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

*На правах рукописи*

Пыжов Виктор Сергеевич

# Разработка состава и технологии термочувствительной системы доставки кеторолака трометамина с модифицированным высвобождением

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

**Научные руководители:**
доктор фармацевтических наук, доцент
Бахрушина Елена Олеговна
кандидат фармацевтических наук, доцент
Гегечкори Владимир Ираклиевич

Москва – 2026

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ ..... 7
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР ..... 17
1.1. In situ системы доставки лекарственных средств ..... 17
1.2. Термочувствительные in situ системы ..... 18
1.3. Механизм термочувствительного перехода ..... 19
1.4. Термочувствительные гидрогели и сшивающие агенты ..... 22
1.5. Термочувствительные гидрогели на основе хитозана ..... 23
1.6. Термочувствительные гели на основе полимолочной-со-гликолевой кислоты ..... 26
1.7. Кеторолака трометамин в in situ системах ..... 28
1.8. Методы in vitro оценки высвобождения лекарственных веществ из гидрогелей ..... 31
1.8.1. Аппараты для оценки высвобождения действующих веществ из лекарственных средств ..... 31
1.8.2. Биорелевантные среды высвобождения ..... 33
1.8.3. Регуляторные подходы к оценке высвобождения из лекарственных форм для парентерального и местного применения ..... 36
1.9. Кинетическое моделирование высвобождения действующих веществ из гидрогелей для внутрисуставного введения ..... 37
1.10. Регуляторные требования к тестам высвобождения и разработке и валидации аналитических методик ..... 38
1.11. Выводы к главе 1 ..... 40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ ..... 42
2.1. Материалы исследования ..... 42
2.1.1. Активные фармацевтические субстанции ..... 42
2.1.2. Вспомогательные вещества ..... 42
2.2. Методы исследования ..... 44
2.2.1. Синтез катализатора лактата олова (II) ..... 44
2.2.2. Синтез и характеристика блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем ..... 45
2.2.3. Определение молекулярной массы и полидисперсности ..... 45
2.2.4. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса ..... 46
2.2.5. Инфракрасная спектрометрия ..... 46
2.2.6. Определение степени деацетилирования хитозана ..... 46
2.2.7. Реологические исследования ..... 47

2.3. Приготовление термочувствительных гелей с кеторолаком ..... 48
2.3.1. Гели на основе хитозан/β-глицерофосфата ..... 48
2.3.2. Гели на основе блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем ..... 49
2.4. Приготовление биорелевантных сред высвобождения ..... 50
2.4.1. Обоснование выбора биорелевантных сред в исследовании ..... 50
2.4.2. Фосфатно-солевой буферный раствор pH 7,4 ..... 51
2.4.3. Модель здорового сустава ..... 51
2.4.4. Модель воспаленного сустава ..... 52
2.5. Изучение кинетики высвобождения in vitro ..... 52
2.5.1. Подготовка диализных мешков ..... 52
2.5.2. Подготовка среды высвобождения ..... 53
2.5.3. Заполнение диализных мешков гелем ..... 53
2.5.4. Условия эксперимента ..... 54
2.5.5. Отбор проб и обработка ..... 54
2.5.6. Расчет кумулятивного высвобождения ..... 54
2.6. Математическое моделирование высвобождения ..... 55
2.7. Изучение стабильности и финишная стерилизация ..... 55
2.7.1. Финишная стерилизация ..... 55
2.7.2. Изучение стабильности ..... 55
2.8. Статистическая обработка результатов ..... 56
ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ ..... 57
3.1. Синтез и стандартизация блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем ..... 57
3.2. Характеристика молекулярно-массового распределения ..... 58
3.3. Подтверждение структуры методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса ..... 60
3.4. Подтверждение структуры методом инфракрасной спектрометрии ..... 61
3.5. Определение температуры гелеобразования в зависимости от концентрации ..... 64
3.6. Степень деацетилирования хитозана ..... 65
3.7. Влияние соотношения хитозан: β-глицерофосфат на гелеобразование ..... 66
3.8. Реологические свойства полимерных систем ..... 66
3.8.1. Кривые течения хитозанового геля при 25 °C ..... 66
3.8.2. Кривые течения гелей блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем при 25 °C ..... 67

3.8.3. Оценка температуры гелеобразования гелей на основе хитозана ... 69
3.8.4. Оценка температуры гелеобразования гелей на основе блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем ... 70
3.9. Выводы к главе 3 ... 73
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ГЕЛЕЙ С КЕТОРОЛАКА ТРОМЕТАМИНОМ ... 75
4.1. Целевой профиль качества продукта и оценка рисков ... 75
4.2. Скрининг составов испытуемых препаратов с кеторолака трометамином ... 77
4.3. Влияние кеторолака на критическую температуру гелеобразования ... 79
4.4. Оптимизация загрузки лекарственного вещества ... 81
4.5. Физико-химические и технологические свойства разработанных гелей ... 81
4.6. pH, вязкость, плотность ... 82
4.7. Реологические характеристики ... 82
4.8. Технологическая схема получения гелей ... 82
4.9. Обоснование выбора метода стерилизации ... 85
4.10. Критические параметры процесса и контрольные точки ... 85
4.11. Выводы к главе 4 ... 93
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК И ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ IN VITRO ... 94
5.1. Разработка и валидация методики количественного определения кеторолака в средах высвобождения ... 94
5.1.1. Хроматографические условия ... 95
5.1.2. Валидационные характеристики ... 97
5.1.2.1. Приготовление растворов для валидации ... 97
5.1.2.2. Методика проведения валидационных испытаний ... 98
5.1.2.3. Специфичность ... 100
5.1.2.4. Линейность ... 103
5.1.2.5. Правильность (открываемость) ... 105
5.1.2.6. Прецизионность ... 106
5.1.2.7. Предел количественного определения и предел обнаружения ... 107
5.1.2.8. Стабильность растворов ... 108
5.1.2.9. Робастность (устойчивость) методики ... 108
5.1.2.10. Обобщенные результаты валидации ... 109
5.2. Количественное определение кеторолака в гелях ... 110
5.2.1. Пробоподготовка ... 110

5.2.2. Учет плотности гелей ..... 110
5.2.3. Результаты количественного определения ..... 110
5.3. Изучение кинетики высвобождения in vitro ..... 111
5.3.1. Подготовка диализных мешков и условия эксперимента ..... 111
5.3.2. Высвобождение из инъекционных гелей на основе хитозана ..... 111
5.3.3. Высвобождение из инъекционных гелей на основе блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем ..... 111
5.3.4. Сравнительный анализ влияния гиалуроновой кислоты и pH ..... 112
5.4. Математическое моделирование кинетики высвобождения ..... 114
5.4.1. Выбор временного интервала для моделирования ..... 114
5.4.2. Оценка применимости различных моделей ..... 114
5.4.3. Параметры модели первого порядка ..... 115
5.5. Корреляция in vitro – in vivo и ограничения метода ..... 116
5.6. Система аналитического контроля кеторолака трометамина в полимерных матрицах ..... 116
5.7. Выводы к главе 5 ..... 118
ГЛАВА 6. СТАБИЛЬНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ И ПРОЕКТЫ СПЕЦИФИКАЦИЙ ..... 119
6.1. Изучение стабильности инъекционных гелей при хранении ..... 119
6.1.1. Условия хранения и план исследования ..... 119
6.1.2. Стабильность хитозановых гелей (10 мг/мл) ..... 119
6.1.3. Стабильность гелей на основе блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем (30 мг/мл) ..... 120
6.1.4. Сравнительный анализ стабильности двух типов гелей ..... 121
6.2. Стабильность после гамма-стерилизации ..... 122
6.3. Проекты спецификаций ..... 122
6.3.1. Проект спецификации «Инъекционный гель кеторолака трометамина 10 мг/мл на хитозановой основе, 2 мл» ..... 123
6.3.2. Проект спецификации «Инъекционный гель кеторолака трометамина 30 мг/мл на основе блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем, 2 мл» ..... 123
6.4. Выводы к главе 6 ..... 124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ..... 126
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ ..... 127
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ..... 129
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ..... 131
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ ..... 133

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 135
Приложение А. Патент Российской Федерации ..... 148
Приложение Б. Акт внедрения в учебный процесс ..... 149
Приложение В. Акт внедрения в производственный процесс ООО «Компания «Деко» ..... 150
Приложение Г. Акт внедрения в производственный процесс ООО «ЛИНЭРС» ..... 151

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность темы исследования

В современной фармацевтической технологии систем направленной доставки лекарственных веществ все большее развитие получают лекарственные формы на основе стимулочувствительных полимеров, называемые «*in situ* системами доставки». Такие системы способны совершать фазовый переход в определенном месте организма за счет физиологических или патологических факторов, обеспечивая пролонгированное и контролируемое высвобождение активной фармацевтической субстанции (АФС). Среди стимулочувствительных систем наиболее изученными и перспективными являются термочувствительные или термореверсивные гидрогели. При комнатной температуре они представляют собой текучие растворы, легко проходящие через инъекционную иглу, затем при нагревании до температуры тела 36–37 °C образуют упругую гелевую матрицу, формируя депо препарата для пролонгированного высвобождения непосредственно в месте введения. Подобные системы обладают рядом таких преимуществ, как возможность инъекционного введения без хирургического вмешательства, простая технология изготовления, таргетная доставка, регулируемая скорость высвобождения, а также высокая биодоступность за счет минования метаболизма первого прохождения через печень [1].

Особый интерес для локальной терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний суставов (остеоартрит, ревматоидный артрит) представляют термочувствительные гидрогели для внутрисуставного введения. Внутрисуставные инъекции позволяют создать высокую локальную концентрацию лекарственного вещества непосредственно в очаге воспаления, минимизируя системные побочные эффекты. Кеторолака трометамин —нестероидное противовоспалительное средство, обладающее высокой анальгетической активностью, сравнимой с опиоидами. Он широко применяется для купирования болевого синдрома, в том числе при суставных патологиях. Однако классические лекарственные формы кеторолака (растворы для инъекций, таблетки) характеризуются коротким временем действия (4–6 ч) и вызывают системные побочные эффекты (со стороны желудочно-кишечного тракта, почек). Создание внутрисуставных депо-гелей с пролонгированным высвобождением кеторолака трометамина позволит увеличить интервал между инъекциями до нескольких дней, снизить дозу и уменьшить риск системных нежелательных реакций [2].

В настоящее время на российском фармацевтическом рынке отсутствуют зарегистрированные инъекционные гели кеторолака с контролируемым высвобождением. Разработка таких систем с использованием двух типов термочувствительных полимерных матриц

— природного хитозана в комбинации с β-глицерофосфатом и синтетического блок-сополимера полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем (ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА) — является актуальной задачей. Оба полимера обладают биосовместимостью и биоразлагаемостью, однако их поведение в пролонгированных экспериментах, влияние на кинетику высвобождения и стабильность при хранении изучены недостаточно.

Системный подход к фармацевтической разработке с использованием концепции «качество через проектирование» (Quality by Design, QbD) позволяет научно обосновать выбор состава, технологических параметров и методов контроля качества. Таким образом, диссертационное исследование, направленное на разработку состава и технологии термочувствительных гелей кеторолака трометамина с модифицированным высвобождением для внутрисуставного введения, является своевременным и актуальным.

## Степень разработанности темы исследования

Интерес к термочувствительным системам доставки возник во второй половине XX века. Первые работы по синтезу биодеградируемых термочувствительных полимеров появились в конце 1990-х годов. В 1999 году Jeong и соавт. опубликовали данные о блок-сополимерах ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, способных к обратимому золь-гель переходу при температуре тела. В 2000 году Chenite и соавт. разработали термочувствительную гидрогелевую систему на основе хитозана и β-глицерофосфата.

В работе коллектива авторов под руководством Фоминой Ю.С. обобщены традиционные и современные подходы к синтезу сополимеров, исследованию структуры и свойств гидрогелей на основе биоразлагаемых полиэфиров, а также рассмотрены основные направления их практического применения. В этой работе показано, что полиэтиленгликоль и его сополимеры являются биосовместимыми, хорошо удерживают воду и легко выводятся из организма, что подтверждает перспективность использования ПЭГ-содержащих блок-сополимеров для создания систем доставки лекарственных средств [3].

В 2024 году Бахрушина Е.О. и др. опубликовали работу, посвященную *in situ* имплантатам для доставки химиотерапевтических агентов, в которой рассмотрены системы, формирующиеся в месте введения за счет фазового перехода золь-гель под влиянием различных стимулов [4]. В этом же году вышла работа по влиянию методов стерилизации на стабильность *in situ* гелеобразующих полимеров, содержащая практические рекомендации по управлению рисками при разработке стерильных *in situ* систем [5].

В последние годы активизировались исследования по созданию термочувствительных *in situ* гелей для различных путей введения. Так, в 2025 году авторами РХТУ им. Д.И. Менделеева

Деркач В.С. и Гордиенко М.Г. была разработана термочувствительная интраназальная система доставки на основе гелей P407/P188, содержащих наночастицы ПЛГА с фавипиравиром. В работе показано, что температура золь-гель перехода регулируется соотношением полоксамеров, а высвобождение АФС из наночастиц в матрице геля является пролонгированным, что демонстрирует перспективность комбинирования наночастиц и термочувствительных гелей для контролируемой доставки [6].

Несмотря на значительное количество публикаций, посвященных термочувствительным системам, результаты этих работ не освещают стандартизованных подходов к оценке термочувствительности, длительного исследования стабильности лекарственных средств на основе *in situ* систем, не содержат валидированных методик определения АФС в биорелевантных средах, имитирующих синовиальную жидкость здорового и воспаленного сустава.

Настоящая работа рассматривает подходы к разработке и стандартизации термочувствительных гелей кеторолака, созданию аналитических методик для контроля качества лекарственных средств на основе термочувствительных гелей и изучение их стабильности в долгосрочных экспериментах.

## Цель и задачи исследования

Целью диссертационного исследования является фармацевтическая разработка лекарственных средств кеторолака трометамина на основе термочувствительной системы доставки с модифицированным высвобождением, а также разработка их показателей качества.

Для реализации поставленной цели необходимо решение следующих задач:

1. Проанализировать современную отечественную и зарубежную литературу, патентные источники по термочувствительным системам доставки и применяемым полимерам и на основе анализа литературных данных определить целевой профиль качества разрабатываемых систем доставки кеторолака трометамина, критические параметры качества и методологию их определения.

2. Разработать методику синтеза блок-сополимера полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем, провести синтез и оценку качества полученного полимера.

3. Экспериментально обосновать выбор вспомогательных веществ для включения в состав термочувствительной системы доставки и изучить совместимость их с кеторолака трометамином.

4. Разработать лабораторную технологию получения лекарственных средств кеторолака трометамина на основе производного хитозана и блок-сополимера полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем, а также определить критические параметры процесса и контрольные точки на стадиях приготовления и фасовки.

5. Разработать и валидировать методики количественного определения кеторолака трометамина в лекарственных средствах и средах высвобождения в присутствии полимерных матриц.

6. Провести исследование кинетики высвобождения кеторолака трометамина *in vitro* и выбрать модели описания профиля высвобождения, установив взаимосвязь между составами, параметрами матриц и характеристиками высвобождения.

7. Подготовить проекты спецификации на лекарственные средства «Инъекционный гель кеторолака трометамина 10 мг/мл на хитозановой основе» и «Инъекционный гель кеторолака трометамина 30 мг/мл на основе ПЛГА-ПЭГ»

8. Изучить стабильность разработанных систем с обоснованием условий хранения и прогнозируемых сроков годности.

## Научная новизна

Новизна диссертационного исследования заключается в комплексном сравнительном анализе двух типов термочувствительных полимерных матриц (хитозан/β-глицерофосфата и ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА) в идентичных экспериментальных условиях в контексте разработки на их основе систем для внутрисуставной доставки кеторолака трометамина. Согласно современной стратегии «качество через дизайн» определены и обоснованы целевой профиль качества лекарственных средств, критические параметры качества, критические параметры используемых материалов и технологического процесса. В работе также впервые определены уровни влияния критических параметров и проведена оценка рисков для производства лекарственных средств «Инъекционный гель кеторолака трометамина 10 мг/мл на хитозановой основе» и «Инъекционный гель кеторолака трометамина 30 мг/мл на основе ПЛГА-ПЭГ».

Для разрабатываемых лекарственных средств в форме термочувствительных инъекционных гелей впервые оценены основные биофармацевтические параметры, такие как термочувствительность, высвобождение активной фармацевтической субстанции *in vitro* с использованием биорелевантных сред, имитирующих синовиальную жидкость здорового и воспаленного сустава, а также стабильность при долгосрочном хранении.

Для оценки кинетики высвобождения кеторолака трометамина в условиях, приближенных к физиологическим, впервые разработана и валидирована методика диализного теста высвобождения *in vitro* в средах, содержащих гиалуроновую кислоту, а также методика количественного определения кеторолака трометамина в присутствии гиалуроновой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Новизна диссертационной работы также заключается в предложенной воспроизводимой методике количественной оценки термочувствительности и тиксотропных свойств *in situ* систем на основе хитозана и блок-сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с применением метода ротационной вискозиметрии, позволяющей оценить температуру гелеобразования, псевдопластичность и восстановление структуры геля после механического воздействия.

Впервые для термочувствительных гелей для инъекций проведено долгосрочное изучение стабильности термочувствительных гелей на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА и хитозана и сделаны выводы о возможных сроках годности лекарственных средств на основе этих полимерных комплексов. Доказана возможность использования гамма-стерилизации без существенного ухудшения качества разработанных лекарственных препаратов.

Диссертационная работа также была поддержана грантом Фонда содействия инновациям (2024 г.), по результатам выполнения которого был получен патент на изобретение № 2857178 «Способ получения сополимеров ПЛГА-ПЭГ для создания термочувствительной системы доставки лекарств».

## Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в систематизации и углублении знаний о термочувствительном поведении полимерных систем на основе хитозана/β-глицерофосфата и ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, а также в обобщении методологических подходов к анализу и контролю качества лекарственных форм, представленных *in situ* термочувствительными системами доставки. Впервые в рамках единого исследования установлены критические концентрационные соотношения компонентов в композициях хитозан/β-глицерофосфат натрия/кеторолака трометамин и ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА/кеторолака трометамин, обеспечивающие фазовый переход раствор–гель в интервале физиологических температур организма человека, и доказано, что кеторолака трометамин не оказывает значимого влияния на температуру гелеобразования. Выявлены фундаментальные различия в механизмах деградации полимерных матриц хитозана/ β-глицерофосфата натрия и ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, влияющих на стабильность при хранении препаратов на их основе. Установлены закономерности влияния состава биорелевантной среды, имитирующей синовиальную жидкость, на кинетику высвобождения кеторолака из полимерных матриц, а также обоснованы подходы к математическому моделированию профилей высвобождения. Полученные результаты расширяют фундаментальные представления о закономерностях термочувствительного гелеобразования, долгосрочной стабильности биоразлагаемых полимерных систем и методологии их аналитического контроля.

Практическая значимость подтверждается разработкой лабораторных регламентов синтеза блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с использованием катализатора лактата олова (II) и получением гелей с воспроизводимыми свойствами. Предложены проекты спецификаций для двух лекарственных препаратов, включающие показатели качества и методы контроля. Результаты внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина Сеченовского Университета (дисциплины «Фармацевтическая технология», «Надлежащие практики») и в рабочий процесс ООО «Компания «ДЕКО» и ООО «ЛИНЭРС».

## Методология и методы исследования

Методологической основой диссертации стали работы по изучению термочувствительных систем доставки лекарственных средств и инъекционных гидрогелей с модифицированным высвобождением, а также труды российских и зарубежных ученых в области синтеза и стандартизации полимерных матриц, фармацевтической химии и промышленной фармации, в частности: Чените А., Ченга Б., Центнера Г.М. (зарубежные исследования), а также работы Мустафина Р.И., Хуторянского В.В., Бахрушиной Е.О., Меньшутиной Н.В., Деминой Н.Б., Пятигорской Н.В., и других отечественных исследователей, посвященные современным аспектам фармацевтической разработки, биосовместимым и биодеградируемым полимерам.

Фармацевтическая разработка в настоящем исследовании проведена в соответствии с руководством ICH Q8(R2) «Фармацевтическая разработка» (Pharmaceutical Development), ICH Q9 «Управление рисками для качества» и ICH Q10 «Фармацевтическая система качества». Проект спецификации на разработанное лекарственное средство составлен по требованиям Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 года № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата». Оценка стабильности разработанного лекарственного средства проводилась в соответствии с требованиями Решения Евразийской экономической комиссии от 10 мая 2018 года № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций».

Для оценки фармакопейных показателей качества (описание, подлинность, pH, вязкость, температура гелеобразования, высвобождение, родственные примеси, однородность дозирования, стерильность, апирогенность, количественное определение) были использованы методики, описанные в фармакопейных статьях Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания. Также в рамках диссертационного исследования были разработаны и валидированы методики количественного определения кеторолака трометамина методом

высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Оценка показателей реологии (вязкость, тиксотропия, температура гелеобразования) осуществлялась на ротационном вискозиметре Lamy RM 200 с измерительной системой коаксиальных цилиндров MS DIN 33. Анализ высвобождения активной фармацевтической субстанции проводился методом диализа через полупроницаемую мембрану в биорелевантных средах, имитирующих синовиальную жидкость здорового и воспаленного сустава.

Экспериментальные работы выполнены на сертифицированном и поверенном оборудовании кафедры фармацевтической технологии и кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина.

## Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнен анализ научной литературы и патентных источников, сформулированы цель и задачи исследования. Разработана методика синтеза блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, проведен синтез двух серий, охарактеризованы полимеры методами ГПХ, 1Н-ЯМР, ИК-спектроскопии. Определена степень деацетилирования хитозана. Проведен скрининг 42 составов гелей, оптимизированы составы и технология. Выполнены реологические исследования, валидация ВЭЖХ-методики, количественное определение кеторолака в гелях. Самостоятельно проведен тест высвобождения *in vitro* в биорелевантных средах, математическое моделирование, изучение стабильности при долгосрочном и ускоренном хранении, а также оценка влияния гамма-стерилизации. Автор интерпретировал полученные данные, сформулировал выводы и подготовил публикации. Патент на изобретение получен при личном участии соискателя.

## Положения, выносимые на защиту

1. Составы и методы синтеза двух серий блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, а также результаты оценки их молекулярно-массовых характеристик, структуры и термочувствительных свойств.

2. Технология лабораторного получения термочувствительных гелей кеторолака трометамина с определением критических параметров процесса и контрольных точек на стадиях приготовления и фасовки.

3. Разработанные и валидированные ВЭЖХ-методики количественного определения кеторолака трометамина в лекарственных средствах и в биорелевантных средах высвобождения, пригодные для анализа в присутствии полимерных матриц и гиалуроновой кислоты, а также

система аналитического контроля качества, включающая методики идентификации, количественного определения, определения родственных примесей и теста высвобождения кеторолака трометамина в биорелевантных средах.

4. Результаты изучения кинетики высвобождения кеторолака трометамина *in vitro* в средах, имитирующих синовиальную жидкость здорового и воспаленного сустава, а также математическое моделирование профилей высвобождения.

5. Проекты спецификаций на лекарственные средства «Инъекционный гель кеторолака трометамина 10 мг/мл на хитозановой основе» и «Инъекционный гель кеторолака трометамина 30 мг/мл на основе ПЛГА-ПЭГ», включающие показатели качества, методы контроля и нормативные ссылки.

## Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств, направлениям исследований пунктов 2, 3, 4; и паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, направлениям исследований пунктов 2, 3.

## Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием валидированных аналитических методик, сертифицированного и поверенного оборудования, внесенного в Государственный реестр средств измерений, многократной повторностью экспериментов (минимум трехкратное повторение каждого этапа исследований), а также статистической обработкой данных с применением параметрических критериев. Воспроизводимость результатов подтверждена на независимых сериях синтезированных полимеров и образцов гелей, а также результатами контрольных экспериментов с плацебо, содержащим полимерные матрицы, и холостыми пробами. Согласованность полученных данных с опубликованными литературными сведениями и соответствие требованиям ГФ РФ XV, Фармакопеи ЕАЭС, руководств ICH, Решений ЕАЭС № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств» и № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» подтверждают обоснованность и надежность научных положений и выводов.

Основные научные положения и результаты диссертационного исследования доложены на всероссийских и международных конференциях: XXII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (г. Сочи, 2024), Первая международная конференция «Инновационные лекарственные средства: от молекулы до пациента» (г. Москва, 2024), XII Международный молодежный научный медицинский форум «Белые цветы» (г. Казань, 2025), Международный конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» (г. Москва, 2026), а также на научно-методической конференции, посвященной памяти Ю.К. Сандера (г. Москва, 2025).

Апробация диссертации проведена на совместном заседании кафедры фармацевтической технологии, кафедры фармацевтического естествознания и кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 13 от 09.06.2026).

**Внедрение результатов исследования**

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина Сеченовского Университета (дисциплины «Фармацевтическая технология», «Надлежащие практики») и в рабочий процесс ООО «Компания «ДЕКО» (отдел исследований и разработок) и ООО «ЛИНЭРС» (разработка инновационных лекарственных средств на основе биотехнологических платформ). Акты внедрения прилагаются.

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

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям развития науки, техники и технологий в Российской Федерации. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований на долгосрочный период (2021–2030 гг.) и согласуется со Стратегией развития фармацевтической промышленности Российской Федерации до 2030 года. Исследование является составной частью плана научно-исследовательских работ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и выполнено в составе комплексной темы «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (гос. регистрация № 01201261653).

## Публикации по теме диссертации

По результатам диссертационного исследования автором опубликовано 8 работ, в том числе 1 научная статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 2 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, Chemical Abstracts; 2 иные публикации, 1 патент, 2 публикации в сборниках материалов международных научных конференций.

## Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 151 страницах машинописного текста, состоит из введения, шести глав, заключения, общих выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы (144 источника, из них 123 зарубежных) и приложений. Работа содержит 35 рисунков и 46 таблиц.

# ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1. *In situ* системы доставки лекарственных средств

Современное развитие фармацевтической технологии все чаще опирается на концепцию *in situ* гелеобразующих систем при разработки направленных систем доставки лекарств. Такие системы представляют собой жидкие полимерные композиции, которые после введения в организм претерпевают фазовый переход в месте аппликации, формируя полусинтетический гелевый матрикс. Термин *in situ*, от латинского «на месте», подчеркивает способность системы к самоорганизации с образованием депо активной фармацевтической субстанции непосредственно в органе-мишени под влиянием физиологических или патологических факторов среды [7,8]. Данный подход базируется на уникальной способности определенных полимеров обратимо изменять свою конформацию и степень гидратации в ответ на внешние стимулы. Изначально такие системы находятся в виде раствора с низкой вязкостью, что обеспечивает легкость их введения. После контакта с биологической средой под действием стимулирующих факторов: температуры, pH, ионного состава или ферментов, — происходит переход раствор-гель с повышением вязкости системы, что ведет к ее фиксации в месте введения и формированию депо для пролонгированного высвобождения лекарственного вещества [9].

История изучения стимулочувствительных полимеров берет свое начало во второй половине XX века. В 1956 году был впервые синтезирован поли(N-изопропилакриламид) (ПНИПААМ) [10,11], который впоследствии стал одной из наиболее изученных модельных систем в данной области. В 1967 году Scarpa с соавторами опубликовали работу, в которой зафиксировали аномалии в обмене водорода у данного полимера, связанные с изменением температуры [12]. Знаковым событием стало исследование Heskins и Guillet 1968 года, в котором была установлена нижняя критическая температура растворения для ПНИПААМ, составляющая приблизительно 32 °C [13]. Эта работа положила начало систематическому изучению термочувствительных полимеров как класса «умных» материалов, способных к обратимому фазовому переходу в ответ на изменение температуры в физиологическом диапазоне организма человека [14].

В зависимости от химической природы полимерной матрицы, применяемой для конструирования *in situ* систем, выделяют три основные группы [8,15–18]:

1. Природные полимеры (хитозан, гелловая камедь, пектин, альгинаты, шеллак) — обладают высокой биосовместимостью, но в зависимости от вида полимера могут требовать химической модификации для приобретения стимулочувствительности;

2. Синтетические полимеры (полоксамеры, полиэтиленгликоль-полиэфирные блок-сополимеры, поликапролактон) — позволяют точно регулировать молекулярно-массовые характеристики и температуру фазового перехода;

3. Полусинтетические полимеры (модифицированный хитозан, ксилоглюкан, производные целлюлозы) — сочетают преимущества природных и синтетических материалов, обеспечивая улучшенную управляемость свойств.

По типу активирующего стимула *in situ* системы подразделяют на термочувствительные, pH-чувствительные, ионотропные, влагоактивируемые и фазоинверсные (осадительные) [8,15–17].

Стимулочувствительные системы, представляющие собой гидрогели, выгодно выделяются среди иных систем доставки лекарственных средств и других лекарственных форм с пролонгированным высвобождением лекарственного средства по многим параметрам:

1) Возможность их инъекционного введения, без хирургического вмешательства, как в случае с имплантами.

2) Простая технология изготовления, требующая только финишной стерилизации, в сравнении с системами, содержащими липосомы, наночастицы или микросферы с АФС [19–21].

3) Таргетная доставка лекарственных средств: данные системы доставки лекарственных средств можно вводить подкожно или внутривенно непосредственно в требуемое место применения, где уже под действием конкретного фактора будет происходить формирование устойчивой сетки геля, из которого происходит высвобождение действующего вещества [22,23].

4) Возможность регуляции скорости высвобождения действующего вещества из матрицы, путем включения в систему полимерных вспомогательных веществ с заданными свойствами [24].

5) Высокая биодоступность лекарственных средств, благодаря минованию метаболизма первого прохождения (печеночного метаболизма) [23].

## 1.2. Термочувствительные *in situ* системы

Среди стимулочувствительных полимерных систем наиболее изученными и технологически проработанными являются термочувствительные системы. Их ключевой особенностью является способность к обратимому фазовому переходу раствор-гель при изменении температуры, что обусловлено наличием в структуре полимера гидрофильных и гидрофобных фрагментов, соотношение которых определяет характер взаимодействия с водным растворителем [25–27]. Такие системы обычно представляют собой слабовязкие жидкости при комнатной температуре и формируют стабильный гель при нагревании до физиологических значений 36–38 °C, что делает их удобными для парентерального применения [28,29].

Термочувствительные *in situ* системы обладают рядом преимуществ перед другими типами стимулочувствительных систем, что обусловливает их приоритетное положение в фармацевтической разработке. В отличие от pH-зависимых и ионно-чувствительных систем, чувствительность которых ограничена специфическими микроокружениями, температурный стимул является универсальным и управляемым параметром, применимым для различных анатомических областей [16,22]. Гелеобразование под действием температуры не требует присутствия специфических ионов или строго определенного pH, что обеспечивает стабильность фазового перехода независимо от состава биологических жидкостей [30].

Важным аспектом является возможность модуляции реологических свойств термочувствительных систем в широких пределах путем варьирования концентрации полимера, его молекулярной массы и архитектуры. Это позволяет адаптировать вязкость раствора для оптимальной инъецируемости, а также контролировать механические свойства формируемого геля [31,32]. Формирование гелевой матрицы непосредственно в месте инъекции обеспечивает точную пространственную локализацию лекарственного средства и создает благоприятные условия для пролонгированного и контролируемого высвобождения, что особенно ценно при лечении хронических воспалительных и дегенеративных заболеваний [1,2].

Данные свойства в совокупности с биосовместимостью и биоразлагаемостью многих термочувствительных полимеров делают их предпочтительной платформой для разработки инъекционных лекарственных форм с модифицированным высвобождением [8].

### 1.3. Механизм термочувствительного перехода

Для создания эффективных систем доставки на основе термочувствительных полимеров необходимо понимание молекулярного механизма, лежащего в основе их фазового перехода [33]. Поведение термореверсивных полимеров в растворах может быть объяснено несколькими термодинамическими моделями, первой из которых является теория Флори, утверждающая, что усредненные геометрические и физические характеристики полимерных цепей в расплаве совпадают со свойствами идеальных (гауссовых) цепей из-за взаимной компенсации дальнодействующих объемных взаимодействий звеньев. Согласно данной теории, полимер в растворе или расплаве рассматривается как цепь структурно связанных фрагментов, каждый из которых оказывает влияние на соседние элементы. При этом направление и сила отталкивания звеньев при их сближении будет всегда скомпенсированы равным удалением от иных фрагментов цепи полимера, таким образом сохраняя термодинамическое равновесие внутри цепи полимера [34].

В соответствии с теорией Флори-Хаггинса все полимеры можно разделить на две группы по взаимодействию с растворителем:

1) Полимеры с верхней критической температурой растворимости (ВКТР). Расслоение в растворах таких полимеров наступает в диапазонах температур до и после ВКТР, а при достижении данной температуры наблюдается наиболее эффективное взаимодействие полимер-растворитель (прим. Полистирол в циклогексане, ацетилцеллюлоза в хлороформе и т. д.).

2) Полимеры с нижней критической температурой растворимости (НТКР). В случаях с НТКР в водных растворах полимеров возникает ренормализация взаимодействий полимер-полимер за счет взаимодействия фрагментов цепи с растворителем. Повышение температуры до НТКР вызывает усиление гидрофобных взаимодействий внутри цепи полимера и между его молекулами, однако термодинамическая стабильность системы будет снижаться за счет снижения энтропии воды за счет нарушения сетки ее водородных связей (прим. водные растворы полиэтиленоксида (ПЭО), поли-N-изопропилакриламида (ПНИПААМ) и др.) [28].

В качестве наглядного примера полимеров с НТКР можно рассмотреть молекулярные и конформационные изменения в водных растворах ПНИПААМ. ПНИПААМ был широко исследован и является одним из наиболее изученных термочувствительных полимеров. НТКР ПНИПААм в гидрогеле находится в диапазоне от 32 °C до 34 °C [35–37]. В растворах данный полимер демонстрирует постепенный переход от спирали к глобуле при повышении температуры до НТКР [38–40]. Ниже НТКР в водных растворах ПНИПААМ полимер находится в сольватированной форме за счет большого количества водородных связей между гидрофильными звеньями его цепей и растворителем, что ведет к повышению его растворимости и скорости набухания. По мере повышения температуры и приближения к НТКР возрастает количество гидрофобных взаимодействий между гидрофобными сегментами, а водородные связи постепенно становятся термодинамически неустойчивыми и разрушаются [35,41].

Еще одним полимером с НТКР является триблок-сополимер полиэтиленоксида (ПЭО) и полипропиленоксида (ППО), обладающий способностью к термореверсивному переходу. Его водные растворы являются жидкими при низкой температуре и обратимо превращаются в гель при повышении температуры. Скорость и температура перехода будет зависеть от соотношения гидрофильных (ПЭО) и гидрофобных (ППО) элементов в цепи полимера и от концентрации высокомолекулярного соединения в растворе. При повышении температуры до критической температуры гелеобразования (КТГ) и концентрации полимера до критической концентрации мицеллообразования (ККМ) гидрофобные элементы склонны к дегидратации и самосборке сначала в агрегаты, затем в мицеллы. Механизм мицеллизации подобных полимеров подчиняется модели Анианссона-Уолла, которая описывает динамику сборки самоагрегирующихся систем. В соответствии с данной моделью при достижении ККМ

гидрофобные элементы формируют ядро мицеллы, а гидрофильные элементы выстраиваются на периферии в форме короны мицеллы [42].

Механизм термочувствительного раствор-гель перехода на примере блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, схематически представленный на рисунке 1.1, может быть описан как многостадийный процесс, включающий последовательную трансформацию полимерной системы. На начальном этапе происходит гидратация полимерных цепей в водной среде, во время которого молекулы воды взаимодействуют как с гидрофильными, так и с гидрофобными сегментами макромолекул, формируя водородные связи, что обеспечивает переход полимера в растворенное состояние. При повышении температуры водородные связи между полимером и водой нарушаются, что приводит к дегидратации гидрофобных блоков. Это инициирует их межмолекулярную ассоциацию, обусловленную стремлением к минимизации контакта с полярным растворителем, и завершается формированием мицеллярных структур с гидрофобным ядром и гидрофильной короной. Заключительная стадия характеризуется достижением КТГ, при которой происходит агрегация образовавшихся мицелл и их пространственная организация в трехмерную полимерную сеть. Устойчивость формируемого геля обеспечивается межмицеллярными взаимодействиями, опосредованными водородными связями и силами Ван-дер-Ваальса между гидрофильными фрагментами мицелл [43].

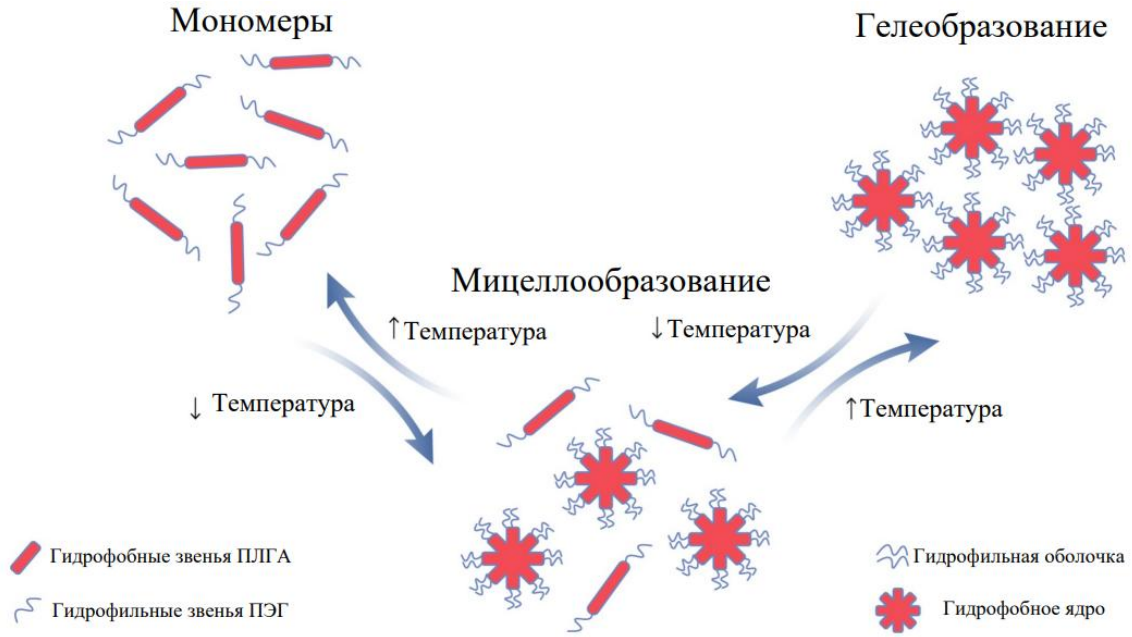


Рисунок 1.1 – Механизм термочувствительного перехода на примере блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

## 1.4. Термочувствительные гидрогели и сшивающие агенты

В общем случае гидрогели — это трехмерные полимерные сети, способные набухать в водной среде в несколько раз от своего первоначального веса. Благодаря этому они находят широкое применение в самых разных областях - от пищевой и косметической промышленности до современных областей клеточных культур, доставки лекарств и тканевой инженерии [44–47]. Термореактивные гидрогели находятся в жидком состоянии, но могут претерпевать фазовый переход в вязко-пластичную тли даже твердую форму под действием температурных манипуляций.

Есть несколько основных способов получить стимулочувствительные композиции из термочувствительных полимеров:

1) Физическое сшивание. При данном явлении образование гидрогеля из раствора происходит без введения в композицию дополнительных сшивающих агентов (кросс-линкеров) исключительно под действием физических стимулов, таких как температура, pH среды, УФ-излучение или смена растворителя.

2) Химическое сшивание. В случае некоторых полимеров, обычно природного происхождения, требуется добавление сшивающих компонентов, которые, взаимодействуя с полимером, модифицируют его структуру и придают стимулочувствительные свойства, за счет чего растворы конечных полимеров способны совершать раствор-гель переход [48–50].

В качестве таких сшивающих агентов зачастую выступают низкомолекулярные соединения альдегидной, акрилатной, циан- или изоцианатной природы. Их можно применять не только для придания стимулочувствительных свойств гидрогелю, но и для регулирования воздействия исследуемого стимула. Например, в термореактивных композициях индивидуального ПНИПААМ его НТКР лежит в диапазоне от 31 °C до 33 °C, что несколько ниже физиологического интервала температур. Однако при добавлении к его водному раствору сшивающих агентов N,N'-метилен-бис-акриламида или N,N'-цистамин-бис-акриламида можно сместить температуру его фазового перехода до интервала 36-38 °C [51]. Стоит отметить, что добавление сшивающих агентов к фармацевтической композиции всегда сопряжено с риском возникновения дополнительного фармакологического или токсического эффекта, обусловленного свойствами кросс-линкера [52–54].

Другим примером использования сшивающих агентов является комбинация хитозана с бета-глицерофосфатом (βГФ). βГФ в композициях с хитозаном выполняет роли стабилизатора pH и агента ионного сшивания, придающего системе термочувствительные свойства [1,8,55].

Помимо модификации стимулочувствительности сшивающие агенты используются в композициях термочувствительных гидрогелей для модуляции высвобождения АФС из матрицы

системы доставки или для придания ей дополнительных фармакологических свойств. Так, известна термореверсивная система на основе трехблочного сополимера ПЭГ-поли(ε-капролактон)-ПЭГ (ПЭГ-ПКЛ-ПЭГ), синтезированного путем открытокольцевой полимеризации демонстрирующая раствор-гель переход при 37 °C [56]. Инъекционные гидрогели на его основе активно применяются в тканевой инженерии, и в работе авторского коллектива во главе с К. Чжао к ПЭГ-ПКЛ-ПЭГ прививался анилиновый тетрамер для улучшения его тканевых регенеративных свойств с помощью электростимуляции [57].

### 1.5. Термочувствительные гидрогели на основе хитозана

Хитозан представляет собой линейный природный полисахарид, построенный из остатков 2-амино-2-дезокси-D-глюкопиранозы, связанных β-(1→4)-гликозидными связями, с варьирующим содержанием остаточных N-ацетилглюкозаминовых фрагментов [1,58,59].

Ключевыми параметрами, определяющими свойства хитозана, являются степень деацетилирования и молекулярная масса. Как установлено в многочисленных исследованиях, повышение степени деацетилирования коррелирует с усилением биологической активности полимера и улучшением его растворимости в водных средах [1,59]. Данный эффект обусловлен увеличением содержания свободных аминогрупп, протонирование которых в кислой среде обеспечивает катионный характер полимера и его гидрофильность [60]. Большинство коммерческих образцов хитозана характеризуются степенью деацетилирования в диапазоне 70–90% [61,62]. Молекулярная масса также оказывает существенное влияние на растворимость: низкомолекулярные фракции (менее 30 кДа) способны растворяться в воде при нейтральных значениях pH без дополнительного подкисления, тогда как полимеры с молекулярной массой выше 30 кДа требуют создания слабокислой среды для эффективной солюбилизации [1,63,64]. При этом хитозан с молекулярной массой менее 9 кДа демонстрирует значительно лучшую растворимость в воде по сравнению с фракциями 22–30 кДа [1,65].

В кислых средах (pH <6,5) макромолекулы хитозана приобретают высокий положительный заряд за счет протонирования аминогрупп, что обусловливает их способность к электростатическому связыванию с отрицательно заряженными поверхностями, полианионами и хелатированию ионов металлов [1,66,67]. Эти свойства, наряду с растворимостью в кислых растворах, создают предпосылки для гелеобразования хитозана в присутствии полианионных соединений.

Несмотря на потенциал хитозана как основы для *in situ* систем доставки лекарств, его индивидуальные водные растворы не проявляют термочувствительности в физиологическом диапазоне температур. При растворении этого полимера в кислых средах возрастает

электростатическое отталкивание между положительно заряженными аминогруппами, что препятствует агрегации макромолекул и формированию гелевой сетки при нагревании. При повышении pH и депротонировании аминогрупп молекулы хитозана образуют мицеллы, однако их гидрофильная часть недостаточно развита для эффективных межмицеллярных взаимодействий и образования устойчивого геля [1,28,68]. Таким образом, водные растворы хитозана не способны к термочувствительному переходу без введения сшивающих агентов или химической модификации полимерной цепи.

Наибольший интерес в контексте создания термочувствительных *in situ* систем представляет композиция хитозана с β-ГФ, выступающим в роли сшивающего агента и регулятора pH. В 2000 году Chenite с соавторами впервые предложили термочувствительную гидрогелевую систему на основе хитозана, модифицированного β-глицерофосфатом натрия [1,69]. Добавление β-ГФ позволяет повысить pH кислого раствора хитозана до нейтральных значений pH в диапазоне pH 7,0–7,4 без осаждения полимера. Одновременно β-глицерофосфат придает хитозановой композиции термочувствительные свойства, инициируя раствор-гель переход при достижении температуры 37 °C [1,69,70].

Механизм термочувствительности системы хитозан-β-глицерофосфат может быть объяснено следующим образом:

1) β-ГФ уменьшает полярность аминогрупп хитозана, что ведет к увеличению гидрофобности матрицы полимера;

2) Вследствие повышения гидрофобности полимерной цепи снижается степень сольватации хитозана и происходит дегидратация хитозановой цепи;

3) Между цепями хитозана и β-ГФ возникает электростатическое притяжения за счет переноса протонов с аминогрупп полимера на β-глицерофосфат, что ведет к формированию водородных связей и установке термодинамического равновесия [70,71].

Для установления термодинамического равновесия в системе должен установиться баланс между следующими силами: (1) силой электростатического отталкивания внутри молекулы хитозана, (2) силой притяжения между положительно заряженными аминогруппами в хитозане и отрицательно заряженной фосфатной группой в β-глицерофосфате, (3) силой возникающих водородных связей и гидрофобных взаимодействий, возникающих между фрагментами хитозана, и (4) способностью полиольных фрагментов β-ГФ снижать силу поверхностного натяжения на границе раздела фаз вода-хитозан [70,72].

В дополнение к вышеупомянутому Чо и коллектив авторов связывают возникновение термочувствительного перехода в системе хитозан-β-глицерофосфат уменьшением количества водородных связей между отдельными цепями хитозана, что ведет к более упорядоченному формированию гидрофобных мицеллярных ядер при повышении температуры в растворе. Это

изменение, вносимое β-ГФ в систему, позволяет формировать устойчивые мицеллы хитозана в растворе с разветвленной гидрофильной короной, которая способна образовывать большое количество межмолекулярных водородных связей, формируя стабильную гелевую сетку при физиологической температуре [73].

