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

Оборотов Григорий Александрович

Разработка липосомальной лекарственной формы противоопухолевого препарата гемцитабин

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Краснюк Иван Иванович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 14
1.1. Гемцитабин 14
1.1.1. Химические свойства и механизм действия гемцитабина 14
1.1.2. Противоопухолевая активность гемцитабина 18
1.1.3. Фармакокинетические особенности и терапевтические ограничения гемцитабина 22
1.1.4. Модифицированные формы гемцитабина и задачи структурной оптимизации молекулы лекарственного средства 23
1.2. Характеристика липосомальных препаратов 26
1.2.1. Общая характеристика 26
1.2.2. Строение и классификация липосом 28
1.2.3. Свойства липосом 29
1.2.4. Методы получения липосом и способы инкапсуляции лекарственных средств 31
1.2.5. Методы повышения стабильности липосом 32
1.2.6. Методы стерилизации липосомальных препаратов 34
1.2.7. Контроль и исследование физико-химических характеристик липосомальных препаратов 34
1.2.8. Липосомальные препараты в медицинской практике 37
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1 40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 42
2.1. Материалы и реактивы 42
2.2. Оборудование 45
2.3. Методы исследований 46
2.3.1. Получение липосом 46
2.3.2. Получение лиофилизированных липосом гемцитабина 47
2.3.3. Методы анализа липосомальной лекарственной формы гемцитабина 48

2.3.4. Сравнительное изучение цитотоксической активности лекарственных форм гемцитабина в опытах in vitro 53
2.3.5. Статистическая обработка результатов 54
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГЕМЦИТАБИНА 55
3.1. Изучение свойств активной фармацевтической субстанции гемцитабина..... 55
3.1.1. Характеристика субстанции гемцитабина..... 55
3.1.2. Кислотно-основные свойства гемцитабина (зависимость от pH) 56
3.1.3. Липофильность гемцитабина 57
3.1.4. Сорбционные свойства гемцитабина 59
3.2. Разработка состава и технологии получения липосомальной лекарственной формы гемцитабина 61
3.2.1. Этап получения липидной пленки..... 61
3.2.2. Этап гидратации липидной пленки 62
3.2.2.1. Активная загрузка гемцитабина в липосомы……..……..62
3.2.2.2. Пассивная загрузка гемцитабина в липосомы……..……...……69
3.2.3. Сравнение методов загрузки лекарственного средства и выбор модельного состава липосом гемцитабина..... 75
3.2.4. Оптимизация технологических параметров липосомальной формы гемцитабина 76
3.3. Исследование стабильности липосомальной лекарственной формы гемцитабина 79
3.4. Разработка технологии лиофилизации липосомальной дисперсии гемцитабина 82
3.5. Обобщенная технология получения и состав лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гемцитабина 87
3.6. Получение экспериментальных серий лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гемцитабина 89
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3 94

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА, СТАНДАРТИЗАЦИЯ, ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГЕМЦИТАБИНА 96
4.1. Разработка методики спектрофотометрического анализа гемцитабина в составе липосомальной лекарственной формы 96
4.1.1. Изучение спектральных характеристик действующего вещества липосомальной лекарственной формы гемцитабина 96
4.1.2. Количественное определение гемцитабина в составе липосомальной лекарственной формы 97
4.2. Показатели для стандартизации лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гемцитабина 98
4.3. Мониторинг стабильности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гемцитабина при хранении 103
4.4. Изучение биологической активности липосомальной лекарственной формы гемцитабина 106
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4 108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 110
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 111
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ 112
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ 113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 117
Приложение А. СПЕЦИФИКАЦИЯ 132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Химиотерапия остается одним из основных методов лечения злокачественных новообразований и в значительной степени определяет прогноз заболевания, показатели выживаемости и качество жизни пациентов. Вместе с тем ее возможности ограничены рядом факторов, к которым относятся недостаточная селективность действия противоопухолевых препаратов, развитие лекарственной резистентности и выраженная токсичность терапии. К числу широко применяемых противоопухолевых средств относится гемцитабин. Препарат используется при лечении различных злокачественных новообразований, в том числе рака поджелудочной железы, легкого, молочной железы, мочевого пузыря и других. По механизму действия гемцитабин относится к антиметаболитным цитостатикам и ингибирует синтез ДНК опухолевых клеток, что приводит к нарушению их пролиферации и последующей гибели. Однако клиническое применение гемцитабина также сопровождается рядом существенных ограничений: короткий период полувыведения, быстрая инактивация в плазме крови и необходимость повторных введений, что повышает системную нагрузку на организм и увеличивает риск развития нежелательных реакций.

Одним из подходов к преодолению указанных ограничений является разработка липосомальных лекарственных форм (ЛЛФ). Использование липосом в качестве системы доставки позволяет повысить стабильность лекарственного вещества, замедлить его выведение и обеспечить более длительное циркулирование в организме. Кроме того, липосомальные частицы могут накапливаться в опухолевой ткани за счет эффекта повышенной проницаемости (EPR-эффект) и удерживания, что рассматривается как один из механизмов повышения адресности доставки и снижения системной токсичности. Дополнительным преимуществом липосомальной инкапсуляции является защита

действующего вещества от преждевременной деградации, что может способствовать сохранению его фармакологической активности. В связи с этим разработка ЛЛФ гемцитабина является актуальным направлением фармацевтических исследований. Создание такой формы может способствовать повышению эффективности и безопасности терапии, а также расширению возможностей применения гемцитабина в лечении онкологических заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

