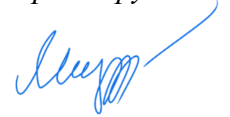


*На правах рукописи*



**Анурова Мария Николаевна**

**Теоретические и экспериментальные основы разработки гидрофильных мягких  
лекарственных форм с биотехнологическими субстанциями**

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

1.5.6. Биотехнология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора фармацевтических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научные консультанты:**

доктор фармацевтических наук, профессор

**Демина Наталья Борисовна**

доктор биологических наук,  
член-корреспондент РАН

**Алешкин Андрей Владимирович**

**Официальные оппоненты:**

**Сливкин Алексей Иванович** - доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», кафедра фармацевтической технологии, заведующий кафедрой

**Суслина Светлана Николаевна** – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», кафедра общей фармацевтической и биомедицинской технологии, заведующий кафедрой

**Красильников Игорь Викторович** – доктор биологических наук, профессор, акционерное общество «Развитие Биотехнологий», директор по научной работе

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 17 сентября 2025 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy b-p., d. 37/1 и на сайте организации: [www.sechenov.ru](http://www.sechenov.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02  
доктор фармацевтических наук, профессор

Демина Наталья Борисовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Ключевыми приоритетами стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года является разработка оригинальных лекарственных препаратов (ЛП) и развитие биотехнологического сектора фармацевтической отрасли. Исследование Global Market Insight показало, что к 2027 году объем рынка биотехнологий достигнет порядка 950 миллиардов долларов, при этом более половины биотехнологических исследований в мире сконцентрировано в отрасли фармацевтического производства. Драйвером для развития биотехнологического сектора стала пандемия COVID-19, которая потребовала глобальных усилий по разработке вакцин, тестов на антитела, инноваций в создании новых противовирусных препаратов. Биотехнологические ЛП порождают большие надежды на будущее для лечения ряда заболеваний и могут вывести оказание медицинской помощи на качественно новый уровень. К таким препаратам относятся лекарственные средства (ЛС) на основе вирусов, например бактериофаги, ставшие вновь актуальными в связи с глобализацией проблемы антибиотикорезистентности, а также рекомбинантные белки, полученные с помощью генноинженерной технологии, направленные на терапию широкого круга заболеваний.

Одним из важнейших этапов создания биотехнологических препаратов является фармацевтическая разработка. На основании принципа «качество, запланированное при разработке» («Quality by Design») при создании лекарственных форм (ЛФ) центральным по значению является определение целевого профиля качества препарата, установление критических показателей качества и разработка стратегии контроля ЛП (Хаджиева, З.Д., 2015). Если технология и производство синтетических и растительных ЛС достаточно хорошо разработаны и изучены, то работы по выбору научно-обоснованной методологии разработки ЛФ для биотехнологических субстанций отсутствуют.

Актуальными для биотехнологических лекарственных веществ (ЛВ) системами доставки являются гидрофильные мягкие лекарственные формы (ГМЛФ), поскольку при их производстве не требуются стрессовые условия, то есть высокие значения температуры, давления или скоростей перемешивания, то в их состав можно включать лабильные субстанции, которыми часто являются биотехнологические ЛП, также ГМЛФ приемлемы для различных путей введения, могут обеспечивать контролируемое высвобождение ЛВ, в зависимости от состава и структуры полимеров имеют настраиваемые свойства, например, способность к биодegradации, биоадгезии, и др.

## **Степень разработанности темы исследования**

Разработки в области создания биотехнологических ЛП активно ведутся как в нашей стране, так и в мире. Основными ЛФ, в которых они производятся являются растворы для инъекций и лиофилизаты. Однако создание препаратов в виде ГМЛФ позволит существенно расширить диапазон их фармакологического действия. В мире проводится значимое количество исследований по разработке ГМЛФ, однако отсутствуют обобщенные научно-методические подходы к принципам выбора вспомогательных веществ и технологии получения данных ЛФ в целом и с субстанциями биотехнологического происхождения, в частности, которые имеют ряд особенностей, а именно: низкую стабильность, высокую чувствительность к рН, температуре, электролитам, детергентам, консервантам и т.д.

В нашей стране большой вклад в развитие технологии мягких лекарственных форм (МЛФ), в том числе ГМЛФ, внесли российские и советские ученые: Тенцова А.И., Муравьев И.А., Аркуша А.А., Перцев И.М., Девяткина И.А., Суслина С.Н., Джавахян М.А. и др. В своих работах они подчеркнули важность обоснования выбора состава ЛФ в первую очередь с позиции биофармации, а затем производства.

Важную роль при разработке составов МЛФ играет контроль реологических свойств, которые дают представление о физических характеристиках, структуре, стабильности и параметрах высвобождения ЛВ из ЛФ. В литературе приводятся описание реологических свойств гелей (Shi, Z., 2016; Sheshala, R., 2015), однако отсутствуют критерии и значения реологических показателей, которых следует придерживаться или ориентироваться при создании новых составов ЛФ на гидрофильных основах. В работах Аркуши А.А. и Перцева И.М., проведенных более 40 лет назад, описаны реологические оптимумы для мазей на липофильных и абсорбционных основах актуальных на тот период, на эти работы до сих пор ссылаются и ряд современных авторов при фармацевтической разработке МЛФ, однако для гелей эти оптимумы не применимы.

## **Цель и задачи исследования**

Целью исследования является разработка научно-методологической системы создания ЛП с биотехнологическими субстанциями - вирусами и белками в виде гидрофильных мягких лекарственных форм и ее экспериментальное обоснование.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. На основании изучения зарубежной и российской нормативной документации, материалов производителей и данных научных публикаций по актуальному современному

ассортименту гелеобразователей выявить эксципиенты, перспективные для использования в рецептурах ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями в контексте способа применения ЛФ.

2. Сформулировать методологическую концепцию фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями для различных путей введения с учетом целевого профиля качества ЛП, включающего фармакопейные и значимые не фармакопейные показатели качества.

3. Изучить реологические характеристики, определить и обосновать реологические оптимумы ГМЛФ, полученных на основе различных гелеобразователей, для дерматологического, офтальмологического, вагинального и стоматологического способов применения.

4. Обосновать универсальные рецептуры и технологию получения пероральных и вагинальных гелей с коктейлями бактериофагов различного состава для профилактики и терапии инфекционных заболеваний, вызванных полирезистентными штаммами бактерий.

5. Разработать состав и технологию геля с новым рекомбинантным белком – эндолизином LysECD7-SMAP, активным в отношении как планктонных форм устойчивых к антибиотикам бактерий, так и их биопленок.

6. Провести фармацевтическую разработку офтальмологической и местной ЛФ интерферона альфа-2b для нанесения на кожу и слизистые оболочки, экспериментально изучить их физико-химические и технологические характеристики.

7. Определить стратегию контроля качества вагинального геля с коктейлем бактериофагов, перорального геля с коктейлем бактериофагов, дерматологического геля с рекомбинантным эндолизином, комбинированного геля с интерфероном альфа-2b для наружного и местного применения и офтальмологического геля интерферона альфа-2b с даларгином, разработать методики их анализа и установить обоснованные нормы допустимых отклонений.

8. Разработать стратегию исследования стабильности ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями для обоснования сроков годности ЛП.

### **Научная новизна**

На основании проведенного комплекса экспериментальных исследований разработана и теоретически обоснована методология фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями, представляющими собой вирусы и белки.

Установлены и обоснованы реологические оптимумы гелей для дерматологического, офтальмологического, стоматологического и вагинального применения, на которые можно опираться при разработке новых ГМЛФ, предназначенных для данных путей введения.

Разработаны составы «универсальных» ЛФ с коктейлями бактериофагов различных комбинаций, представляющими собой вагинальный термореверсивный и пероральный гели.

Получен состав нового дерматологического антибактериального геля с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP, в рамках комплексных исследований показана его безопасность и стабильность. Преимущество разработанной ЛФ эндолизинов подтверждено патентами РФ на изобретение: «Бактерицидная фармацевтическая композиция для местного применения в форме геля бактерицидного с эндолизином» патент на изобретение RU 2781050 C1, 04.10.2022 заявка № 2021128276 от 28.09.2021; «Антибактериальная композиция на основе эндолизинов и лекарственные средства в форме геля или спрея с ее использованием» патент на изобретение RU 2790481 C1, 21.02.2023, заявка № 2021128275 от 28.09.2021.

Разработаны оригинальные комбинированные ГМЛФ с интерфероном альфа-2b для офтальмологического, наружного и местного применения. Показана возможность масштабирования разработанной технологии на промышленную площадку АО «Биннофарм».

Для всех разработанных ЛФ определены стратегии контроля качества и программы изучения стабильности, оценены риски масштабирования технологии производства.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Сформулирована методологическая концепция фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями, представляющими собой вирусы и белки, которая может являться основой для создания гелей для различных путей введения с ЛВ биотехнологического происхождения.

Теоретическая значимость исследования включает результаты структурирования ассортимента гелеобразователей, позволившие установить научно-обоснованные подходы к выбору эксципиентов для фармацевтической разработки ГМЛФ в зависимости от физико-химических свойств ЛВ и целевого профиля качества ЛП.

Установленные реологические оптимумы ГМЛФ для различных путей введения являются опорой для разработки, изучения и обоснования структурно-механических свойств новых ЛФ в виде гелей.

Определены профили качества ГМЛФ в контексте путей введения, где обоснована необходимость определения ряда не фармакопейных показателей качества, таких как органолептические свойства, осмотическая, адсорбционная активность, намазываемость, биоадгезивные свойства.

Практическая значимость исследования состоит в разработке ряда ЛФ на основе оригинальных вирулентных бактериофагов, рекомбинантного эндолизина, и комбинированных препаратов на основе интерферона альфа-2b. Также практическую значимость представляют предложенная стратегия контроля качества, экспериментально обоснованная стратегия изучения

стабильности, разработанные проекты нормативных документов по качеству на лекарственные формы и лабораторные регламенты получения ЛФ: гель для приема внутрь с коктейлем бактериофагов, 30 г; гель для вагинального применения коктейлем бактериофагов, 30 г; гель бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP, 30 г; офтальмологический гель интерферона альфа-2b и даларгина 500 тыс. МЕ + 4,0 мкг, 10 г; комбинированный гель наружного и местного применения интерферона альфа-2b, декспантенола и лидокаина 400 тыс. МЕ + 500 мкг + 100 мкг на 10 г.

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой диссертационного исследования служили работы отечественных и иностранных ученых в области фармацевтической разработки МЛФ и ЛП с биотехнологическими субстанциями. В работе использовали системный и процессный подходы для разработки методологии создания ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями.

Доклинические исследования ЛФ проводились в соответствии с действующей нормативной документацией по параметрам: определение местного действия; изучение фармакокинетических показателей. Доклинические исследования ЛФ одобрены локальным Этическим комитетом Федерального научного центра — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской Академии Наук (протокол №541 от 09.07.2019) и локальным Этическим комитетом Федерального бюджетного учреждения науки Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского) (протокол №38 от 23.12.2019).

Общие подходы к фармацевтической разработке были определены согласно руководству International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use ich harmonised tripartite guideline. Pharmaceutical development Q8 (R2), для чего применяли общие научные и фармакопейные методы анализа, а в связи с спецификой физико-химических свойств биотехнологических субстанций также специфические: метод Грация, метод определения спектра литической активности фагов, выявления лизогенных штаммов бактерий, определения частоты возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов, выделения и рестрикционного анализа ДНК бактериофагов, определения спектра противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов, иммуноэлектрофореза в агаровом геле, методике определения специфической противовирусной активности интерферона альфа-2b.

В работе использованы методы фармакопейного анализа, включенные в Государственную фармакопею Российской Федерации XV издания (ГФ РФ) и Фармакопею Евразийского

экономического союза (ГФ ЕАЭС), фармацевтико-технологические, физико-химические, математические, статистические методы анализа и обработки результатов. Фармацевтическую разработку ЛФ биотехнологических субстанций проводили в соответствии с решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза". Проекты нормативных документов по качеству на ЛП разрабатывались в соответствии с Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 года №151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата» и решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза". Использованные в работе аналитические методики были валидированы в соответствии с требованиями Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. N 113 "Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств" Программу стабильности ЛФ осуществляли по требованиям Решения Евразийской Экономической Комиссии от 10 мая 2018 года № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций».

При выполнении работы использовались международные базы данных и информационные ресурсы PubMed, Scopus, Medline, Wiley Online Library, elibrary, материалы российских и зарубежных научных журналов и конференций.

### **Личный вклад автора**

Автор внес свой вклад в каждый этап подготовки диссертации, начиная с разработки плана исследования, продолжая аналитическим обзором литературы по выбранной проблематике, заканчивая проведением экспериментов, обработкой и интерпретацией полученных результатов. Автор принимал непосредственное участие в разработке состава, технологии, методов анализа и изучении стабильности разработанных лекарственных форм с коктейлями бактериофагов, рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP и интерфероном альфа-2b. Автором разработаны лабораторные регламенты и спецификации на готовые ЛФ, программы изучения стабильности, оценены риски по масштабированию технологического процесса для разработанных ЛФ. Исследователь, ставший автором данного труда, самостоятельно провел оценку полученных данных, применяя широкий спектр статистических аналитических инструментов. В результате были созданы ключевые научные работы, патенты и

презентации, которые были официально представлены на международных и национальных конференциях и симпозиумах.

### **Положения, выносимые на защиту**

– Методология фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями, представляющими собой вирусы и белки;

– результаты определения профилей качества ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями, представляющими собой вирусы и рекомбинантные белки, для различных путей введения и обоснованный выбор критических технологических параметров качества;

– принципы обоснования выбора гелеобразователей при разработке составов ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями для дерматологического, офтальмологического, вагинального, стоматологического применения и для нанесения на раны и ожоги;

– реологические оптимумы ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями для дерматологического, стоматологического, офтальмологического и вагинального путей введения;

– результаты апробации методологии фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями, представляющими собой вирусы и белки, на примере разработки следующих ЛС: термореверсивного вагинального геля с коктейлем бактериофагов, перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций; геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP; комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина и комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения;

– технология производства разработанных ЛФ: геля для приема внутрь с коктейлем бактериофагов, 30 г; геля для вагинального применения коктейлем бактериофагов, 30 г; геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP, 30 г; офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина 500 тыс. МЕ + 4,0 мкг, 10 г; комбинированного геля наружного и местного применения интерферона альфа-2b, декспантенола и лидокаина 400 тыс. МЕ + 500 мкг + 100 мкг на 10 г;

– результаты изучения показателей качества и стабильности разработанных ЛФ в рамках предложенной стратегии контроля.

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

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств, пунктам 1, 2, 3, 4 и паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология, пунктам 9, 10, 12, 25.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов научных положений и выводов обеспечивается достаточным объемом проведенных экспериментов, анализируемых образцов, воспроизводимостью основных и промежуточных результатов, верифицированных и валидированных методов анализа, статистической обработкой данных. Экспериментальные исследования проведены на сертифицированном оборудовании кафедр фармацевтической технологии, биотехнологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора. Полученные результаты соотносятся с данными, опубликованными в научной российской и иностранной литературе, что так же свидетельствует о достоверности полученных данных.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на научных конференциях, форумах и конгрессах: XII Международной научной конференции Scientific Publishing Center «Discovery», 2016; Международном форуме Биотехнология: состояние и перспективы развития. Москва, 2020; VII Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2020. 2020.; XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора: Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены, Москва, 2020; Всероссийской научно-практической интернет-конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора с международным участием: Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения. Пермь, 2020; BIO WEB of conferences, 2021; Всероссийской конференции: от микробиологии к генетическим технологиям. Новосибирск, 2023; Всероссийской конференции, посвященной памяти выдающегося отечественного ученого в области технологии лекарств Юрия Карловича Сандера. Санкт-Петербург, 2023; XVI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского. Москва, 2024; Втором Саммите разработчиков лекарственных препаратов «Сириус. Биотех», Сочи, 2024; in Pharmaceutical Advanced Forum (PAF) hybrid conference held at Sechenov University in collaboration with ETFLIN 11th September 2024; Международной

конференции: Бактериофаги от фундаментальных исследований к применению, Новосибирск, 2024.

