузионная ячейка Франца, которая уже стала обыденностью для анализа лекарственных форм для местного слизистого применения. Данное оборудование позволяет проводить высвобождение при одновременном перемешивании и нагревании без дополнительных приборов или термостатов. Простота обслуживания и отбора проб также является значительным преимуществом по сравнению с другим оборудованием анализа.

3.5.1. Подходы к улучшению высвобождения из системы доставки рибавирина

Как было описано ранее, рибавирин обладает сниженной проницаемостью через биологические мембраны, что приводит к минимальной биодоступности АФС. Повысить биодоступность подобных АФС возможно с помощью добавления в состав композиции ПАВ, обладающих свойствами пенетраторов (вещества, различными механизмами повышающие проницаемость АФС через биологические мембраны) [59]. Дополнительным энхансером проникновения АФС является увеличенное время экспозиции препарата на слизистой. Данный вариант повышения биодоступности выполняется по умолчанию, так как разрабатываемая система доставки обладает увеличенным показателем назальной ретенции по сравнению со стандартными назальными спреями.

Для повышения биодоступности был использован метод получения твердых дисперсий, способный повысить растворимость рибавирина и прямо пропорционально повысить процент

проницаемости через полупроницаемую мембрану [185]. В общей сложности было изготовлено 6 видов твердых дисперсий. Их составы перечислены в таблице 3.20.

Таблица 3.20 – Составы твердых дисперсий

Полимер	Соотношение рибавирин:полимер
ПЭГ400	1:1
ПЭГ400	1:2
ПЭГ1500	1:1
ПЭГ1500	1:2
ПВП10000	1:1
ПВП10000	1:2

Для оптимизации эксперимента было принято решение провести *in vitro* анализ биодоступности состава №31 параллельно с композициями с добавлением пенетраторов. Подобный подход позволит выявить наиболее подходящий пенетратор и снизить время на интерпретацию и сравнение результатов.

Учитывая ранее описанные особенности слизистой носовой полости, однозначно не все пенетраторы будут применимы для введения в состав назального лекарственного препарата. Были отобраны ПАВ, способные повысить проникновение рибавирина через мембрану, а также используемые в технологии интраназальных и парентеральных лекарственных препаратов. Отобранные полимеры перечислены в таблице 3.21.

Основой для композиции всех составов являлся состав №31. В дальнейшем анализировались все его модификации с добавлением пенетраторов или твердых дисперсий. Изготовленные композиции перечислены в таблице 3.22. Методика получения исследуемых составов описана в главе 2.

Таблица 3.21 – Пенетраторы и рабочие концентрации [180–184]

Полимер	Сокращение	Рабочие концентрации, %
Транскутол	Транскутол	2-5%
Полиэтиленгликоль 400	ПЭГ400	1-2%
Полиэтиленгликоль 40	ПЭГ40	5-10%
Kolliphor CS12	CS12	2-5%
Kolliphor HS15	HS15	3-10%

Перед проведением анализа биодоступности необходимо было провести первичный скрининг полученных модифицированных плацебо композиций по показателям CQA. Данный подход является экономически и логически верным, так как снижаются к минимуму затраты испытуемого АФС на потенциально неудачные образцы.

После изготовления композиций в необходимых условиях они отправлялись на стабилизацию и хранение в холодильную камеру при температуре 2-8°C. Все дальнейшие исследования проводились через 24 часа после изготовления составов.

Таблица 3.22 – Составы композиций с модификаторами всасывания лекарственного вещества

№	ГК	Pol124	Транскутол	ПЭГ-40	ПЭГ-400	CS 12	HS 15
31.1	0,5	2	2	-	-	-	-
31.2	0,5	2	5	-	-	-	-
31.3	0,5	2	-	-	1	-	-
31.4	0,5	2	-	-	2	-	-
31.5	0,5	2	-	-	-	2	-
31.6	0,5	2	-	-	-	5	-
31.7	0,5	2	-	-	-	-	3
31.8	0,5	2	-	-	-	-	10
31.9	0,5	2	-	5	-	-	-
31.10	0,5	2	-	10	-	-	-
31.11	ТД ПЭГ 400 1:1						
31.12	ТД ПЭГ 400 1:2						
31.13	ТД ПЭГ 1500 1:1						
31.14	ТД ПЭГ 1500 1:2						
31.15	ТД ПВП 10000 1:1						
31.16	ТД ПВП 10000 1:2						

Перед началом испытаний по заданному дизайну было обнаружено, что за сутки пребывания в холодильной камере составы №31.11 - №31.16 образовали устойчивую к внешнему воздействию гелеобразную массу. При нагревании массы до комнатной температуры состояние не изменялось. Подобная новоявленная реакция может быть вызвана взаимодействием компонентов твердой дисперсии с геллановой камедью или Pol124. В связи с этим было принято решение об исключении композиций №31.11 - №31.16 из дальнейших исследований по выделенным CQA.

По хронологии первым испытанием, как и ранее, была проведена оценка стимулочувствительности новых композиций с пенетраторами. Данное исследование всегда необходимо, так как введение нового компонента в существующую, стабильную систему может привести к нарушению ионселективных свойств матрицеобразователя. Результаты анализа приведены в таблице 3.23.

Добавление новых компонентов в композицию не изменило стимулочувствительности систем. Все составы оставались все так же восприимчивы к воздействию СНЖ и совершали фазовый переход с образованием устойчивого, структурированного геля.

Несмотря на то, что используемые пенетраторы и солубилизаторы одобрены для применения в технологии интраназальных и/или парентеральных лекарственных форм, все еще

стоит анализировать изменение pH композиций при создании финальной системы доставки. Результаты измерения pH плацебо композиций с пенетраторами приведены в таблице 3.24.

Таблица 3.23 – Стимулочувствительность плацебо композиций с содержанием модификаторов всасывания

№	Стимулочувствительность	Индекс стимулочувствительности
31.1	+++	6,71
31.2	+++	7,19
31.3	+++	5,32
31.4	+++	6,01
31.5	+++	4,91
31.6	+++	5,78
31.7	+++	12,45
31.8	+++	11,98
31.9	+++	5,62
31.10	+++	4,12

Таблица 3.24 – Определение pH плацебо композиций с содержанием модификаторов всасывания

№	pH (SD±0,05)
31.1	5,56
31.2	5,57
31.3	4,56
31.4	4,47
31.5	5,93
31.6	5,92
31.7	5,65
31.8	6,19
31.9	5,47
31.10	5,48

Изменение кислотности практически всех композиций укладывалось в запланированные значения. В сравнении с прочими, составы №31.3 и №31.4 были слишком кислыми и потенциально могли вызвать цилиотоксический эффект на слизистой носовой полости.

Таблица 3.25 – Динамическая вязкость плацебо композиций с содержанием модификаторов всасывания, рассчитанная по модели Кэссона

№	Динамическая вязкость, mPa·s (SD±10,19)
31.1	93,3
31.2	78,9
31.3	76,1
31.4	77,4
31.5	102,6
31.6	117,9
31.7	28,9

Продолжение Таблицы 3.25

31.8	29,6
31.9	88,1
31.10	81,9

Реологическое исследование продемонстрировало основательное воздействие пенетраторов на общее состояние системы. Лишь в двух случаях (составы №31.7 и №31.8) показатели отличались от вязкости первичного состава №31 на несколько единиц. Оставшиеся композиции критически изменили вязкость, а в некоторых случаях вовсе вышли за пределы допустимых дизайном исследования значений.

Таблица 3.26 – Характер распыления плацебо композиций с содержанием модификаторов всасывания

№	Угол, ° (SD±1,16)	Ширина, мм (SD±4,58)	Диаметр, мм (SD±2,72)	Площадь, мм² (SD±50,12)
31.1	5,3	5,02	4,74	15,55
31.2	30,07	32,22	22,81	572,68
31.3	30,49	33,42	20,29	300,13
31.4	30,49	33,42	20,29	300,13
31.5	3,82	5,02	5,1	13,67
31.6	4,93	4,11	4,83	14,61
31.7	31,71	34,74	26,08	557,04
31.8	30,89	33,82	25,59	537,65
31.9	5,67	5,93	4,65	16,49
31.10	4,95	4,27	5,28	16,06

Исследование показателей факела распыления композиций выявило воздействие некоторых групп пенетраторов на составы. Практически во всех случаях факел распыления стал значительно уже. В случае с составами №31.7 и №31.8, учитывая особенность сужения факела при добавлении рибавирина, полученные результаты вполне удовлетворительны для продолжения исследования.

Финальным исследованием, как и ранее, была оценка показателя назальной ретенции для оценки полноты удерживания лекарственного препарата на поверхности слизистой (таблица 3.27).

Стоит отметить, что все композиции продемонстрировали высокий уровень ретенции на поверхности *in vitro* модели носовой полости.

Полученные результаты скрининга позволили исключить из исследования с рибавирином восемь композиций (№31.1 - №31.6, №31.9, №31.10) ввиду критического изменения вязкости композиций и неудовлетворительного pH композиции (в случае с составом №31.4). Отклонение

от CQA не позволило проводить дальнейшие испытания с АФС. К оставшимся составам (№31.7 и №31.8) был добавлен рибавирин в концентрации 250 мг/мл.

Таблица 3.27 – Определение показателя назальной ретенции плацебо композиций с содержанием модификаторов всасывания

№	ПНР, %	SD, ±
31.1	91,7	0,144
31.2	100,0	0,000
31.3	91,7	0,144
31.4	91,7	0,144
31.5	88,3	0,104
31.6	88,3	0,029
31.7	100,0	0,000
31.8	90,0	0,000
31.9	98,3	0,058
31.10	93,3	0,029

Введение рибавирина осуществлялось при комнатной температуре и после растворения композиции снова направлялись на хранение в холодильную камеру при температуре 2-8°C. Исследования по критическим показателям качества проводились через 24 часа после изготовления образцов. Результаты финишных исследований по CQA приведены в таблице 3.28.

Скрининг отобранных композиций по CQA показал критические изменения в составе №31.8. Кумулятивный характер изменений вязкости и показателей факела распыления в свою очередь повлиял на показатель назальной ретенции состава, который изменился до критических значений, что не позволяет идентифицировать его как прошедший скрининг. В то же время состав №31.7 с содержанием рибавирина 250 мг/мл продемонстрировал удовлетворительные результаты. Полученные данные стали основанием для использования состава №31.7 для проведения теста растворения и повторного *in vitro* анализа биодоступности.

Таблица 3.28 – Результаты анализа составов по CQA с модификаторами всасывания и содержанием рибавирина (250 мг/мл)

Показатель	№	
	31.7	31.8
Стимулочувствительность	+++	++
Индекс стимулочувствительности	10,62	2,32
pH (SD±0,05)	5,53	5,68
Динамическая вязкость, mPa·s (SD±10,19)	38,4	72,5
Угол, ° (SD±1,16)	28,5	8,83
Ширина, мм (SD±4,58)	30,48	9,04
Диаметр, мм (SD±2,72)	21,82	9,99
Площадь, мм ² (SD±50,12)	379,74	68,32
ПНР, % (SD±0,05)	98	74

3.5.2. Оценка высвобождения рибавирина из фармацевтических композиций

Контрольные точки для отбора проб были подобраны с учетом воздействия мукоцилиарного клиренса на систему доставки. Учитывая усредненную скорость физиологического клиренса, финальной контрольной точкой для анализа высвобождения была выбрана точка в 180 минут [186]. Конечная точка была подобрана из расчета на противодействие мукоцилиарному клиренсу стимулочувствительной системой. Всего было выполнено 5 отборов проб из ячейки Франца: 15 минут, 30 минут, 60 минут, 120 минут, 180 минут. Образцы в течение 2 часов после отбора помещались в морозильную камеру при температуре от – 8 до – 5 °С, чтобы избежать физико-химических изменений образца в период хранения перед проведением количественного определения. Непосредственно количественное определение проводилось по методике, описанной в Государственной фармакопее XV издания (ФС.2.1.0031 «Рибавирин»). Результаты количественного определения приведены в таблице 3.29.

Таблица 3.29 – Количественное определение рибавирина в исследуемых образцах №31 и №31.7

Состав	№ пробы	Концентрация АФС, мг/мл	Средняя концентрация, мг/мл	Средняя концентрация, %	SD±
31	1-15	19,44438	19,87707	7,950828	1,97
	2-15	18,6005			
	3-15	19,58239			
	4-15	23,28747			
	5-15	18,47061			
	1-30	36,39548	34,642168	13,8568672	2,71
	2-30	30,55337			
	3-30	36,29605			
	4-30	36,80187			
	5-30	33,16407			
	1-60	39,52252	41,334242	16,5336968	2,39
	2-60	38,62742			
	3-60	42,54781			
	4-60	41,34443			
	5-60	44,62903			
	1-120	48,64684	52,671736	21,0686944	3,96
	2-120	55,16334			
	3-120	52,31841			
	4-120	57,99272			
	5-120	49,23737			
	1-180	58,52273	56,16963	22,467852	3,05
	2-180	57,13746			
	3-180	58,39997			
	4-180	55,65831			
	5-180	51,12968			

Продолжение Таблицы 3.29

31.7	1-15	1,818283552	1,826873742	0,7307495	0,22
	2-15	1,651998117			
	3-15	1,795763982			
	4-15	1,671503533			
	5-15	2,196819525			
	1-30	2,935364115	2,838573403	1,13542936	0,21
	2-30	2,855051752			
	3-30	2,797029302			
	4-30	2,519368409			
	5-30	3,086053435			
	1-60	4,192792107	4,290094962	1,71603798	0,26
	2-60	4,048667449			
	3-60	4,703035866			
	4-60	4,147586412			
	5-60	4,358392975			
	1-120	5,521043896	4,762715514	1,90508621	1,05
	2-120	2,976429385			
	3-120	5,36446788			
	4-120	4,652424799			
	5-120	5,299211608			
	1-180	9,754375925	6,523897884	2,60955915	2,20
	2-180	7,860651228			
	3-180	4,899831165			
	4-180	4,824288032			
	5-180	5,280343067			

Ввиду стабильности рибавирина при термической обработке было исключено изменение конформации АФС. Максимумы поглощения при спектрофотометрическом анализе вспомогательных веществ находятся в другом диапазоне длин волн, что позволило провести количественное определение без изменения фармакопейной методики. Таким образом были исключены помехи при спектрофотометрическом детектировании (220 нм).

Полученные результаты свидетельствуют о последовательном высвобождении рибавирина без явных точек агрессивного выброса АФС. Обе композиции продемонстрировали линейное высвобождение.

Также стоит отметить, что проведенный эксперимент подтвердил целесообразность параллельного анализа композиций с пенетраторами и без. Несмотря на свойства ПАВ Kolliphor HS15 улучшать растворимость и проницаемость АФС [187], биодоступность снизилась почти в 10 раз по сравнению с составом без содержания дополнительных пенетраторов (рисунок 3.8).

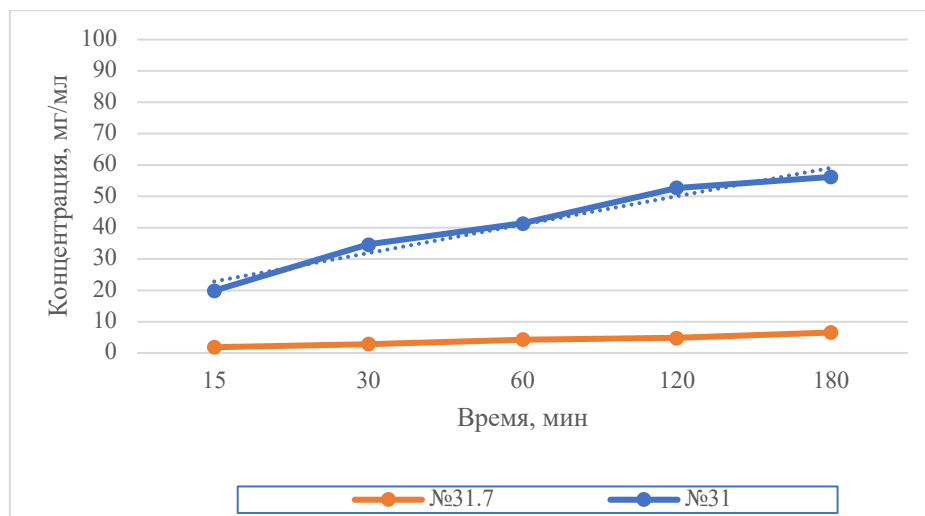


Рисунок 3.8 – Кривая высвобождения рибавирина из составов №31 и №31.7

Учитывая специфику места аппликации лекарственного средства и непрерывное обновление слизистого слоя носовой полости, выбранная конечная точка отбора аликвот была корректной. За 180 минут анализа была достигнута биодоступность в более чем 20%, что позволяет судить о высокой эффективности стимулочувствительного геля рибавирина.

3.6. Введение консервантов и определение сроков годности

Следующий этап разработки заключался в оценке стабильности системы доставки при добавлении консерванта, а также влиянии условий хранения на срок годности разработанного ЛС. Наиболее часто применяемым консервантом в технологии изготовления интраназальных лекарственных препаратов является бензалкония хлорид. В настоящем исследовании бензалкония хлорид был добавлен к композиции №31 в средней рабочей концентрации, не вызывающей нарушений мукоцилиарного клиренса – 0,01% [188,189]. Такое решение было принято для снижения вероятности оказания цилиотоксического воздействия при *in vivo* исследовании системы доставки. Финальный состав системы доставки приведен в таблице 3.30.

Состав №31 с добавлением бензалкония хлорида 0,01% был в дальнейшем отправлен на доклинические исследования на аутбредных крысах линии Wistar. Результаты анализа цилиотоксического воздействия и биодоступности *in vivo* приведены в Приложении Д.

Таблица 3.30 – Финальный состав лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза»

Компонент состава	Содержание
Рибавирин	250 мг/мл
Геллановая камедь	0,5%
Полосамер 124	2%

Продолжение Таблицы 3.30

Бензалкония хлорид	0,01%
Вода очищенная	до 1 мл

Для проведения исследований стабильности были отобраны три серии по пять образцов разработанного лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза», произведенных в период с сентября по ноябрь 2024 года. До начала испытаний осуществлялся контроль качества в соответствии с установленной спецификацией. Образцы хранили в условиях, предусмотренных требованиями решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10 мая 2018 года №69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций» при температуре 25 ± 2 °C и влажности $60 \pm 5\%$ в течение 12 месяцев. Полученные результаты представлены в Приложении Б.

На основании проведенных исследований для ЛС «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза» показана стабильность в течение 1 года.

3.7. Результаты оценки степени влияния параметров состава и технологического процесса на качество разработанной системы доставки

Качественная оценка воздействия CQA и CMA продемонстрировала высокую степень влияния характеристик состава на параметры качества системы доставки. В качестве критических параметров состава были выбраны: тип полимера, концентрация полимера (% полимера), вспомогательные вещества (ВВ), концентрация вспомогательных веществ (С% ВВ) и влияние АФС. В равной степени влияние оказывали тип и концентрация гелеобразующих полимеров и вспомогательных веществ. Влияние активной фармацевтической субстанции на качество препарата было минимальным. Результат оценки приведен в таблице 3.31.

Таблица 3.31 – Оценка степени влияния критических показателей качества и характеристик используемых материалов

CQA	CMA				
	Тип полимера	С% полимера	ВВ	С% ВВ	АФС
Стимулочувствительность	Высокая	Высокая	Средняя	Средняя	Средняя
Вязкость	Высокая	Высокая	Высокая	Высокая	Средняя
рН	Высокая	Низкая	Средняя	Низкая	Низкая
Температура гелеобразования*	Низкая	Низкая	Высокая	Высокая	Низкая
рН гелеобразования**	Высокая	Высокая	Низкая	Низкая	—***
Характер распыления	Низкая	Высокая	Высокая	Высокая	Средняя
ПНР	Средняя	Высокая	Высокая	Высокая	Средняя

Продолжение Таблицы 3.31

Примечание: * - оценка проводилась только для композиций, обладающих термореверсивным фазовым переходом; ** - оценка проводилась только для композиций, обладающих pH-чувствительным фазовым переходом; *** - оценка не проводилась.