Исследования, посвященные разработке липосомальных форм гемцитабина, ведутся на протяжении более двух десятилетий. Основное внимание уделяется преодолению низкой эффективности инкапсуляции, обусловленной гидрофильной природой молекулы, а также повышению стабильности и контролю высвобождения препарата. В зарубежных работах описаны различные подходы к инкапсуляции гемцитабина в липосомы, включая использование pH-градиента, гипертонической загрузки и модифицированных липидных композиций, однако полученные результаты характеризуются ограниченной загрузочной способностью и недостаточной стабильностью системы. Наиболее известной на сегодняшний день является липосомальная форма гемцитабина FF-10832, достигшая I фазы клинических испытаний и продемонстрировавшая улучшенные фармакокинетические характеристики и переносимость. Тем не менее данные о её клинической эффективности пока остаются ограниченными. В целом, накопленный опыт свидетельствует о значительном потенциале липосомальных систем доставки гемцитабина, одновременно указывая на необходимость дальнейшей оптимизации их состава и технологии получения.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является разработка ЛЛФ противоопухолевого препарата гемцитабин (2′,2′-дифтор-2′-деоксицитидин).

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. На основании технологических и химико-фармацевтических исследований установить оптимальный состав ЛЛФ гемцитабина.
2. Разработать технологию получения устойчивой при хранении ЛЛФ гемцитабина для инъекционного введения.
3. Разработать методику качественного и количественного анализа для контроля ЛЛФ гемцитабина.
4. Провести стандартизацию ЛЛФ гемцитабина и составить проект нормативной документации (НД).
5. Определить цитотоксическую активность ЛЛФ гемцитабина в опытах *in vitro*.

Научная новизна

Впервые разработана отечественная инъекционная ЛЛФ гемцитабина, обладающая устойчивостью при хранении. Подобран оптимальный состав стерически стабилизированных липосом гемцитабина, что обеспечило высокую степень инкапсуляции ЛС и приемлемые характеристики для инъекционного введения. Разработан технологический процесс получения ЛЛФ гемцитабина, адаптированный для условий лабораторного производства. Предложены методики качественного и количественного анализа липосомального гемцитабина, а также определены показатели качества, положенные в основу стандартизации препарата. Особенностью данной разработки является ее российское происхождение, что обеспечивает перспективы импортозамещения и формирует научно-

технологическую базу для создания новых отечественных липосомальных противоопухолевых средств.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в обосновании выбора состава и метода получения ЛЛФ гемцитабина − гидрофильного соединения с достижением высокого уровня включения, что представляет особую сложность для подобных субстанций. Обосновано применение лиофилизации в технологии получения ЛЛФ гемцитабина как подхода, направленного на повышение ее стабильности в процессе хранения. Представленный в работе экспериментально-практический материал может служить основой для разработки липосомальных систем доставки активных фармацевтических субстанций (АФС), обладающих гидрофильными свойствами. Практическая значимость исследования состоит в создании отечественной оригинальной инъекционной ЛФ «Гемцитабин липосомальный лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 5 мг».

Методология и методы исследования

В основе методологии исследования лежит многофакторный подход к разработке ЛЛФ, опирающийся на труды отечественных и зарубежных ученых в области создания липосомальных систем доставки противоопухолевых препаратов (Оборотова Н.А., Торчилин В.П., Краснопольский Ю.М., Швец В.И., Дмитриева М.В., Санарова Е.В., Li P.W., Zhang X.J., Zucker D., Boafo G.F. и др.). Методология включала анализ литературных данных, оценку степени разработанности и актуальности темы, постановку цели и задач исследования, проведение

экспериментально-практических работ для достижения поставленной цели и обработку полученных результатов. В ходе исследования применялись:

— технологические методы, используемые при получении липосомальных везикул (тонкопленочная гидратация, экструзия, гомогенизация, ультразвуковая обработка, лиофилизация);

— химико-фармацевтические методы (спектрофотометрия, гель-фильтрация, вискозиметрия, потенциометрия, лазерная спектроскопия рассеяния, электрофоретическое рассеяние света и др.;

— математико-статистические методы, применявшиеся для анализа регрессионных зависимостей, оценки воспроизводимости результатов и обработки данных по эффективности загрузки и стабильности липосомальных дисперсий;

— методы экспериментальной химиотерапии, предусматривающие изучение цитотоксической активности липосомальной лекарственной формы гемцитабина *in vitro* на клеточной линии аденокарциномы легкого А549 в сравнении со свободным препаратом.

Личный вклад автора

Автором выполнен анализ научной литературы по проблеме разработки липосомальных форм гемцитабина, на основании которого сформулированы цель и задачи исследования. Лично автором проведены экспериментальные исследования по выбору липидной композиции и разработке технологии получения липосомальной лекарственной формы гемцитабина, включая этапы тонкопленочной гидратации, экструзии и лиофилизации. Автором выполнено количественное определение гемцитабина в липосомальных дисперсиях и лиофилизированных образцах, оценены эффективность инкапсуляции, загрузочная способность и основные физико-химические характеристики липосом. Лично автором проведено сравнительное изучение цитотоксической активности

липосомальной формы и раствора гемцитабина *in vitro* на клеточной линии аденокарциномы легкого А549, выполнена статистическая обработка и обобщение полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Состав ЛЛФ гемцитабина.
2. Технология получения ЛЛФ гемцитабина.
3. Методики качественного и количественного спектрофотометрического анализа ЛЛФ гемцитабина.
4. Показатели качества ЛЛФ гемцитабина и результаты исследования ее стабильности в процессе хранения.
5. Результаты оценки цитотоксической активности липосомальной формы гемцитабина.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность научных положений и выводов диссертационной работы обеспечивается совокупностью экспериментальных данных, полученных при

разработке состава и технологии получения липосомальной лекарственной формы гемцитабина.