Апробация диссертационной работы состоялась на заседании научно-практической междисциплинарной конференции кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), при участии кафедр института: фармацевтической технологии, биотехнологии, фармацевтического естествознания, аналитической, физической и коллоидной химии, фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, химии, научно-образовательного исследовательского центра «ФАРМА–ПРЕМИУМ»; а также представителей подразделений Федерального бюджетного учреждения науки “Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: лаборатории диагностики и профилактики инфекционных заболеваний, лаборатории биотехнологии и микробиологии бактериофагов, лаборатории иммунобиологических препаратов, отдела медицинской биотехнологии и Евразийской академии надлежащих практик, протокол № 1 от 16 января 2025 года.

### **Внедрение результатов в практику**

Проведена апробация лабораторных регламентов лекарственных форм с интерфероном альфа-2b на базе ООО Производственной фармацевтической компании «АЛИУМ» (г. Москва) (акт о внедрении от 06.12.2024) и масштабирование технологии производства в АО «Биннофарм» (акт о внедрении от 06.12.2024)

Методики контроля качества разработанных лекарственных форм с бактериофагами внедрены в работу Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (акт о внедрении от 19.12.2024).

Фрагменты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии и кафедры биотехнологии института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акты о внедрении №533 и 534 от 11.11.2024).

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

Исследование выполнено в соответствии с Программой фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период – с 2021 по 2030 годы

(утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 31.12.2020 года №3684–р); Стратегией развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года (утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 7 июня 2023 г. № 1495–р); Планом научно–исследовательских работ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и является фрагментом исследования по теме «Развитие научных и научно–методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01201261653).

Работа по созданию ЛФ эндолизинов выполнена в рамках государственного контракта №0373100122119000013 от 15 мая 2019 года с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России.

### **Публикации по теме диссертации**

Основное содержание работы отражено в 47 публикациях, в том числе 8 научных статей 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 доктора наук; 10 статей в изданиях, индексируемых в международных базах (Scopus, PubMed, Springer), 12 – иные публикации по результатам исследования, 1 монография, 2 патента, 14 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, 6 глав, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 470 страницах, содержит 116 таблиц и 84 рисунка. Библиография содержит 445 источника литературы, включая 87 отечественных и 358 иностранных.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Объекты и методы исследований**

В качестве объектов исследований были выбраны вирусы: бактериофаги Escherichia phage ECD7, V18, Ec13-52, Ec732, Salmonella phage FG1m, FM4b, SE40, Salmonella phage ST11, Staphylococcus phage Sa30, CH1, SCH1, SCH111, представляющие собой стерильные бесклеточные концентраты фаголизатов полученные в лаборатории клинической микробиологии

и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского в соответствии с патентом РФ 2525141.

Объектами работы также являются белки: эндолизин LysECD7-SMAP и интерферон альфа-2b. Рекомбинантный модифицированный эндолизин LysECD7-SMAP, разработанный и предоставленный лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, представляет собой цинковую d-аланил-d-аланинкарбоксипептидазу (семейство пептидаз M15) из литического бактериофага ECD7 (NCBI: KY683735.1, *Escherichia coli*), инфицирующего виды *Escherichia*, и N-концевого миелоидного пептида 29 аминокислот (SMAP). Для получения комбинированных ЛФ интерферона использовали субстанции: интерферон альфа-2b (АО «Биннофарм», Россия), даларгин (ООО «Бион», Россия), декспантенол, (BASF, Германия), лидокаин (MAHENDRA CHEMICALS, Индия).

В качестве гелеобразователей применялись следующие полимеры: гидрокиэтилцеллюлоза (ГЭЦ) марок Natrosol 250 ННХ, Natrosol® 250Н, Natrosol® 250G (Ashland, США), гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) марки Benecel K100M (Ashland, США), метилцеллюлоза (МЦ) марки Metolose™SM-100 (Shin-Etsu, Япония), натрий-карбоксиметилцеллюлоза марки (NaКМЦ) Blanose™ СМС (Ashland, США), смесь микрокристаллической целлюлозы и натрий карбоксиметилцеллюлозы NEOCEL®-C11 (MingTai Chemical Co., LTD, Тайвань), полоксамер 407 марки Kolliphor® P 407 (BASF, Германия), карбопол 974 (марки Carborol® 974 P NF, Lubrizol, США). Другие вспомогательные вещества (ВВ), использованные при разработке ЛФ: изопропилмиристант марки Kollicream IPM (BASF, Германия), октилдодеканол марки Kollicream® OD (BASF, Германия), полисорбат 20 (Acros Organics, Бельгия), полисорбат 80 (Acros Organics, Бельгия), полоксамер 188 марки Kolliphor® P 188 (BASF, Германия), метилпарагидроксибензоат (Pharmaffiliates, Индия), маннитол (Shijiazhuang Huaxi pharmaceutical CO.,LTD, Китай), сорбитол (Shijiazhuang Huaxi pharmaceutical CO.,LTD, Китай), натрия хлорид (HiMedia Laboratories, Индия), натрия ацетата тригидрат (NeoFroxx GmbH, Германия), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Angene International, Китай), Трис-НСl буфер (Bio-Rad, США), PBS таблетки для приготовления раствора (phosphate buffered saline, натрий-фосфатный буфер, pH 7,4), (NeoFroxx GmbH, Германия).

Упаковку гелей осуществляли в алюминиевые тубы с мембраной и пластиковыми колпачками, производства компании Yes-Urak, Россия, различного объема.

Экспериментальные данные получены на сертифицированном аналитическом и технологическом оборудовании. Параметры качества ЛФ: описание, pH, стерильность, микробиологическую чистоту (МБЧ), массу содержимого упаковки, бактериальные эндотоксины, осмолярность, механические включения видимые, металлические частицы,

цветность, прозрачность, герметичность упаковки, эффективность антимикробных консервантов, аномальную токсичность, вязкость, растворение, спектр литической активности бактериофагов, подлинность эндолизина методом иммуноэлектрофореза, реакцию нейтрализации противовирусной активности интерферона альфа-2b, специфическую противовирусную активность интерферона альфа-2b, подлинность и количественное определение декспантенола и лидокаина определяли в соответствии с ГФ РФ.

Агрегативную устойчивость ГМЛФ определяли с использованием коэффициента кинетической стабильности по соотношению высоты слоя отделившейся фазы геля после центрифугирования к изначальному слою геля.

Адсорбционную активность образцов гелей оценивали по способности навески геля сорбировать краситель метиленовый синий.

Осмотическую активность изучали гравиметрическим методом.

Высыхаемость гелей оценивали по убыли в массе, происходящей за счет испарения влаги.

Измерение биоадгезивных свойств гелей проводили *ex vivo* методами. Методика 1 – метод потока на наклонной плоскости с использованием модели слизистой оболочки из 4% геля муцина. Замеряли время, за которое образец преодолевал определенное расстояние. Методика 2 – на глазах кроликов. Образцы гелей окрашивали метиленовым оранжевым, наносили на глаз и определяли скорость в миллиметрах в секунду. Методика 3 – по силе отрыва. ЛФ наносили на подложку, обработанную раствором 0,5% муцина. Оценку силы отрыва проводили с использованием рычажного механизма, она рассчитывалась как произведение массы груза, при которой верхний рычаг с закрепленной пластиной отрывался от пластины, закрепленной на столешнице, на ускорение свободного падения.

Намазываемость гелей определяли методом «параллельных пластин».

Степень увлажнения кожи после нанесения ЛФ оценивалась при помощи корнеометра, работающего по принципу биоимпедансного анализа.

Для термореверсивного геля определяли: температуру гелеобразования методом «переворачивания пробирки», прочность геля по времени, потребовавшемуся грузу для преодоления 5 см геля, после его выдерживания в термостате при 37 °С, время гелеобразования по времени, за которое вращение магнита магнитной мешалки при 37 °С и 100 об/мин останавливается.

Оценку вкуса экспериментальных образцов перорального геля проводили по методу А.И. Тенцовой. В эксперименте участвовали 20 добровольцев, которые органолептически исследовали образцы гелей и определяли вкус, выставя каждому образцу баллы от 1 до 5 по четырем критериям: «сладость», «наличие послевкусия», «характер послевкусия», «вкус в целом».

Специфическую активность эндолизина LysECD7-SMAP определяли микробиологическим методом по бактерицидной активности на тест-микроорганизмах: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* TS 50-16, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Подлинность даларгина в ЛФ изучали методом спектрофотометрии, а его количественное содержание методом высокожидкостной хроматографии.

Валидацию аналитических методик контроля качества ЛФ проводили по ГФ РФ.

Изучение стабильности и определение срока годности разработанных ЛФ проводилось в соответствии с ГФ РФ и Решением Коллегии ЕАЭС от 10.05.2018 № 69 "Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций".

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ «SAS» (SAS Institute Inc., USA).

Изучение фармакокинетических показателей перорального геля бактериофагов проводилось на 12 кроликах породы шиншилла, которым перорально вводили по 3 мл геля с бактериофагами, затем отбирали кровь, кал, мочу через определенные интервалы времени и подтверждали присутствие в биоматериале фаговых частиц микробиологическими методами спот-тестом и методом Грация и молекулярно-генетическим методом – полимеразной цепной реакцией.

Изучение безопасности геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP проводили по следующим параметрам: острой токсичности, субхронической токсичности, хронической токсичности, местно-раздражающему действию, алергизирующему действию, иммунотоксичности.

Определение местно-раздражающего действия офтальмологического геля проводили методом конъюнктивной пробы, а геля для наружного и местного применения методом накожных аппликаций на кроликах породы шиншилла.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### **Разработка методологической концепции фармацевтической разработки гидрофильных мягких лекарственных форм с биотехнологическими субстанциями с учетом целевого профиля качества лекарственных препаратов**

На основании литературных данных и результатов собственных исследований сформулирована методология фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими

субстанциями с учетом целевого профиля качества ЛП, представленная на рисунке 1. Фармацевтическая разработка ГМЛФ, должна начинаться с изучения свойств ЛС. Минимальным объемом исследований на данном этапе является изучение физико-химических свойств ЛС, ее растворимость, реактогенность, устойчивость в различных диапазонах рН, термостабильность и т.д.

Следующим этапом является собственно фармацевтическая разработка, которая начинается с определения профиля качества ЛП. Исходя из выбора пути введения, ЛФ, дозировки, объема и вида упаковки, требований по стабильности, для обоснования которых необходимы данные по фармакокинетике и фармакодинамике ЛВ и знания о свойствах ЛС, формирующие показатели качества готовой ЛФ, которые войдут в спецификацию на ЛП. Затем следует определять критические параметры качества ЛП. Важнейшим критическим показателем качества ЛП с биотехнологическими субстанциями является стабильность или деградация ЛВ. Стабильность ЛП определяют по комплексу показателей качества, основным из которых является биологическая активность, от которой зависит терапевтическая эффективность ЛП. В качестве критических показателей следует выбирать не только, те которые регламентируются в соответствии с ГФ РФ или ГФ ЕАЭС, но и те которые могут повлиять на качество препарата или его терапевтические или потребительские свойства. Биотехнологические субстанции в своем большинстве, достаточно нестабильные, поэтому подбор способов стабилизации ЛВ в водном растворе является важнейшей стадией. К этому этапу разработки относится: выбор буферного раствора, стабилизаторов рН, антиоксидантов, стабилизаторов белковой или нуклеотидной структуры и др.

Не менее важным является выбор гелеобразователя, который осуществляют на основе данных о способе применения ЛП, физико-химических свойств ЛВ и совместимости с ЛВ. Причем детерминирующим фактором будет именно совместимость полимера и ЛВ, и стабильность биотехнологической субстанции в присутствии гелеобразователя. Для ЛП требующих стерильности готовой ЛФ выбор основы для её получения ограничен, так как многие гелеобразователи не сохраняют постоянную вязкость после термической стерилизации, стерилизация фильтрованием затруднена из-за высокой вязкости ЛФ. Кроме того, биотехнологические субстанции требуют введения в состав ЛФ солей для создания буферной ёмкости и определенного значения рН, что дополнительно ограничивает выбор полимера. На следующем этапе целесообразно проводить подбор ВВ: формообразующих, загустителей, веществ, обеспечивающих биофармацевтические и терапевтические характеристики препарата, такие как биоадгезивные, осмотически активные компоненты, пролонгаторы, активаторы всасывания. Важным является подбор ВВ, обеспечивающих технологические и потребительские свойства гелей: корригенты вкуса и запаха, консерванты, эмульгенты и увлажняющие агенты.

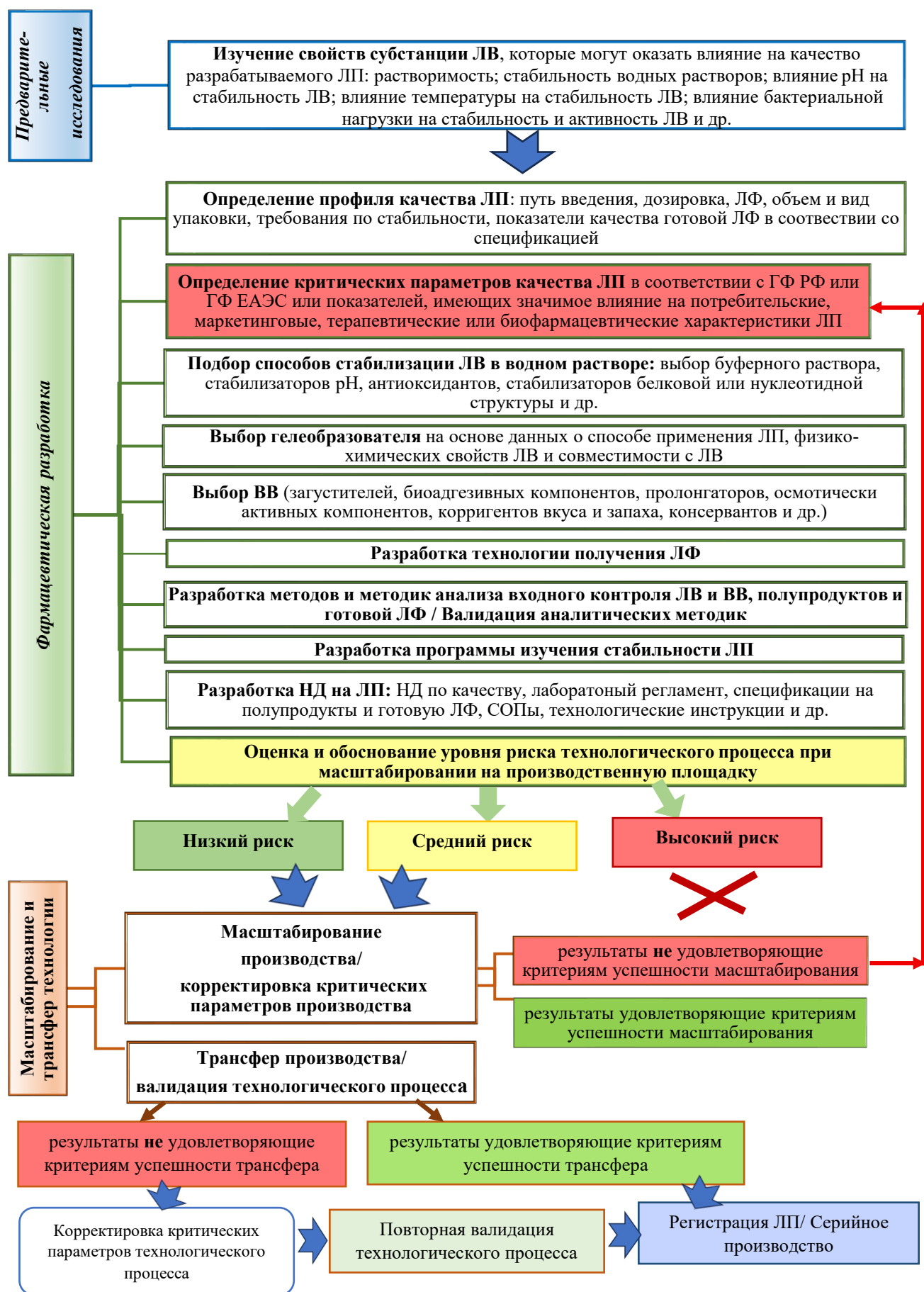


Рисунок 1 – Блок-схема процесса разработки состава и технологии ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями

Параллельно осуществляют разработку технологии получения ЛФ и методов анализа. Под разработкой технологии обычно понимают определение технологических стадий производства, последовательности введения компонентов, диапазоны технологических параметров.