Полученные результаты подтверждают значительную роль составляющих композицию ингредиентов на критические параметры качества системы доставки.

Для оценки влияния технологических параметров на критические показатели качества использовали составы из «базы ионселективных матриц». В эксперименте варьировали:

- время перемешивания (10 мин — «малое», 60 мин — «большое»);
- скорость перемешивания (50 об — «малая», 500 об — «большая»);
- время структурирования (3 ч — «малое», 48 ч — «большое»);

Полученные образцы протестировали по ключевым параметрам качества. Анализ данных выполнили в программном обеспечении MiniTab 19.0, определив степень влияния факторов как высокую, среднюю или низкую. Результаты представлены в таблице 3.32.

Таблица 3.32 – Оценка взаимосвязи критических показателей качества и характеристик используемых материалов

CQA	CPR		
	Время перемешивания	Время структурирования	Скорость перемешивания
Стимулочувствительность	Низкая	Низкая	Низкая
Вязкость	Средняя	Средняя	Средняя
pH	Низкая	Низкая	Низкая
Температура гелеобразования*	Низкая	Низкая	Низкая
pH гелеобразования**	Низкая	Низкая	Низкая
Характер распыления	Низкая	Низкая	Низкая
ПНР	Низкая	Низкая	Низкая
Примечание: * - оценка проводилась только для композиций, обладающих термореверсивным фазовым переходом; ** - оценка проводилась только для композиций, обладающих pH-чувствительным фазовым переходом; *** - оценка не проводилась.			

Проведенный анализ показал отсутствие критического влияния варьирования параметров изготовления ЛС на его качество.

3.8. Анализ различных видов упаковки при сравнении данных на SprayView и SprayTec

Одним из самых важных факторов качества лекарственного средства является его упаковка. Правильный подбор упаковочных материалов позволяет не только придать препарату приемлемый и приятный вид для потребителя, но также может улучшить опыт применения для пациента, что повысит приверженность к оказываемой терапии. На сегодняшний день рынок

упаковочных решений для назальных препаратов располагает следующими категориями распылительных систем: многодозовый флакон-капельница (не дозированные), многодозовые распылительные системы с вертикальным триггером, многодозовые распылительные системы с горизонтальным триггером, многодозовые аэрозоли дозированные, многодозовые аэрозоли недозированные, однодозовые распылительные системы с вертикальным триггером, двудозовые распылительные системы с вертикальным триггером, шприц-спрей.

Особенность подбора разрабатываемой системы доставки заключается в необходимости таргетного распыления состава в верхний носовой ход к обонятельной луковице для наиболее нацеленного воздействия на черепно-мозговые нервы. Целевое упаковочное решение должно обеспечивать равномерное распыление препарата для обеспечения запланированного осаждения на слизистой оболочке. Исследование факела распыления по различным показателям, как и ранее, проводилось на анализаторе измерения формы и геометрии факела распыла SprayVIEW.

Также важным показателем является размер капель при распылении, ведь данный показатель может косвенно свидетельствовать о скорости обеспечения системой фазового перехода. Стоит учитывать, что капли слишком мелкого размера рискуют попасть в нижние дыхательные пути вместе со вдыхаемым воздухом, не задержавшись на поверхности слизистой носовой полости. Капли слишком большого размера обречены после гелеобразования либо стечь по носоглотке, либо удалиться через вестибулярную часть носа, что тоже приведет к удалению части препарата и потере целевого фармакологического эффекта. В стандартных коммерчески доступных спреях дозирующие устройства распыляют лекарственный препарат в диапазоне 20-150 мкм. Такой размер частиц применим для стандартных растворов с минимальной вязкостью, приравненной к воде. Естественно, в случае со стимулочувствительной системой, где раствор априори обладает повышенной вязкостью в нативном состоянии, изначально ожидаются более повышенные значения размера частиц при распылении. Анализ размера капель обусловлен необходимостью повышения площади контакта распыляемого лекарственного препарата со слизистой. Выявить соотношение частиц различного размера возможно при использовании специального оборудования – анализатора размера частиц в распылении Malvern Spraytec. В данном приборе для измерения размера капель/частиц спреев и аэрозолей в распылении применяется метод лазерной дифракции. Прибор позволяет высчитать процентное соотношение капель различного размера при распылении определенной системы доставки. Совокупный анализ на тестере размера частиц и показателя назальной ретенции позволит выбрать наиболее оптимальное дозирующее устройство и провести *in vitro* корреляцию между тремя показателями: вязкость, размер частиц и ПНР.

Для анализа было отобрано шесть различных дозирующих устройств. Наименования и характеристики перечислены в таблице 2.3 в главе 2.

При проведении измерений была выполнена поправка на различный высвобождаемый объем исследуемых дозирующих устройств. Данная поправка необходима для проведения корректных расчетов и выявления стандартного отклонения измерений.

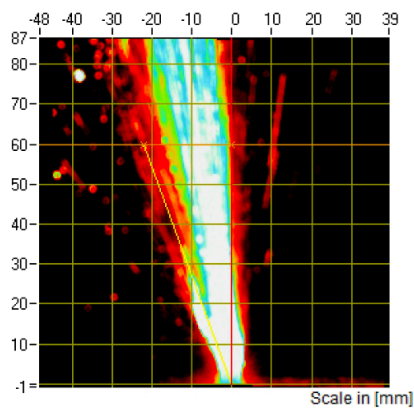
Для начала состав-лидер (№31) был испытан на анализаторе измерения формы и геометрии факела распыла SprayVIEW с использованием всех испытуемых дозирующих устройств. Результаты анализа приведены в таблице 3.33.

Полученные данные продемонстрировали непригодность распылительных систем под номерами 3 и 4. Основным минусом данных дозирующих устройств является отклонение угла распыления от срединной оси (рисунок 3.9).

Таблица 3.33 – Результаты измерения формы и геометрии факела распыла на различных дозирующих устройствах

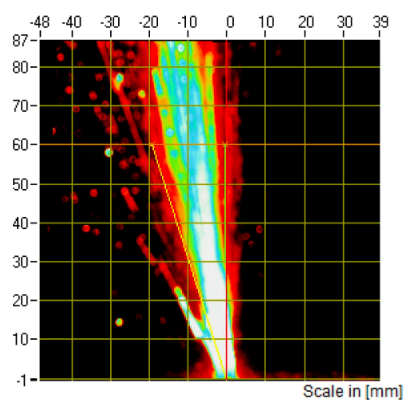
№	Угол, ° (SD±5,64)	Ширина, мм (SD±6,15)	Диаметр, мм (SD±1,32)	Площадь, мм ² (SD±33,03)
1	28,65	30,72	17,47	224,57
2	16,15	17,07	13,69	152,10
3	198,95	20,65	19,09	277,5
4	366,25	8,02	*	*
5	19,20	20,31	12,49	125,27
6	25,60	27,31	17,51	241,30
Примечание: * необрабатываемые результаты.				

Подобное изменение факела распыления приведет к нарушению таргетности и воспроизводимости при дозировании системы доставки самим пациентом. В случае с устройством 004 результаты анализа формы и факела распыла вовсе не поддавались обработке программным обеспечением (рисунок 3.10).



Arm 1: 0.1 deg
 Arm 2: 20.2 deg
 Angle: 20.3 deg
 Distance: 60.0 mm
 Width: 22.18 mm
 Time: 128 ms

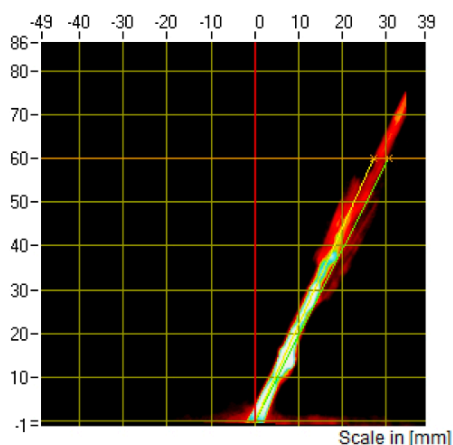
А



Arm 1: 359.7 deg
 Arm 2: 17.9 deg
 Angle: 377.6 deg
 Distance: 60.0 mm
 Width: 19.11 mm
 Time: 148 ms

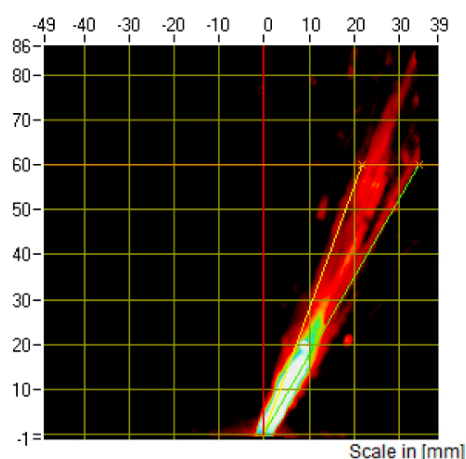
Б

Рисунок 3.9 – Результаты измерения геометрии факела распыления с использованием ДУ №3: А – измерение 1, Б – измерение 2



Arm 1: 27.0 deg
 Arm 2: 335.6 deg
 Angle: 362.6 deg
 Distance: 60.0 mm
 Width: 3.41 mm
 Time: 132 ms

А



Arm 1: 29.9 deg
 Arm 2: 340.0 deg
 Angle: 369.9 deg
 Distance: 60.0 mm
 Width: 12.63 mm
 Time: 136 ms

Б

Рисунок 3.10 – Результаты измерения геометрии факела распыления с использованием ДУ №4:
 А – измерение 1, Б – измерение 2

Из наилучших результатов стоит выделить распылительные устройства №1, 2, 5 и 6, которые продемонстрировали удовлетворительные значения по всем исследуемым характеристикам. Несмотря на приемлемые цифровые показатели распылителя №6, визуальная оценка снимков не позволяет выделять его в качестве лидера. За счет асимметричности факела распыла появляется риск нарушения однородности распределения лекарственного средства по поверхности слизистой (рисунок 3.11).

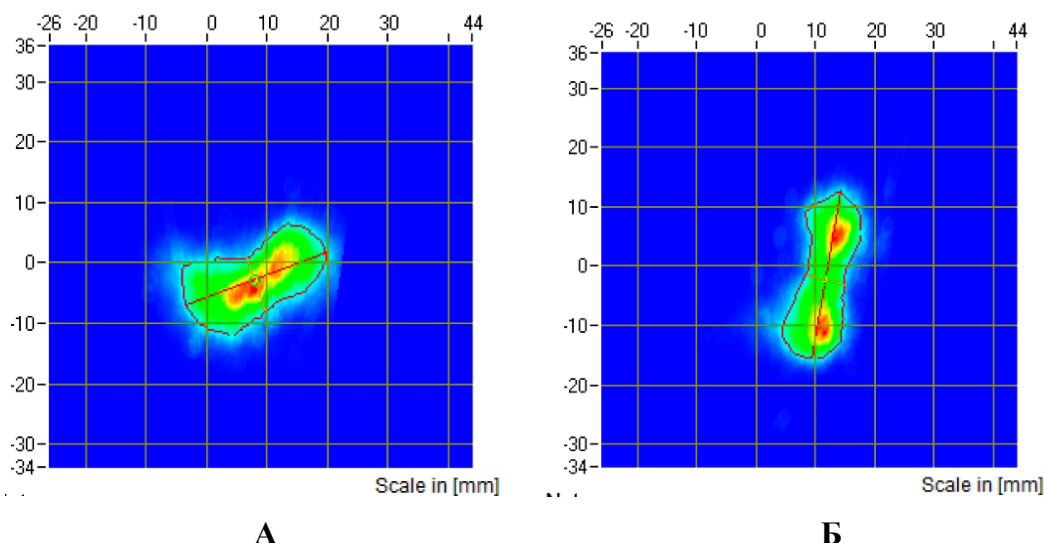


Рисунок 3.11 – Результаты измерения формы факела распыления с использованием ДУ №6: А – измерение 1, Б – измерение 2

Как было упомянуто ранее, для всестороннего анализа распылительных систем был проанализирован профиль распределения размера капель при высвобождении лекарственного средства из дозирующего устройства, что в полной мере позволит сделать вывод о пригодности той или иной распылительной системы. Результаты измерений приведены в таблице 3.34.

Таблица 3.34 – Результаты измерений профиля распределения размера капель на различных дозирующих устройствах на аппарате SprayTec

№	1	2	3	4	5	6
Dv (10), μm	72,22	48,24	41,13	37,63	76,77	86,25
Dv (50), μm	256,37	149,23	141,48	89,06	189,33	192,56
Dv (90), μm	680,57	406,47	462,04	301,43	414,23	492,31
%V <10 μm, %	0,4620	0,1933	0,9734	0,8473	0,0380	0,1291
Трансмиссия, %	79,33	87,63	73,20	89,73	89,33	81,41

Несмотря на наиболее удовлетворительные результаты в исследовании факела и геометрии распыла, устройство №1 продемонстрировало наихудшие результаты при оценке размера капель и смежных характеристик распыления. Наибольшая фракция капель имела размер более 600 μm , что свидетельствует о высокой вероятности «слипания» частиц и уменьшении площади контакта препарата со слизистой оболочкой носовой полости.

Также стоит обратить внимание на распылитель №5, где 50% частиц обладали достаточно приемлемым размером, а показатель трансмиссии был одним из лидирующих, что свидетельствует о равномерном распределении частиц различного размера в общем столбе спрея. Немаловажным является и наименьший показатель %V <10 μm , что позволяет сделать вывод о минимальной вероятности попадания ЛС в нижние дыхательные пути.

Лучшими характеристиками обладал распылитель №4. Несмотря на доказательство его непригодности в предыдущих исследованиях, в данном эксперименте он был наиболее удовлетворительным. Данные результаты были ожидаемы, так как угол распыления смещен от срединной оси и, следовательно, столб спрея не мог полностью попасть в область измерения. Приведенные значения описывают лишь ту часть проанализированного спрея, которая попала в область действия лазерного луча и оптического детектора. К сожалению, полученные данные в отношении распылителя № 4 нельзя считать достоверными за счет искажения измерений из-за отклонения геометрии распыла дозирующего устройства.

Для повышения достоверности проведенных исследований и проведения корреляции между эффективностью дозирующего устройства и распределением препарата на поверхности слизистой для всех распылительных устройств был проведен анализ показателя назальной ретенции. Так как не только состав вспомогательных веществ влияет на удержание препарата на поверхности носовой полости, то следует удостовериться в пригодности конкретного дозирующего устройства для разрабатываемой системы доставки. Результаты анализа показателя назальной ретенции для всех распылительных устройств приведены в таблице 3.35.

Таблица 3.35 – Результаты оценки показателя назальной ретенции при использовании различных типов дозирующих устройств

№	ПНР, %	SD±
1	85	0,000
2	100	0,000
3	Необрабатываемые результаты	-
4	Необрабатываемые результаты	-
5	95	0,100
6	98	0,058

За счет искаженного угла распыла при использовании дозирующих устройств № 3 и 4 композиция распыляется непосредственно в вестибулярной части носовой полости, что не позволяет ей контактировать с имитируемой слизистой. Несмотря на довольно удовлетворительные показатели инструментального анализа данных распылительных систем, исследование на модели носовой полости продемонстрировало невозможность обработки результатов и непригодность данных распылителей для анализа.

Дозирующее устройство №1 обладало вполне удовлетворительным ПНР, что укладывается в CQA, запрограммированные дизайном исследования. Обосновать частичный выход лекарственного препарата из носовой полости можно преобладанием частиц большого размера при распылении, по сравнению с другими распылителями.

Распылители № 2, 5 и 6 с наилучшими результатами ПНР также обладали сравнительно похожими показателями на анализаторе SprayTec. Имеющиеся результаты позволяют выдвинуть

в лидеры 3 оставшихся дозирующих устройства и проводить анализ исключительно по потребительским характеристикам.

В сравнении со шприц-спреем, использование которого подразумевает возобновление дозы, его наполнение или вовсе утилизацию после каждого применения, более удобным вариантом для разрабатываемой системы доставки является многодозовая упаковка. Использование многодозовой упаковки возможно только при монтаже распылителей № 2 и 5 в соответствующий флакон. Так как распылитель № 2 распыляет большую дозу при единовременной актуации, то его применение имеет большую целесообразность в данном случае.

3.9. Технологическая схема производства лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза»

Рисунок 3.12 отражает технологическую схему производства лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза». Средство представляет собой прозрачную бесцветную жидкость, лишенную запаха; хранение предусмотрено при температуре $+25 \pm 2$ °С. Фасовку осуществляют во флаконы темного стекла вместимостью 15 мл, снабженные навинчивающейся насосной распылительной системой и этикеткой, с последующей укладкой флаконов в картонные коробки.

В основу лабораторной технологии получения лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза» положен установленный оптимальный состав, где действующим веществом выступает рибавирин (25 мг/1 доза, 250 мг/мл), а вспомогательными – геллановая камедь (0,5%), полоксамер 124 (2,0%) и бензалкония хлорид (0,01%). Изготовление включает следующие стадии, отраженные в технологической схеме (рисунок 3.12):

ТП.4. Получение стимулочувствительной системы доставки рибавирина

УМО.5. Упаковка, маркировка, отпуск

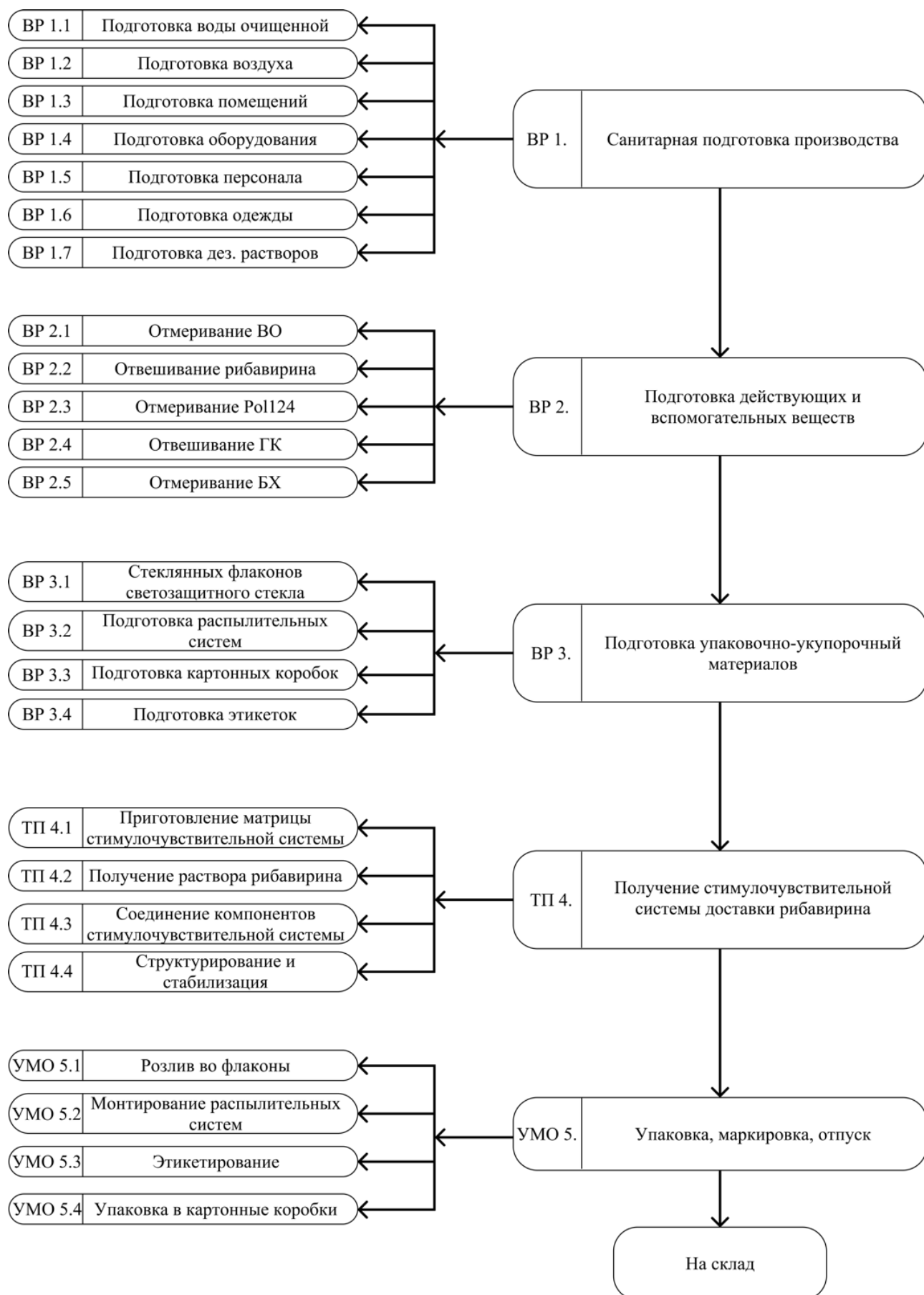


Рисунок 3.12 – Технологическая схема производства лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза»

ТП.4. Получение стимулочувствительной системы доставки рибавирина

Процесс приготовления основы системы доставки начинается с диспергирования геллановой камеди в воде очищенной. ГК вносят в предварительно нагретый до 80 °С рассчитанный объем воды очищенной при непрерывном перемешивании со скоростью 300–400 об/мин. Нагрев необходим для обеспечения набухания и полного растворения полисахарида. Процесс растворения продолжается 20–30 минут при поддержании заданной температуры. По окончании растворения горячий раствор геллановой камеди охлаждают до 20–25 °С, после чего прибавляют отмеренный объем полоксамера 124 при перемешивании со скоростью 200–250 об/мин в течение 10–15 минут. Полученная основа системы доставки должна представлять собой прозрачный однородный раствор без видимых частиц и признаков расслоения.