Исследования проводились с использованием воспроизводимых методов получения липосомальных дисперсий, включающих тонкопленочную гидратацию, экструзию и лиофилизацию, с контролем критических параметров качества — размера частиц, индекса полидисперсности, ζ-потенциала и эффективности инкапсуляции гемцитабина.

Количественное определение действующего вещества осуществлялось спектрофотометрическим методом, а отделение неинкапсулированного гемцитабина — методом гель-фильтрации. Обработка экспериментальных данных выполнялась с применением методов математико-статистического анализа.

Биологическая значимость полученных результатов подтверждена в опытах in vitro при сравнительном изучении цитотоксической активности липосомальной формы и раствора гемцитабина на клеточной линии аденокарциномы легкого А549. Совокупность полученных данных подтверждает обоснованность и достоверность выводов, представленных в диссертационной работе.

Материалы проведённых исследований по теме диссертации были представлены и обсуждены на межинституциональной XVIII Всероссийской научно-практической конференции им. А.Ю. Барышникова «Новые перспективные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы» памяти А. Ю. Барышникова, проведённой с участием сотрудников ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России (Москва, 24-25 апреля 2025 г.).

Апробация диссертационной работы состоялась 8 декабря 2025 г. на кафедре фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) протокол № 4 от 8 декабря 2025 г.

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертационного исследования опубликовано 5 научных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах, включённых в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, 1 иная научная публикация по результатам исследования и 1 публикация в сборнике материалов всероссийской научной конференции.

Внедрение результатов в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в образовательный процесс ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы используются в учебном процессе кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина при преподавании дисциплины «Частная фармацевтическая технология» студентам, обучающимся по направлению подготовки «Фармация» (33.05.01), что подтверждено актом о внедрении от 18.11.2025.

Внедрение результатов исследования способствует формированию у обучающихся практических навыков разработки и оценки липосомальных лекарственных форм противоопухолевых препаратов, а также углублению знаний в области современных технологий получения и стандартизации лекарственных средств.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертация выполнена в соответствии с комплексной научной темой ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01201261653).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 132 листах машинописного текста и содержит 27 таблиц, 19 рисунков. Диссертации включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, три главы собственных исследований, общие выводы, список литературы и приложения. Список литературы состоит из 138 источников, в том числе 120 – на иностранном языке.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Гемцитабин

1.1.1. Химические свойства и механизм действия гемцитабина

Гемцитабин (2′,2′-дифтор-2′-деоксицитидин) − синтетический нуклеозидный аналог пиримидина, структурно близкий к дезоксицитидину (Рисунок 1) [35]. В отличие от дезоксицитидина его молекула содержит два атома фтора в положении 2′ рибозного кольца, что повышает химическую стабильность и биологическую активность соединения.

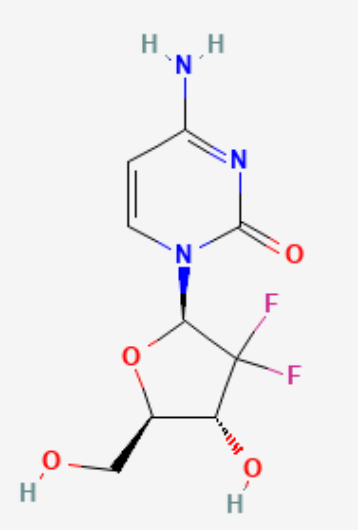

Рисунок 1 − Химическая структура гемцитабина

Препарат относится к пролекарствам: после проникновения в клетку под действием дезоксицитидинкиназы (dCK) он фосфорилируется с образованием гемцитабин-дифосфата (dFdCDP) и гемцитабин-трифосфата (dFdCTP). dFdCDP ингибирует рибонуклеотидредуктазу, снижая пул дезоксинуклеозидтрифосфатов. Гемцитабин-трифосфат конкурирует с дезоксицитидинтрифосфатом (dCTP), естественным нуклеозидным компонентом, за включение в реплицирующуюся

цепь ДНК. Встраивание dFdCTP приводит к маскированной терминации цепи, при которой дальнейшее удлинение ДНК становится невозможным, что блокирует клеточное деление и инициирует апоптоз [14, 42, 47, 49, 56, 67, 68, 100, 102, 108, 135, 138].

В клиническом исследовании III фазы (Burris H.A. и соавт. [81]), в котором гемцитабин сравнивался с 5-фторурацилом (5-ФУ) у пациентов с метастатическим раком поджелудочной железы (РПЖ), было продемонстрировано статистически значимое увеличение медианы общей выживаемости (ОВ) (5,65 против 4,41 месяца; p=0,0025) и более высокая частота объективного ответа (ЧОО) (23,8 против 4,8%). Эти клинические результаты подтверждают реализуемость молекулярного механизма действия препарата: после включения гемцитабина в ДНК происходит маскированная терминация цепи, что нарушает процесс репликации, вызывает остановку клеточного цикла в S-фазе (Рисунок 2) и инициирует апоптоз опухолевых клеток [26, 67]. Высокая пролиферативная активность клеток РПЖ делает их особенно чувствительными к такому типу воздействия.

В исследовании III фазы MPACT (Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma Clinical Trial) [82] оценивалась эффективность комбинации гемцитабина с наночастицами паклитаксела (nab-паклитаксел) у пациентов с метастатическим РПЖ. Комбинированная терапия продемонстрировала статистически значимое преимущество по сравнению с монотерапией гемцитабином. Медиана общей выживаемости составила 8,5 месяца против 6,7 месяца соответственно ($p<0,001$), частота объективного ответа - 23% против 7%. Эти результаты указывают на более высокую клиническую эффективность комбинированного подхода. Наблюдаемый эффект может быть связан с механизмом действия гемцитабина, который ингибирует синтез ДНК и нарушает прохождение клеточного цикла. Добавление nab-паклитаксела, вероятно, усиливает противоопухолевое действие за счет повышения внутриклеточной экспозиции гемцитабина и дополнительного подавления деления быстро пролиферирующих клеток.