К разработке методов анализа, относится разработка аналитических методик входного контроля ЛВ и ВВ, полупродуктов и готовой ЛФ, также валидация аналитических методик и верификация фармакопейных методов. На основании этих данных разрабатывается документация на ЛП: нормативный документ по качеству, лабораторный регламент, спецификации на полупродукты и готовую ЛФ, стандартные операционные процедуры, технологические инструкции и др. Чаще всего фармацевтической разработку заканчивают на данном этапе составлением отчета в формате общего технического документа для регистрационного досье.

Однако без оценки и обоснования уровня риска технологического процесса для его масштабирования на производственную площадку фармацевтическая разработка не имеет смысла, поэтому данный этап один из ключевых. Нужно понимать, что разработанная технология может быть произведена на конкретной уже существующей производственной площадке или специально для данного продукта сконструированной. После оценки рисков, если он не превышает средний, может быть осуществлен процесс масштабирования и трансфера технологии. Если риск является высоким, то требуется пересмотр критических параметров качества ЛП, который заключается во введении дополнительных критических параметров качества или изменении диапазона их значений, и повторная фармацевтическая разработка. Под масштабированием понимается получение от одной и более серий ЛФ на производственной площадке, корректировка технологических параметров производства для перехода к следующему этапу – трансферу, в течение которого, обычно выпускают не менее трех серий ЛФ и проводят валидацию технологического процесса и очистки оборудования. Несмотря на то, что фармацевтическая разработка заканчивается составлением отчета, конечной целью всего данного процесса должна являться подача регистрационного досье и дальнейшее серийное производство разработанного ЛП.

Для апробации разработанной методологической концепции в качестве объектов исследования выбраны ЛС представляющие собой вирусы и рекомбинантные белки.

Вирусными ЛС являются бактериофаги, хорошо изученные и перспективные для терапии инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью. Одной из актуальных задач является терапия метициллинрезистентного золотистого стафилококка (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, далее – MRSA). Распространенная группа MRSA – клональная группа USA200 (CC30), которая продуцирует токсин синдрома токсического шока-1 (TSST-1), наиболее опасный для беременных женщин и новорожденных детей. Инфекции *S.*

*aureus* трудно поддаются лечению после ее развития, поэтому внедрение в практику использования вагинального геля с бактериофагами даст возможность проведения профилактики и лечения данной инфекции. Еще одной приоритетной задачей является создание препаратов для лечения острых кишечных инфекций, составляющих в общей структуре заболеваний населения 20%. Наиболее часто встречаемыми бактериальными инфекциями данной группы являются сальмонеллез и эшерихиозы. Для этих заболеваний является актуальной разработкой ЛП как для профилактики, так и для лечения. Причем это могут быть препараты для персонализированного подбора фагов, например для пациентов стационаров, а могут быть препараты фиксированного состава для профилактики и лечения диареи путешественников. Штаммы бактериофагов использованные в работе выбраны на основании их широкого спектра литического действия из коллекции лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. У всех штаммов охарактеризованы фенотипические, терапевтические, молекулярно-генетические свойства, они являются производственно-перспективными.

Эндолизин LysECD7-SMAP – это рекомбинантный белок, обладающий широким антибактериальным спектром активности, активным в отношении суспензионных форм патогенов и биопленок. Актуальным является разработка ЛФ для лечения раневых и ожоговых инфекций, терапия которых осложнена антибиотикорезистентностью внутрибольничных инфекций, усугублённая на фоне проводимой Специальной военной операции.

Второй используемый в работе белок – это интерферон альфа-2b, иммуномодулятор, эффективное средство для неспецифической терапии и профилактики вирусных инфекций. Создание комбинированных ЛП с данным ЛС позволит расширить ассортимент препаратов в арсенале врачей и увеличить эффективность терапии за счет комплексного воздействия на патологические звенья заболеваний.

### **Экспериментальное определение реологических оптимумов гидрофильных мягких лекарственных форм для различных путей введения**

При фармацевтической разработке ГМЛФ большое внимание следует уделять изучению их реологических свойств, так как структурно-механические параметры определяют стабильность высокодисперсных систем, к которым относятся гели. Комплексное изучение реологических характеристик представляет как теоретический, так и практический интерес, поскольку они могут быть эффективным и объективным критерием контроля качества на этапе создания, производства, хранения и применения ЛП. Реологические свойства влияют на высвобождение ЛВ, их терапевтическую эффективность, удобство дозирования и нанесения на

кожу или слизистые, а также на производственные процессы, включая процессы перемешивания и дозирования в упаковку.

Было проведено определение реологических оптимумов ГМЛФ для различных путей введения, чтобы опираться на полученные данные при проведении собственных разработок ЛФ и также для получения обобщенных данных по реологии существующих ЛП в данной ЛФ.

Для определения реологических оптимумов дерматологических гелей в исследование включили 25 ЛП на всех типах использующихся гелеобразователей, а именно 15 препаратов на основе карбополов различных марок (Азелик, Кеторол, Троксирутин Ветпром, Венолайф, Метрогил, Диклак, Вольтарен Эмульгель, Флуцинар Быструмгель, Найз, Гепатромбин, Дип Рилиф, Ревма-гель, Диклофенак-Акрихин), 2 на основе полиакриловой кислоты (Долобене, Скинорен), 2 на основе NaКМЦ (Димексид, Солкосерил). комбинации марок карбомеров: карбопол 980 и пемулен (Кармолис), комбинации карбопола и гидроксипропилцеллюлозы (ГПЦ) (Нимесулид), смеси полиакриламида, изопарафина С13-14 и лаурета-7 (Доктор Тайсс Венен сепигель), ГПМЦ (Финалгегель), ГЭЦ (Нурофен Экспресс), ксантановой камеди (Контратубекс), полоксамера 407 (Долгит).

Для изучения офтальмологических гелей проанализировали 10 препаратов, часть из них зарегистрирована как ЛП, а часть как изделия медицинского назначения, это все зарегистрированные в РФ на 2024 год препараты в виде данной ЛФ. В основном в качестве гелеобразователя используется карбопол (Корнерегель, Видисик, Офтагель, Офтан-Тимогель, Декспантель, Блефарогель), в одном препарате NaКМЦ (Солкосерил), в одном камедь (Систейн-гель), в двух натрия гиалуронат (Визмед, Блефарогель) и в одном коллаген (Сферо Око).

При анализе вагинальных гелей было выбрано 13 препаратов, являющихся ЛП и косметическими средствами, что составляет более 95% всего российского рынка вагинальных гелей. В качестве гелеобразователей в составе ЛФ использованы карбопол (Кандид, Метрогил, Праджисан, Крайнон, Миражэль, Блиссель, Фагагин, Биофам), инулин (Сальвагин, Кандинорм), ГЭЦ (Монтавит гель), камедь (Мульти-ГинАктигель) и комплекс пептидогликанов и липотейховой кислоты (Кольпоцид).

Для изучения стоматологических гелей для нанесения на слизистую оболочку ротовой полости выбрано 11 ЛП, что также покрывает более 95% всего российского рынка данных ЛФ. В составе коммерческих стоматологических гелей применяются в качестве полимерной основы карбопол (Метрогил-Дента, Дентамет, Аджиметрил, Гекмет, Метродент, Камистад, Камилидин) и ГЭЦ (Калгель, Дентесгель, Лидокавер, Холисал).

В таблице 1 представлены установленные расчетные оптимумы реологических показателей ГМЛФ для различных путей введения, на рисунке 2 графические оптимумы.

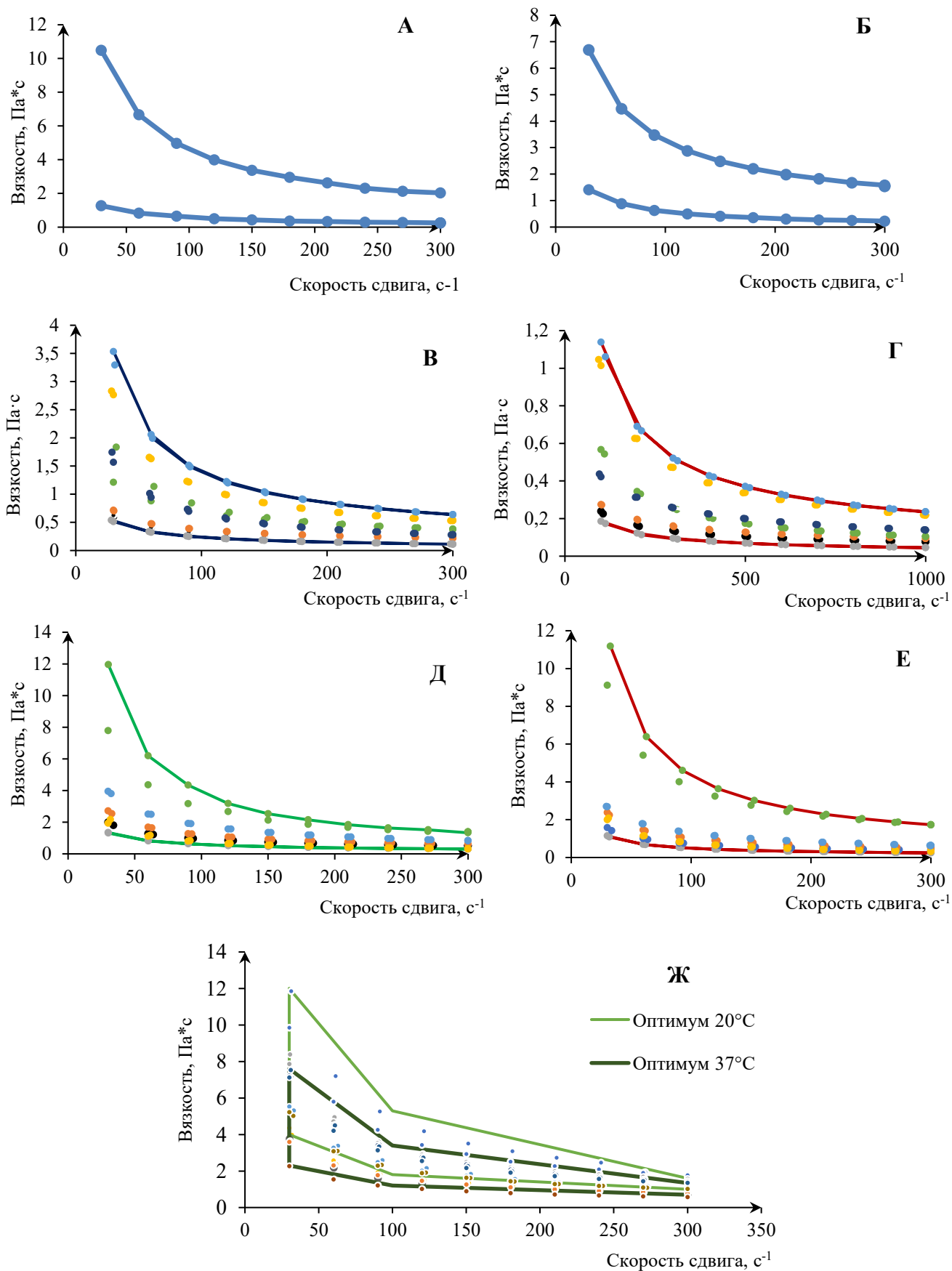


Рисунок 2 – Оптимумы динамической вязкости в диапазоне скоростей сдвига:  
 А – дерматологических гелей, 20 °С; Б – дерматологических гелей, 32 °С; В – офтальмологических гелей, 20 °С; Г – офтальмологических гелей, 37 °С; Д – вагинальных гелей, 20 °С; Е – вагинальных гелей, 37 °С; Ж – стоматологических гелей

Реологические оптимумы определяли, измеряя динамическую вязкость образцов при температурах 20 °С и 32 °С (дерматологические гели) или 37 °С (офтальмологические, вагинальные, стоматологические) в диапазонах скоростей сдвига от 0 до 300 с<sup>-1</sup> для всех типов гелей, кроме офтальмологических, для них в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 1000 с<sup>-1</sup>. Температура 20 °С соответствует условиям производства, 32 °С и 37 °С – условиям применения. Диапазон скоростей сдвига от 0 до 300 с<sup>-1</sup> соответствует условиям производства, значение градиента зависит от объема реактора, типа перемешивающего устройства, частоты вращения и диаметра мешалки, так же эти значения скоростей сдвига соответствуют усилиям при экструзии геля из упаковки и распределению геля по коже или слизистой оболочке. Для офтальмологических гелей напряжение сдвига выше и составляет интервал от 0 до 1000 с<sup>-1</sup>, что соответствует усилию при моргании.

Таблица 1 – Реологические оптимумы ГМЛФ

Показатель Вид ГМЛФ	Динамическая вязкость, Па			
	при температуре			
	20 °С	20 °С	32 °С	32 °С
	скорость сдвига			
дерматологические	при 30 с <sup>-1</sup> 0,90-10,80	при 30 с <sup>-1</sup> 0,15-2,90	при 300 с <sup>-1</sup> 1,40-6,85	при 300 с <sup>-1</sup> 0,18-1,83
	при температуре			
	20 °С	20 °С	37 °С	37 °С
вагинальные	1,30-12,00	0,30-140	1,00-11,00	0,30-1,70
стоматологические	4,00-12,00	2,00-3,00	2,00-7,80	1,10-2,30
	скорость сдвига			
	при 30 с <sup>-1</sup>	при 30 с <sup>-1</sup>	при 1000 с <sup>-1</sup>	при 1000 с <sup>-1</sup>
офтальмологические	0,50-3,50	0,110-0,64	0,17-1,12	0,045-0,25

### Фармацевтическая разработка термореверсивного вагинального геля с коктейлем бактериофагов

Первым этапом разработки ЛФ являются предварительные исследования, посвященные изучению свойств активных фармацевтических субстанций. Штаммы бактериофагов *Staphylococcus phage Sa30*, CH11, SCH1, SCH111, использованные в работе, обладают следующими физико-химическими свойствами: стабильны в диапазоне температур от -20 до 45 °С, наибольшая стабильность наблюдается при pH 6-7, при температуре от 5 до 8 °С в течение 24 месяцев. В соответствии с методологией фармацевтической разработки ГМЛФ следующим этапом должно быть обоснование и подбор стабилизаторов в водном растворе АФС в качестве которого использовали изотонический раствор натрия хлорида. Далее проводили выбор гелеобразователя, для этого изучали возможность использования следующих полимеров: ГЭЦ Natrosol 250 G, Natrosol 250 H, ГМПЦ Benecel K100M, NaКМЦ Blanose™ СМС, полуксамеры

Kolliphor® P 407 и Kolliphor® P 188, карбопол Carbopol® 974 P NF, ПЭГ 3000 и 6000. Провели изучение совместимости ЛВ с ВВ, фаги стабильны в гелях на основе производных целлюлозы, ПЭГ и полоксамеров, но нестабильны в образцах на основе карбопола. титр фагов падал от исходных значений  $10^8$ - $10^7$  БОЕ/мл до  $10^5$ - $10^4$  БОЕ/мл в течение 3 месяцев. Поэтому карбопол из дальнейших исследований исключили.

