

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора фармацевтических наук, профессора Алексеева Константина Викторовича, на диссертацию Бу Лугэнь «Разработка лекарственной формы противоопухолевого препарата на основе гликозидного производного индолокарбазола», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.01 - технология получения лекарств в диссертационный совет ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Актуальность темы исследования

В настоящее время базовым методом лечения злокачественных опухолей является химиотерапия. Создание новых противоопухолевых препаратов, действие которых направлено на избирательное разрушение опухолевой ткани, представляет актуальную задачу современной медицинской науки.

В результате биологических исследований в рамках скрининга новых гликозидных производных индолокарбазола, синтезированных в научно-исследовательском институте экспериментальной диагностики и терапии опухолей федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, для дальнейшего углубленного изучения отобрано соединение ЛХС-1269, которое показало высокую противоопухолевую активность на моделях асцитных (Эрлиха, лимфолейкозе Р388) и солидных (меланоме В16, эпидермоидной карциноме легкого Льюис, аденокарциноме молочной железы Са755, раке шейки матки и раке толстого кишечника АКАТОЛ) опухолей. Отличительной особенностью механизма действия ЛХС-1269 является способность блокировать васкулогенную мимикрию, то есть оказывать антиангиогенное действие.

Исследуемая субстанция ЛХС-1269 практически нерастворима в воде и

большинстве органических растворителей, что является существенной проблемой для разработки ее инъекционной лекарственной формы. В связи с этим для улучшения биологической и фармацевтической доступности данного гликозидного производного индолокарбазола (ГПИ) соискателем предложено использование современного технологического подхода – включение гидрофобной субстанции в липидные наночастицы – липосомы.

Целью исследования являлась разработка липосомальной лекарственной формы ЛХС-1269 для инъекционного применения.

Научная новизна и теоретическая значимость исследований

Доказано, что эффективность инкапсуляции гидрофобной субстанции ЛХС-1269 в липосомы обусловлена количественным соотношением липидных компонентов бислоя – фосфатидилхолин (ФХ)/холестерин/полиэтиленгликоль-2000-дистеароифосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ДФА). Удержание ФС внутри везикулы объясняется увеличением доли холестерина в липосомальной мембране, стабилизирующего ее структуру.

Установлена корреляция вязкости дисперсии ЛХС-1269 с общей концентрацией липосомальных липидов, значения которой колеблются в диапазоне от 7,0 до 13,6 мПа·с.

Методом спектроскопии динамического светорассеяния подтверждено, что средний диаметр модельных липосом, вне зависимости от соотношения липидов в липосомальной мембране и ЛХС-1269/ФХ, не превышает размер везикул 220 нм.

Исследования состава композиции показали, что состав композиции с молярным соотношением ЛХС-1269/ФХ=1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДФА = 1:0,33:0,003, обеспечивает включение ЛХС-1269 на уровне 98% и приемлемые физико-химические характеристики.

Сравнительное изучение влияния типа мембран в технологии экструзии показало, что наиболее результативной является мембрана из поликарбоната.

Подтверждено, что технология экструзии с применением поликарбонатных фильтров способствует получению наиболее качественной

липосомальной дисперсии, обладающей оптимальным размером везикул и сохраняющей высокий уровень включения активной субстанции.

Сравнительная оценка лиофилизатов по показателям качества продемонстрировала, что сахароза, вводимая в состав липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ) ЛХС-1269 в молярном соотношении сахароза/ФХ 5:1, обладает оптимальными криопротективными свойствами.

При выборе технологической стадии введения криопротектора доказано, что растворение сахарозы в дисперсии однослойных липосом (ОСЛ) ЛХС-1269 обеспечивает получение полупродуктов с лучшими показателями качества.

Экспериментально обосновано применение технологии лиофилизации для повышения стабильности при хранении ЛЛФ ЛХС-1269 для инъекционного применения.