Также гемцитабин способен влиять на механизмы лекарственной устойчивости опухолевых клеток. В частности, его действие связывают с

подавлением активности цитидиндезаминазы (CDA), фермента, участвующего в инактивации препарата путем превращения в дифтордезоксиуридин (dFdU).

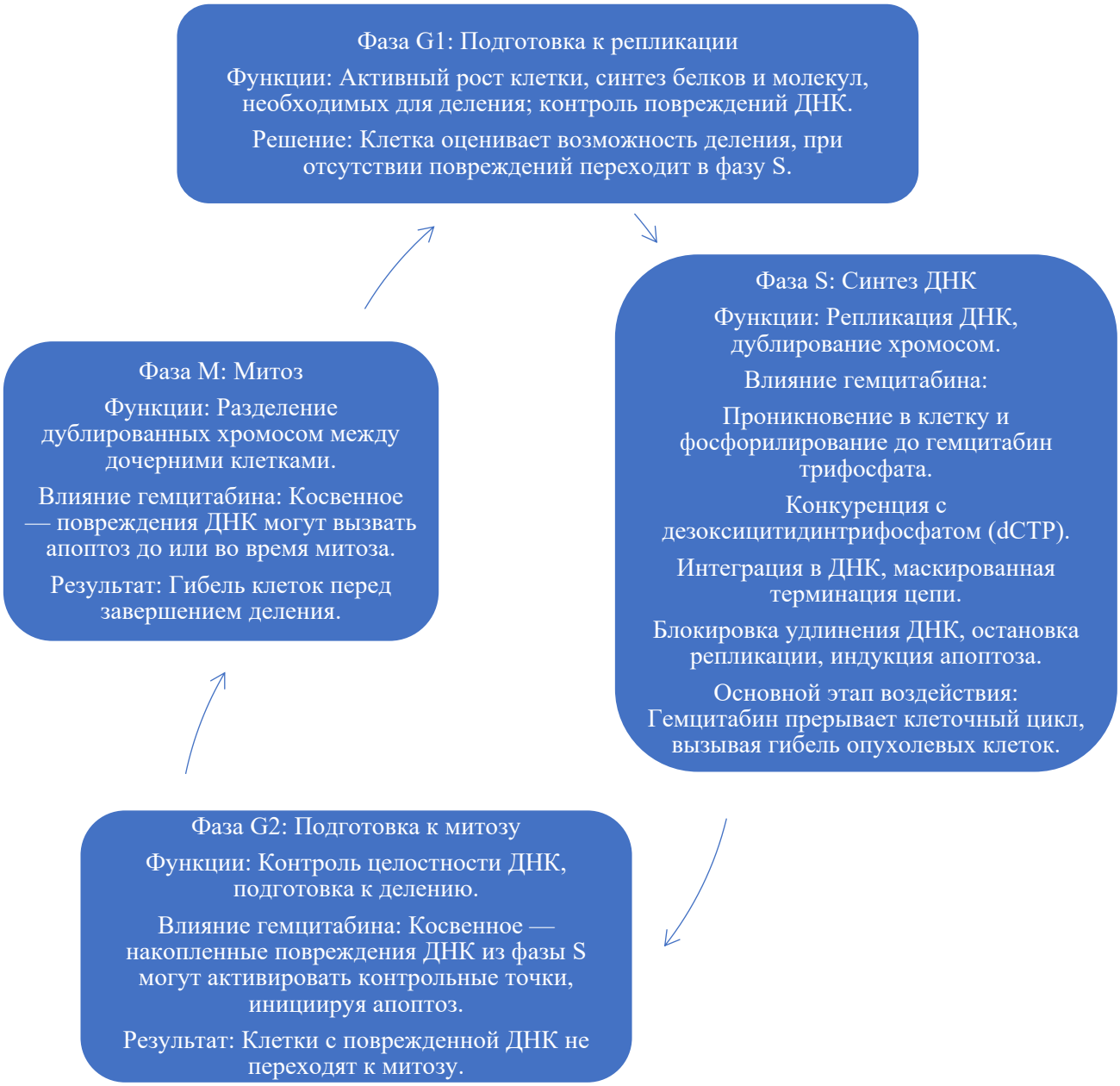

Рисунок 2 − Последовательность клеточного цикла и влияние гемцитабина

При использовании высоких доз или в комбинации с другими цитотоксическими средствами активность CDA снижается, что способствует поддержанию терапевтических внутриклеточных концентраций dFdCTP. Так, в клиническом исследовании III фазы [64] комбинация гемцитабина (1000 мг/м²) с оксалиплатином (100 мг/м²) у пациентов с местно-распространенным или

метастатическим РПЖ обеспечила увеличение медианы выживаемости без прогрессирования (6,0 против 3,7 месяца; p=0,039) и более высокий уровень объективного ответа (26,8 против 17,3%). Дополнительно показано, что низкая экспрессия CDA коррелирует с лучшим ответом на терапию [45], а применение высоких концентраций гемцитабина может использоваться как инструмент для оценки и подавления активности фермента [1].