Затем получали экспериментальные составы вагинальной ЛФ с коктейлем бактериофагов на основе 20% геля полоксамера 407, как терморевверсивного гелеобразователя, с добавлением производных целлюлозы и ПЭГ. Всего проанализировано 24 состава по показателям: описание, рН до и после стерилизации, вязкость до и после стерилизации и агрегативная устойчивость. Почти половина составов была исключена на данном этапе работы, оставшиеся образцы изучали по параметрам: температура гелеобразования (переход золь-гель), время гелеобразования, прочность геля, осмотическая и адсорбционная активность, величина биоадгезии. Был выбран образец, имеющий температуру гелеобразования  $32 \pm 1$  °С, время гелеобразования  $8,5 \pm 1,0$  мин, величину биоадгезии по силе отрыва  $28,2 \pm 1,9$  Н, по скорости стекания  $23,8 \pm 2,6$  мм/мин, осмотическую активность  $249,1 \pm 2,9\%$  за 24 часа и адсорбционную активность  $0,058 \pm 0,005$  мг. Температура гелеобразования определяет переход золь-гель ЛФ, и она должна быть в интервале от 29 до 37 °С, чтобы обеспечивать удобство применения. На рисунке 3 показано изменение вязкости разработанного состава при изменении температуры, видно ее резкое повышение в диапазоне от 30 до 40 °С.

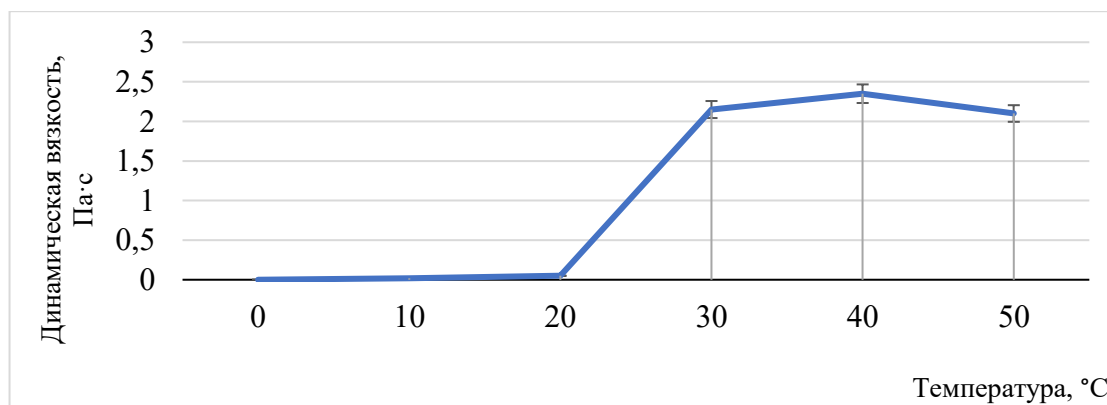


Рисунок 3 – Зависимость вязкости от температуры разработанного состава вагинального геля с коктейлем бактериофагов

Время гелеобразования еще один важный с потребительской точки зрения параметр оптимальным считается время гелеобразования от 7 до 15 минут. Так как разрабатываемая ЛФ предназначена для нанесения на слизистую оболочку влагалища, то значимым параметром выступает биоадгезия. Для вагинальных гелей высокая осмотическая активность может привести к обезвоживанию слизистой оболочки, ощущениям стянутости, дискомфорта, поэтому выбрали образец с минимальным значением данного параметра. Адсорбционная активность гелей

позволяет сорбировать на себе вирусы и бактериальные агенты, однако не должны сорбироваться бактерии нормофлоры, поэтому адсорбционная активность не должна быть очень высокой.

На следующем этапе работы изучали реологические свойства данного образца. Разработанный состав (таблица 2) вагинального геля обладает стабильной вязкостью в процессе хранения, изученной в условиях ускоренных испытаний, достаточной прочностью (предел текучести 152,5 Па) и динамической вязкостью, находящейся в оптимуме для вагинальных гелей (при скорости сдвига  $300 \text{ с}^{-1}$  – от 0,3 до 1,4 Па·с), высокой степенью тиксотропии.

Технология получения вагинального геля с бактериофагами состоит из следующих стадий: подготовка сырья, получение буферного раствора, получение гелевой основы, стерилизация основы, введение в основу стерильной субстанции коктейля бактериофагов, наполнение туб и укупорка, маркировка, вторичная упаковка. Технологические стадии производства показаны на рисунке 4.

Таблица 2 – Состав вагинального геля с коктейлем бактериофагов

Компоненты	Содержание на 1 г
<i>Действующее вещества</i>	
Фаголизат коктейля стафилакокковых фагов Sa30, CH11, SCH1	не менее $10^7$ БОЕ каждого бактериофага
<i>Вспомогательные вещества</i>	
Гидроксиэтилцеллюлоза марки Natrosol® 250 G	0,015 г
Полоксамер Kolliphor® P 407	0,2 г
Натрия хлорид	0,9 мг
Вода для инъекций (ВДИ)	до 1,0 г

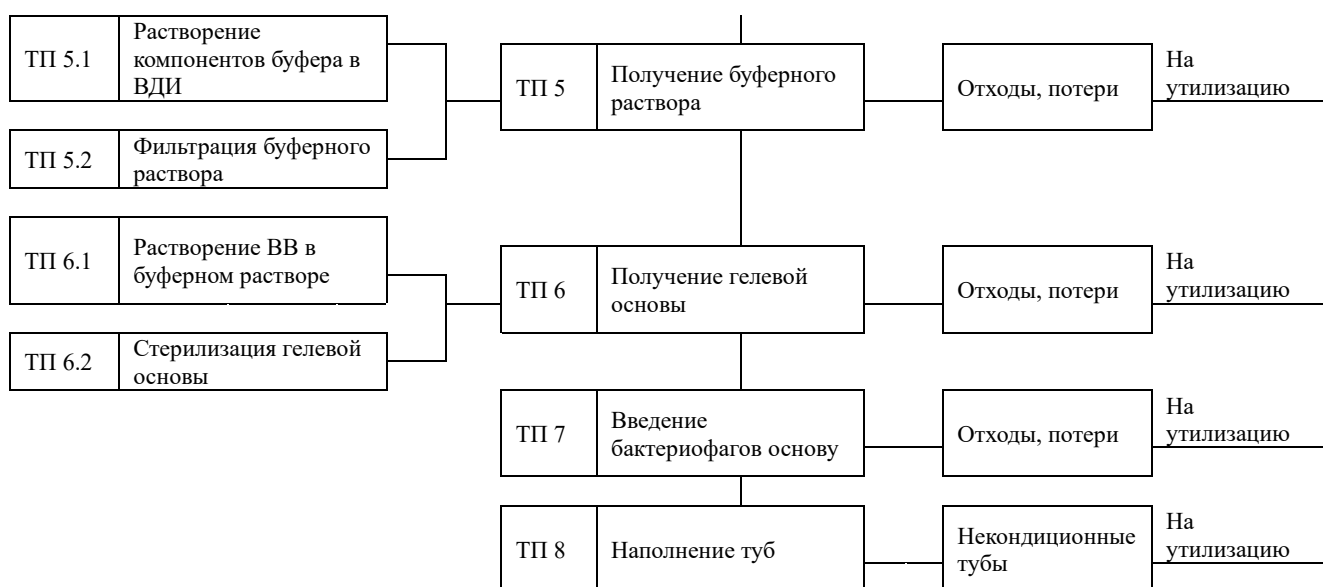


Рисунок 4 – Фрагмент технологической схемы (стадии ТП) получения геля для вагинального применения с коктейлем бактериофагов

В таблице 3 приведен проект спецификации «Геля для вагинального применения с коктейлем бактериофагов, 30 г».

Определен срок годности разработанного вагинального геля в рамках долгосрочных и ускоренных испытаний, который составил 2 года. Изучена стабильность ЛФ после вскрытия упаковки в течение 1 недели в условиях хранения  $5\pm 3$  °С на двух сериях препарата.

Кроме того, оценены риски при масштабировании технологического процесса и показано, что они являются низкими или средними, и, таким образом, разработанная технология может быть воспроизведена как во внутрибольничной аптеке, так и на промышленном производстве.

Таблица 3 – Проект спецификации «Гель для вагинального применения с коктейлем бактериофагов, 30 г»

Показатели качества	Нормы (допустимые пределы)	Ссылки на методы испытаний
Описание	Однородный бесцветный или с желтоватым оттенком слегка опалесцирующий гель, не содержащий видимых частиц	Визуальный ГФ РФ ОФС.1.4.1.0008 МЛФ
Идентификация:	Препарат должен специфически лизировать бактерии <i>Staphylococcus epidermidis</i> и/или <i>Staphylococcus aureus</i> (в зависимости от фагового состава коктейля)	Метод Аппельманна ГФ РФ ОФС 1.7.1.0002.15 Бактериофаги лечебно-профилактические
рН	От 6,0 до 7,0	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004 Ионометрия»
Специфическая активность	Препарат должен лизировать бактерии <i>Staphylococcus epidermidis</i> и/или <i>Staphylococcus aureus</i> (в зависимости от фагового состава коктейля) в разведении не менее $10^7$ в 1 г	Метод Грация ГФ РФ ОФС 1.7.1.0002.15 Бактериофаги лечебно-профилактические
Стерильность	Препарат должен быть стерильным	Метод мембранной фильтрации ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15
Аномальная токсичность	Должен быть нетоксичен	Биологический ГФ РФ ОФС.1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность
Бактериальные эндотоксины	Не более 100 ЕЭ/доза	Гель-тромб тест (метод А) ГФ РФ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины
Масса содержимого упаковки	Не менее 28,5 г	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007 Масса (объем) содержимого упаковки
Герметичность упаковки	На фильтровальной бумаге и ни на одной из 10 туб не должно быть подтеков содержимого. Если наблюдаются подтеки хотя бы на одной из 10 первоначально отобранных туб, то дополнительно проводят испытание еще с 20 тубами	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0025 Определение герметичности упаковки

### Фармацевтическая разработка состава и технологии перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

В рамках предварительных исследований были изучены физико-химические свойства бактериофагов *Escherichia phage* ECD7, V18, Ec13-52, Ec732, *Salmonella phage* FG1m, FM4b, SE40, ST11, а именно влияние температуры и рН на стабильность субстанций. Данные штаммы

стабильны в диапазоне рН от 6-8, и при температуре от 20 °С до 37 °С в течение 30 суток, при температуре от 5 до 8 °С в течение 24 месяцев. Для стабилизации так же, как в вагинальном геле использован изотонический раствор натрия хлорида.

Следующим этапом разработки состава перорального геля с коктейлем бактериофагов является изучение совместимости ЛВ и ВВ. В качестве гелеобразователей использовали смесь МЦ и NaКМЦ марки NEOCEL®-С11, ГМПЦ марки Venecel К100М и NaКМЦ марки Vlanose™ СМС. Полиолы (маннитол, сорбитол, ксилитол) в составе ЛФ выступают как в роли подсластителей, так и компонентов основы, которые значимо влияют консистенцию ЛФ. ЛВ стабильны в присутствии всех выбранных ВВ. Затем проводили первичный скрининг 36 полученных экспериментальных образцов перорального геля на основе изучения следующих показателей качества: описания, рН до и после стерилизации, пластической вязкости до после стерилизации, коэффициента агрегативной устойчивости. 20 составов было отсеяно на данном этапе работы. У отобранных образцов изучали вкусовые характеристики и консистенцию, которые играют решающую роль при определении потребительских и маркетинговых характеристик препарата, предназначенных для приема внутрь. Образцы на основе NEOCEL®-С11 и Venecel К100М имели не удовлетворительную консистенцию, и добровольцы не высоко оценили вкус образцов (3,0-3,4). Среди образцов на основе NaКМЦ лучшими вкусовыми свойствами обладали образцы с сорбитолом. На основании изучения стабильности реологических показателей был выбран образец с содержанием сорбитола 15%, динамическая вязкость которого составила  $2,78 \pm 0,06$  Па·с. Вкусовые характеристики разработанного состава отражены на рисунке 5.

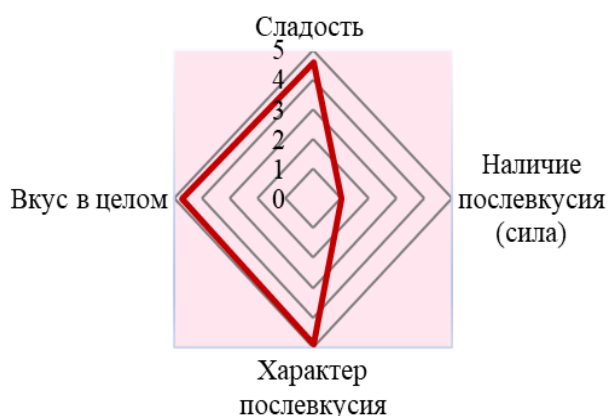


Рисунок 5 – Оценка вкуса перорального геля с коктейлем бактериофагов

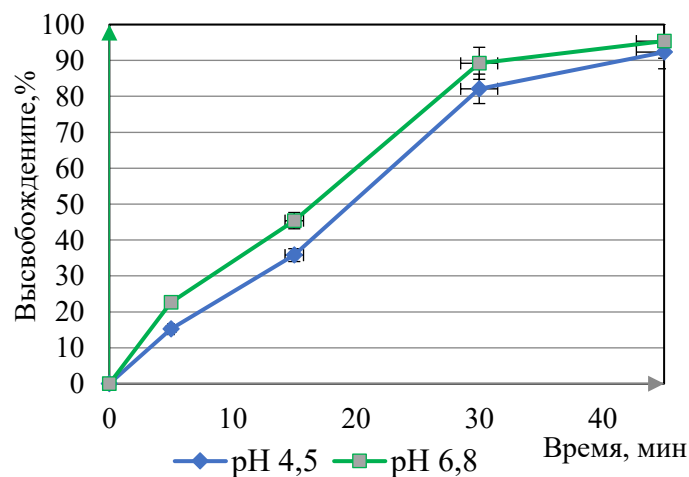


Рисунок 6 – Высвобождение бактериофагов из перорального геля в средах растворения

Для полученного образца перорального геля изучали кинетику растворения на приборе «Качающаяся корзинка» в двух средах: буферном ацетатном растворе рН 4,5 и фосфатном

буферном растворе рН 6,8 (рисунок 6). Несмотря на то, что изучение растворения для пероральных гелей необязательно, представляло интерес поведение геля в условиях, имитирующих желудочно-кишечную среду. Бактериофаги не стойки в кислой среде желудка, в растворе хлористоводородной кислоты теряют активность достаточно быстро, поэтому при терапии рекомендуется за 15-30 минут до приема применять антацид. В буферных растворах рН 4,5 и рН 6,8 высвобождение ЛВ происходит по схожей динамике, и через 30 минут превышает 80%.

На основе проведенных исследований разработаны составы (таблица 4) перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций: 1 вариант постоянного или переменного состава для персонализированной терапии и 2 вариант постоянного состава для профилактики и лечения диареи путешественников.