Рибавирин вносят в остаток воды очищенной (50% от общего объема серии) при температуре 20–25 °С при постоянном перемешивании. Введение АФС осуществляют порционно, небольшими добавками, для обеспечения равномерного диспергирования и исключения комкования. По окончании растворения охлажденный раствор полимерной матрицы объединяют с раствором рибавирина при скорости мешалки 300–400 об/мин в течение 20–30 минут при температуре 20–25 °С. К завершению данной стадии раствор должен стать прозрачным или слегка опалесцирующим, без видимых нерастворенных агломератов. Гомогенизация является критической стадией, непосредственно влияющей на однородность содержания действующего вещества в дозе.

К гомогенной смеси добавляют рассчитанный объем предварительно приготовленного раствора бензалкония хлорида до достижения концентрации консерванта 0,01% в общей массе серии. Введение консерванта осуществляют при перемешивании со скоростью 150–200 об/мин. После введения всех компонентов полупродукт доводят водой очищенной до целевого объема серии, перемешивают 10 минут и проводят контроль параметров качества полупродукта.

УМО.5. Упаковка, маркировка, отпуск

Фасовку ЛС осуществляют во флаконы из светозащитного стекла объемом 15 мл. Флаконы перед наполнением промывают водой очищенной, сушат при температуре 100–120 °С в течение не менее 30 минут и охлаждают до комнатной температуры. Наполнение флаконов осуществляется на полуавтоматическом дозаторе объемного типа с точностью дозирования $\pm 2\%$ от номинального объема (15 мл).

После наполнения флаконы незамедлительно укупоривают навинчивающейся насосной распылительной системой (распылитель № 2 согласно результатам отбора оптимального дозирующего устройства, пункт 3.8), обеспечивающей подачу дозы 100 мкл при однократном нажатии.

Этикетка первичной упаковки (флакона) несет торговое наименование и МНН, концентрацию действующего вещества, объем, номер серии, дату изготовления и срок годности, условия хранения ($+25 \pm 2$ °C), способ применения, наименование производителя и предупреждение «Хранить в недоступном для детей месте». Флакон в сборе с распылительной системой помещают в пачку из картона для потребительской упаковки вместе с листком-вкладышем. Вторичная упаковка (пачка) дополнительно содержит адрес и контактные данные производителя, штрих-код, номер регистрационного удостоверения и условия отпуска из аптек.

По окончании фасовки готовую продукцию контролируют согласно проекту спецификации (таблица 3.36).

Таким образом, предложенная технология позволяет воспроизводимо получать ЛС «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза» с заданными физико-химическими и биофармацевтическими характеристиками.

3.10. Проект спецификации на разработанное лекарственное средство

При составлении проекта спецификации учитывались требования действующих нормативных документов [190, 191, 192, 193] (таблица 3.36). Наряду с показателями, стандартными для нестерильных жидких лекарственных форм, проект содержит требование к определению стимулочувствительности, введенное с учетом специфики созданной системы доставки препарата.

Зависимость качества созданной системы доставки от условий и сроков хранения изучали, руководствуясь [194, 195].

Таблица 3.36 – Проект спецификации на разработанное ЛС «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза», флакон 15 мл, 120 доз

Показатель качества	Нормы (допустимые пределы)	Методы испытаний
Описание	Прозрачный бесцветный раствор при температуре 25 ± 2 °C	Органолептический 2.1.2.1. Прозрачность и степень опалесценции жидкостей 2.1.2.2. Окраска и интенсивность окраски жидкостей (Фармакопея ЕАЭС)

Продолжение Таблицы 3.36

Подлинность	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика рибавирина на хроматограмме раствора стандартного образца рибавирина	ВЭЖХ ФС.2.1.0031 Рибавирин (ГФ XV)
Сtimулочувствительность*	Максимально выраженный стимулочувствительного перехода (Индекс стимулочувствительности >3)	Ротационная вискозиметрия
Вязкость раствора	20-35 мПа·с	Ротационная вискозиметрия ОФС.1.2.1.0015 Вязкость (ГФ XV) [196]
pH	6,5–7,5	Ионометрия ОФС.1.2.1.0004 Ионометрия (ГФ XV)
Однородность массы доставляемой дозы	Результат удовлетворительный, если 9/10 результатов лежат в диапазоне 75-125 % от среднего значения, а все результаты — в пределах 65-135 %.	Методика определения однородности массы доставляемой дозы ОФС.1.4.1.0046 Спреи (ГФ XV) [197]
Однородность дозирования	Результат удовлетворительный, если 9/10 результатов лежат в диапазоне 75-125 % от среднего значения, а все результаты — в пределах 65-135 %.	Методика определения однородности дозирования ОФС.1.4.1.0002.15 Аэрозоли и спреи (ГФ XV)
Количество высвобождений из упаковки (количество доз в упаковке)	Не менее 120 доз	Методика определения количества высвобождений из упаковки ОФС.1.4.1.0046 Спреи (ГФ XV) [197]
Количественное определение	Содержание рибавирина в дозе лекарственного средства от 99,0 до 101,0 %	ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» (ГФ XV) Хроматографические условия – ФС.2.1.0031 Рибавирин (ГФ XV)
Микробиологическая чистота	Категория 2	Прямой посев (глубинный метод) ОФС.1.2.4.0002 Микробиологическая чистота (ГФ XV)
Примечание: * - для оценки показателя разработана собственная методика.		

3.11. Выводы к главе 3

1. Последовательный и тщательный анализ всех сгенерированных *in situ* составов с различными стимулами гелеобразования привел к удовлетворительным результатам, позволившим перейти к *in vivo* исследованиям. Уже первичный скрининг плацебо композиций по сформулированным биофармацевтическим критическим показателям качества дал основания судить о пригодности отдельных составов для дальнейшей разработки. Часть из них была способна к фазовому переходу, однако гелеобразование протекало вне физиологических условий носовой полости, поэтому к лидирующим такие композиции отнести не удалось;

2. Предложенный дизайн фармацевтической разработки по стандартам QbD позволил определить состав, содержащий 0,5% геллановой камеди и 2% полоксамера 124, в качестве оптимальной композиции, обладающей ионселективностью в отношении искусственной назальной жидкости. После введения рибавирина в состав композиции ею были продемонстрированы удовлетворительные результаты по выделенным показателям SQA. Использование солюбилизаторов и пенетраторов не позволило достичь желаемого результата в увеличении высвобождения рибавирина *in vitro*. Использование твердых дисперсий вовсе невозможно ввиду нестабильности после изготовления композиций с ними в составе;

3. Многопрофильный анализ по показателям формирующих характер распыления лекарственного средства упаковочных решений позволил подобрать самое оптимальное дозирующее устройство, обеспечивающее необходимый факел распыления системы доставки;

4. Для разработанного лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза» составлен проект спецификации и технологическая схема изготовления лекарственного средства. Результаты проведенных доклинических исследований подтвердили направленность доставки рибавирина в ткань головного мозга и отсутствие местно-раздражающего действия разработанной системы (Приложение Д).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование было направлено на разработку инновационной стимулочувствительной назальной системы доставки рибавирина с целью использования его доказанного противоопухолевого потенциала для таргетной терапии злокачественных новообразований головного мозга.

В рамках работы была успешно реализована концепция Quality by Design (QbD), позволившая на основе тщательного анализа литературных данных и проведенного SWOT-анализа идентифицировать наиболее перспективные полимерные системы. Было подтверждено, что термореверсивные, ионселективные и pH-чувствительные полимеры являются оптимальной основой для создания назальных *in situ* систем доставки.

Ключевым достижением стало определение оптимальной композиции, которая продемонстрировала требуемые физико-химические характеристики. В результате последовательного скрининга и анализа составов была выбрана композиция, содержащая 0,5% геллановой камеди и 2% полоксамера 124, обладающая выраженной ионселективностью и способностью к гелеобразованию в условиях, максимально приближенных к физиологическим параметрам носовой полости.

Также значимые результаты были получены на этапе доклинических исследований. Подтверждена безопасность разработанной системы, поскольку не было выявлено цилиотоксического воздействия на слизистую оболочку носовой полости. Критически важным результатом стало подтверждение таргетной доставки АФС в центральную нервную систему. Фармакокинетические исследования на животной модели продемонстрировали значительное накопление рибавирина в тканях головного мозга, что однозначно подтверждает эффективность разработанной назальной системы в реализации прямого пути «из носа в мозг».

Таким образом, данное исследование не только успешно решило задачу создания безопасной и эффективной стимулочувствительной назальной системы доставки рибавирина, но и предоставило убедительные доклинические доказательства ее потенциала в качестве неинвазивного и целенаправленного подхода к лечению опухолей головного мозга.

Помимо прочего, для разработанного лекарственного средства был проведен анализ упаковочных решений для подбора наиболее подходящего биофармацевтического варианта упаковки. Координация нескольких показателей распыления системы доставки из различных дозирующих устройств позволила выбрать многодозовую упаковку с наиболее приемлемым распылением *in situ* системы.

Полученные результаты открывают широкие перспективы для дальнейшей трансляции данной технологии в клиническую практику, одновременно подчеркивая необходимость

стандартизации методологий качественного анализа стимулочувствительных систем для ускорения инноваций в области фармацевтической технологии.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведен всесторонний анализ опубликованной литературы и сформированы подходы к созданию интраназальных стимулочувствительных систем доставки. Проведен SWOT-анализ существующих видов *in situ* полимеров для производства стимулочувствительных систем доставки АФС. На основе анализа выявлены основные группы смарт-полимеров, используемые для производства назальных систем доставки – термореверсивные, ионселективные и pH-чувствительные. Составлен перечень показателей, анализируемых при разработке назальных стимулочувствительных спреев, позволяющий достичь наиболее качественного результата;

2. В соответствии с подходом к организации дизайна исследования «качество через дизайн» (Quality by Design - ICH Q8 «Фармацевтическая разработка») сформирован целевой профиль качества препарата (QTPP), отображающий характеристику финального лекарственного средства. На основе изученной литературы и сформированного перечня QTPP составлен перечень критических показателей качества (CQA) разрабатываемого лекарственного средства. Сформированы перечни критических показателей используемых материалов и технологического процесса в производстве стимулочувствительной системы доставки из носа в мозг. Данные показатели были определены с целью дальнейшего изучения влияния состава и технологии изготовления на критические показатели качества лекарственного средства;

3. Разработано 64 плацебо композиции на основе термореверсивных, ионселективных и pH-чувствительных полимеров. По результатам скрининга по критическим показателям качества отобрано 9 составов, после введения рибавирина в концентрации 250 мг/мл определен состав-лидер № 31 и обосновано влияние используемых материалов и переменных параметров процесса на качество лекарственного средства;

4. Предложена и апробирована воспроизводимая методика количественной оценки стимулочувствительности *in situ* систем методом ротационной вискозиметрии в среде симуляционной назальной жидкости с определением индекса стимулочувствительности. Разработанная методика проверена на ионселективных, термореверсивных и pH-чувствительных композициях;

5. Многочисленными аналитическими, статистическими и инструментальными методами обоснованы состав и технология получения ЛС «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза», разработаны методики оценки его качества. Полученные результаты оценки ЛС по биофармацевтическим характеристикам позволили обосновать выбор наиболее подходящего состава ЛС;

6. Подготовлен проект спецификации на разработанное ЛС «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза». Качество ЛС оценено по

описанию, подлинности, стимулочувствительности, вязкости раствора, pH, однородности массы доставляемой дозы, количественному определению и микробиологической чистоте. Были проведены исследования стабильности ЛС «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза». Показана стабильность в течение года при температурном хранении 25 ± 2 °C.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные данные о воспроизводимости и стабильности свойств разработанного состава позволяют рекомендовать лекарственное средство «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза» к внедрению на производстве. Методики оценки физико-химических, биофармацевтических и технологических характеристик, в первую очередь стимулочувствительности и показателя назальной ретенции, сохраняют применимость при создании иных назальных стимулочувствительных систем доставки.

Реализованные технологические решения и экспериментальные подходы могут быть востребованы лабораториями, организующими работу по принципу «качество через дизайн». За счет их внедрения достигается рост воспроизводимости результатов и эффективности разработки, сокращение затрат, а также соответствие процессов современным фармацевтическим стандартам качества.

Технологии лабораторной разработки стимулочувствительных систем доставки, описанные в работе, безопасны и эффективны, что позволяет включить их в учебный процесс высшего фармацевтического образования.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Логичным продолжением работы над ЛС «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза» станут доклинические исследования, в которых противоопухолевая эффективность будет оценена на модели опухоли головного мозга при транспорте АФС NTV.

Второе направление – расширение круга АФС, вводимых в разработанную матрицу, и создание на ее основе препаратов иного спектра действия: антипсихотических, гормональных, противовоспалительных, противомигренозных и иммунобиологических.

Стандартизация и регламентация использования изученных стимулочувствительных полимеров в российские нормативные документы приведет к повышению исследовательского интереса и возможности коммерциализации сложных систем доставки, подобных ЛС «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза».

Углубление предложенных научно-методических подходов и технологических решений создает предпосылки для формирования нормативной базы и стандартов, которые регламентировали бы разработку, оценку качества и регистрацию лекарственных средств данного типа в Российской Федерации и государствах Евразийского экономического союза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АТ/РТ — атипичная тератоидно-рабдоидная опухоль;
- АФС — активная фармацевтическая субстанция;
- БКС — биофармацевтическая классификационная система;
- ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения;
- ГЭБ — гематоэнцефалический барьер;
- ЕАЭС — Евразийский экономический союз;
- ЕЭК — Евразийская экономическая комиссия;
- ЛП — лекарственный препарат;
- ЛС — лекарственное средство;
- ЛФ — лекарственная форма;
- мкМ — микромолярная концентрация;
- μмоль — микромоль;
- ОФС — общая фармакопейная статья;
- РНК — рибонуклеиновая кислота;
- ФС — фармакопейная статья;
- ЦНС — центральная нервная система;
- COVID-19 — coronavirus disease 2019 — коронавирусная инфекция 2019 года;
- eIF4E — eukaryotic translation initiation factor 4E — эукариотический фактор инициации трансляции 4E;
- EZH2 — enhancer of zeste homolog 2 — гомолог энхансера zeste 2;
- ERK — extracellular signal-regulated kinase — внеклеточно-регулируемая протеинкиназа;
- FDA — Food and Drug Administration — Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США;
- G-CSF — granulocyte colony-stimulating factor — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор;
- GM-CSF — granulocyte-macrophage colony-stimulating factor — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор;
- ICH — International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use — Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным препаратам для медицинского применения;
- IMPDH — inosine monophosphate dehydrogenase — инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа;
- MAPK — mitogen-activated protein kinase — митоген-активируемая протеинкиназа;

MNK1 — MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1 — серин/треониновая протеинкиназа 1, взаимодействующая с MAPK;

NTB — nose-to-brain — доставка «из носа в мозг»;

PDGFRA — platelet-derived growth factor receptor alpha — рецептор α фактора роста тромбоцитов;

QbD — Quality by Design — «качество через дизайн»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides / J. T. Witkowski, R. K. Robins, R. W. Sidwell [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1972. – Vol. 15. – № 11. – P. 1150-1154. – DOI: 10.1021/jm00281a014.
2. Broad-Spectrum Antiviral Activity of Virazole: 1- β -D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide / R. W. Sidwell, J. H. Huffman, L. G. P. Khare [et al.] // *Science*. – 1972. – Vol. 177. – № 4050. – P. 705-706. – DOI: 10.1126/science.177.4050.705.
3. In Vitro Effect of 1- β -d-Ribofuranosyl-1,2,4-Triazole-3-Carboxamide (Virazole, ICN 1229) on Deoxyribonucleic Acid and Ribonucleic Acid Viruses / J. H. Huffman, R. W. Sidwell, G. P. Khare [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1973. – Vol. 3. – № 2. – P. 235-241. – DOI: 10.1128/AAC.3.2.235.
4. Ribavirin for Hepatitis E Virus Infection After Organ Transplantation: A Large European Retrospective Multicenter Study / N. Kamar, F. Abravanel, P. Behrendt [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 71. – № 5. – P. 1204-1211. – DOI: 10.1093/cid/ciz953.
5. Ribavirin for treating Lassa fever: A systematic review of pre-clinical studies and implications for human dosing / A. P. Salam, A. Duvignaud, M. Jaspard [et al.] // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. – 2022. – Vol. 16. – № 3. – P. e0010289. – DOI: 10.1371/journal.pntd.0010289.
6. Ribavirin for the treatment of Lassa fever: A systematic review and meta-analysis / K. A. Eberhardt, J. Mischlinger, S. Jordan [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2019. – Vol. 87. – P. 15-20. – DOI: 10.1016/j.ijid.2019.07.015.
7. Mayor, J. Antiviral Efficacy of Ribavirin and Favipiravir against Hantaan Virus / J. Mayor, O. Engler, S. Rothenberger // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – № 6. – P. 1306. – DOI: 10.3390/microorganisms9061306.
8. Ribavirin for Treatment of Subjects with Respiratory Syncytial Virus-Related Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis / S. Tejada, R. Martinez-Reviejo, H. N. Karakoc [et al.] // *Advances in Therapy*. – 2022. – Vol. 39. – № 9. – P. 4037-4051. – DOI: 10.1007/s12325-022-02256-5.
9. Fernandez, H. Ribavirin: A clinical overview / H. Fernandez, G. Banks, R. Smith // *European Journal of Epidemiology*. – 1986. – Vol. 2. – № 1. – P. 1-14. – DOI: 10.1007/BF00152711.
10. Ribavirin treatment of acute and chronic hepatitis E: a single-centre experience / S. Pischke, S. Hardtke, U. Bode [et al.] // *Liver International*. – 2013. – Vol. 33. – № 5. – P. 722-726. – DOI: 10.1111/liv.12114.