Помимо ингибирования репликации ДНК, гемцитабин подавляет механизмы репарации, включая гомологичную рекомбинацию. Снижение внутриклеточного уровня dCTP ограничивает возможность восстановления повреждений ДНК, что приводит к накоплению мутаций и активации апоптотических каскадов. В доклиническом исследовании G. Cartei и соавт. [41] показано, что гемцитабин в сочетании с цисплатином усиливает повреждения ДНК за счет формирования межцепочечных сшивок, которые не могут быть эффективно репарированы в условиях дефицита dCTP, что приводит к апоптозу опухолевых клеток.

Таким образом, противоопухолевое действие гемцитабина реализуется через комплексный механизм, включающий ингибирование рибонуклеотидредуктазы, маскированную терминацию цепи ДНК, остановку клеточного цикла в S-фазе, подавление репарационных процессов и преодоление ферментативной инактивации (Рисунок 3).

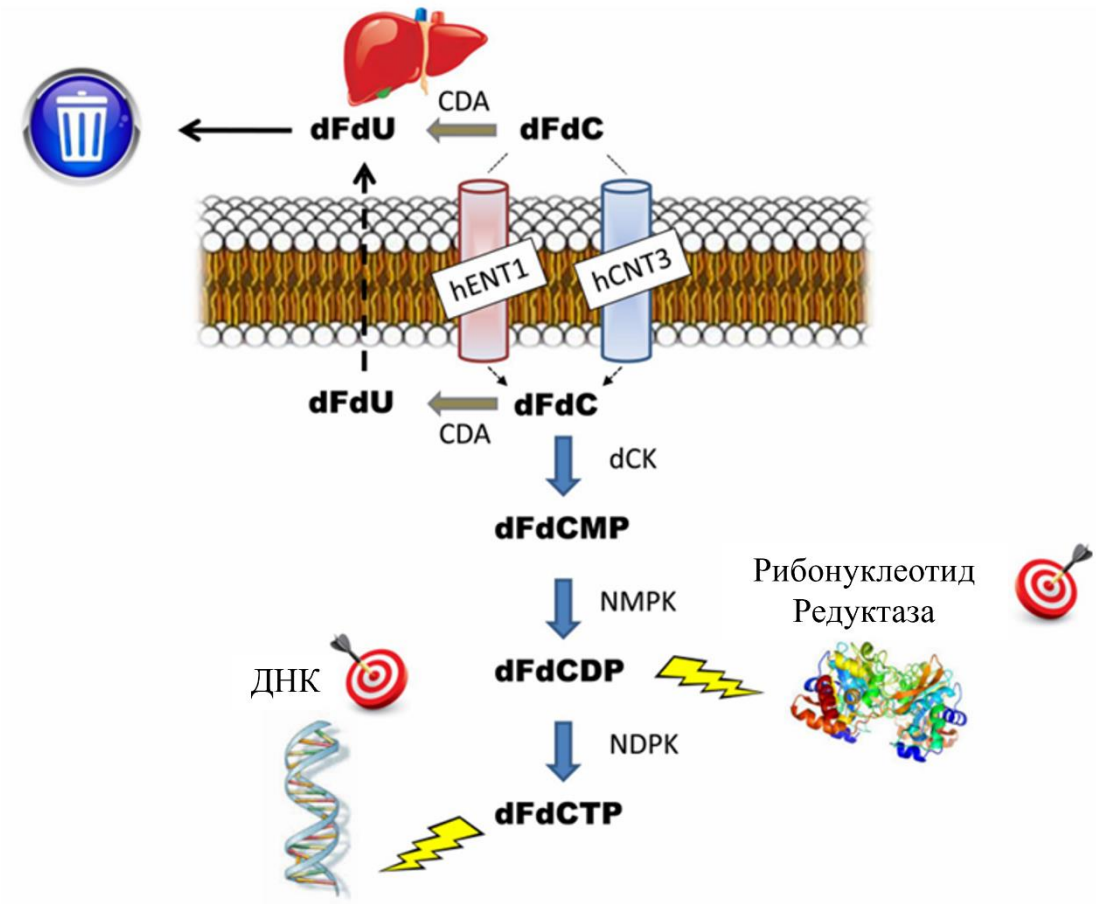

Рисунок 3 − Модели и механизмы действия гемцитабина [48]. Обозначения: CDA − цитидиндезаминаза, dCK – дезоксицитидинкиназа, dFdC – гемцитабин, dFdCDP − гемцитабин-дифосфат, dFdCMP − дифтордезоксицитидинмонофосфат, dFdCTP − гемцитабин-трифосфат, dFdU – дифтордезоксиуридин, NMPC – нуклеотидмонофосфаткиназа, NDPK – нуклеотиддифосфаткиназа, hENT1 – равновесный переносчик нуклеозидов человека подтипа 1, hCNT3 – концентрирующий переносчик нуклозидов человека подтипа 3

1.1.2. Противоопухолевая активность гемцитабина

Гемцитабин был синтезирован в конце 1980-х годов как фторированный аналог цитидина и в 1995 г. одобрен для медицинского применения при РПЖ. За тридцать лет клинического использования он вошел в число основных цитостатиков, применяемых в моно- и комбинированных режимах при широком

спектре злокачественных опухолей, включая поджелудочную железу, легкие, молочную железу, яичники, мочевой пузырь и печень [12, 15, 34, 35, 75, 85, 117].

Стандартная схема дозирования гемцитабина, закрепленная в международных рекомендациях, предусматривает внутривенную инфузию в дозе 1000 мг/м² в течение 30 минут еженедельно на протяжении семи недель с последующим недельным перерывом и переходом на 28-дневные циклы (три недели введений и неделя отдыха). Этот режим был выбран на основе соотношения эффективности и переносимости ЛС и подтвержден клинической практикой.