Термочувствительные инъекционные гидрогели на основе хитозана с использованием динатриевой соли β-глицерофосфата характеризуются температурой гелеобразования, близкой к 37 °C (рисунок 1.2) [1]. Формирование гелевой структуры при нагревании обусловлено уменьшением электростатического отталкивания между цепями хитозана и последующими гидрофобными взаимодействиями, стабилизированными водородными связями [1,70,74]. Следует отметить, что в отличие от многих термочувствительных систем, гидрогель хитозан/β-ГФ является лишь частично термореверсивным, так как после формирования гелевой структуры при 37 °C охлаждение приводит к размягчению матрицы, но не к полному возврату в исходное жидкое состояние [75,76].

Термочувствительные системы на основе хитозана демонстрируют значительный потенциал для клинического применения. В отличие от pH-чувствительных *in situ* систем, они характеризуются более предсказуемым поведением и большей воспроизводимостью результатов [1]. Ключевыми преимуществами являются способность к пролонгированному высвобождению лекарственных веществ, повышение биодоступности и способность к биодеградации [71]. Важным технологическим достоинством является способность некоторых составов к обратимому гелеобразованию без потери стабильности. В ряде работ подтверждены удовлетворительные реологические характеристики и достижение температуры фазового перехода в пределах физиологических значений (35–40 °C) [1,68].

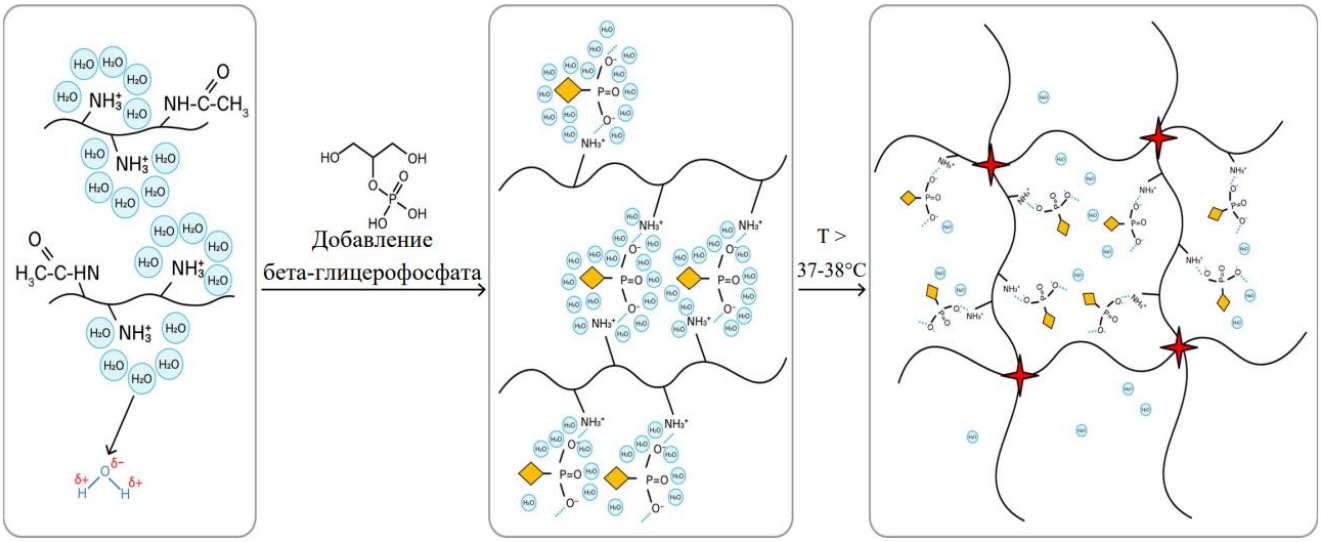


Рисунок 1.2 – Термочувствительный переход в системе хитозан/ β-ГФ

## 1.6. Термочувствительные гели на основе полимолочной-со-гликолевой кислоты

Полимеры на основе полимолочной-со-гликолевой кислоты (ПЛГА) и их сополимеры с полиэтиленгликолем (ПЭГ) относятся к числу наиболее перспективных синтетических матриц для создания термочувствительных *in situ* систем доставки. Интерес к данному классу материалов обусловлен их доказанной биосовместимостью, способностью к гидролитической деградации с образованием физиологических метаболитов, молочной и гликолевой кислот, а также возможностью тонкой настройки физико-химических свойств путем варьирования молекулярно-массовых характеристик и соотношения мономерных звеньев [3,77].

ПЛГА представляет собой линейный алифатический сополимер, получаемый открытокольцевой сополимеризацией циклических димеров молочной кислоты (лактида, LA) и гликолевой кислоты (гликолида, GA) [78]. Молекулярная масса ПЛГА может варьироваться в широком диапазоне — от 5000 до 200 000 г/моль (Да, дальтон), а соотношение мономерных звеньев LA:GA определяет гидрофильно-липофильный баланс и кристалличность полимера. Повышение содержания LA фрагментов увеличивает гидрофобность и снижает скорость гидролитической деградации полимера, тогда как возрастание доли GA, напротив, ускоряет процессы гидратации и эрозии полимерной матрицы [79,80]. Стереохимия мономеров также играет существенную роль: сополимеры на основе D, L-лактида проявляют свойства аморфных субстанций и демонстрируют более высокую скорость проникновения воды, что приводит к ускоренной деградации по сравнению с кристаллическими L- или D-формами [17].

Основным ограничением ПЛГА для применения в *in situ* системах является его нерастворимость в воде. Однако введение гидрофильных ПЭГ-блоков в структуру сополимера изменяет его свойства. Трехблочные блок-сополимеры ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, приобретают амфифильный характер, становятся растворимыми в воде и демонстрируют термочувствительное поведение с обратимым раствор-гель переходом при физиологических температурах [81,82]. Данная модификация позволяет превратить ПЛГА из инертного биоразлагаемого полимера в функциональную матрицу для инъекционных гидрогелей с контролируемым высвобождением.

Молекулярная масса блок-сополимера является основным параметром, определяющим его растворимость, температуру гелеобразования и скорость деградации. Для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА систем, перспективных для фармацевтической разработки, молекулярная масса обычно находится в диапазонах от 5000 до 10 000 Да при массовой доле ПЭГ в пределах 30% [83]. В данном диапазоне обеспечивается хорошая водорастворимость и возможность получения термореверсивных водных гелей с фазовым переходом в интервале 25–40 °C при концентрации полимера 15–25% [83,84].

Отдельное влияние на мицеллообразование и температурочувствительное гелеобразование в водных растворах ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА оказывает молекулярная масса ПЭГ-фрагментов в полимерах. Исследования показывают, что увеличение длины ПЭГ-цепи, т.е. повышение молекулярной массы гидрофильного блока, смещает температуру раствор-гель перехода в область более высоких значений, тогда как более короткий ПЭГ-блок способствует гелеобразованию при более низких температурах [83]. В работах Shim с соавторами 2002 года установлено, что ККМ и нижняя граница КТГ возрастают с увеличением отношения молекулярных масс ПЭГ/ПЛГА [81]. Для сополимеров с молекулярной массой ПЭГ-блока около 1500 Да температура гелеобразования может быть точно настроена в диапазоне 30–40 °C путем варьирования соотношения D, L-лактида и гликолида, а также общей молекулярной массы сополимера [85]. При этом модуль упругости формируемого геля зависит от соотношения LA/GA, молекулярной массы и полидисперсности синтезируемых блок-сополимеров [78].

Влияние молекулярной массы гидрофобных ПЛГА-блоков также оказывает влияние на свойства конечного полимера и его водных растворов. С увеличением длины ПЛГА-сегментов температура фазового перехода закономерно снижается, что связано с усилением межмолекулярных гидрофобных взаимодействий и увеличением плотности упаковки мицеллярного ядра [86]. Согласно результатам исследований Chen с соавторами 2015 года, ширина молекулярно-массового распределения ПЭГ-блока может оказывать такое же влияние на гелеобразование, как и средняя молекулярная масса блок-сополимера. Так, более широкая полидисперсность ПЭГ-блока в некоторых случаях приводит к сосуществованию термочувствительных гелей способных к раствор-гель и гель-раствор переходам при повышении температуры в одной системе [83].

Деградация блок-сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА протекает преимущественно за счет гидролиза сложноэфирных связей в ПЛГА-блоках, причем скорость процесса напрямую зависит от молекулярной массы полимера. Блок-сополимеры с более высокой молекулярной массой демонстрируют более длительные сроки деградации от нескольких недель до нескольких месяцев [17,87]. В физиологических условиях гидролиз сопровождается снижением молекулярной массы и образованием низкомолекулярных олигомеров, которые в дальнейшем метаболизируются до молочной и гликолевой кислот [88].

Соотношение лактидных и гликолидных звеньев в ПЛГА-блоке является одним из наиболее эффективных инструментов регулирования свойств термочувствительных сополимеров. Увеличение содержания GA в блок-сополимере приводит к повышению ККМ, тогда как температура раствор-гель перехода и временной интервал гелеобразования могут быть точно настроены путем варьирования соотношения LA:GA в звеньях ПЛГА при синтезе [82].

Стереохимия мономеров также вносит существенный вклад в свойства конечного полимера. Сополимеры на основе D, L-лактида являются аморфными и характеризуются более высокой скоростью гидролитической деградации по сравнению с изотактическими L- или D-формами, которые обладают кристалличностью и, следовательно, более низкой проницаемостью для воды [17]. В контексте разработки *in situ* систем предпочтение часто отдается D, L-лактиду, поскольку аморфная структура обеспечивает более равномерное распределение гидрофобных доменов в полимерных звеньях и предсказуемую кинетику высвобождения АФС.

Термочувствительный раствор-гель переход в водных растворах ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, проиллюстрированный на рисунке 1.3, обусловлен амфифильной природой блок-сополимера и представляет собой многостадийный процесс самоорганизации полимерных цепей в водном растворе с механизмом описанным в подпункте 1.3 Главы 1 [43,81,89–91].

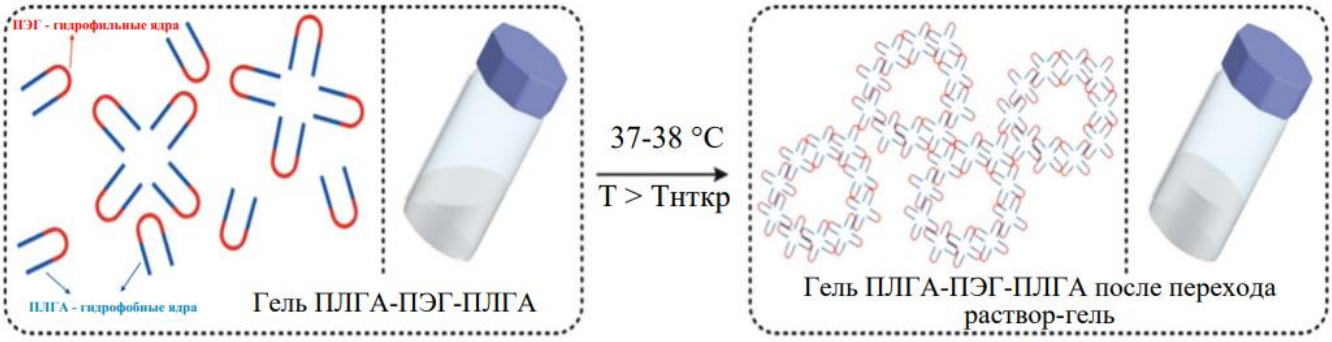


Рисунок 1.3 – Термочувствительный переход в гелях ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

## 1.7. Кеторолака трометамин в *in situ* системах

В качестве модельного действующего вещества для разработки термореверсивных лекарственных форм используется АФС I класса биофармацевтической классификационной системы (БКС) – кеторолака трометамин (далее – КТ). КТ является хорошо изученным эффективным нестероидным противовоспалительным средством, использующимся в различных областях фармакотерапии. Принадлежность к I классу БКС указывает на высокую растворимость данного вещества в полярных растворителях, таких как вода, и его высокую всасываемость в тканях организма человека. В одном из современных исследований было также доказано, что кеторолака трометамин оказывает низкое влияние на критическую температуру гелеобразования в термореверсивных растворах полоксамеров, что позволяет предположить его незначительное влияние на КТГ растворов новых экспериментальных термочувствительных систем или отсутствие взаимодействия данного АФС с новыми полимерными системами [92].

Кеторолак трометамин — это одобренный Министерством здравоохранения РФ нестероидный противовоспалительный препарат. Он относится к группе пирроло-пирролов. Химически КТ известен как (±)-5-бензоил-2,3-дигидро-1H-пирролизин-1-карбоновая кислота, 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол [93]. Химическая формула КТ - $C_{15}H_{13}NO_3 \cdot C_4H_{11}NO_3$, молекулярная масса - 376,4 г/моль. КТ представляет собой кристаллический порошок, который имеет три кристаллические формы, хорошо растворимые в воде (56,5 мг/мл) в диапазоне pH 4-8, но проявляющие ограниченную водную растворимость (0,86 мг/мл) при pH выше 9 [94]. КТ выпускается в различных лекарственных формах, таких как таблетки, глазные капли и парентеральные растворы, все из которых обеспечивают немедленное высвобождение [95].

Благодаря своим фармакологическим преимуществам кеторолак привлек внимание клиницистов и стал одним из широко назначаемых обезболивающих средств. Он обеспечивает анальгезию в 800 раз сильнее, чем аспирин, в 50 раз сильнее, чем напроксен, и оказывает анальгезирующее действие, сравнимое с опиоидами, такими как морфин и оксиморфин [96–98]. Фармакологически КТ является неселективным НПВС, ингибирует ферменты циклооксигеназы-1 и циклооксигеназы-2 [99]. После перорального приема КТ достигает $C_{max}$ в течение 1-2 часов и выводится в основном с мочой с периодом полувыведения 5-6 часов [100].

Несмотря на высокую анальгетическую активность кеторолака, его преимущества часто конфликтуют с нежелательными реакциями. Системное введение КТ связано с серьезными побочными реакциями, такими как нефротоксичность, язвы желудочно-кишечного тракта и кровотечения [101]. Поэтому для ограничения системных побочных реакций было целесообразно местное введение или таргетное применение кеторолака трометамина с помощью смарт-систем доставки лекарственных средств.

Стабильность КТ является критическим параметром, определяющим как условия хранения лекарственного препарата, так и срок его годности. Согласно исследованиям принудительной деградации, проведенным в соответствии с руководством ICH Q1A(R2), кеторолака трометамин демонстрирует чувствительность к ряду стресс-факторов.

В исследованиях, выполненных с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с времяпролетной и квадруполной тандемной масс-спектрометрией (LC/ESI/Q/TOF/MS/MS), идентифицировано девять продуктов деградации кеторолака трометамина, а их токсикологический профиль оценен методами *in silico* [102]. Препарат подвергается деградации в гидролитических условиях (кислых, основных и нейтральных), фотолитических условиях (в растворе), а также при термическом воздействии. При этом твердая форма субстанции проявляет устойчивость к фотолитическому разложению [102].

В условиях термического стресса (нагревание до 50–70°C) наблюдается значительная деградация; в 1H растворах кислот и оснований деградация имеет умеренный характер [103]. При

этом кеторолака трометамин демонстрирует устойчивость при хранении в холодильных условиях (4°C) в течение как минимум 90 дней без образования продуктов деградации [104]. Основными путями деградации являются гидролиз (в кислой, щелочной и нейтральной среде), окисление и фотохимические реакции (в растворе) [102].

Данные факторы обосновывают необходимость контроля примесей при разработке спецификации, выбора условий хранения (2–8°C, защита от света) и разработки стабильности-индикативных аналитических методик для подтверждения качества препарата на протяжении всего срока годности.

Внутрисуставное введение кеторолака трометамина активно изучается в клинической практике как альтернатива кортикостероидным инъекциям при лечении остеоартрита (ОА) крупных суставов. Согласно результатам рандомизированного контролируемого исследования Jurgensmeier и соавт. (2021), внутрисуставные инъекции кеторолака обеспечивают сопоставимое улучшение клинических исходов по сравнению с триамцинолоном при первичном ОА тазобедренного и коленного суставов [105]. В исследовании, включавшем 110 пациентов (52 с поражением тазобедренного и 58 — коленного суставов), показано, что максимальный терапевтический эффект достигается на 1-й неделе после инъекции с последующим постепенным снижением, при этом статистически значимых различий между группами кеторолака и триамцинолона не выявлено. Побочные эффекты при применении обоих препаратов были минимальными [105]. Авторы заключают, что кеторолак является дополнительным низкозатратным вариантом консервативного лечения первичного ОА, а его отличающийся механизм действия (ингибирование ЦОГ-1 и ЦОГ-2) позволяет избежать повреждения хряща, связанного с кортикостероидами, и не препятствует раннему хирургическому вмешательству в случае неэффективности терапии [105].

Аналогичные результаты получены в ретроспективном сравнительном исследовании Xu и соавт. (2020), включавшем 84 пациента с односторонним симптоматическим ОА коленного сустава: внутрисуставное введение кеторолака (10 мг) и кортикостероидов (триамцинолона ацетонид, 25 мг) продемонстрировало сопоставимое обезболивание и функциональное улучшение [106]. В группе кеторолака успешные исходы были достигнуты у 76,2% пациентов через 5 недель и у 57,1% — через 3 месяца после последней инъекции; различия с группой кортикостероидов статистически не значимы [106]. В ряде других работ также подтверждена сопоставимая эффективность внутрисуставного кеторолака и кортикостероидов при остеоартрите коленного и тазобедренного суставов [102].

Особый интерес представляет комбинированное применение кеторолака с гиалуроновой кислотой. Исследования показывают, что добавление кеторолака к внутрисуставной инъекции гиалуроновой кислоты обеспечивает более быстрое наступление обезболивающего эффекта по

сравнению с мототерапией гиалуроновой кислотой, что подтверждает целесообразность разработки комбинированных депо-гелей с пролонгированным высвобождением [102].

Таким образом, накопленные клинические данные подтверждают, что внутрисуставное введение кеторолака в дозе 10–30 мг обеспечивает значимое и длительное (до 3 месяцев) снижение боли и улучшение функции при остеоартрите коленного и тазобедренного суставов, сопоставимое с эффектом кортикостероидных инъекций. Это обосновывает целесообразность создания депо-гелей с пролонгированным высвобождением, позволяющих увеличить интервал между инъекциями до нескольких дней или недель, а также снизить риск системных побочных эффектов.

## 1.8. Методы *in vitro* оценки высвобождения лекарственных веществ из гидрогелей

Инструментарий, используемый для изучения высвобождения лекарственных веществ из гидрогелей *in vitro*, определяется химической природой полимера, ожидаемым профилем высвобождения и конечным клиническим применением препарата. Несмотря на отсутствие унифицированных фармакопейных требований для этой перспективной лекарственной формы, в научной литературе и регуляторной практике сложился ряд общепризнанных подходов.

Все многообразие методов можно разделить на две большие группы: основанные на стандартных аппаратах и разработанные для специфических систем [107].

### 1.8.1. Аппараты для оценки высвобождения действующих веществ из лекарственных средств

Выбор метода для проведения испытания по высвобождению АФС из лекарственной формы является ключевым этапом фармацевтической разработки, особенно для препаратов, представленных инъекционными гелями с пролонгированным высвобождением, для которых отсутствуют жесткие фармакопейные требования, но существует необходимость в релевантной *in vitro* оценке кинетики высвобождения. В зависимости от типа лекарственной формы и целей исследования могут использоваться как стандартные аппараты для проведения испытаний по растворению и высвобождению, так и специализированные установки.

Наиболее распространенными аппаратами для оценки высвобождения из твердых и полужидких лекарственных форм являются аппарат 1 «Вращающаяся корзинка» и аппарат 2 «Лопастная мешалка». Для энтеральных систем пролонгированного действия, представленных суппозиториями, чаще всего применяется аппарат 3 «Проточная ячейка», который считается

наиболее оптимальным для обеспечения корректных условий высвобождения, поскольку он обеспечивает непрерывную циркуляцию среды и поддержание условий достаточного разбавления, которые необходимы для изучения длительного профиля высвобождения без влияния накопления лекарства в среде [108].

В фармакопеях ЕАЭС и РФ описание теста «Растворение» представлено в общих фармакопейных статьях (ОФС). В ГФ РФ XV издания существует ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм», а также ОФС.1.4.2.0015 «Растворение для суппозиториев на липофильной основе». Однако для анализа высвобождения действующих веществ из парентеральных гелей с пролонгированным высвобождением в Российской Федерации не представлено нормативной документации с прямыми указаниями на применение данных аппаратов [109,110].

В USP общей главе <1724> подробно описана разработка методов *in vitro* для полужидких форм, включая гели. Методика включает выбор подходящей мембраны, среды высвобождения и условий эксперимента. Информация, представленная в <1092>, также может быть применима к другим лекарственным формам, включая парентеральные [111].

Аппарат 2 (лопастная мешалка) также может использоваться, в частности в сочетании с диализными мембранами. При этом в фармакопейных руководствах упоминается, что испытание может включать диализный мешок, обратный диализный мешок или проточную систему. В ЕАЭС подход к тестированию качества изложен в Фармакопее ЕАЭС, где, в частности, используется IVRT-тест (*In vitro* Release Testing) для оценки качества лекарственных форм, особенно топических препаратов, таких как кремы, гели и мази. Этот метод позволяет оценить скорость высвобождения активного вещества из лекарственной формы в условиях, максимально приближенных к физиологическим.

Среди множества методов для гидрогелей и систем с пролонгированным высвобождением наиболее распространенным является метод диализа. Гель помещается в диализный мешок с полупроницаемой мембраной с определенным номиналом отсечения по молекулярной массе (MWCO), который затем погружается в среду высвобождения [112]. Диализный метод часто становится единственным приемлемым способом тестирования *in vitro* для парентеральных форм с модифицированным высвобождением по следующим причинам:

1. Моделирование *in vivo* условий. Мембрана ограничивает диффузию полимерной матрицы и крупных агрегатов в среду высвобождения, что имитирует барьерную функцию тканей или самого геля *in vivo*.

2. Упрощение пробоподготовки. Отпадает необходимость в трудоемком центрифугировании или фильтрации проб для отделения полимера перед анализом.

3. Возможность использования стандартных аппаратов растворения, таких как аппарат 2 «Лопастная мешалка», в сочетании с диализными мешками, что обеспечивает воспроизводимость и сравнимость результатов [112].

В ЕАЭС требования к разработке, валидации и проведению тестов высвобождения *in vitro* отражены в Решении ЕАЭС от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» и в Решении Коллегии ЕЭК от 17 июля 2018 г. № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств». В соответствии с этим документом, обязательными для валидации методик количественного определения и высвобождения являются следующие характеристики: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, диапазон применения и предел количественного определения [113,114].

В ГФ РФ XV издания введена ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», гармонизированная с Решением № 113. В ЕАЭС в настоящее время действует Фармакопея ЕАЭС, которая устанавливает единые требования к качеству лекарственных средств, включая ОФС.2.3.14.0 «Валидация аналитических методик» — общую статью, аналогичную ОФС.1.1.0012.15. Этот документ распространяется на все типы аналитических методик, включая методики количественного определения и высвобождения [115,116].

Ключевым требованием является установление линейности в пределах аналитической области методики и демонстрация корреляции между количеством высвободившегося действующего вещества в единицах массы на единицу площади мембраны и временем. При выборе метода следует руководствоваться принципом, что испытания должны проводиться в условиях, максимально приближенных к физиологическим.

Для оценки высвобождения из инъекционных гидрогелей наиболее предпочтительным является сочетание метода диализа с использованием диализных мешков и аппарата 2 «Лопастная мешалка». Выбор метода испытания, условий эксперимента и мембраны должен быть научно обоснован, а сам метод должен быть валидирован в соответствии с требованиями ГФ РФ XV издания и Руководства ЕАЭС по валидации аналитических методик (Решение № 113).

### 1.8.2. Биорелевантные среды высвобождения

При изучении высвобождения лекарственных веществ из гелей для инъекций для внутрисуставного введения критически важным является максимально возможное приближение экспериментальных *in vitro* условий к реальной физиологической среде — синовиальной жидкости. Биорелевантные среды, имитирующие основные физико-химические параметры

синовиальной жидкости, позволяют повысить прогностическую значимость результатов теста высвобождения для последующего *in vivo* поведения системы доставки.

Синовиальная жидкость представляет собой сложную биологическую среду, выполняющую смазывающую и амортизационную функции в суставах. Ее уникальные реологические свойства обусловлены присутствием комплекса макромолекул, среди которых ключевую роль играет гиалуроновая кислота — естественный компонент, вырабатываемый синовиальной оболочкой и обеспечивающий необходимую вязкость суставной смазки. Подавляющее большинство вязкоэластических добавок и протезов синовиальной жидкости представлены производными гиалуроновой кислоты [117].

Физиологический диапазон pH синовиальной жидкости, согласно литературным данным, находится в пределах pH 7,4–7,8. В здоровом суставе концентрация гиалуроновой кислоты составляет 2,0–4,0 мг/мл, что подтверждается данными современных исследований. В работе, выполненной под руководством Wu et al., было установлено, что добавление гиалуроновой кислоты в концентрации 2,0 мг/мл обеспечивает наилучшее воспроизведение реологических свойств здоровой синовиальной жидкости и способствует сохранению фенотипа хондроцитов [118]. В обзорной работе Красивиной И.Г. с соавторами также подчеркивается, что гиалуроновая кислота является естественным компонентом синовиальной жидкости, поддерживающим ее реологические свойства и обладающим противовоспалительным и хондропротективным потенциалом [117].

При остеоартрите и других воспалительных заболеваниях суставов происходят существенные изменения состава синовиальной жидкости. Ключевыми отличительными признаками являются:

- снижение pH до кислых значений;
- значительное уменьшение концентрации гиалуроновой кислоты, что ведет к потере вязкоэластических свойств и ухудшению смазывающей способности синовиальной жидкости.

В ряде научных работ для моделирования остеоартритного состояния используются сыворотки животных или композиции на основе гиалуроновой кислоты с добавлением цитокинов. Исследования показывают, что синовиальная жидкость при остеоартрите обладает иными реологическими свойствами, и для их имитации часто применяются растворы с пониженной концентрацией гиалуроновой кислоты. В патенте Georgia Tech Research Corporation описана композиция для моделирования синовиальной жидкости при дегенеративных заболеваниях суставов, включающая цитокины и гиалуроновую кислоту, которая по вязкости, модулю упругости и модулю потерь соответствует синовиальной жидкости пациента с остеоартритом [119].

На основе проведенного анализа литературных данных можно выделить наиболее обоснованные составы биорелевантных сред:

1. Модель здорового сустава:

- pH 7,4, имитирующий физиологические условия;
- концентрация гиалуроновой кислоты: 2,0–2,5 мг/мл — диапазон, рекомендованный рядом авторов для имитации здоровой синовиальной жидкости;
- в качестве буферной основы используется фосфатно-солевой буфер (далее - ФСБР) pH 7,4, обеспечивающий стабильность ионной среды;
- для предотвращения микробной контаминации в ходе длительных экспериментов добавляют 0,02% натрия азида в качестве консерванта [118].

2. Модель воспаленного/остеоартритного сустава:

- pH 6,8, отражающий сдвиг кислотно-щелочного баланса в кислую сторону при воспалении;
- концентрация гиалуроновой кислоты: 0,5–0,75 мг/мл, имитирующая патологическое снижение содержания ГК в синовиальной жидкости;
- буферная основа — ФСБР, доведенный до pH 6,8 с помощью хлористоводородной кислоты [120].

3. Контрольная среда:

- ФСБР pH 7,4 без добавления гиалуроновой кислоты;
- используется как среда контроля качества для выделения вклада гиалуроновой кислоты в процесс высвобождения.

Использование биорелевантных сред оказывает значительное влияние на профиль высвобождения лекарственных веществ методами диализа из гидрогелевых матриц. Присутствие гиалуроновой кислоты может:

- увеличивать вязкость среды, что приводит к замедлению диффузии АФС из диализного мешка;
- влиять на ионизацию лекарственного вещества, особенно если АФС является амфифильным соединением;
- при определенных условиях взаимодействовать с полимерной матрицей, изменяя степень набухания гидрогеля [121].

Так, в работе 2024 года Wójcik-Pastuszka et al. было показано, что высвобождение бупивакаина из метилцеллюлозного гидрогеля существенно различается в среде ФСБР, ФСБР с высокомолекулярной ГК и ФСБР с низкомолекулярной ГК, что подтверждает необходимость использования дифференцированных биорелевантных сред для адекватной оценки кинетики высвобождения. В этом исследовании для моделирования здорового и остеоартритного суставов

были разработаны дифференцированные среды: ФСБР pH 7,4 с высокомолекулярной ГК для «здорового» состояния и ФСБР pH 6,8 с низкомолекулярной ГК для модели остеоартрита. Наиболее существенные различия в профилях высвобождения наблюдались между контрольной средой и средой, содержащей ГК [122].

### 1.8.3. Регуляторные подходы к оценке высвобождения из лекарственных форм для парентерального и местного применения

В Российской Федерации и ЕАЭС в настоящее время отсутствуют специализированные требования к биорелевантным средам для тестирования высвобождения из гелей для парентерального применения. В Решении ЕАЭС от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» в настоящей редакции приводятся подходы для оценки высвобождения АФС для твердых дозированных форм для энтерального применения и для мягких лекарственных форм для местного применения. Однако в данном Решении и ГФ РФ XV издания (ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» и ОФС «Рекомендациях по проведению испытания на растворение») представлены общие подходы к выбору сред растворения и алгоритмам проведения *in vitro* оценки высвобождения АФС из лекарственных форм. Согласно этим документам, состав среды растворения должен выбираться на основе физико-химических свойств действующего вещества и вспомогательных веществ в пределах диапазона условий, в которых лекарственный препарат предположительно будет находиться после его введения. Это положение напрямую применимо к обоснованию выбора биорелевантных сред для внутрисуставных препаратов.

Рекомендации по проведению испытания на растворение ГФ РФ также указывают, что pH среды растворения в общем случае выбирают из диапазона от 1 до 8, однако при соответствующем обосновании может потребоваться среда с более высоким pH. Среду растворения следует деаэрировать, а ее состав выбирают, стремясь максимально приблизить условия эксперимента к реальным [123].

В Фармакопее ЕАЭС, в частности в ОФС.2.3.14.0 «Валидация аналитических методик», установлены требования к валидации методик количественного определения, включая методики, используемые в тестах высвобождения. Обязательными для валидации являются специфичность, линейность, правильность, прецизионность, диапазон применения и предел количественного определения. Для тестов высвобождения ключевым требованием является установление линейности в пределах аналитической области методики и демонстрация корреляции между количеством высвободившегося действующего вещества в единицах массы на единицу площади

мембраны и временем. Фармакопея также требует представления подробного описания условий исследования и валидации аналитических методик [115].

## 1.9. Кинетическое моделирование высвобождения действующих веществ из гидрогелей для внутрисуставного введения

Интерпретация экспериментальных профилей высвобождения проводится путем их математического описания с помощью известных моделей. Данные модели позволяют описать кинетику высвобождения, а также предположить механизмы, контролирующие высвобождение.

Основные модели, используемые для описания кинетики высвобождения АФС из лекарственных препаратов, представлены в Таблице 1.1.

Одной из наиболее информативных является модель Корсмейера-Пеппаса, так как позволяет установить механизм контролируемого высвобождения из полимерных систем, где процессы диффузии и набухания (релаксации) матрицы могут сосуществовать и влиять друг на друга [124].

Таблица 1.1 – Модели кинетики высвобождения лекарственных веществ

| Модель | Уравнение | Интерпретация |
|---|---|---|
| Нулевого порядка | $Q_t = Q_0 + K_0 t$ | Описывает высвобождение с постоянной скоростью, независимо от концентрации. |
| Первого порядка | $\ln Q_t = \ln Q_0 - K_1 t$ | Характеризует высвобождение, скорость которого зависит от остаточной концентрации вещества. |
| Хигучи | $Q_t = K_H \sqrt{t}$ | Модель диффузионного высвобождения из плоской матрицы. |
| Корсмейера-Пеппаса | $Q_t/Q_\infty = K_{KP} t^n$ | Универсальная степенная модель. Показатель n (коэффициент диффузии) указывает на механизм: $n = 0.5$ — фиковская диффузия; $0.5 < n < 1.0$ — аномальный транспорт (диффузия и набухание); $n = 1.0$ — нулевой порядок. |

В последние годы наблюдается развитие более сложных моделей, учитывающих деградацию полимерной матрицы. Одной из первых работ, в которой была показана возможность использования модели кинетического анализа для описания высвобождения АФИ из полимерной матрицы, разрушение которой происходит на границе контакта со средой растворения, является исследование, представленное в работе Zygourakis K. [125]. Данный подход особенно актуален для биоразлагаемых полимерных систем, таких как ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, где высвобождение АФС сопряжено с гидролитической деградацией матрицы.

При моделировании кинетики высвобождения из гидрогелей для внутрисуставного введения важно учитывать, что стандартные модели (нулевого порядка, первого порядка, Хигучи, Корсмейера-Пеппаса) описывают высвобождение в идеализированных условиях *in vitro* (условия достаточного разбавления, постоянный объем среды). Для корректной интерпретации результатов и прогнозирования *in vivo* поведения необходимы дополнительные исследования, включая установление корреляции *in vitro – in vivo* (IVIVC) [126].

## 1.10. Регуляторные требования к тестам высвобождения и разработке и валидации аналитических методик

Разработка и валидация методик высвобождения *in vitro*, особенно для новых лекарственных форм, таких как парентеральные гидрогели, регламентируется комплексом нормативных документов, которые, несмотря на отсутствие узкоспециализированных требований, задают общие принципы и подходы.

Фундаментом современной фармацевтической разработки являются руководства ICH серии Q. Наиболее значимыми в контексте разработки методик высвобождения являются:

- ICH Q8(R2) «Фармацевтическая разработка» — вводит концепцию Quality by Design (QbD) [127–129];
- ICH Q9 «Управление рисками для качества» — определяет принципы оценки рисков [128–130];
- ICH Q10 «Фармацевтическая система качества» — устанавливает требования к системе качества на протяжении жизненного цикла продукта [128,129,131];
- ICH Q12 «Технические и регуляторные аспекты управления жизненным циклом лекарственного препарата» — дополняет QbD-подход механизмами управления изменениями [128,129,132];
- ICH Q14 «Analytical procedure Development» (2023/2024) — описывает научные и риск-ориентированные подходы к разработке аналитических методик [128,129,133];
- ICH Q2(R2) «Validation of analytical procedures» (2023/2024) — содержит обновленные требования к валидации [128,129,134].

QbD — это системный подход, предусматривающий определение целей перед началом разработки продукции, точную оценку продукции и процесса ее производства, а также контроль процесса производства на основе научных данных и принципов управления рисками для качества. Внедрение этого подхода позволяет сместить акцент с финального тестирования готовой продукции на обеспечение качества на всех этапах разработки и производства [135].

Современные обзоры подчеркивают, что информация, получаемая в рамках QbD-методологии, гармонизируется в регистрационных досье для одобрения на европейском рынке. Разработка дизайн-пространства (Design Space) как инструмента QbD остается актуальной, однако ее практическое применение варьируется в зависимости от типа продукта и регуляторного контекста. Внедрение обновленных руководств ICH Q2(R2) и Q14 требует пересмотра подходов к разработке и валидации аналитических методик на фармацевтических предприятиях [136].

В Российской Федерации и странах ЕАЭС нормативная база в данной области базируется на принципах ICH.

Государственная фармакопея РФ XV издания содержит ряд общих фармакопейных статей, применимых к инъекционным препаратам. Так, ОФС.1.4.2.0003 «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения» устанавливает требования к контролю заполнения ампул, картриджей и предварительно наполненных шприцев [137].

Единая Фармакопея ЕАЭС устанавливает общие требования к качеству лекарственных средств на рынке Союза. В статье 2.3.14.0 «Валидация аналитических методик» детально изложены требования к валидации методик для различных целей. В таблице 2.3.14.0-1 документа указано, что для количественных методик (включая определение растворения) обязательной валидации подлежат: специфичность, линейность, диапазон применения, правильность и прецизионность (повторяемость и промежуточная прецизионность). Этот документ гармонизирован с международными руководствами ICH [115].

В дополнение к этому, важную роль играет ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» ГФ РФ XV издания. Данная статья определяет общие принципы испытания для подтверждения постоянства состава и стабильности технологического процесса. Хотя тест «Растворение» разработан для твердых лекарственных форм, именно его методология и аппаратура (корзинка, лопастная мешалка, проточная ячейка) могут быть адаптированы и для гидрогелей [109].

В USP общей главой <1724> «Semisolid dug Products—Performance Tests» подробно описана разработка методов *in vitro* для полужидких форм, включая гели, кремы, мази и лосьоны. Методика включает выбор подходящей мембраны, среды высвобождения и условий эксперимента. В USP также ведется работа по включению *in vitro* тестов для оценки высвобождения из *in situ* гелей и депо-формирующих систем. *In vitro* drug release tests (IVRTs) рассматриваются как один из наиболее важных инструментов для разработки лекарственных средств и оценки эффективности полужидких лекарственных форм [138].

Для *in situ* гелей/депо-формирующих продуктов, которые образуют гель/депо в месте введения и обеспечивают пролонгированную доставку лекарственного средства, в настоящее время отсутствуют стандартизованные фармакопейные методы. Как отмечается в литературе, для

парентеральных продуктов с контролируемым высвобождением не существует стандартизованных методов *in vitro* тестирования высвобождения. В этой связи разработка метода должна быть научно обоснована, валидирована в соответствии с международными и евразийскими требованиями к аналитическим методикам и вписана в общую логику подхода QbD [139].

Концепция QbD становится все более значимой в российском и евразийском регуляторном поле. Ее имплементация началась с Рекомендации Коллегии ЕЭК от 26 сентября 2017 года № 19, а позже была официально закреплена в Обновленном Приложении 15 GMP ЕАЭС (Решение Совета ЕЭК от 14 июля 2021 года № 65) [135].

QbD подразумевает, что на этапе разработки должны быть определены не только целевой профиль качества продукта (QTPP), но и критические атрибуты качества (CQA), а также установлена взаимосвязь между критическими параметрами процесса (CPP) и критическими атрибутами материала (CMA). Для разрабатываемого гидрогеля это означает, что тест высвобождения *in vitro* должен быть разработан и валидирован на самых ранних этапах, чтобы его можно было использовать для характеристики препаратов, применяемых в доклинических и клинических исследованиях [139].

Важными элементами нормативной базы являются Решение ЕАЭС от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» и Руководство ЕАЭС по валидации аналитических методик, утвержденное Решением Коллегии № 113 (2018 г.). Данные документы определяют правила валидации аналитических методик и перечень характеристик, подлежащих оценке. Положения этого руководства гармонизированы с международными стандартами ICH и USP и служат основой для подтверждения пригодности разработанной методики высвобождения [113,114].

## 1.11. Выводы к главе 1

1. Проведенный систематический анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что термочувствительные *in situ* гидрогели представляют собой перспективную платформу для парентеральной доставки лекарственных средств, обеспечивая пролонгированное и контролируемое высвобождение активных фармацевтических субстанций. Установлено, что среди полимерных матриц наибольший интерес для внутрисуставного введения представляют хитозан/β-глицерофосфат и блок-сополимер полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем.

2. Систематизированы физико-химические и фармакологические свойства кеторолака трометамина, относящегося к I классу биофармацевтической классификационной системы. Показано, что высокая водорастворимость и проницаемость делают его удобной моделью для разработки термочувствительных систем доставки. Доказанная в клинических исследованиях анальгетическая эффективность при внутрисуставном введении подтверждает целесообразность создания пролонгированных гелевых депо-форм для терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний суставов. Кроме того, обобщены факторы, влияющие на стабильность субстанции, что обосновывает необходимость контроля примесей и выбора условий хранения лекарственных форм, содержащих КТ.

3. Установлено, что нормативные требования Российской Федерации и Евразийского экономического союза гармонизированы с международными руководствами ICH и предписывают обязательную валидацию методик количественного определения и высвобождения по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость и промежуточная прецизионность), диапазон применения и предел количественного определения. Кроме того, в 2023–2024 гг. вступили в силу обновленные руководства ICH Q2(R2) и ICH Q14, вводящие расширенные требования к разработке и валидации аналитических методик на основе концепции жизненного цикла и Analytical Target Profile (ATP). Концепция «качества через проектирование» (Quality by Design, QbD) должна быть положена в основу разработки методов контроля качества.

4. На основе проведенного литературного обзора идентифицированы такие нерешенные научно-практические проблемы, как отсутствие системного сравнительного анализа различных типов полимерных матриц в идентичных экспериментальных условиях для доставки кеторолака трометамина; недостаток данных по долгосрочной стабильности термочувствительных гелей на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА при хранении; отсутствие валидированных аналитических методик количественного определения и оценки высвобождения АФС из пролонгированных лекарственных форм для парентерального введения.

# ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования проводились на кафедрах фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева и фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Синтез полимеров выполнялся на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева. Тест высвобождения *in vitro* и реологические исследования проводились на базе кафедры фармацевтической технологии и кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева.

## 2.1. Материалы исследования

В работе использовали коммерчески доступные на территории Российской Федерации активные фармацевтические субстанции, вспомогательные вещества, растворители и материалы, разрешенные для фармацевтического применения.

### 2.1.1. Активные фармацевтические субстанции

В качестве модельного действующего вещества использовали кеторолака трометамин. Молекулярная масса соли – 376,4 г/моль, активного основания кеторолака – 255,3 г/моль.

Кеторолака трометамин легко растворим в воде и метаноле, мало растворим в спирте 96%, практически нерастворим в метиленхлориде. pH 1% водного раствора – 5,7–6,7. Относится к I классу биофармацевтической классификационной системы (высокая растворимость, высокая проницаемость).

### 2.1.2. Вспомогательные вещества

Номенклатура вспомогательных веществ и материалов, использованных в исследовании, приведена в Таблице 2.1. Все использованные в работе реактивы и материалы соответствуют требованиям, предъявляемым Государственной фармакопеей РФ XV, Фармакопеей ЕАЭС и спецификациям производителей (для веществ, не регламентированных ГФ РФ XV и Фармакопеей ЕАЭС).

Таблица 2.1 – Перечень реактивов и вспомогательных веществ и материалов

| Наименование | Производитель | Каталожный номер | Характеристика |
|---|---|---|---|
| Хитозан (низкомолекулярный, пищевой, водорастворимый) | ООО «Биопрогресс», Россия | — | Молекулярная масса 70–80 кДа |
| ПЭГ 1500 | ООО «НОРКЕМ», Россия | — | ≥99% |
| D, L-лактид | ООО «Новохим», Россия | — | ≥98,5% |
| Гликолид | ООО «Новохим», Россия | — | ≥98,5% |
| Лактат олова (II) | Синтезирован автором | — | ≥99% |
| β-Глицерофосфат натрия пентагидрат | Sigma-Aldrich, США | — | ≥98% |
| Трис(гидроксиметил)аминометан | ООО «ТД «ХИММЕД», Россия | — | ≥99,9% |
| Гиалуроновая кислота ExceptionHyal Star | Bloomage Biotech, Китай | — | Молекулярная масса 1500–3000 кДа |
| Натрия хлористый | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.0.0.0210.07 | х.ч. |
| Калий хлористый | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.0.0.0435.07 | х.ч. |
| Натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12- водный (натрия гидрофосфат додекагидрат) | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.0.0.0529.07 | х.ч. |
| Калий фосфорнокислый 1-замещенный (калия дигидрофосфат) | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.0.0.0431.07 | ч.д.а. |
| Натрий гидроокись | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.0.8.0506.07 | ч.д.а. |
| Натрий углекислый кислый (натрия гидрокарбонат) | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.0.0.0521.07 | х.ч. |
| Натрия азид | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.0.6.0497.06 | ч.д.а. |
| ЭДТА динатриевая соль (Трилон Б) | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.0.0.0307.07 | ч. |
| Ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.1.3.0463.01 | о.с.ч. |
| Уксусная кислота ледяная | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.1.8.0620.02 | х.ч. |
| Аммиак водный 25% | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.0.8.0011.02 | о.с.ч. |
| Вода очищенная (тип I) | Система Аквалаб AL-4 Plus, «Аквалаб», Россия | — | Удельное сопротивление 18,2 МОм·см |
| Тетрагидрофуран стабилизированный | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.1.3.0712.02 | для ВЭЖХ |
| Соляная кислота (хлороводородная кислота) | ООО «АЛЬДОСА», Россия | 01.1.8.0567.02 | о.с.ч. |

Продолжение Таблицы 2.1

| Вспомогательные материалы | | | |
|---|---|---|---|
| Диализные мешки | Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, США | 132724 | MWCO 3,5 кДа, плоская ширина 25 мм |
| Фильтры мембранные | Millipore, США | — | 0,22 мкм, PTFE |
| Фильтры шприцевые | Lab-Support, Россия | FBS25RC045 | 0,45 мкм, PTFE |
| Фильтры мембранные для подвижной фазы | CNW Technologies, Китай | Q5120050 | 0,45 мкм, PVDF (гидрофильный) |
| Шприцы стерильные одноразовые | ООО «Аугури дистрибьюшн», Россия | 00010004300 | 2 мл, с иглой 23G, трехкомпонентные |
| Зажимы для диализных мешков | Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, США | — | Пластиковые, для герметизации |

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Синтез катализатора лактата олова (II)

Предварительно перед синтезом полимера был получен катализатор – лактат олова (II), отличающийся от использованного в оригинальных экспериментах этилгексаноата олова (II). Катализатор был получен на основании методики, упомянутой в патенте RU 2525235 [140]. Реакция протекала между хлоридом двухвалентного олова и концентрированной молочной кислотой в присутствии гидроксида натрия при постоянном перемешивании. Нагревание реакционной смеси происходило за счет выделяемого в ходе процесса тепла. Полученная суспензия дилактата олова фильтровалась через беззольный фильтр «Белая лента», затем промывалась холодной дистиллированной водой трижды и высушивалась в сублимационной сушилке под вакуумом, для предотвращения окисления полученного катализатора.

Схема синтеза катализатора отображена на рисунке 2.1.