Теоретическая значимость работы заключается в:

- разработке концептуальной модели липосомальной лекарственной формы для инъекционного применения, содержащей труднорастворимую фармацевтическую субстанцию;
- определении научных подходов к выбору системы растворителей для труднорастворимой фармацевтической субстанции ЛХС-1269 и вспомогательных веществ;
- доказательстве молярного соотношения состава композиция ЛХС-1269/ФХ и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДФА, обеспечивающего высокое включение ЛХС-1269 и приемлемые физико-химические характеристики;
- систематизации фармацевтических факторов, обеспечивающих стабильность липосом ЛХС-1269;
- изучении влияния криопротекторов на обеспечение получения полупродуктов с приемлемыми показателями качества;
- обосновании влияния типа мембран, применяемых в технологии экструзии для получения липосомальной дисперсии ЛХС-1269, обладающей оптимальным размером везикул и сохраняющей высокий уровень включения активной субстанции.

Приведенный в работе экспериментальный материал может служить теоретической базой для разработки лиофилизатов для инъекционного применения гидрофобных соединений.

Степень обоснованности научных положений, выводов, и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения, выводы и рекомендации, изложенные в работе, подтверждены и обоснованы полученными в ходе работы экспериментальными данными, использованием современных методов исследования, аттестованных приборов и оборудования. Материалы исследований прошли апробацию на конференциях различного уровня.

Обоснованность и достоверность полученных результатов обеспечивается однородной и представительной выборкой результатов экспериментов, позволяющей судить о сходимости и воспроизводимости представленных данных.

Полученные данные, выявленные различными независимыми методами, согласуются между собой и взаимно дополняют друг друга. Выводы и положения, выносимые на защиту, обоснованы и логичны.

Личный вклад автора

Этапы исследовательской работы по планированию и постановке экспериментов, обработке и интерпретации получаемых данных, подготовке публикаций выполнены лично автором (не менее 85 % общего объема) или при его непосредственном участии в результате совместной работы с соавторами научных публикаций.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

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

Результаты проведенных исследований представлены на научных мероприятиях международного и всероссийского уровня: на 4-й Российской

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

Опубликованные научные работы полностью отражают основное содержание диссертационной работы.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

В ходе реализации задач исследования создана лиофилизированная липосомальная лекарственная форма гидрофобного производного индолокарбазола ЛХС-1269, которая рекомендована для доклинических исследований.

На основании выбранных показателей качества проведена стандартизация и составлен проект НД «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг».

Результаты диссертационного исследования внедрены в деятельность лаборатории разработки лекарственных форм федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация построена по традиционному принципу, изложена на 138 страницах компьютерного текста. Работа состоит из оглавления, введения, обзора литературы, материалов и методов, четырех глав экспериментальной части, общих выводов, списков сокращений и условных обозначений и литературы, а также приложений. Список цитируемой литературы содержит 161 источник, из них 71 на иностранных языках.

Во введении автором сформулированы цель и задачи диссертационной работы, раскрыта её научная новизна, теоретическая и практическая значимость.

Первая глава представляет собой обзор литературы по исследуемой теме. Проанализирован механизм действия противоопухолевых соединений индолокарбазола и технология липосомальных препаратов.

Во второй главе подробно описаны материалы и методы исследования, в которые входят стандартные образцы, объекты исследования, фармацевтическая субстанция и препараты, а также используемое оборудование.

В третьей главе представлены экспериментальные результаты разработки состава и технологии получения лиофилизата для приготовления дисперсии для инъекций ЛХС-1269. Установлено, что рациональным для технологии растворителем субстанции ЛХС-1269 является ацетон, а липидных компонентов – хлороформ. Для получения липосом ЛХС-1269 выбран состав с молярным соотношением компонентов ЛХС-1269/ФХ=1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДФФА=1:0,33:0,003.

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

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

Для обеспечения проведения биологических исследований по предложенной технологии получены 3 опытные серии лиофилизата для приготовления дисперсии для инъекций ЛХС-1269 в малых объемах. Также проведена отработка технологии в условиях масштабирования.