Клиническое применение гемцитабина ограничивается фармакокинетическими особенностями: коротким периодом полувыведения (2–40 мин), быстрой инактивацией CDA и необходимостью введения высоких доз, что повышает риск гематологической токсичности (нейтропении, тромбоцитопении) [21, 56].

Современные разработки направлены на оптимизацию фармакокинетического профиля гемцитабина за счет новых ЛФ. Липосомальная форма FF-10832, получившая в 2025 г. статус препарата для лечения редких опухолей желчных протоков, демонстрирует увеличение времени полувыведения препарата до ≈5 ч, рост площади под фармакокинетической кривой (AUC) и снижение пиковых концентраций, что может уменьшать выраженность миелосупрессии [56]. Другой подход реализован в альбумин-инкапсулированной проформе JNTX-101, для которой в доклинических моделях показано 4–6-кратное повышение внутроопухолевого накопления ЛС за счет caveolin-1-опосредованного эндоцитоза, сопровождающееся выраженным торможением роста опухоли.

Рак поджелудочной железы

Данное заболевание характеризуется агрессивным течением, поздней диагностикой и крайне неблагоприятным прогнозом: по данным ВОЗ, ежегодно выявляется около 450 тыс. новых случаев, более 90% пациентов умирают в течение 5 лет после постановки диагноза [29, 79, 73]. В рандомизированном исследовании III фазы, посвященному улучшению показателей выживаемости и клинической эффективности при использовании гемцитабина в качестве терапии первой линии

у пациентов с распространенным РПЖ в сравнении с 5-ФУ [81]. Было показано, что гемцитабин более эффективен, чем 5-ФУ, в облегчении симптомов заболевания и улучшении клинической пользы: медиана ОВ составила 5,65 против 4,41 месяца (p=0,0025), ЧОО − 23,8 против 4,8%, а клиническая польза (снижение боли, улучшение общего состояния и массы тела) отмечена у 24% пациентов против 5% в группе сравнения. Комбинация с наночастицами паклитаксела (nab-паклитаксел) дополнительно улучшала показатели ОВ и времени до прогрессирования у пациентов с метастатическим процессом [82].

Немелкоклеточный рак легкого

Это наиболее распространенный морфологический вариант рака легких, составляющий около 85% всех случаев, с ежегодной заболеваемостью более 2,1 млн. и высокой смертностью [28, 73]. В многоцентровом исследовании II фазы у пациентов с прогрессированием после платиновой химиотерапии монотерапия гемцитабином показала ЧОО 20% (3 полных и 14 частичных ответов), медиану выживаемости без прогрессирования (ВБП) 4,0 месяца и ОВ 7,8 месяца при умеренной токсичности (нейтропения 3–4 степени: 10%, анемия: 5%). В другом исследовании II фазы у пожилых пациентов в первой линии ЧОО составила 22% (1 полный и 9 частичных ответов из 46 пациентов), стабилизация заболевания − 35%, общий контроль − 57%, медиана ВБП − 4,8 месяца, медиана ОВ − 9,0 месяцев. Профиль переносимости был благоприятным: тяжелая нейтропения у 8,7%, минимальная негематологическая токсичность [63].

Рак молочной железы

Ежегодно регистрируется около 2,1 млн. новых случаев, заболевание лидирует среди женских онкологических диагнозов [73]. В исследовании III фазы [66] комбинация гемцитабина (1250 мг/м², дни 1 и 8) с паклитакселом (175 мг/м², день 1) каждые 21 день у пациентов с метастатическим процессом после антрациклиновой терапии обеспечила медиану ОВ 18,6 против 15,8 месяцев (p<0,05), время до прогрессирования 6,1 против 4,0 месяцев (p<0,05), ЧОО 41,4 против 26,2% при сопоставимой токсичности. Систематический обзор Dent S. и соавт. [48] (83 исследования, включая 4 рандомизированных клинических

исследования (РКИ) III фазы) показал, что в монотерапии гемцитабином ЧОО варьировала от 14 до 37% у пациентов без предшествующей терапии и от 12 до 30% после антрациклинов/таксанов; в комбинациях − до 80%, при преимущественно гематологической токсичности.

Рак мочевого пузыря

По данным GLOBOCAN, в 2020 г. зарегистрировано более 570 тыс. новых случаев, заболевание чаще встречается у мужчин и характеризуется высокой смертностью на поздних стадиях [73]. В исследовании III фазы у больных с метастатическим уротелиальным раком после неудачи цисплатинсодержащей терапии комбинация гемцитабина с паклитакселом давала ЧОО 37,5–41,5%, медиану ВБП 3,1–4,0 месяца при токсичности 3–4 степени (нейтропения 10–30%) [112]. Метаанализ 46 исследований показал, что монотерапия гемцитабином во второй линии обеспечивает ЧОО 20–28% и ОВ 5–7 месяцев при лучшей переносимости по сравнению с комбинациями [118].

Рак яичников

Заболеваемость превышает 200 тыс. случаев в год; это пятая причина смертности от рака у женщин [73]. В исследовании III фазы у пациенток с платиночувствительным рецидивом добавление гемцитабина к карбоплатину повышало медиану ВБП (8,6 против 5,8 месяца; p=0,0031) и ЧОО (47,2 против 30,9%) при ожидаемом увеличении гематологической токсичности [65]. При платинорезистентных формах гемцитабин демонстрировал эффективность, сопоставимую с пегилированным липосомальным доксорубицином (ВБП 3,6 против 3,1 месяца; p=0,870) при различном профиле токсичности [113].