11. Pharmacokinetics and Safety of Viramidine, a Prodrug of Ribavirin, in Healthy Volunteers / C. Lin, L. Philips, C. Xu [et al.] // *The Journal of Clinical Pharmacology*. – 2004. – Vol. 44. – № 3. – P. 265-275. – DOI: 10.1177/0091270004262974.
12. Safety and Pharmacokinetics of Ribavirin for the Treatment of La Crosse Encephalitis / J. E. McJunkin, M. C. Nahata, E. C. D. L. Reyes [et al.] // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2011. – Vol. 30. – № 10. – P. 860-865. – DOI: 10.1097/INF.0b013e31821c922c.
13. Macromolecular Prodrugs of Ribavirin: Structure–Function Correlation as Inhibitors of Influenza Infectivity / C. F. Riber, T. M. Hinton, P. Gajda [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 14. – № 1. – P. 234-241. – DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00826.
14. Antiviral, immunosuppressive and antitumour effects of Ribavirin / C. W. Potter, J. P. Phair, L. Vodinelich [et al.] // *Nature*. – 1976. – Vol. 259. – № 5543. – P. 496-497. – DOI: 10.1038/259496a0.
15. Ribavirin as a potential therapeutic for atypical teratoid/rhabdoid tumors / J. Casaos, S. Huq, T. Lott [et al.] // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9. – № 8. – P. 8054-8067. – DOI: 10.18632/oncotarget.23883.
16. Chen, J. Clinically relevant concentration of anti-viral drug ribavirin selectively targets pediatric osteosarcoma and increases chemosensitivity / J. Chen, X. Xu, J. Chen // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Vol. 506. – № 3. – P. 604-610. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.10.124.
17. Ribavirin as a tri-targeted antitumor repositioned drug / E. De La Cruz-Hernandez, J. L. Medina-Franco, J. Trujillo [et al.] // *Oncology Reports*. – 2015. – Vol. 33. – № 5. – P. 2384-2392. – DOI: 10.3892/or.2015.3816.
18. Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 4E is effective against chemo-resistance in colon and cervical cancer / C. Xi, L. Wang, J. Yu [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Vol. 503. – № 4. – P. 2286-2292. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.06.150.
19. Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap / A. Kentsis, I. Topisirovic, B. Culjkovic [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101. – № 52. – P. 18105-18110. – DOI: 10.1073/pnas.0406927102.
20. Antiviral Drug Ribavirin Targets Thyroid Cancer Cells by Inhibiting the eIF4E- β -Catenin Axis / X. Shen, Y. Zhu, Z. Xiao [et al.] // *The American Journal of the Medical Sciences*. – 2017. – Vol. 354. – № 2. – P. 182-189. – DOI: 10.1016/j.amjms.2017.03.025.
21. Ribavirin in Modern Antitumor Therapy: Prospects for Intranasal Administration / I. Mikhel, E. Bakhrushina, O. Stepanova [et al.]. – DOI 10.2174/0115672018305548240614113451. – Текст : электронный // *Current Drug Delivery*. – 2025. – Vol. 22, № 5. – P. 510–521. – URL: <https://doi.org/10.2174/0115672018305548240614113451>

22. Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin / S. Assouline, B. Culjkovic, E. Cocolakis [et al.] // *Blood*. – 2009. – Vol. 114. – № 2. – P. 257-60. – DOI: 10.1182/blood-2009-02-205153.
23. Molecular targeting of the UDP-glucuronosyltransferase enzymes in high-eukaryotic translation initiation factor 4E refractory/relapsed acute myeloid leukemia patients: a randomized phase II trial of vismodegib, ribavirin with or without decitabine / S. Assouline, J. Gasiorek, J. Bergeron [et al.] // *Haematologica*. – 2023. – Vol. 108. – № 11. – P. 2946-2958. – DOI: 10.3324/haematol.2023.282791.
24. A phase I trial of ribavirin and low-dose cytarabine for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia with elevated eIF4E / S. Assouline, B. Culjkovic-Kraljacic, J. Bergeron [et al.] // *Haematologica*. – 2015. – Vol. 100. – № 1. – P. e7-e9. – DOI: 10.3324/haematol.2014.111245.
25. Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines / A. Ogino, E. Sano, Y. Ochiai [et al.] // *Oncology Letters*. – 2014. – Vol. 8. – № 6. – P. 2469-2474. – DOI: 10.3892/ol.2014.2569.
26. Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines: Follow-up study / Y. Ochiai, E. Sano, Y. Okamoto [et al.] // *Oncology Reports*. – 2018. – Vol. 39. – № 2. – P. 537-544. – DOI: 10.3892/or.2017.6149.
27. Autophagy suppression sensitizes glioma cells to IMP dehydrogenase inhibition-induced apoptotic death / A. M. Isakovic, M. Dulovic, I. Markovic [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 2017. – Vol. 350. – № 1. – P. 32-40. – DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.11.001.
28. Preclinical efficacy of ribavirin in SHH and group 3 medulloblastoma / S. Huq, N. V. Kannapadi, J. Casaos [et al.] // *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*. – 2021. – Vol. 27. – № 4. – P. 482-488. – DOI: 10.3171/2020.8.PEDS20561.
29. Influence of drug delivery systems on the safety and effectiveness profile of ribavirin / I. B. Mikhel, S. A. Titova, E. O. Bakhrushina [et al.] // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 17. – № 2. – P. 65-77. – DOI: 10.22159/ijap.2025v17i2.52864.
30. The Use of Ribavirin as an Anticancer Therapeutic: Will It Go Viral? / J. Casaos, N. L. Gorelick, S. Huq [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2019. – Vol. 18. – № 7. – P. 1185-1194. – DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0666.
31. Use of an anti-viral drug, Ribavirin, as an anti-glioblastoma therapeutic / F. Volpin, J. Casaos, J. Sesen [et al.] // *Oncogene*. – 2017. – Vol. 36. – № 21. – P. 3037-3047. – DOI: 10.1038/onc.2016.457.
32. Glioblastoma-synthesized G-CSF and GM-CSF contribute to growth and immunosuppression: Potential therapeutic benefit from dapsons, fenofibrate, and ribavirin / R. E. Kast, Q. A. Hill, D. Wion [et al.] // *Tumor Biology*. – 2017. – Vol. 39. – № 5. – P. 101042831769979. – DOI: 10.1177/1010428317699797.

33. Antitumor effects of ribavirin in combination with TMZ and IFN- β in malignant glioma cells / Y. Ochiai, K. Sumi, E. Sano [et al.] // *Oncology Letters*. – 2020. – Vol. 20. – № 5. – P. 178. – DOI: 10.3892/ol.2020.12039.
34. Intranasal delivery of nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles and nanoemulsions: A current overview of in vivo studies / C. P. Costa, J. N. Moreira, J. M. S. Lobo [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2021. – Vol. 11. – № 4. – P. 925-940. – DOI: 10.1016/j.apsb.2021.02.012.
35. Lochhead, J. J. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system / J. J. Lochhead, R. G. Thorne // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2012. – Vol. 64. – № 7. – P. 614-628. – DOI: 10.1016/j.addr.2011.11.002.
36. Geurkink, N. Nasal anatomy, physiology, and function / N. Geurkink // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 1983. – Vol. 72. – № 2. – P. 123-128. – DOI: 10.1016/0091-6749(83)90518-3.
37. Misra, A. Drug Delivery Systems from Nose to Brain / A. Misra, G. Kher // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2012. – Vol. 13. – № 12. – P. 2355-2379. – DOI: 10.2174/138920112803341752.
38. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs / M. Agrawal, S. Saraf, S. Saraf [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2018. – Vol. 281. – P. 139-177. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.05.011.
39. Keller, L.A. Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development / L.A. Keller, O. Merkel, A. Popp // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2022. – Vol. 12. – № 4. – P. 735-757. – DOI: 10.1007/s13346-020-00891-5.
40. Lane, A. P. Nasal anatomy and physiology / A. P. Lane // *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. – 2004. – Vol. 12. – № 4. – P. 387-395. – DOI: 10.1016/j.fsc.2004.04.001.
41. Nasal Valve: anatomy and physiology / C. E. N. Nigro, J. F. D. A. Nigro, O. Mion [et al.] // *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. – 2009. – Vol. 75. – № 2. – P. 305-310. – DOI: 10.1016/S1808-8694(15)30795-3.
42. Иванов, В. А. Анатомия и физиология дыхательной системы : учебно-методическое пособие / В. А. Иванов, В. В. Харченко, О. Д. Щукина. – Курск : Издательство Курского государственного университета, 2016. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – № государственной регистрации 321602773. – Текст : электронный.
43. Koo, J. Recent Advances in Intranasal Administration for Brain-Targeting Delivery: A Comprehensive Review of Lipid-Based Nanoparticles and Stimuli-Responsive Gel Formulations / J. Koo, C. Lim, K. T. Oh // *International Journal of Nanomedicine*. – 2024. – Vol. 19. – P. 1767-1807. – DOI: 10.2147/IJN.S439181.

44. Патент № WO 91/07947 A1, МПК A61K 9/08, A61K 9/72. Neurologic agents for nasal administration to the brain : № PCT/US1990/007099 : заявл. 04.12.1990 : опубл. 13.06.1991 / W. H. Frey III ; заявитель Ramsey Foundation // Google Patents : официальный сайт. – URL: <https://patents.google.com/patent/WO1991007947A1/en> (дата обращения: 21.02.2024). – Текст : электронный.

45. Insulin mediated novel therapies for the treatment of Alzheimer's disease / S. K. Dubey, K. K. Lakshmi, K. V. Krishna [et al.] // Life Sciences. – 2020. – Vol. 249. – P. 117540. – DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117540.

46. Intranasal Insulin Improves Age-Related Cognitive Deficits and Reverses Electrophysiological Correlates of Brain Aging / S. Maimaiti, K. L. Anderson, C. DeMoll [et al.] // The Journals of Gerontology: Series A, Biological Sciences and Medical Sciences. – 2016. – Vol. 71. – № 1. – P. 30-39. – DOI: 10.1093/gerona/glu314.

47. Михел, И. Б. Создание стимулочувствительной системы для доставки рибавирина nose-to-brain / И. Б. Михел, Д. А. Петрусевич, Е. О. Бахрушина. – Текст : непосредственный // Молодая фармация – потенциал будущего : сборник материалов XIV Всероссийской научной конференции с международным участием молодежного научного общества, г. Санкт-Петербург, 28 марта – 2 апреля 2024 г. – Санкт-Петербург, 2024. – С. 889–891.

48. Михел, И. Б. Перспективы применения рибавирина в форме интраназальной стимулочувствительной системы в терапии опухолей головного мозга / И. Б. Михел, Е. О. Бахрушина. – Текст : непосредственный // Фармобразование-2023 : сборник трудов 9-й Международной научно-методической конференции, г. Воронеж, 28–29 сентября 2023 г. – Воронеж, 2023. – С. 85–89.

49. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain / T. P. Crowe, M. H. W. Greenlee, A. G. Kanthasamy [et al.] // Life Sciences. – 2018. – Vol. 195. – P. 44-52. – DOI: 10.1016/j.lfs.2017.12.025.

50. Wu, H. From nose to brain: understanding transport capacity and transport rate of drugs / H. Wu, K. Hu, X. Jiang // Expert Opinion on Drug Delivery. – 2008. – Vol. 5. – № 10. – P. 1159-1168. – DOI: 10.1517/17425247.5.10.1159.

51. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting / F. Erdő, L. A. Bors, D. Farkas [et al.] // Brain Research Bulletin. – 2018. – Vol. 143. – P. 155-170. – DOI: 10.1016/j.brainresbull.2018.10.009.

52. Кунельская, Н. Л. Основные компоненты назального секрета. Мукоактивные средства во врачебной практике / Н. Л. Кунельская, А. В. Артемьева-Карелова // Лечебное дело. – 2013. – Т. 3. – С. 4-7.

53. Интраназальные системы доставки *in situ*: перспективы применения и основные фармацевтические аспекты разработки (обзор) / Е. О. Бахрушина, Н. Б. Демина, М. М. Шумкова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10. – № 4. – С. 54-63. – DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63.

54. Интраназальное введение как способ доставки лекарств в головной мозг (обзор) / Н. Н. Порфирьева, И. И. Семина, Р. И. Мустафин, В. В. Хуторянский // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10. – № 4. – С. 117-127. – DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-117-127.

55. Singh, R. M. Mucoadhesive *in situ* nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery / R. M. Singh, A. Kumar, K. Pathak // Expert Opinion on Drug Delivery. – 2013. – Vol. 10. – № 1. – P. 115-130. – DOI: 10.1517/17425247.2013.746659.

56. Stimuli-responsive *In situ* gelling system for nose-to-brain drug delivery / M. Agrawal, S. Saraf, S. Saraf [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2020. – Vol. 327. – P. 235-265. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.044.

57. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa / P. G. Gervasi, V. Longo, F. Naldi [et al.] // Biochemical Pharmacology. – 1991. – Vol. 41. – № 2. – P. 177-184. – DOI: 10.1016/0006-2952(91)90474-J.

58. Polysaccharides: New Frontiers for Nasal Administration of Medicines / A. Clementino, G. Climani, A. Bianchera [et al.] // Polysaccharides. – 2025. – Vol. 6. – № 1. – P. 6. – DOI: 10.3390/polysaccharides6010006.

59. Демина, Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы / Н. Б. Демина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – Т. 2. – С. 56-60.

60. Залепугин, Д. Ю. Использование сверхкритических флюидов для получения нано- и микроформ фармацевтических субстанций / Д. Ю. Залепугин, Н. А. Тилькунова, И. В. Чернышова // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2008. – Т. 3. – № 1. – С. 5-23.

61. КФ-микронизация фармацевтической субстанции рисперидон / В. Н. Баграташвили, А. М. Егоров, Л. И. Кротова [и др.] // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2011. – Т. 6. – № 4. – С. 88-101.

62. Sekhon, B. S. Pharmaceutical co-crystals – a review / B. S. Sekhon // Der Pharmacia Sinica. – 2013. – Vol. 50. – № 2. – P. 99-117.

63. Crystal Morphology Engineering of Pharmaceutical Solids: Tableting Performance Enhancement / S. Mirza, I. Miroshnyk, J. Heinämäki [et al.] // AAPS PharmSciTech. – 2009. – Vol. 10. – № 1. – P. 113-119. – DOI: 10.1208/s12249-009-9187-4.

64. In situ гели как современный способ интраназальной доставки вакцин / Е. О. Бахрушина, И. Б. Михел, В. М. Кондратьева [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2022. – Т. 67. – № 5. – С. 395-402. – DOI: 10.36233/0507-4088-139.
65. Main Aspects of Pharmaceutical Development of In situ Immunobiological Drugs for Intranasal Administration / E. Bakhrushina, I. Mikhel, V. Kondratieva [et al.] // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2024. – Vol. 25. – № 11. – P. 1394-1405. – DOI: 10.2174/0113892010260017231002075152.
66. De, B. J. D. Unique purified hydrated-gelatin diet for feeding dietary fiber to Wistar rats / B. J. D. De, J. C. Street // Laboratory Animal Science. – 1984. – Vol. 34. – № 1. – P. 44-48.
67. Development of an Intranasal In Situ System for Ribavirin Delivery: In Vitro and In Vivo Evaluation / I. B. Mikhel, E. O. Bakhrushina, D. A. Petrusevich [et al.] // Pharmaceutics. – 2024. – Vol. 16. – № 9. – P. 1125. – DOI: 10.3390/pharmaceutics16091125.
68. Sonawane, S. A comprehensive review on natural polysaccharides based in situ gels for nasal drug delivery / S. Sonawane, H. Shelke, S. Bonde // International Journal of Biological Macromolecules. – 2025. – Vol. 320. – P. 145987. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.145987.
69. Research progress of in-situ gelling ophthalmic drug delivery system / Y. Wu, Y. Liu, X. Li [et al.] // Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2019. – Vol. 14. – № 1. – P. 1-15. – DOI: 10.1016/j.ajps.2018.04.008.
70. Enzyme-Triggered Intestine-Specific Targeting Adhesive Platform for Universal Oral Drug Delivery / Y. Li, J. S. Lee, A. R. Kirtane [et al.] // Advanced Healthcare Materials. – 2023. – Vol. 12. – № 27. – DOI: 10.1002/adhm.202301033.
71. Burst Release from In Situ Forming PLGA-Based Implants: 12 Effectors and Ways of Correction / E. O. Bakhrushina, P. S. Sakharova, P. D. Konogorova [et al.] // Pharmaceutics. – 2024. – Vol. 16. – № 1. – P. 115. – DOI: 10.3390/pharmaceutics16010115.
72. Bedford, J. G. Intranasal Delivery of a Chitosan-Hydrogel Vaccine Generates Nasal Tissue Resident Memory CD8⁺ T Cells That Are Protective against Influenza Virus Infection / J. G. Bedford, I. Caminschi, L. M. Wakim // Vaccines. – 2020. – Vol. 8. – № 4. – P. 572. – DOI: 10.3390/vaccines8040572.
73. Ozbilgin, N. D. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of mucosal adjuvant in situ forming gels with diphtheria toxoid / N. D. Ozbilgin, O. M. Saka, A. Bozkir // Drug Delivery. – 2014. – Vol. 21. – № 2. – P. 140-147. – DOI: 10.3109/10717544.2013.834754.
74. Statistical Design of Experiment (DoE) based development and optimization of DB213 in situ thermosensitive gel for intranasal delivery / Q. Wang, C.-H. Wong, H. Y. E. Chan [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2018. – Vol. 539. – № 1-2. – P. 50-57. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.01.032.

75. Poloxamer-chitosan-based Naringenin nanoformulation used in brain targeting for the treatment of cerebral ischemia / N. Ahmad, R. Ahmad, F. J. Ahmad [et al.] // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2020. – Vol. 27. – № 1. – P. 500-517. – DOI: 10.1016/j.sjbs.2019.11.008.
76. Immune response induced by conjunctival immunization with polymeric antigen BLSOmp31 using a thermoresponsive and mucoadhesive in situ gel as vaccine delivery system for prevention of ovine brucellosis / A. G. Díaz, D. A. Quinteros, S. E. Gutiérrez [et al.] // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2016. – Vol. 178. – P. 50-56. – DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.07.004.
77. In situ mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin / P. Mura, N. Mennini, C. Nativi [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2018. – Vol. 122. – P. 54-61. – DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.10.008.
78. Carboxymethyl chitosan in advanced drug-delivery applications / S. S. Das, S. Kar, S. K. Singh [et al.] // *Chitosan in Drug Delivery*. – 2022. – P. 323-360. – DOI: 10.1016/B978-0-12-819336-5.00006-6.
79. Антибактериальные и антитоксические свойства хитозана и его производных / Л. А. Иванушко, Т. Ф. Соловьева, Т. С. Запорожец [и др.] // *Тихоокеанский медицинский журнал*. – 2009. – Т. 3. – № 37. – С. 82-85.
80. Stimuli sensitive ocular drug delivery systems / F. J. Otero-Espinar, A. Fernández-Ferreiro, M. González-Barcia [et al.] // *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*. – 2018. – P. 211-270. – DOI: 10.1016/B978-0-12-813689-8.00006-9.
81. Synthesis and characterization of Poloxamer 188-grafted heparin copolymer / J.-L. Tian, Y.-Z. Zhao, Z. Jin [et al.] // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2010. – Vol. 36. – № 7. – P. 832-838. – DOI: 10.3109/03639040903520983.
82. Zylke, J. Poloxamer 188 for Sickle Cell Disease / J. Zylke // *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. – 2021. – Vol. 325. – № 15. – P. 1524. – DOI: 10.1001/jama.2021.3399.
83. Emanuele, M. Differential Effects of Commercial-Grade and Purified Poloxamer 188 on Renal Function / M. Emanuele, B. Balasubramaniam // *Drugs in Research and Development*. – 2014. – Vol. 14. – № 2. – P. 73-83. – DOI: 10.1007/s40268-014-0041-0.
84. Physicochemical characterization and in vivo evaluation of poloxamer-based solid suppository containing diclofenac sodium in rats / C. S. Yong, Y.-K. Oh, Y.-I. Kim [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2005. – Vol. 301. – № 1-2. – P. 54-61. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.05.037.
85. A UHPLC-Q-TOF/MS method for the determination of poloxamer 124 and its application in a tissue distribution study in rats / Y. Li, Y. Cui, L. Li [et al.] // *Analytical Methods*. – 2021. – Vol. 13. – № 45. – P. 5516-5522. – DOI: 10.1039/D1AY01373D.
86. Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry method for quantifying polymer poloxamer 124 and its application to pharmacokinetic

study / Y. Li, Y. Cui, L. Li [et al.] // Journal of Separation Science. – 2021. – Vol. 44. – № 20. – P. 3822-3829. – DOI: 10.1002/jssc.202100552.