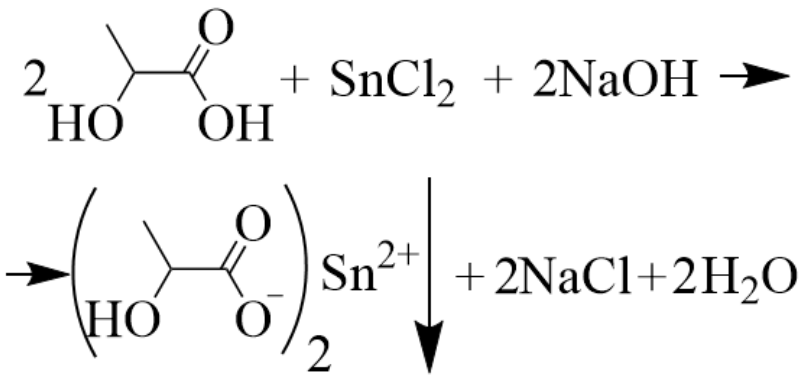

Рисунок 2.1 – Схема синтеза катализатора лактата олова II

### 2.2.2. Синтез и характеристика блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем

Синтез блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА проводили методом открытокольцевой полимеризации в расплаве в соответствии с патентом №2857178 [141]. В трехгорлую колбу помещали ПЭГ 1500, D, L-лактид и гликолид и лактат олова (II). Реакцию проводили в атмосфере азота при 145 °С в течение 10 ч. Сополимеры очищали путем растворения реакционной смеси в воде при температуре 2-8 °С и переосаждения конечных продуктов из водного раствора при нагревании до 70-80 °С. Осажденная фракция далее собиралась в чистую стеклянную тару и высушивалась под вакуумом в течение 24 ч [141]. Схема синтеза блок-сополимера отображена на рисунке 2.2.

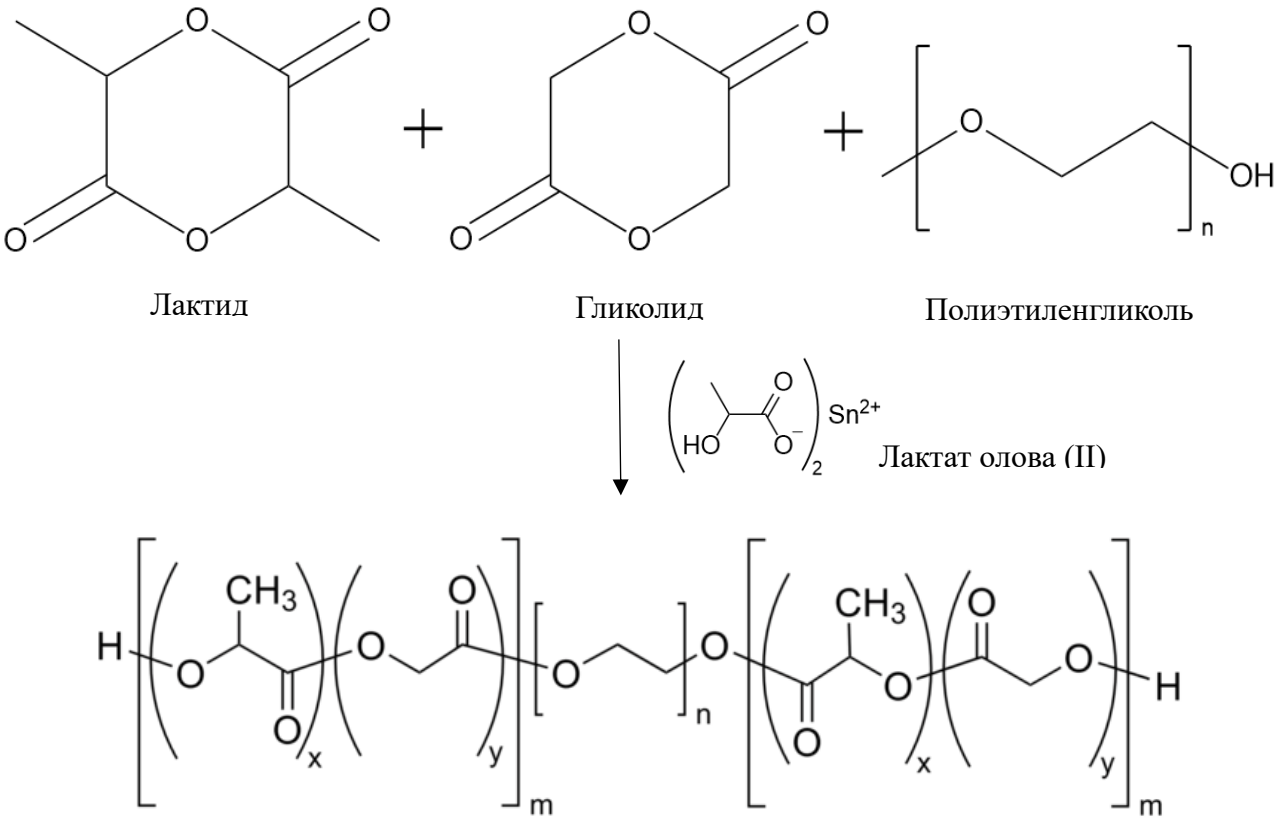


Рисунок 2.2 – Схема синтеза блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

### 2.2.3. Определение молекулярной массы и полидисперсности

Использовали хроматограф Waters Breeze 2 с рефрактометрическим детектором, каскад колонок Waters Styragel HR 5E, Waters Styragel HR 4E. Подвижная фаза – тетрагидрофуран (ТГФ), скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонок 30°С.

Калибровку проводили по узкодисперсным полистирольным стандартам, Agilent. Рассчитывали Mn, Mw и коэффициент полидисперсности Đ = Mw/Mn.

### 2.2.4. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Спектры регистрировали на спектрометре Bruker Avance III Nanobay 300 МГц при 25°C в $CDCl_3$. Концентрация образца 10 мг/мл. Химические сдвиги (δ) приведены в м.д. относительно тетраметилсилана (ТМС).

### 2.2.5. Инфракрасная спектрометрия

Спектры веществ регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре Reileigh WQF с приставкой НПВО в диапазоне 4000–400 $см^{-1}$. Испытуемые вещества предварительно высушивались до постоянной массы под вакуумом при температуре 70 °C в течение 24 ч.

### 2.2.6. Определение степени деацетилирования хитозана

Проводили потенциометрическим титрованием на титраторе с автоматической регистрацией конечной точки титрования Metrohm Ti-Touch 916. Точную навеску хитозана массой 0,2 г растворяли в 20 мл 0,1 М HCl при перемешивании в течение 30 мин. Полученный раствор титровали 0,1 М NaOH. Объем NaOH, соответствующий нейтрализации избытка HCl и протонированных аминогрупп, определяли по двум точкам перегиба. Степень деацетилирования (СД) рассчитывали по формуле:

$$\text{СД}(\%) = \frac{(V_2 - V_1) \cdot C_{\text{NaOH}} \cdot 161}{m \cdot (1 - W) \cdot 1000} \cdot 100\%$$

где:

($V_2$ – $V_1$) — объем NaOH, пошедший на титрование протонированных аминогрупп, мл;

CNaOH— концентрация NaOH, моль/л;

161 — молекулярная масса мономерного звена, г/моль;

m — масса навески хитозана, г;

W — содержание влаги в хитозане.

### 2.2.7. Реологические исследования

Реологические характеристики растворов полимеров и готовых гелей изучали на ротационном вискозиметре Lamy RM 200 (Lamy Rheology, Франция) с измерительной системой коаксиальных цилиндров MS DIN 33. Геометрические параметры системы: радиус внутреннего цилиндра — 12,5 мм, радиус внешнего цилиндра — 13,56 мм, радиальный зазор — 1,06 мм. Температуру образцов поддерживали с помощью циркуляционного термостата (точность поддержания температуры ±0,1°C). Все измерения проводили при 25°C и 37°C, если не указано иное.

*Зависимость вязкости от скорости сдвига.* Для оценки типа течения определяли зависимость динамической вязкости (η) от скорости сдвига ($\dot{\gamma}$) в диапазоне 0,1–100 $с^{-1}$. Измерения проводили в режиме контролируемой скорости сдвига с логарифмическим сканированием (10 точек на декаду); время выдержки на каждой ступени составляло 10 с. По полученным кривым течения рассчитывали индекс псевдопластичности как отношение вязкости при скорости сдвига 10 $с^{-1}$ к вязкости при скорости сдвига 100 $с^{-1}$ ($\eta_{10}/\eta_{100}$).

*Тиксотропные свойства.* Тиксотропное поведение оценивали методом петли гистерезиса. Образец подвергали ступенчатому увеличению скорости сдвига от 0,1 до 100 $с^{-1}$, после чего немедленно проводили обратное сканирование — ступенчатое снижение скорости сдвига от 100 до 0,1 $с^{-1}$. Площадь петли гистерезиса, рассчитанная как разность интегралов восходящей и нисходящей ветвей кривой течения (зависимость напряжения сдвига от скорости сдвига), служила количественной мерой тиксотропного восстановления структуры геля.

*Определение температуры гелеобразования (Tgel).* Температуру фазового перехода золь-гель определяли по изменению динамической вязкости при нагревании образца. В измерительный зазор коаксиальных цилиндров помещали 10–12 мл пробы, предварительно выдержанной при 15°C в течение 10 мин для достижения температурного равновесия. Затем проводили нагрев образца от 15 до 60°C со скоростью 1°C/мин при постоянной скорости вращения внутреннего цилиндра, соответствующей скорости сдвига 50 $с^{-1}$. В процессе нагрева регистрировали динамическую вязкость (η) через каждые 0,5°C. Температуру гелеобразования (Tgel) определяли как температуру, при которой наблюдалось резкое увеличение вязкости, интерпретируемое как начало формирования пространственной гелевой сетки. Для стандартизации Tgel определяли графически как точку пересечения касательных к базальной и возрастающей ветвям кривой зависимости вязкости от температуры (метод касательных). Все измерения проводили в трех повторностях; результаты выражали как среднее арифметическое ± стандартное отклонение.

## 2.3. Приготовление термочувствительных гелей с кеторолаком

Все операции по приготовлению гелей проводили при температуре 4–8°C с использованием охлажденных растворов и предварительно охлажденного оборудования для предотвращения преждевременного гелеобразования.

### 2.3.1. Гели на основе хитозан/β-глицерофосфата

Раствор хитозана с массо-объемной концентрацией 4% готовили в 0,1 М HCl при комнатной температуре при перемешивании до полного растворения хитозана, полученный раствор затем фильтровали через мембранный PTFE фильтр с размером пор 0,45 мкм для удаления нерастворимых частиц полимера.

Отдельно готовили раствор β-глицерофосфата натрия в воде очищенной с концентрацией соли 25-30%. Для получения концентрированного раствора соли точную навеску β-глицерофосфата натрия пентагидрата 10,0 г помещали в мерную колбу объемом 25 мл, растворяли в 10 мл воды очищенной в ультразвуковой бане при температуре 40-50 °С, затем после охлаждения раствора доводили объем до метки тем же растворителем.

Затем готовили пересыщенный раствор кеторолака трометамина путем растворения точной навески кеторолака трометамина массой 10,0 г в мерной колбе объемом 20 мл в 10 мл воды очищенной. Для полного растворения кеторолака трометамина полученную смесь помещали в ультразвуковую баню при температуре 30-35 °С и перемешивали в течение 30 мин. Затем полученный пересыщенный раствор охлаждали до комнатной температуры и доводили объем колбы до метки водой очищенной.

Все исходные растворы далее помещали в холодильную камеру с температурным режимом 2-8 °С до полного охлаждения. Контролировали стабильность растворов кеторолака трометамина и β-глицерофосфата натрия для исключения выпадения в осадок растворенных веществ и изменения их концентрации.

Для получения испытуемых гелей кеторолака трометамина на основе системы хитозан/β-глицерофосфат в химический стакан добавляли 10,0 мл раствора 4% хитозана, химический стакан фиксировался в ледяной бане над магнитной мешалкой, и в него помещался электрод pH-метра (pH-метр 150 МИ, Россия) и термоиндикатор. Далее при постоянном перемешивании и контроле значения pH к раствору хитозана по каплям добавлялся концентрированный раствор β-глицерофосфата натрия до pH 6,8-6,9. При достижении данного значения pH к данной системе по каплям добавлялся концентрированный раствор кеторолака трометамин. Дозирование концентрированных растворов проводилось с помощью лабораторных дозаторов Dlab HiPette. По

достижении необходимых концентраций кеторолака трометамина и β-глицерофосфата натрия в системе pH полученных гелей доводили до 7,0–7,2 с помощью 0,1 М HCl или 0,1 М NaOH.

Полученную систему переливали в мерную колбу 20 мл и доводили водой очищенной до метки, затем бережно перемешивали до получения однородного геля, затем помещали в холодильную камеру при температуре 2-8 °С на 24 ч.

### 2.3.2. Гели на основе блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем

Исходный раствор блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с массо-объемной концентрацией 30% готовили путем растворения точной навески полимера в воде очищенной при температуре 4-6 °С. Навеску полимера массой 6,0 г помещали в мерную колбу объемом 20 мл, добавляли 10-12 мл холодной воды очищенной и помещали в холодильную камеру при температуре 2–8 °С на 12–16 ч для полной гидратации и набухания полимера. Затем колбу помещали в ультразвуковую баню в ледяную воду в течение 30 мин, при необходимости меняя нагреваемую воду в бане на ледяную, до получения прозрачного вязкого раствора. Полученный раствор полимера доводили до метки охлажденной водой очищенной и фильтровали через мембранный фильтр PTFE с размером пор 0,45 мкм для удаления возможных агрегатов и нерастворимых частиц.

Метастабильный пересыщенный раствор кеторолака трометамина готовили путем растворения точной навески кеторолака трометамина массой 10,0 г в мерной колбе объемом 20 мл в 10 мл воды очищенной. Для полного растворения кеторолака трометамина полученную смесь помещали в ультразвуковую баню при температуре 30-35 °С и перемешивали в течение 30 мин. Затем полученный пересыщенный раствор охлаждали до комнатной температуры и доводили объем колбы до метки водой очищенной. Стабильность раствора кеторолака трометамина контролировали визуально для исключения выпадения осадка [142].

Раствор 0,5 М Трис-буфера pH 8,0–8,5 готовили растворением 6,055 г трис(гидроксиметил)аминометана в 80 мл воды очищенной, доводили pH до 8,0–8,5 1 М HCl и доводили объем до 100 мл водой очищенной. Раствор Трис-буфера фильтровали через мембранный фильтр 0,22 мкм и хранили при 2–8°С [142].

Все исходные растворы помещали в холодильную камеру с температурным режимом 2–8°С до полного охлаждения. Контролировали стабильность растворов визуально — для исключения выпадения в осадок растворенных веществ, изменения их концентрации и преждевременного гелеобразования.

Для получения гелей кеторолака трометамина на основе системы ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА в химический стакан, фиксированный в ледяной бане над магнитной мешалкой, помещали 10,0 мл

30% мас./об. раствора ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА. В стакан погружали электрод pH-метра (pH-метр 150 МИ, Россия) и термоиндикатор. Далее при постоянном перемешивании и контроле значения pH к раствору полимера по каплям добавляли 0,5 М раствор Трис-буфера до достижения pH 7,0–7,2. При достижении данного значения pH к системе по каплям добавляли концентрированный раствор кеторолака трометамина. Дозирование растворов проводилось с помощью лабораторных дозаторов Dlab HiPette. По достижении необходимой концентрации кеторолака трометамина в системе pH полученного геля доводили до 7,2–7,4 с помощью 0,5 М Трис-буфера или 0,1 М HCl.

Полученную систему переливали в мерную колбу объемом 20 мл и доводили холодной водой очищенной до метки, затем бережно перемешивали до получения однородного геля и помещали в холодильную камеру при температуре 2–8°C на 24 ч для стабилизации.

## 2.4. Приготовление биорелевантных сред высвобождения

### 2.4.1. Обоснование выбора биорелевантных сред в исследовании

В настоящей диссертационной работе для изучения высвобождения кеторолака трометамина из термочувствительных гидрогелей были выбраны следующие среды (Таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Биорелевантные среды, использованные в исследовании

| Модель | pH | Концентрация ГК | Обоснование |
|---|---|---|---|
| Контрольная среда | 7,4 | — | Позволяет оценить базовую кинетику высвобождения в отсутствие ГК; референсный стандарт для выделения вклада гиалуроновой кислоты. |
| Здоровый сустав | 7,4 | 2,5 мг/мл | Соответствует физиологической концентрации ГК в здоровой синовиальной жидкости (2,0–4,0 мг/мл) и имитирует ее вязкоэластические свойства. |
| Воспаленный сустав | 6,8 | 0,75 мг/мл | Отражает патологические изменения при остеоартрите и ревматоидном артрите — снижение pH и уменьшение концентрации ГК. |

Выбранные концентрации гиалуроновой кислоты и значения pH обоснованы данными научной литературы и находятся в пределах физиологических и патологических диапазонов, что позволяет адекватно моделировать условия здорового и воспаленного сустава в тесте высвобождения *in vitro*.

Следует отметить, что разработанные подходы к созданию биорелевантных сред могут найти применение не только в настоящем диссертационном исследовании, но и в дальнейшей фармацевтической разработке препаратов для внутрисуставного введения. Предложенная методология позволяет стандартизировать *in vitro* тестирование высвобождения и повысить его прогностическую ценность для последующих *in vivo* исследований.

### 2.4.2. Фосфатно-солевой буферный раствор pH 7,4

В мерную колбу вместимостью 2000,0 мл помещали 16,0 г натрия хлорида, 0,40 г калия хлорида, 4,76 г натрия гидрофосфата додекагидрата и 0,38 г калия дигидрофосфата, растворяли в 1600 мл воды очищенной, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали [142]. При необходимости доводили значение pH до 7,4 ± 0,05 потенциометрически с помощью 1 М раствора натрия гидроксида или 1 М раствора хлороводородной кислоты. Добавляли 0,40 г натрия азида (консервант), перемешивали до полного растворения. Раствор фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Хранили полученный раствор при 25 °С в герметично закрытой таре не более 7 суток.

### 2.4.3. Модель здорового сустава

В мерную колбу вместимостью 2000,0 мл помещали 5,00 г гиалуроновой кислоты и прибавляли 1600 мл фосфатно-солевого буферного раствора pH 7,4 (приготовленного по разделу 2.4.2, но без добавления натрия азида) [142]. Перемешивали на магнитной мешалке при 200–300 об/мин в течение 2–4 ч до полного растворения. Для ускорения растворения допускалось нагревание смеси до 35°С на водяной бане при постоянном перемешивании (не выше 40°С) [142]. После полного растворения гиалуроновой кислоты раствор охлаждали до комнатной температуры, добавляли 0,40 г натрия азида, перемешивали, доводили объем раствора фосфатно-солевым буферным раствором pH 7,4 до метки и перемешивали. При необходимости доводили значение pH до 7,4 ± 0,05 потенциометрически с помощью 1 М раствора натрия гидроксида или 1 М раствора хлороводородной кислоты. Раствор фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм для удаления возможных агрегатов гиалуроновой кислоты.

Хранили полученный раствор при 25 °С в герметично закрытой таре не более 7 суток.

### 2.4.4. Модель воспаленного сустава

В мерную колбу вместимостью 2000,0 мл помещали 16,0 г натрия хлорида, 0,40 г калия хлорида, 4,76 г натрия гидрофосфата додекагидрата и 0,38 г калия дигидрофосфата, растворяли в 1600 мл воды очищенной, доводили объем раствора той же водой до метки и перемешивали [142]. При необходимости доводили значение pH до 6,8 ± 0,05 потенциометрически с помощью 1 М раствора хлороводородной кислоты [142]. Добавляли 0,40 г натрия азида, перемешивали до полного растворения. Затем в полученный раствор при медленном перемешивании вносили 1,50 г гиалуроновой кислоты и перемешивали в течение 2–4 ч до полного растворения. Для ускорения растворения допускалось нагревание смеси до 35°С на водяной бане при постоянном перемешивании (не выше 40°С). После полного растворения гиалуроновой кислоты раствор охлаждали до комнатной температуры, доводили объем раствора фосфатно-солевым буферным раствором pH 6,8 до метки и перемешивали. При необходимости доводили значение pH до 6,8 ± 0,05 потенциометрически с помощью 1 М раствора хлороводородной кислоты или 1 М раствора натрия гидроксида. Раствор фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Хранили полученный раствор при 25 °С в герметично закрытой таре не более 7 суток.

## 2.5. Изучение кинетики высвобождения *in vitro*

### 2.5.1. Подготовка диализных мешков

Для удаления глицерина и иных компонентов консервантов, а также для активации мембраны, мешки подвергали многоступенчатой очистке.

1. Нарезка мешков. От рулона сухой мембраны шириной 25 мм отрезали отрезки длиной 8–10 см. Количество отрезков определяли числом образцов (не менее 3 параллельных мешков на каждый тип геля) с учетом контрольных образцов (плацебо и холостая проба).

2. Приготовление очищающих растворов.

2.1. Раствор А: в 1 л воды очищенной растворяли 20,0 г натрия гидрокарбоната и 0,372 г динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты. pH раствора доводили до 8,0 ± 0,1 с помощью 1 М NaOH.

2.2. Раствор Б: в 1 л воды очищенной растворяли 0,372 г динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и доводили pH до 8,0 ± 0,1 с помощью 1 М NaOH.

3. Очистка мешков. Нарезанные отрезки мешков помещали в стакан с раствором А и нагревали на водяной бане до 70–80 °С, избегая активного кипения, в течение 10 мин при периодическом перемешивании. Раствор сливали, мешки ополаскивали водой очищенной,

нагретой до 40–50 °C. Затем мешки заливали свежим раствором Б и повторяли нагревание при 70–80 °C в течение 10 мин. После второй обработки раствор сливали.

4. Конечная промывка. Мешки тщательно промывали большим объемом воды очищенной, не менее 3–4 смен по 200–300 мл на мешок, для удаления остатков ЭДТА и солей.

5. Проверка целостности. Каждый мешок заполняли водой очищенной, завязывали один конец и слегка сдавливали. Отсутствие протечек свидетельствовало о целостности мембраны.

6. Хранение очищенных мешков. Подготовленные мешки помещали в контейнер с фосфатно-солевым буферным раствором pH 7,4, содержащий 0,05–0,1% натрия азида для предотвращения микробной контаминации. Мешки хранили при 2–8 °C не более 2 месяцев. Перед использованием мешки трижды промывали дистиллированной водой для удаления азида.

### 2.5.2. Подготовка среды высвобождения

В качестве контрольной среды высвобождения использовали фосфатно-солевой буфер pH 7,4, приготовленный по методике, описанной в разделе 2.4.2. Для моделирования здорового и воспаленного суставов применяли биорелевантные среды (разделы 2.4.3–2.4.4).

Перед использованием каждую из сред подготавливали на автоматическом дегазаторе ERWEKA Dissofill при температуре 37,0 °C.

### 2.5.3. Заполнение диализных мешков гелем

1. Подготовка испытуемых гелей. Гели готовили непосредственно перед экспериментом согласно разделу 2.5. Температура гелей при заполнении поддерживалась в диапазоне 15-20 °C для предотвращения преждевременного гелеобразования.

2. Заполнение. Один конец диализного мешка, изнутри промокали фильтровальной бумагой для удаления лишней влаги. С помощью пипеточного дозатора вносили 2,0 мл геля в мешок. Осторожно выпускали пузырьки воздуха, сжимая мешок снизу вверх. Верхний конец мешка фиксировали пластиковой клипсой для диализных мешков, оставляя пространство около 1 см над гелем.

3. Контрольные образцы. Для оценки матричных эффектов готовили по 2–3 мешка с гелем-плацебо (без кеторолака) для каждого типа полимерной матрицы. Также готовили холостую пробу — сосуд с чистым фосфатно-солевым буфером без мешка.

4. Маркировка. Каждый мешок маркировали несмываемым маркером на клипсе или прикрепляли этикетку с указанием состава и номера параллельного определения.

### 2.5.4. Условия эксперимента

Эксперимент проводили на аппарате для теста растворения Sotax ATXtend. В каждый сосуд объемом 1000 мл заполняли 500 мл предварительно подготовленной среды высвобождения. Лопастные мешалки устанавливали на высоте 25 ± 2 мм от дна сосуда. После погружения диализных мешков в сосуды включали перемешивание со скоростью 25 об/мин. Температуру водяной бани поддерживали на уровне 37,0 ± 0,5°C на протяжении всего эксперимента.

### 2.5.5. Отбор проб и обработка

1. Временные точки отбора. Пробы отбирали в следующие временные точки (от момента погружения мешков): 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 24; 36; 48; 72; 96; 120 ч.

2. Процедура отбора. Для отбора пробы мешалку в каждой временной точке градуированной пипеткой отбирали 5,0 мл среды из центра сосуда, избегая захвата пузырьков воздуха и частиц геля. Отобранную пробу переносили в стеклянную пробирку. После отбора проб проводили восполнений среды посредством пипеточного дозатора.

3. Подготовка пробы к анализу. Сразу после отбора пробу фильтровали через мембранный PTFE шприцевой фильтр с размером пор 0,45 мкм в виалу для ВЭЖХ, отбрасывая первые 2–3 капли фильтрата.

Пробы хранили при 2–8°C в защищенном от света месте не более 24 ч до проведения ВЭЖХ-анализа.

### 2.5.6. Расчет кумулятивного высвобождения

Расчет кумулятивного высвобождения (без учета испарения, объем среды постоянен) проводили по формуле:

$$M_n = C_n \cdot 500 + \sum_{i=1}^{n-1}(C_i \cdot 5) \text{ (1);}$$

$$\%\text{высвобождения}_n = \frac{M_n}{M_{\text{total}}} \cdot 100\% \text{ (2),}$$

где $C_n$ — концентрация в пробе (мг/мл); $M_{\text{total}} = C_{\text{гель}} \cdot 2$ — общее количество АФС в геле, мг.

Критерий приемлемости: сумма высвободившегося АФС 95–105% от концентрации в испытуемом геле.

## 2.6. Математическое моделирование высвобождения

Для математического описания кинетики высвобождения использовали модели нулевого порядка, первого порядка, Хигучи и Корсмейера-Пеппаса. Моделирование проводили на основании данных первых 8 временных точек (0–8 ч), в которых наблюдалось линейное нарастание высвобождения.

Модель нулевого порядка: $Q(t) = Q_0 + K_0 t$ — описывает высвобождение с постоянной скоростью.

Модель первого порядка: $Q(t) = Q_{max} \cdot (1 - e^{-k_1 t})$ — характеризует высвобождение, скорость которого зависит от остаточной концентрации вещества. Линеаризация проводилась по формуле: $\ln(100 - Q) = \ln 100 - k_1 t$.

Модель Хигучи: $Q_t = K_H \sqrt{t}$ — модель диффузионного высвобождения из плоской матрицы.

Модель Корсмейера-Пеппаса: $Q_t / Q_\infty = K_{KP} t^n$ — универсальная степенная модель, где показатель n указывает на механизм высвобождения: $n = 0.5$ — фиковская диффузия; $0.5 < n < 1.0$ — аномальный транспорт; $n = 1.0$ — нулевой порядок.

Расчет параметров проводили методом наименьших квадратов с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2019 и GraphPad Prism 9.0. Качество модели оценивали по коэффициенту детерминации ($R^2$).

## 2.7. Изучение стабильности и финишная стерилизация

### 2.7.1. Финишная стерилизация

Финишную стерилизацию гелей проводили гамма-излучением на установке с источником $^{60}$Co. Поглощенная доза составляла 15 кГр±1 кГр в конечной упаковке. Контроль качества проводили сразу после стерилизации и через 1 месяц хранения при 2-8°C.

### 2.7.2. Изучение стабильности

Изучение стабильности проводили на трех сериях каждого типа геля в соответствии с требованиями ICH Q1A(R2), ГОСТ Р 57129-2016 и Решения Коллегии ЕАЭС № 69. Образцы хранили в преднаполненных шприцах объемом 2 мл в холодильной камере и испытывали в климатической камере Binder KBF 240 при следующих условиях:

1. Холодильная камера с постоянно поддерживаемой температурой 5 ± 3°C;

2. Долгосрочное хранение: 25 ± 2°C и относительная влажность 60 ± 5%;

3. Ускоренное хранение: 30 ± 2°C и относительная влажность 65 ± 5% RH;

4. Для испытания были выбраны контрольные точки 0, 1, 3, 6, 9, 12 месяцев.

Контролируемые показатели: внешний вид (визуально), pH (потенциометрически), вязкость (Lamy RM 200, 25°C, 100 $c^{-1}$), температура гелеобразования (метод переворачивания пробирки), содержание кеторолака (ВЭЖХ), родственные примеси (ВЭЖХ).

## 2.8. Статистическая обработка результатов

Все эксперименты выполняли в трех повторностях (n = 3–6). Результаты выражали как среднее арифметическое ± стандартное отклонение (M ± SD). Относительное стандартное отклонение (RSD, %) рассчитывали для оценки прецизионности. Сравнение двух групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента, множественное сравнение — однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA). Уровень значимости $p < 0,05$ считали статистически значимым. Расчеты выполнялись в Microsoft Excel 2019 и GraphPad Prism 9.0.

# ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ

## 3.1. Синтез и стандартизация блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем

Синтез блок-сополимера полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем (ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА) проводили методом открытокольцевой полимеризации в расплаве с использованием катализатора лактата олова (II), синтезированного по методике, описанной в разделе 2.2.1.

В ходе эксперимента было выполнено семь серий синтезов (Р1–Р7) с варьированием масс загрузки мономеров и ПЭГ для определения оптимального состава, обеспечивающего термочувствительные свойства. Детальные условия синтеза представлены в Таблице 3.1. Массы лактида и гликолида в таблице приведены с поправкой на чистоту исходных веществ. Массу продукта определяли как разность между массой пробирки с полимером и массой пустой пробирки. Выход продукта рассчитывали по формуле:

$$\text{Выход}(\%) = \frac{m_{\text{полимера}}}{m_{\text{ПЭГ}} + m_{\text{лактида}} + m_{\text{гликолида}}} \times 100\%,$$

где $m_{\text{полимера}}$ — масса выделенного полимера после очистки и сушки.

Таблица 3.1– Условия синтеза блок-сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

| Серия | Лактид (LA), г | Гликолид (GA), г | Мольное соотношение LA:GA | ПЭГ 1500, г | Катализатор, г |
|---|---|---|---|---|---|
| Р1 | 43,67575758 | 11,78395939 | 2,985:1 | 23,7685 | 0,3981 |
| Р2 | 50,95505051 | 11,78395939 | 3,482:1 | 26,8881 | 0,4504 |
| Р3 | 40,03611111 | 11,78395939 | 2,736:1 | 22,2086 | 0,3720 |
| Р4 | 43,67575758 | 11,78395939 | 2,985:1 | 23,7685 | 0,3981 |
| Р5 | 21,83787879 | 5,891979695 | 2,985:1 | 11,8842 | 0,1991 |
| Р6 | 35,37736364 | 9,497871269 | 3,000:1 | 19,2322 | 0,3221 |
| Р7 | 21,96890606 | 5,891979695 | 3,003:1 | 11,9404 | 0,2000 |

Полученные при синтезе полимеры подвергали первичному скринингу для оценки свойств растворимости в воде и термочувствительности 20-25% водных растворов, приготовленных на их основе. Характеристики и результаты скрининга полученных полимеров представлены в Таблице 3.2. Внешний вид полученных полимеров представлен на Рисунке 3.1.

Рисунок 3.1 – Внешний вид полимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

Таблица 3.2 – Характеристика полимеров P1-P7

| № опыта | Цвет | Агрегатное состояние | Растворимость в воде | Термочувствительность |
|---|---|---|---|---|
| P1 | Бесцветный прозрачный | Клееподобная вязкая субстанция | Не растворим в воде | Нет |
| P2 | Желтый прозрачный | Клееподобная вязкая субстанция | Не растворим в воде | Нет |
| P3 | Беловатый мутный | Клееподобная вязкая субстанция | Не растворим в воде | Нет |
| P4 | Желтоватый прозрачный | Клееподобная вязкая субстанция | Растворим в воде | Да, раствор-гель |
| P5 | Желтый мутный | Пластичная субстанция | Трудно растворим в воде | Да, гель-раствор |
| P6 | Желтоватый прозрачный | Клееподобная вязкая субстанция | Растворим в воде | Да, раствор-гель |
| P7 | Белый | Пластичная субстанция | Трудно растворим в воде | Да, раствор-гель |

### 3.2. Характеристика молекулярно-массового распределения

Молекулярно-массовые характеристики синтезированных сополимеров P1-P7 (среднечисловую ($M_n$), среднемассовую (Mw) молекулярные массы и коэффициент полидисперсности (Đ = $Mw/M_n$) рассчитывали по пику основного вещества, представленного на хроматограммах ГПХ. Результаты представлены в Таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Молекулярно-массовые характеристики синтезированных сополимеров

| Серия | $M_n$, г/моль | Mw, г/моль | Mp, г/моль | Đ ($Mw/M_n$) |
|---|---|---|---|---|
| P1 | 3582 | 3996 | 3635 | 1,116 |
| P2* | - | - | - | - |
| P3 | 5504 | 6244 | 5932 | 1,134 |
| P4 | 5124 | 5825 | 5549 | 1,137 |
| P5 | 5386 | 6071 | 5860 | 1,127 |
| P6 | 4876 | 5470 | 5226 | 1,122 |
| P7 | 5892 | 6663 | 5932 | 1,131 |
| Примечание: * - Данные для серии полимеров P2 отсутствуют ввиду недостаточного количества синтезированного полимера для анализа | | | | |

Типичная ГПХ хроматограмма блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ- ПЛГА на примере образца Р4 изображена на Рисунке 3.2.

Типичное молекулярное распределение на ГПХ хроматограмме анализируемых блок-сополимеров на примере образца Р4 изображено на Рисунке 3.3.

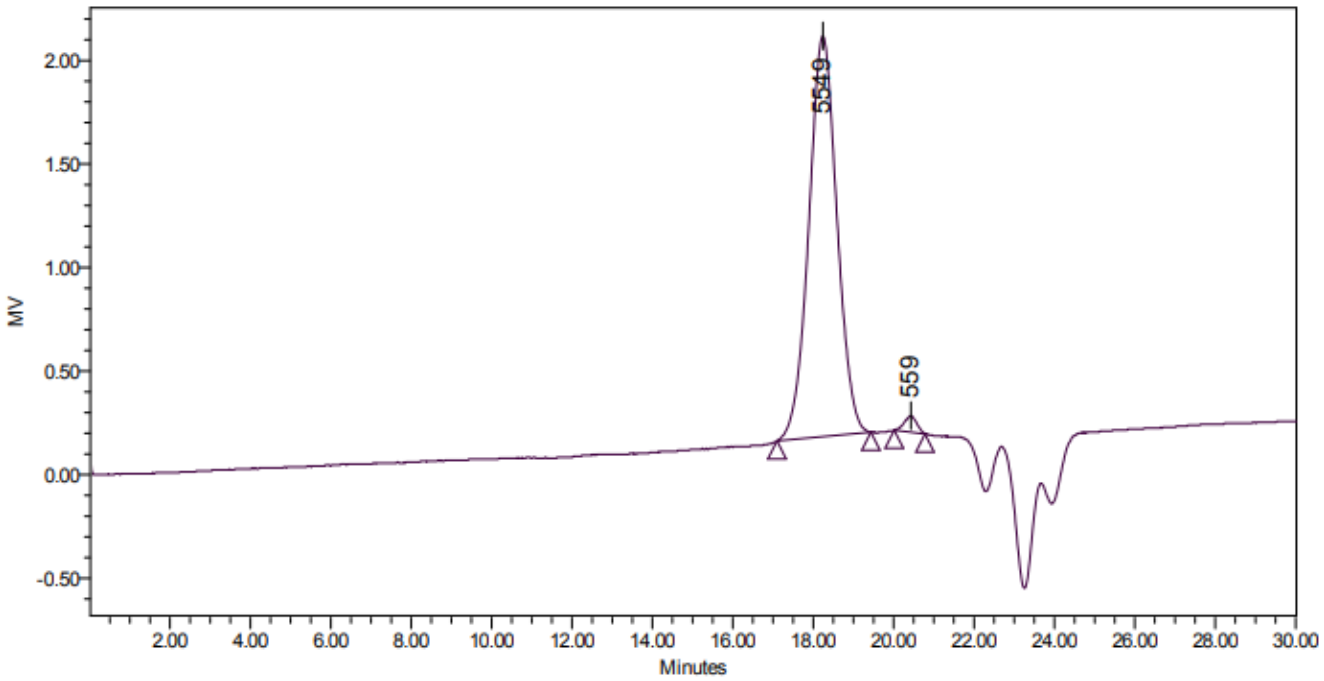


Рисунок 3.2 – Типичная ГПХ хроматограмма ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

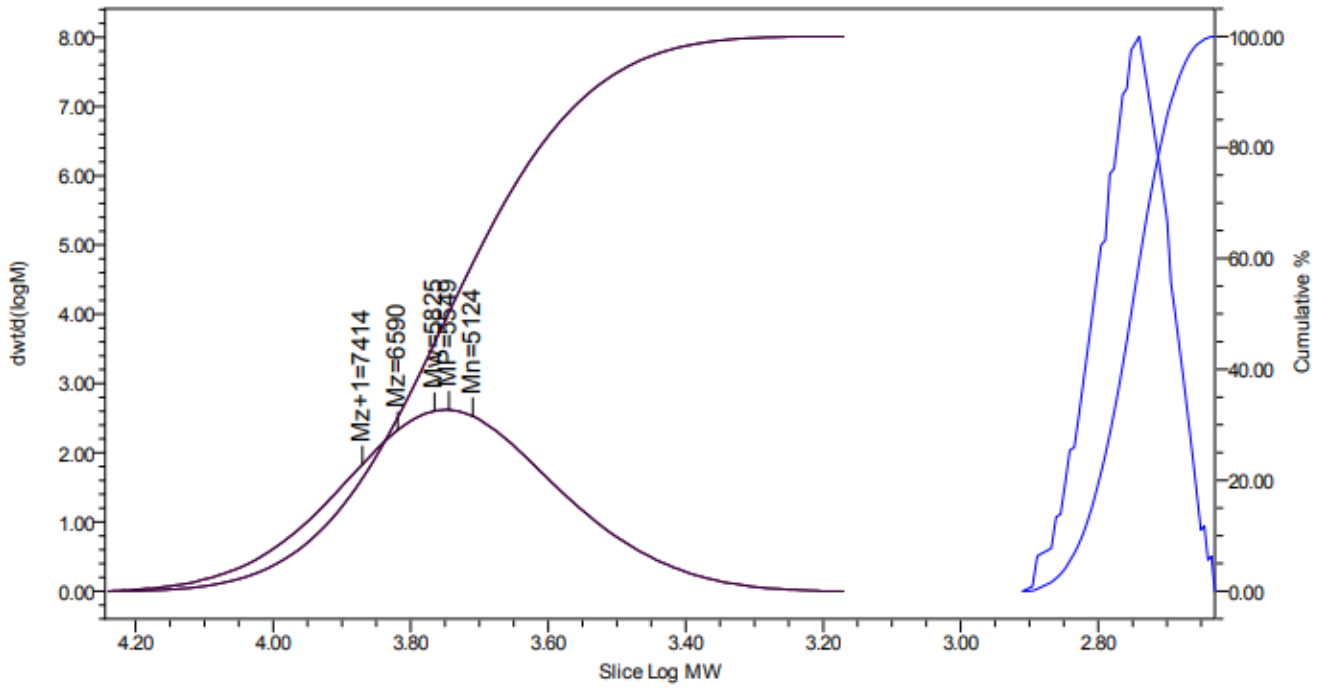


Рисунок 3.3 – Молекулярное распределение блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ- ПЛГА на ГПХ хроматограмме

Полученные значения $M_n$ находятся в диапазоне 3500–6100 г/моль, что соответствует ожидаемой молекулярной массе для термочувствительных блок-сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА в соответствии с литературными данными [143]. Коэффициент полидисперсности Đ не превышает 1,14 для обеих серий, что свидетельствует об узком молекулярно-массовом распределении и подтверждает контролируемый характер полимеризации. Близость значений $M_n$ и $M_w$, а также $M_p$ (пиковая молекулярная масса) указывает на преобладание целевого продукта в образцах.

### 3.3. Подтверждение структуры методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса

Структуру синтезированных блок-сополимеров подтверждали методом $^1$H-ЯМР-спектроскопии. На рисунке 3.4. отображена структурная формула блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с отнесением характеристических сигналов $^1$H-ЯМР-спектра. Данные о химических сдвигах протонов структурных групп блок-сополимера отображены в Таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Химические сдвиги и отнесение сигналов в $^1$H-ЯМР-спектрах ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

| Химический сдвиг, м.д. | Отнесение | Фрагмент |
|---|---|---|
| 1,5–1,6 | -CH3 группа (дублет, Д) | Лактидные звенья блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА |
| 3,6–3,7 | - CH2-CH2-O - (синглет, Г) | Метиленовые звенья полиэтиленгликолевого блока, не связанные с блоками ПЛГА |
| 4,2-4,4 | -CH2-CH2-O- (триплет, В) | Метиленовые звенья полиэтиленгликолевого блока, связанные с блоками ПЛГА |
| 4,7-4,85 | группы -CH- лактида (мультиплет, А) | Метиновые звенья лактидных фрагментов блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА |
| 5,15-5,25 | группы -CH2- гликолида (синглет, Б) | Метиленовые звенья гликолидных фрагментов блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА |

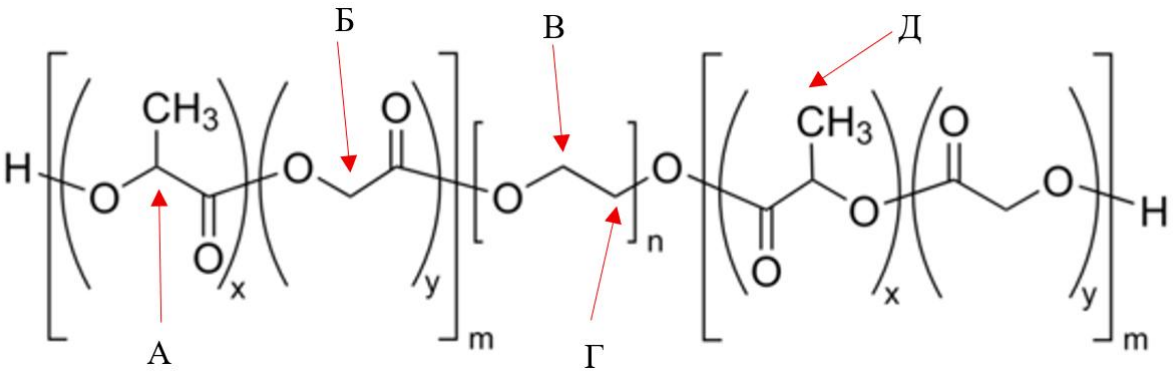


Рисунок 3.4 – Структурная формула блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с указанием фрагментов, идентифицированных на спектрах $^1$H-ЯМР

Интегральное соотношение сигналов позволило рассчитать содержание звеньев. Отношение интегральной интенсивности сигнала метильных протонов лактида 1,5-1,6 м.д. к сигналу метиленовых протонов ПЭГ 3,6-3,7 м.д. составило для серии Р4 - 2,8:1, для серии Р6 — 2,9:1, что соответствует мольному соотношению лактидных звеньев к этиленоксидным звеньям ~ 2,5:1. С учетом молекулярной массы ПЭГ (1500 Да) и рассчитанного соотношения, среднее число лактидных звеньев на один ПЭГ-блок составило примерно 8-9, что хорошо согласуется с заданным составом. Полученные данные подтверждают формирование трехблочной структуры ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с соотношением блоков, близким к ожидаемому.

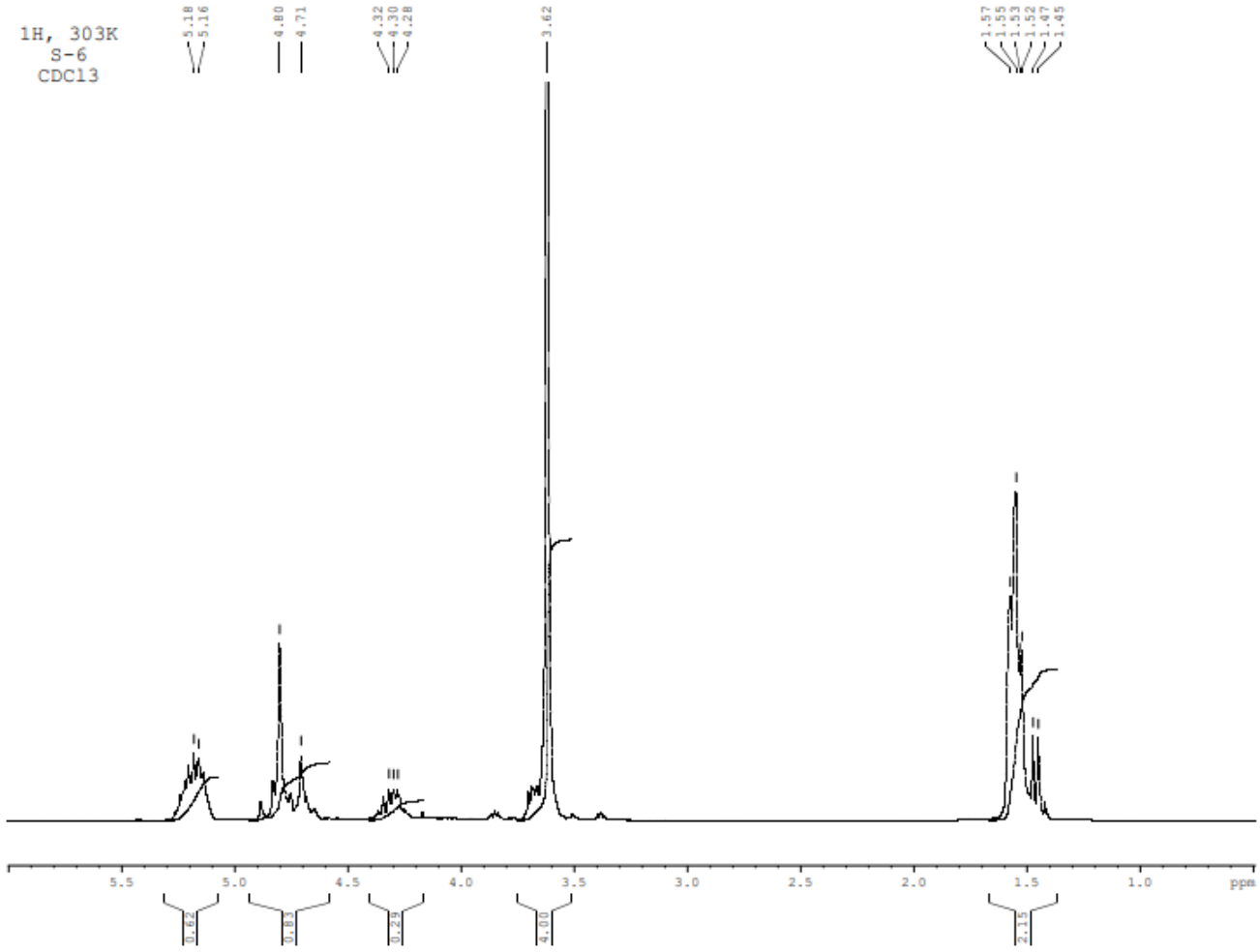


Рисунок 3.5 – Типичный спектр $^{1}$H-ЯМР блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА на примере образца полимера Р6

### 3.4. Подтверждение структуры методом инфракрасной спектрометрии

На основании ИК-спектров (НПВО) для хитозана и синтезированного блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА (серия Р6) проведен анализ характеристических полос поглощения.