Таблица 4 – Составы перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

<b>Вариант 1</b>	
<b>Компоненты</b>	<b>Содержание на 1 г</b>
<i>Действующее вещества</i>	
Фаголизат коктейля против <i>Salmonella spp</i> : FG1m, FM4b, SE40, ST11 или Фаголизат коктейля против <i>Escherichia coli</i> : ECD7, V18, Ec13-52, Ec732	не менее 10 <sup>7</sup> БОЕ каждого бактериофага
<i>Вспомогательные вещества</i>	
Натрий-карбоксиметилцеллюлоза марки Blanose™ СМС	0,05
Сорбитол производства Shijiazhuang Huaxu pharmaceutical CO., LTD	0,15
Натрия хлорид	0,9 мг
Вода для инъекций	до 1,0 г
<b>Вариант 2</b>	
<b>Компоненты</b>	<b>Содержание на 1 г</b>
<i>Действующее вещества</i>	
Фаголизат коктейля <i>Salmonella spp</i> : FG1m, FM4b, ST11 и против <i>Escherichia coli</i> Ec13-52, Ec732	не менее 10 <sup>7</sup> БОЕ каждого бактериофага
<i>Вспомогательные вещества</i>	
Натрий-карбоксиметилцеллюлоза марки Blanose™ СМС	0,05
Сорбитол производства Shijiazhuang Huaxu pharmaceutical CO., LTD	0,15
Натрия хлорид	0,9 мг
Вода для инъекций	до 1,0 г

Технология получения перорального геля с бактериофагами состоит из тех же стадий, что и вагинального геля. Аналогично были проведены исследования стабильности ЛФ и срок годности разработанного перорального геля составил 2 года. Также были оценены риски при масштабировании технологического процесса и показано, что они являются низкими или средними. Изучены фармакокинетические показатели перорального геля, доказано наличие системного действия разработанной ЛФ.

В спецификацию на пероральный гель с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций, включен тот же перечень показателей качества, что и на вагинальный гель с бактериофагами: описание, идентификация, рН, специфическая активность, стерильность, аномальная токсичность, бактериальные эндотоксины, масса содержимого упаковки, герметичность упаковки.

### **Разработка геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LYSECD7-SMAP**

Результаты совместного изучения с лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи физико-химических свойств ЛС эндолизина LysECD7-SMAP показали, что субстанция крайне чувствительна к температуре и стабильна в течение 30 суток при температурах - 20 °С и 2-8 °С, при комнатной температуре через сутки теряет активность, температуре тела через 2-2,5 часа. Эндолизин LysECD7-SMAP наиболее стабилен при рН 7-8.

Начальным этапом разработки состава геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP являлся выбор гелевой основы, а не стабилизаторов. Разработчики субстанции провели выбор буферного раствора, в котором белок наиболее стабилен и в работе он был взят за основу. На момент начала разработки полноценные данные о стабильности субстанции отсутствовали, и было высказано предположение, что введение в гелевую основу повысит стабильность ЛВ, что было затем подтверждено, поэтому разработку начали именно с выбора основы. В качестве гелеобразователей рассматривали возможность использования следующих полимеров: ГМПЦ, ГЭЦ, ПЭГ 1500, 3000 и 6000, полуксамера 407. Первое требование к ВВ это отсутствие влияние на активность ЛВ. Активность эндолизина была стабильна в растворах с ГМПЦ 0,75-1,5%, ГЭЦ 0,75-1,5% и ПЭГ 1500 1%, в растворах с другими полимерами активность белка падала через сутки или в процессе хранения в течение 1 месяца. На основании полученных результатов получили 18 составов экспериментальных образцов гелей. Эти составы были проанализированы по следующим параметрам: описание ЛФ, рН до стерилизации, после стерилизации, вязкость до стерилизации и после стерилизации, осмотическая и адсорбционная активность, агрегативная стабильность. Основным параметром, по которому отсеялось большинство образцов, это не соответствие нормам рН (7,0-8,0) и сильное падение значения вязкости более чем на 50% после стерилизации. Выбранный образец обладает стабильным значением рН, на которое не влияет процесс стерилизации (рН 7,4 ±0,1 до стерилизации и 7,3±0,1 после), стабильной вязкостью (0,159 Па·с до стерилизации и 0,168 Па·с после), максимальным значением осмотической (121±2,1% через 24 часа) и адсорбционной

активности ( $0,058 \pm 0,009$  мг), низким значением коэффициента агрегативной устойчивости (0%), значением вязкости ( $0,168$  Па·с) удобным как для нанесения на раны ЛФ, так и возможным для введения в раны через катетеры. Затем изучали стабильность полученного состава, и она составила 6 месяцев, что посчитали недостаточным и на следующем этапе работы провели подбор дополнительных стабилизаторов. На основании литературных данных в качестве стабилизаторов изучали возможность введения в состав полисорбата 20 в диапазоне концентраций 0,03-0,3 мг и полоксамера 188 в диапазоне концентраций 2,0 – 8,0 мг. Стабильность препарата удастся увеличить включением в состав полисорбата 20 в концентрации от 0,06% (таблица 5). Так как, существенной разницы между стабильностью гелей с полисорбатом 20 в концентрациях 0,06, 0,12 и 0,3% нет, то использовали в дальнейших исследованиях минимальную концентрацию

Таблица 5 – Изучение влияния стабилизаторов на специфическую активность образцов геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP (ускоренные испытания, температура  $25 \pm 2$  °С, относительная влажность  $60 \pm 5$  %)

Время	Активность эндолизина в присутствии ВВ, %											
	7 суток			14 суток			21 сутки			28 суток		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Полисорбат 20 0,03	97,5±2,5	96,5±1,6	53,2±2,2	75,4±0,5	65,3±0,3	32,0±0,4	60,2±1,3	56,2±1,2	25,6±0,5	35,6±1,0	24,5±0,5	11,8±0,9
Полисорбат 20 0,06	93,6±1,3	96,4±1,2	54,6±0,3	80,2±1,0	82,6±0,3	41,5±1,4	75,6±0,9	79,2±1,5	29,2±1,4	42,5±1,0	43,6±0,5	12,2±1,0
Полисорбат 20 0,12	99,5±0,5	98,9±1,4	65,4±1,4	88,9±0,4	87,5±1,2	42,1±1,1	68,4±1,0	76,6±1,2	26,5±0,4	45,2±1,2	32,5±1,4	9,4±1,2
Полисорбат 20 0,30	99,2±1,4	97,5±1,2	60,2±1,0	89,8±0,9	86,5±0,4	48,5±1,4	68,9±0,5	65,2±1,8	25,8±0,9	37,5±2,5	44,5±1,2	13,2±2,4
Полоксамер 188 3,0	97,5±1,5	96,8±1,9	60,4±2,4	55,5±1,4	61,5±1,2	16,1±1,5	40,4±1,5	41,1±1,3	10,5±1,4	12,2±2,2	11,5±1,4	5,4±2,2
Полоксамер 188 5,0	98,9±1,4	97,9±1,2	58,2±1,3	65,8±1,9	63,5±1,4	25,5±1,4	41,9±0,5	35,5±1,8	15,8±1,9	13,5±1,5	12,5±2,2	3,2±2,0
Полоксамер 188 8,0	98,7±0,5	99,69±1,0	52,6±1,4	67,5±1,2	68,2±0,5	21,2±0,3	30,4±1,7	33,9±0,4	11,8±0,4	15,4±0,4	14,6±0,5	10,1±0,9

На основе проведенных исследований разработан состав геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP, приведенный в таблице 6.

Отработана технология получения ЛФ в лабораторных условиях состоящая из стадий: подготовки ЛВ и ВВ, получения буферного раствора, гелевой основы и ее стерилизации,

введения субстанции эндолизина LysECD7-SMAP в основу, упаковки и маркировки в первичную и вторичную тару. Разработан проект спецификации ЛФ (таблица 7).

Таблица 6 – Состав геля с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

Компоненты	Содержание на 1 г
<i>Действующее вещества</i>	
Рекомбинантный модифицированный эндолизин LysECD7-SMAP	20 мг/г
<i>Вспомогательные вещества</i>	
Гидроксиэтилцеллюлоза марки Natrosol® 250 ННХ	0,01 г
Полиэтиленгликоль 1500	0,015гг
Полисорбат 20	0,06 мг
Фосфатный буферный раствор pH 7,5, PBS, сух.	0,725 мг
Вода для инъекций	до 1,0 г

Таблица 7 – Проект спецификации «Гель бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP, 30 г»

Показатели качества	Нормы (допустимые пределы)	Ссылки на методы испытаний
Описание	Однородный бесцветный прозрачный гель, не содержащий видимых частиц	Визуальный ГФ РФ ОФС.1.4.1.0008 МЛФ
Идентификация:	Образует линию преципитации с антисывороткой специфичной к эндолизины LysECD7-SMAP)	Иммуноэлектрофорез ГФ РФ ОФС.1.8.2.002.15 Иммуноэлектрофорез в агаровом геле
pH	От 7,0 до 8,0	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004 Ионометрия
Специфическая активность	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Не менее 80%
	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	Не менее 80%
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Не менее 30%
Стерильность	Препарат должен быть стерильным	Метод мембранной фильтрации ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15
Аномальная токсичность	Должен быть нетоксичен	Биологический ГФ РФ ОФС.1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность
Бактериальные эндотоксины	Не более 100 ЕЭ/доза	Гель-тромб тест (метод А) ГФ РФ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины
Масса содержимого упаковки	Не менее 28,5 г	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007 Масса (объем) содержимого упаковки
Герметичность упаковки	На фильтровальной бумаге и ни на одной из 10 туб не должно быть подтеков содержимого. Если наблюдаются подтеки хотя бы на одной из 10 первоначально отобранных туб, то дополнительно проводят испытание еще с 20 тубами	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0025 Определение герметичности упаковки

Проведена оценка рисков масштабирования технологии, которая показала низкие и средние значения рисков, следовательно, возможность трансфера технологии из лаборатории на

производственную площадку. Показана стабильность разработанной ЛФ в течение 18 месяцев, что увеличило срок годности ЛС в три раза по сравнению с ранее полученными результатами.

В ходе проведения доклинических исследований изучена острая, субхроническая, хроническая токсичность, реактогенность и аллергенность, иммунотоксичность, направленные на оценку безопасности геля, содержащего в своем составе рекомбинантный белок LysECD7-SMAP. Было установлено, что эндолизин в дозировке 20 мг/г не оказывает негативного воздействия на функционирование внутренних органов и жизненно важных систем организма животных, участвовавших в эксперименте. Кроме того что в процессе исследований не было зафиксировано никаких отсроченных реакций, а также отсутствовали побочные токсические эффекты, которые могли бы возникнуть в результате применения этого препарата в клинических условиях. Эти данные открывают новые перспективы для дальнейших исследований и возможного клинического применения геля на основе LysECD7-SMAP.

### **Фармацевтическая разработка комбинированного офтальмологического геля с интерфероном альфа-2b и даларгином**

На основе литературных данных о терапевтическом применении ЛВ в офтальмологии предлагается следующий состав действующих веществ офтальмологического геля, не менее 50 тыс. МЕ интерферона альфа-2b и 0,5 мг даларгина в одном грамме ЛФ. Разработку ЛФ проводили на основании предложенной методологии, оценивали возможность как масштабирования, так и трансфера ЛП на производственную площадку АО «Биннофарм». Для разработки данного ЛС предварительные исследования не проводили, так как физико-химические свойства данных субстанций хорошо известны, и в процессе производства использована субстанция, синтезированная АО «Биннофарм», для которой изучены факторы влияющие на ее стабильность. Субстанция интерферона альфа 2b наиболее устойчива при рН в диапазоне от 5,5 до 7,0, температура хранения 2-8 °С 1 год, при комнатной температуре стабильна в течение 24 часов. Субстанция даларгина термостабильна, оптимальные значения рН от 5,5- 7,5.

На первом этапе исследования необходимо оценить совместимость действующих веществ. Для оценки специфической активности интерферона в ЛФ необходимо убедиться в отсутствии цитотоксического действия даларгина на линию клеток Vero, для этого в лунки планшета с приготовленным слоем клеток, вносят раствор даларгина и инкубируют, а затем под микроскопом оценивают цитотоксический эффект в сравнении контролем (рисунок 7).

Разницы в количестве и плотности клеток в лунках с контролем и испытуемым раствором не наблюдалось, таким образом даларгин не обладает цитотоксичностью и не препятствует оценке специфической активности интерферона. Затем изучали стабильность раствора, содержащего интерферон и даларгин в ацетатном буферном растворе при хранении в течение 30

суток, температура 5 °С, продемонстрировано отсутствие влияния компонентов на их стабильность.

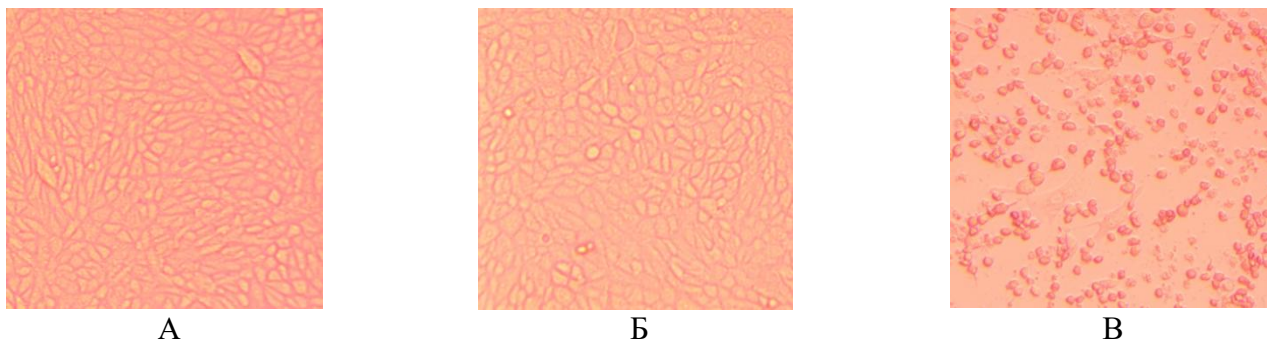


Рисунок 7 – Лунки с монослоем клеток линии Vero при увеличении в 100 раз: А- контроль, Б- раствор даларгина 0,5 мг/мл . В - повреждение во всех лунках повтора, монослой клеток уничтожен

Для выбора гелеобразователя необходимо подтвердить отсутствие у них цитотоксического действия, для этого изучали влияние на клетки МЦ, ГЭЦ и ГМПЦ различных концентраций. Выбор стабилизаторов не проводили, были использованы те, что подобраны АО «Биннофарм» для субстанции интерферона, а именно: ЭДТА и ацетатный буферный раствор. Для лабораторной разработки использовали многодозовую упаковку, однако, для промышленного производства предлагаем использовать однодозовые буфусы или флаконы-капельницы с помпой, поэтому в состав ЛФ консерванты не вводили. У всех марок гелеобразователей: МЦ марки Metolose™ SM-100 в концентрациях 0,5-1,0%, ГЭЦ марок Natrosol® 250ННХ, Natrosol® 250G и Natrosol® 250Н в концентрациях 0,5-1,5 % и ГМПЦ марки Benecel™ К100М в концентрации 0,5-1,5% цитотоксическое действие на линию клеток Vero отсутствует. На основании этих результатов получили 20 экспериментальных образцов, которые анализировали по следующим показателям: внешний вид/описание, цветность, прозрачность, рН до и после стерилизации, вязкость до и после стерилизации и коэффициент агрегативной стабильности. 8 образцов было отсеяно на данном этапе разработки. Для оставшихся образцов изучали осмотическую активность, стабильность вязкости в процессе ускоренного хранения в течение 3 месяцев при 20 °С, предел текучести и соотносили эти данные реологическими оптимумами для офтальмологических гелей. Выбрали состав геля интерферона альфа-2b и даларгина со стабильным значением рН (до стерилизации  $6,33 \pm 0,12$ , после стерилизации  $6,59 \pm 0,12$ ), стабильной вязкостью (до стерилизации 0,136 Па·с, после стерилизации 0,134 Па·с), входящей в реологический оптимум для офтальмологических гелей, пределом текучести 9,64 Па, высокой степенью тиксотропии. Определяющим параметром для офтальмологических гелей является биоадгезия. Поэтому проводили сравнительный анализ данных характеристик разработанного состава и коммерческих ЛП (таблица 8), который показал преимущество комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина и по скорости потока и по силе

отрыва (0,025-0,031 мм/с, интервал значений скорости потока, измеренной при разных условиях;  $118,6 \pm 2,9$  Н с, сила отрыва).