87. Biopharmaceutical study of binary poloxamer systems as in situ drug delivery systems poloxamer polycomplexes: The study / E. O. Bakhrushina, E. V. Novozhilova, A. S. Kashperko [et al.] // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14. – № 3. – P. 162-165.

88. Formulation, optimization and evaluation of rasagiline mesylate in situ nasal gel / M. Kola, G. K. Puri, M. T. Unnisa [et al.] // Indo American Journal of Pharmaceutical Research. – 2018. – Vol. 8. – № 09. – P. 1645-1654.

89. In situ gelling nasal inserts for influenza vaccine delivery / U. Bertram, M.-C. Bernard, J. Haensler [et al.] // Drug Development and Industrial Pharmacy. – 2010. – Vol. 36. – № 5. – P. 581-593. – DOI: 10.3109/03639040903382673.

90. Thakkar, J. Formulation development and characterization of in-situ gel of Rizatriptan Benzoate for intranasal delivery / J. Thakkar, S. Prajapati // Journal of Drug Delivery and Therapeutics. – 2021. – Vol. 11. – P. 1-6. – DOI: 10.22270/jddt.v11i1-s.4685.

91. Bertram, U. In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: In vitro characterization of a new nasal dosage form / U. Bertram, R. Bodmeier // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2006. – Vol. 27. – № 1. – P. 62-71. – DOI: 10.1016/j.ejps.2005.08.005.

92. In situ gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate / S.-L. Cao, X.-W. Ren, Q.-Z. Zhang [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2009. – Vol. 365. – № 1-2. – P. 109-115. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.08.042.

93. Биофармацевтические аспекты дизайна интраназальных лекарственных форм / Н. Б. Демина, Е. О. Бахрушина, А. И. Бардаков, И. И. Краснюк // Фармация. – 2019. – Т. 68. – № 3. – С. 12-17. – DOI: 10.29296/25419218-2019-03-02.

94. Natural Origin Materials for Bone Tissue Engineering / F. R. Maia, V. M. Correlo, J. M. Oliveira [et al.] // Principles of Regenerative Medicine. – 2019. – P. 535-558. – DOI: 10.1016/B978-0-12-809880-6.00032-1.

95. Giavasis, I. Gellan Gum / I. Giavasis, L. M. Harvey, B. McNeil // Critical Reviews in Biotechnology. – 2000. – Vol. 20. – P. 177-211.

96. Mandal, S. Guar gum, a low-cost sustainable biopolymer, for wastewater treatment: A review / S. Mandal, S. Hwang, S. Q. Shi // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – Vol. 226. – P. 368-382. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.12.039.

97. Xanthan gum in drug release / H. Cortes, I. H. Caballero-Florán, N. Mendoza-Muñoz [et al.] // Cellular and Molecular Biology. – 2020. – Vol. 66. – № 4. – P. 199-207.

98. Intranasal delivery of a bivalent norovirus vaccine formulated in an in situ gelling dry powder / J. P. Ball, M. J. Springer, Y. Ni [et al.] // PLOS ONE. – 2017. – Vol. 12. – № 5. – P. e0177310. – DOI: 10.1371/journal.pone.0177310.
99. Intranasal delivery of Norwalk virus-like particles formulated in an in situ gelling, dry powder vaccine / L. S. Velasquez, S. Shira, A. N. Berta [et al.] // Vaccine. – 2011. – Vol. 29. – № 32. – P. 5221-5231. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.027.
100. Lipid/alginate nanoparticle-loaded in situ gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery / B. J. Dukovski, I. Plantić, I. Čunčić [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2017. – Vol. 533. – № 2. – P. 480-487. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.065.
101. Giri, T. K. Nanoarchitected Polysaccharide-Based Drug Carrier for Ocular Therapeutics / T. K. Giri // Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting. – 2016. – P. 119-141. – DOI: 10.1016/B978-0-323-47347-7.00005-7.
102. Икласова, А. Ш. Пектин: состав, технология получения, применение в пищевой и фармацевтической промышленности / А. Ш. Икласова, З. Б. Сакипова, Э. Н. Бекболатова // Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2018. – Т. 3. – № 3. – С. 243-246.
103. Formulation and evaluation of ion-sensitive in-situ nasal gel of Zolmitriptan / P. R. Patil, V. K. Salve, R. U. Thorat [et al.] // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2015. – Vol. 7. – P. 478-486.
104. Oral controlled and sustained drug delivery systems / G. Kaur, J. Grewal, K. Jyoti [et al.] // Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems. – 2018. – P. 567-626. – DOI: 10.1016/B978-0-12-813689-8.00015-X.
105. Preparation of huperzine A nasal in situ gel and evaluation of its brain targeting following intranasal administration / T. Tao, Y. Zhao, P. Yue [et al.] // Acta Pharmaceutica Sinica. – 2006. – Vol. 41. – P. 1104-1110.
106. Friedli, M. J. Huperzine A and Its Neuroprotective Molecular Signaling in Alzheimer's Disease / M. J. Friedli, N. C. Inestrosa // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – № 21. – P. 6531. – DOI: 10.3390/molecules26216531.
107. A mucoadhesive, thermoreversible in situ nasal gel of geniposide for neurodegenerative diseases / Y. Wang, S. Jiang, H. Wang [et al.] // PLOS ONE. – 2017. – Vol. 12. – № 12. – P. e0189478. – DOI: 10.1371/journal.pone.0189478.
108. Sherje, A. P. Development and Evaluation of pH-Responsive Cyclodextrin-Based in situ Gel of Paliperidone for Intranasal Delivery / A. P. Sherje, V. Londhe // AAPS PharmSciTech. – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 384-394. – DOI: 10.1208/s12249-017-0844-8.

109. Comparative study of oral and intranasal puerarin for prevention of brain injury induced by acute high-altitude hypoxia / J. Ma, C. Wang, Y. Sun [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 591. – P. 120002. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120002.
110. Intranasal temperature-sensitive hydrogels of cannabidiol inclusion complex for the treatment of post-traumatic stress disorder / L. Pang, S. Zhu, J. Ma [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2021. – Vol. 11. – № 7. – P. 2031-2047. – DOI: 10.1016/j.apsb.2021.01.014.
111. Intranasal tetrandrine temperature-sensitive in situ hydrogels for the treatment of microwave-induced brain injury / L. Zhang, L. Pang, S. Zhu [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 583. – P. 119384. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119384.
112. Nose-to-Brain Delivery of Therapeutic Peptides as Nasal Aerosols / W. Alabsi, B. B. Eedara, D. Encinas-Basurto [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 9. – P. 1870. – DOI: 10.3390/pharmaceutics14091870.
113. A Nanoemulgel for Nose-to-Brain delivery of Quetiapine – QbD-Enabled formulation development & in-vitro characterization / Z. Wang, G. Xiong, W. C. Tsang [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 370. – № 3. – P. 593-601. – DOI: 10.1124/jpet.119.258152.
114. Optimization of Bromocriptine-Mesylate-Loaded Polycaprolactone Nanoparticles Coated with Chitosan for Nose-to-Brain Delivery: In Vitro and In Vivo Studies / M. M. Badran, A. E. Alanazi, M. A. Ibrahim [et al.] // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – № 19. – P. 3890. – DOI: 10.3390/polym15193890.
115. Brain distribution of ribavirin after intranasal administration / G. Colombo, L. Lorenzini, E. Zironi [et al.] // *Antiviral Research*. – 2011. – Vol. 92. – № 3. – P. 408-14. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.09.012.
116. In vivo nose-to-brain delivery of the hydrophilic antiviral ribavirin by microparticle agglomerates / A. Giuliani, A. G. Balducci, E. Zironi [et al.] // *Drug Delivery*. – 2018. – Vol. 25. – № 1. – P. 376-387. – DOI: 10.1080/10717544.2018.1428242.
117. Evaluation of Ribavirin-Poloxamer Microparticles for Improved Intranasal Absorption / D. M. Vasa, Z. Bakri, M. D. Donovan [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 8. – P. 1126. – DOI: 10.3390/pharmaceutics13081126.
118. Nose-to-Brain Delivery / Z. Wang, G. Xiong, W. C. Tsang [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2019. – Vol. 370. – № 3. – P. 593-601. – DOI: 10.1124/jpet.119.258152.
119. Intranasal Insulin Therapy for Alzheimer Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment / S. Craft, L. D. Baker, T. J. Montine [et al.] // *Archives of Neurology*. – 2012. – Vol. 69. – № 1. – P. 29. – DOI: 10.1001/archneurol.2011.233.

120. Delivery of interferon- β to the monkey nervous system following intranasal administration / R. G. Thorne, L. R. Hanson, T. M. Ross [et al.] // *Neuroscience*. – 2008. – Vol. 152. – № 3. – P. 785-797. – DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.01.013.
121. Nanoparticulate peptide delivery exclusively to the brain produces tolerance free analgesia / L. Godfrey, A. Iannitelli, N. L. Garrett [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2018. – Vol. 270. – P. 135-144. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.11.041.
122. ОФС.1.4.1.0002.15. Аэрозоли и спреи // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание : [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 02.11.2024).
123. Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery / C. R. Behl, H. K. Pimplaskar, A. P. Sileno [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1998. – Vol. 29. – № 1-2. – P. 89-116. – DOI: 10.1016/S0169-409X(97)00063-X.
124. Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers / N. Washington, R. J. C. Steele, S. J. Jackson [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2000. – Vol. 198. – № 2. – P. 139-146. – DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00442-1.
125. Scherließ, R. Nasal formulations for drug administration and characterization of nasal preparations in drug delivery / R. Scherließ // *Therapeutic Delivery*. – 2020. – Vol. 11. – № 3. – P. 183-191. – DOI: 10.4155/tde-2019-0086.
126. Intranasal in situ gelling liquid crystal for delivery of resveratrol ameliorates memory and neuroinflammation in Alzheimer's disease / B. Fonseca-Santos, C. A. Cazarin, P. B. da Silva [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2023. – Vol. 51. – P. 102689. – DOI: 10.1016/j.nano.2023.102689.
127. Ion-Triggered In Situ Gelling Intranasal Spray of Dronedaronе Hydrochloride Nanocarriers: In Vitro Optimization and In Vivo Pharmacokinetic Appraisal / M. H. Teaima, D. A. Helal, J. M. Alsofany [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 11. – P. 2405. – DOI: 10.3390/pharmaceutics14112405.
128. Intranasal delivery of berberine via in situ thermoresponsive hydrogels with non-invasive therapy exhibits better antidepressant-like effects / Q.-S. Wang, K. Li, L.-N. Gao [et al.] // *Biomaterials Science*. – 2020. – Vol. 8. – № 10. – P. 2853-2865. – DOI: 10.1039/C9BM02006C.
129. Разработка in situ интраназальной системы на основе формиата хитозана / Е. О. Бахрушина, И. Б. Михел, В. С. Пыжов [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2022. – Т. 174. – № 9. – С. 324-328. – DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-9-324-328.
130. Intranasal Administration of Dolutegravir-Loaded Nanoemulsion-Based In Situ Gel for Enhanced Bioavailability and Direct Brain Targeting / A. B. Nair, S. Chaudhary, S. Jacob [et al.] // *Gels*. – 2023. – Vol. 9. – № 2. – P. 130. – DOI: 10.3390/gels9020130.

131. Betaxolol-loaded niosomes integrated within pH-sensitive in situ forming gel for management of glaucoma / A. Allam, M. Elsabahy, M. El Badry [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 598. – P. 120380. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120380.

132. Altuntaş, E. Formulation and Evaluation of Thermoreversible In Situ Nasal Gels Containing Mometasone Furoate for Allergic Rhinitis / E. Altuntaş, G. Yener // *AAPS PharmSciTech*. – 2017. – Vol. 18. – № 7. – P. 2673-2682. – DOI: 10.1208/s12249-017-0747-8.

133. Mucoadhesive, Thermoreversible Hydrogel, Containing Tetracaine-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical, Intranasal Needle-Free Anesthesia / G. M. F. Calixto, B. V. Muniz, S. R. Castro [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 11. – P. 1760. – DOI: 10.3390/pharmaceutics13111760.

134. Chitosan/guar gum-based thermoreversible hydrogels loaded with pullulan nanoparticles for enhanced nose-to-brain drug delivery / M. ur R. Kashif, M. Sohail, S. A. Khan [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – Vol. 215. – P. 579-595. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.161.

135. Investigation of Rheological Characteristics of Thermosensitive Nasal In Situ Gels Based on P407 and Their Effect on Spray Pattern / N. Menshutina, V. Derkach, E. Mokhova [et al.] // *Gels*. – 2025. – Vol. 11. – № 10. – P. 841. – DOI: 10.3390/gels11100841.

136. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solutions for controlled drug delivery / J. C. Gilbert, J. L. Richardson, M. C. Davies [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 1987. – Vol. 5. – P. 113-118.

137. ГОСТ 33768-2015. Метод определения кинематической вязкости и расчет динамической вязкости прозрачных и непрозрачных жидкостей : межгосударственный стандарт. – Москва : Стандартинформ, 2019.

138. In situ-gelling starch nanoparticle (SNP)/O-carboxymethyl chitosan (CMCh) nanoparticle network hydrogels for the intranasal delivery of an antipsychotic peptide / M. J. Majcher, A. Babar, A. Lofts [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2021. – Vol. 330. – P. 738-752. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.12.050.

139. Абуэльэз, С. М. Вопросы создания биорелевантной in vitro модели носовой полости / С. М. Абуэльэз, И. Б. Михел. – Текст : непосредственный // *Инновационные лекарственные средства: от молекулы до пациента : сборник материалов I Международной конференции*, г. Москва, 19–21 ноября 2024 г. – Москва, 2024.

140. Impact of Pre-Actuation Shaking on the Aerosolization Performance of Easyhaler® Salbutamol Dry Powder Inhaler / L. Esposito, P. He, C. Y. J. Wong [et al.] // *Pharmaceutical Research*. – 2025. – Vol. 42. – № 11. – P. 2145-2155. – DOI: 10.1007/s11095-025-03952-x.

141. 3D printing technologies in the development of a biorelevant in vitro model of the nasal cavity: new step of intranasal drugs quality assessment / E. Bakhrushina, I. Mikhel, S. Abuelez [et al.]. – DOI 10.22159/ijap.2025v17i4.54101. – Текст : электронный // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2025. – Vol. 17, № 4. – P. 66–76. – URL: <https://doi.org/10.22159/ijap.2025v17i4.54101>

142. Разработка и апробация in vitro модели носовой полости для стандартизации систем доставки in situ / Е. О. Бахрушина, Д. С. Шуликина, И. Б. Михел [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2023. – № 4. – С. 83–91.

143. Shang, Y. Development of a computational fluid dynamics model for mucociliary clearance in the nasal cavity / Y. Shang, K. Inthavong, J. Tu // Journal of Biomechanics. – 2019. – Vol. 85. – P. 74-83. – DOI: 10.1016/j.jbiomech.2019.01.015.

144. Михел, И. Б. Использование методов 3D-моделирования для создания in vitro модели носовой полости / И. Б. Михел, С. М. Абуэльэз, Е. О. Бахрушина. – Текст : непосредственный // Сандеровские чтения : научно-методическая конференция с международным участием, г. Санкт-Петербург, 7 февраля 2025 г. – Санкт-Петербург, 2025. – С. 337–339.

145. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres / L. Nižić, J. Potaś, K. Winnicka [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2020. – Vol. 141. – P. 105115. – DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105115.

146. Validation of Anatomical Models to Study Aerosol Deposition in Human Nasal Cavities / S. Le Guellec, D. Le Pennec, S. Gatier [et al.] // Pharmaceutical Research. – 2014. – Vol. 31. – № 1. – P. 228-237. – DOI: 10.1007/s11095-013-1157-6.

147. Inoue, D. Development of In Vitro Evaluation System for Assessing Drug Dissolution Considering Physiological Environment in Nasal Cavity / D. Inoue, A. Yamashita, H. To // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14. – № 11. – P. 2350. – DOI: 10.3390/pharmaceutics14112350.

148. 3D-printed Franz type diffusion cells / B. C. Sil, M. P. Alvarez, Y. Zhang [et al.] // International Journal of Cosmetic Science. – 2018. – Vol. 40. – № 6. – P. 604-609. – DOI: 10.1111/ics.12504.

149. Rauma, M. Comparison of the thermogravimetric analysis (TGA) and Franz cell methods to assess dermal diffusion of volatile chemicals / M. Rauma, G. Johanson // Toxicology in Vitro. – 2009. – Vol. 23. – № 5. – P. 919-926. – DOI: 10.1016/j.tiv.2009.04.003.

150. Сушинская, О. А. Методы исследования высвобождения лекарственных веществ из наружных лекарственных форм / О. А. Сушинская, Н. С. Голяк, В. М. Царенков // Вестник фармации. – 2019. – Т. 4. – № 86.

151. Development and characterization of in situ gel system for nasal insulin delivery / A. K. Agrawal, P. N. Gupta, A. Khanna [et al.] // *Die Pharmazie*. – 2010. – Vol. 65. – № 3. – P. 188-93.

152. Star-shaped poly(oligoethylene glycol) copolymer-based gels: Thermo-responsive behaviour and bioapplicability for risedronate intranasal delivery / M. E. Soliman, E. Elmowafy, L. Casettari [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 543. – № 1-2. – P. 224-233. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.03.053.

153. Intranasal delivery of ciprofloxacin to rats: A topical approach using a thermoreversible in situ gel / J. Sousa, G. Alves, P. Oliveira [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Vol. 97. – P. 30-37. – DOI: 10.1016/j.ejps.2016.10.033.

154. Ion-triggered in situ gelling nanoemulgel as a platform for nose-to-brain delivery of small lipophilic molecules / S. Nagaraja, G. M. Basavarajappa, R. K. Karnati [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 8. – P. 1216. – DOI: 10.3390/pharmaceutics13081216.

155. Elshafeey, A. H. Intranasal Microemulsion of Sildenafil Citrate: In Vitro Evaluation and In Vivo Pharmacokinetic Study in Rabbits / A. H. Elshafeey, E. R. Bendas, O. H. Mohamed // *AAPS PharmSciTech*. – 2009. – Vol. 10. – № 2. – P. 361-367. – DOI: 10.1208/s12249-009-9213-6.

156. Intranasal In Situ Gel of Apixaban-Loaded Nanoethosomes: Preparation, Optimization, and In Vivo Evaluation / A. A. El-Shenawy, R. A. Mahmoud, E. A. Mahmoud [et al.] // *AAPS PharmSciTech*. – 2021. – Vol. 22. – № 4. – P. 147. – DOI: 10.1208/s12249-021-02020-y.