ИК-спектроскопия использована для подтверждения химического строения полимеров и выявления функциональных групп.

Спектры хитозана, блок-сополимеров серий Р4 и Р6 представлены ИК-спектры испытуемых образцов полимеров. В таблице 3.5 представлено отнесение характеристических полос к функциональным группам исследуемых полимеров.

Спектры серий Р4 и Р6 практически идентичны по набору и положению основных полос, что подтверждает воспроизводимость синтеза и идентичность химического строения полученных полимеров.

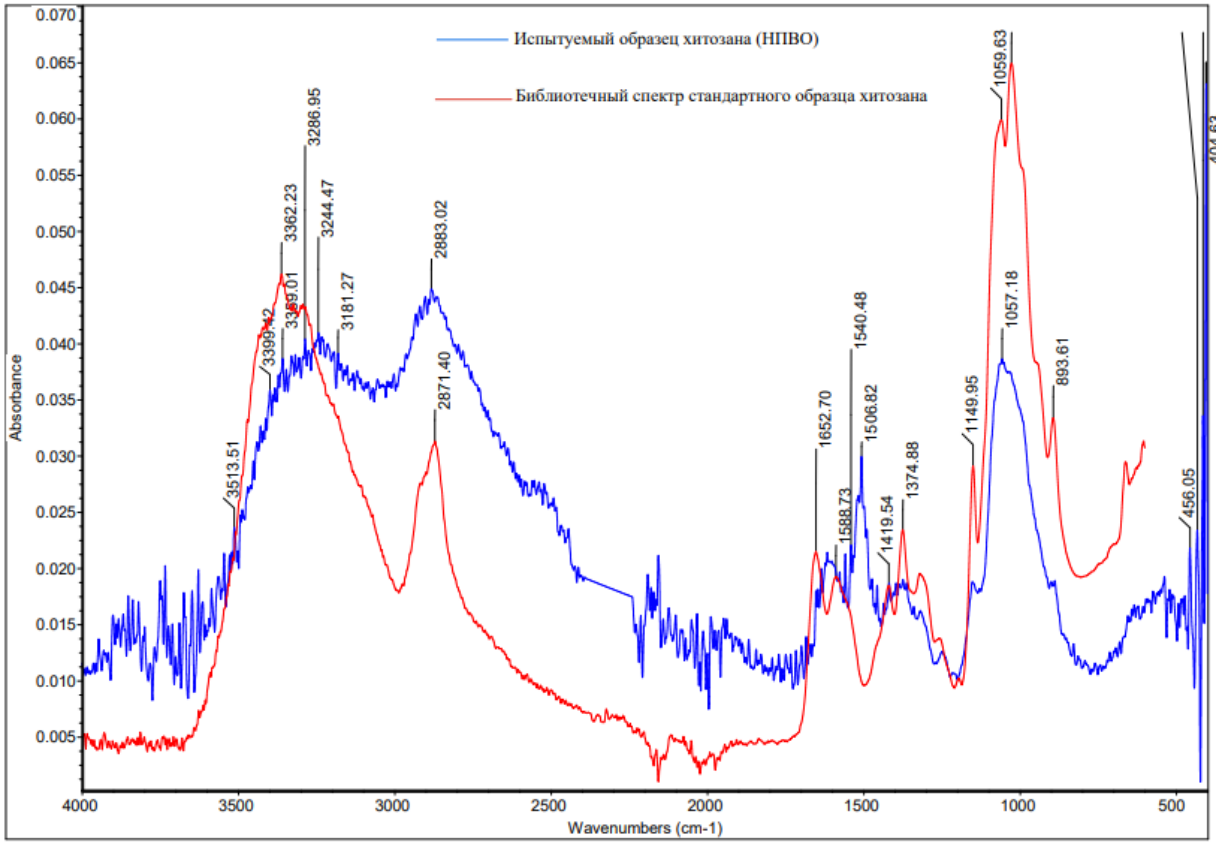


Рисунок 3.6 – ИК-спектр испытуемого образца хитозана в сравнении с библиотечным спектром хитозана

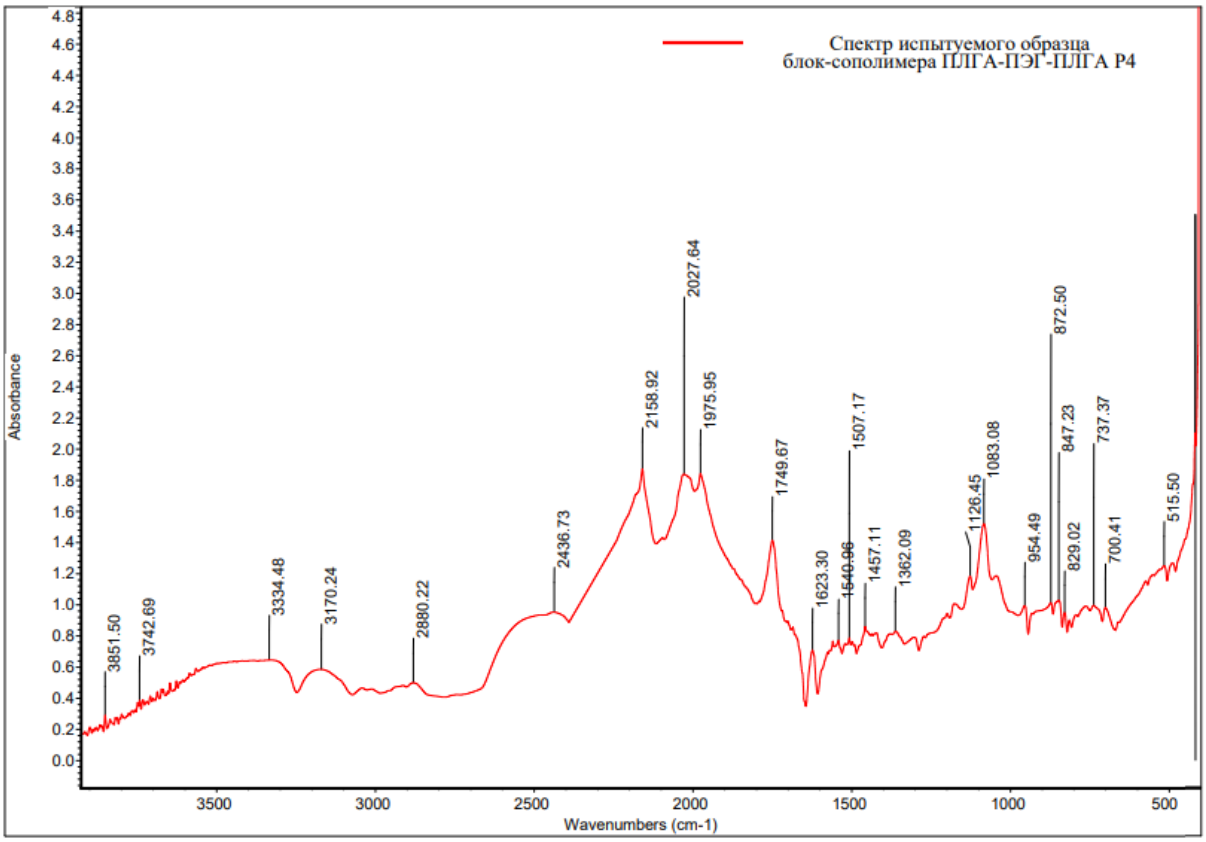


Рисунок 3.7 – ИК-спектр испытуемого образца блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА Р4

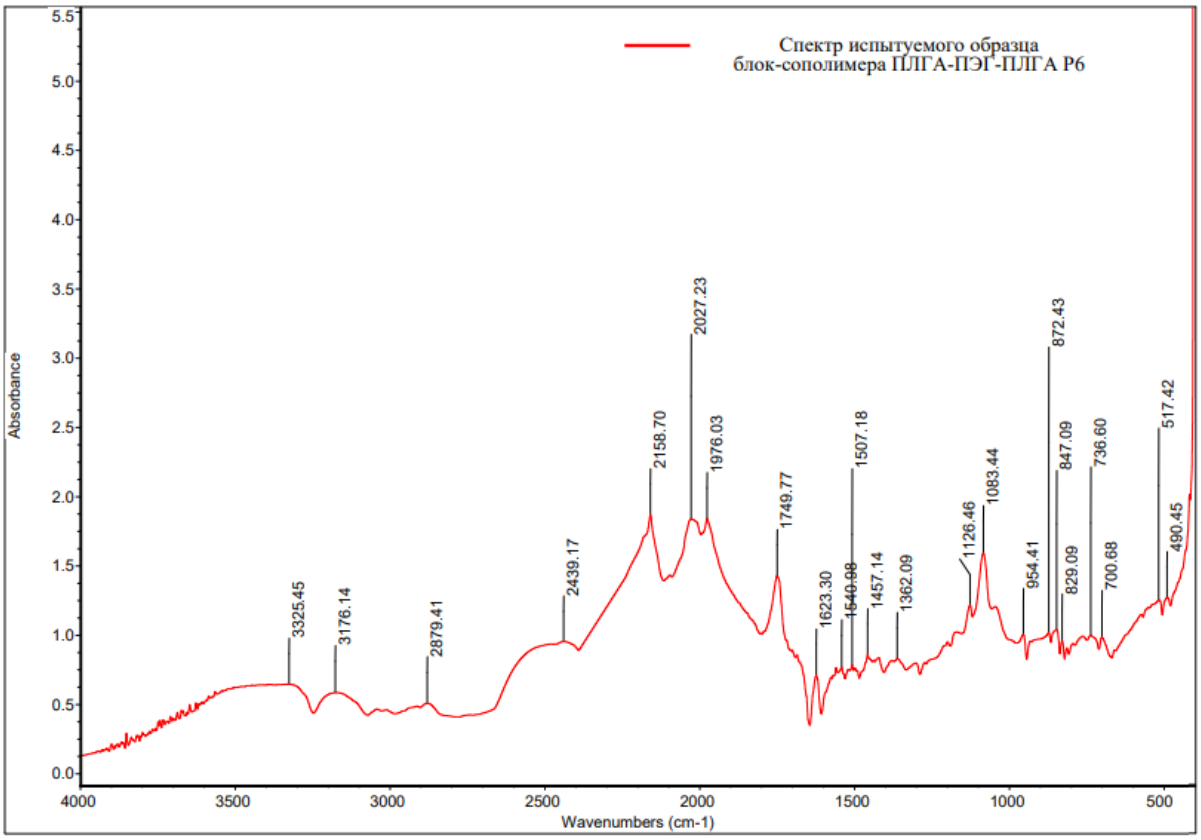


Рисунок 3.8 – ИК-спектр испытуемого образца блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА Р6

Таблица 3.5 – Характеристические полосы поглощения в ИК-спектрах полимеров

| Полимер | Волновое число, $см^{-1}$ | Отнесение |
|---|---|---|
| Хитозан | 3359, 3399, 3513, 3286, 3181, 3244 | ν(O–H), ν(N–H) во фрагментах D-глюкозамина |
| | 2871, 2883 | ν(C–H) алифатические |
| | 1652 | ν(C=O) с вкладом ν(C—N) и δ(N—H) амидных групп |
| | 1588 | δ(N—H) с вкладом ν(C—N) амидных групп |
| | 1419, 1374 | δ(C–H) |
| | 1149, 1059 | ν(C–O–C) пиранозного кольца |
| | 893 | δ(C–H) (β-гликозидная связь) |
| | 456, 404 | Скелетные колебания |
| ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА Р4 | 3334, 3170 | ν(O–H) (концевые гидроксильные группы) |
| | 2880 | ν(C–H) |
| | 1749 | ν(C=O) сложноэфирных групп |
| | 1457, 1362 | δ(C–H) |
| | 1126 | ν(C–O–C) эфирных связей |
| | 954, 829, 700, 515 | Скелетные колебания |
| ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА Р6 | 3325, 3176 | ν(O–H) (концевые гидроксильные группы) |
| | 2879 | ν(C–H) |
| | 1750 | ν(C=O) сложноэфирных групп |
| | 1457, 1362 | δ(C–H) |
| | 1126 | ν(C–O–C) эфирных связей |
| | 954, 829, 700, 490 | Скелетные колебания |

## 3.5. Определение температуры гелеобразования в зависимости от концентрации

Температуру фазового перехода раствор-гель водных растворов синтезированного сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА определяли методом переворачивания пробирки. Результаты представлены в Таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Температура гелеобразования растворов ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА в зависимости от концентрации

| Концентрация, % (мас. /об.) | Tgel, °C |
|---|---|
| 10 | не гелеобразуется |
| 15 | 45,0 ± 1 |
| 20 | 37,5 ± 1 |
| 25 | 29,0 ± 1 |
| 30 | 25,0 ± 1 |

Установлено, что с увеличением концентрации сополимера температура гелеобразования закономерно снижается. Для дальнейших исследований выбрана концентрация 20%, при которой $T_{gel}$ = 37,5 ± 1 °C, что близко к физиологической температуре тела человека.

### 3.6. Степень деацетилирования хитозана

Степень деацетилирования (СД) хитозана, использованного в работе, определяли методом потенциометрического титрования на титраторе Metrohm Ti-Touch 916 с автоматической регистрацией конечной точки титрования.

Высокое содержание свободных аминогрупп обеспечивает растворимость хитозана в слабокислой среде и способность к эффективному гелеобразованию в присутствии β-глицерофосфата.

Результаты титрования для трех параллельных навесок представлены в Таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Результаты потенциометрического титрования хитозана

| № навески | Масса навески, г | $V_1$ (точка эквивалента 1), мл | $V_2$ (точка эквивалента 2), мл | ($V_2 – V_1$), мл |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,20151 | 8,20 | 18,95 | 10,75 |
| 2 | 0,19983 | 8,15 | 18,85 | 10,70 |
| 3 | 0,20024 | 8,18 | 18,90 | 10,72 |

Концентрация титранта (NaOH) составляла 0,1001 М. Содержание влаги в хитозане, определенное гравиметрически после высушивания при 105 °C до постоянной массы, составила W = 5,2%.

Среднее значение степени деацетилирования по трем параллельным определениям составило 90,9 ± 0,5%.

Высокая степень деацетилирования свидетельствует о том, что большая часть ацетильных групп в исходном хитине была гидролизована, и в молекуле хитозана преобладают свободные аминогруппы, что обеспечивает способность данного полимера к термочувствительному гелеобразованию. За счет наличия свободных аминогрупп хитозан способен к взаимодействию с β-глицерофосфатом. Депротонирование аминогрупп при повышении pH и температуры инициирует формирование водородных связей и гидрофобных взаимодействий между полимерными цепями, что приводит к образованию гелевой сетки [66].

### 3.7. Влияние соотношения хитозан: β-глицерофосфат на гелеобразование

Оценивали испытуемые гели с постоянной концентрацией хитозана 2% и различными концентрациями β-глицерофосфата. Устанавливали термочувствительность системы методом перевернутой пробирки после термостатирования при температуре 37-38 °С Влияние концентрации β-ГФ на pH и время гелеобразования системы хитозан/β-ГФ представлено в Таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Влияние концентрации β-ГФ на pH и время гелеобразования

| Массо-объемная концентрация β-ГФ, % | pH смеси | Время гелеобразования при 37-38 °С, мин |
|---|---|---|
| 5 | 5,6 | >60 |
| 8 | 6,4 | 25 ± 2 |
| 12 | 7,1 | 12 ± 2 |
| 16 | 7,4 | 5 ± 1 |

Оптимальным для дальнейшей разработки инъекционных гелей признано соотношение хитозан: β-ГФ = 1: 6-7 % (2% и 12-14% мас. /об. соответственно), при котором pH = 6,8–7,2, время гелеобразования составляет 12 ± 2 мин.

### 3.8. Реологические свойства полимерных систем

Реологические исследования проводили на ротационном вискозиметре Lamy RM 200. Для обеих полимерных систем регистрировали кривые течения при 25 °С (Таблица 3.9) и температурную зависимость вязкости при нагревании (Таблица 3.10).

#### 3.8.1. Кривые течения хитозанового геля при 25 °С

Кривая течения хитозанового геля при 25 °С демонстрирует классическое псевдопластическое поведение, при котором вязкость снижается с ростом скорости сдвига (Таблица 3.9). Петля гистерезиса между восходящей и нисходящей ветвями указывает на тиксотропное поведение данного геля.

Таблица 3.9 – Вязкость хитозанового геля при разных скоростях сдвига (25 °С)

| Скорость сдвига, $с^{-1}$ | Напряжение сдвига, Па | Вязкость, Па·с |
|---|---|---|
| 10,1 | 18,48 | 1,76 |
| 20,1 | 15,62 | 0,78 |
| 30,1 | 18,09 | 0,80 |

Продолжение Таблицы 3.9

| | | |
|---|---|---|
| 40,1 | 32,97 | 0,82 |
| 50,1 | 19,33 | 0,39 |
| 60,1 | 8,67 | 0,34 |
| 70,0 | 11,00 | 0,16 |
| 80,0 | 8,61 | 0,13 |
| 90,0 | 5,09 | 0,15 |
| 100,0 | 7,81 | 0,1 |

Площадь петли гистерезиса, изображенной на рисунке 3.9, рассчитанная численным интегрированием, составила 1,45 × 10³ Па·с⁻¹, что подтверждает выраженную тиксотропию.

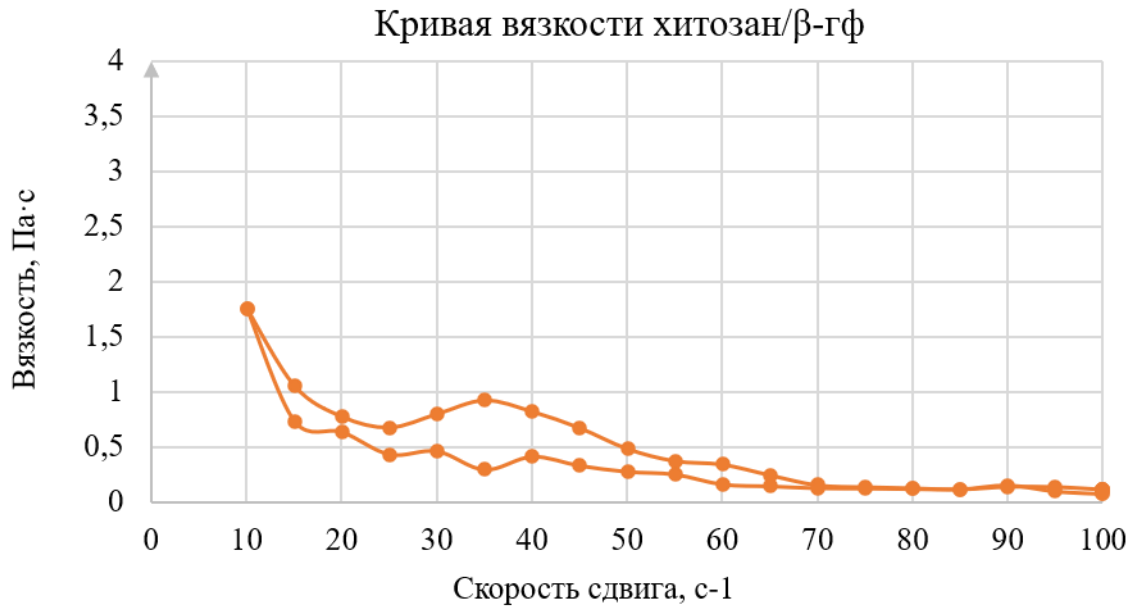


Рисунок 3.9 – Кривая течения геля хитозан/β-гф

### 3.8.2. Кривые течения гелей блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем при 25 °C

Для гелей на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА (20% раствор) также регистрировали кривые течения. Данные для серий Р4 и Р6 представлены в Таблице 3.10.

Таблица 3.10 – Вязкость ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гелей при разных скоростях сдвига (25 °C)

| Скорость сдвига, с⁻¹ | Вязкость (Р4), Па·с | Вязкость (Р6), Па·с |
|---|---|---|
| 10,1 | 0,82 | 0,80 |
| 20,1 | 0,48 | 0,47 |
| 30,1 | 0,33 | 0,32 |
| 40,1 | 0,25 | 0,25 |
| 50,1 | 0,20 | 0,20 |
| 60,1 | 0,17 | 0,17 |

Продолжение Таблицы 3.10

| | | |
|---|---|---|
| 70,0 | 0,15 | 0,15 |
| 80,0 | 0,13 | 0,13 |
| 90,0 | 0,11 | 0,11 |
| 100,0 | 0,10 | 0,10 |

Обе серии блок-сополимеров демонстрируют практически идентичные реологические профили, что подтверждает воспроизводимость свойств синтезированных полимеров. Гели на основе синтезированных полимеров проявляют классическое псевдопластическое поведение, демонстрируя снижение вязкости в ответ на увеличение напряжения сдвига – при увеличении скорости сдвига от 10 до 100 $с^{-1}$ вязкость снижается примерно в 8 раз. Такое поведение характерно для структурированных систем, в которых под действием напряжения сдвига происходит ориентация и деформация мицеллярных агрегатов.

На кривой течения гелей блок-сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, отображенной на рисунке 3.10, также наблюдается выраженное псевдопластическое поведение испытуемых гелей. Однако в отличие от гидрогелей хитозана у гелей ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА на кривой течения практически не наблюдается тиксотропии и тиксотропная площадь стремится к 0, поэтому численная оценка данного показателя не проводилась. Это объясняется тем, что физическая сетка, образованная мицеллами, быстро перестраивается после прекращения сдвигового воздействия благодаря высокой подвижности полимерных цепей и термодинамическому стремлению системы к равновесному состоянию.

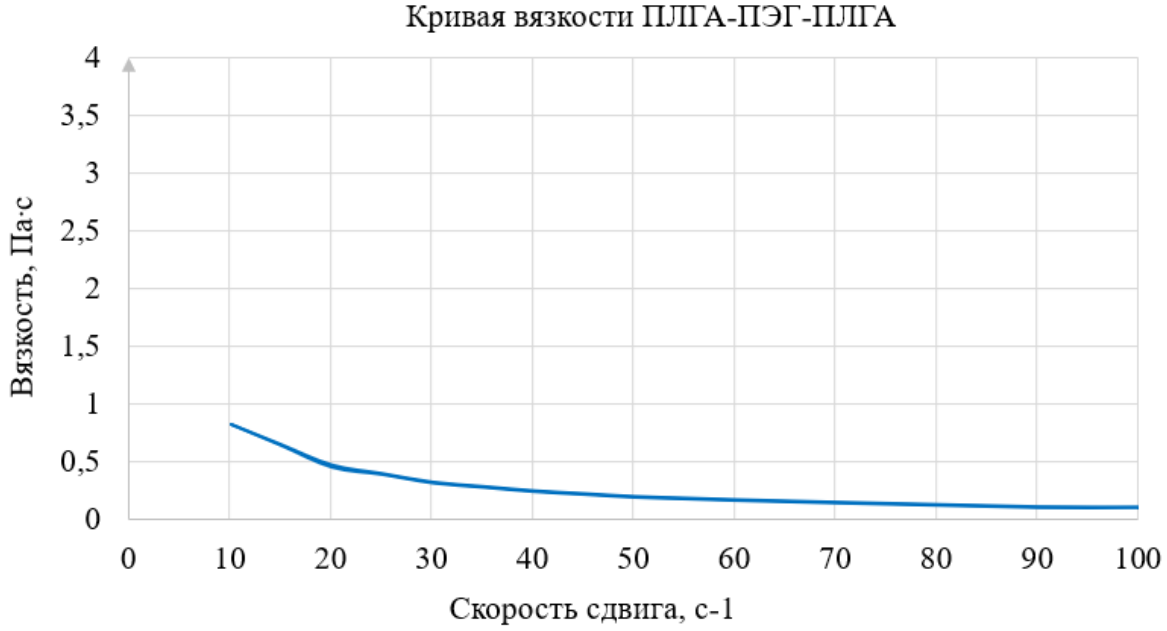


Рисунок 3.10 – Кривая течения геля ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

### 3.8.3. Оценка температуры гелеобразования гелей на основе хитозана

Для хитозанового геля определяли температуру фазового перехода по изменению вязкости при нагревании (нормализованная скорость сдвига 50 $с^{-1}$). Результаты представлены в Таблице 3.11.

Таблица 3.11 – Изменение вязкости хитозанового геля при нагревании

| Температура, °С | Вязкость, Па·с |
|---|---|
| 20,4 | 0,019 |
| 22,4 | 0,0207 |
| 24,4 | 0,0218 |
| 26,4 | 0,0219 |
| 30,4 | 0,0229 |
| 32,4 | 0,0247 |
| 34,8 | 0,0247 |
| 35,4 | 0,0247 |
| 36,1 | 0,0247 |
| 36,9 | 0,0286 |
| 37,2 | 0,0299 |
| 37,9 | 0,0355 |
| 38,5 | 0,0338 |
| 39,5 | 0,0356 |
| 40,5 | 0,0338 |
| 41,2 | 0,0312 |
| 42,1 | 0,02602 |

На графике, отображенном на рисунке 3.11, наблюдается что при нагревании от 20 до 35 °С вязкость геля незначительно повышается, затем в диапазоне 36–38 °С наблюдается увеличение вязкости (с 0,02247 до 0,0355 Па·с), что соответствует началу фазового перехода раствор-гель. Пиковое значение вязкости наблюдается при значении Tgel = 37,9 ± 1 °С. Затем при дальнейшем нагревании происходит индуцированное температурой разрушение системы и преципитация частиц хитозана из водного раствора ввиду разрешения связей между полимером и β-ГФ.

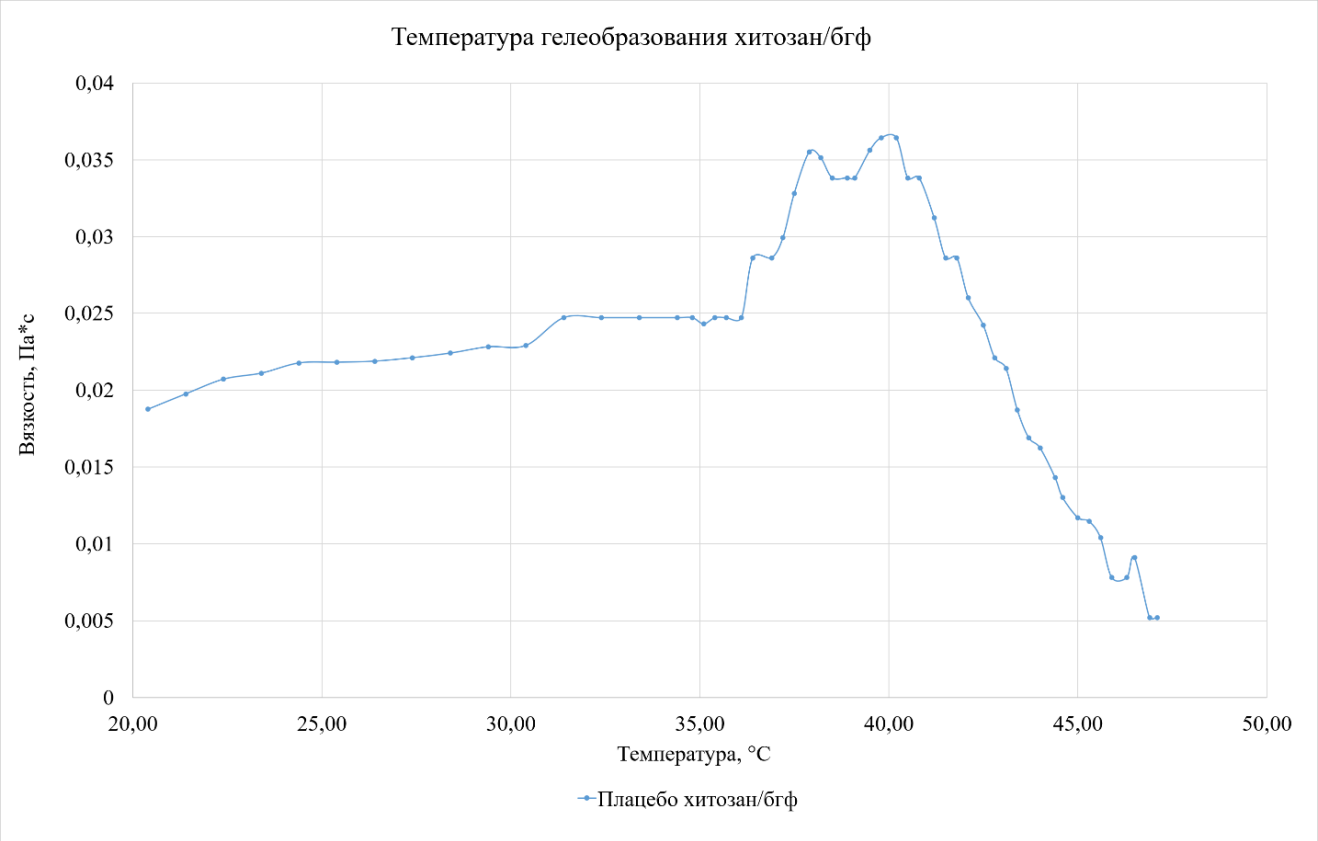


Рисунок 3.11 – Термочувствительный переход хитозан/бета-глицерофосфатной системы

### 3.8.4. Оценка температуры гелеобразования гелей на основе блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем

Для гелей ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА серий Р4 и Р6 также определяли температуру термочувствительного перехода по изменению вязкости при нагревании (нормализованная скорость сдвига 50 $с^{-1}$). Результаты представлены в таблицах 3.12 и 3.13.

Таблица 3.12 – Зависимость вязкости ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА Р4 геля от температуры

| Температура, °С | Вязкость, Па·с |
|---|---|
| 4,1 | 0,049 |
| 8,0 | 0,038 |
| 12,0 | 0,032 |
| 16,0 | 0,033 |
| 20,0 | 0,044 |
| 23,0 | 0,063 |
| 25,0 | 0,095 |
| 27,0 | 0,171 |
| 29,0 | 0,439 |
| 31,0 | 1,06 |
| 33,0 | 1,60 |

Продолжение Таблицы 3.12

| | |
|---|---|
| 35,0 | 2,03 |
| 36,0 | 2,14 |
| 37,5 | 1,95 |
| 39,5 | 0,396 |

Таблица 3.13 – Зависимость вязкости ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА Р6 геля от температуры

| Температура, °С | Вязкость, Па·с |
|---|---|
| 12,6 | 0,262 |
| 16,0 | 0,211 |
| 20,0 | 0,253 |
| 24,0 | 0,369 |
| 26,0 | 0,504 |
| 28,0 | 0,617 |
| 30,0 | 0,766 |
| 31,5 | 0,801 |
| 33,0 | 0,94 |
| 34,5 | 1,05 |
| 35,5 | 1,11 |
| 36,5 | 1,15 |
| 37,5 | 1,11 |
| 38,5 | 0,708 |
| 40,0 | 0,064 |

На графике, отображенном на рисунке 3.12, наблюдается что у геля на основе блок-сополимера серии Р4 при нагревании вязкость в диапазоне температур от 5 °С до 25 °С изменяется незначительно, затем на участке 26-30 градусов начинается плавный рост вязкости, свидетельствующий о начале термочувствительного перехода. Пиковая вязкость и конец фазового перехода достигается на участке температур 36,0-37,5 °С, соответствующих физиологической температуре человека. Затем при дальнейшем нагревании происходит разрушение гелевой сетки ввиду нарушения связей между мицеллами полимера при повышении температуры выше точки гелеобразования.

Рисунок 3.12 – Термочувствительный переход геля ПЛГА-ПЭГ- ПЛГА Р4

На графике, отображенном на рисунке 3.13, наблюдается что у геля на основе блок-сополимера серии Р6 при нагревании вязкость в диапазоне температур от 12,5 °С до 20 °С изменяется незначительно, затем на участке 20-30 °С начинается плавный рост вязкости, свидетельствующий о начале термочувствительного перехода системы. На участке 30-37,5 °С отмечается скачкообразное возрастание вязкости, указывающее на полный фазовый переход системы из раствора в гель. Пиковая вязкость и конец фазового перехода достигается на участке температур 35,5-37,5 °С, соответствующих физиологической температуре человека. Затем при дальнейшем нагревании происходит разрушение гелевой сетки ввиду нарушения связей между мицеллами полимера при повышении температуры выше точки гелеобразования.

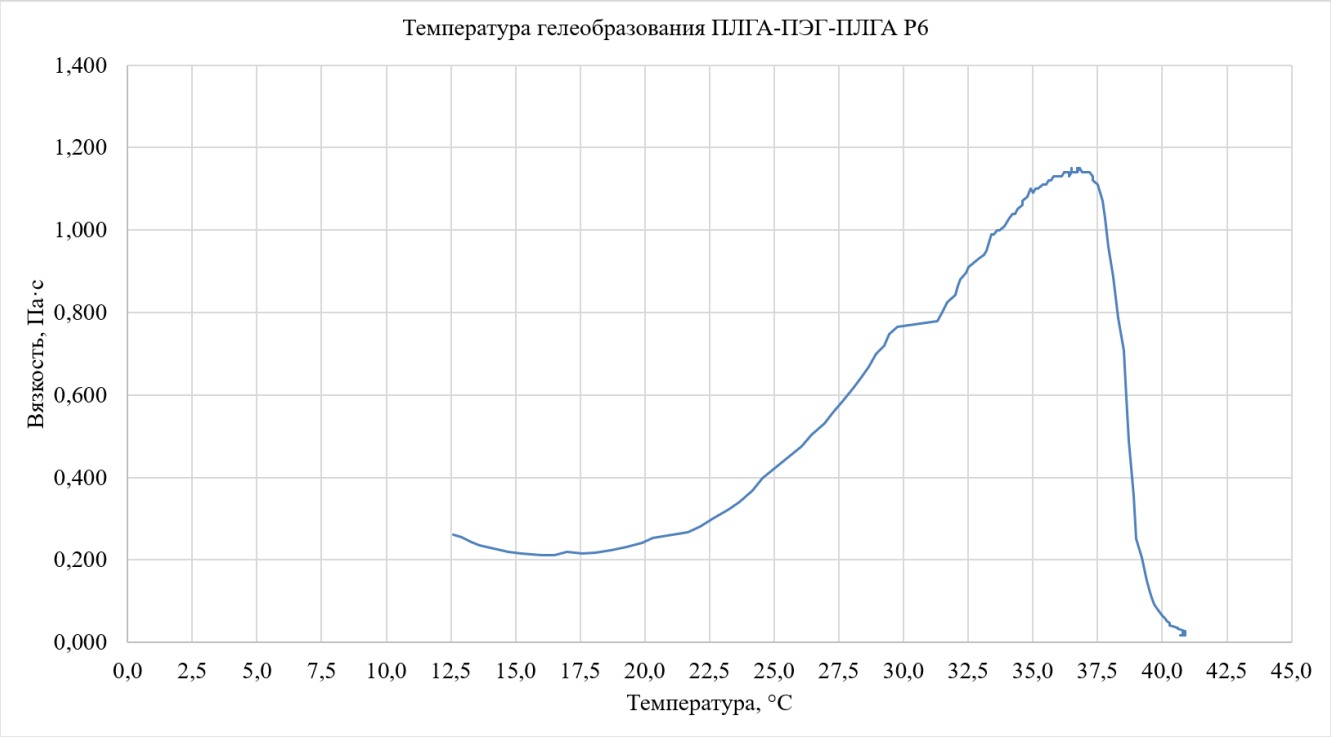


Рисунок 3.13 – Термочувствительный переход геля ПЛГА-ПЭГ- ПЛГА Р6

Обе серии полимеров демонстрируют схожее температурозависимое поведение, характерное для термореверсивных полимеров. Незначительные различия в пиковых температурах фазовых переходов гидрогелей на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА Р4 и Р6 могут быть объяснены различной молекулярной массой испытуемых полимеров, влияющей на скорость фазового перехода раствор-гель и стабильность гелевой сетки, а именно на межмолекулярные связи между полимерными цепями. Согласно данным ГПХ (раздел 3.2), для серии Р4 $M_n$ = 5124 г/моль, тогда как для серии Р6 $M_n$ = 4876 г/моль. Более высокая молекулярная масса Р4 обеспечивает формирование более плотной и устойчивой мицеллярной сетки при температуре гелеобразования, что выражается в более высокой пиковой вязкости, 2,14 Па·с для Р4 против 1,15 Па·с для Р6. Более низкая молекулярная масса Р6 может приводить к менее плотной упаковке мицелл в геле, что, в свою очередь, вызывает более низкую пиковую вязкость и более раннее начало разрушения структуры.

## 3.9. Выводы к главе 3

1. Разработана и экспериментально апробирована методика синтеза блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА. В ходе эксперимента выполнено семь серий синтезов с варьированием загрузки мономеров для определения оптимальных условий получения термочувствительных

полимеров. Для дальнейших исследований отобраны две серии, Р4 и Р6, показавшие наилучшую воспроизводимость и способность к образованию термочувствительных водных растворов.

2. Проведена характеристика молекулярно-массового распределения синтезированных сополимеров методом ГПХ. Узкое молекулярно-массовое распределение для обеих серий подтверждает контролируемый характер полимеризации и воспроизводимость разработанной методики синтеза.

3. Методом $^{1}$Н-ЯМР-спектроскопии подтверждена структура синтезированных блок-сополимеров. В спектрах идентифицированы характеристические сигналы, соответствующие лактидным, гликолидным и этиленоксидным звеньям.

4. Методом ИК-спектроскопии подтверждено химическое строение хитозана и синтезированного блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА. Идентичность спектров серий Р4 и Р6 подтверждает воспроизводимость синтеза.

5. Степень деацетилирования хитозана, определенная методом потенциометрического титрования, составила 90 ± 1%.

6. Установлена зависимость температуры гелеобразования ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА от концентрации.

7. Исследовано влияние соотношения хитозан: β-ГФ на pH и время гелеобразования. Оптимальным признано соотношение хитозан: β-ГФ = 1: 6-7 (2% и 12-14% мас. /об.), при котором pH = 6,8–7,2, время гелеобразования при 37 °С составляет 12 ± 2 мин.

8. Методом измерения вязкости при нагревании определены температуры гелеобразования. Обе серии ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА демонстрируют идентичные термочувствительные свойства. Различия в пиковых значениях вязкости обусловлены разной молекулярной массой полимеров.

# ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ГЕЛЕЙ С КЕТОРОЛАКА ТРОМЕТАМИНОМ

## 4.1. Целевой профиль качества продукта и оценка рисков

В соответствии с концепцией «качество через дизайн» (Quality by Design, QbD), закрепленной в руководствах ICH Q8(R2), ICH Q9 и ICH Q10, а также в нормативных документах ЕАЭС, фармацевтическая разработка начинается с определения целевого профиля качества продукта, Quality Target Product Profile, QTPP. QTPP представляет собой проспективное резюме качественных и количественных параметров лекарственного препарата, которые должны быть достигнуты для обеспечения требуемой безопасности, эффективности и стабильности.

Для разрабатываемых термочувствительных инъекционных гелей кеторолака трометамина на основе хитозана/β-ГФ и на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА были определены следующие элементы QTPP (Таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Целевой профиль качества продукта для инъекционных термочувствительных гелей кеторолака трометамина

| Элемент QTPP | Целевое значение | Обоснование |
|---|---|---|
| Лекарственная форма | Гель для инъекций | Обеспечение инъецируемости и формирования депо *in situ* |
| Путь введения | Внутрисуставной | Локальная доставка, снижение системных побочных эффектов |
| Концентрация АФС | 10 -30 мг/мл | Диапазон, обеспечивающий терапевтическую дозу 20–60 мг в объеме 2 мл |
| Срок годности | ≥ 6 месяцев | Исходя из стабильности полимерных матриц |
| Стерильность | Стерильно | Обязательно для парентеральных лекарственных форм |
| pH | 6,5–7,5 | Физиологическая совместимость с синовиальной жидкостью |
| Вязкость (25°C, 50 $с^{-1}$) | Хитозановый: 200–500 мПа·с | Обеспечение инъецируемости и равномерного распределения. Значения обоснованы на основе экспериментальных по реологии полимерных систем, не содержащих АФС (Глава 3, разделы 3.8.1–3.8.2). |
| | ПЛГА-ПЭГ: 100–400 мПа·с | |
| Температура гелеобразования | 35–39°C | Гелеобразование при физиологической температуре (37-38 °C) |
| Инъецируемость | ≤ 50 Н (игла 22G) | Удобство и безопасность введения |
| Высвобождение *in vitro* | Модифицированное (целевое значение – не более 80% за 4 ч) | Обеспечение модифицированного высвобождения |
| Стабильность | Сохранение свойств в течение срока годности | Обеспечение качества на протяжении хранения |

Продолжение Таблицы 4.1

| | | |
|---|---|---|
| Упаковка | Преднаполненный стеклянный шприц 2 мл с иглой 22G | Удобство применения, защита от контаминации |

Оценка рисков проводилась с использованием методологии анализа видов и последствий ошибок, Failure Mode and Effects Analysis, FMEA. Для каждого элемента QTPP были идентифицированы потенциальные виды рисков, их влияние на качество лекарственного препарата и возможные причины возникновения данных рисков. На основе ранжирования рисков по показателям «вероятность возникновения», «тяжесть последствий» и «обнаруживаемость» были определены критические параметры качества (Critical quality attributes, CQA), и критические параметры процесса (Critical production points, CPP). Результаты оценки рисков обобщены в Таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Оценка рисков для критических параметров качества

| Атрибут качества | Потенциальный риск | Влияние на качество | Меры контроля |
|---|---|---|---|
| Концентрация кеторолака | Некорректное взвешивание, негомогенное распределение АФС в геле | Снижение эффективности, потенциальная токсичность препарата | Входной контроль сырья, валидация производственного процесса |
| pH | Отклонение из-за неточной коррекции | Раздражение тканей, нестабильность АФС | Калибровка pH-метра, стандартизованные процедуры контроля при производстве |
| Температура гелеобразования | Неверное соотношение хитозан/β-ГФ, изменение концентрации ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА | Отсутствие гелеобразования в суставе | Контроль концентраций, реологический контроль |
| Стерильность | Контаминация при производстве | Инфекционные осложнения | Асептическое производство, финишная гамма-стерилизация |
| Инъецируемость | Высокая вязкость, закупорка иглы ввиду наличия механических частиц в геле | Невозможность введения лекарственного препарата | Контроль вязкости лекарственного препарата, фильтрация полимерных растворов, корректный выбор иглы |

### 4.2. Скрининг составов испытуемых препаратов с кеторолака трометамином

Для выбора оптимальных составов термочувствительных гелей был проведен систематический скрининг, включающий варьирование концентраций полимеров, сшивателя/буфера, pH и загрузки активной фармацевтической субстанции. Всего исследовано 42 композиции (Таблица 4.3). Оценку проводили по трем последовательным критериям отбора, на каждом из которых отсеивались составы, не соответствующие требованиям к качеству и технологии. Последовательный характер отбора обеспечивал системный подход и позволял на каждом этапе исключать заведомо непригодные композиции без проведения дополнительных дорогостоящих и трудоемких исследований.

Таблица 4.3 – Дизайн скрининга составов

| Тип геля | Варьируемые параметры | Количество композиций |
|---|---|---|
| Хитозан/β-ГФ | – Концентрация хитозана: 1,5; 2,0; 2,5%<br>– Концентрация β-ГФ: 5; 8; 12; 16; 18; 20%<br>– Концентрация кеторолака трометамина: 5; 10; 15; 20; 30 мг/мл | 24 |
| ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА | – Концентрация сополимера: 15; 20; 25; 30%<br>– Концентрация кеторолака трометамина: 10; 20; 30; 40; 50; 60 мг/мл<br>– Две серии синтеза (Р4 и Р6) | 18 (по 9 образцов на серию полимера) |
| Итого | | 42 |

На первом этапе оценивалась способность композиций к гелеобразованию при 37°C. На данном этапе оценивали, способна ли композиция к формированию устойчивого геля при физиологической температуре в течение времени, достаточного для инъекции и фазового перехода лекарственного препарата в суставе, оцениваемом в 10–15 мин. Критерием отбора служило время гелеобразования в диапазоне 10–15 мин при 37°C. Составы, которые не претерпевали фазовый переход раствор-гель в течение 15 мин, или образовывали гель быстрее 5 мин, что могло бы привести к преждевременному гелеобразованию в канюле шприца, исключали из эксперимента.

По результатам первого этапа из 24 хитозановых композиций было отобрано 12 для дальнейшего исследования. Основные исключения отсева хитозановых гелей из эксперимента заключаются в недостаточной концентрация β-ГФ и не корректном соотношении β-ГФ/кеторолак/хитозан. При концентрации β-ГФ менее 10% в трехкомпонентной системе хитозан-β-ГФ-кеторолака трометамин происходило соосаждение хитозана и АФС из раствора ввиду конкурентного взаимодействия аминогрупп хитозана и трометамина с β-ГФ при pH 6-7. При

избыточной концентрации β-ГФ и визуальной стабильности системы при pH 6,8-7,4 испытуемые гели претерпевали фазовый переход при температурах выше 40 °C в течение 15-30 минут, и при фазовом переходе наблюдался выраженный синерезис, разделение водной и гелевой фазы препарата.