Роль гемцитабина в комбинированной терапии

Гемцитабин активно используется в сочетании с паклитакселом, цисплатином и 5-ФУ. В исследовании MPACT комбинация с nab-паклитакселом увеличивала выживаемость и частоту ответа у пациентов с РПЖ [123]. В РКИ III фазы при раке молочной железы комбинация с паклитакселом увеличивала ОВ и ВБП [66]. В исследовании II фазы при РПЖ комбинация с 5-ФУ давала клинический ответ в 65% случаев и объективный ответ в 15% [14]. Синергизм

обусловлен различными механизмами действия и снижением резистентности опухолевых клеток.

Таким образом, гемцитабин демонстрирует значительную клиническую активность в лечении широкого спектра солидных опухолей, в том числе с неблагоприятным прогнозом, как в монотерапии, так и в составе комбинированных режимов.

1.1.3. Фармакокинетические особенности и терапевтические ограничения гемцитабина

Гемцитабин, как и большинство цитостатических средств, имеет ряд ограничений, связанных с его физико-химическими свойствами, фармакокинетикой и профилем безопасности. Эти особенности снижают эффективность терапии и обуславливают необходимость разработки усовершенствованных ЛФ, в частности создание систем доставки гемцитабина.

Фармакокинетические особенности и метаболизма гемцитабина

Препарат характеризуется гидрофильностью и быстрым распределением в водных компартментах организма. Период полувыведения варьирует от 2 до 40 мин вследствие быстрой инактивации CDA с образованием неактивного метаболита 2′,2′-дифтор-2′-дезоксиуридина (dFdU) [42, 47, 49, 60, 108]. Это приводит к необходимости введения высоких доз гемцитабина, увеличивающих риск гематологических осложнений, включая миелосупрессию, нейтропению и тромбоцитопению [68, 81, 100, 116, 135].

Ограниченная проникающая способность гемцитабина

Гидрофильная молекула гемцитабина проникает в клетки с участием переносчиков нуклеозидов (hNT). В солидных опухолях с низкой экспрессией этих транспортных белков доступ препарата к опухолевым клеткам ограничен, что способствует формированию резистентности [60]. Для преодоления данного барьера исследуются наноразмерные системы доставки гемцитабина, включая pH-чувствительные липосомы и полимерные носители [53, 69, 71, 130].

1.1.4. Модифицированные формы гемцитабина и задачи структурной оптимизации молекулы лекарственного средства

Для преодоления ограничений традиционной терапии гемцитабином разрабатываются его модифицированные ЛФ и молекулярные производные. К числу наиболее перспективных подходов относятся создание липофильных аналогов, которые отличаются более высокой биодоступностью и большей устойчивостью к ферментативной инактивации [86], а также разработка различных липосомальных систем (Таблица 1). В их числе особый интерес представляют конструкции, содержащие лиганды, способные специфически взаимодействовать с рецепторами опухолевых клеток, например, фолиевую кислоту или эстроген [54, 56]. Такая модификация направлена на реализацию адресной избирательной доставки липосом к клеткам, гиперэкспрессирующим соответствующие рецепторы, что может способствовать повышению эффективности противоопухолевой терапии и снижению неспецифического воздействия препарата. Одновременно ведутся исследования, связанные со структурной модификацией самой молекулы гемцитабина. Такой подход рассматривается как способ преодоления его основных фармакокинетических ограничений, включая низкую липофильность, быструю инактивацию цитидиндезаминазой и недостаточную способность проникать через клеточные мембраны [108].

Таблица 1 − Формы модификации и доставки гемцитабина

№	Форма гемцитабина	Тип модификации/ пример композиции	Основные преимущества	Ограничения формы	Источник
1	Свободный гемцитабин	Без модификаций	Быстрое действие, высокая растворимость	Короткий T½, инактивация CDA, низкая стабильность	42, 47, 49, 60, 108
2	Гемцитабин в обычных	Инкапсуляция в обычные липосомы	Снижение токсичности, увеличение T½	Ограниченная направленность, нестабильность при pH 7.4	133
3	Температуро-чувствительные липосомы	Высвобождение при гипертермии • DPPC/DSPC/DSPE-PEG$_2$k 0,80/0,15/0,05	Локальное высвобождение, высокая эффективность *in vivo*	Требуется локальный нагрев опухоли	130, 132
4	pH-чувствительные липосомы	Высвобождение при pH<6,5 • DPPC/DOTAP/DSPE-mPEG2000 4:1:0,1	Повышенная доставка в опухоль, эндосомальный выход	Уменьшение T½, нестабильность в крови	74
5	Фолат-модифицированные липосомы	Таргетинг на фолат-рецепторы • Фосфатидилхолин/ Холестерин/FA-PEG-SA 0,55/0,45/0,001	Повышенная селективность доставки, повышение захвата клетками	Неэффективны при низкой экспрессии фолат-рецепторов	56
6	Эстроген-рецептор-модифицированные ПЭГ-липосомы	Таргетинг на ER-рецепторы (например, A549) • Фосфатидилхолин/ Холестерин/DSPE-mPEG$_{2000}$ 11/9/1	Высокая специфичность и эффективность при NSCLC	Применимость ограничена экспрессией ER	54
7	FF-10832 (липосомальный гемцитабин пролонгированного действия)	Пролонгированное высвобождение • HSPC/Холестерин/PEG 1/0,4/0,05	Продолжительная экспозиция, синергия с иммунотерапией	Находится на ранних фазах клинических исследований; требуется подтверждение эффективности и безопасности, повышение воспроизводимости накопления в опухоли и определение оптимальных	14, 24