157. Михел, И. Б. Изучение цилиотоксичности интраназальной in situ системы доставки nose-to-brain / И. Б. Михел, М. Д. Цицуашвили, Е. О. Бахрушина. – Текст : непосредственный // VIII съезд физиологов СНГ, XV съезд аллергологов и иммунологов СНГ, симпозиум «Белки и пептиды» : объединенный научный форум : сборник тезисов докладов, г. Сочи, 23–28 апреля 2025 г. – Сочи, 2025. – С. 58–59.

158. Анализ цилиотоксического воздействия интраназальной in situ системы доставки рибавирина: in vitro и in vivo оценка / И. Б. Михел, Е. О. Бахрушина, Д. Н. Тихонов [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2025. – Т. 180. – № 9. – С. 303-307. – DOI: 10.47056/0365-9615-2025-180-9-303-307.

159. ГОСТ 450-77. Кальций хлористый технический. Технические условия : межгосударственный стандарт : дата введения 1979-01-01 // Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии : офиц. сайт. – URL: <https://protect.gost.ru> (дата обращения: 02.11.2024).

160. ГОСТ 4234-77. Реактивы. Калий хлористый. Технические условия : межгосударственный стандарт : дата введения 1979-01-01 // Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии : офиц. сайт. – URL: <https://protect.gost.ru> (дата обращения: 02.11.2024).

161. ГОСТ 2493-75. Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия : межгосударственный стандарт : дата введения 1976-07-01 // Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии : офиц. сайт. – URL: <https://protect.gost.ru> (дата обращения: 02.11.2024).

162. Реологические методы в изучении стимулочувствительности ионселективных интраназальных систем / Е. О. Бахрушина, И. Б. Михел, А. А. Володина [и др.]. – DOI 10.29296/25419218-2026-02-05. – Текст : электронный // Фармация. – 2026. – Т. 75, № 2. – С. 31–37. – URL: <https://doi.org/10.29296/25419218-2026-02-05>

163. ОФС.1.2.1.0004. Ионметрия // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание : [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 02.11.2024).

164. ФС.2.1.0031. Рибавирин // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание : [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 02.11.2024).

165. ОФС.1.2.4.0002. Микробиологическая чистота // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание : [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 02.11.2024).

166. Rethinking Pharmaceutical Industry with Quality by Design: Application in Research, Development, Manufacturing, and Quality Assurance / J. G. Duarte, M. G. Duarte, A. P. Piedade [et al.] // AAPS Journal. – 2025. – Vol. 27. – № 4. – P. 96. – DOI: 10.1208/s12248-025-01079-w.

167. Chhajer, H. Rationalised experiment design for parameter estimation with sensitivity clustering / H. Chhajer, R. Roy // Scientific Reports. – 2024. – Vol. 14. – № 1. – P. 25864. – DOI: 10.1038/s41598-024-75539-2.

168. Quality by Design approach for an in situ gelling microemulsion of Lorazepam via intranasal route / V. Shah, M. Sharma, R. Pandya [et al.] // Materials Science and Engineering: C. – 2017. – Vol. 75. – P. 1231-1241. – DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.002.

169. Михел, И. Б. Применение подхода quality by design в разработке стимулочувствительной матрицы для доставки рибавирина nose-to-brain / И. Б. Михел, Е. О. Бахрушина. – Текст : непосредственный // Современные проблемы фармации : сборник научных трудов III Научно-практической онлайн-конференции. – [б. м. : б. и., б. г.].

170. DoE based development and optimization of ion sensitive in situ nanoemulgel containing bimatoprost for sustained ocular delivery / M. Singh, M. Devi, R. P. Singh [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2025. – Vol. 329. – P. 147768. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.147768.

171. A roadmap for model-based bioprocess development / K. Mu'azzam, F. V. S. da Silva, J. Murtagh [et al.] // *Biotechnology Advances*. – 2024. – Vol. 73. – P. 108378. – DOI: 10.1016/j.biotechadv.2024.108378.
172. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Ribavirin / N. Goodarzi, A. B. Morgani, B. Abrahamsson [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2016. – Vol. 105. – № 4. – P. 1362-9. – DOI: 10.1016/j.xphs.2016.01.017.
173. Quadir, M. Toxicological Implications of Nasal Formulations / M. Quadir, H. Zia, T. E. Needham // *Drug Delivery*. – 1999. – Vol. 6. – № 4. – P. 227-242. – DOI: 10.1080/107175499266823.
174. The effect of nasal drug formulations on ciliary beating in vitro / S. G. Romeijn, J. C. Verhoef, E. Martin [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1996. – Vol. 135. – № 1. – P. 137-145. – DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(96\)04460-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(96)04460-2).
175. Изучение вопросов поддержания стабильности термочувствительных систем на основе полоксамеров при автоклавировании / Е. О. Бахрушина, А. М. Афонина, В. С. Пыжов, И. Б. Михел // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2025. – Т. 14. – № 4. – С. 60-67. – DOI: 10.33380/2305-2066-2025-14-4-2077.
176. Thermosensitive Intravitreal In Situ Implant of Cefuroxime Based on Poloxamer 407 and Hyaluronic Acid / E. Bakhrushina, A. Dubova, M. Nikonenko [et al.] // *Gels*. – 2023. – Vol. 9. – P. 693. – DOI: 10.3390/gels9090693.
177. In vitro and in vivo evaluation of an in situ forming gel system for sustained delivery of Florfenicol / Z. -. Yu, Z. -. Geng, T. -. Liu [et al.] // *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. – 2015. – Vol. 38. – № 3. – P. 271-277. – DOI: 10.1111/jvp.12171.
178. In vitro evaluation of poloxamer in situ forming gels for bedaquiline fumarate salt and pharmacokinetics following intramuscular injection in rats / S. Van Hemelryck, J. Dewulf, H. Niekus [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*: X. – 2019. – Vol. 1. – P. 100016. – DOI: 10.1016/j.ijpx.2019.100016.
179. Anderson, B. C. Understanding drug release from poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) gels / B. C. Anderson, N. K. Pandit, S. K. Mallapragada // *Journal of Controlled Release*. – 2001. – Vol. 70. – № 1-2. – P. 157-167. – DOI: 10.1016/S0168-3659(00)00341-2.
180. Patil, M. R. Formulation, Optimization and Evaluation of Solid SMEDDS of Itraconazole in Effervescent Granules Form / M. R. Patil, S. K. Kshirsagar // *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*. – 2024. – Vol. 15. – № 01. – P. 273-287. – DOI: 10.25258/ijpqa.15.1.42.
181. Nasotransmucosal Delivery of Curcumin-Loaded Mucoadhesive Microemulsions for Treating Inflammation-Related CNS Disorders / M. S. Patel, S. D. Mandal, S. Mandal [et al.] // *Turkish*

Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2022. – Vol. 19. – № 5. – P. 560-571. – DOI: 10.4274/tjps.galenos.2021.45945.

182. Paroxetine Loaded Nanostructured Lipid Carriers Based In-situ Gel for Brain Delivery via Nasal Route for Enhanced Anti-Depressant Effect: In Vitro Prospect and In Vivo Efficacy / K. Akbar, M. Ur Rehman, F. A. Shah [et al.] // AAPS PharmSciTech. – 2024. – Vol. 25. – № 8. – P. 248. – DOI: 10.1208/s12249-024-02954-z.

183. Integration of PEG 400 into a self-nanoemulsifying drug delivery system improves drug loading capacity and nasal mucosa permeability and prolongs the survival of rats with malignant brain tumors / Y.-S. Chen, Y.-H. Chiu, Y.-S. Li [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2019. – Vol. 14. – P. 3601-3613. – DOI: 10.2147/IJN.S193617.

184. Development and in vivo evaluation of intranasal formulations of parathyroid hormone (1-34) / D. Wang, Y. Du, W. Zhang [et al.] // Drug Delivery. – 2021. – Vol. 28. – № 1. – P. 487-498. – DOI: 10.1080/10717544.2021.1889718.

185. Preparation of a ternary amorphous solid dispersion using hot-melt extrusion for obtaining a stable colloidal dispersion of amorphous probucol nanoparticles / N. Hanada, K. Higashi, Z. Zhao [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 640. – P. 122959. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.122959.

186. Mechanisms and solutions for nasal drug delivery – a narrative review / S. Ulusoy, N. B. Muluk, S. Karpischenko [et al.] // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2022. – Vol. 26. – № 2 Suppl. – P. 72-81. – DOI: 10.26355/eurev_202212_30487.

187. Characterization of Solutol® HS15 and Labrasol® mixed micellar system: Insights into their combined effects on ophthalmic drug delivery systems / G. Dalsaniya, S. Kumar, V. K. Aswal [et al.] // Journal of Molecular Liquids. – 2026. – Vol. 444. – P. 129229. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.129229>.

188. Bernstein, I. L. Is the use of benzalkonium chloride as a preservative for nasal formulations a safety concern? A cautionary note based on compromised mucociliary transport / I. L. Bernstein // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2000. – Vol. 105. – № 1, Part 1. – P. 39-44. – DOI: [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(00\)90175-1](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(00)90175-1).

189. ICH M10. Bioanalytical method validation : scientific guideline // European Medicines Agency: official website. – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline> (дата обращения: 22.05.2025). – Текст : электронный.

190. Евразийская экономическая комиссия. Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата : решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. № 151 // Правовой портал

Евразийского экономического союза : офиц. сайт. – URL: <https://docs.eaeunion.org/documents/253/3870/> (дата обращения: 02.11.2024).

191. Евразийская экономическая комиссия. О Руководстве по качеству лекарственных препаратов для ингаляций и назальных лекарственных препаратов : рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. № 17 // Правовой портал Евразийского экономического союза : офиц. сайт. – URL: <https://docs.eaeunion.org/documents/323/3877/> (дата обращения: 02.11.2024).

192. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание : утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20 июля 2023 г. № 377 : [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 02.11.2024).

193. Евразийская экономическая комиссия. Об утверждении Фармакопеи Евразийского экономического союза : решение Совета Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100 // Правовой портал Евразийского экономического союза : офиц. сайт. – URL: <https://docs.eaeunion.org> (дата обращения: 02.11.2024).

194. Евразийская экономическая комиссия. Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций : решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10 мая 2018 г. № 69 // Правовой портал Евразийского экономического союза : офиц. сайт. – URL: <https://docs.eaeunion.org/documents/253/3632/> (дата обращения: 02.11.2024).

195. ОФС.1.1.0009. Стабильность и сроки годности лекарственных средств // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание : [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 02.11.2024).

196. ОФС.1.2.1.0015. Вязкость // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание : [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 02.11.2024).

197. ОФС.1.4.1.0046. Спреи // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание : [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 02.11.2024).

198. Newman, H. The effects of 1-beta-D ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Ribavirin) on the transplanted tumours of animals / H. Newman, L. Vodinelich, C. W. Potter // *European Journal of Cancer*. – 1977. – Vol. 13. – № 8. – P. 821-30. – DOI: 10.1016/0014-2964(77)90137-2.

199. Ribavirin targets eIF4E dependent Akt survival signaling / K. Tan, B. Culjkovic, A. Amri [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2008. – Vol. 375. – № 3. – P. 341-5. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.07.163.

200. Ayyub, M. Outcome of combination antiviral therapy in chronic hepatitis C virus infection during therapy of acute lymphoblastic leukemia / M. Ayyub, S. El-Moursy, F. Al-Abbas // Saudi Journal of Gastroenterology. – 2011. – Vol. 17. – № 4. – P. 283. – DOI: 10.4103/1319-3767.82586.

201. Ribavirin treatment effects on breast cancers overexpressing eIF4E, a biomarker with prognostic specificity for luminal B-type breast cancer / F. Pettersson, C. Yau, M. C. Dobocan [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2011. – Vol. 17. – № 9. – P. 2874-84. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2334.

202. Ribavirin Inhibits the Activity of mTOR/eIF4E, ERK/Mnk1/eIF4E Signaling Pathway and Synergizes with Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib to Impair Bcr-Abl Mediated Proliferation and Apoptosis in Ph⁺ Leukemia / F. Shi, Y. Len, Y. Gong [et al.] // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10. – № 8. – P. e0136746. – DOI: 10.1371/journal.pone.0136746.

203. Ribavirin augments doxorubicin's efficacy in human hepatocellular carcinoma through inhibiting doxorubicin-induced eIF4E activation / J. Tan, J. Ye, M. Song [et al.] // Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. – 2018. – Vol. 32. – № 1. – DOI: 10.1002/jbt.22007.

204. A phase 1/2a trial of docetaxel plus ribavirin for reprogramming efficacy in patients with progressive metastatic castration resistant prostate cancer who have previously received docetaxel alone: DRREEM trial / T. Kosaka, T. Shinojima, K. Kikuchi [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2018. – Vol. 36. – № 6_suppl. – P. 329-329. – DOI: 10.1200/JCO.2018.36.6_suppl.329.

205. Phase I study of induction chemotherapy with afatinib, ribavirin, and weekly carboplatin and paclitaxel for stage IVA/IVB human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell cancer / L. A. Dunn, M. G. Fury, E. J. Sherman [et al.] // Head and Neck. – 2018. – Vol. 40. – № 2. – P. 233-241. – DOI: 10.1002/hed.24938.

206. Targeting EIF4E signaling with ribavirin in infant acute lymphoblastic leukemia / K. A. Urtishak, L.-S. Wang, B. Culjkovic-Kraljacic [et al.] // Oncogene. – 2019. – Vol. 38. – № 13. – P. 2241-2262. – DOI: 10.1038/s41388-018-0567-7.

207. NCT03760666. A Phase 1b/2a open-label, multi-center study to assess the safety, efficacy and pharmacokinetics of inpatient dose-adjusted brequinar and inhibition of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) in adult subjects with AML : [клиническое исследование] // ClinicalTrials.gov : official website. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03760666> (дата обращения: 11.02.2026). – Текст : электронный.

208. NCT03585725. A Pilot investigator-initiated study of ribavirin in indolent follicular lymphoma and mantle cell lymphoma : [клиническое исследование] // ClinicalTrials.gov : official website. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03585725> (дата обращения: 11.02.2026). – Текст : электронный.

Доказательная база противоопухолевого эффекта рибавирина

Таблица А.1 – Доказательная база противоопухолевого эффекта рибавирина

Год	Страна	Ссылка	Тип опухоли / Объект	Тип исследования / Фаза	Схема / Дозировка	Лекарственная форма	Результат
1976	Великобритания	[14]	Трансплантированны е опухоли, индуцированные аденовирусом 12	<i>In vitro / In vivo</i>	Рибавирин (100 мг/кг в день)	Раствор для внутрибрюшинной инъекции	Ингибирование роста опухоли в сравнение с контрольной группой
1977	Великобритания	[198]	Саркома, Карцинома (крысы)	<i>In vivo</i>	Рибавирин (монотерапия)	Раствор для внутрибрюшинной инъекции	Ингибирование роста
2004	Канада/США	[19]	eIF4E-зависимые опухоли	<i>In vivo / In vitro</i>	Рибавирин 40- 100 мг/кг (монотерапия)	Раствор	Ингибирование роста
2008	Канада	[199]	eIF4E-зависимые опухоли	Культуры клеток (U-2 OS lacZ and Akt1 wildtype derived murine fibroblast cell lines) в том числе чешуйчато клеточная карцинома головы и шеи	Рибавирин (монотерапия)	Раствор	Ингибирование роста

Продолжение Таблицы А.1

2009	Канада	[22]	Острый миелоидный лейкоз	Фаза I/II (NCT00559091)	Рибавирин (1000–2800 мг/день)	Капсулы	Клинический ответ
2011	Саудовская Аравия	[200]	Острый лимфобластный лейкоз	Клинический случай	Рибавирин + Пэг-ИФН α -2a	Капсулы	Ремиссия
2011	Канада	[201]	Рак молочной железы	Фаза I/II (NCT01056757)	Рибавирин (1000–2800 мг/день)	Капсулы	Ремиссия и ингибирование роста
2014	Япония	[25]	Глиома (различные линии)	<i>In vitro</i>	Рибавирин (монотерапия)	Раствор	Дозозависимое воздействие рибавирина на клетки опухоли мозга
2015	Китай	[202]	Лейкоз (Bcr-Abl)	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Рибавирин / Рибавирин + Иматиниб	Раствор	Синергическое взаимодействие препаратов
2015	Мексика	[17]	Раковые клетки опухолей головного мозга, молочной железы, шейки матки, прямой кишки и простаты	<i>In silico</i> / <i>In vitro</i>	Рибавирин 10– 50 μ M (монотерапия)	Раствор	Три-таргетный эффект
2015	Канада	[21]	Метастазирующий рак молочной железы	<i>In vivo</i> (крысы) / <i>In vitro</i>	Рибавирин (монотерапия)	Раствор для внутрибрюшинной инъекции	Доказана эффективность на трех разных клеточных линиях)

Продолжение Таблицы А.1

2015	Канада	[24]	Рефрактерная острая миелоидная лейкемия	Фаза I	Рибавирин (1000-2200 мг) + Цитарабин 20 мг	Капсулы	Появление частичного и полного ответа терапии)
2016	США	[31]	Глиобластома	<i>In vivo</i> (крысы) / <i>In vitro</i>	Рибавирин / Рибавирин + Темозоломид / Рибавирин + облучение	Раствор для внутривенной инъекции	Ингибирование роста
2017	Сербия	[27]	Глиома	<i>In vitro</i>	Рибавирин (монотерапия)	Раствор	Ингибирование роста
2017	Китай	[203]	Гепатоцеллюлярная карцинома	<i>In vitro</i>	Рибавирин + Доксорубин	Раствор	Повышение эффективности терапии
2018	Япония	[204]	Рак простаты (DRREEM trial)	Фаза I/IIa	Доцетаксел (60-75 мг/м ²) + Рибавирин (600 мг 2 р/д).	Капсулы	Подбор дозы и оценка безопасности
2018	США	[15]	Атипичная рабдоидная опухоль	<i>In vivo</i> (мыши) / <i>In vitro</i>	Рибавирин (монотерапия)	Раствор	Ингибирование роста
2018	США	[205]	Рак ротоглотки (HPV+)	Фаза I (NCT01721525)	Рибавирин + Афатиниб + Паклитаксел + Карбоплатин	Капсулы	Определение доз

Продолжение Таблицы А.1

2018	Китай	[16]	Остеосаркома у детей	Клеточные линии	Рибавирин (моно) / Доксорубицин (моно) / Рибавирин + Доксорубицин	Раствор	Ингибирование роста и подтверждение механизма противоопухолевой активности)
2019	США	[206]	Лимфобластный лейкоз младенцев	<i>In vivo / Ex vivo</i>	Рибавирин (монотерапия)	Раствор	Ингибирование роста
2020	Япония	[33]	Глиома (TMZ резистентная)	<i>In vitro</i>	Рибавирин + Темозоломид + Интерферон- β	Раствор	Синергическое взаимодействие препаратов
2023	Канада	[23]	Острый миелоидный лейкоз	Фаза II (NCT02073838)	Рибавирин + Висмодегиб	Капсулы	Улучшение клинического ответа
2024	США	[207]	Рецидивирующий AML	Фаза I/II	Рибавирин + Бреквинар	Замаскировано	Ожидаются
2024	США	[208]	Фолликулярная/Мантийноклеточная лимфома	Фаза I	Рибавирин (монотерапия): оценка биомаркеров.	Замаскировано	Ожидаются

166
Приложение Б

Результаты изучения стабильности лекарственного средства при хранении

Таблица Б.1 – Результаты контроля качества серий образцов лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза», хранящихся при температуре 25±2 °С в течение 12 месяцев в первичной упаковке из светозащитного стекла

СРОК ХРАНЕНИЯ, МЕС	ОПИСАНИЕ	ПОДЛИННОСТЬ	РН	ВЯЗКОСТЬ	СТИМУЛОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ	ОДНОРОДНОСТЬ ДОЗИРОВАНИЯ	КО ВЭЖХ
	Бесцветный прозрачный раствор	ВЭЖХ	6,5–7,5	20-35 мПа·с	Индекс стимулочувствительности >3	Результат удовлетворительный, если 9/10 результатов лежат в диапазоне 75-125 % от среднего значения, а все результаты — в пределах 65-135 %.	99,0 – 101,0
Серия 102024 – 1							
0	Соответствует	Соответствует	6,87	28,72	10,24	Соответствует	99,8
3	Соответствует	Соответствует	7,09	30,01	10,85	Соответствует	99,9
6	Соответствует	Соответствует	6,90	29,35	11,12	Соответствует	100,1
9	Соответствует	Соответствует	6,97	29,87	10,56	Соответствует	100,4
12	Соответствует	Соответствует	6,93	29,08	10,98	Соответствует	99,9
Серия 102024 – 2							
0	Соответствует	Соответствует	7,12	30,12	11,05	Соответствует	100,4
3	Соответствует	Соответствует	6,88	28,67	10,42	Соответствует	100,5
6	Соответствует	Соответствует	6,89	28,84	10,04	Соответствует	99,9
9	Соответствует	Соответствует	6,99	29,96	11,21	Соответствует	100,1
12	Соответствует	Соответствует	7,13	29,14	10,33	Соответствует	100,1
Серия 102024 – 3							
0	Соответствует	Соответствует	7,11	28,70	10,74	Соответствует	99,9
3	Соответствует	Соответствует	6,95	29,26	11,15	Соответствует	100,4
6	Соответствует	Соответствует	7,00	29,90	10,67	Соответствует	100,4
9	Соответствует	Соответствует	6,89	30,20	10,91	Соответствует	100,5
12	Соответствует	Соответствует	6,98	30,12	11,08	Соответствует	100,2

Приложение В

Акты внедрения результатов диссертационной работы в образовательный процесс

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе ФГАОУ ВО
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России (Сеченовский Университет)

Литвинова Т.М.