Из 18 ПЛГА-ПЭГ-композиций отобрано 12. В случае ПЛГА-ПЭГ-гелей единственным критическим параметром являлась концентрация блок-сополимеров гелях. При массо-объемных концентрациях ниже 20% время гелеобразования при 37 °C превышало 60 мин, а вязкость системы повышалась не значительно, фазовый переход фиксировался только по помутнению прозрачных растворов ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, свидетельствующем о достижении критической температуры мицеллообразования. При концентрациях блок-сополимера в растворе выше 25% вязкость при комнатной температуре превышала допустимые по QTTP значения при 25 °C, гелеобразование происходило за 3-4 мин при 37 °C.

*На втором этапе оценивали инъецируемость испытуемых составов.* На данном этапе оценивали силу экструзии через иглу 22G при скорости 1 мм/с. Критерием отбора являлась сила экструзии испытуемых гелей ≤ 50 Н. Составы с силой экструзии > 50 Н исключали как не пригодные для внутрисуставного введения. Измерения проводили на текстуроанализаторе с использованием преднаполненных шприцев объемом 2 мл.

По результатам второго этапа испытаний из 12 отобранных на первом этапе хитозановых составов 8 соответствовали критерию, показывая значения силы экструзии в диапазоне 28–45 Н. 4 состава с концентрацией кеторолака 20–30 мг/мл и/или с 2,5% хитозана имели силу экструзии> 50 Н и были исключены.

Из 12 ПЛГА-ПЭГ-составов 7 соответствовали критерию, продемонстрировав силу экструзии в диапазоне 35–48 Н. 5 составов с загрузкой кеторолака > 40 мг/мл имели силу экструзии > 50 Н и были исключены. Для ПЛГА-ПЭГ-гелей также наблюдалась прямая зависимость силы экструзии от концентрации сополимера, в связи с чем у 25% гелей ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА сила экструзии была выше, чем у 20%, поэтому для дальнейших экспериментов были выбраны составы с 20% концентрацией блок-сополимера в композиции.

*На третьем этапе оценивали стабильность при хранении испытуемых растворов.* На данном этапе оценивали стабильность составов при хранении в холодильной установке при температуре 2–8°C в течение 1 месяца. Критериями отбора составов стали содержание АФС 95–105% от номинала, индивидуальные примеси <2%, сумма примесей <3%, отсутствие расслоения, опалесценции или изменения цвета гелей после хранения.

По результатам третьего этапа отбора образцов из 8 хитозановых составов только 2 соответствовали установленным критериям отбора. 6 образцов были исключены в связи с

преждевременным гелеобразованием из-за повышенной концентрации β-ГФ, составляющей 18-20% при концентрации кеторолака в системе 10 мг/мл.

Из 7 ПЛГА-ПЭГ-составов 2 соответствовали установленным критериям отбора. Ни в одном из составов не наблюдалось опалесценции, осаждения веществ или изменения цвета гелей. Все составы с ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА дополнительно исследовались с целью установления изменения pH после хранения. Составы с концентрацией кеторолака трометамина более 40 мг/мл в композиции продемонстрировали значительное снижение уровня pH, с 7,4 до 5 и ниже, в связи с чем 5 соответствующих составов были исключены.

Результаты скрининга обобщены в Таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Результаты скрининга составов

| Этап | Гели на основе хитозана (отобрано/всего) | ПЛГА-ПЭГ гели (отобрано/всего) |
|---|---|---|
| Гелеобразование при 37°C | 12/24 | 12/18 |
| Инъецируемость | 8/12 | 7/12 |
| Стабильность (1 месяц) | 2/8 | 1/7 |
| Финальные составы | 2 | 2 |

По результатам испытаний были отобраны следующие составы

- для хитозановых гелей – два состава с концентрацией кеторолака трометамина 10 мг/мл, соответствующей номинальной дозе 20 мг в 2 мл шприца при 14% и 16% β-ГФ и 2% хитозана в системе.
- для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гелей – два состава с концентрацией ПЛГА-ПЭГ- ПЛГА 20%, кеторолака трометамина - 30 мг/мл, pH 7,4, отличающихся только сериями полимеров P4 и P6, используемых для изготовления систем.

### 4.3. Влияние кеторолака на критическую температуру гелеобразования

Для каждого типа полимерной матрицы оценивали влияние добавления кеторолака трометамина на температуру гелеобразования, Tgel. Измерения проводили методом ротационной вискозиметрии для плацебо, составов без АФС, и для составов с максимальной загрузкой АФС. Результаты представлены в Таблице 4.5 и на рисунках 4.1 и 4.2.

Таблица 4.5 – Влияние кеторолака на температуру гелеобразования

| Состав | Tgel плацебо, °C | Tgel с АФС, °C | ΔTgel, °C |
|---|---|---|---|
| Хитозан/β-ГФ (2%/16%) | 37,5 ± 1 | 37,0 ± 1 | –0,5 |
| Хитозан/β-ГФ (2%/14%) | 36,5 ± 1 | 36,0 ± 1 | –0,5 |
| ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА (20%) | 37,0 ± 1 | 36,5 ± 1 | –0,5 |

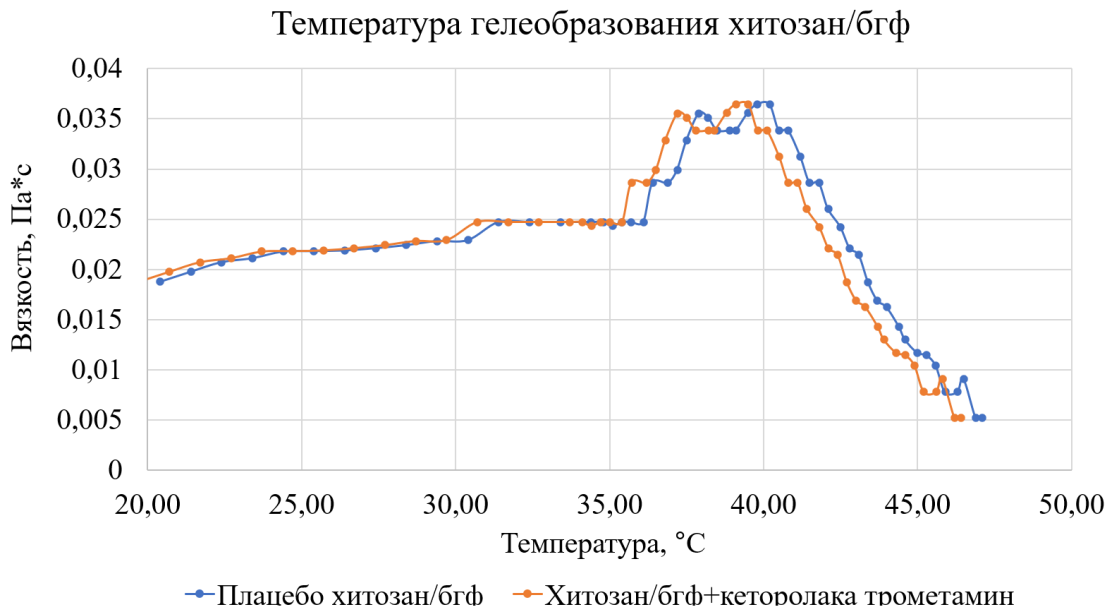


Рисунок 4.1 – Влияние кеторолака трометамина на температуру гелеобразования в гелях на основе системы хитозан/ β-ГФ

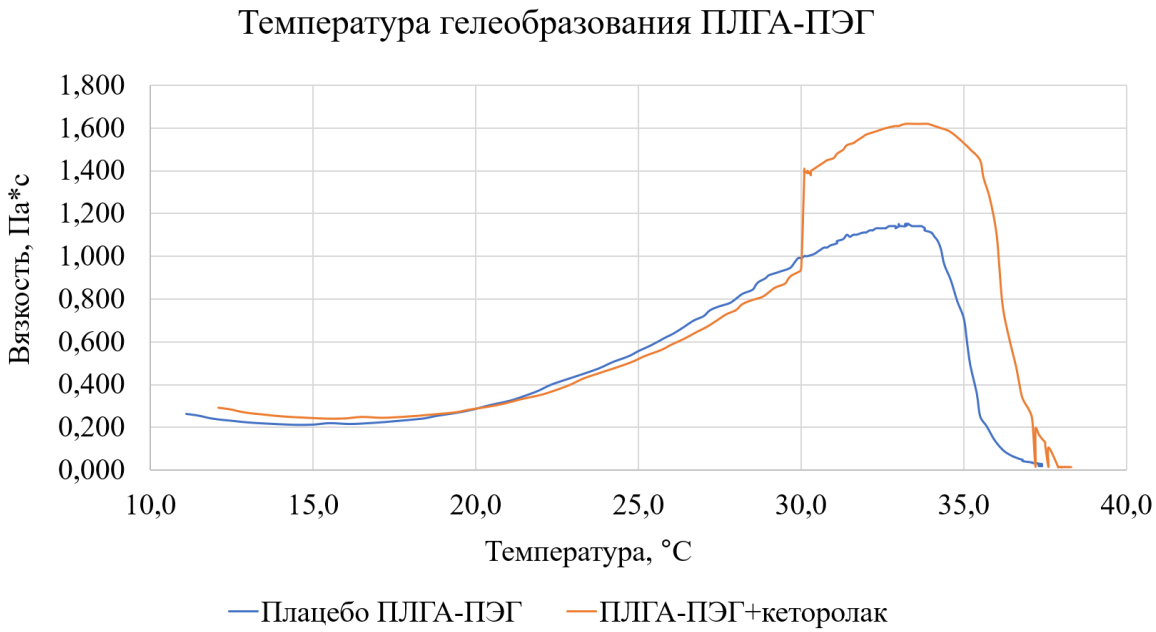


Рисунок 4.2 – Влияние кеторолака трометамина на температуру гелеобразования в гелях на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

Установлено, что кеторолака трометамин снижает Tgel на 0,5–1°C, что не оказывает существенного влияния на способность системы к гелеобразованию при физиологической температуре. Это объясняется принадлежностью исследуемой АФС к I классу БКС и отсутствием выраженных ионных взаимодействий с полимерными цепями испытуемых систем. Полученные результаты согласуются с данными, полученными ранее в исследовании Bakhrushina et al. [92].

### 4.4. Оптимизация загрузки лекарственного вещества

Для оптимизации загрузки кеторолака трометамина исследовали составы с различной концентрацией АФС (5–60 мг/мл) и оценивали их влияние на технологические свойства. Ключевые результаты представлены в Таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Влияние концентрации кеторолака на свойства гелей

| Тип геля | Концентрация КТ, мг/мл | Tgel, °C | Вязкость (25°C, 50 $с^{-1}$), мПа·с | Сила экструзии (22G), Н | Примеси через 1 мес, % |
|---|---|---|---|---|---|
| Хитозан/β-ГФ | 5 | 37,5 | 398 | 25 | 0,5 |
| | 10 | 37,0 | 409 | 28 | 0,6 |
| | 15 | 39, 7 | 427 | 32 | 1,0 |
| | 20 | 40,0 | 443 | 38 | 1,5 |
| | 30 | 45,0 | 483 | 45 | 2,2 |
| ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА | 10 | 37,0 | 206 | 35 | 0,5 |
| | 20 | 36,5 | 213 | 38 | 0,7 |
| | 30 | 36,5 | 217 | 40 | 0,8 |
| | 40 | 36,0 | 226 | 48 | 1,5 |
| | 60 | 35,5 | 245 | 58 | 2,5 |

Оптимальной признана загрузка:

- для хитозановых гелей – 10 мг/мл кеторолака трометамина, так как более высокие концентрации КТ требуют значительного увеличения концентрации β-ГФ, что ведет к изменению реологических свойств гелевых композиций, увеличению их КТГ и снижению их стабильности при хранении;
- для ПЛГА-ПЭГ геля – 30 мг/мл кеторолака трометамина, обеспечивающая терапевтическую дозу 60 мг в 2 мл при приемлемой инъецируемости и стабильности гелей.

### 4.5. Физико-химические и технологические свойства разработанных гелей

Для оптимальных составов были определены основные физико-химические и технологические характеристики. Результаты обобщены в Таблице 4.7.

Таблица 4.7 – Свойства оптимальных составов гелей

| Показатель | Гель хитозана | ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гель |
|---|---|---|
| Внешний вид | Прозрачный, слегка опалесцирующий гель | Прозрачный бесцветный гель |
| pH (25°C) | 6,9 ± 0,1 | 7,3 ± 0,1 |
| Плотность, г/мл | 1,0727 ± 0,001 | 1,0411 ± 0,001 |
| Динамическая вязкость (25°C, 50 $с^{-1}$), мПа·с | 400 ± 20 | 240 ± 30 |

Продолжение Таблицы 4.7

| | | |
|---|---|---|
| Температура гелеобразования, °C | 37,0 ± 1 | 36,5 ± 1 |
| Время гелеобразования при 37°C, мин | 12 ± 2 | 8 ± 2 |
| Сила экструзии (игла 22G, 1 мм/с), Н | 28 ± 5 | 40 ± 6 |
| Содержание кеторолака трометамина, мг/мл | 9,9 ± 0,3 | 29,5 ± 0,5 |
| Стерильность | Стерильно | Стерильно |

### 4.6. pH, вязкость, плотность

Значение pH для обоих типов гелей находится в диапазоне 6,5–7,5, что соответствует буферной емкости синовиальной жидкости при внутрисуставном введении. Плотность определена пикнометрическим методом и учтена при пересчете массовой концентрации в объемную (см. п. 4.5). Вязкость подобрана так, чтобы обеспечить инъецируемость и равномерное распределение в суставной полости.

### 4.7. Реологические характеристики

Реологические исследования выполнены на ротационном вискозиметре Lamy RM 200 при 25°C. Установлено, что оба типа гелей обладают псевдопластическим течением, что облегчает инъекцию. Тиксотропные свойства, характеризующиеся петлей гистерезиса кривых течения, указывают на способность геля восстанавливать структуру после сдвига, что важно для удержания депо в суставе.

Таблица 4.8 – Реологические параметры оптимальных составов

| Параметр | Хитозановый гель | ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гель |
|---|---|---|
| Вязкость при 50 $с^{-1}$, мПа·с | 400 ± 20 | 240 ± 30 |
| Индекс псевдопластичности ($\eta_{10}/\eta_{100}$) | 2,8 | 3,2 |
| Площадь петли гистерезиса, Па·с | 1450 ± 100 | 100 и менее |

### 4.8. Технологическая схема получения гелей

Технологические схемы получения инъекционных гелей кеторолака трометамина на основе систем хитозан/ β-ГФ и ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА представлены на рисунках 4.3 и 4.4 соответственно.

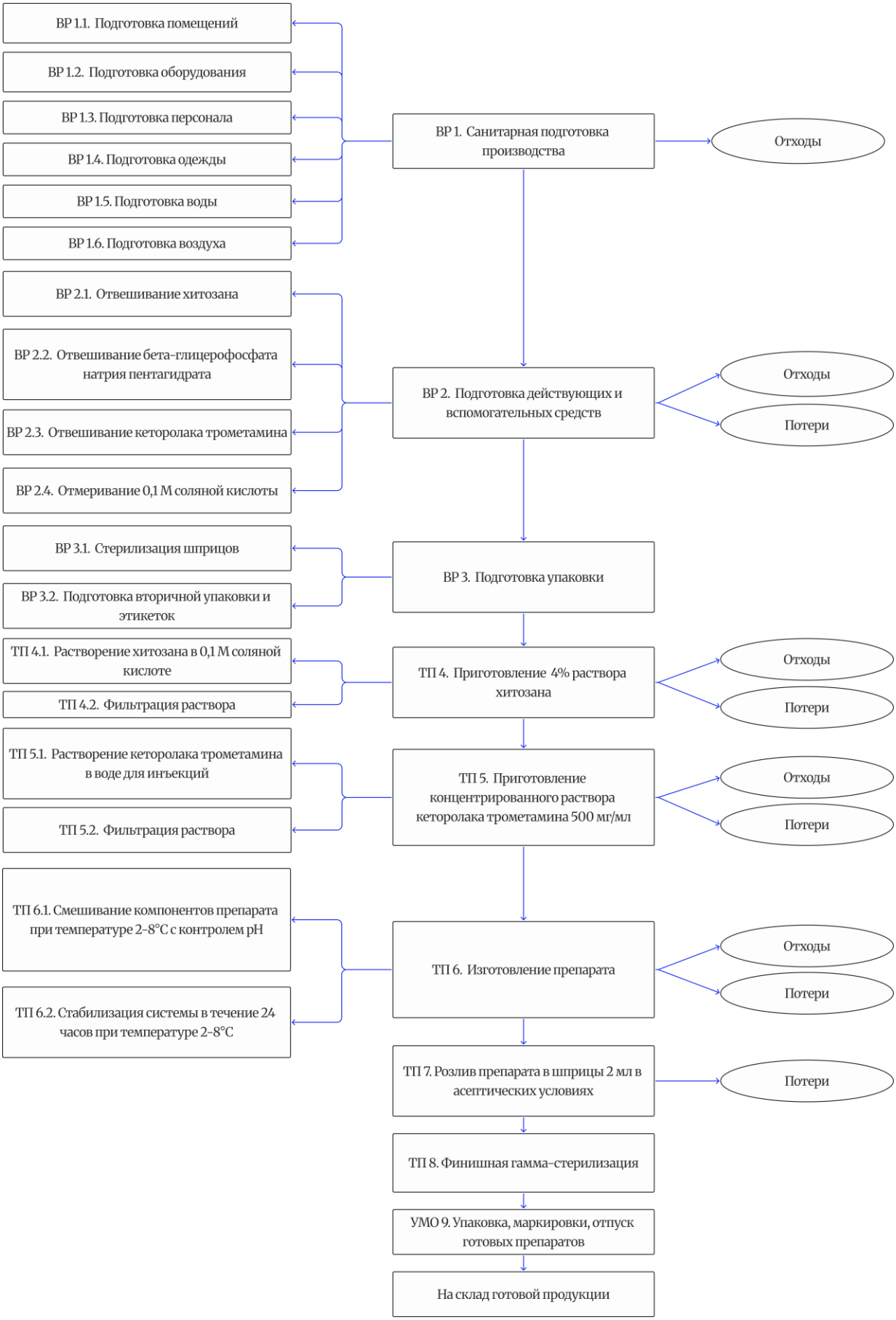


Рисунок 4.3 – Технологическая схема производства инъекционного геля кеторолака трометамина на основе системы хитозан/ β-ГФ

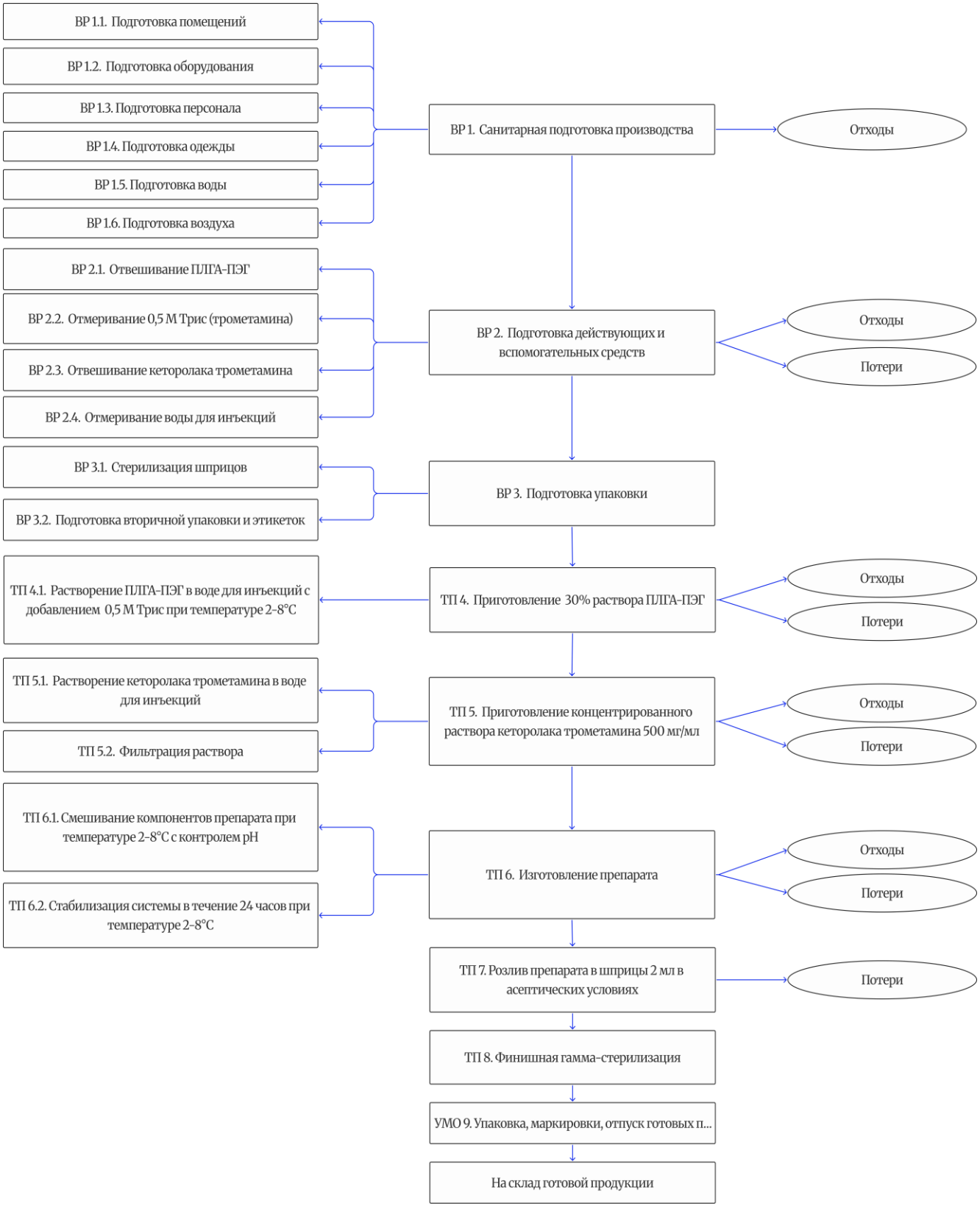


Рисунок 4.4 – Технологическая схема производства инъекционного геля кеторолака трометамина на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

## 4.9. Обоснование выбора метода стерилизации

Ввиду термочувствительности полимерных матриц и возможной деструкции кеторолака при нагревании, финишная стерилизация автоклавированием не применялась. В качестве методов стерилизации выбраны гамма-стерилизация с дозой облучения 15 кГр, источник облучения $^{60}Co$ для обоих типов гелей после фасовки в шприцы. Экспериментально подтверждено, что гамма-облучение не приводит к значимому изменению свойств гелей [144].

## 4.10. Критические параметры процесса и контрольные точки

На основе анализа рисков и экспериментальных данных определены критические параметры процесса (CPP) и контрольные точки (IPC), обеспечивающие воспроизводимость качества продукта. Данные приведены в Таблице 4.9 и Таблице 4.10.

Таблица 4.9 – Критические параметры процесса и контрольные точки производства инъекционного геля кеторолака трометамина на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

| Стадия | Операция | Критический параметр (CPP) | Допустимый диапазон | Контрольная точка (IPC) | Метод контроля | Частота |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ВР 1. Санитарная подготовка производства | | | | | | |
| ВР 1.1 | Подготовка помещений | Класс чистоты | Класс C (ISO 7) | Сертификация помещений | Твердые частицы, микробиологический мониторинг | Периодически |
| ВР 1.2 | Подготовка оборудования | Стерильность оборудования | Стерильно | Отсутствие контаминации | Визуальный контроль, микробиологический мониторинг | Перед каждой серией |
| ВР 1.3 | Подготовка персонала | Гигиена, одежда | Соответствие GMP | Внешний вид, анализы на контаминацию | Визуальный контроль, микробиологический мониторинг | Перед каждой сменой |
| ВР 2. Подготовка действующих и вспомогательных средств | | | | | | |
| ВР 2.1 | Отвешивание ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА | Масса навески | 6,0 ± 0,1 г (на 20 мл) | Точность взвешивания | Аналитические весы (поверенные) | Каждая серия |
| ВР 2.2 | Отмеривание 0,5 М Трис-буфера | pH буфера | 8,0–8,5 | pH раствора | pH-метр (калибровка | Каждая серия |
| ВР 2.3 | Отвешивание КТ | Масса навески | 10,0 ± 0,05 г (на 20 мл) | Точность взвешивания | Аналитические весы (поверенные) | Каждая серия |
| ВР 2.4 | Отмеривание воды для инъекций | Температура воды | 4–8 °C | Термометр | Термометр контактный | Каждая серия |
| ВР 3. Подготовка упаковки | | | | | | |
| ВР 3.1 | Стерилизация шприцов | Стерильность | Стерильно | Стерильность упаковки | Микробиологический контроль | Каждая партия |
| ВР 3.2 | Подготовка вторичной упаковки и этикеток | Качество этикеток | Соответствие макету | Визуально | Визуальный контроль | Каждая партия |
| ТП 4. Приготовление 30% раствора ПЛГА-ПЭГ | | | | | | |
| ТП 4.1 | Растворение ПЛГА-ПЭГ в воде с добавлением 0,5 М Трис при 2–8°C | Температура растворения | 2–8°C | Термометр | Термометр контактный | Непрерывно |
| | | Время гидратации | 12–16 ч | — | Таймер | Каждая серия |
| | | pH раствора | 7,0–7,2 | pH раствора | pH-метр | Каждая серия |
| ТП 5. Приготовление концентрированного раствора кеторолака трометамина (500 мг/мл) | | | | | | |

Продолжение Таблицы 4.9

| Стадия | Операция | Критический параметр (CPP) | Допустимый диапазон | Контрольная точка (IPC) | Метод контроля | Частота |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ТП 5.1 | Растворение кеторолака трометамина в воде | Температура растворения | 30–35°C | Термометр | Термометр контактный | Каждая серия |
| | | Время растворения | 30 мин (УЗ-баня) | Полнота растворения | Визуально | Каждая серия |
| | | Стабильность раствора | Отсутствие осадка | Визуально | Визуальный контроль | Каждая серия |
| ТП 5.2 | Фильтрация раствора | Размер пор | 0,22 мкм | Целостность фильтра | Тест точки пузырька | Каждая серия |
| | | Давление | <3 бар | Манометр | Манометр | Непрерывно |
| ТП 6. Изготовление препарата | | | | | | |
| ТП 6.1 | Смешивание компонентов при 2–8°C с контролем pH | Температура смешивания | 2–8°C | Термометр | Термометр | Непрерывно |
| | | pH | 7,2–7,4 | pH раствора | pH-метр | Каждая серия |
| | | Время перемешивания | 30 мин | Визуальная гомогенность | Визуально | Каждая серия |
| ТП 6.2 | Стабилизация системы в течение 24 ч при 2–8°C | Температура стабилизации | 2–8°C | Термометр | Термометр | Непрерывно |
| | | Время стабилизации | 24 ч | Стабильность геля | Визуально | Каждая серия |
| ТП 7. Розлив препарата в шприцы 2 мл в асептических условиях | | | | | | |
| ТП 7.1 | Розлив | Объем заполнения | 2,0 ± 0,1 мл | Масса шприца | Весы | Каждый шприц (выборочно) |
| | | Асептические условия | Класс A / ISO 5 | Мониторинг среды | Твердотельные частицы, микробиологический мониторинг | Непрерывно |
| ТП 8. Финишная гамма-стерилизация | | | | | | |
| ТП 8.1 | Гамма-облучение | Поглощенная доза | 15 ± 1 кГр | Дозиметр | Дозиметр | Каждая серия |
| | | Источник | $^{60}$Co | Сертификат источника | Паспорт установки | Периодически |
| УМО 9. Упаковка, маркировка, отпуск готовых продуктов | | | | | | |

Продолжение Таблицы 4.9

| Стадия | Операция | Критический параметр (CPP) | Допустимый диапазон | Контрольная точка (IPC) | Метод контроля | Частота |
|---|---|---|---|---|---|---|
| УМО 9.1 | Вторичная упаковка | Качество упаковки | Соответствие требованиям | Визуально | Визуальный контроль | Выборочно |
| УМО 9.2 | Маркировка | Соответствие макету | Полнота и читаемость | Визуально | Визуальный контроль | Каждая упаковка |
| Контроль готовой продукции | | | | | | |
| Анализ готового геля | | pH | 6,5–7,5 | pH-метр | pH-метр | Каждая серия |
| | | Вязкость (25°C, 50 $с^{-1}$) | 100–400 мПа·с (ПЛГА-ПЭГ) | Ротационный вискозиметр | Lamy RM 200 | Каждая серия |
| | | Температура гелеобразования | 35–39°C | Реологический метод | Lamy RM 200 | Каждая серия |
| | | Содержание кеторолака | 90–110% от номинала (27,0–33,0 мг/мл) | ВЭЖХ | Agilent 1260 Infinity II | Каждая серия |
| | | Родственные примеси | Индивидуальная ≤2%, сумма ≤3% | ВЭЖХ | Agilent 1260 Infinity II | Каждая серия |
| | | Стерильность | Стерильно | Микробиологический анализ | ГФ РФ XV | Каждая серия |
| | | Бактериальные эндотоксины | <5 ЕЭ/мл | ЛАЛ-тест | ЛАЛ-тест | Каждая серия |

Таблица 4.10 – Критические параметры процесса и контрольные точки производства инъекционного геля кеторолака трометамина на основе системы хитозан/ β-ГФ

| Стадия | Операция | Критический параметр (CPP) | Допустимый диапазон | Контрольная точка (IPC) | Метод контроля | Частота |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ВР 1. Санитарная подготовка производства | | | | | | |
| ВР 1.1 | Подготовка помещений | Класс чистоты | Класс C (ISO 7) | Сертификация помещений | Твердые частицы, микробиологический мониторинг | Периодически |
| ВР 1.2 | Подготовка оборудования | Стерильность оборудования | Стерильно | Отсутствие контаминации | Визуальный контроль, микробиологический мониторинг | Перед каждой серией |

Продолжение Таблицы 4.10

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ВР 1.3 | Подготовка персонала | Гигиена, одежда | Соответствие GMP | Внешний вид, анализы на контаминацию | Визуальный контроль, микробиологический мониторинг | Перед каждой сменой |
| ВР 2. Подготовка действующих и вспомогательных средств | | | | | | |
| ВР 2.1 | Отвешивание хитозана | Масса навески | 0,8 ± 0,01 г (на 20 мл, 4% раствор) | Точность взвешивания | Весы аналитические (поверка) | Каждая серия |
| ВР 2.2 | Отмеривание 0,1 М HCl | Концентрация кислоты | 0,1 ± 0,005 М | Титр HCl | Титрование | Каждая серия |
| ВР 2.3 | Отвешивание β-глицерофосфата натрия | Масса навески | 1,6 ± 0,02 г (на 20 мл, 8% раствор) | Точность взвешивания | Весы аналитические | Каждая серия |
| ВР 2.4 | Отвешивание кеторолака трометамина | Масса навески | 0,20 ± 0,005 г (на 20 мл, 10 мг/мл) | Точность взвешивания | Весы аналитические | Каждая серия |
| ВР 2.5 | Отмеривание воды для инъекций | Температура воды | 4–8°C | Термометр | Термометр контактный | Каждая серия |
| ВР 3. Подготовка упаковки | | | | | | |
| ВР 3.1 | Стерилизация шприцов | Стерильность | Стерильно | Стерильность упаковки | Микробиологический контроль | Каждая партия |
| ВР 3.2 | Подготовка вторичной упаковки и этикеток | Качество этикеток | Соответствие макету | Визуально | Визуальный контроль | Каждая партия |
| ТП 4. Приготовление 4% раствора хитозана | | | | | | |
| ТП 4.1 | Растворение ПЛГА-ПЭГ в воде с добавлением 0,5 М Трис при 2–8°C | Температура растворения | 2–8°C | Термометр | Термометр контактный | Непрерывно |
| | | Время гидратации | 12–16 ч | — | Таймер | Каждая серия |
| | | pH раствора | 7,0–7,2 | pH раствора | pH-метр | Каждая серия |
| ТП 4.2 | Фильтрация раствора хитозана | Размер пор | 0,45 мкм | Целостность фильтра | Тест точки пузырька | Каждая серия |
| ТП 5. Приготовление концентрированных растворов | | | | | | |
| ТП 5.1 | Приготовление β-ГФ (25–30%) | Температура растворения | 40–50°C | Термометр | Термометр | Каждая серия |

Продолжение Таблицы 4.10

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ТП 5.1 | Приготовление β-ГФ (25–30%) | Концентрация | 25–30% (мас./об.) | Точность приготовления | Весы, мерная посуда | Каждая серия |
| | | Стабильность | Отсутствие осадка после охлаждения | Визуально | Визуальный контроль | Каждая серия |
| ТП 5.2 | Приготовление концентрированного раствора кеторолака (500 мг/мл) | Температура растворения | 30–35°C | Термометр | Термометр | Каждая серия |
| | | Время растворения | 30 мин (УЗ-баня) | Полнота растворения | Визуально | Каждая серия |
| | | Стабильность | Отсутствие осадка после охлаждения | Визуально | Визуальный контроль | Каждая серия |
| ТП 5.3 | Фильтрация растворов | Размер пор | 0,22 мкм | Целостность фильтра | Тест точки пузырька | Каждая серия |
| ТП 6. Изготовление препарата | | | | | | |
| ТП 6.1 | Охлаждение всех растворов до 4°C | Температура | 2–8°C | Термометр | Термометр | Каждая серия |
| | | Время охлаждения | До достижения 4°C | — | Термометр | Каждая серия |
| ТП 6.2 | Смешивание хитозана с β-ГФ (добавление β-ГФ к хитозану) | Температура смешивания | 2–8°C (ледяная баня) | Термометр | Термометр | Непрерывно |
| | | Скорость добавления | По каплям, медленно | Визуально | Визуальный контроль | Каждая серия |
| | | pH после добавления β-ГФ | 6,8–6,9 | pH раствора | pH-метр | Непрерывно |
| ТП 6.3 | Добавление концентрированного раствора кеторолака | Температура | 2–8°C | Термометр | Термометр | Непрерывно |
| | | Скорость добавления | По каплям, медленно | Визуально | Визуальный контроль | Каждая серия |
| | | pH после добавления кеторолака | 7,0–7,2 | pH раствора | pH-метр | Непрерывно |
| ТП 6.4 | Коррекция pH | pH | 7,0–7,2 | pH раствора | pH-метр | Каждая серия |

Продолжение Таблицы 4.10

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ТП 6.5 | Доведение объема до 20 мл, перемешивание | Время перемешивания | 5–10 мин | Визуальная гомогенность | Визуально | Каждая серия |
| ТП 6.6 | Стабилизация системы при 2–8°C | Температура стабилизации | 2–8°C | Термометр | Термометр | Непрерывно |
| | | Время стабилизации | 24 ч | — | Таймер | Каждая серия |
| | | Внешний вид после стабилизации | Прозрачный, слегка опалесцирующий | Визуально | Визуальный контроль | Каждая серия |
| ТП 7. Розлив препарата в шприцы 2 мл в асептических условиях | | | | | | |
| ТП 7.1 | Розлив | Объем заполнения | 2,0 ± 0,1 мл | Масса шприца | Весы | Каждый шприц (выборочно) |
| | | Асептические условия | Класс A / ISO 5 | Мониторинг среды | Твердотельные частицы, микробиологический мониторинг | Непрерывно |
| ТП 7.2 | Проверка герметичности шприцов | Герметичность | Отсутствие подтеканий | Визуально | Визуальный контроль | Каждый шприц (выборочно) |
| ТП 8. Стерилизация | | | | | | |
| ТП 8 | Гамма-стерилизация (после фасовки, для обоих типов) | Поглощенная доза | 15 ± 1 кГр | Дозиметр | Дозиметр | Каждая серия |
| | | Источник | $^{60}$Co | Сертификат источника | Паспорт установки | Периодически |
| УМО 9. Упаковка, маркировка, отпуск готовых продуктов | | | | | | |
| УМО 9.1 | Вторичная упаковка | Качество упаковки | Соответствие требованиям | Визуально | Визуальный контроль | Выборочно |
| УМО 9.2 | Маркировка | Соответствие макету | Полнота и читаемость | Визуально | Визуальный контроль | Каждая упаковка |
| Контроль готовой продукции | | | | | | |
| Анализ готового геля | | Внешний вид | Прозрачный, слегка опалесцирующий | Визуально | Визуальный контроль | Каждая серия |
| | | pH | 6,5–7,5 | pH-метр | pH-метр | Каждая серия |

Продолжение Таблицы 4.10

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Анализ готового геля | Вязкость (25°C, 50 $с^{-1}$) | 200–500 мПа·с | Ротационный вискозиметр | Lamy RM 200 | Каждая серия |
| | Температура гелеобразования | 35–39°C | Реологический метод | Lamy RM 200 | Каждая серия |
| | Время гелеобразования при 37°C | 10–15 мин | Метод переворачивания пробирки | Визуально | Каждая серия |
| | Сила экструзии (игла 22G) | ≤ 50 Н | Текстуроанализатор | Текстуроанализатор | Каждая серия |
| | Содержание кеторолака | 90–110% от номинала (9,0–11,0 мг/мл) | ВЭЖХ | Agilent 1260 Infinity II | Каждая серия |
| | Родственные примеси | Индивидуальная ≤2%, сумма ≤3% | ВЭЖХ | Agilent 1260 Infinity II | Каждая серия |
| | Стерильность | Стерильно | Микробиологический анализ | ГФ РФ XV | Каждая серия |
| | Бактериальные эндотоксины | <5 ЕЭ/мл | ЛАЛ-тест | ЛАЛ-тест | Каждая серия |

## 4.11. Выводы к главе 4

1. Сформулирован целевой профиль качества продукта (QTPP) для двух лекарственных форм в соответствии с концепцией QbD и руководствами ICH Q8(R2), ICH Q9 и ICH Q10. Проведена оценка рисков, идентифицированы критические атрибуты качества и критические параметры процесса.

2. Оптимизирована загрузка лекарственного вещества. Для хитозанового геля оптимальной признана концентрация 10 мг/мл кеторолака. Для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА геля оптимальной признана концентрация 30 мг/мл кеторолака трометамина, обеспечивающая терапевтическую дозу 60 мг в 2 мл при приемлемой силе экструзии  и содержании примесей.

3. Определены физико-химические и технологические свойства оптимальных составов.

4. Разработаны технологические схемы получения гелей для обоих типов лекарственных форм с детализацией стадий.

5. Определены критические параметры процесса (CPP) и контрольные точки (IPC) для каждой стадии технологического процесса. Для каждого параметра определены допустимые диапазоны, методы контроля и частота проверки.

6. Разработанные составы и технология обеспечивают получение гелей с воспроизводимыми свойствами. Обе серии синтезированного полимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА Р4 и Р6 признаны пригодными для фармацевтической разработки на основе идентичности их физико-химических, реологических и термочувствительных свойств. Технологические схемы и критические параметры процесса обеспечивают масштабируемость и воспроизводимость производства при переходе на опытно-промышленный уровень. Разработанные составы могут быть рекомендованы для дальнейших доклинических исследований.

# ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК И ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ *IN VITRO*

Для количественного определения кеторолака трометамина в средах высвобождения и в составе гелей разработана методика высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием. Валидацию методики проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XV издания (ОФС.1.1.0012), Решения Коллегии ЕАЭС от 17 июля 2018 г. № 113, Решения Коллегии ЕАЭС от 25 июля 2024 г. № 75 (ОФС.2.3.14.0). Изучение кинетики высвобождения *in vitro* проводили методом диализа в биорелевантных средах, имитирующих синовиальную жидкость здорового и воспаленного суставов.

## 5.1. Разработка и валидация методики количественного определения кеторолака в средах высвобождения

Для количественного определения кеторолака трометамина в средах высвобождения разработана методика высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием. Валидацию методики проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XV издания (ОФС.1.1.0012), Решения Коллегии ЕАЭС от 17 июля 2018 г. № 113, Решения Коллегии ЕАЭС от 25 июля 2024 г. № 75 (ОФС.2.3.14.0) и Решения ЕАЭС от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Оценивали следующие характеристики: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная прецизионность), предел количественного определения (ПКО), предел обнаружения (ПО), стабильность растворов и робастность методики.

Валидацию проводили для трех сред высвобождения и растворителя, используемого в количественном определении КТ в испытуемых гелях: контрольная среда - ФСБР pH 7,4, модель здорового сустава - ФСБР с гиалуроновой кислотой в концентрации 2,5 мг/мл, модель воспаленного сустава - ФСБР pH 6,8 с гиалуроновой кислотой в концентрации 0,75 мг/мл (модель воспаленного сустава) и подвижной фазы состоящей из ацетатного буфера pH 4,5: ацетонитрила = 70:30 (объемное соотношение). Для каждой среды готовили отдельные калибровочные и модельные растворы для минимизации матричного эффекта.

### 5.1.1. Хроматографические условия

Хроматографическое разделение осуществляли на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity II с диодно-матричным детектором. Оптимизация условий хроматографирования проводилась с целью достижения максимальной эффективности разделения и воспроизводимости результатов. Финальные условия анализа:

Условия хроматографирования

| | |
|---|---|
| Колонка | 150 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм (Utilsil XB-C18 или аналогичного качества); |
| Подвижная фаза | ацетатный буфер pH 4,5 – ацетонитрил в объемном соотношении 70:30; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Температура колонки | 40°C; |
| Детекция | спектрофотометрический, 320 нм; |
| Объем ввода | 10 мкл; |
| Время хроматографирования | 10 мин; |
| Режим хроматографирования | Изократический. |

Приготовление 0,5 М аммония ацетата буферного раствора с pH 4,5. Смешивали 14,3 мл ледяной уксусной кислоты и 470 мл воды, по каплям добавляли концентрированный раствор аммиака до достижения pH 4,5 ± 0,05, доводили объем водой до 500 мл. Готовый буферный раствор фильтровали через мембранный PTFE фильтр 0,45 мкм.

Приготовление подвижной фазы. Смешивали 0,5М аммония ацетата буферный раствора с pH 4,5 с ацетонитрилом в объемном соотношении 70:30. Полученный раствор перемешивали и дегазировали на ультразвуковой ванне.

Время удерживания кеторолака составило около 4,2 мин. Типичные хроматограммы представлены на Рисунках 5.1–5.2.

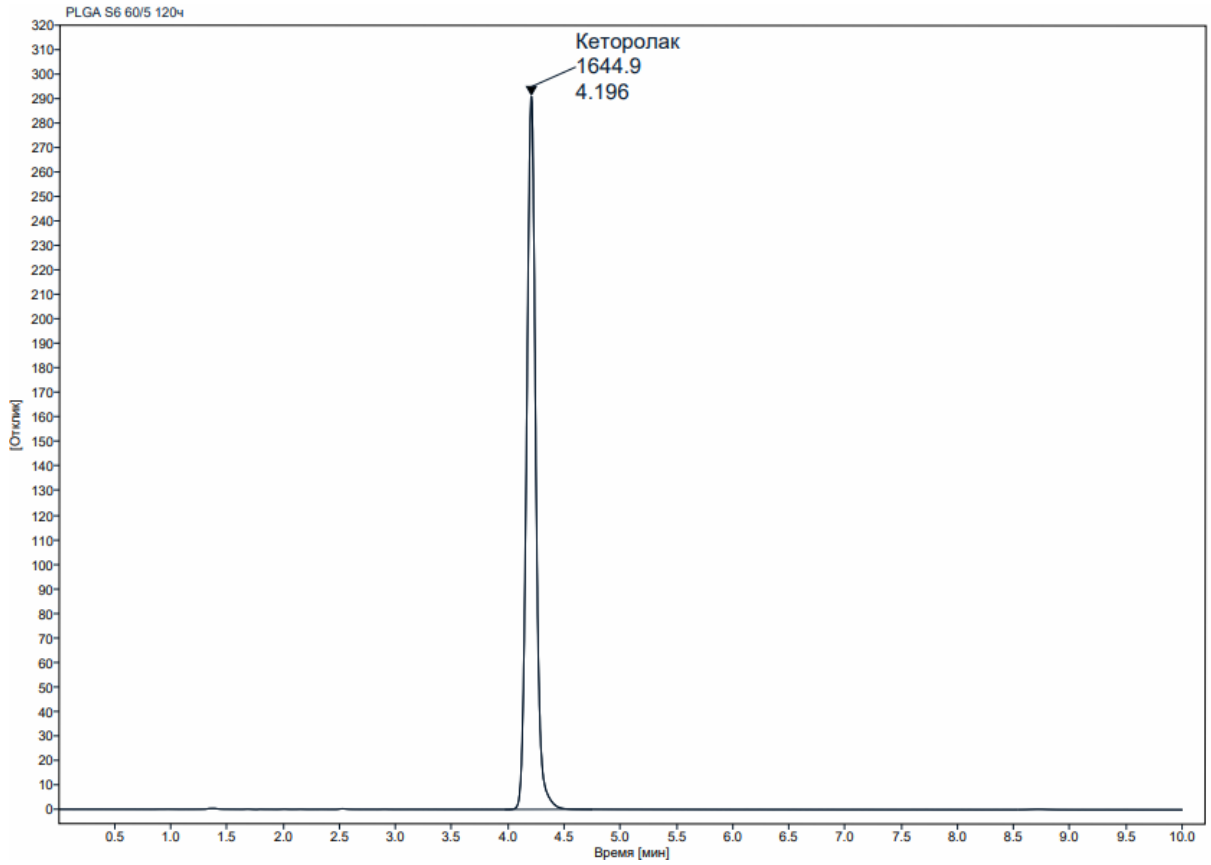


Рисунок 5.1 – Типичная хроматограмма испытуемого раствора инъекционного геля кеторолака трометамина на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

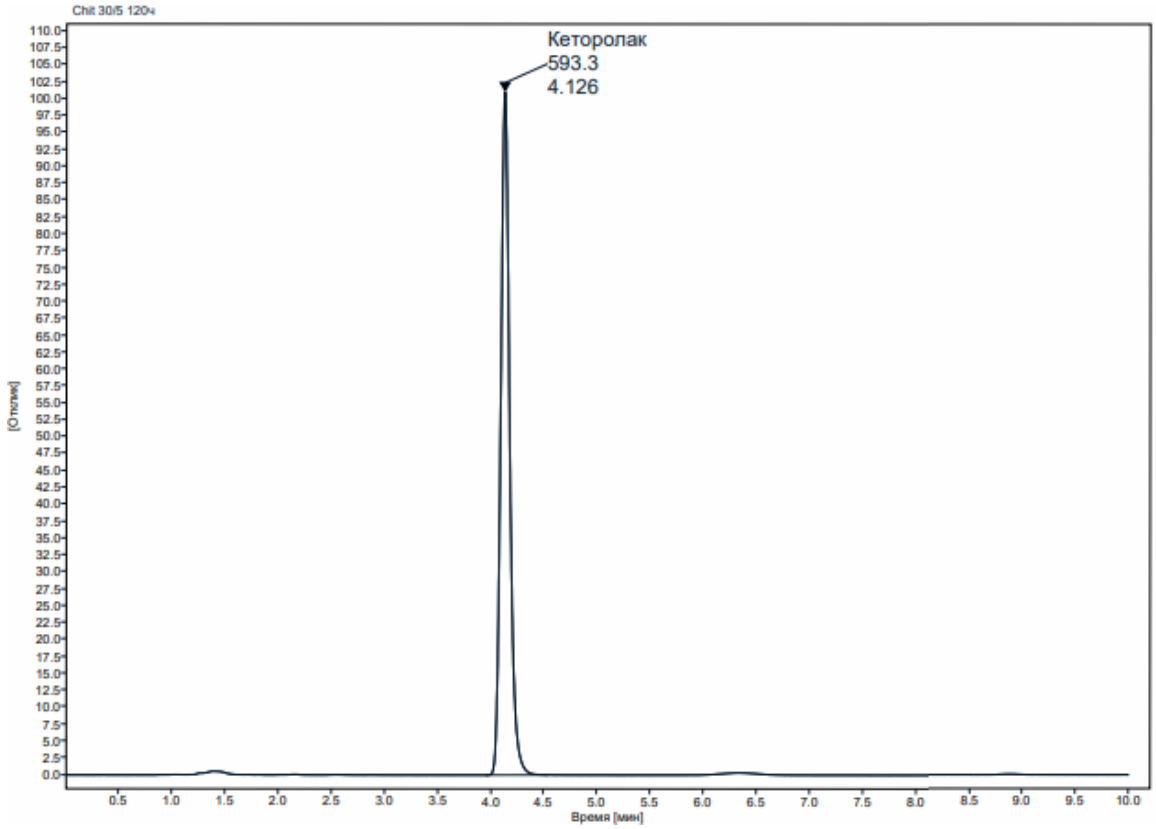


Рисунок 5.2 – Типичная хроматограмма испытуемого раствора инъекционного геля кеторолака трометамина на основе хитозан/бета-глицерофосфат

### 5.1.2. Валидационные характеристики

#### 5.1.2.1. Приготовление растворов для валидации

Стандартный раствор кеторолака трометамина 1000 мкг/мл (Раствор А). Точную навеску кеторолака трометамина 25,0 мг помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в подвижной фазе и доводили до метки тем же растворителем. Раствор хранили при 4°С в защищенном от света месте не более 7 суток.