На следующем этапе исследования изучали высвобождение ЛВ из комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина (рисунок 8). Результаты теста демонстрируют, что высвобождение ЛВ из ЛФ замедленно и достаточное полное.

Таблица 8 – Сравнение значений биоадгезии коммерческих ЛП и разработанной ЛФ

Образец	Скорость потока 20 °С, мм/с (имитация слизистой)	Скорость потока 37 °С, мм/с (имитация слизистой)	Скорость потока, мм/с (глаза кроликов)	Сила отрыва, Н
гель интерферона альфа-2b и даларгина	$0,031 \pm 0,004$	$0,025 \pm 0,003$	$0,023 \pm 0,003$	$118,6 \pm 2,9$
Солкосерил®	$0,421 \pm 0,013$	$0,301 \pm 0,012$	$0,361 \pm 0,011$	$25,8 \pm 0,9$
Офтагель®	$0,038 \pm 0,006$	$0,028 \pm 0,007$	$0,044 \pm 0,005$	$97,5 \pm 1,5$
Видисик®	$0,981 \pm 0,025$	$1,012 \pm 0,023$	$1,522 \pm 0,121$	$10,2 \pm 0,8$
Лакропос®	$1,121 \pm 0,091$	$1,221 \pm 0,085$	$1,453 \pm 0,099$	$12,4 \pm 0,6$
Корнерегель®	$0,359 \pm 0,025$	$0,389 \pm 0,022$	$0,325 \pm 0,019$	$32,5 \pm 1,1$
Декспантель®	$0,281 \pm 0,018$	$0,329 \pm 0,017$	$0,126 \pm 0,009$	$44,2 \pm 0,5$

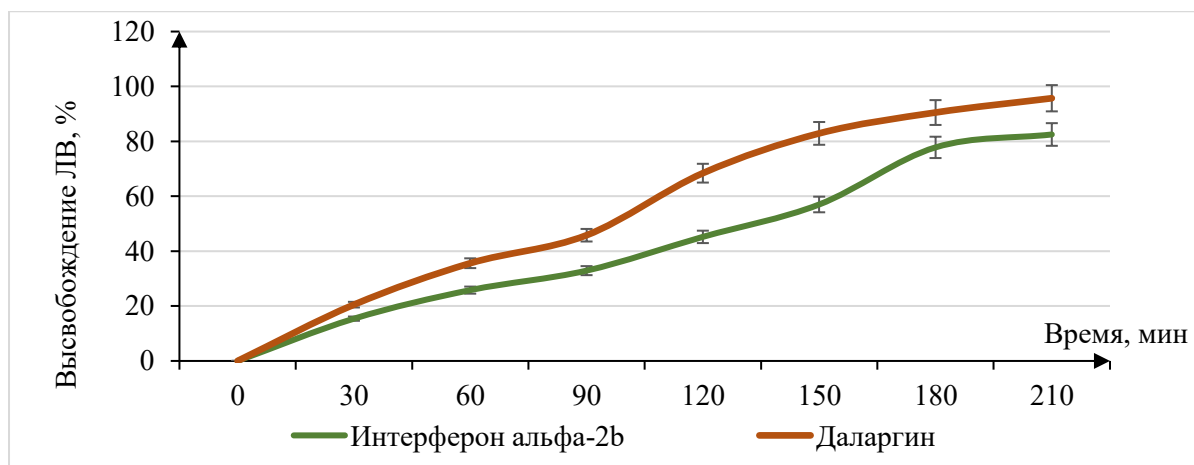


Рисунок 8 – Зависимость концентрации ЛВ (интерферона и даларгина) в среде искусственной слезной жидкости от времени

На основании проведенных исследований выбран состав ЛФ, указанный в таблице 9.

Разработана технологическая схема получения ЛФ, состоящая из следующих основных стадий: подготовки сырья, получения гелевой основы, включающей получение буферного раствора, растворение гелеобразователя в буферном растворе и стерилизацию гелевой основы, получение раствора даларгина в две стадии: растворение даларгина в буферном растворе и фильтрование раствора даларгина через фильтр 0,22 мкм, введение в основу раствора даларгина и интерферона, наполнение туб и маркировка и вторичная упаковка. Показана возможность

трансфера разработанной технологий и её масштабирования, подобраны параметры процессов производства.

Изучена стабильность разработанных ЛФ в естественных условиях хранения, оценено влияние хранения при комнатной температуре в течение 24 часов на стабильность ЛФ, влияние стресс-факторов на стабильность ЛФ. Срок годности комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина составил 2 года.

Таблица 9 – Состав комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

Компоненты	Содержание на 10 г
<i>Действующее вещества</i>	
Интерферон $\alpha$ -2b	3,5 мкг (500000 МЕ)*
Даларгин	5 мг
<i>Вспомогательные вещества</i>	
Гидроксиэтилцеллюлоза марки Natrosol® 250 ННХ PHARM	0,125 г
Натрия хлорид	0,058 г
Натрия ацетат тригидрат	0,02 г
Дигидрат динатриевой соли этилендиамина тетрауксусной кислоты	0,00058 г
Вода очищенная	до 10,0 г
*- Номинальное содержание, выраженное в мкг, указано из расчета минимально допустимой удельной активности субстанции интерферона альфа-2b	

Были разработаны методы анализа комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2 и даларгина и спецификация на готовую ЛФ (таблица 10).

Таблица 10 – Проект спецификации «Офтальмологический гель интерферона альфа-2b и даларгина 500 тыс. МЕ + 4,0 мкг, 10 г»

Показатели качества	Нормы (допустимые пределы)	Ссылки на методы испытаний
Описание	Прозрачный бесцветный гель, не содержащий видимых частиц	Визуальный ГФ РФ ОФС.1.4.1.0008 МЛФ
Идентификация: Интерферона альфа -2b Даларгина	Реакция нейтрализации. Соответствует интерферону человеческого альфа-типа  Спектрофотометрия в среде искусственной слезной жидкости в диапазоне от 250 до 300 нм при длине волны $275 \pm 2$ нм должен наблюдаться максимум ВЭЖХ должен наблюдаться пик соответствующий стандарту даларгина	ГФ РФ ОФС.1.7.2.0002.15 Биологический метод. Реакция нейтрализации противовирусной активности ГФ РФ ОФС.1.2.1.1.0003 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0005 ВЭЖХ
Прозрачность	Препарат должен быть прозрачным	Визуальный ГФ РФ ОФС.1.2.1.0007 Прозрачность и степень опалесценции
Осмолярность	239–376 мОсм/л.	ОФС.1.2.1.0003 Осмолярность
pH	От 6,0 до 7,0	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004 Ионометрия

Продолжение таблицы 10

Показатели качества	Нормы (допустимые пределы)	Ссылки на методы испытаний
Механические включения -видимые невооружённым глазом	В соответствии с требованиями. Частиц размером 10 мкм и более – не более 6000 в тубе	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0005.18 Визуальный
Стерильность	Препарат должен быть стерильным	Метод прямого посева ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15
Вязкость	0,120-0,145 Па·с	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0015 Вязкость
Специфическая активность	Не менее 50000 МЕ в 1 г	ГФ РФ ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток
Количественное определение даларгина	0,475 – 0,525 мг в 1 г	ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0005 ВЭЖХ
Металлические частицы	В соответствии с требованиями ОФС. Общее число частиц размером 50-90 мкм в 30 тубах не должно превышать 150 частиц. Не допускается наличие частиц размером более 90 мкм.	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0023 Металлические частицы в мазях глазных
Масса содержимого упаковки	Не менее 9,5 г	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007 Масса (объём) содержимого упаковки
Герметичность упаковки	На фильтровальной бумаге и ни на одной из 10 туб не должно быть подтеков содержимого. Если наблюдаются подтеки хотя бы на одной из 10 первоначально отобранных туб, то дополнительно проводят испытание еще с 20 тубами	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0025 Определение герметичности упаковки

Оценена интенсивность местно-раздражающего действия комбинированного офтальмологического геля интерферона и даларгина на слизистую оболочку глаза экспериментальных животных и его действие соответствует «слабому или отсутствует», то есть разработанный офтальмологический гель не обладает местно-раздражающим действием.

### **Фармацевтическая разработка комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения**

При разработке комбинированного ЛП выбирали компоненты, которые способны ускорять процесс заживления и уменьшать боль. В качестве ранозаживляющего компонента в состав ЛФ вводили декспантенол, для снятия болезненных ощущений лидокаин, концентрации подобраны на основе литературных данных. Также как и для офтальмологического геля первым этапом исследования стала оценка совместимости интерферона альфа-2b и действующих

веществ: декспантенола и лидокаина. Для этого изучали наличие цитотоксического действия линии клеток Vero растворов ЛВ. Монослой клеток линии Vero не продемонстрировал признаков токсичности и дегенерации, таким образом декспантенол и лидокаин в концентрации, в которой они входят в состав разрабатываемой ЛФ, цитотоксического действия не оказывают. Следующим этапом стало изучение стабильности раствора, содержащего интерферон и ЛВ в ацетатном буферном растворе, для предварительной оценки влияния ЛВ на специфическую активность интерферона, как самого критического показателя ЛФ. Растворы хранили 30 суток при температуре 5° С. Результаты, демонстрируют отсутствие влияния компонентов на стабильность ЛВ.

Получали экспериментальные образцы гелей, в качестве гелеобразователей использовали ГЭЦ различных марок, которые были выбраны на основе предыдущих исследований по разработке офтальмологического геля. Вводили в состав модификаторы вязкости - ПЭГ различной молекулярной массы. ПЭГ обладают высокой адсорбционной и осмотической активностью, хорошими окклюзионными свойствами, собственным антибактериальным эффектом. Однако ГЭЦ и ПЭГ создают на коже ощущение липкости. Чтобы его снизить в состав вводили изопропилмиририлат марок Kollicream® IPM и Kollicream® OD, это эмульгаторы, которые способны увеличивать проницаемость кожи для лучшей доставки ЛВ в очаг поражения. Так как упаковка предполагается многодозовая, то вводили в состав консервант метилпарагидроксибензоат. Этот консервант обладает широким спектром действия, эффективен в концентрации от 0,05 до 0,4 % и стабилен и функционален при рН от 4 до 8,0. В качестве стабилизаторов рН и стабилизатора для белковой молекулы интерферона, по аналогии с офтальмологическим гелем, использовали ацетатный буферный раствор и ЭДТА. Изучали цитотоксическое действие ЛВ в различных концентрациях на линию клеток Vero. Kollicream® OD и ПЭГ 6000 обладают токсическим действием на клетки и их из исследований исключили. Получили 33 экспериментальных образца геля, которые оценивали по параметрам: внешний вид/описание, рН, вязкость и коэффициент агрегативной стабильности. 9 составов были исключены вследствие несоответствия требованиям. Следующим этапом исследования стало изучение технологических и потребительских параметров качества гелей: реологических характеристик, осмотической и адсорбционной активности, степени увлажнения, высыхаемости, намазываемости и биоадгезии.

Разрабатываемый гель планируется в первую очередь для лабиального применения и на слизистую оболочку ротовой полости, так же его можно будет наносить наружно на половые органы при генитальном герпесе. Таким образом, ЛФ должна одновременно обладать хорошими окклюзионными свойствами, высокой способностью «намазываться» и при этом иметь и биоадгезивные свойства. По оптимумам реологии ЛФ должна соответствовать

стоматологической и дерматологической ГМЛФ. По комплексу параметров был выбран состав, обладающий лучшими увлажняющими свойствами (степень увлажнения через 30 минут составляла  $33,2 \pm 0,6\%$ ), высокой адсорбционной активностью –  $0,082 \pm 0,06$  мг, высокой биоадгезией –  $898,4 \pm 2,8$  Н, средним значением осмотической активности ( $144,00 \pm 0,4\%$  за 24 часа) и высыхаемости (8,1%), вязкостью, входящей в требуемый интервал, (пластическая вязкость  $0,644$  Па·с), высокой степенью тиксотропии и выраженными окклюзионными свойствами.

У разработанного образца геля оценивали эффективность включенного в состав ЛФ антимикробного консерванта метилпарагидроксибензоата. Комбинированный гель интерферона альфа-2b для наружного и местного применения относится к категории 6.3А по МБЧ. Результаты исследований действия консерванта приведены в таблице 11. После инокуляции тест-микроорганизмами, происходила быстрая и эффективная гибель как бактерий, так и дрожжеподобных грибов в ЛФ.

Таблица 11 – Эффективность антимикробного действия препарата комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Экспозиция	Требования ГФ РФ (категория 6.3А)		Число микроорганизмов, КОЕ/г, log снижения		
	Число бактерий КОЕ/г, log снижения	Число грибов КОЕ/г, log снижения	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Исходная нагрузка	25-50	0-2	$1,20 \times 10^5$	$9,10 \times 10^5$	$8,60 \times 10^5$
Исходный высеv	—	—	$9,55 \times 10^5$	$8,45 \times 10^5$	$9,25 \times 10^4$
2 сут	—	—	НО	НО	НО
7 сут	—	—	НО	НО	НО
14 сут	НУ	НУ	НО	НО	НО
28 сут	НУ	НУ	НО	НО	НО

*НО – жизнеспособные клетки тест-микроорганизмов не обнаружены*  
*НУ – число жизнеспособных клеток тест-микроорганизмов не увеличивается*

Состав разработанного комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения приведен в таблице 12.

Технологические стадии производства показаны на рисунке 9. Разработанный гель не стерильная ЛФ, однако при наработке лабораторных серий часть технологических операций проводили под ламинаром, и промышленное производство рекомендуется осуществлять в классе С. Субстанция интерферона чувствительна к микробному загрязнению и ее стабильность падает при увеличении числа микроорганизмов. Поэтому для снижения микробной нагрузки полупродукт, представляющий собой гелевую основу, стерилизовали, затем в стерильный полупродукт вводили стерильную субстанцию интерферона, для повышения стабильности ЛФ.