 2016г.

АКТ № 904-У

о внедрении результатов диссертации Михела Иосифа Бениаминовича в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Михела Иосифа Бениаминовича на тему «Создание стимулочувствительной интраназальной системы доставки рибавирина с улучшенными биофармацевтическими характеристиками» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина при изучении дисциплин «Частная фармацевтическая технология» и «Биофармация», преподаваемых студентам по направлению подготовки (специальности) Фармация (33.05.01).

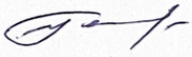
Директор Института фармации им. А.П. Нелюбина		Г.В. Раменская
Заведующий кафедрой фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина		И.И. Краснюк
Начальник Учебного управления		Л.Ю.Юдина

Рисунок В.1 – Акт внедрения результатов диссертационной работы в образовательный процесс на кафедре фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

АКТ

о внедрении результатов диссертации Михела Иосифа Бениаминовича
(фамилия, имя, отчество)
 в учебный процесс кафедры химического и фармацевтического инжиниринга
(название кафедры)
 ФГБОУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской (докторской) диссертации Михела Иосифа Бениаминовича
(фамилия, имя, отчество)
 на тему «Создание стимулочувствительной интраназальной системы доставки рибавирина с улучшенными биофармацевтическими характеристиками»
(название диссертации)
 внедрены в учебный процесс кафедры химического и фармацевтического инжиниринга
(название кафедры)
 при изучении дисциплины «Разработка фармацевтических препаратов и материалов медицинского назначения»
(название дисциплины),
 читаемых студентам по направлению подготовки (специальности)
28.03.02 Наноинженерия
(шифр и наименование направления подготовки (специальности))

Декан факультета
 цифровых технологий и химического инжиниринга
(наименование факультета)

Заведующий кафедрой
химического и фармацевтического инжиниринга
(название кафедры)



Горюхино Н.В.
(ФИО)

Меньшутин Н.В.
(ФИО)

Рисунок В.2 – Акт внедрения результатов диссертационной работы в образовательный процесс на кафедре химического и фармацевтического инжиниринга факультета цифровых технологий и химического инжиниринга ФГБОУ ВО «РХТУ им. Д.И. Менделеева»

Приложение Г

**Акт внедрения основных научных положений диссертационного исследования в работу
Дирекции по науке и разработкам ООО «Технология лекарств», ГК Р-Фарм»**

	Р-ФАРМ Инновационные технологии здоровья	АО «Р-ФАРМ» 123154, г. Москва, ул. Берзарина, дом 19, корп. 1; тел.: (495) 956-79-37, факс: (495) 956-79-38 www: r-pharm.com; e-mail: info@rpharm.ru
УТВЕРЖДАЮ Генеральный директор ООО «Технология лекарств», ГК Р-Фарм		
 Онохов И.Ф. <i>И.Ф. Онохов</i> 20.06.		
АКТ о внедрении результатов кандидатской диссертационной работы Михела Иосифа Бениаминовича на тему «Создание стимулочувствительной интраназальной системы доставки рибавирина с улучшенными биофармацевтическими характеристиками»		
Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе представителей ГК Р-Фарм - медицинский директор – Самсонов Михаил Юрьевич, генеральный директор ООО «Технология лекарств» ГК Р-Фарм – Онохов Игорь Федорович составили настоящий акт о внедрении основных научных положений, выводов и методологических подходов кандидатской диссертационной работы Михела Иосифа Бениаминовича на тему «Создание стимулочувствительной интраназальной системы доставки рибавирина с улучшенными биофармацевтическими характеристиками» в работу Дирекции по науке и разработкам ООО «Технология лекарств», ГК Р-Фарм. Данное предложение было разработано в рамках материалов диссертационного исследования Михела Иосифа Бениаминовича по теме: «Создание стимулочувствительной интраназальной системы доставки рибавирина с улучшенными биофармацевтическими характеристиками» в условиях опытно-промышленного участка ГК Р-Фарм и может быть рассмотрено для дальнейшего производства.		
Медицинский директор		Самсонов М.Ю.
Генеральный директор ООО «Технология лекарств»		Онохов И.Ф.

Рисунок Г.1 – Акт внедрения основных научных положений диссертационного исследования в работу Дирекции по науке и разработкам ООО «Технология лекарств», ГК Р-Фарм

Приложение Д

Результаты исследования биодоступности и местной токсичности разработанного лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза» на животных моделях

Исследование на животных проводилось в Центре доклинических исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет) под наблюдением руководителя центра Недорубова Андрея Анатольевича.

Михел Иосиф Бениаминович – аспирант кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет) на основе проведенного анализа литературных данных обосновал и разработал дизайн исследования биодоступности и местно-раздражающего действия, подготовил образцы лекарственного средства, выполнил статистический анализ данных и сформулировал выводы по результатам испытаний.

Расчет дозы

Расчет дозы для интраназального применения рибавирина

При пероральном применении рибавирина в дозе 1000-1400 мг (доза необходимая для оказания противоопухолевого эффекта) системная биодоступность составляет 45–50% (~475 мг), однако проникновение в ЦНС ограничено ГЭБ. Интраназальное введение обеспечивает частичный прямой транспорт в ЦНС по обонятельному и тройничному путям, минуя ГЭБ. Выбранная доза 250 мг/мл для интраназального введения обеспечивает системную экспозицию на уровне ~42% от перорального стандарта, при этом ожидаемая концентрация препарата в ЦНС сопоставима или превышает достигаемую при пероральном применении за счет прямого NTV транспорта. Такой режим позволяет достичь целевого фармакодинамического эффекта при сниженной системной нагрузке.

Пересчет человеческой дозы на крысиную

Клиническая доза препарата у человека — 25 мг ($\approx 0,36$ мг/кг для пациента 70 кг). В пересчете на поверхность тела через коэффициенты K_m (коэффициент масштабирования по площади поверхности тела) эквивалентная доза для крысы составляет ~2,2 мг/кг. В настоящем исследовании использована доза 25 мг/кг, что соответствует приблизительно 11-кратной

клинической дозе ($11 \times \text{MRHD}$ - maximum recommended human dose – максимально рекомендованная человеческая доза) и обосновано задачами исследования – оценка токсичности и проникновения исследуемого АФС через ГЭБ и доказательство присутствия механизма доставки из носа в мозг.

***In vivo* оценка биодоступности лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза»**

Животные

В исследовании использовано 27 аутбредных крыс (27 самцов), массой 270-330 грамм. Крысы, использованные в этом исследовании, были приобретены в Филиале «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях с контролируемой средой (12-часовой цикл "свет–темнота", температура 22 ± 2 °C, относительная влажность 45-65%). Им был предоставлен свободный доступ к пище и воде. Период акклиматизации составлял неделю до начала исследований.

Все манипуляции осуществляли согласно «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ЕЭС, Страсбург, 1985), «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (ЕЭС, Страсбург, 1986) и Руководствам по проведению медико-биологических исследований по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS) и Правилам лабораторной практики и приказу Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении правил лабораторной практики», а также одобрены Локальным этическим комитетом. Доклинические исследования были проведены в Центре доклинических исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова.

Животные были распределены по группам случайным образом в соответствии с временными точками. Группа «0'» служила исходным контролем: полученные в ней значения использовали в качестве фонового уровня при статистическом сравнении с последующими временными точками.

Таблица Д.1 – Распределение животных по группам

Животные	Группы	Кол-во животных	Препарат/Доза/Объем введения	Манипуляции
Крысы, интраназальное введение	0'	3♂	Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/кг, по 15 мкл в каждую ноздрю на 300 грамм	Прижизненные манипуляции: интраназальное введение, забор крови. После эвтаназии – забор мозга и обонятельных луковиц с дальнейшей гомогенизацией и аналитическим исследованием
	15'	3♂		
	30'	3♂		
	1ч	3♂		
	2ч	3♂		
	5ч	3♂		
	8ч	3♂		
	12ч	3♂		
	24ч	3♂		

Процедура забора образцов

После введения, в соответствии с временными точками, у крыс под наркозом выполнялась пункция сердца со сбором крови в вакуумные литий-гепариновые пробирки (Bodywin®). Затем отобранные образцы крови центрифугировали 15 минут при 3500 об/мин. Далее отбирался супернатант в пробирки Eppendorf®, который впоследствии замораживали при -20°C до дальнейшего ВЭЖХ-МС исследования. Головной мозг и обонятельные луковицы собирали после общей перфузии тела холодным PBS с pH 7,4 для удаления остатков крови. Обескровленные образцы мозга и обонятельных луковиц замораживали при -20°C до дальнейшего исследования.

После размораживания обонятельные луковицы и мозги взвешивали и гомогенизировали (Mr biomedicals - FASTPREP-24®) в растворе NaCl (0,9%) в соотношении 1:1 для мозгов и 1:20 для обонятельных луковиц. Процедуру повторяли 3 раза по 20 секунд при скорости 4,0 м/с. Далее проводилось центрифугирование гомогенизата при следующих параметрах: 20 минут при 15000 об/мин для гомогенизата мозгов и 15 минут при 1500 об/мин для гомогенизата обонятельных луковиц. Затем отбирали супернатант в пробирки Eppendorf® и замораживали образцы при -20°C до дальнейшего ВЭЖХ-МС.

ВЭЖХ-МС исследование

Подготовку образцов к инструментальному анализу осуществляли методом осаждения белка. К аликвоте 50 мкл добавляли 450 мкл ацетонитрила, после чего полученную смесь аккуратно встряхивали в шейкере в течение 30–40 секунд. Далее, пробирки с исследуемыми образцами центрифугировали в течение 5 минут при 13000 об/мин. После центрифугирования отбирали 400 мкл надосадочной жидкости, переносили в эппендорф и упаривали досуха, остаток перерастворяли в 100 мкл воды и отправляли на ВЭЖХ-МС анализ.

Исследование проводилось на жидкостном хроматографе высокого давления Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies®, США) с tandemным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Agilent 6470 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies®, США). Хроматографирование велось в режиме градиентного элюирования (таблица Д.2). Подвижная фаза А состояла из 0,1 % раствора муравьиной кислоты, 0,01% гептафтормасляной кислоты и 5 мМ формиата аммония в воде. Подвижная фаза Б состояла из 0,1 % раствора муравьиной кислоты, 0,01% гептафтормасляной кислоты и 5 мМ формиата аммония в ацетонитриле. Анализ проводили с использованием обратно-фазной колонки Discovery® HS F5-3 15cm x 2.1mm, 3um Supelco при 40°C со скоростью потока подвижной фазы – 0,4 мл/мин. Время анализа каждого образца составляло 8 мин. Объем вводимой пробы составлял 5 мкл. Параметры детектора указаны в таблице Д.3.

Таблица Д.2 – Программа градиентного элюирования

Время, мин	Кол-во фазы А, %	Кол-во фазы В, %
0	100	0
1.5	100	0
2.0	10	90
6.0	10	90
6.10	100	0
8.0	100	0

Таблица Д.3 – Параметры tandemного квадрупольного масс-спектрометрического детектора

Параметр	Значение
Тип ионизации	Электрораспыление с нагреваемым потоком распыляющего газа
Gas Temp	300 °C
Gas Flow	11 л/мин
Nebulizer	35 psi
SheathGasHeater	300 °C
SheathGasFlow	11 л/мин
Capillary Voltage	2,5 кВ
Mode of Analysis	MRM, positive ion

Исходные хромато-масс-спектрометрические данные обрабатывали с использованием программного комплекса MassHunter фирмы Agilent Technologies, США. Интегрирование хроматографических пиков осуществляли в автоматическом режиме.

Методика валидирована по показателям селективности, линейному диапазону, правильности и воспроизводимости, стабильности аналита в растворе и матрице, а также степени экстракции и эффекту матрицы согласно ICH guideline M10 on bioanalytical method validation.

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием компьютерной программы SPSS 27.0.1.0 for Windows (IBM Analytics, США). Данные представлены в формате $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($M \pm \text{SD}$). Сравнение между различными группами внутри каждого из биообразцов проводилось с использованием двустороннего дисперсионного анализа ANOVA с последующим post hoc тестом Тьюки. При сравнении групп различных биообразцов применялся t-критерий Стьюдента. Различия между выборками считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$, установленном до начала исследования.

Результаты *in vivo* исследований

Аналитическое исследование образцов мозга, обонятельных луковиц и плазмы

Профили «концентрация-время» для рибавирина в плазме, мозге и обонятельных луковицах после интраназального введения стимулочувствительного спрея показаны на рисунке Д.1.

Фармакокинетические параметры, рассчитанные по данным ВЭЖХ-МС исследования распределения рибавирина в мозге, плазме и обонятельных луковицах, сведены в таблицу Д.4.

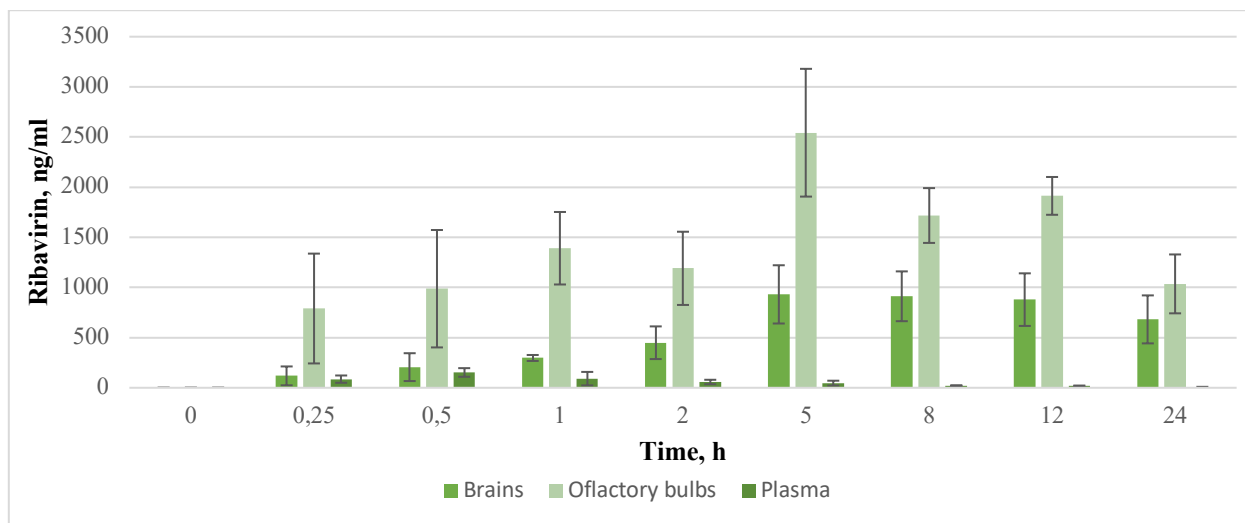


Рисунок Д.1 – Профили рибавирина концентрация-время в образцах плазмы, мозга и обонятельных луковиц после интраназального введения крысам в форме *in situ* спрея. Данные представлены в виде $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($M \pm \text{SD}$), $n = 3$

Таблица Д.4 – Фармакокинетические параметры рибавирина в образцах мозга, плазмы и обонятельных луковиц после его введения крысам в форме интраназального *in situ* спрея

Параметр	Единица измерения	Значение в плазме	Значение в мозге	Значение в обонятельной луковице
Lambda_z	1/h	0,128859849	0,033520694	0,037830955
t1/2	h	5,379077998	20,67818716	18,32222287
Tmax	h	0,5	5	5
Cmax	ng/ml	152,6585951	931,1436862	2542,795254
Tlag	h	0	0	0
Clast_obs/Cmax	-	0,022771003	0,589037157	0,407319183
AUC 0-t	ng/ml·h	629,5281161	17535,42484	38105,3782
AUC 0-inf_obs	ng/ml·h	656,5046282	33897,80185	65483,20402
AUC 0-t/0-inf_obs	-	0,958908877	0,517302712	0,581910717
AUMC 0-inf_obs	ng/ml·h ²	4569,568753	1085744,771	1796570,896
MRT 0-inf_obs	h	6,960451696	32,02994623	27,43559853
Vz/F_obs	(µg/kg) / (ng/ml)	0,118207379	0,008800664	0,004036666
Cl/F_obs	(µg/kg) / (ng/ml)/h	0,015232185	0,000295004	0,000152711

Продолжение Таблицы Д.4

Примечание: λ_z – константа скорости терминальной конечной элиминации лекарственного средства из организма; $t_{1/2}$ – период полувыведения; T_{max} – время достижения этой концентрации в плазме; C_{max} – максимальная концентрация в плазме; T_{lag} – время между введением ЛС и началом всасывания; C_{last_obs} – последняя измеряемая концентрация ЛС в крови; AUC_{0-t} – площадь под кривой зависимости концентрации от времени в плазме; AUC_{0-inf_obs} – площадь под кривой от нуля до бесконечности; $AUMC_{0-inf_obs}$ – площадь под кривой первого момента; MRT_{0-inf_obs} – среднее время пребывания; V_z/F_{obs} – объем распределения; Cl/F_{obs} – суммарный клиренс.

ВЭЖХ-МС исследование образцов мозга

При исследовании образцов мозга концентрация не имела существенных различий ($p>0,05$) между временными точками 15 мин, 30 мин, 1 час и 2 часа. Так, в сравнении с точками 15 мин, 30 мин и 1 час, фиксировали статистически значимые изменения уровня концентрации в точках 5 часов, 8 часов и 12 часов ($p<0,05$), что говорит о росте концентрации рибавирина в мозге в течение 5 часов. Точки 5 часов, 8 часов, 12 часов и 24 часа между собой также статистически не различались, то есть высокая концентрация рибавирина в мозге сохранялась не менее 19 (5-24 часа) часов после интраназального введения *in situ* спрея. При этом сравнение точек 15 минут и 24 часа выявило значимые различия ($p<0,05$): вероятно, высокий уровень субстанции в мозге удерживается дольше максимальной исследованной точки, что согласуется со значением MRT_{inf_obs} (рисунок Д.2).