Стандартный раствор кеторолака трометамина 100 мкг/мл (Раствор Б). Аликвоту раствора А объемом 2,5 мл переносили в мерную колбу объемом 25,0 мл и доводили до метки соответствующим испытанию разбавителем.

Растворы плацебо. Для оценки специфичности готовили растворы плацебо, соответствующие каждой матрице: подвижная фаза, фосфатный буферный раствор pH 7,4 (среда контроля качества), фосфатный буферный раствор с гиалуроновой кислотой 2,5 мг/мл (модель здорового сустава), фосфатный буферный раствор pH 6,8 с гиалуроновой кислотой 0,75 мг/мл (модель воспаленного сустава), а также растворы полимеров (хитозан/β-ГФ, ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА) в концентрациях, соответствующих содержанию полимеров в лекарственных средствах, без добавления АФС.

Калибровочные растворы для линейности. Готовили серийным разведением растворов А и Б в мерных колбах объемом 10,0 мл. Объемы аликвот и конечные концентрации представлены в Таблице 5.1. Для минимизации матричного эффекта калибровочные растворы готовили на матрице соответствующей среды высвобождения.

Таблица 5.1 – Приготовление калибровочных растворов для проверки линейности

| Уровень | Концентрация, мкг/мл | Исходный раствор | Объем аликвоты, мл | Объем мерной колбы, мл |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | Раствор Б | 0,1 | 10 |
| 2 | 2,5 | Раствор Б | 0,25 | 10 |
| 3 | 5,0 | Раствор Б | 0,50 | 10 |
| 4 | 7,5 | Раствор Б | 0,75 | 10 |
| 5 | 10 | Раствор А | 0,10 | 10 |
| 6 | 25 | Раствор А | 0,25 | 10 |
| 7 | 50 | Раствор А | 0,50 | 10 |
| 8 | 75 | Раствор А | 0,75 | 10 |
| 9 | 100 | Раствор А | 1,00 | 10 |
| 10 | 150 | Раствор А | 1,50 | 10 |
| 11 | 200 | Раствор А | 2,00 | 10 |
| 12 | 250 | Раствор А | 2,50 | 10 |
| 13 | 300 | Раствор А | 3,00 | 10 |

Растворы для оценки правильности (открываемости). Готовили путем добавления известного количества стандартного раствора кеторолака трометамина к матрице плацебо (соответствующей среде высвобождения) с получением трех уровней концентраций: 80 %, 100 % и 120 % от номинальной рабочей концентрации. Для каждого уровня готовили по три независимых образца. Для количественного определения в гелях использовали метод «введено-найдено»: к навеске плацебо-геля (без АФС) добавляли известное количество стандартного раствора кеторолака и проводили пробоподготовку, соответствующую методике пробоподготовки испытуемых образцов.

### 5.1.2.2. Методика проведения валидационных испытаний

Специфичность. Для подтверждения специфичности хроматографировали раствор плацебо (соответствующая среда высвобождения без АФС), раствор плацебо с добавлением полимеров, стандартный раствор кеторолака (100 мкг/мл) и модельную смесь, содержащую кеторолак и все компоненты плацебо. Критерием специфичности служило отсутствие пиков на хроматограммах плацебо в области времени удерживания кеторолака (около 4,2 мин). Чистоту пика кеторолака оценивали с помощью диодно-матричного детектора по спектру КТ на хроматограмме стандартного раствора (чистота пика >99,9%).

Эффективность хроматографической системы. Для оценки пригодности системы определяли число теоретических тарелок (N) и фактор асимметрии (As) для пика кеторолака на хроматограммах стандартных растворов (100 мкг/мл) во всех исследованных средах. Данные усреднены по 6 инжекциям для каждого типа среды (таблица 5.2). Все значения удовлетворяют критериям приемлемости (N ≥ 2000, As от 0,8 до 1,5), что подтверждает пригодность хроматографической системы.

Таблица 5.2 – Параметры эффективности хроматографической системы (M ± SD, n=6)

| Среда | Число теоретических тарелок (N) | Фактор асимметрии (As) |
|---|---|---|
| ФСБР pH 7,4 (контроль) | 12 370 ± 45 | 1,21 ± 0,02 |
| ФСБР + ГК 2,5 мг/мл (здоровый сустав) | 12 980 ± 60 | 1,19 ± 0,03 |
| ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75 мг/мл (воспаленный сустав) | 13 460 ± 50 | 1,16 ± 0,02 |
| Количественное определение (КО) | 13 850 ± 70 | 1,16 ± 0,03 |

*Линейность*. Для каждого из 13 уровней концентраций (Таблица 5.1) выполняли по 3 инжекции в одинаковых хроматографических условиях.

Строили калибровочный график в координатах «концентрация (мкг/мл) — площадь пика». Линейность оценивали по следующим критериям:

• *Свободный член регрессии (a)*. В нормализованных координатах (концентрация нормирована на среднюю концентрацию, площадь пика нормирована на среднюю площадь) рассчитывали уравнение линейной регрессии $y = a + b \cdot x$. Свободный член $a$ должен быть статистически незначимо отличен от нуля:

$$| a | \leq \Delta_A = t_{(95\%,n-2)} \cdot S_a,$$

где $S_a$ — стандартное отклонение свободного члена, $t$ — коэффициент Стьюдента для одностороннего распределения при доверительной вероятности 95% и числа степеней свободы $f = n - 2$. В случае невыполнения этого условия используют критерий практической незначимости:

$| a | \leq 0{,}05 \cdot C_{min}$,

где $C_{min}$ — минимальная концентрация в диапазоне (1 мкг/мл).

• *Остаточное стандартное отклонение ($S_0$)*. Доверительный интервал разброса точек вокруг прямой не должен превышать предельно допустимую неопределенность методики для тестов растворения ($\Delta_As \leq 3\%$):

$$t \cdot S_0 / b \leq \Delta_{As},$$

где $b$ — угловой коэффициент регрессии (в нормализованных координатах $b \approx 1$).

• *Коэффициент корреляции (r)*. Для концентраций, исследованных при изучении линейности (20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 120% от номинала), рассчитывали относительное стандартное отклонение концентраций $RSD_y$ и проверяли выполнение неравенства $r \geq \sqrt{1 - (t \cdot S_0)^2 / (RSD_y^2 \cdot (n-1))}$. Критерием приемлемости является $r \geq 0{,}999$.

*Правильность (открываемость)*. Оценивали на модельных растворах трех уровней концентраций (80, 100 и 120 % от номинальной рабочей концентрации 10 мкг/мл для сред высвобождения и 100 мкг/мл для КО) в трех повторностях для каждого дня. Для всех шести уровней калибровочного диапазона (1, 3, 30, 80, 120 и 300 мкг/мл) дополнительно подтверждена правильность путем сравнения найденных концентраций с введенными. Для каждого уровня рассчитывали среднюю открываемость $Z_i = (C_{\text{найденная}} / C_{\text{введенная}}) \times 100\%$. Правильность подтверждали, если выполнялись следующие условия:

• средняя открываемость для каждого уровня находится в пределах 98–102% (для уровня 1 мкг/мл — 80–120%);

• систематическая погрешность $\delta = |\bar{Z} - 100|$ статистически незначима: $\delta \leq \Delta_Z$, где $\Delta_Z = t_{(95\%,n-1)} \cdot S_Z/\sqrt{n}$ ($S_Z$ — стандартное отклонение значений Z); если это условие не выполняется, используют критерий практической незначимости: $\delta \leq 0{,}05 \cdot \Delta_{As}$ (для тестов растворения Δ_As ≤ 3%).

*Прецизионность.* Оценивали на шести уровнях концентраций (1, 3, 30, 80, 120 и 300 мкг/мл) в двух днях (по 3 инжекции на уровень в каждом дне). Рассчитывали усредненное по двум дням значение RSD для каждого уровня. Критерий: RSD ≤ 2%.

• Дополнительно оценивали односторонний доверительный интервал для Z: $\Delta_Z \leq 3\%$ (максимально допустимая неопределенность для методик растворения).

Предел количественного определения (ПКО) и предел обнаружения (ПО). Определяли двумя методами:

1. По соотношению сигнал/шум (S/N): хроматографировали серию разведенных растворов кеторолака и рассчитывали S/N для пика аналита. ПКО определяли как концентрацию, при которой S/N ≥ 10; ПО — при S/N ≥ 3.

2. По параметрам калибровочной кривой: ПКО и ПО рассчитывали по формулам ПКО = 10 × ($SD_0$ / b), ПО = 3,3 × ($SD_0$ / b), где $SD_0$ — остаточное стандартное отклонение (стандартное отклонение остатков регрессии), b — угловой коэффициент калибровочного графика.

*Стабильность растворов.* Стабильность оценивали на стандартных растворах (10 мкг/мл и 100 мкг/мл), модельных растворах (80%, 100%, 120%) и пробах реальных образцов (фильтраты гелей). Растворы хранили при 4°C в защищенных от света флаконах в течение 24 ч. Анализ проводили непосредственно после приготовления (0 ч) и через 1, 2, 4, 8 и 24 ч хранения. Критерий стабильности: изменение площади пика относительно исходного значения не более ±2%. Дополнительно визуально контролировали отсутствие осадка и изменение цвета растворов.

*Робастность (устойчивость) методики.* Робастность оценивали путем последовательного изменения одного из факторов (длина волны детектирования, скорость потока подвижной фазы, соотношение компонентов подвижной фазы, температура колонки) и оценивали влияние на площадь пика и другие хроматографические параметры (эффективность, фактор асимметрии). Методика считается робастной, если изменение площади пика не превышает ±2% по сравнению с нормальными условиями, а параметры системы остаются в пределах критериев приемлемости.

### 5.1.2.3. Специфичность

Специфичность методики подтверждена отсутствием пиков на хроматограммах плацебо (среды высвобождения без АФС, растворы полимеров) в области времени удерживания

кеторолака. Чистота пика кеторолака (по данным диодно-матричного детектора) составила >99,9%. Отсутствие мешающих пиков подтверждает селективность методики во всех трех средах высвобождения. Хроматограммы плацебо растворов гелей и испытуемых растворов представлены на рисунках 5.3 – 5.6.

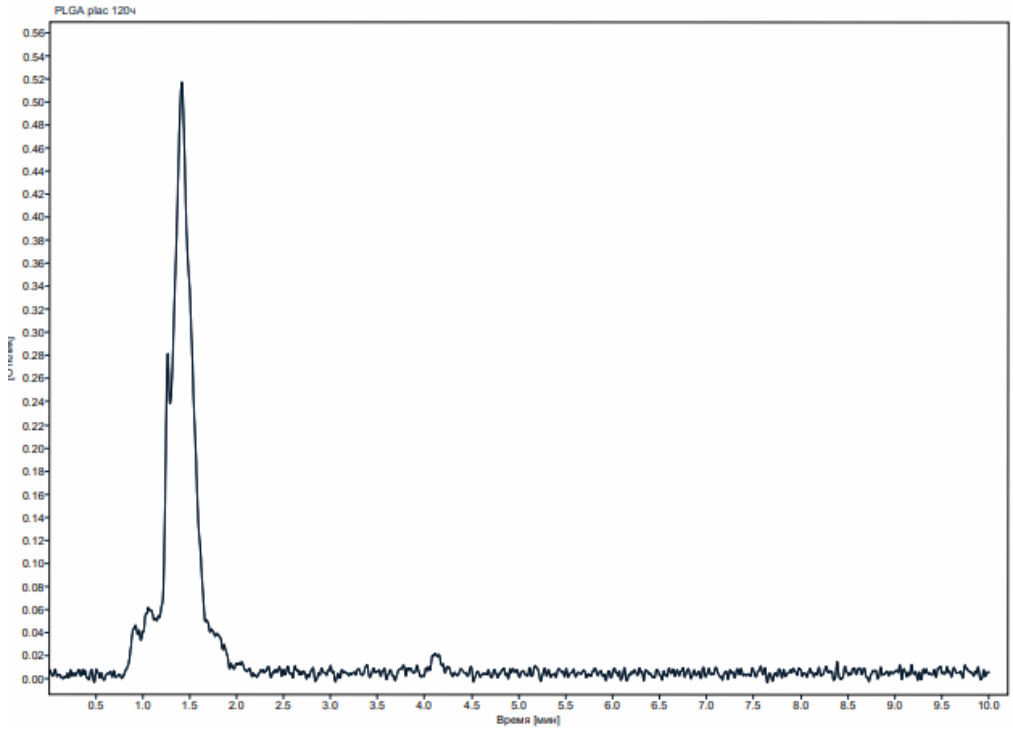


Рисунок 5.3 – Типичная хроматограмма раствора плацебо геля на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

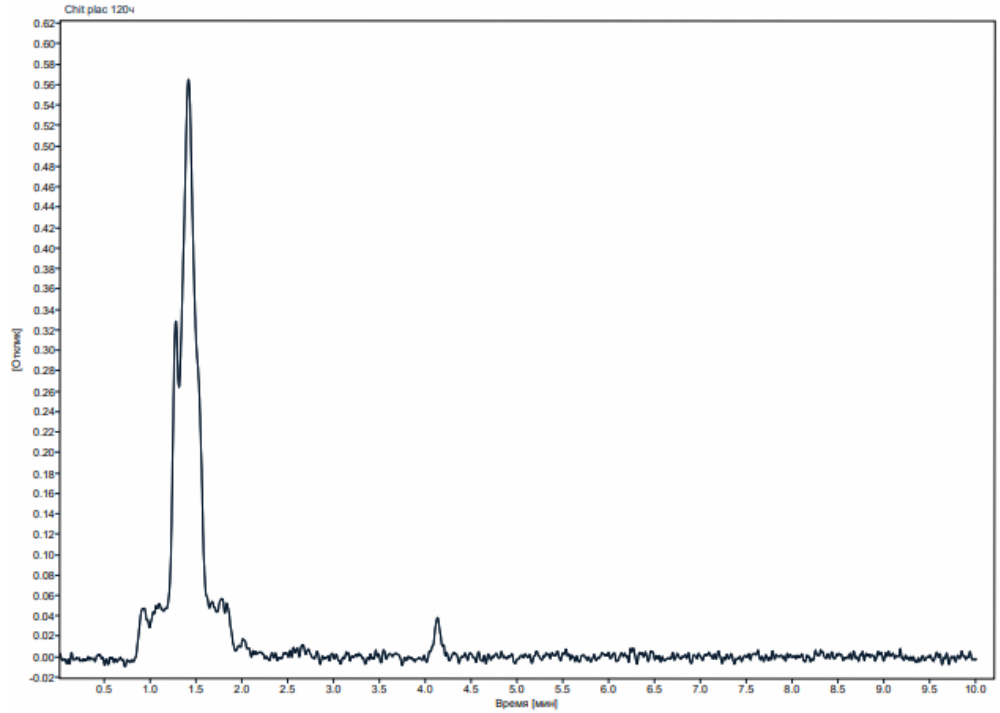


Рисунок 5.4 – Типичная хроматограмма раствора плацебо геля на основе системы хитозан/бета-глицерофосфат

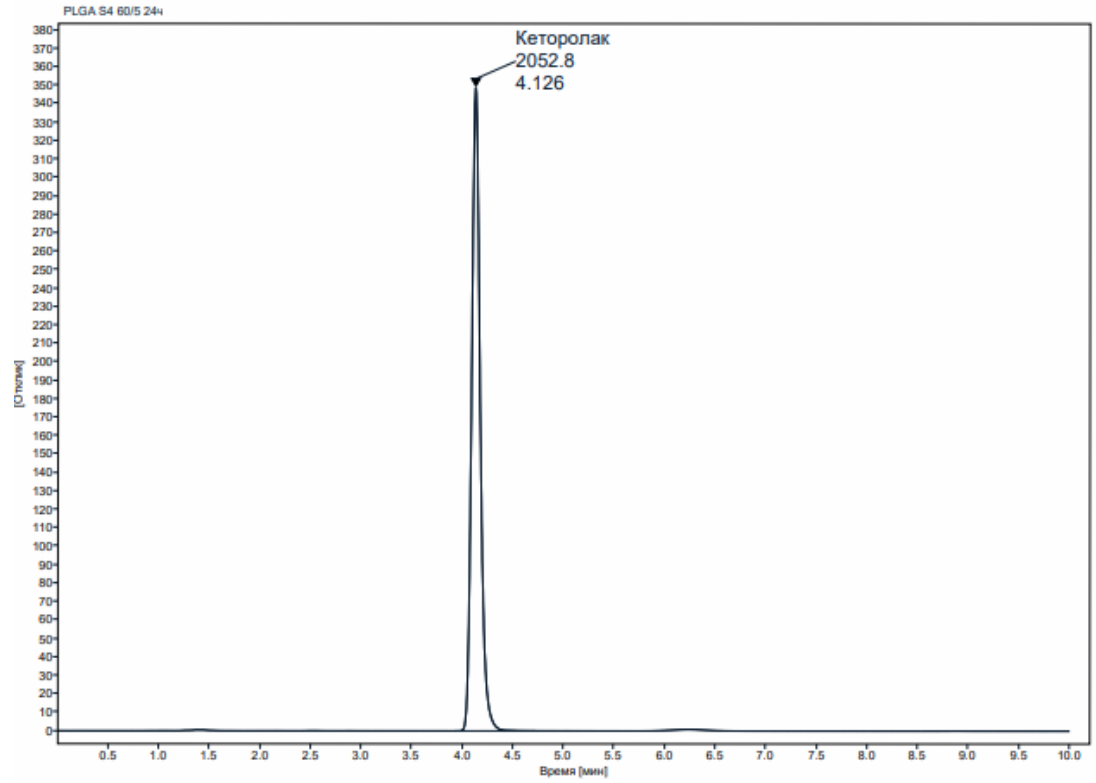


Рисунок 5.5 – Типичная хроматограмма испытуемого раствора геля на основе системы ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА

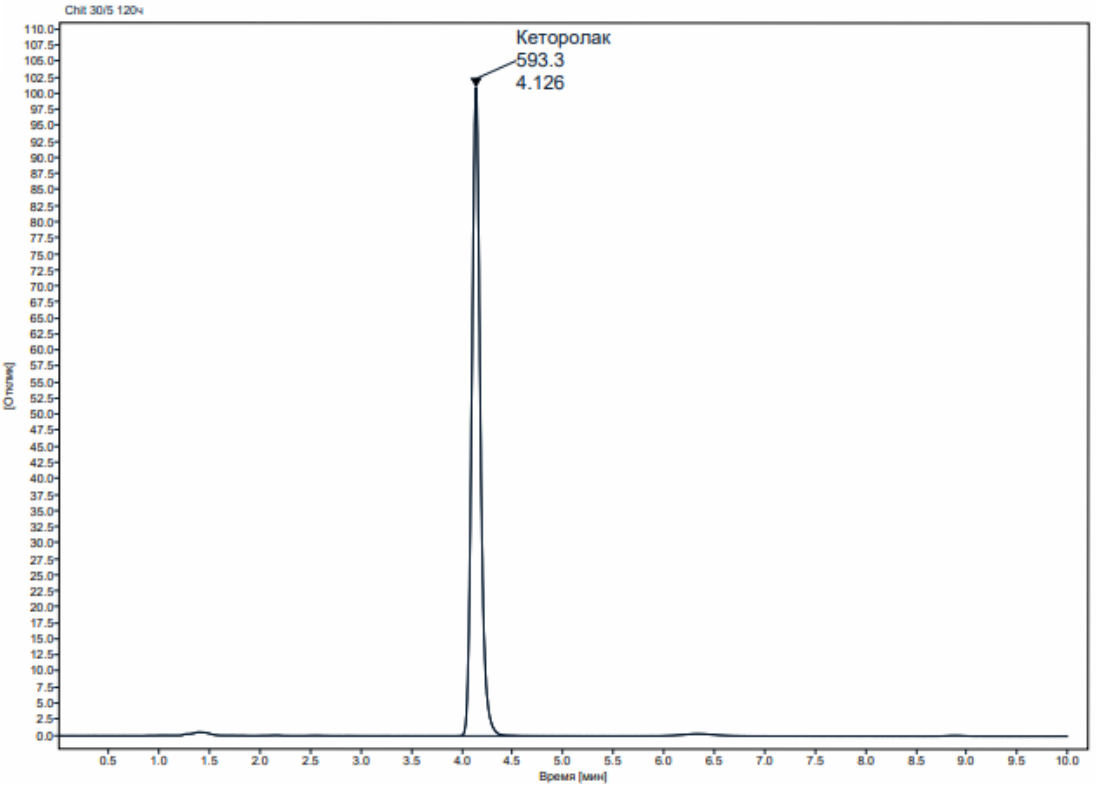


Рисунок 5.6 – Типичная хроматограмма испытуемого раствора геля на основе системы хитозан/бета-глицерофосфат

### 5.1.2.4. Линейность

Линейность оценивали в диапазоне концентраций 1–300 мкг/мл для каждой из трех сред высвобождения, а также для методики количественного определения в гелях (КО). Калибровочные графики строили в двух независимых днях двумя аналитиками (по 3 инжекции на уровень). В таблице 5.3 приведены уравнения регрессии для каждого дня.

Анализ линейности проводили в широком диапазоне для демонстрации применимости методики как для теста высвобождения, так и для количественного определения в гелях.

Для каждой среды строили калибровочный график в координатах «концентрация (мкг/мл) - площадь пика». Результаты представлены в Таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Результаты проверки линейности

| Среда | День 1 (аналитик 1) | День 2 (аналитик 2) |
|---|---|---|
| ФСБР pH 7,4 (контроль) | Y = 18,32955·X + 3,304352 ($R^2$ = 0,999972) | Y = 18,42441·X + 2,929697 ($R^2$ = 0,999969) |
| ФСБР + ГК 2,5 мг/мл | Y = 18,09770·X + 4,607945 ($R^2$ = 0,999926) | Y = 18,10006·X + 5,269318 ($R^2$ = 0,999917) |
| ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75 мг/мл | Y = 18,95804·X – 11,38392 ($R^2$ = 0,999941) | Y = 18,95058·X – 10,85118 ($R^2$ = 0,999948) |
| Количественное определение (КО) | Y = 18,75002·X + 2,455203 ($R^2$ = 0,999979) | Y = 18,75042·X + 2,558902 ($R^2$ = 0,999977) |

Оценку линейности проводили по следующим критериям:

• Свободный член регрессии (a). В нормализованных координатах рассчитывали доверительный интервал для свободного члена $\Delta_A = t_{(95\%,n-2)} \cdot S_a$. Для всех сред свободный член $a$ статистически незначимо отличался от нуля ($| a | \leq \Delta_A$), что подтверждает отсутствие систематической ошибки в начале калибровочного графика.

• Остаточное стандартное отклонение ($S_0$). Для всех сред соблюдалось неравенство $t \cdot S_0/b \leq \Delta_{As}$, где $\Delta_{As} = 3\%$ — предельно допустимая неопределенность для методик теста растворения. Рассчитанные значения $S_0/b$ составили: для ФСБР pH 7,4 — 0,66%; для ФСБР + ГК 2,5 мг/мл — 0,71%; для ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75 мг/мл — 0,54%.

• Коэффициент корреляции (r). Рассчитанные значения $r$ для всех сред составили ≥ 0,9997, что удовлетворяет критерию $r \geq 0{,}999$.

• Отклонение угловых коэффициентов между днями не превышает 1,5 %, свободных членов – менее 3 мАЕ·с. Во всех случаях $R^2 \geq 0{,}999$, что подтверждает линейность методики во всем исследованном диапазоне.

Таким образом, методика линейна в диапазоне концентраций от 1 до 300 мкг/мл для всех трех сред высвобождения. Графики линейности в абсолютных и нормализованных координатах представлены на Рисунках 5.7–5.10.

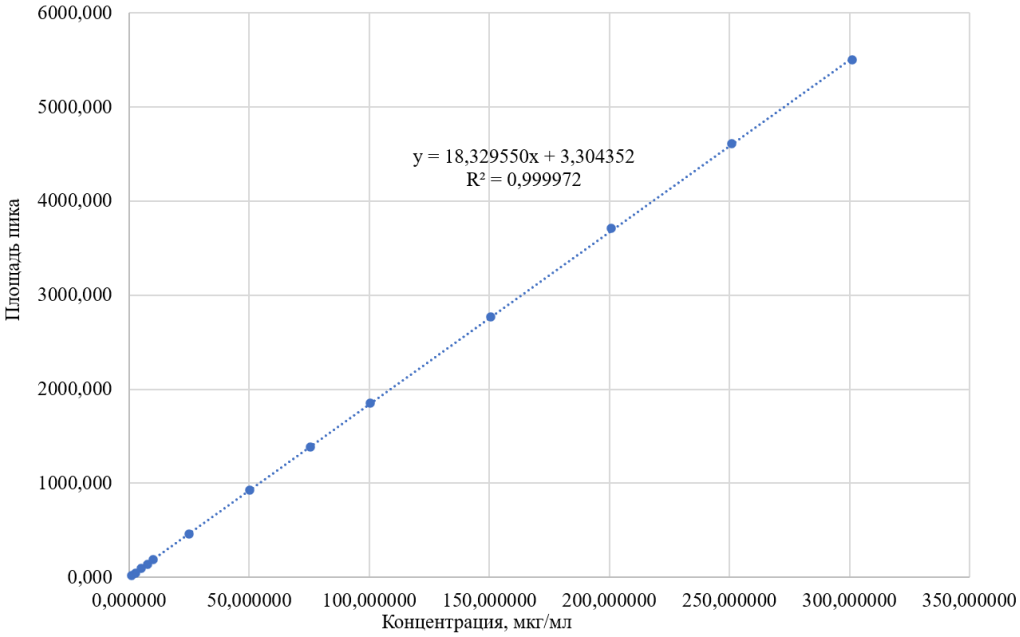


Рисунок 5.7 – Линейность методики в среде ФСБР pH 7,4 (контроль)

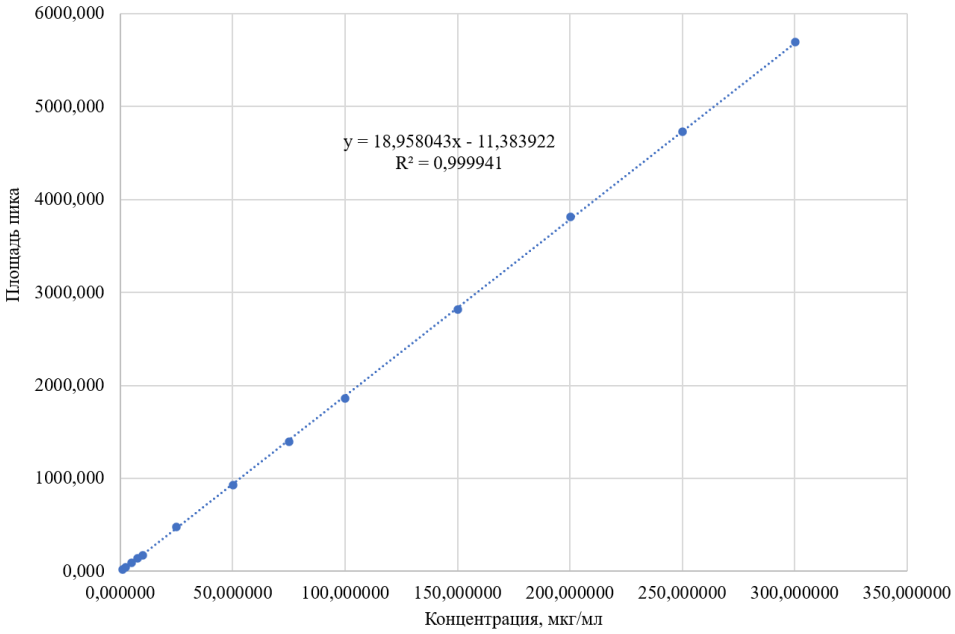


Рисунок 5.8 – Линейность методики в среде ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75 мг/мл (воспаленный сустав)

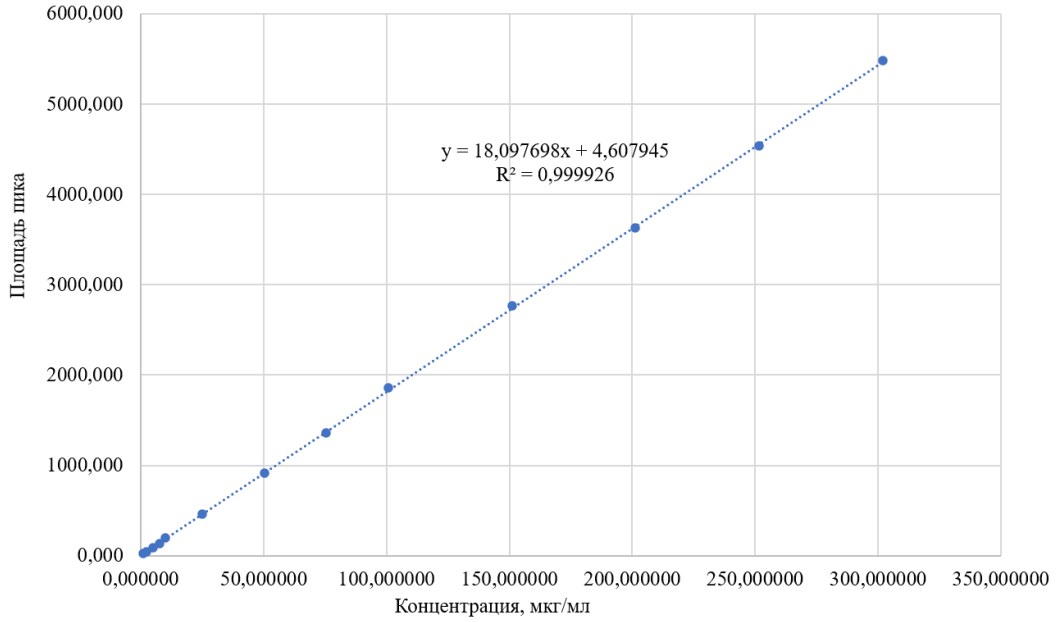


Рисунок 5.9 – Линейность методики в среде ФСБР + ГК 2,5 мг/мл (здоровый сустав)

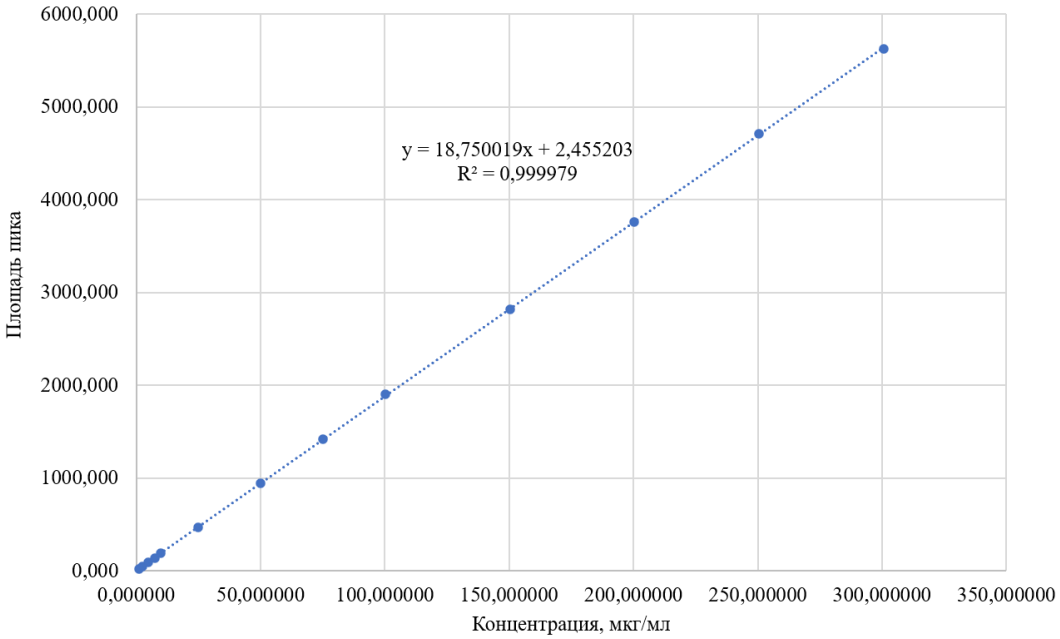


Рисунок 5.10 – Линейность методики количественного определения КТ в гелях

### 5.1.2.5. Правильность (открываемость)

Оценивали на модельных растворах трех уровней концентраций (80, 100 и 120 % от номинальной рабочей концентрации 10 мкг/мл для сред высвобождения и 100 мкг/мл для КО) в трех повторностях для каждого дня. Для всех шести уровней калибровочного диапазона (1, 3, 30, 80, 120 и 300 мкг/мл) дополнительно подтверждена правильность путем сравнения найденных

концентраций с введенными. В таблице 5.4 приведены усредненные по трем уровням (80, 100, 120 %) значения открываемости для каждого дня и каждой среды, а также диапазон значений по уровням.

Таблица 5.4 – Правильность методики (открываемость, %)

| Среда | День 1, Z ср., % (диапазон по уровням) | День 2, Z ср., % (диапазон по уровням) | RSD между днями, % |
|---|---|---|---|
| ФСБР pH 7,4 | 99,87 (99,2–100,3) | 99,55 (98,9–100,1) | 0,45 |
| ФСБР + ГК 2,5 мг/мл | 99,43 (98,8–100,0) | 99,12 (98,5–99,6) | 0,52 |
| ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75 мг/мл | 99,17 (98,5–99,8) | 98,95 (98,2–99,5) | 0,61 |
| КО | 99,80 (99,3–100,2) | 99,60 (99,1–99,9) | 0,38 |

Оценку правильности проводили по следующим критериям:

• Средняя открываемость. Для всех уровней и сред средняя открываемость находилась в пределах 98,5–100,3%, что соответствует критерию 98–102%.

• Систематическая погрешность (δ). Для всех сред $\delta = |\bar{Z} - 100|$ не превышала доверительный интервал $\Delta_Z$, что подтверждает статистическую незначимость систематической погрешности.

Таким образом, правильность методики подтверждена для всех трех сред высвобождения во всем исследованном диапазоне концентраций.

### 5.1.2.6. Прецизионность

В таблице 5.5 приведены значения RSD для каждого уровня исследуемой концентрации, усредненные по двум дням (повторяемость) и междневная прецизионность.

Таблица 5.5 – Прецизионность методики (RSD, %) для шести уровней концентраций

| Среда | Уровень, мкг/мл | Повторяемость (средняя за два дня) | Междневная (n=6) |
|---|---|---|---|
| ФСБР pH 7,4 | 1 | 0,14 | 0,48 |
| | 3 | 0,12 | 0,44 |
| | 30 | 0,11 | 0,42 |
| | 80 | 0,13 | 0,46 |
| | 120 | 0,15 | 0,50 |
| | 300 | 0,12 | 0,45 |
| ФСБР + ГК 2,5 мг/мл | 1 | 0,16 | 0,55 |
| | 3 | 0,14 | 0,51 |
| | 30 | 0,13 | 0,49 |
| | 80 | 0,15 | 0,53 |
| | 120 | 0,17 | 0,58 |
| | 300 | 0,14 | 0,52 |

Продолжение Таблицы 5.5

| | | | |
|---|---|---|---|
| ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75 мг/мл | 1 | 0,19 | 0,63 |
| | 3 | 0,17 | 0,60 |
| | 30 | 0,16 | 0,58 |
| | 80 | 0,18 | 0,62 |
| | 120 | 0,20 | 0,65 |
| | 300 | 0,18 | 0,61 |
| КО | 1 | 0,12 | 0,40 |
| | 3 | 0,10 | 0,36 |
| | 30 | 0,09 | 0,34 |
| | 80 | 0,11 | 0,38 |
| | 120 | 0,13 | 0,42 |
| | 300 | 0,10 | 0,37 |

Значения RSD не превышали 2% как для повторяемости, так и для внутрилабораторной прецизионности. Дополнительно оценивали односторонний доверительный интервал $\Delta_Z$ для всех сред: во всех случаях $\Delta_Z \leq 0{,}65\%$, что значительно ниже предельно допустимого значения $\Delta_{As} = 3\%$.

Таким образом, прецизионность методики подтверждена.

### 5.1.2.7. Предел количественного определения и предел обнаружения

ПКО и ПО определяли двумя методами: по соотношению сигнал/шум и по параметрам калибровочной кривой. Результаты представлены в Таблице 5.6.

Таблица 5.6 – Пределы обнаружения и количественного определения

| Среда | ПКО (по калибровке), мкг/мл | ПО (по калибровке), мкг/мл | ПКО (S/N), мкг/мл | ПО (S/N), мкг/мл |
|---|---|---|---|---|
| ФСБР pH 7,4 | 0,96 | 0,32 | 1,0 | 0,3 |
| ФСБР + ГК 2,5 мкг/мл | 1,02 | 0,34 | 1,0 | 0,3 |
| ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75 мг/мл | 0,94 | 0,31 | 1,0 | 0,3 |
| КО | 0,92 | 0,30 | 1,0 | 0,3 |

Таким образом, ПКО методики составляет 1 мкг/мл, ПО — 0,3 мкг/мл.

### 5.1.2.8. Стабильность растворов

Стабильность оценивали на стандартных растворах (10 мкг/мл и 100 мкг/мл) и модельных растворах (80, 100, 120 %) для каждой среды. Растворы хранили при 4 °C в защищенных от света флаконах в течение 24 ч. Анализ проводили непосредственно после приготовления (0 ч) и через 1, 2, 4, 8 и 24 ч хранения. Изменение площади пика относительно исходного значения не превышало ±0,6 % для всех исследованных растворов. Результаты представлены в таблице 5.7

Таблица 5.7 – Стабильность растворов

| Среда | Стандартный р-р 10 мкг/мл | Стандартный р-р 100 мкг/мл | Модельный р-р 80 % | Модельный р-р 100 % | Модельный р-р 120 % |
|---|---|---|---|---|---|
| ФСБР pH 7,4 | –0,42 | –0,35 | –0,48 | –0,29 | –0,33 |
| ФСБР + ГК 2,5 мг/мл | –0,38 | –0,41 | –0,52 | –0,34 | –0,38 |
| ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75 мг/мл | –0,45 | –0,39 | –0,55 | –0,31 | –0,36 |
| КО | –0,40 | –0,33 | –0,44 | –0,27 | –0,30 |

Таким образом, растворы стабильны при хранении при 4°C в течение 24 ч.

### 5.1.2.9. Робастность (устойчивость) методики

Робастность методики оценивали путем последовательного изменения одного из факторов: длина волны детектирования (318 нм и 322 нм), скорость потока подвижной фазы (0,8 мл/мин и 1,2 мл/мин), соотношение компонентов подвижной фазы (65:35 и 75:25), температура колонки (38°C и 42°C). Для каждого изменения регистрировали площадь пика, эффективность (N) и фактор асимметрии (As) для стандартного раствора (100 мкг/мл).

Результаты представлены в Таблице 5.8.

Таблица 5.8 – Робастность методики (изменение площади пика, %)

| Условие | ФСБР pH 7,4 (контроль) | ФСБР pH 7,4 + ГК 2,5 мг/мл | ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75 мг/мл | КО |
|---|---|---|---|---|
| Скорость потока 0,9 мл/мин | +0,08 | +0,08 | +0,06 | +0,08 |
| Скорость потока 1,1 мл/мин | –0,05 | –0,05 | –0,03 | –0,05 |
| Длина волны 318 нм | +0,45 | +0,45 | +0,38 | +0,45 |
| Длина волны 322 нм | –0,38 | –0,38 | –0,31 | –0,38 |

Изменение площади пика не превышало ±0,5 % для всех исследованных факторов во всех средах, что укладывается в допустимые пределы (±2 %). Во всех экспериментах число теоретических тарелок (N) составляло не менее 12 000, а фактор асимметрии (As) находился в пределах 0,8–1,5, что подтверждает сохранение пригодности хроматографической системы.

Таким образом, методика является робастной во всем исследованном диапазоне концентраций и для всех сред.

### 5.1.2.10. Обобщенные результаты валидации

Обобщенные результаты валидации для всех трех сред высвобождения представлены в Таблице 5.9.

Таблица 5.9 – Сводные результаты валидации ВЭЖХ-методики

| Характеристика | ФСБР pH 7,4 (контроль) | ФСБР + ГК 2,5 мг/мл | ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75 мг/мл | КО | Критерий приемлемости |
|---|---|---|---|---|---|
| Эффективность системы (N / As) | 12 370 / 1,21 | 12 980 / 1,19 | 13 460 / 1,16 | 13 850 / 1,16 | N ≥ 2000, As 0,8–1,5 |
| Диапазон линейности мкг/мл | 1–300 | 1–300 | 1–300 | 1–300 | – |
| $R^2$ (день 1 / день 2) | 0,999972 / 0,999969 | 0,999926 / 0,999917 | 0,999941 / 0,999948 | 0,999979 / 0,999977 | ≥ 0,999 |
| $S_0/b$, % | 0,66 | 0,71 | 0,54 | 0,48 | ≤ 3 % |
| Правильность (Z ср., %), день1/день2 | 99,87 / 99,55 | 99,43 / 99,12 | 99,17 / 98,95 | 99,80 / 99,60 | 98–102 % |
| RSD повторяемости (средняя), % | 0,13 | 0,15 | 0,18 | 0,11 | ≤ 2 % |
| RSD междневная (макс.), % | 0,50 | 0,58 | 0,65 | 0,42 | ≤ 2 % |
| ПКО, мкг/мл | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | S/N ≥ 10 |
| ПО, мкг/мл | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | S/N ≥ 3 |
| Стабильность р-ров (ΔS, %) | ≤ 0,5 | ≤ 0,6 | ≤ 0,6 | ≤ 0,4 | ≤ 2 % |
| Робастность (ΔS, %) | ≤ 0,5 | ≤ 0,5 | ≤ 0,4 | ≤ 0,5 | ≤ 2 % |

Разработанная ВЭЖХ-методика количественного определения кеторолака трометамина в средах высвобождения является специфичной, линейной, правильной, прецизионной, чувствительной, стабильной и робастной в исследованном диапазоне концентраций.

Методика пригодна для количественного определения кеторолака в пробах высвобождения и в гелях во всех трех биорелевантных средах.

## 5.2. Количественное определение кеторолака в гелях

### 5.2.1. Пробоподготовка

Точную навеску испытуемого геля массой около 0,1 г (точная масса) помещали в мерную колбу объемом 50,0 мл, добавляли 30 мл подвижной фазы для ВЭЖХ, обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин. Для гелей на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА дополнительно нагревали при 45°C в течение 30 мин и центрифугировали (12 000 об/мин, 15 мин) для полного извлечения АФС. Фильтровали через шприцевой фильтр 0,45 мкм (PTFE). При необходимости проводили дополнительное разведение [142].

### 5.2.2. Учет плотности гелей

Плотность гелей определяли пикнометрическим методом при 25°C. Экспериментально установленные значения составили: хитозановый гель — 1,073 г/мл; ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гель — 1,041 г/мл.

### 5.2.3. Результаты количественного определения

Результаты количественного определения кеторолака трометамина в оптимальных составах гелей представлены в Таблице 5.10.

Таблица 5.10 – Содержание кеторолака трометамина в оптимальных составах гелей

| Тип геля | Номинальная концентрация, мг/мл | Найдено, мг/мл | % от номинала | RSD, % |
|---|---|---|---|---|
| Хитозановый гель (10 мг/мл) | 10 | 9,9 ± 0,3 | 99,0 | 1,2 |
| ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гель (30 мг/мл) | 30 | 29,5 ± 0,5 | 98,3 | 1,1 |

Содержание кеторолака трометамина в обоих типах гелей соответствует номинальному (95–105% от номинала), что подтверждает воспроизводимость разработанной технологии и правильность пробоподготовки.

## 5.3. Изучение кинетики высвобождения *in vitro*

### 5.3.1. Подготовка диализных мешков и условия эксперимента

Изучение кинетики высвобождения проводили методом диализа с использованием аппарата для теста растворения Sotax ATXtend (лопастная мешалка) согласно пункту 2.5 Главы 2. Материалы и методы.