Таблица 12 – Состав комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Компоненты	Содержание на 10 г
<i>Действующее вещества</i>	
Интерферон $\alpha$ -2b	2,8 мкг (400000 МЕ)*
Декспантенол	500 мг
Лидокаин	100 мг
<i>Вспомогательные вещества</i>	
Гидроксиэтилцеллюлоза марки Natrosol® 250 ННХ	0,4 г
ПЭГ 4000	0,4 г
Kollicream® IPM	0,05 г
Метилпарагидроксибензоат	0,0075 г
Натрия хлорид	0,058г
Натрия ацетат тригидрат, г	0,02 г
Дигидрат динатриевой соли этилендиамина тетрауксусной кислоты	0,00058 г
Вода очищенная	до 10,0 г
*- Номинальное содержание, выраженное в мкг, указано из расчета минимально допустимой удельной активности субстанции интерферона альфа-2b	

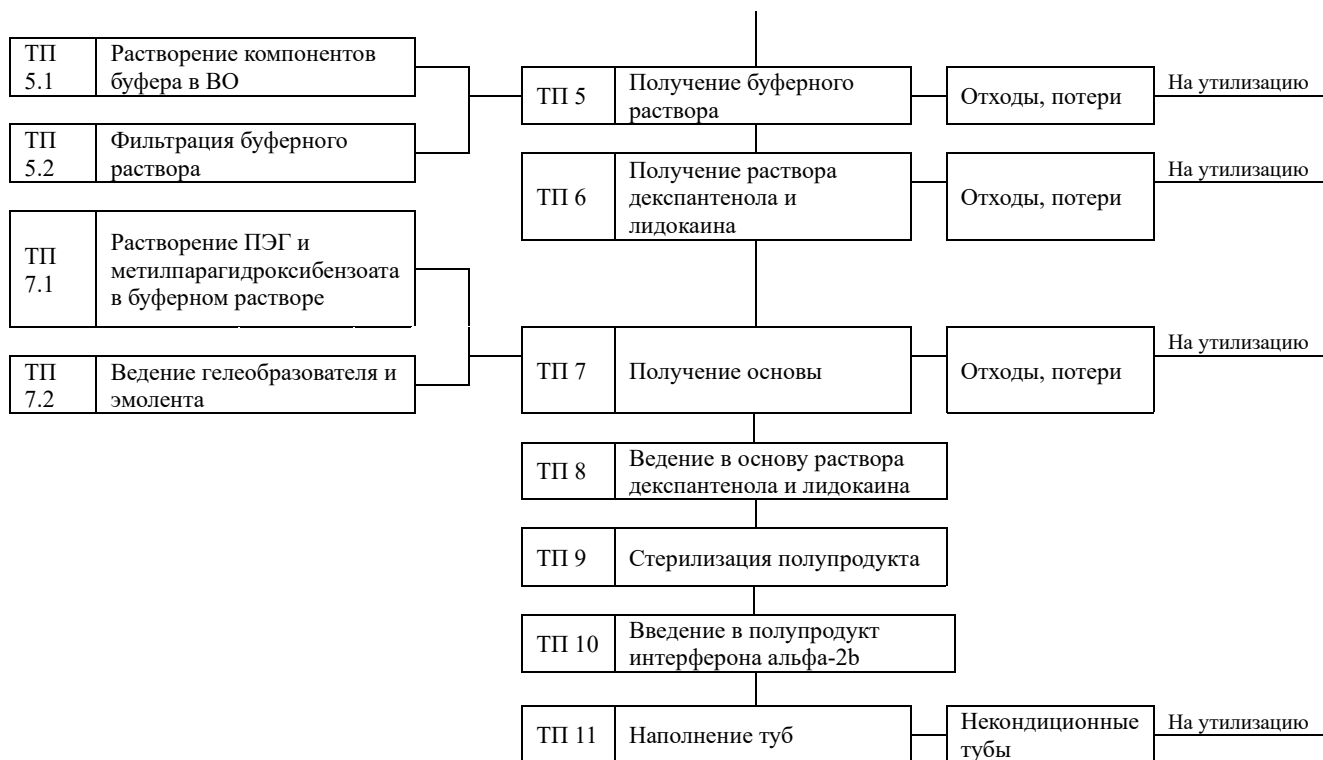


Рисунок 9 – Фрагмент технологической схемы (стадии ТП) получения комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Проведена оценка уровня риска технологических процессов производства данной ЛФ, обоснованы риски и предложены мероприятия для их снижения на этапе масштабирования и валидации технологического процесса. Подтверждена возможность трансфера и масштабирования технологического производства на промышленную площадку.

Спецификация на комбинированный гель интерферона для наружного и местного применения приведена в таблице 13.

Таблица 13 – Проект спецификации «Комбинированный гель наружного и местного применения интерферона альфа-2b, декспантенола и лидокаина 400 тыс. МЕ + 500 мкг + 100 мкг, 10 г»

Показатели качества	Нормы (допустимые пределы)	Ссылки на методы испытаний
Описание	Прозрачный бесцветный гель, не содержащий видимых частиц	Визуальный ГФ РФ ОФС.1.4.1.0008 МЛФ
Идентификация: Интерферона альфа -2b	Реакция нейтрализации. Соответствует интерферону человеческого альфа-типа	ГФ РФ ОФС.1.7.2.0002.15 Биологический метод. Реакция нейтрализации противовирусной активности
Декспантенола	ТСХ. Основная зона адсорбции на хроматограмме раствора геля по положению, величине и окраске должна соответствовать основной зоне адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца декспантенола. Качественная реакция с 8,5 % раствором натрия гидроксида и 12,5% раствором меди(II) сульфата образуется синее окрашивание.	ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0003 Тонкослойная хроматография
Лидокаина	Качественная реакция на хлориды: С азотной кислотой 16 % и серебра нитрата раствора 2 % образуется белый творожистый осадок С калия дихроматом и серной кислотой концентрированной. Над пробиркой помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную дифенилкарбазида раствора, которая должна окраситься в фиолетово-красный цвет. УФ-спектрофотометрия, раствор ЛФ должен иметь характерный максимум при $201 \pm 2$ нм и минимум при $261 \pm 2$ нм	ГФ РФ ОФС.1.2.2.0001 Общие реакции на подлинность  ГФ РФ ОФС.1.2.1.1.0003 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях
рН	От 6,0 до 7,0	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004 Ионометрия
МБЧ	Категория 6.3А	ГФ РФ ОФС.1.2.4.0002.18 МБЧ
Специфическая активность	Не менее 40000 МЕ в 1 г	ГФ РФ ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток
Количественное определение декспантенола	47,5 – 52,5 мг в 1 г	ГФ РФ ОФС.1.2.3.0029 Титриметрия
Количественное определение лидокаина	9,5 – 10,5 мг в 1 г	ГФ РФ ОФС.1.2.1.1.0003 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях
Масса содержимого упаковки	Не менее 9,5 г	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007 Масса содержимого упаковки
Герметичность упаковки	На фильтровальной бумаге и ни на одной из 10 туб не должно быть подтеков содержимого. Если наблюдаются подтеки хотя бы на одной из 10 первоначально отобранных туб, то дополнительно проводят испытание еще с 20 тубами	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0025 Определение герметичности упаковки

Изучение стабильности геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения проводили аналогично офтальмологическому гелю интерферона, так как препараты имеют схожие условия производства и одинаковые условия хранения. Срок годности ЛФ составил 2 года. По результатам оценки местно-раздражающего действия разработанной ЛФ на коже экспериментальных животных сделан вывод, что гель практически не вызывает местную реакцию, его действие соответствует «слабому или отсутствует» и он не обладает местно-раздражающим действием.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методология фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями с учетом целевого профиля качества ЛП апробирована на пяти препаратах с различными биотехнологическими субстанциями. Первая группа субстанций представляет собой вирусные частицы – бактериофаги, различного штаммового состава. Разработанные составы и технологии получения ГМЛФ для перорального и вагинального применения могут быть использованы как для промышленного производства препаратов с фиксированным штаммовым составом, так и для персонализированной фаговой терапии и производства в аптечных условиях. Место персонализированной фаготерапии инфекционных заболеваний обсуждено и подтверждено клиническим использованием в публикациях, где автор данной работы является соавтором (Алёшкин, А.В., 2024; Галицкий, А.А., 2023).

Вторая группа субстанций представляет собой рекомбинантные белки: оригинальная активная фармацевтическая субстанция эндолизин LysECD7-SMAP, разработанная ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава РФ, и интерферон альфа-2b, производства АО «Биннофарм». Работа по разработке дерматологического геля с эндолизином LysECD7-SMAP для лечения раневых и ожоговых инфекций выполнена при поддержке Министерства здравоохранения РФ в рамках государственного контракта №0373100122119000013 от 15 мая 2019 года с ФГБУ ««Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России. Доказана эффективность и безопасность ЛФ в рамках исследований на животных, результаты опубликованы в Journal of Pharmaceutical Sciences Q2 с H-индексом 206 (Antonova, N.P., 2022).

На основе интерферона альфа-2b разработано две комбинированных лекарственных формы для лечения офтальмологических и дерматологических инфекционных заболеваний. Приведена оценка рисков трансфера разработанных технологий на производственную площадку, и результаты ее апробации в виде актов о внедрении ПФК «Алиум» и АО «Биннофарм».

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. На основе проведенного информационного и литературного поиска структурирован современный ассортимент гелеобразователей в зависимости от их физико-химических свойств, исходного сырья и способов получения. Дана характеристика, сравнительный анализ и рекомендации по выбору полимеров для получения ГМЛФ для различных путей введения.

2. Разработана методологическая концепция фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями с учетом целевого профиля качества ЛП, которая состоит из следующих основных стадий: определение профиля качества ЛП, определение критических параметров качества ЛП, подбор способов стабилизации ЛВ, выбор гелеобразователя, подбор вспомогательных веществ, обеспечивающих биофармацевтические, терапевтические, технологические и потребительские характеристики препарата, разработка технологии получения ЛФ и методов анализа, разработка НД на ЛП и оценка и обоснование уровня риска технологического процесса для его масштабирования на производственную площадку.

3. Определены реологические оптимумы ГМЛФ для различных способов применения: для дерматологических ГМЛФ оптимум значений динамической вязкости при температуре 20 °С лежит в диапазоне от 0,9 до 10,8 Па·с при 30 с<sup>-1</sup> и от 0,15 до 2,9 Па·с при 300 с<sup>-1</sup>, при температуре 32 °С – от 1,4 до 6,85 Па·с при 30 с<sup>-1</sup> и от 0,18 до 1,83 Па·с при 300 с<sup>-1</sup>; для офтальмологических ГМЛФ оптимум значений динамической вязкости находится в интервале от 0,5 до 3,5 Па·с при 30 с<sup>-1</sup> и от 0,11 до 0,64 Па·с при 30 с<sup>-1</sup> (при температуре 20 °С) и в диапазоне от 0,17 до 1,12 Па·с при 30 с<sup>-1</sup> и от 0,045 до 0,25 Па·с при 1000 с<sup>-1</sup> (при температуре 37 °С); для вагинальных ГМЛФ оптимум значений динамической вязкости при температуре 20 °С при скорости сдвига 30 с<sup>-1</sup> лежит в диапазоне от 1,3 до 12 Па·с, при скорости сдвига 300 с<sup>-1</sup> – от 0,3 до 1,4 Па·с; при температуре 37 °С – при скорости сдвига 30 с<sup>-1</sup> в диапазоне от 1,0 до 11 Па·с, а при скорости сдвига 300 с<sup>-1</sup> – от 0,3 до 1,7 Па·с; для стоматологических ГМЛФ оптимум значений динамической вязкости при температуре 20 °С при скорости сдвига 30 с<sup>-1</sup> лежит в диапазоне от 4,0 до 12 Па·с, при скорости сдвига 300 с<sup>-1</sup> – от 2,0 до 3,0 Па·с; при температуре 37 °С – при скорости сдвига 30 с<sup>-1</sup> в диапазоне от 2,0 до 7,8 Па·с, а при скорости сдвига 300 с<sup>-1</sup> – от 1,1 до 2,3 Па·с.

4. Разработаны составы двух «универсальных» ЛФ с коктейлями бактериофагов. Пероральный гель в качестве гелеобразователей и структурообразующих компонентов содержит 5% натрий-карбоксиметилцеллюлозы марки Vlanose™ СМС и 15% сорбитола, обладает системным действием, доказанным в рамках фармакокинетических исследований, требуемыми потребительскими, технологическими и биофармацевтическими качествами. Вагинальный гель образован 1,5% гидроксиэтилцеллюлозой марки Natrosol® 250 G PHARM и 20% полоксамера Kolliphor® P 407, имеет термозависимый переход золь-гель при температуре 32,0±1,0 °С, время гелеобразования составляет 8,5±1 минут, что обеспечивает удобство применения ЛП.

5. Проведена фармацевтическая разработка дерматологического геля с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP на основе гидроксиэтилцеллюлозы и полиэтиленгликоля 1500. Экспериментально обосновано введение в состав ЛФ стабилизатора белковых молекул, в качестве которого использован 0,06% полисорбат -20. Показана безопасность разработанной ЛФ.

6. Предложены составы комбинированных лекарственных форм интерферона альфа-2 b в виде офтальмологического геля с даларгином и геля для наружного и местного применения с декспантенолом и лидокаином. Гелеобразователем для обеих лекарственных форм служит гидроксиэтилцеллюлоза разных марок, в виду отсутствия у нее цитотоксического действия на линию клеток Vero, использующуюся для оценки специфической активности лекарственного вещества. Экспериментально доказана необходимость введения в состав ЛФ стабилизаторов рН, антиоксидантов для дерматологического геля, также эмолиента, пластификатора и консерванта. Проведен трансфер технологии ЛФ на производственную площадку АО «Биннофарм».

7. Определены стратегии контроля качества вагинального геля с коктейлем бактериофагов, перорального геля с коктейлем бактериофагов, дерматологического геля с рекомбинантным эндолизином, комбинированного лабиального геля с интерфероном  $\alpha$ -2b и офтальмологического геля интерферона альфа-2b с даларгином, разработаны методики их анализа и спецификации на готовые ЛФ.

8. Определены программы изучения стабильности ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями для обоснования сроков годности ЛП. Срок годности разработанных ЛФ бактериофагов составляет 2 года, геля с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP 18 месяцев, комбинированных гелей интерферона альфа-2b составил 2 года.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Предложенная методология фармацевтической разработки может быть использована при создании гелей, представляющих собой как классические ГМЛФ, так и «умные системы» с программируемыми технологическими характеристиками на основе биотехнологических субстанций, представляющих собой вирусы и белки. Результаты разработки лекарственных средств, а именно термореверсивного вагинального геля с коктейлем бактериофагов, перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций; геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP; комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина и комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения являются основой для дальнейших исследований, направленных на регистрацию и внедрение их в клиническую практику.

Определенные в ходе работы реологические оптимумы ГМЛФ для различных способов применения могут быть использованы для создания МЛФ на гидрофильных основах с субстанциями синтетического, растительного, животного и биотехнологического происхождения.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Теоретические и экспериментальные основы разработки гидрофильных мягких лекарственных форм с биотехнологическими субстанциями подразумевает следующие направления развития.

1. Использование разработанной концепции фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями для получения биотехнологических препаратов другой природы помимо белков и вирусов.

2. Создание ЛФ с универсальным составом, предназначенных для введения в них персонализированно подобранных коктейлей бактериофагов, которые могут использоваться для различных путей введения, включая дерматологический, пероральный, имплантационный, вагинальный, назальный, стоматологический и др.

3. Изучение потенциала новых сочетаний бактериофагов и/или их ферментов, например, эндолизинов.

4. Определение реологических оптимумов для МЛФ на гидрофильных и липофильных основах.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Анурова, М.Н.** Проблемы коррекции органолептических свойств лекарственных препаратов / **М.Н. Анурова**, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – Том 13. – № 4 – С. 64-73.

2. **Anurova, M.N.** Review of contemporary gel-forming agents in the technology of dosage forms/ **M.N. Anurova**, E.O. Bakhrushina, N.B. Demina // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2015. – Т. 49. – № 9. – С. 627-634.

3. **Анурова М.Н.** Мягкие лекарственные формы С. 236-274. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Под. Ред. Быковского С.Н. и др. М. Изд-во Перо, 2015. – 472 с.

4. Lapik, I.V. Investigation of the rheological characteristics of dalargin and interferon fixed-dose combined ophthalmic gel / I.V. Lapik, **M.N. Anurova**, S.P. Krechetov // В сборнике: The priorities of the world science: experiments and scientific debate. Proceedings of the XII International scientific

conference. Материалы XII международной научной конференции. Scientific Publishing Center «Discovery».– 2016. – С. 64-68.

5. Алгоритм рационального подбора бактериофагов для новой лекарственной формы/ А.В. Алешкин, С.С. Бочкарева, О.Ю. Борисова, Е.О. Рубальский, **М.Н. Анурова** // Инфекционные болезни. – 2016. – Т. 14. – № S1. –С. 134-135.

6. **Анурова, М.Н.** Изучение влияния состава комбинированной матрицы на реологические характеристики экспериментальных образцов пероральных гелей нимесулида/ **М.Н. Анурова**, Е.О. Бахрушина, С.П. Кречетов // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2016.– №4. – С. 98-104.

7. Современные аспекты создания глазных лекарственных форм: определение реологических оптимумов офтальмологических гелей/ **М.Н. Анурова**, Е.О. Бахрушина, И.В. Лапик, С.П. Кречетов // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** 2017. – № 4 – С. 64-70.

8. Обоснование реологических оптимумов при разработке мягких лекарственных форм на гидрофильной основе. стоматологические гели / **М.Н. Анурова**, Е.О. Бахрушина, Г.Г. Барнолицкий, С.П. Кречетов // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** 2017. –№ 2. –С. 124-128.