Четвертая глава посвящена разработке методик контроля качества и стандартизация лиофилизата для приготовления дисперсии для инъекций ЛХС-1269. С целью контроля качества лиофилизата ЛХС-1269 соискателем разработаны методики качественного ТСХ-анализа компонентов препарата и количественного спектрофотометрического определения содержания ЛС. Для достижения поставленной цели выбраны системы растворителей, способные обеспечить оптимальные условия разделения компонентов лекарственной формы. Для анализа ЛХС-1269 и холестерина предложена система «этанол», ФХ – «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)», сахарозы – «ацетон–ЛУК–вода (15:3:2)». Проведена оценка пригодности выбранных хроматографических систем.

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

На основании таких показателей качества, как регидратируемость, подлинность, описание, однородность массы дозированных лекарственных форм, количественное определение, размер везикул, рН, ζ -потенциал везикул, вязкость и потеря в массе при высушивании проведена стандартизация лиофилизата ЛХС-1269.

Изучена стабильность трех экспериментальных серий лиофилизата для приготовления дисперсии для инъекций ЛХС-1269 в процессе хранения.

Установлен срок годности препарата «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» 2 года.

Раздел **общие выводы** сформулированы четко и соответствуют поставленным задачам.

В **приложениях** представлены спецификация на «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, акты внедрения.

Достоинства и недостатки по содержанию, оформлению, общая оценка диссертации

Диссертационная работа Бу Лугэнь выполнена на высоком научном уровне с использованием необходимых современных методов исследования. К каждой главе приводятся заключения, которые кратко и ёмко описывают промежуточные результаты исследования. Общие выводы в диссертации, автореферате полностью отражают итоги научной работы диссертанта.

Диссертационная работа оценивается в целом положительно, однако в процессе ознакомления с диссертацией возникли следующие вопросы и замечания:

1. На наш взгляд, соискатель не полно раскрыл раздел «Научная новизна работы», в котором надо было показать – каким методом получено новое знание, выявлена зависимость и др. Приведенная соискателем формулировка отражает практическую значимость.

2. В диссертационной отсутствует описание технологических режимов процесса лиофилизации. В разделе 3.6. описаны три этапа проведения лиофилизации: замораживание, первичная сублимация и вторичное досушивание, однако не приведены температурные условия процесса, давление, скорость замораживания и сублимации. Какая продолжительность процесса лиофилизации?

3. Соискатель отмечает, что при регидратации лиофилизата в течение 15 мин получалась однородная светло-желтая дисперсия. Надо было привести данные изучения стабильности полученной дисперсии во времени, что важно для проведения доклинических исследований и применения препарата в клинике.

4. Надо объяснить, почему содержание ЛХС-1269 1,8 мг/флаконе выбрано на основании того, что «максимально возможный объем наполнения флакона липосомальной дисперсией для получения лиофилизированной формы является 6 мл во флаконы вместимостью 20 мл и диаметром 30 мм», а не дозировкой по результатам фармакологических исследований.

5. По результатам диссертационного исследования надо было подготовить лабораторный технологический регламент.

6. Список литературы оформлен не по ГОСТ.

Указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают ценности проведенного исследования, достоверности и несомненных достоинств данной диссертационной работы.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Бу Лугэнь на тему: «Разработка лекарственной формы противоопухолевого препарата на основе гликозидного производного индолокарбазола» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи в области фармацевтической технологии, состоящей в разработке новой, эффективной лекарственной формы, оказывающей антиангиогенное действие и имеющей существенное значение для фармации, что соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский

Университет), утвержденного приказом ректора от 31.01.2020 г. № 0094/Р, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Бу Лугэнь, заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности - 14.04.01 - Технология получения лекарств.

Официальный оппонент

главный научный сотрудник лаборатории готовых лекарственных форм
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», доктор фармацевтических наук
(14.04.01-технология получения лекарств),
профессор

Алексеев Константин Викторович

Подпись Алексеева К.В. заверяю:
Ученый секретарь ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,
кандидат биологических наук

Крайнева Валентина Александровна



125315, Россия, г. Москва, ул. Балтийская, 8 Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», тел. (495) 601-21-25; Сайт организации:
e-mail:<http://www.academpharm.ru> E-mail: zakusovpharm@mail.ru

« 20 » апреля 2022 г.