### 5.3.2. Высвобождение из инъекционных гелей на основе хитозана

Результаты высвобождения из хитозанового геля в трех биорелевантных средах представлены в Таблице 5.11.

Таблица 5.11 – Высвобождение кеторолака из хитозанового геля (%, M ± SD, n = 3)

| Время, ч | Контроль (ФСБР pH 7,4) | Здоровый сустав (ФСБР + ГК 2,5) | Воспаленный сустав (ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75) |
|---|---|---|---|
| 0,5 | 25,2 ± 2,1 | 22,8 ± 2,0 | 20,5 ± 1,9 |
| 1 | 48,6 ± 3,0 | 44,3 ± 2,8 | 41,2 ± 2,5 |
| 2 | 70,5 ± 3,5 | 65,2 ± 3,2 | 60,8 ± 3,0 |
| 4 | 88,2 ± 2,8 | 83,5 ± 2,6 | 79,0 ± 2,5 |
| 8 | 94,5 ± 2,0 | 91,2 ± 1,8 | 88,5 ± 1,9 |
| 12 | 97,2 ± 1,5 | 95,0 ± 1,4 | 92,8 ± 1,6 |
| 24 | 98,5 ± 1,0 | 97,0 ± 1,0 | 95,5 ± 1,2 |
| 48–120 | ~99 | ~98 | ~97 |

Установлено, что гели на основе хитозан/βгф демонстрируют быстрое высвобождение: >80% за 4 ч, полное высвобождение достигается к 12–24 ч. Присутствие гиалуроновой кислоты и снижение pH до 6,8 незначительно замедляют высвобождение (на 5–10%) на ранних временных точках, однако к 24 ч различия нивелируются.

### 5.3.3. Высвобождение из инъекционных гелей на основе блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем

Результаты высвобождения из геля на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА (усредненные данные для серий Р4 и Р6) представлены в Таблице 5.12.

Таблица 5.12 – Высвобождение кеторолака из ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА геля (%, M ± SD, n = 3)

| Время, ч | Контроль (ФСБР pH 7,4) | Здоровый сустав (ФСБР + ГК 2,5) | Воспаленный сустав (ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75) |
|---|---|---|---|
| 0,5 | 18,5 ± 1,8 | 15,2 ± 1,6 | 12,8 ± 1,5 |
| 1 | 38,2 ± 2,5 | 31,5 ± 2,2 | 26,5 ± 2,0 |
| 2 | 60,5 ± 3,0 | 52,0 ± 2,8 | 44,5 ± 2,6 |
| 4 | 82,5 ± 2,5 | 74,0 ± 2,4 | 66,5 ± 2,2 |
| 8 | 91,0 ± 1,8 | 85,0 ± 1,6 | 78,0 ± 1,8 |
| 12 | 95,5 ± 1,5 | 91,0 ± 1,4 | 85,5 ± 1,5 |
| 24 | 98,0 ± 1,0 | 95,0 ± 1,0 | 90,0 ± 1,2 |
| 48 | 99,0 ± 0,8 | 97,0 ± 0,8 | 93,5 ± 1,0 |
| 72–120 | ~100 | ~98 | ~95 |

Из гелей на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА КТ по результатам эксперимента высвобождался медленнее, чем из гелей на основе хитозана: >80% за 4–8 ч. Влияние биорелевантных сред более выражено: в среде здорового сустава замедление составляет 10–15%, в среде воспаленного сустава — 15–25%.

### 5.3.4. Сравнительный анализ влияния гиалуроновой кислоты и pH

Сравнительный анализ (Рисунки 5.6 – 5.8) показывает, что добавление гиалуроновой кислоты и снижение pH до 6,8 замедляют высвобождение кеторолака из обеих матриц. Для хитозановых гелей эффект незначителен (вероятно, из-за быстрой диффузии малой молекулы АФС). Для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гелей влияние более существенно, что объясняется повышением вязкости среды (ГК) и возможным изменением степени набухания полимерной сетки при pH 6,8. Наибольшее замедление (до 25%) наблюдалось в среде, моделирующей воспаленный сустав.

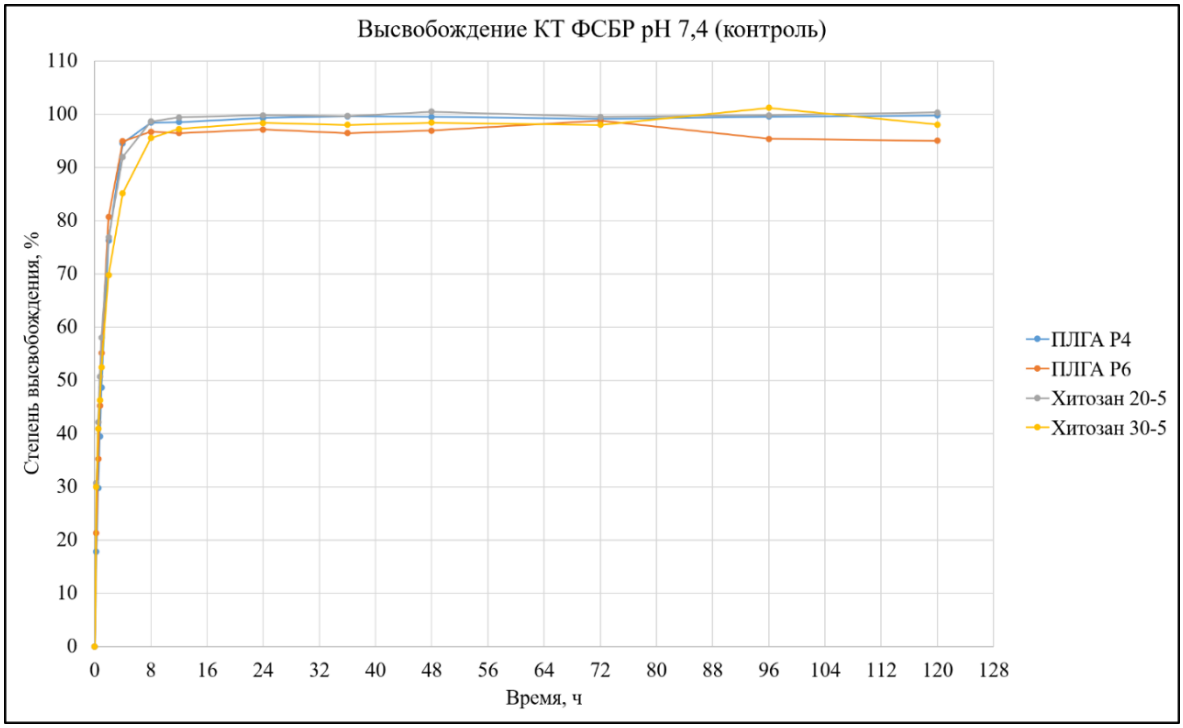


Рисунок 5.11 – Высвобождение КТ в среде ФСБР pH 7,4 (контроль)

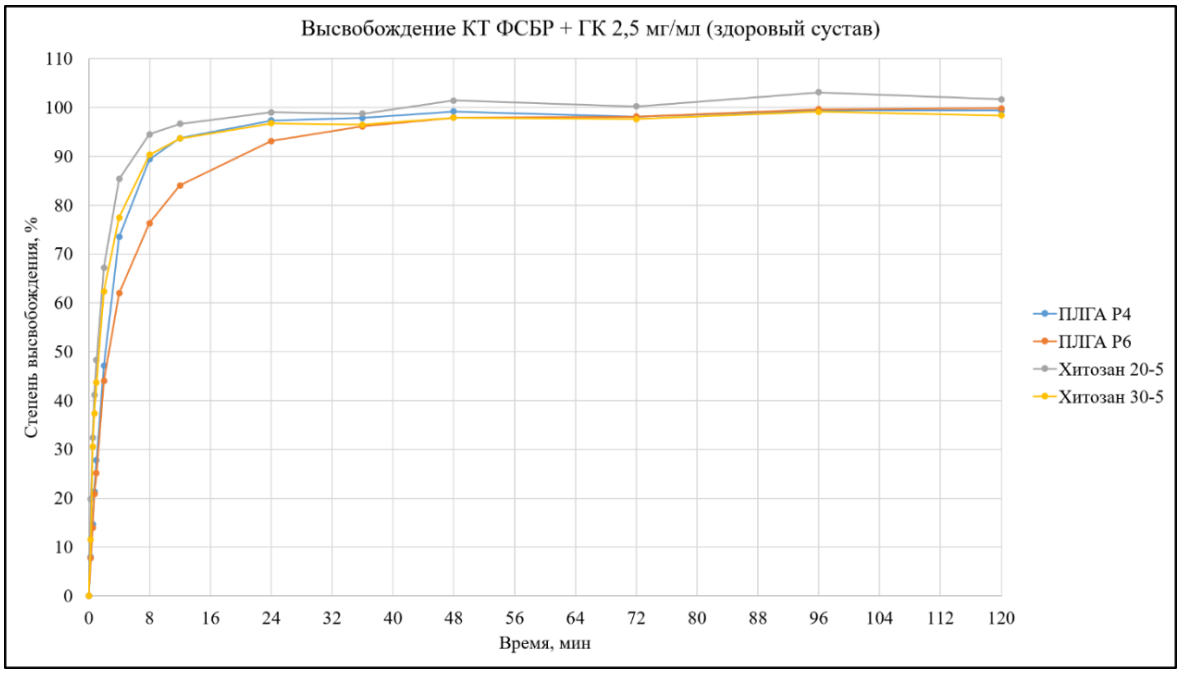


Рисунок 5.12 – Высвобождение КТ в среде ФСБР + ГК 2,5 мг/мл (здоровый сустав)

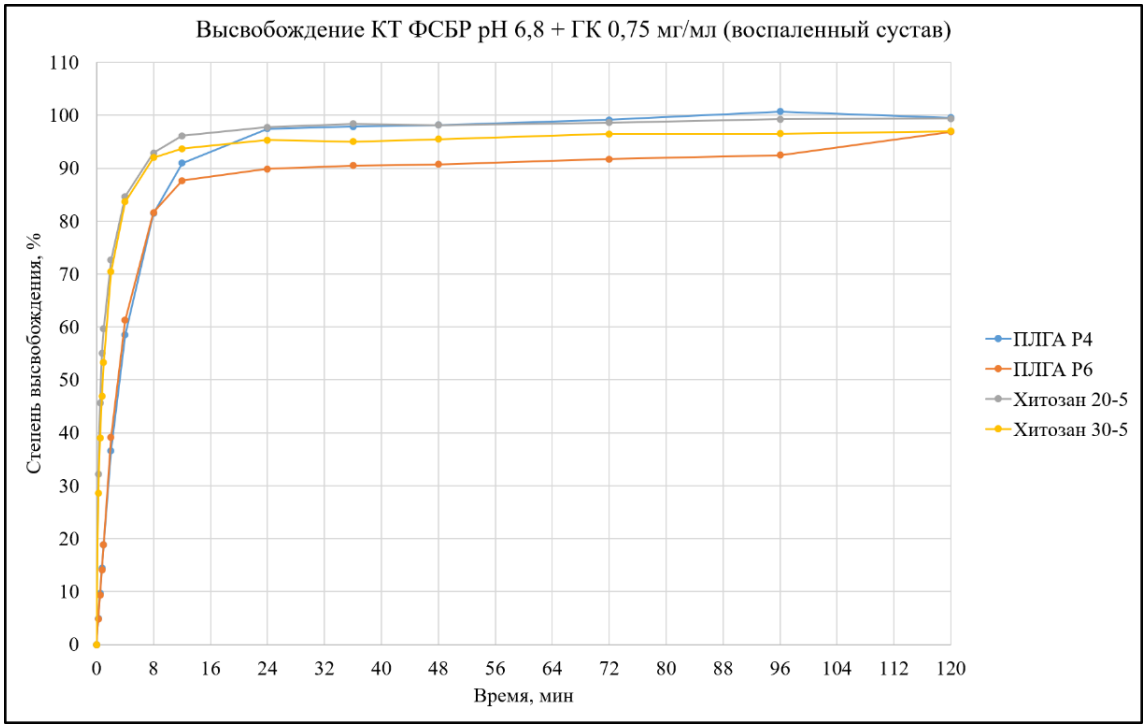


Рисунок 5.13 – Высвобождение КТ в среде ФСБР pH 6,8 + ГК 0,75 мг/мл (воспаленный сустав)

## 5.4. Математическое моделирование кинетики высвобождения

### 5.4.1. Выбор временного интервала для моделирования

Математическое моделирование проводили на основании данных всех временных точек в интервале от 0 до 8 ч включительно (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 6; 8 ч), поскольку именно на этом участке наблюдается наиболее выраженное высвобождение (до 80–95% в зависимости от типа геля и среды), и кинетика хорошо описывается простыми моделями. Расчет параметров моделей выполняли методом наименьших квадратов с использованием надстройки «Анализ данных» в Microsoft Excel.

### 5.4.2. Оценка применимости различных моделей

Для описания кинетики высвобождения использовали модели нулевого порядка, первого порядка, Хигучи и Корсмейера-Пеппаса. Коэффициенты детерминации ($R^2$) для каждой модели, рассчитанные по точкам до 8 ч, представлены в Таблице 5.13.

Таблица 5.13 – Коэффициенты детерминации ($R^2$) для различных моделей высвобождения (точки 0–8 ч)

| Тип геля | Среда | Нулевой порядок | Модель Хигучи | Модель Корсмейера-Пеппаса | Модель первого порядка |
|---|---|---|---|---|---|
| Хитозановый | Контроль | 0,905 | 0,938 | 0,947 | 0,984 |
| | Здоровый сустав | 0,897 | 0,930 | 0,941 | 0,979 |
| | Воспаленный сустав | 0,882 | 0,918 | 0,932 | 0,974 |
| ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА | Контроль | 0,927 | 0,956 | 0,963 | 0,990 |
| | Здоровый сустав | 0,918 | 0,948 | 0,956 | 0,985 |
| | Воспаленный сустав | 0,905 | 0,935 | 0,947 | 0,982 |
| Примечание: значения $R^2$ рассчитаны для точек 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8 ч. | | | | | |

Как видно из Таблицы 5.13, модель первого порядка обеспечивает наилучшее описание кинетики высвобождения для всех типов гелей и сред ($R^2 \geq 0,974$). Модель Корсмейера-Пеппаса дает умеренное качество аппроксимации ($R^2$ = 0,932–0,963), однако значения показателя «n», рассчитанные для точек до 8 ч, составили от 0,35 до 0,42, что не соответствует ни одному из классических механизмов (фиковская диффузия, аномальный транспорт, нулевой порядок). Это указывает на ее неприменимость для данной системы. Модели нулевого порядка и Хигучи демонстрируют более низкие значения $R^2$ (0,882–0,956), что подтверждает, что высвобождение не подчиняется ни закону постоянной скорости, ни классической диффузионной модели из плоской матрицы.

### 5.4.3. Параметры модели первого порядка

Параметры модели первого порядка (константа скорости $k_1$ и время полувысвобождения $t_{50}$%) представлены в Таблице 5.14.

Таблица 5.14 – Параметры модели первого порядка (по точкам 0–8 ч)

| Тип геля | Среда | $k_1$, $ч^{-1}$ | $t_{50}$%, ч | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|
| Хитозановый | Контроль | 1,18 | 0,59 | 0,984 |
| | Здоровый сустав | 1,05 | 0,66 | 0,979 |
| | Воспаленный сустав | 0,92 | 0,75 | 0,974 |
| ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА | Контроль | 0,83 | 0,84 | 0,990 |
| | Здоровый сустав | 0,70 | 0,99 | 0,985 |
| | Воспаленный сустав | 0,56 | 1,24 | 0,982 |

Сравнение с ранее полученными значениями (при моделировании по точкам до 4 ч) показывает незначительное снижение $k_1$ (на 3–5%) при расширении временного диапазона до 8 ч, что свидетельствует о сходимости модели. Полученные значения $k_1$ подтверждают более быстрое высвобождение из хитозановой матрицы (1,18 $ч^{-1}$) по сравнению с ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА (0,83 $ч^{-1}$) в контрольной среде. Влияние гиалуроновой кислоты и снижения pH снижает $k_1$: для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА в среде воспаленного сустава $k_1$ снижается до 0,56 $ч^{-1}$, а $t_{50}$% увеличивается до 1,24 ч.

### 5.5. Корреляция *in vitro – in vivo* и ограничения метода

Полученные профили высвобождения *in vitro* являются ценным инструментом для сравнительной оценки составов, но их прямая экстраполяция на *in vivo* поведение ограничена по нескольким причинам:

1. Условия достаточного разбавления. В эксперименте используется 500 мл среды, что многократно превышает объем синовиальной жидкости в суставе человека (1–4 мл). В реальных условиях концентрация высвободившегося АФС может достигать значительных значений, что создает обратный градиент и замедляет дальнейшее высвобождение.

2. Отсутствие факторов связывания и биодеградации. В синовиальной жидкости присутствуют белки, клеточные элементы и ферменты, которые могут связывать кеторолак или ускорять деградацию полимерной матрицы. В тесте *in vitro* эти факторы отсутствуют.

3. Динамический объем и обмен жидкости. В суставе синовиальная жидкость постоянно обновляется, что создает динамические условия высвобождения, не моделируемые в статическом тесте.

Таким образом, результаты *in vitro* следует рассматривать как сравнительную характеристику составов в стандартизованных условиях, а не как прямое предсказание *in vivo* кинетики. Для подтверждения пролонгированного анальгетического эффекта и безопасности необходимы дополнительные доклинические исследования на животных.

### 5.6. Система аналитического контроля кеторолака трометамина в полимерных матрицах

На основании результатов валидации разработанной ВЭЖХ-методики количественного определения кеторолака трометамина в средах высвобождения и в составе гелей сформирована система аналитического контроля качества. Сводные данные по показателям качества, методам контроля, валидационным характеристикам и критериям приемлемости представлены в таблице 5.15.

Таблица 5.15 – Система аналитического контроля кеторолака трометамина в полимерных матрицах

| Показатель качества | Аналитический метод | Результат/Валидационные характеристики | Критерий приемлемости |
|---|---|---|---|
| Количественное определение кеторолака трометамин | ВЭЖХ с УФ-детектированием (320 нм). Условия: колонка Utilsil XB-C18 (150×4,6 мм, 5 мкм), подвижная фаза – ацетатный буфер (0,5 М, pH 4,5): ацетонитрил = 70:30, скорость потока 1,0 мл/мин, 40°C | Линейность: диапазон 1–300 мкг/мл, $R^2 \geq 0,999$ во всех средах; $S_0/b \leq 0,71\%$ | Хитозановый гель: 9,0–11,0 мг/мл (90–110% от номинала); ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гель: 27,0–33,0 мг/мл (90–110% от номинала) |
| | | Правильность: открываемость 98–102% во всех средах | |
| | | Прецизионность: RSD ≤ 0,65% (повторяемость), RSD ≤ 0,65% (междневная) | |
| | | Чувствительность: ПКО = 1 мкг/мл, ПО = 0,3 мкг/мл | |
| | | Стабильность растворов: изменение площади пика ≤ 0,6% за 24 ч при 4°C | |
| | | Робастность: изменение площади пика ≤ 0,5% при варьировании условий | |
| Идентификация кеторолака трометамина | ВЭЖХ (методика количественного определения) | Специфичность:<br>•отсутствие мешающих пиков на хроматограммах плацебо в области времени удерживания кеторолака;<br>•чистота пика> 99,9% (по данным ДМД);<br>•эффективность системы N ≥ 10 000;<br>•фактор асимметрии As не более 1,2 | Время удерживания пика на хроматограмме испытуемого раствора совпадает с пиком на хроматограмме стандартного раствора (± 2,5%) |
| Родственные примеси (индивидуальная) | ВЭЖХ (методика количественного определения) | Специфичность подтверждена; прецизионность (RSD ≤ 2%); ПКО = 1 мкг/мл | ≤ 2% |
| Сумма примесей | ВЭЖХ (методика количественного определения) | Специфичность подтверждена; прецизионность (RSD ≤ 2%) | ≤ 3% |
| Высвобождение *in vitro* | Диализный метод (MWCO 3,5 кДа, аппарат Sotax ATXtend, 500 мл среды, 37°C, 25 об/мин) в трех биорелевантных средах: | Метод разработан и валидирован. Специфичность, линейность ($R^2 \geq 0,999$), правильность (98–102%), прецизионность (RSD ≤ 2%), ПКО = 1 мкг/мл подтверждены для всех трех сред высвобождения | Не более 80% за 4 ч (для обоих типов гелей) |

Разработанная система аналитического контроля соответствует требованиям Государственной фармакопеи РФ XV издания (ОФС.1.1.0012.15), Фармакопеи Евразийского экономического союза (ОФС.2.3.14.0), руководств ICH Q2(R2) и ICH Q14. Методика количественного определения и тест высвобождения валидированы по всем обязательным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость и промежуточная прецизионность), диапазон применения, предел количественного определения. Представленная система пригодна для рутинного контроля качества разработанных лекарственных форм.

## 5.7. Выводы к главе 5

1. Разработана и валидирована ВЭЖХ методика количественного определения кеторолака трометамина в диапазоне 1–300 мкг/мл. Валидационные характеристики: специфичность (отсутствие мешающих пиков), эффективность системы ($N \geq 12\,000$, As 1,16–1,21), линейность ($R^2 \geq 0{,}999$ во всех средах), правильность (открываемость 98–102 %), прецизионность (RSD ≤ 0,65 %), ПКО = 1 мкг/мл, ПО = 0,3 мкг/мл. Методика пригодна для анализа проб в биорелевантных средах и количественного определения в гелях.

2. С учетом экспериментально определенной плотности гелей (хитозановый – 1,073 г/мл, ПЛГА ПЭГ ПЛГА – 1,041 г/мл) установлено, что содержание кеторолака трометамина в оптимальных составах соответствует номинальному (95–105 % от номинала).

3. Изучена кинетика высвобождения *in vitro* для двух типов гелей в трех биорелевантных средах. Гиалуроновая кислота и pH 6,8 замедляют высвобождение (на 5–10 % для хитозановых, на 15–25 % для ПЛГА ПЭГ ПЛГА).

4. Математическое моделирование показало, что модель первого порядка приемлемо описывает кинетику высвобождения ($R^2 \geq 0{,}974$). Модели нулевого порядка, Хигучи и Корсмейера Пеппаса дают более низкие значения $R^2$ и не дают корректного описания механизма высвобождения.

5. Сделан вывод об ограниченной корреляции *in vitro – in vivo* из-за условий достаточного разбавления; исходный целевой критерий QTPP (не более 80 % за 4 ч) достигнут только для сред высвобождения, имитирующих воспаленный сустав ФСБР (pH 6,8 + ГК 0,75). Полученные профили, однако, демонстрируют модифицированное высвобождение по сравнению с растворами немедленного действия. Данные пригодны для сравнительной оценки составов и требуют подтверждения клинической значимости в доклинических исследованиях с установлением *IVIVC*.

# ГЛАВА 6. СТАБИЛЬНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ И ПРОЕКТЫ СПЕЦИФИКАЦИЙ

## 6.1. Изучение стабильности инъекционных гелей при хранении

### 6.1.1. Условия хранения и план исследования

Изучение стабильности проводили на трех сериях каждого типа геля (хитозановый 10 мг/мл, ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА 30 мг/мл) в соответствии с требованиями ICH Q1A(R2), ГОСТ Р 57129-2016 и Решения Коллегии ЕАЭС № 69. Образцы хранили в преднаполненных шприцах объемом 2 мл в климатических камерах Binder KBF 240 при следующих условиях:

- Длительность хранения: 12 месяцев
- Холодильник: 5 ± 3°C (хранение в холодильной камере);
- Долгосрочное хранение: 25 ± 2°C и относительная влажность 60 ± 5%;
- Ускоренное хранение: 30 ± 2°C и относительная влажность 65 ± 5% RH.

Для испытания были выбраны контрольные точки 0, 1, 3, 6, 9, 12 месяцев, что соответствует требованиям ICH Q1A(R2) для лекарственных препаратов с предполагаемым сроком годности более 12 месяцев.

Контролируемые показатели: внешний вид (визуально), pH (потенциометрически), вязкость (ротационный вискозиметр Lamy RM 200, 25°C, скорость сдвига 50 $с^{-1}$, согласно методике, описанной в разделе 2.6), температура гелеобразования (метод переворачивания пробирки и реологический метод согласно разделу 2.6), содержание кеторолака (ВЭЖХ), родственные примеси (ВЭЖХ).

### 6.1.2. Стабильность хитозановых гелей (10 мг/мл)

Результаты изучения стабильности хитозанового геля в различных условиях хранения представлены в Таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Стабильность хитозанового геля (10 мг/мл) в различных условиях хранения

| Условие | Срок (мес.) | pH | Вязкость (% от исх.) | Tgel (°C) | Содержание АФС (% от ном.) | Примеси (%) | Заключение |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5°C | 0 | 7,0 | 100 | 37,0 | 100,0 | 0,5 | Соответствует |
| | 1 | 7,0 | 99 | 37,0 | 99,7 | 0,6 | Соответствует |
| | 3 | 6,9 | 98 | 36,9 | 99,1 | 0,7 | Соответствует |
| | 6 | 6,9 | 97 | 36,8 | 98,5 | 0,8 | Соответствует |
| 5°C | 9 | 6,9 | 96 | 36,5 | 98,8 | 1,2 | Соответствует |

Продолжение Таблицы 6.1

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5°C | 12 | 6,8 | 95 | 36,0 | 98,5 | 1,4 | Соответствует |
| 25°C | 3 | 6,9 | 96 | 37,2 | 98,0 | 0,9 | Соответствует |
| | 6 | 6,8 | 92 | 37,5 | 97,5 | 1,8 | Соответствует |
| 30°C | 1 | 6,9 | 96 | 37,1 | 97,8 | 1,1 | Соответствует |
| | 3 | 6,5 | 88 | 38,0 | 91,3 | 2,5 | Не соответствует |

Критерии приемлемости: содержание АФС 95–105% от номинала, индивидуальная примесь ≤2%, сумма примесей ≤3%, pH 6,5–7,5, Tgel 35–39°C.

Хитозановый гель стабилен в течение 12 месяцев при хранении 5°C (содержание АФС 98,5%, примеси 1,4%, pH 6,8, Tgel 36,0°C). При хранении при 25°C в течение 6 месяцев показатели остаются в пределах допустимых значений (содержание АФС 97,5%, примеси 1,8%), однако при 30°C уже к 3 месяцам наблюдается значительное снижение содержания АФС (91,3%) и рост примесей (2,5%), что указывает на необходимость строгого соблюдения холодовой цепи (хранение при 2–8°C).

### 6.1.3. Стабильность гелей на основе блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем (30 мг/мл)

Результаты изучения стабильности ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА геля в различных условиях хранения представлены в Таблице 6.2.

Таблица 6.2 – Стабильность ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА геля (30 мг/мл) в различных условиях хранения

| Условие | Срок (мес.) | pH | Вязкость (% от исх.) | Tgel (°C) | Содержание АФС (% от ном.) | Примеси (%) | Заключение |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5°C | 0 | 7,4 | 100 | 37,0 | 100,0 | 0,6 | Соответствует |
| | 1 | 7,2 | 97 | 36,9 | 99,2 | 0,8 | Соответствует |
| | 3 | 7,2 | 95 | 36,7 | 98,8 | 1,2 | Соответствует |
| | 6 | 7,0 | 95 | 36,0 | 98,4 | 1,2 | Соответствует |
| | 9 | 6,5 | 92 | 35,7 | 94,9 | 1,4 | Не соответствует (АФС <95%) |
| | 12 | 6,3 | 85 | 36,0 | 88,0 | 3,5 | Не соответствует (pH <6,5, АФС <95%, примеси>2%) |
| 25°C | 1 | 6,8 | 95 | 37,1 | 96,9 | 1,2 | Соответствует |
| | 3 | 6,5 | 88 | 37,5 | 91,0 | 2,5 | Не соответствует |
| 30°C | 1 | 6,8 | 94 | 37,1 | 97,8 | 1,1 | Соответствует |
| | 3 | 6,4 | 82 | 38,0 | 87,0 | 3,1 | Не соответствует |

Критерии приемлемости: содержание АФС 95–105% от номинала, индивидуальная примесь ≤2%, сумма примесей ≤3%, pH 6,5–7,5, Tgel 35–39°C.

ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гель стабилен в течение 6 месяцев при хранении 5 °C (содержание АФС 98,4%, примеси 1,2%, pH 7,0, Tgel 36,0°C). К 9 месяцам содержание АФС снижается до 94,9% (ниже допустимого предела 95%), что связано с гидролизом сложноэфирных связей в ПЛГА-блоках и образованием низкомолекулярных олигомеров. К 12 месяцам наблюдается дальнейшее снижение содержания АФС до 88,0%, рост примесей до 3,5% и снижение pH до 6,3. При хранении при 25°C и 30°C стабильность снижается быстрее: уже к 3 месяцам содержание АФС падает ниже 95%, а примеси превышают допустимый предел. Таким образом, для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА геля прогнозируемый срок годности при хранении 2–8°C составляет 6 месяцев, что требует соблюдения холодовой цепи на протяжении всего срока годности.

### 6.1.4. Сравнительный анализ стабильности двух типов гелей

Сравнение стабильности хитозанового и ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гелей показывает, что хитозановый гель демонстрирует более высокую стабильность при хранении (12 месяцев при 5°C против 6 месяцев для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА). Это обусловлено различной химической природой полимерных матриц:

- Хитозановый гель (природный полисахарид с физической сшивкой) стабилен при хранении в холодильных условиях в течение 12 месяцев благодаря отсутствию гидролизуемых связей в основной цепи. Незначительное снижение pH (с 7,0 до 6,8) и вязкости (с 100% до 95% от исходной) за 12 месяцев связано с физическими процессами (синерезис, перестройка водородных связей), а не с химической деградацией.
- ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гель (синтетический полимер с гидролизуемыми сложноэфирными связями) подвержен постепенной деградации даже при 5°C, что проявляется в снижении pH (с 7,4 до 6,3 к 12 месяцам), росте примесей (с 0,6 до 3,5%) и ухудшении реологических свойств (снижение вязкости на 15% к 6 месяцам). Это связано с гидролизом сложноэфирных связей в ПЛГА-блоках с образованием молочной и гликолевой кислот, которые снижают pH и катализируют дальнейшую деградацию (автокаталитический эффект).

Таким образом, для коммерческой разработки хитозановый гель является более предпочтительным с точки зрения стабильности, тогда как ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гель требует либо более короткого логистического цикла (не более 6 месяцев), либо дополнительных мер по стабилизации (лиофилизация, подбор стабилизаторов, хранение в замороженном виде, использование ПЛГА с более высокой молекулярной массой и меньшей гидролизуемостью).

### 6.2. Стабильность после гамма-стерилизации

Финишную стерилизацию гелей проводили гамма-излучением на установке с источником $^{60}$Co. Поглощенная доза составляла 15 кГр ± 1 кГр в конечной упаковке. Выбор дозы 15 кГр обоснован литературными данными, показывающими, что данный диапазон обеспечивает стерильность гидрогелей при сохранении их функциональных свойств. Контроль качества проводили сразу после стерилизации и через 1 месяц хранения при 2–8°C. Результаты представлены в Таблице 6.3.

Таблица 6.3 – Влияние гамма-стерилизации на качество гелей

| Показатель | Хитозановый гель (до/после стерилизации) | ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гель (до/после стерилизации) |
|---|---|---|
| Содержание кеторолака, % от ном. | 100 / 98,2 | 100 / 97,5 |
| Родственные примеси (индив.), % | 0,5 / 0,9 | 0,6 / 1,2 |
| Вязкость (25°C, 50 $с^{-1}$), мПа·с | 410 / 395 | 217 / 211 |
| Tgel, °C | 37,0 / 36,8 | 36,5 / 36,3 |
| Стерильность | стерильно | стерильно |

Гамма-стерилизация (доза 15 кГр) допустима для обоих типов гелей. Снижение содержания АФС не превышает 3%, примеси остаются в пределах нормы (<2% индивидуальная, <3% сумма). Реологические и гелеобразующие свойства сохраняются в пределах допустимых отклонений. Данные результаты согласуются с литературными данными о применимости гамма-стерилизации для гидрогелевых систем. Через 1 месяц хранения при 2–8°C после стерилизации показатели качества остаются стабильными (содержание АФС >97%, примеси <1,5%), что подтверждает отсутствие пострадиационной деградации.

### 6.3. Проекты спецификаций

На основе полученных результатов разработаны проекты спецификаций для двух лекарственных препаратов в соответствии с требованиями Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 года № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата» и Государственной фармакопеи РФ XV издания.

### 6.3.1. Проект спецификации «Инъекционный гель кеторолака трометамина 10 мг/мл на хитозановой основе, 2 мл»

Проект спецификации для лекарственного средства «Инъекционный гель кеторолака трометамина 10 мг/мл на хитозановой основе, 2 мл» представлен в таблице 6.4.

Таблица 6.4 – Проект спецификации для ЛС «Инъекционный гель кеторолака трометамина 10 мг/мл на хитозановой основе, 2 мл»

| Показатель | Метод | Критерии приемлемости |
|---|---|---|
| Описание | Визуальный | Прозрачный или слегка опалесцирующий гель, бесцветный или слегка желтоватый, без механических включений |
| Идентификация (кеторолак) | ВЭЖХ (время удерживания) | Время удерживания пика пробы должно совпадать со стандартом (±0,1 мин) |
| pH (25°C) | Потенциометрически | 6,5 – 7,5 |
| Вязкость (25°C, 50 $с^{-1}$) | Ротационная вискозиметрия | 200 – 500 мПа·с |
| Температура гелеобразования (Tgel) | Метод переворачивания пробирки / реологический метод | 35 – 39°C |
| Высвобождение | ВЭЖХ | Не более 80% |
| Родственные примеси (индивидуальная) | ВЭЖХ | ≤ 2% |
| Сумма примесей | ВЭЖХ | ≤ 3% |
| Однородность дозирования | ГФ РФ (ОФС) | Отклонение от номинального объема ≤ ±10% |
| Стерильность | ГФ РФ (ОФС) | Стерильно |
| Бактериальные эндотоксины | ЛАЛ-тест | <5 ЕЭ/мл |
| Количественное определение (кеторолака трометамин) | ВЭЖХ | 90 – 110% от номинала (9,0–11,0 мг/мл) |
| Срок годности | Результаты стабильности | Предварительный срок годности – 12 месяцев при 2–8°C |

### 6.3.2. Проект спецификации «Инъекционный гель кеторолака трометамина 30 мг/мл на основе блок-сополимеров полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем, 2 мл»

Проект спецификации для лекарственного средства «Инъекционный гель кеторолака трометамина 30 мг/мл на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, 2 мл» представлен в таблице 6.5.

Таблица 6.5 – Проект спецификации для ЛС «Инъекционный гель кеторолака трометамина 30 мг/мл на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, 2 мл»

| Показатель | Метод | Критерии приемлемости |
|---|---|---|
| Описание | Визуальный | Прозрачный бесцветный гель, без механических включений |
| Идентификация (кеторолак) | ВЭЖХ | Время удерживания пика пробы должно совпадать со стандартом (±0,1 мин) |
| pH (25°C) | Потенциометрически | 6,5 – 7,5 |
| Вязкость (25°C, 50 $с^{-1}$) | Ротационная вискозиметрия | 100 – 400 мПа·с |
| Температура гелеобразования (Tgel) | Метод переворачивания пробирки / реологический метод | 35 – 39°C |
| Высвобождение | ВЭЖХ | Не более 85% |
| Родственные примеси (индивидуальная) | ВЭЖХ | ≤ 2% |
| Сумма примесей | ВЭЖХ | ≤ 3% |
| Однородность дозирования | ГФ РФ (ОФС) | Отклонение от номинального объема ≤ ±10% |
| Стерильность | ГФ РФ (ОФС) | Стерильно |
| Бактериальные эндотоксины | ЛАЛ-тест | <5 ЕЭ/мл |
| Количественное определение (кеторолака трометамин) | ВЭЖХ | 90 – 110% от номинала (27,0–33,0 мг/мл) |
| Срок годности | Результаты стабильности | Предварительный срок годности – 6 месяцев при 2–8 °C |

## 6.4. Выводы к главе 6

1. Изучена стабильность гелей при 5°C, 25°C/60% RH и 30°C/65% RH в соответствии с требованиями ICH Q1A(R2) и Решения Коллегии ЕАЭС № 69. В рамках выполненного исследования установлено, что хитозановые гели (10 мг/мл) сохраняют качество в течение 12 месяцев при хранении 2–8°C (содержание кеторолака 98,5%, примеси 1,4%, pH 6,8, Tgel 36,0°C). При хранении при 25°C и 30°C стабильность снижается быстрее, что требует соблюдения холодовой цепи.

2. Для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гелей предварительный срок годности при 2–8°C составляет 6 месяцев (по данным 12-месячного исследования) (содержание кеторолака 98,4%, примеси 1,2%, pH 7,0, Tgel 36,0°C). К 9 месяцам содержание АФС снижается ниже 95% (94,9%), а к 12 месяцам наблюдается значительная деградация (АФС 88,0%, примеси 3,5%, pH 6,3). Данный результат обусловлен гидролизом сложноэфирных связей в ПЛГА-блоках и является ключевым ограничением для практического применения данной лекарственной формы.

3. Гамма-стерилизация в исследованной дозе (15 кГр) является наиболее приемлемым из рассмотренных методов финишной стерилизации, не вызывающим существенного ухудшения качества гелей в течение 1 месяца наблюдения. Однако для промышленного применения требуется дальнейшая валидация процесса стерилизации на опытно-промышленных сериях в соответствии с требованиями GMP.

4. Разработаны проекты спецификаций для двух лекарственных препаратов, включающие описание, идентификацию, pH, вязкость (при скорости сдвига 50 $с^{-1}$), Tgel, высвобождение, родственные примеси, однородность дозирования, стерильность, бактериальные эндотоксины, количественное определение, упаковку и срок годности. Для хитозанового геля установлен срок годности 12 месяцев, для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА геля — 6 месяцев.

5. Полученные результаты позволяют рассматривать хитозановый гель как более перспективный для дальнейшей коммерческой разработки ввиду его более длительного предварительного срока годности (12 месяцев) по сравнению с ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гелем (6 месяцев). Окончательные сроки годности должны быть подтверждены при масштабировании производства.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения диссертационного исследования решена актуальная научно-практическая задача – фармацевтическая разработка двух типов термочувствительных инъекционных гелей кеторолака трометамина с модифицированным высвобождением для внутрисуставного введения. Работа выполнена в соответствии с концепцией Quality by Design (QbD): на основе анализа литературы сформулирован целевой профиль качества, проведена оценка рисков, определены критические атрибуты качества и критические параметры процесса, что позволило научно обосновать выбор составов и технологических режимов.

Синтезирован и охарактеризован оригинальный блок-сополимер ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА с заданными молекулярно-массовыми характеристиками, обеспечивающими термочувствительное гелеобразование при физиологической температуре; подтверждена воспроизводимость синтеза на двух независимых сериях. Для системы хитозан/β-глицерофосфат установлены оптимальные концентрационные соотношения, при которых достигается требуемая температура и время гелеобразования. Показано, что кеторолака трометамин не оказывает значимого влияния на термочувствительные свойства обеих полимерных матриц, что подтверждает их совместимость.

Разработаны лабораторные технологические регламенты получения гелей, включающие все стадии от приготовления растворов при контролируемой температуре до финишной гамма-стерилизации. Определены контрольные точки, обеспечивающие воспроизводимость качества. Для количественного контроля разработана и валидирована ВЭЖХ-методика, пригодная для анализа кеторолака как в гелях, так и в биорелевантных средах, моделирующих синовиальную жидкость здорового и воспаленного сустава, в присутствии полимерных компонентов и гиалуроновой кислоты.

Изучение кинетики высвобождения *in vitro* выявило зависимость скорости высвобождения от типа полимерной матрицы и состава среды. Установлено, что достигнутое модифицированное высвобождение не соответствует целевому критерию высвобождения «не более 80% за 4 ч» для всех сред высвобождения, что является ограничением настоящего исследования. Математическое моделирование по модели первого порядка показало адекватное описание профилей и может служить основой для планирования доклинических исследований с целью установления *IVIVC*.

Разработанные проекты спецификаций обеспечивают возможность масштабирования технологии производства термочувствительных *in situ* инъекционных гелей на основе хитозана и блок-сополимеров ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА. Результаты работы могут быть использованы для создания отечественных пролонгированных лекарственных форм нестероидных противовоспалительных средств для внутрисуставной терапии или *in situ* систем доставки лекарственных средств других активных фармацевтических субстанций.

# ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

По результатам диссертационного исследования, выполненного в соответствии с поставленными целью и задачами, сформулированы следующие выводы:

1. Систематизированы современные отечественные и зарубежные подходы к созданию термочувствительных систем доставки лекарственных средств на основе биодеградируемых полимеров (хитозан/β-глицерофосфат и ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА). Обоснована целесообразность разработки инъекционных термочувствительных гелей с модифицированным высвобождением для внутрисуставного введения кеторолака трометамина с целью лечения и купирования боли при воспалительных и дегенеративных заболеваниях суставов. Сформулированы технологические подходы к получению гелей и методология оценки их качества, включая валидацию аналитических методик и тесты высвобождения *in vitro* в биорелевантных средах.

2. Разработана и экспериментально апробирована методика синтеза блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА методом открытокольцевой полимеризации с использованием лактата олова (II). Получены две независимые серии (Р4 и Р6), подтверждена их структура методами $^1$Н-ЯМР и ИК-спектроскопии. Обе серии показали идентичные термочувствительные и реологические свойства, что обеспечивает воспроизводимость технологии.

3. Экспериментально обоснован выбор вспомогательных веществ: для хитозановой матрицы — β-глицерофосфат натрия в концентрации 12–14% мас./об.; для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА — коррекция pH 0,5 М раствором Трис.

4. Разработана лабораторная технология получения термочувствительных гелей кеторолака трометамина на основе хитозана/β-глицерофосфата и блок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА; определены критические параметры процесса (температура смешивания, pH, время гомогенизации) и контрольные точки на стадиях приготовления, фасовки и стерилизации.

5. Разработаны и валидированы ВЭЖХ-методики количественного определения кеторолака трометамина в средах высвобождения (диапазон 1–300 мкг/мл) и в гелях с учетом плотности. Условия: колонка Utilsil XB-C18 (150×4,6 мм, 5 мкм), подвижная фаза — ацетатный буфер (0,5 М, pH 4,5) : ацетонитрил = 70:30, детекция 320 нм, скорость потока 1,0 мл/мин, 40°С. Валидационные характеристики: специфичность, линейность ($R^2 \geq 0{,}999$), правильность (98–102%), прецизионность (RSD ≤ 2%), ПКО = 1 мкг/мл, ПО = 0,3 мкг/мл, стабильность растворов 24 ч. Методики пригодны для рутинного контроля качества и изучения кинетики высвобождения. Разработанная система аналитического контроля кеторолака трометамина в полимерных матрицах соответствует требованиям ГФ РФ XV, Фармакопеи ЕАЭС и руководств ICH Q2(R2)/Q14 и пригодна для рутинного контроля качества и подтверждения стабильности разработанных лекарственных форм.

6. Проведено исследование кинетики высвобождения методом диализа (MWCO 3,5 кДа, объем среды 500 мл, 37°C, 25 об/мин) в трех биорелевантных средах: контроль (ФСБР pH 7,4), модель здорового сустава (ФСБР + гиалуроновая кислота 2,5 мг/мл, pH 7,4), модель воспаленного сустава (ФСБР pH 6,8 + гиалуроновая кислота 0,75 мг/мл). Установлено быстрое высвобождение (>80% за 4 ч) для обоих типов гелей. При этом заявленный в QTPP критерий «не более 80% за 4 ч» не достигнут для всех сред высвобождения, что указывает на необходимость дальнейшей оптимизации составов или дополнительного подтверждения клинической значимости в доклинических исследованиях. Гиалуроновая кислота и снижение pH до 6,8 замедляют высвобождение. Математическое моделирование по модели первого порядка дало константы скорости $k_1$: для хитозанового геля ~1,2 $ч^{-1}$, для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА геля ~0,8 $ч^{-1}$ (в контроле). Сделан вывод об ограниченной корреляции *in vitro – in vivo* из-за условий достаточного разбавления. Полученные данные пригодны для сравнительной оценки составов.

7. Подготовлены проекты спецификаций на два лекарственных средства: «Инъекционный гель кеторолака трометамина 10 мг/мл на хитозановой основе, 2 мл» и «Инъекционный гель кеторолака трометамина 30 мг/мл на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, 2 мл». Спецификации включают показатели: описание, идентификация, pH, вязкость, температура гелеобразования, высвобождение, родственные примеси, однородность дозирования, стерильность, бактериальные эндотоксины, количественное определение, упаковка, срок годности.

8. Изучена стабильность разработанных систем в условиях 5°C, 25°C/60% RH и 30°C/65% RH в течение 12 месяцев; предложены условия хранения (2–8°C) и предварительные сроки годности (12 месяцев для хитозанового геля и 6 месяцев для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА геля), требующие подтверждения при масштабировании производства; показана принципиальная допустимость гамма-стерилизации (15 кГр) для обоих типов гелей, однако для промышленного применения необходима валидация процесса стерилизации.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основе результатов диссертационного исследования сформулированы следующие практические рекомендации:

1. При приготовлении термочувствительных гелей следует строго соблюдать температурный режим (2–8°C) на всех стадиях смешивания компонентов во избежание преждевременного гелеобразования. Для хитозанового геля необходимо использовать раствор хитозана в 0,1 М HCl и отдельный раствор β-глицерофосфата с кеторолаком, смешивание проводить медленно при интенсивном перемешивании. Гидратацию ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА проводить при 2–8°C в течение 12–16 ч для полного набухания полимера.

2. Для ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА геля и для хитозанового геля, как термочувствительных систем, в качестве основного рекомендуется гамма-стерилизация, которая не приводит к существенной деградации полимеров и АФС. Автоклавирование не рекомендуется из-за риска деструкции термочувствительных матриц. Контроль качества после стерилизации следует проводить по показателям содержания АФС, родственных примесей, вязкости и Tgel.