9. **Анурова, М.Н.** Изучение современных требований к разработке и стандартизации вагинальных гелей / **М.Н. Анурова**, А.А. Дрыгина, Е.О. Бахрушина // Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – V. 19. – № 10. – С. 334-336.

10. Разработка состава комбинированного лабиального геля с иммунобиологической субстанцией/ **М.Н. Анурова**, А.С. Коваленко, Е.О. Бахрушина, И.И. Краснюк // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** 2017. –Т. 20. –№ 9. – С. 3-7.

11. Изучение осмотической активности офтальмологических гелей / **М.Н. Анурова**, Е.О. Бахрушина, И.В. Лапик, А.С. Шитова, И.И. Краснюк // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2018. – № 3. – С. 30-34.

12. Определение реологических оптимумов вагинальных гелей / **М.Н. Анурова**, Е.О. Бахрушина, А.М. Подколзин, С.П. Кречетов // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** 2018. – № 2. – С. 46-51.

13. **Анурова, М.Н.** Вопросы моделирования слизистой оболочки влагалища для определения биоадгезии вагинальных гелей методом потока in vitro / **М.Н. Анурова**, А.С. Кашперко, Е.О. Бахрушина // **Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке.** – 2018. – Т. 20. – № 5. – С. 99-102.

14. Определение реологических оптимумов гелей для приема внутрь/ Е.О. Бахрушина, **М.Н. Анурова**, М.Б. Корнеев, Н.Б. Демина, С.П. Кречетов // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** 2019. – Т. 22. – № 6. – С. 18-23.

15. Разработка термореверсивного вагинального геля с бактериофагами./ **М.Н. Анурова**, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина, А.В. Алешкин, И.А. Киселева // **Биофармацевтический журнал**. – 2019. – Т. 11. – № 2. – С. 30-33. [**Scopus**]
16. Main aspects of pharmaceutical gel development for peroral administration / Е.О. Bakhrushina, М.Н. **Anurova**, N.B. Demina, G.Y. Ivannikov // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2019. – Т. 53. – № 9. – С. 838-844.
17. Modern preservatives of microbiological stability (review)/ **M.N. Anurova**, Е.О. Bakhrushina, N.B. Demina, E.S. Panteleeva // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2019. – Т. 53. – № 6. – С. 564-571.
18. Разработка лекарственных форм на основе эндолизинов для терапии раневых инфекций / А.М. Воробьев, А.В. Алешкин, В.А. Гуцин, **М.Н. Анурова**, Е.О. Бахрушина, И.А. Киселева, Э.Р. Зилькарнеев, А.И. Лаишевцев, О.Г. Ефимова, Э.Р. Мехтиев, Е.О. Рубальский, Л.И. Новикова, С.С. Бочкарева, О.Г. Жиленкова, В.В. Каминский, Н.П. Антонова, Д.В. Васина, А.П. Ткачук // В книге: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы международного форума. – Москва, – 2020. – С. 21-23.
19. Разработка состава и технологии геля с артилизином для терапии раневых инфекций/ А.М. Воробьев, **М.Н. Анурова**, А.В. Алешкин, В.А. Гуцин, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, Е.Р. Мехтиев // В книге: VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2020. – 2020. – С. 36-37.
20. Изучение стабильности геля модифицированного рекомбинантного эндолизина ранозаживляющего действия / А.М. Воробьев, А.В. Алешкин, **М.Н. Анурова**, Э.Р. Мехтиев, Л.И. Новикова, С.С. Бочкарева, К.М. Багандова, Т.Э. Мизаева // В сборнике: Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Под редакцией А.Ю. Поповой, А.К. Носкова. – 2020. – С. 317-318.
21. Перспективы применения рекомбинантных белков бактериофагов для терапии инфекций, вызванных полирезистентными бактериями / А.М. Воробьев, **М.Н. Анурова**, А.В. Алешкин, В.А. Гуцин, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, А.И. Лаишевцев, И.А. Киселева, Э.Р. Зилькарнеев, Е.О. Рубальский, Э.Р. Мехтиев // В сборнике: Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения. Материалы всероссийской научно-практической интернет-конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора с международным участием. – Пермь, – 2020. – С. 188-192.
22. Comparative study of the mucoadhesive properties of polymers for pharmaceutical use / Е. Bakhrushina, **M. Anurova**, N. Demina, A. Kashperko, O. Rastopchina, A. Bardakov, I. Krasnyuk // **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**. – 2020. – Т. 8. – № А. – С. 639-645. [**Scopus**]

23. New combined eye gel with alpha-2-beta interferon / **M.N. Anurova**, E.O. Bakhrushina, I.V. Lapik, A.S. Kashperko, I.I. Krasnyuk // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. – 2020. – Т. 168. – № 3. – С. 349-351. [**Scopus, PubMed, Springer**]
24. Принципы коррекции органолептических свойств лекарственных веществ, обладающих горьким вкусом/ М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, А.А. Моисеева, И.И. Краснюк // Фармацевтическое дело и технология лекарств. – 2020. – № 1. – С. 25-32.
25. **Anurova, M.N.** Permeability enhancers in transdermal delivery system technology (review)/ **M.N. Anurova**, N.B. Demina, E.O. Bakhrushina // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021. Т. 54. № 11. С. 1162-1168.
26. Системы доставки офтальмологических препаратов (обзор)/ Е.О. Бахрушина, **М.Н. Анурова**, Н.Б. Демина, И.В. Лапик, А.Р. Тураева, И.И. Краснюк // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10. – № 1. – С. 57-66.
27. Efficacy of the endolysin-based antibacterial gel for treatment of anaerobic infection caused by fusobacterium necrophorum/ D.V.Vasina, N.P. Antonova, A.P. Tkachuk, V.A. Gushchin, A.M. Vorobev, E.R. Zulkarneev, S.S. Bochkareva, I.A. Kiseleva, A.V. Aleshkin, A.I. Laishevtsev, A.V. Kapustin, **M.N. Anurova** // **Antibiotics**. – 2021. – Т. 10. – № 10. – С. 1260. doi: 10.3390/antibiotics10101260. [**Scopus, PubMed**]
28. Determination of bactericidal activity spectrum of recombinant endolysins of ECD7, AM24, AP22, SI3, and ST11 bacteriophages/ A.M. Vorob'ev, A.V. Aleshkin, I.A. Kiseleva, E.O. Rubalskii, E.R. Zul'karneev, E.R. Mekhtiev, V.V. Kaminskii, S.S. Bochkareva, A.V. Karaulov, **M.N. Anurova**, E.O. Bakhrushina, V.A. Gushchin, D.V. Vasina, N.P. Antonova, A.I. Laishevtsev // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. – 2021. – Т. 170. – № 5. – С. 636-639. [**Scopus, PubMed, Springer**]
29. Воробьев, А.М. Эндолизины и перспективы их применения для лечения инфекций, вызванных полирезистентными бактериями (обзор)/ А.М. Воробьев, **М.Н. Анурова**, А.В. Алешкин, И.А. Киселева, К.М. Багандова, Т.Э. Мизаева, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, В.А. Гуцин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24. – № 10. – С. 13-22.
30. Современные тенденции применения и создания лекарственных препаратов бактериофагов/ Е.О. Бахрушина, **М.Н. Анурова**, А.В. Алешкин, Н.Б. Демина, И.И. Краснюк, Н.В. Пятигорская, В.В. Береговых // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2021. – Т. 76. – № 4. – С. 351-360.
31. Эндолизины vs бактериофаги: перспективы производства, эффективность и безопасность применения/ А.В. Алешкин, А.М. Воробьев, С.С. Бочкарева, Л.И. Новикова, **М.Н. Анурова**, И.А. Киселева, Э.Р. Зулкарнеев, А.И. Лаишевцев, К.М. Багандова, Т.Э. Мизаева, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, В.А. Гуцин // Бактериология. – 2022. – Т. 7. – № 3. – С. 12-13.

32. Dermatologic gels spreadability measuring methods comparative study/ E.O. Bakhrushina, **M.N. Anurova**, M.S. Zavalniy, N.B. Demina, A.I. Bardakov, I.I. Krasnyuk // **International Journal of Applied Pharmaceutics**. – 2022. – Т. 14. – № 1. – С. 164-168. [Scopus]

33. Бактерицидная фармацевтическая композиция для местного применения в форме геля бактерицидного с эндолизином. Алешкин А.В., **Анурова М.Н.**, Воробьев А.М., Усачев Е.В., Васина Д.В., Гуцин В.А., Ткачук А.П., Юдин С.М., Макаров В.В., Краевой С.А., Антонова Н.П. **Патент на изобретение RU 2781050 C1**, 04.10.2022. Заявка № 2021128276 от 28.09.2021.

34. Изучение биофармацевтических свойств новой мукоадгезивной лекарственной формы для терапии дегенеративных заболеваний глаз / **М.Н. Анурова**, Е.О. Бахрушина, И.В. Лапик, А.Р. Тураева, Н.Б. Демина, Б.Б. Сысуев, И.И. Краснюк // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2023. – Т. 12. – № 3. – С. 41-48. [Scopus]

35. Проблемы антибактериальной терапии госпитальных инфекций в пост-пандемическом периоде covid-19 и пути их решения/ А.А. Галицкий, С.Д. Митрохин, А.С. Шкода, О.Е. Орлова, С.С. Бочкарева, И.А. Киселева, **М.Н. Анурова**, А.В. Алешкин // Астраханский медицинский журнал. – 2023. – Т. 18. – № 4. – С. 25-34.

36. Рекомбинантные белки бактериофагов как перспективное средство противомикробной терапии/ А.М. Воробьев, **М.Н. Анурова**, Н.П. Антонова, А.В. Алешкин, А.И. Лаишевцев, В.А. Гуцин, Д.В.Васина // В сборнике: От микробиологии к генетическим технологиям. Материалы всероссийской конференции. – Новосибирск, – 2023. – С. 43-44.

37. **Анурова, М.Н.** Валидация методики определения количественного содержания бактериофагов в лекарственных препаратах/ М.Н. Анурова, М.А. Пасивкина, А.В. Корниенко, И.А. Киселева // В сборнике: Сандеровские чтения. Сборник материалов конференции, посвященной памяти выдающегося отечественного ученого в области технологии лекарств Юрия Карловича Сандера. – Санкт-Петербург, – 2023. – С. 100-103.

38. Антибактериальная композиция на основе эндолизинов и лекарственные средства в форме геля или спрея с ее использованием. Алешкин А.В., **Анурова М.Н.**, Бочкарева С.С., Воробьев А.М., Зулкарнеев Э.Р., Лаишевцев А.И., Усачев Е.В., Васина Д.В., Гуцин В.А., Ткачук А.П., Антонова Н.П., Киселева И.А., Капустин А.В., Юдин С.М., Макаров В.В., Краевой С.А. **Патент на изобретение RU 2790481 C1**, 21.02.2023. Заявка № 2021128275 от 28.09.2021.

39. Pharmacokinetics and Preclinical Safety Studies of Modified Endolysin-Based Gel for Topical Application/. N.P. Antonova, D.V. Vasina, I.V. Grigoriev, E.V. Usachev, A.V. Aleshkin, A.M. Vorobev, A.I. Laishevtsev, A.V. Kapustin, V.A. Savinov, **M.N. Anurova**, A.A. Zackharova, T.A. Remizov// **Journal of Pharmaceutical Sciences** – 2024, 2093-2100. doi: 10.1016/j.xphs.2024.04.028. [Scopus, PubMed]

40. Выделение и характеристика бактериофагов salmonella как потенциальных агентов для фаговой терапии антибиотикорезистентных кишечных инфекций/ М.А. Пасивкина, **М.Н. Анурова**, И.А. Киселева, А.А. Андреева, А.М. Воробьев, Т.Э. Мизаева, Э.Р. Мехтиев, Е.С.

Зубкова, К.М. Алиева, А.Р. Кузьмин, А.В. Караулов, А.В. Алешкин // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2024. – Т. 177. – № 4. С. 471-475. [Scopus, PubMed, Springer ]

41. Место персонализированной фаготерапии в лечении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванных возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью/ А.В. Алёшкин, С.С. Бочкарева, Л.И. Новикова, О.Н. Ершова, И.А.Киселёва, Е.С. Зубкова, **М.Н. Анурова**, Е.О. Рубальский, Э.Р. Зулькарнеев, И.М. Фёдорова, М.С. Бляхер, Н.Д. Долинер, А.В. Алехнович, П.С. Маркевич, А.В. Караулов // **Инфекционные болезни** – 2024, – т. 22, – №4, – с. 76-85. [Scopus]

42. Бактериофаги и эндолизины как инновационный подход к борьбе с акне/ А.А. Андреева, **М.Н. Анурова**, А.М. Воробьев, И.А. Киселева, Д.В. Васина, В.А. Гущин, Н.П. Антонова, А.В. Алешкин //В книге: Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы. Сборник трудов XVI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского. – Москва, – 2024. – С. 18-19.

43. Изучение фармакокинетики бактериофагов для разработки лечебно-профилактического продукта для борьбы с кишечными инфекциями/ М.А. Пасивкина, **М.Н. Анурова**, А.И. Лаишевцев, Э.Р. Мехтиев, А.А. Андреева, И.А. Киселева, Е.С. Зубкова, Е.В. Морозова, А.В. Алешкин // Проблемы медицинской микологии. – 2024. – Т. 26. – № 2. – С. 183.

44. Validation of the method for determining the specific activity of the gel with recombinant endolysin/ A. Vorobev, **M. Anurova**, K. Bagandova, T. Mizaeva, A. Aleshkin, D. Vasina, N. Antonova, V. Gushchin // BIO Web of Conferences. – 2021. – Vol. 40. – P. 01005. DOI: 10.1051/bioconf/20214001005.

45. Бактериофаги как инновационная биотехнологическая субстанция для создания лечебно-профилактического препарата от акне/ А.А. Андреева, **М.Н. Анурова**, И.А. Киселева, А.М. Воробьев, А.В. Алешкин //В сборнике: Сандеровские чтения. сборник материалов конференции. – Санкт-Петербург. – 2024. – С. 15-18.

46. Изучение комбинации пробиотиков и бактериофагов в рамках борьбы с антибиотикорезистентностью/ М.А. Пасивкина, **М.Н. Анурова**, А.И. Лаишевцев, Е.С. Зубкова, А.В. Алешкин //В книге: Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы. Сборник трудов XVI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского. – Москва. – 2024. – С. 153.

47. Разработка лечебно-профилактического продукта для борьбы с кишечными инфекциями на основе комбинации про- и фагобиотиков/ М.А. Пасивкина, **М.Н. Анурова**, А.И. Лаишевцев, А.В. Алешкин //В книге: Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению. Материалы международной конференции. – Новосибирск. – 2024. – С. 57.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

**БОЕ** – бляшкообразующая единица

**ВВ** – вспомогательное вещество

**ВДИ** – вода для инъекций

**ВО** – вода очищенная

**ВЭЖХ** – высокожидкостная хроматография

**ГМЛФ** – гидрофильные мягкие лекарственные формы

**ГПМЦ** – гидроксиметилпропилцеллюлоза

**ГФ ЕАЭС** - Фармакопея Евразийского экономического союза

**ГФ РФ** - Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания

**ГЭЦ** – гидрокиэтилцеллюлоза

**КОЕ** – колониеобразующая единица

**ЛВ** – лекарственное вещество

**ЛП** – лекарственный препарат

**ЛС** – лекарственное средство

**ЛФ** – лекарственная форма

**МБЧ**- микробиологическая чистота

**МЛФ** – мягкие лекарственные формы

**МЦ** – метилцеллюлоза

**НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи** – Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации

**ОФС** – общая фармакопейная статья

**ПЭГ** – полиэтиленгликоль

**ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского** – Федеральное бюджетное учреждение науки Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора

**ЭДТА** - этилендиаминтетрауксусная кислота

**NaКМЦ** – натрий карбоксиметилцеллюлоза

**MRSA** - Methicillin-resistant Staphylococcus aureus