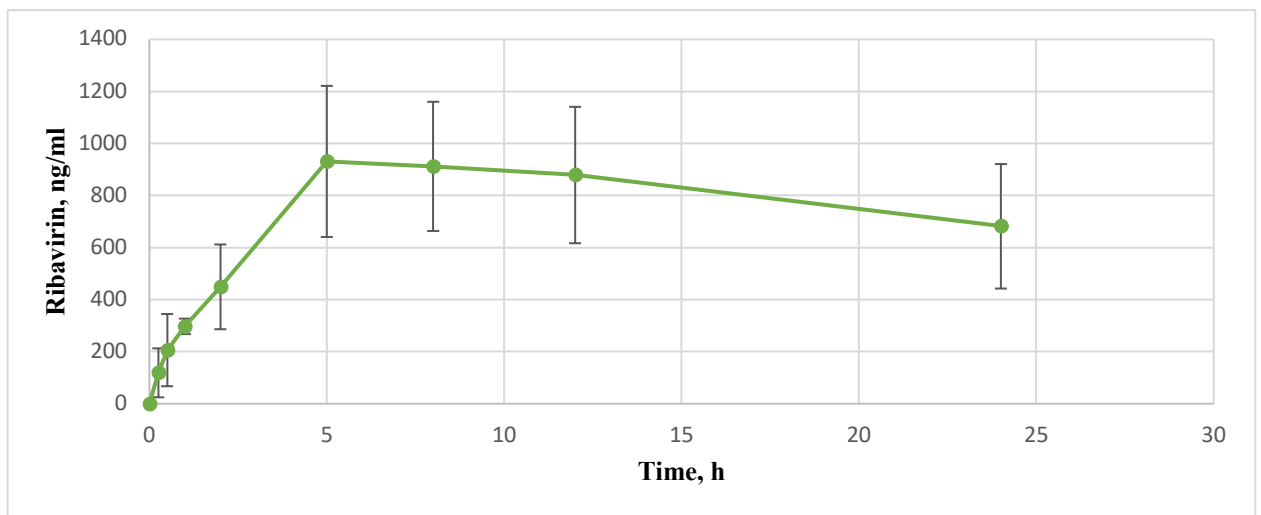


Рисунок Д.2 – Фармакокинетическая кривая рибавирина в образцах мозга после интраназального введения крысам в форме *in situ* спрея. Данные представлены в виде mean ± SD ($M \pm SD$), $n = 3$

ВЭЖХ-МС исследование образцов обонятельных луковиц

В обонятельных луковицах, как и в мозге, концентрация не различалась значимо ($p>0,05$) между точками 15 мин, 30 мин, 1 час, 2 часа и нулевой. Не обнаружено различий и между точками

5 часов, 8 часов и 12 часов ($p>0,05$). Ключевыми для сравнения оказались три точки – 15 минут, 5 часов и 24 часа, где изменения концентрации были статистически значимыми ($p<0,05$). Это указывает на рост содержания рибавирина в обонятельных луковицах в течение первых 5 часов, удержание достигнутого уровня до 12 часов и снижение к 24 часам. Поскольку между точками 15 минут, 24 часа и нулевой значимых различий не выявлено ($p>0,05$), к 24 часам концентрация рибавирина в обонятельных луковицах падает существенно. Причем на всех исследуемых точках, кроме 15 минут и 24 часов, концентрация рибавирина в обонятельных луковицах была выше, чем в мозгах ($p<0,05$). В точке 24 часа между концентрациями рибавирина в обонятельных луковицах и мозгах не было статистически значимых различий ($p>0,05$), что может свидетельствовать о роли обонятельных луковиц при данном способе введения как переносчика препарата в мозг (рисунок Д.3).

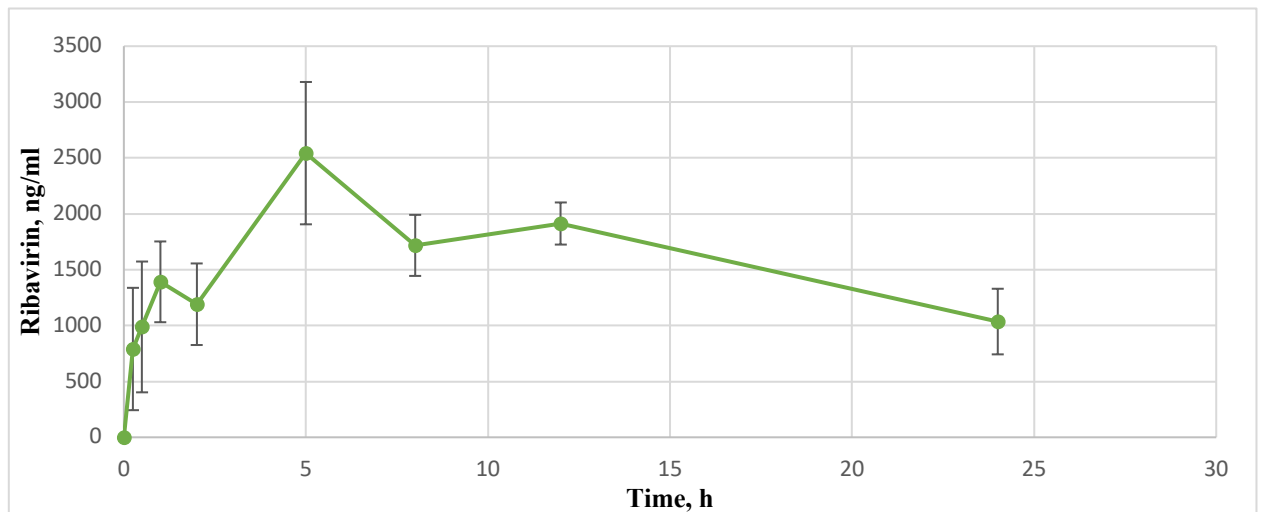


Рисунок Д.3 – Фармакокинетическая кривая рибавирина в образцах обонятельных луковиц после интраназального введения крысам в форме *in situ* спрея. Данные представлены в виде $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($M \pm \text{SD}$), $n = 3$

ВЭЖХ-МС исследование плазмы крови

В плазме уровень рибавирина в точках 2, 5, 8, 12 и 24 часа статистически не отличался от нулевой точки ($p>0,05$). Одновременно все они значимо отличались от точки 30 минут ($p<0,05$), что отражает быстрый – в пределах получаса – подъем концентрации рибавирина в плазме и столь же быструю его элиминацию.

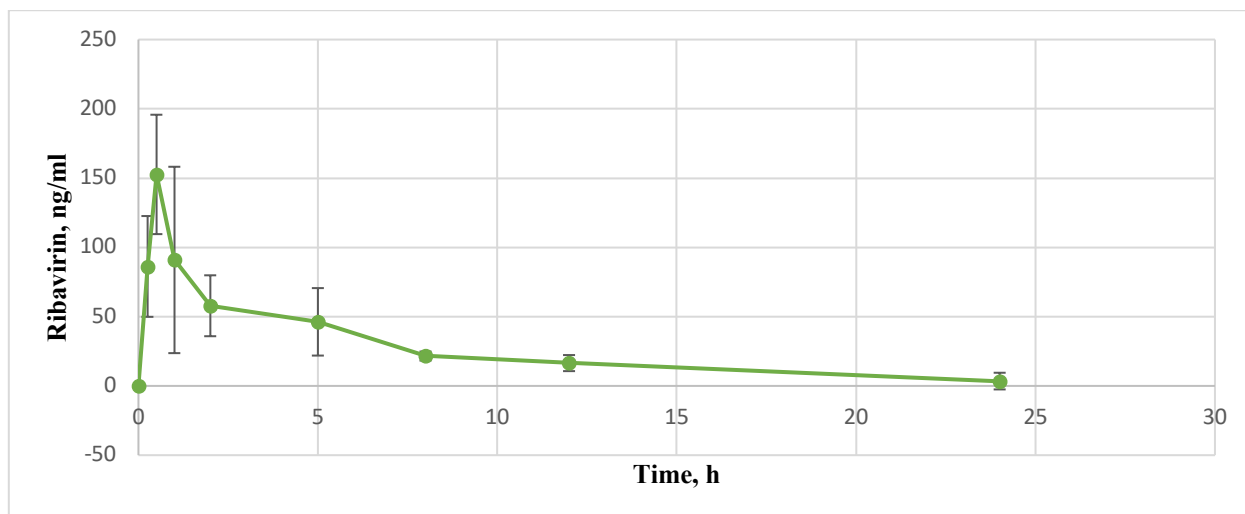


Рисунок Д.4 – Фармакокинетическая кривая рибавирина в образцах плазмы после интраназального введения крысам в форме *in situ* спрея. Данные представлены в виде $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($M \pm \text{SD}$), $n = 3$

Низкие значения C_{max} , AUC_{0-t} и $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ в плазме, в сравнении со значениями этих параметров в мозгах и обонятельных луковицах (рисунок Д.4), могут свидетельствовать о небольшой степени прохождения рибавирина в общий кровоток через капиллярную сеть носовой полости, по-видимому, в связи с полярной природой вещества.

***In vivo* оценка цилиотоксичности лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза»**

Животные

В исследовании местно-раздражающего действия использовано 6 аутбредных крыс (6 самцов), массой 270-330 грамм.

Согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией Миронова А.Н. аутбредные крысы являются релевантным видом для токсикологических исследований.

Манипуляции с животными осуществляли согласно Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (ЕЭС, Страсбург, 1985), ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Руководствам по проведению медико-биологических исследований и использованию лабораторных животных. Исследование одобрено комиссией по биоэтике.

Крысы, использованные в этом исследовании, были приобретены в Филиале «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Спрей вводился интраназально в дозировке 25 мг/кг. После поступления животные акклиматизировались в течение 7 суток.

Животные содержались в следующих условиях:

- температура воздуха 20-24°C;
- влажность 45-65 %;
- 12-часовой цикл «свет–темнота».

В качестве подстила использовалась древесная стружка нехвойных пород древесины.

Животные питались полнорационным гранулированным комбикормом для лабораторных животных и получали воду из центрального водопровода (СанПиН 2.1.3684-21).

Животных содержали в поликарбонатных клетках, размером 420x240x240 мм, площадью 1008 см² системы ИВК-Вент-Био-1М с индивидуальной вентиляцией. В одной клетке содержалось по 3 животных.

Перечень материалов и оборудования, необходимый для проведения анализа цилиотоксичности на аутбредных крысах, перечислен в таблице Д.5.

Таблица Д.5 – Материалы и оборудование для проведения исследования цилиотоксичности

Процедура	Перечень оборудования и материалов	Спецификация
Уход за животными	Клетки	Поликарбонат
	Решетки	Нержавеющая сталь
	Разделители	
	Карточкодержатели	-
	Стеллажи	Вент-БИО-1М
	Корм	ООО "Провими", ГОСТ Р 34566-2019
	Дезинфектанты	Аламинол
	Лабораторная одежда	-
Введение препарата	Дозатор механический	Proline® Plus 1-канальный 2-20 мкл
	Наконечники для дозатора	Тип Eppendorf, 2-20 мл
Маркировка животных	Фукорцин	Самарамедпром, Россия
Измерение массы тела	Весы	Ohaus Navigator NVL2101
Прочие расходные материалы	Пробирки	Тип Эппендорф, 2 мл
Гистологическое исследование	Микротом полностью моторизированный	Leica RM2265
	Комплект оборудования для окрашивания и заключения под стекло гистологических препаратов: объединенные в единую производительную линию	Окрашивающий аппарат Leica ST5010 и аппарат для заключения под покровное стекло Leica CV5030
	Гистологический процессор карусельного типа (220 кассет)	Leica TP1020

Продолжение Таблицы Д.5

Гистологическое исследование	Станция для заливки в парафин	Leica EG1150
	Микроскоп	Leica DM2500 с цифровой камерой, с программным обеспечением и управляющей рабочей станцией
	Гистологические кассеты	-
	Предметные стекла	-
	Покровные стекла	-
	Посуда	Пробирка типа «Фалькон» 50 мл

Дизайн исследования цитоотоксичности

Каждому животному в отдельной клетке присваивали индивидуальный номер, помечая их фукорцином.

Распределение животных по группам велось случайным образом, но с учетом того, чтобы масса отдельного животного отличалась менее чем на 10 % от средней массы всех животных, участвующих в эксперименте (таблица Д.6). Были выделены 2 группы животных: опытная, в которой животным интраназально вводился *in situ* спрей в дозировке 25 мг/кг один раз в день в течение двух недель, и контрольная, в которой животным по идентичной схеме интраназально вводился физиологический раствор.

Таблица Д.6 – Распределение животных по группам в исследовании местно-раздражающего действия

Животные	Группы	Кол-во животных	Препарат/Доза/Объем введения	Манипуляции
Крысы	Опытная	3♂	Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/кг, однократно по 15 мкл в каждую ноздрю	Прижизненные манипуляции: интраназальное введение в течение двух недель. После эвтаназии - гистологический анализ срезов носовой полости с предварительной декальцинацией
	Контрольная	3♂	Физиологический раствор, однократно по 15 мкл в каждую ноздрю	

Подготовка образцов носовой полости к гистологическому исследованию

После эвтаназии на 15 сутки проводили забор образцов носовой полости. Далее проводили фиксацию образцов в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 72 часов. После фиксации биообразцы отмывали в воде в течение 60 минут, затем проводили их декальцинацию 10 % раствором ЭДТА при pH = 7 в течение 20 дней. При завершении декальцинации образцы носовой полости промывали в воде, а после чего отправляли на гистологическое исследование.

Гистологическое исследование

После того, как декальцинация была завершена, фрагменты носовой полости были вырезаны в гистологические кассеты для проведения гистологической проводки. Проводка осуществлялась в возрастающей концентрации изопропанола (*Izonpen, Biovitrum*). На первых трех станциях использовался изопропанол в концентрациях 70 %, 80 % и 90 % соответственно. В следующих шести станциях использовался абсолютный изопропанол. Время выдержки составляло 45 минут для первой станции и 1 час для всех последующих. После прохождения девяти станций с изопрепом образцы проводили через четыре станции с расплавленным парафином (*Paraplast, Leica*). Общее время инфильтрации парафином составило 6 часов.

Далее полученные образцы носовой полости заливались в парафиновые блоки (*Paraplast, Leica*) на заливочной станции.

Затем проводилась нарезка охлажденных парафиновых блоков на микротоме. Полученные срезы расправляли на водяной бане, затем помещали на предметное стекло и просушивали на нагревательном столике 30 минут при температуре 40°C. После просушивания срезы термостатировали при 37°C в течение ночи.

На следующий день проводили окрашивание срезов по данному протоколу:

- термостатирование при 60°C - 10 минут;
- три станции с ксилолом (*о-Ксилол*) - 3 минуты на каждой станции;
- три станции с этиловым спиртом с концентрацией 96%, 96% и 70% соответственно - 3 минуты на каждой станции;
- дистиллированная вода - 3 минуты;
- гематоксилин (*Гематоксилин Gill II, Leica*) - 10 минут;
- дистиллированная вода - 3 минуты;
- эозин (*Эозин Y, Leica*) - 2 минуты;
- дистиллированная вода - 3 минуты;

- три станции с этиловым спиртом с концентрацией 96% - 0,5 минут для первой станции и по 2 минуты для двух следующих;
- смесь ксилол-фенол - 1 минута;
- две станции с ксилолом – каждая станция по 2 минуты.

Полученные после окрашивания срезы накрывали покровными стеклами. Далее дожидались застывания среды в готовых гистологических препаратах и передавали их на анализ. Срезы фотографировали камерой для микроскопа, согласно стандартному режиму работы устройства.

Результаты гистологического исследования

При морфологическом исследовании препаратов контрольной группы носовая полость была выстлана мерцательным псевдомногослойным эпителием, состоящим из 4 типов клеток: мерцательных и нереснитчатых столбчатых клеток, бокаловидных клеток и базальных клеток. Собственная пластинка обильно васкуляризирована, содержит серозные железы и бокаловидные клетки. Обонятельный эпителий также представляет собой мерцательный псевдомногослойный эпителий, который покрывает верхнюю носовую раковину и самую верхнюю часть перегородки в каждой полости. Обонятельный эпителий отличается наличием желез Боумена, участвующих в выработке слизи. Базальная мембрана под эпителием также содержит кровеносные и лимфатические сосуды.

При сравнительном морфологическом анализе носовой полости опытной и контрольной групп патоморфологических изменений не наблюдалось, строение и гистоархитектоника соответствовали контрольным значениям (рисунок Д.5).

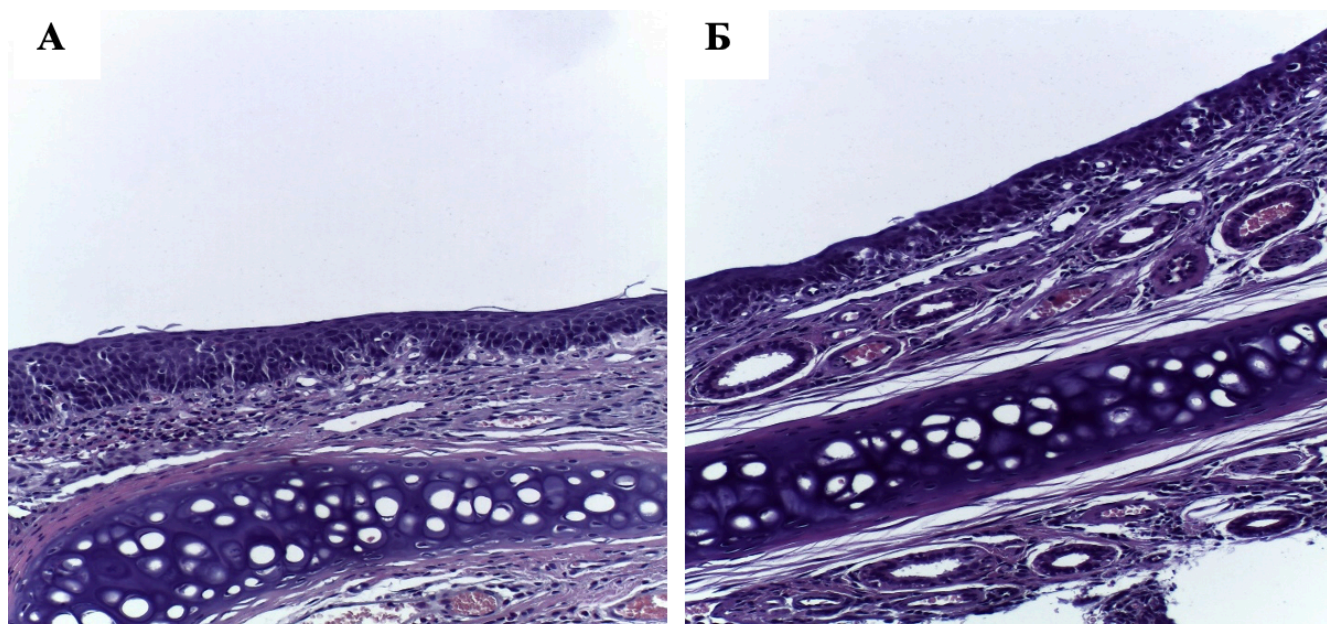


Рисунок Д.5 – Полость носа в опытной (А) и контрольной (Б) группах. Окрашивание: гематоксилин и эозин, увеличение $\times 200$

Гистологическое исследование не выявило признаков местно-раздражающего действия после двухнедельного ежедневного применения лекарственного средства «Рибавирин, стимулочувствительный спрей назальный дозированный, 25 мг/1 доза».