3. При количественном определении кеторолака в гелях обязательно учитывать экспериментально определенную плотность для пересчета массы навески в объем. Пробоподготовку ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА гелей проводить с дополнительным нагреванием (и центрифугированием для полного извлечения АФС. Калибровочные растворы для ВЭЖХ готовить на соответствующей матрице для минимизации матричного эффекта. Скорость сдвига при реологических измерениях — 50 $с^{-1}$ или об/мин, с поправкой на коэффициенты измерительных систем используемого ротационного вискозиметра.

4. При моделировании синовиальной жидкости здорового сустава использовать ФСБР pH 7,4 с добавлением гиалуроновой кислоты в концентрации 2,5 мг/мл; для модели воспаленного сустава — ФСБР pH 6,8 с гиалуроновой кислотой 0,75 мг/мл. Для приготовления сред использовать гиалуроновую кислоту с молекулярной массой 1500–3000 кДа для модели здорового сустава и 200–500 кДа для модели воспаленного сустава. Концентрации обоснованы литературными данными и позволяют адекватно оценивать влияние состава среды на высвобождение.

5. Гели на основе хитозана рекомендуется хранить при температуре 2–8°C в вертикальном положении; предварительный срок годности — 12 месяцев. Гели на основе ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА в разработанной композиции имеют предварительный срок годности 6 месяцев при 2–8°C, что следует учитывать при планировании логистического цикла. Окончательные сроки годности должны быть подтверждены в ходе исследований стабильности на опытно-промышленных сериях. Контроль качества при хранении должен включать определение содержания АФС,

родственных примесей, pH, вязкости, температуры и времени гелеобразования. При отклонении содержания АФС ниже 95% или росте примесей выше 2% продукт бракуется.

6. Разработанные технологические схемы и критические параметры процесса (CPP) могут быть использованы для масштабирования производства до опытно-промышленной партии. Особое внимание следует уделять контролю температуры на всех стадиях (использование реакторов с охлаждающей рубашкой), точности доведения pH, а также валидации процессов фильтрации и стерилизации. Для промышленного производства рекомендуется использовать автоматизированные системы контроля pH и температуры.

7. Для подтверждения пролонгированного анальгетического эффекта и безопасности рекомендуется проведение доклинических исследований на животных с определением концентрации кеторолака в синовиальной жидкости и плазме, а также гистологической оценкой состояния суставного хряща и синовиальной оболочки. Рекомендуется использовать гель на основе хитозана как более стабильный для коммерческой разработки, а гель ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА — как перспективную платформу для доставки других АФС или для исследований с укороченным логистическим циклом.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты диссертационного исследования открывают ряд направлений для дальнейшей научной и практической работы:

1. Необходимо проведение исследований на животных (кролики, крысы) с внутрисуставным введением разработанных гелей для подтверждения пролонгированного анальгетического эффекта, оценки фармакокинетики (концентрация в синовиальной жидкости и плазме), биодеградации полимерных матриц и гистологической безопасности (состояние суставного хряща, синовиальной оболочки, отсутствие воспалительной реакции). Поскольку для данной лекарственной формы не установлена корреляция *in vitro – in vivo* (*IVIVC*), первостепенной задачей является верификация прогностической ценности разработанного теста высвобождения путем параллельного определения концентраций кеторолака *in vivo*. Особое внимание следует уделить сравнительному анализу двух типов гелей и оценке их эффективности в моделях остеоартрита.

2. Для увеличения срока годности ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА геля возможны следующие подходы: подбор стабилизаторов (антиоксиданты, хелаторы металлов, например, α-токоферол или бутилгидрокситолуол); использование более ПЛГА-блоков с большим содержанием лактидных звеньев с замедленной гидролизуемостью; лиофилизация геля с восстановлением перед применением.

3. Разработка опытно-промышленного регламента для производства гелей в условиях GMP, включая валидацию процессов смешивания, фильтрации, стерилизации и фасовки. Подготовка регистрационного досье для подачи в Министерство здравоохранения РФ. Оценка экономической эффективности производства и разработка бизнес-плана для коммерциализации продукта.

4. Применение разработанных полимерных матриц для доставки других нестероидных противовоспалительных средств, а также для доставки глюкокортикостероидов для лечения воспалительных заболеваний суставов. Оценка влияния различных АФС на термочувствительные и реологические свойства матриц.

5. Создание комбинированных гелей с кеторолака трометамином и гиалуроновой кислотой для синергетического действия. Разработка гелей с комбинацией кеторолака и местных анестетиков для послеоперационного обезболивания.

6. Разработка методик определения продуктов деградации полимеров (молочная и гликолевая кислоты) в процессе хранения и в биологических жидкостях для более полного контроля качества. Разработка ускоренных методов оценки стабильности с использованием термического стресса и моделирования гидролиза.

7. Проведение долгосрочных исследований биодеградации полимерных матриц в суставной полости с оценкой продуктов распада, их выведения и влияния на метаболизм хондроцитов. Разработка методов визуализации геля в суставе (МРТ-контрастные агенты, флуоресцентная метка).

8. При успешных результатах доклинических испытаний — планирование и проведение клинических исследований I–II фазы для оценки безопасности, переносимости и эффективности разработанных гелей у пациентов с остеоартритом и другими воспалительными заболеваниями суставов.

9. Таким образом, выполненное диссертационное исследование является основой для создания нового класса отечественных инъекционных гелей с модифицированным высвобождением для лечения заболеваний суставов и имеет перспективы для дальнейшего развития как в научном, так и в практическом аспектах.

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|---|---|
| АФС | Активная фармацевтическая субстанция |
| БКС | Биофармацевтическая классификационная система |
| ВКТР | Верхняя критическая температура растворимости |
| ВР | Вспомогательные работы (в технологической схеме) |
| ВЭЖХ | Высокоэффективная жидкостная хроматография |
| ГПХ | Гельпроникающая хроматография |
| ГФ РФ | Государственная фармакопея Российской Федерации |
| ЕАЭС | Евразийский экономический союз |
| ИК | Инфракрасная спектроскопия |
| ККМ | Критическая концентрация мицеллообразования |
| КТГ | Критическая температура гелеобразования |
| ЛАЛ-тест | LAL-тест (Limulus Amebocyte Lysate) |
| МНН | Международное непатентованное наименование |
| НПВС | Нестероидные противовоспалительные средства |
| НТКР | Нижняя критическая температура растворимости |
| $^{1}$Н-ЯМР | Ядерный магнитный резонанс (спектроскопия) |
| ОФС | Общая фармакопейная статья |
| ПКО | Предел количественного определения |
| ПЛГА | Полимолочная-со-гликолевая кислота |
| ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА | Блок-сополимер полимолочной-со-гликолевой кислоты с полиэтиленгликолем |
| ПО | Предел обнаружения |
| ПЭГ | Полиэтиленгликоль |
| РСД | Относительное стандартное отклонение (RSD) |
| Трис | Трис(гидроксиметил)аминометан |
| УМО | Упаковка, маркировка, отпуск (в технологической схеме) |
| ЦОГ | Циклооксигеназа |
| ЭДТА | Этилендиаминтетрауксусная кислота |
| CQA | Critical Quality Attribute (критический атрибут качества) |
| CPP | Critical Process Parameter (критический параметр процесса) |
| GMP | Good Manufacturing Practice (надлежащая производственная практика) |
| ГК | Гиалуроновая кислота |

| | |
|---|---|
| ICH | International Council for Harmonization (Международный совет по гармонизации) |
| IPC | In-process control (промежуточный контроль) |
| IVIVC | *In vitro – in vivo* correlation (корреляция *in vitro – in vivo*) |
| ФСБР | Фосфатно-солевой буферный раствор |
| QbD | Quality by Design (качество через проектирование) |
| QTPP | Quality Target Product Profile (целевой профиль качества продукта) |
| ROP | Ring-opening polymerization (полимеризация с раскрытием цикла) |
| Tgel | Temperature of gelation (температура гелеобразования) |
| USP | United States Pharmacopeia (Фармакопея США) |
| β-ГФ | β-Глицерофосфат натрия |

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хитозан как основа стимулочувствительных систем: систематический обзор (обзор) / В. С. Пыжов, В. С. Ганыкин, Д. М. Власова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14. – № 2. – С. 88–105.

2. Novel drug delivery systems for NSAIDs in management of rheumatoid arthritis: An overview / S. Thakur, B. Riyaz, A. Patil [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2018. – Vol. 106. – P. 1011–1023.

3. Биосовместимые гидрогели на основе биоразлагаемых полиэфиров и их сополимеров / Ю. С. Фомина, А. А. Князев, В. П. Зубов [и др.] // Коллоидный журнал. – 2023. – Т. 85. – № 5. – С. 682–704.

4. Implantation of *In situ* Gelling Systems for the Delivery of Chemotherapeutic Agents / E. O. Bakhrushina, I. B. Mikhel, L. M. Buraya [et al.] // Gels. – 2024. – Vol. 10. – № 1. – P. 44.

5. Role of Sterilization on *In situ* Gel-Forming Polymer Stability / E. O. Bakhrushina, A. M. Afonina, I. B. Mikhel [et al.] // Polymers (Basel). – 2024. – Vol. 16. – № 20. – P. 2943.

6. Деркач, В. С. Разработка термочувствительного назального *in situ* геля с наночастицами сополимера полимолочной и гликолевой кислот, содержащих фавипиравир / В. С. Деркач, М. Г. Гордиенко // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025. – Т. 28. – № 12. – С. 28–35.

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

8. Polymer Matrices for Reversible Thermogelling Hydrogels: Principles, Fabrication, and Drug Delivery Prospects / V. S. Pyzhov, E. O. Bakhrushina, V. I. Gegechkori [et al.] // Polymers (Basel). – 2026. – Vol. 18. – № 6. – P. 681.

9. Harmonious Biomaterials for Development of *In situ* Approaches for Locoregional Delivery of Anti-cancer Drugs: Current Trends / A. Singh, S. Thakur, T. Sharma [et al.] // Current Medicinal Chemistry. – 2020. – Vol. 27. – № 21. – P. 3463–3498.

10. Synthesis and characterization of poly N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid and their binary blend films properties / S. P. F. Bordín, J. M. Padró, V. G. Josa, M. Romero // ChemRxiv: [сайт]. — 2021. — 21 December. — URL: https://www.researchgate.net/publication/357084987_Synthesis_and_characterization_of_poly_N-isopropylacrylamide-co-acrylic_acid_and_their_binary_blend_films_properties (дата обращения: 04.05.2026). — Текст: электронный.

11. Halperin, A. Poly( N -isopropylacrylamide) Phase Diagrams: Fifty Years of Research / A. Halperin, M. Kröger, F. M. Winnik // Angewandte Chemie International Edition. – 2015. – Vol. 54. – № 51. – P. 15342–15367.

12. Scarpa, J. S. Slow hydrogen-deuterium exchange in a non-α-helical polyamide / J. S. Scarpa, D. D. Mueller, I. M. Klotz // Journal of the American Chemical Society. – 1967. – Vol. 89. – № 24. – P. 6024–6030.

13. Heskins, M. Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide) / M. Heskins, J. E. Guillet // Journal of Macromolecular Science. Part A. Chemistry. – 1968. – Vol. 2. – № 8. – P. 1441–1455.

14. Thermoresponsive polymers and their biomedical application in tissue engineering – a review / F. Doberenz, K. Zeng, C. Willems [et al.] // J. Mater. Chem. B. – 2020. – Vol. 8. – № 4. – P. 607–628.

15. Anti-Infective and Pro-Coagulant Chitosan-Based Hydrogel Tissue Adhesive for Sutureless Wound Closure / X. Du, Y. Liu, X. Wang [et al.] // Biomacromolecules. – 2020. – Vol. 21. – № 3. – P. 1243–1253.

16. Биофармацевтические аспекты дизайна интраназальных лекарственных форм / Н. Б. Демина, Е. О. Бахрушина, А. И. Бардаков, И. И. Краснюк // Фармация. – 2019. – Т. 68. – № 3. – С. 12–17.

17. *In vitro* degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam / C. E. Holy, S. M. Dang, J. E. Davies, M. S. Shoichet // Biomaterials. – 1999. – Vol. 20. – № 13. – P. 1177–1185.

18. Chitosan-based responsive hybrid nanogels for integration of optical pH-sensing, tumor cell imaging and controlled drug delivery / W. Wu, M. Aiello, T. Zhou [et al.] // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31. – № 32. – P. 8371–8381.

19. Cleland, J. L. Emerging protein delivery methods / J. L. Cleland, A. Daugherty, R. Mrsny // Current Opinion in Biotechnology. – 2001. – Vol. 12. – № 2. – P. 212–219.

20. Eeckman, F. Synthesis and characterization of thermosensitive copolymers for oral controlled drug delivery / F. Eeckman, A. J. Moës, K. Amighi // European Polymer Journal. – 2004. – Vol. 40. – № 4. – P. 873–881.

21. Controlled release of insulin from injectable biodegradable triblock copolymer / Y. J. Kim, S. Choi, J. J. Koh [et al.] // Pharmaceutical Research. – 2001. – Vol. 18. – № 4. – P. 548–550.

22. Loh, X. J. Biodegradable Thermogelling Polymers / X. J. Loh, P. L. Chee, C. Owh // Small Methods. – 2019. – Vol. 3. – № 3. – P. 1800174.

23. Jeznach, O. Injectable hydrogels and nanocomposite hydrogels for cartilage regeneration / O. Jeznach, D. Kołbuk, P. Sajkiewicz // Journal of Biomedical Materials Research. Part A. – 2018. – Vol. 106. – № 10. – P. 2762–2776.

24. Conductive hydrogel-based on chitosan-aniline pentamer/gelatin/agarose significantly promoted motor neuron-like cells differentiation of human olfactory ecto-mesenchymal stem cells / Z.

Bagher, Z. Atoufi, R. Alizadeh [et al.] // Materials Science and Engineering: C. – 2019. – Vol. 101. – P. 243–253.

25. Roy, D. New directions in thermoresponsive polymers / D. Roy, W. L. A. Brooks, B. S. Sumerlin // Chemical Society Reviews. – 2013. – Vol. 42. – № 17. – P. 7214–7243.

26. Thermoresponsive polymers with LCST transition: synthesis, characterization, and their impact on biomedical frontiers / Y. Yuan, Y. Liu, Y. Zhang [et al.] // RSC Applied Polymers. – 2023. – Vol. 1. – № 2. – P. 158–189.

27. Thermoresponsive Polymer Assemblies: From Molecular Design to Theranostics Application / S.-L. Qiao, Y. Wang, Y. Ma [et al.] // Progress in Polymer Science. – 2022. – Vol. 131. – P. 101578.

28. Thermo-sensitive polymers in medicine: A review / P. Zarrintaj, M. Jouyandeh, M. R. Ganjali [et al.] // European Polymer Journal. – 2019. – Vol. 117. – P. 402–423.

29. New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems / B. Jeong, Y. H. Bae, D. S. Lee, S. W. Kim // Journal of Controlled Release. – 1999. – Vol. 62. – № 1–2. – P. 109–114.

30. Thermogels: *In situ* Gelling Biomaterial / S. S. Liow, Q. Dou, D. Kai [et al.] // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2016. – Vol. 2. – № 3. – P. 295–316.

31. Ward, M. A. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications / M. A. Ward, T. K. Georgiou // Polymers. – 2011. – Vol. 3. – № 3. – P. 1215–1242.

32. Constantinou, A. P. Tuning the gelation of thermoresponsive gels / A. P. Constantinou, T. K. Georgiou // European Polymer Journal. – 2016. – Vol. 78. – P. 366–375.

33. Thermosensitive behavior of hydrophobically associating anionic guar gum solutions and gels / C. Wang, Y. Li, H. Zhang [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – Vol. 111. – P. 169–177.

34. Flory theory of randomly branched polymers / R. Everaers, A. Y. Grosberg, M. Rubinstein, A. Rosa // Soft Matter. – 2017. – Vol. 13. – № 6. – P. 1223–1234.

35. Gil, E. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates / E. Gil, S. Hudson // Progress in Polymer Science. – 2004. – Vol. 29. – № 12. – P. 1173–1222.

36. Zeng, F. Molecular chain properties of poly(N-isopropylacrylamide) / F. Zeng, Z. Tong, T. Sato // Science China Series B: Chemistry. – 1999. – Vol. 42. – № 3. – P. 290–297.

37. Thermo-sensitivity and triggered drug release of polysaccharide nanogels derived from pullulan-g-poly(L-lactide) copolymers / S. Seo, C.-S. Lee, Y.-S. Jung, K. Na // Carbohydrate Polymers. – 2012. – Vol. 87. – № 2. – P. 1105–1111.

38. Thermosensitive Polymer Biocompatibility Based on Interfacial Structure at Biointerface / D. Murakami, M. Kobayashi, M. Morita [et al.] // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2018. – Vol. 4. – № 5. – P. 1591–1597.

39. On-line observation of hydrogels during swelling and LCST-induced changes / S. Hashmi, A. GhavamiNejad, F. O. Obiweluozor [et al.] // Korea-Australia Rheology Journal. – 2012. – Vol. 24. – № 3. – P. 191–198.

40. Design and synthesis study of the thermo-sensitive poly(N-vinylpyrrolidone-b-N,N-diethylacrylamide) / X. Zhang, D. Wu, J. Shen [et al.] // Designed Monomers and Polymers. – 2018. – Vol. 21. – № 1. – P. 43–54.

41. Hydrogels based on PAAm network with PNIPAAm included: hydrophilic–hydrophobic transition measured by the partition of Orange II and Methylene Blue in water / M. R. Guilherme, G. M. Campese, E. Radovanovic [et al.] // Polymer. – 2003. – Vol. 44. – № 15. – P. 4213–4219.

42. Poloxamer-based stimuli-responsive biomaterials / P. Zarrintaj, J. D. Ramsey, A. Samadi [et al.] // Materials Today: Proceedings. – 2018. – Vol. 5. – № 7. – P. 15516–15523.

43. Application of a novel thermo-sensitive injectable hydrogel in therapy *in situ* for drug accurate controlled release / X. Kong, Y. Wang, X. Li [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials. – 2020. – Vol. 108. – № 8. – P. 3200–3216.

44. Development and curing potential of epoxy/starch-functionalized graphene oxide nanocomposite coatings / E. Yarahmadi, K. Didehban, M. Rezaei [et al.] // Progress in Organic Coatings. – 2018. – Vol. 119. – P. 194–202.

45. Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials / B. Bakhshandeh, P. Zarrintaj, M. O. Oftadeh [et al.] // Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. – 2017. – Vol. 33. – № 2. – P. 144–172.

46. Hyperbranched poly(ethyleneimine) physically attached to silica nanoparticles to facilitate curing of epoxy nanocomposite coatings / S. Ghiyasi, S. M. Sajadi, P. Zarrintaj, M. R. Saeb // Progress in Organic Coatings. – 2018. – Vol. 120. – P. 100–109.

47. Influence of hydrodynamic pressure on chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells cultured in perfusion system / S. Zamanlui, M. Haghbin Nazarpak, M. Solati Hashjin [et al.] // Biologicals. – 2018. – Vol. 56. – P. 1–8.

48. The design of pH-sensitive chitosan-based formulations for gastrointestinal delivery / H. Du, X. Yang, X. Pang, G. Zhai // Drug Discovery Today. – 2015. – Vol. 20. – № 8. – P. 1004–1011.

49. Application of a novel Electroactive Agarose-Aniline Pentamer Platform as a Potential Candidate for Neural Tissue Engineering / P. Zarrintaj, B. Bakhshandeh, I. Rezaeian [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 17187.

50. Bio-Conductive Scaffold Based on Agarose-Polyaniline for Tissue Engineering / P. Zarrintaj, I. Rezaeian, B. Bakhshandeh [et al.] // Journal of Skin and Stem Cell. – 2017. – Vol. 4. – № 2. – P. e67394.

51. Cononsolvency of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM): Microgels versus linear chains and macrogels / C. Scherzinger, A. Schwarz, A. Bardow [et al.] // Current Opinion in Colloid & Interface Science. – 2014. – Vol. 19. – № 2. – P. 84–94.

52. Poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate-grafted chitosan-based micro- and nanoparticles as a drug delivery system for antibiotics / C.-L. Logigan, M. V. Dinu, E. S. Dragan [et al.] // Polymers. – 2024. – Vol. 16. – № 1. – P. 144.

53. Racine, L. Chitosan-based hydrogels: recent design concepts to tailor properties and functions / L. Racine, I. Texier, R. Auzély-Velty // Polymer International. – 2017. – Vol. 66. – № 7. – P. 981–998.

54. Preparation and Characterization of Biodegradable Sponge-like Cryogel Particles of Chitosan via the Inverse Leidenfrost (iLF) Effect / E. Ciptawati, A. B. Nugraha, R. N. Sari [et al.] // ACS Omega. – 2024. – Vol. 9. – № 2. – P. 2383–2390.

55. Intra-articular Administration of Chitosan-based Thermosensitive *In situ* Hydrogels Combined With Diclofenac-sodium-loaded Alginate Microspheres / X. Qi, Y. Xu, W. Wu [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2016. – Vol. 105. – № 1. – P. 122–130.

56. PCL-PEG copolymer-based injectable thermosensitive hydrogels / M. R. Dethe, A. Prabakaran, H. Ahmed [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2022. – Vol. 343. – P. 217–236.

57. Zhao, X. Single-component thermo-gelling electroactive hydrogels from poly(caprolactone)–poly(ethylene glycol)–poly(caprolactone) graft aniline tetramer amphiphilic copolymers / X. Zhao, B. Guo, P. X. Ma // Journal of Materials Chemistry B. – 2015. – Vol. 3. – № 43. – P. 8459–8468.

58. Recent Advances of Chitosan Formulations in Biomedical Applications / M. A. S. Abourehab, S. Pramanik, M. A. Abdelgawad [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 18. – P. 10975.

59. Younes, I. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications / I. Younes, M. Rinaudo // Marine Drugs. – 2015. – Vol. 13. – № 3. – P. 1133–1174.

60. Chitosan: Gels and interfacial properties / J. Nilsen-Nygaard, S. P. Strand, K. M. Vårum [et al.] // Polymers. – 2015. – Vol. 7. – № 3. – P. 552–579.

61. Kean, T. Chitin and Chitosan: Sources, Production and Medical Applications / T. Kean, M. Thanou // Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials. – The Royal Society of Chemistry, 2011. – P. 292–318.

62. Khan, T. A. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods / T. A. Khan, K. K. Peh, H. S. Ch'ng // Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2002. – Vol. 5. – № 3. – P. 205–212.

63. Antibacterial Effects of Water-Soluble Low-Molecular-Weight Chitosans on Different Microorganisms / D. V. Gerasimenko, I. D. Avdienko, G. E. Bannikova [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2004. – Vol. 40. – № 3. – P. 253–257.

64. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity / C. Qin, Y. Du, L. Xiao [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2002. – Vol. 31. – № 1–3. – P. 111–117.

65. Enzymic preparation of acid-free water-soluble chitosan / A. V. Ilyina, V. E. Tikhonov, A. I. Albulov, V. P. Varlamov // Process Biochemistry. – 2000. – Vol. 35. – № 6. – P. 563–568.

66. Пыжов, В. С. Результаты исследования термочувствительных свойств композиций на основе хитозана лактата / В. С. Пыжов, Д. М. Власова, Е. О. Бахрушина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2024. – Т. 27. – № 7. – С. 3-10.

67. Kou, S. G. Chitosan: A review of sources and preparation methods / S. G. Kou, L. M. Peters, M. R. Mucalo // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 169. – P. 85–94.

68. Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications / H. Y. Zhou, L. J. Jiang, P. P. Cao [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2015. – Vol. 117. – P. 524–536.

69. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels *in situ* / A. Chenite, C. Chaput, D. Wang [et al.] // Biomaterials. – 2000. – Vol. 21. – № 21. – P. 2155–2161.

70. Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol phosphate solutions / A. Chenite, M. Buschmann, D. Wang [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2001. – Vol. 46. – № 1. – P. 39–47.

71. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs / E. Ruel-Gariépy, A. Chenite, C. Chaput [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2000. – Vol. 203. – № 1–2. – P. 89–98.

72. Пыжов, В. С. Разработка и исследование термочувствительной системы доставки лекарственных средств на основе композиции хитозан/β-глицерофосфат / В. С. Пыжов, Е. О. Бахрушина // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2025. – № 1. – С. 126–130.

73. A chitosan/β-glycerophosphate thermo-sensitive gel for the delivery of ellagic acid for the treatment of brain cancer / S. Kim, J.-H. Kim, O. Jeon [et al.] // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31. – № 14. – P. 4157–4166.

74. Jiang, G. PEG-g-chitosan thermosensitive hydrogel for implant drug delivery: Cytotoxicity, *in vivo* degradation and drug release / G. Jiang, J. Sun, F. Ding // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2014. – Vol. 25. – № 3. – P. 241–256.

75. Physical gelation of chitosan in the presence of β-glycerophosphate: The effect of temperature / J. Cho, M.-C. Heuzey, A. Bégin, P. J. Carreau // Biomacromolecules. – 2005. – Vol. 6. – № 6. – P. 3267–3275.

76. Exploration of the nature of a unique natural polymer-based thermosensitive hydrogel / S. Lu, W. Liu, Z. Wang [et al.] // Soft Matter. – 2016. – Vol. 12. – № 2. – P. 492–499.

77. Poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid)-based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications / A. Alexander, Ajazuddin, J. Khan, S. Saraf // Journal of Controlled Release. – 2013. – Vol. 172. – № 3. – P. 715–729.

78. Engineer, C. Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system / C. Engineer, J. Parikh, A. Raval // Trends in Biomaterials and Artificial Organs. – 2011. – Vol. 25. – № 2. – P. 79–85.

79. Wu, X. S. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: biodegradation / X. S. Wu, N. Wang // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2001. – Vol. 12. – № 1. – P. 21–34.

80. Park, T. G. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition / T. G. Park // Biomaterials. – 1995. – Vol. 16. – № 15. – P. 1123–1130.

81. Poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) triblock copolymer and thermoreversible phase transition in water / M. S. Shim, H. T. Lee, W. S. Shim [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research. – 2002. – Vol. 61. – № 2. – P. 188–196.

82. Yu, L. Influence of LA and GA sequence in the PLGA block on the properties of thermogelling PLGA-PEG-PLGA block copolymers / L. Yu, Z. Zhang, J. Ding // Biomacromolecules. – 2011. – Vol. 12. – № 4. – P. 1290–1297.

83. Effects of Molecular Weight and Its Distribution of PEG Block on Micellization and Thermogellability of PLGA-PEG-PLGA Copolymer Aqueous Solutions / L. Chen, T. Ci, L. Yu, J. Ding // Macromolecules. – 2015. – Vol. 48. – № 11. – P. 3662–3671.

84. Synthesis and characterization of PLGA-PEG-PLGA-based thermosensitive polyurethane micelles for potential drug delivery / M. Wang, Y. Zhang, Y. Li [et al.] // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2020. – Vol. 32. – № 5. – P. 613–634.

85. Amphiphilic PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer nanogels varying in gelation temperature and modulus for the extended and controlled release of hyaluronic acid / L. L. Osorno, D. E. Maldonado, R. J. Whitener [et al.] // Journal of Applied Polymer Science. – 2020. – Vol. 137. – № 25. – P. 48678.

86. Effect of PLGA block molecular weight on gelling temperature of PLGA-PEG-PLGA thermoresponsive copolymers / N. Y. Steinman, E. Haimov, R. Aharoni [et al.] // Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. – 2019. – Vol. 57. – № 1. – P. 35–39.

87. Temperature-sensitive biodegradable mixed star-shaped block copolymers hydrogels for an injection application / P. Zou, Y. Yang, S. Li [et al.] // Polymer. – 2012. – Vol. 53. – № 6. – P. 1245–1257.

88. Jeong, B. *In situ* gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof / B. Jeong, Y. H. Bae, S. W. Kim // Journal of Biomedical Materials Research. – 2000. – Vol. 50. – № 2. – P. 171–177.

89. Jeong, B. Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications / B. Jeong, A. Gutowska // Trends in Biotechnology. – 2002. – Vol. 20. – № 7. – P. 305–311.

90. Linse, P. Temperature-dependent micellization in aqueous block copolymer solutions / P. Linse, M. Malmsten // Macromolecules. – 1992. – Vol. 25. – № 20. – P. 5434–5439.

91. Cui, S. Thermogelling of Amphiphilic Block Copolymers in Water: ABA-Type versus AB or BAB-Type / S. Cui, L. Yu, J. Ding // Macromolecules. – 2019. – Vol. 52. – № 10. – P. 3697–3715.

92. Study of the effect of active pharmaceutical ingredients of various classes of BCS on the parameters of thermosensitive systems based on poloxamers / E. O. Bakhrushina, M. N. Anurova, A. V. Belyatskaya [et al.] // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2023. – Vol. 31. – № 10. – P. 101780.

93. Krishna Prasad, G. V. Post-operative analgesia techniques after total knee arthroplasty: A narrative review / G. V. Krishna Prasad // Saudi Journal of Anaesthesia. – 2020. – Vol. 14. – № 1. – P. 85–90.

94. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Treatment of Retinal Diseases / E. B. Rodrigues, M. E. Farah, J. M. Bottós, F. Bom Aggio // Developments in Ophthalmology. – 2016. – Vol. 55. – P. 212–220.

95. Sinha, V. R. Ketorolac tromethamine formulations: an overview / V. R. Sinha, R. V. Kumar, G. Singh // Expert Opinion on Drug Delivery. – 2009. – Vol. 6. – № 9. – P. 961–975.

96. Katz, W. A. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors in the management of acute and perioperative pain / W. A. Katz // Cleveland Clinic Journal of Medicine. – 2002. – Vol. 69, Suppl. 1. – P. SI65–SI75.

97. Analgesic effect of intra-articular ketorolac in knee arthroscopy: comparison of morphine and bupivacaine / J. Calmet, C. Esteve, S. Boada, A. Ginés // Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. – 2004. – Vol. 12. – № 6. – P. 552–555.

98. Gillis, J. C. Ketorolac. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in pain management / J. C. Gillis, R. N. Brogden // Drugs. – 1997. – Vol. 53. – № 1. – P. 139–188.

99. Mallinson, T. E. A review of ketorolac as a prehospital analgesic / T. E. Mallinson // Journal of Paramedic Practice. – 2017. – Vol. 9. – № 12. – P. 522–526.

100. Williams, B. S. Nonopioid analgesics: NSAIDs, COX-2 inhibitors, and acetaminophen / B. S. Williams, A. Buvanendran // Essentials of Pain Medicine. – New York : Elsevier, 2011. – P. 130–139.

101. Hersh, E. V. Nonopioid Analgesics / E. V. Hersh, R. A. Dionne // Pharmacology and Therapeutics for Dentistry. – St. Louis : Elsevier, 2017. – P. 257–275.

102. Characterization of forced degradation products of ketorolac tromethamine using LC/ESI/Q/TOF/MS/MS and in silico toxicity prediction / P. D. Kalariya, P. N. Patel, M. G. Kalariya [et al.] // Journal of Mass Spectrometry. – 2014. – Vol. 49. – № 5. – P. 380–391.

103. Degradation Study of Ketorolac Tromethamine by a Validated UPLC Method / M. N. Uddin, M. M. Hasan, M. S. Hossain [et al.] // Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology. – 2018. – Vol. 6. – № 1. – P. 11.

104. Suit, P. F. DNA quantitation by image cytometry of touch preparations from fresh and frozen tissue / P. F. Suit, T. W. Bauer // American Journal of Clinical Pathology. – 1990. – Vol. 94. – № 1. – P. 49–53.

105. Intra-articular Injections of the Hip and Knee With Triamcinolone vs Ketorolac: A Randomized Controlled Trial / K. Jurgensmeier, I. Kutzner, Y. El Gazzar [et al.] // The Journal of Arthroplasty. – 2021. – Vol. 36. – № 2. – P. 416–422.

106. The European medical information framework: A novel ecosystem for sharing healthcare data across Europe / S. Lovestone, EMIF Consortium // Learning Health Systems. – 2020. – Vol. 4. – № 2. – P. e10214.

107. Current Approaches for *in vitro* Drug Release Study of Long-Acting Parenteral Formulations / T. Dadhaniya, P. Patel, J. Patel [et al.] // Current Drug Delivery. – 2015. – Vol. 12. – № 3. – P. 256–270.

108. Development and validation of an *in vitro* release test (IVRT) method for a locally acting mesalamine suppository / L. Xie, H. Li, Y. Zhang [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2025. – Vol. 686. – Art. 126288.

109. ОФС.1.4.2.0014.15. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание. Т. 1. – Москва : Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2023. – URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-2/rastvorenie-dlya-tvyerdykh-dozirovannykh-lekarstvennykh-form/ (дата обращения: 25.05.2025). – Текст : электронный.

110. ОФС.1.4.2.0015.15. Растворение для суппозиториев на липофильной основе // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание. Т. 1. – Москва : Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2023. – URL: regmed.ru (дата обращения: 25.05.2025). – Текст: электронный.

111. USP General Chapter <1092>. The Dissolution Procedure: Development and Validation // United States Pharmacopeia. USP 43–NF 38. – Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2020. – Текст: непосредственный.

112. Lusina Kregar, M. An Overview of *In vitro* Release Methods for Long-Acting Injectable Products Based on PLGA / M. Lusina Kregar, I. Krtalić, I. Šagud // Methods and Protocols. – 2026. – Vol. 9. – № 3. – P. 87.

113. Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза: Решение Совета

Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85: [в ред. от 12.04.2024 № 30] // Альта-Софт: таможенный онлайн-справочник. – URL: https://www.alta.ru/tamdoc/16sr0085/ (дата обращения: 25.05.2025). – Текст: электронный.

114. Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств: Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. № 113 // Альта-Софт: таможенный онлайн-справочник. – URL: https://www.alta.ru/tamdoc/18kr0113/ (дата обращения: 25.05.2025). – Текст: электронный.

115. ОФС 2.3.14.0. Валидация аналитических методик (203140000-2022) // Фармакопея Евразийского экономического союза: утверждена Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100: [в ред. от 25.06.2024 № 75]. – Т. 1. – Москва : КонсультантПлюс, 2024. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_359911/495677ebb0ed89c4bb4cc9006e1a05a78a11b356/ (дата обращения: 25.05.2025). – Текст: электронный.

116. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание. Т. 1. – Москва : Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2023. – URL: regmed.ru (дата обращения: 25.05.2025). – Текст: электронный.

117. Красивина, И. Г. Терапевтическая ниша производных гиалуроновой кислоты при остеоартрозе / И. Г. Красивина, Л. Н. Долгова, Н. В. Долгов // Медицинский совет. – 2021. – № 10. – С. 123–132.

118. Hyaluronan supplementation as a mechanical regulator of cartilage tissue development under joint kinematic mimicking loading / Y. Wu, M. J. Stoddart, J. J. Bara [et al.] // Journal of the Royal Society Interface. – 2017. – Vol. 14. – № 133. – P. 20170255.

119. Патент № US 20230358730 A1 Соединенные Штаты Америки, МПК A61K 35/15 (2006.01). Simulated synovial fluids for modeling degenerative joint diseases and screening for therapeutics for same : № 18/312321 : заявл. 04.05.2023 : опубл. 09.11.2023 / A. Bowles-Welch, N. Willett, A. J. Garcia [et al.] ; заявитель Georgia Tech Research Corp // Google Patents. – URL: https://patents.google.com/patent/US20230358730A1/ (дата обращения: 25.05.2025). – Текст : электронный.

120. Blewis, M. E. Interactive Cytokine Regulation of Synoviocyte Lubricant Secretion / M. E. Blewis, G. E. Nugent, M. A. Nugent // Tissue Engineering. Part A. – 2010. – Vol. 16. – № 4. – P. 1329–1337.

121. Luo, Y. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery / Y. Luo, K. R. Kirker, G. D. Prestwich // J. Control. Release. – 2000. – Vol. 69. – № 1. – P. 169–184.

122. Wójcik-Pastuszka, D. Influence of the Acceptor Fluid on the Bupivacaine Release from the Prospective Intra-Articular Methylcellulose Hydrogel / D. Wójcik-Pastuszka, A. Frąk, W. Musiał // Pharmaceutics. – 2024. – Vol. 16. – № 7. – P. 936.

123. ОФС.0.0.0000. Рекомендации по проведению испытания на растворение [Проект] // Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание : фармакопейные проекты. – Москва : Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2023. – URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia-projects/izdanie-15/rekomendatsii-po-provedeniyu-ispytaniya-na-rastvorenie/?vers=8035 (дата обращения: 25.05.2025). – Текст : электронный.

124. Chidambaram, N. A novel *in vitro* release method for submicron sized dispersed systems / N. Chidambaram, D. J. Burgess // AAPS PharmSci. – 1999. – Vol. 1. – № 3. – P. E11.

125. Zygourakis, K. Development and temporal evolution of erosion fronts in bioerodible controlled release devices / K. Zygourakis // Chemical Engineering Science. – 1990. – Vol. 45. – № 8. – P. 2359–2366.

126. *In vitro–in vivo* correlation (IVIVC) development for long-acting injectable drug products based on poly(lactide-co-glycolide) / Y. Wang, Y. Liu, X. Zhang, Y. Chen, J. Li // Journal of Controlled Release. – 2025. – Vol. 377. – P. 186–196.

127. Фармацевтическая разработка (ICH Q8). Перевод: PharmAdvisor, версия перевода от 04.12.2020. [Электронный ресурс]. – URL: https://pharmadvisor.ru/document/tr3614/ (дата обращения: 27.05.2025). – Текст : электронный.

128. Vatankhah Barenji, R. Blockchain-enabled quality by design system for clinical trials / R. Vatankhah Barenji, R. E. Hariry // Frontiers in Medicine. – 2025. – Vol. 12. – P. 1546897.

129. Perspectives in modeling and model validation during analytical quality by design chromatographic method evaluation: a case study / Y. Dong, Y. Zhou, L. Zhang, S. Wang, H. Li // AAPS Open. – 2021. – Vol. 7. – № 1. – P. 3.

130. Управление рисками для качества (ICH Q9(R1)). Перевод: PharmAdvisor, версия перевода от 3/21/2023. [Электронный ресурс]. – URL: https://pharmadvisor.ru/document/tr3660/ (дата обращения: 27.05.2025). – Текст : электронный.

131. Система фармацевтического качества (ICH Q10). Перевод: PharmAdvisor, версия перевода от 15.06.2021. [Электронный ресурс]. – URL: https://pharmadvisor.ru/document/tr3641/ (дата обращения: 27.05.2025). – Текст : электронный.

132. ICH Q12 Technical and regulatory considerations for pharmaceutical product lifecycle management – Scientific guideline [Электронный ресурс]. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/ich-q12-technical-regulatory-considerations-pharmaceutical-product-lifecycle-management-scientific-guideline (дата обращения: 27.05.2025). – Текст : электронный.

133. ICH Q14 Guideline on analytical procedure development – Step 5 – Revision 1 [Электронный ресурс]. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/ich-q14-analytical-procedure-development-scientific-guideline (дата обращения: 27.05.2025). – Текст : электронный.

134. ICH Q2(R2) guideline on validation of analytical procedures – Step 5 – Revision 2 [Электронный ресурс]. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline (дата обращения: 27.05.2025). – Текст : электронный.

135. Комплексная оценка технологической готовности инновационного проекта при разработке фармацевтического продукта / А. М. Пятигорский, Н. В. Пятигорская, Е. О. Бахрушина, Н. Б. Демина // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2023. – Т. 78. – № 3. – С. 234–241.

136. Yaparla, S. R. Applications and Principles of Quality by Design (QbD) in European Union Regulatory Dossiers for Medicinal Products from 2020 to 2023 / S. R. Yaparla, K. Yetukuri // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research. – 2024. – P. 279–285.

137. ОФС.1.4.2.0003. Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения [Электронный ресурс]. – URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-2/izvlekaemyy-obyem-lekarstvennykh-form-dlya-parenteralnogo-primeneniya/ (дата обращения: 25.05.2025). – Текст : электронный.

138. General Chapter, ⟨1724⟩ Semisolid Drug Products—Performance Tests // USP–NF. – Rockville, MD : United States Pharmacopeia, 2023.

139. PLGA-Based *In situ*-Forming Implants, a Quality by Design Perspective / N. Campos Morales, I. M. Rodríguez Cruz, V. M. Sánchez Nava, A. García López // Pharmaceutics. – 2026. – Vol. 18. – № 3. – P. 123.

140. Патент № RU 2 525 235 C1 Российская Федерация, МПК B01J 37/12 (2006.01); B01J 37/14 (2006.01); B01J 31/12 (2006.01); B01J 23/14 (2006.01); C07F 7/22 (2006.01); C08G 63/85 (2006.01). Способ получения катализатора полимеризации лактонов или поликонденсации альфа-оксикислот : № 2013122939/04 : заявл. 20.05.2013 : опубл. 10.08.2014 / Д. К. Поляков, Ю. И. Кирюхин, Н. Г. Седуш, Т. Е. Григорьев, С. Н. Чвалун ; заявитель ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» // Google Patents. – URL: https://patents.google.com/patent/RU2525235C1/ru (дата обращения: 23.10.2023). – Текст : электронный.

141. Патент № RU 2 857 178 C1 Российская Федерация, МПК C08L 71/02 (2006.01); C08F 2/00 (2006.01); C08G 63/664 (2006.01); C08F 4/16 (2006.01). Способ получения сополимеров плга-пэг для создания термочувствительной системы доставки лекарств : № 2025115948 : заявл. 07.06.2025 : опубл. 26.02.2026 / В. С. Пыжов // Роспатент.платформа : официальный сайт. – URL:

https://searchplatform.rospatent.gov.ru/doc/RU2857178C1_20260226?q=&from=search_simple&hash=-1640742019 (дата обращения: 26.02.2026). – Текст : электронный.

142. Руководство по экспертизе лекарственных средств : в 3 томах. – Москва : Типография Миттель Пресс, 2025. – 424 с.

143. Preparation and *in vitro* evaluation of injectable formulations of levothyroxine sodium using *in situ* forming hydrogel temperature-responsive systems based on PLA-PEG-PLA and PLGA-PEG-PLGA triblock copolymers / J. Movaffagh, B. S. F. Bazzaz, M. Sadeghi, S. M. R. Hosseini, M. A. Bazzaz // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. – 2022. – Vol. 25. – № 3. – P. 341–351.

144. Изучение вопросов поддержания стабильности термочувствительных систем на основе полоксамеров при автоклавировании / Е. О. Бахрушина, А. М. Афонина, В. С. Пыжов [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14. – № 4. – С. 60–67.

**Приложение А. Патент Российской Федерации**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2857178

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СОПОЛИМЕРОВ ПЛГА-ПЭГ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

Патентообладатель: *Пыжов Виктор Сергеевич (RU)*

Автор(ы): *Пыжов Виктор Сергеевич (RU)*

Заявка № **2025115948**
Приоритет изобретения **07 июня 2025 г.**
Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **26 февраля 2026 г.**
Срок действия исключительного права на изобретение истекает **07 июня 2045 г.**

*Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности*

*Ю.С. Зубов*

## Приложение Б. Акт внедрения в учебный процесс

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
Сеченова Минздрава России (Сеченовский
Университет)
к.фарм.н., доцент
_____ Литвинова Т.М.
"24" ДЕК 2025 г.

24 ДЕК 2025

825

**АКТ**

о внедрении результатов диссертации Пыжова Виктора Сергеевича в учебный процесс Института Фармации им А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Пыжова Виктора Сергеевича

на тему «Разработка состава и технологии термочувствительной системы доставки кеторолака трометамина с модифицированным высвобождением»
внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института Фармации им А.П. Нелюбина и кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармации им А.П. Нелюбина

при изучении дисциплин «Фармацевтическая технология», «Частная фармацевтическая технология», «Надлежащие практики в обращении лекарственных средств», читаемых студентам по направлению подготовки 33.05.01 Фармация.

| | |
|---|---|
| д.фарм.н., профессор по кафедре клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, Директор Института Фармации им. А.П. Нелюбина | _____ Раменская Г.В. |
| к.фарм.н, доцент, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармации им А.П. Нелюбина | _____ Кузина В.Н. |
| к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической технологии Института Фармации им А.П. Нелюбина, заведующая учебной частью кафедры фармацевтической технологии | _____ Растопчина О.В. |
| Начальник Учебного управления | _____ Юдина Л.Ю. |

**Приложение В. Акт внедрения в производственный процесс ООО «Компания «Деко»**

«КОМПАНИЯ «ДЕКО»
Общество с ограниченной ответственностью
ИНН / КПП 7731205648 / 771601001
129344 г.Москва, ул.Енисейская д.3, корп.4
ОКПО 42420561, ОГРН 1027739254960

УТВЕРЖДАЮ

(*подпись*)/ (*расшифровка*)

«09» февраля 2026 г.

АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы

Основные научные положения, выводы и рекомендации научно-исследовательской работы Пыжова Виктора Сергеевича на тему «Разработка состава и технологии термочувствительной системы доставки кеторолака трометамина с модифицированным высвобождением» внедрены в рабочий процесс работы отдела исследований и разработок в части планирования разработки и производства номенклатуры инновационных мягких лекарственных форм с пролонгированным высвобождением, в частности предназначенных для парентерального введения.

09.02.2026
Дата

Подпись

(499) 1896325
(495) 7305687
(48233) 77166
dekopharm@mail.ru

**Приложение Г. Акт внедрения в производственный процесс ООО «ЛИНЭРС»**

LEENERS Biotech

Общество с ограниченной ответственностью "ЛИНЭРС"
ИНН 7728471777 КПП 772701001 ОГРН 1197746350966
117186, Г. МОСКВА, ВН.ТЕР.Г. МУНИЦИПАЛЬНЫЙ ОКРУГ
КОТЛОВКА, УЛ НАГОРНАЯ, Д. 3А

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ООО "ЛИНЭРС"
_____ С.В. Дидук
«19» января 2026 г.

АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы Пыжова Виктора Сергеевича в работу биотехнологической компании ООО "ЛИНЭРС" в части разработки инновационных биотехнологических лекарственных препаратов.

Данный акт подтверждает, что основные научные положения, выводы и рекомендации научно-исследовательской работы

Пыжова Виктора Сергеевича

на тему «Разработка состава и технологии термочувствительной системы доставки кеторолака трометамина с модифицированным высвобождением» внедрены в рабочий процесс ООО "ЛИНЭРС" в части создания инновационных лекарственных средств на основе биотехнологической платформы, используемой в разработке препаратов, содержащих терапевтические рекомбинантные белки и пептиды.

Генеральный директор,
ООО «ЛИНЭРС»
Кандидат биологических наук — С. В. Дидук