Обозначения: T½ − период полувыведения, DPPC – дипальмитоилфосфатидилхолин, DSPC – дистеароилфосфатидилхолин, DSPE-PEG$_{2000}$ – полиэтиленгликолизированный дистеароилфосфоэтаноламин, DOTAP – 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан, FA-PEG-SA – фолиевая кислота, конъюгированная с полиэтиленгликоль-стеариловым ангидридом, HSPC – гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин, PEG – полиэтиленгликоль

Наиболее изученными направлениями являются разработка липофильных пролекарств, в которых гидроксильные группы гемцитабина замещаются ацильными или алкильными остатками. К таким соединениям относятся, например, гемцитабин-элаидат, CP-4126 и LY2334737. Подобные модификации направлены на повышение устойчивости вещества к ферментативной инактивации и улучшение его мембранной проницаемости. Кроме того, исследуются нуклеотидные и фосфорамидные производные, позволяющие обойти стадию внутриклеточного фосфорилирования, а также конъюгаты с полимерными и пептидными носителями, обеспечивающие замедленное высвобождение действующего вещества и его более направленную доставку в опухолевые клетки.

Инкапсуляция гемцитабина в липосомы позволяет частично защитить его от ферментативной инактивации и реализовать пассивный таргетинг через EPR-эффект (Рисунок 4) [87]. При опухолевом неоангиогенезе формируются сосуды с повышенной проницаемостью и увеличенными порами, что облегчает проникновение наночастиц в опухолевый интерстиций. Одновременно сниженный лимфатический дренаж способствует их длительному удержанию, а локальное высвобождение препарата повышает селективность действия и снижает системную токсичность. Вместе с тем липосомальные формы ограничены в равномерном проникновении в глубокие и гипоксические зоны опухоли при недостаточной стабилизации в кровотоке [24, 46, 54, 120].

Доклиническое и клиническое изучение пегилированных липосомальных форм, таких как FF-10832, показало, что они обеспечивают длительную циркуляцию в плазме и способствуют формированию иммунокомпетентного опухолевого микроклимата, особенно в сочетании с ингибиторами иммунных контрольных точек, включая пембролизумаб [14, 24].

Применяются функционально модифицированные липосомы, в том числе чувствительные к pH или температуре, обеспечивающие контролируемое высвобождение препарата в условиях опухолевой микросреды [74, 130, 132]. Это повышает внутриклеточную концентрацию действующего вещества и снижает системную токсичность.

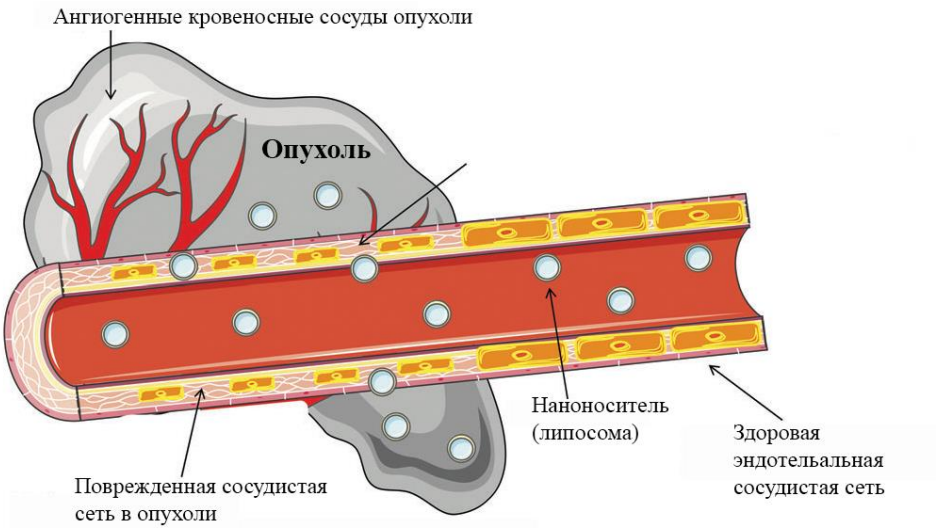

Рисунок 4 − Эффект улучшенной проницаемости и удержания (EPR-эффект) [87]

Кроме классических липосомальных носителей, исследуются и их модификации − например, эстроген-модифицированные пегилированные липосомы, нацеленные на опухоли, экспрессирующие соответствующие рецепторы, включая немелкоклеточный рак легкого [21, 46, 54, 57, 84]. Фолат-модифицированные липосомы демонстрируют значительное увеличение внутриклеточного накопления гемцитабина по сравнению с немодифицированными формами, а также более выраженное подавление роста опухоли *in vivo* [56]. Такие направленные системы обеспечивают повышение селективности доставки и усиление цитотоксического эффекта.

1.2. Характеристика липосомальных препаратов

1.2.1. Общая характеристика

Липосомы представляют собой сферические везикулы, образованные фосфолипидным бислоем, аналогичным по строению биологическим мембранам. Термин «липосома» происходит от греческих слов *lipos* − жир и *soma* − тело, что

отражает их липидную природу. Благодаря мембранной организации липосомы обладают высокой биосовместимостью и низким иммуногенным потенциалом, что делает их универсальными носителями для доставки фармакологически активных веществ различной природы и типа действия (белки, пептиды, цитостатики, антибиотики) и предопределяет широкие перспективы применения липосомальных технологий в медицине и фармацевтике [9, 55, 87, 93].

Липосомы состоят из одной или нескольких фосфолипидных мембран, которые могут инкапсулировать как водорастворимые, так и жирорастворимые вещества (Рисунок 5) [8]. Благодаря схожести по структуре с мембранами клеток липосомы обладают уникальной способностью транспортировать активные молекулы через биологические барьеры и обеспечивать их целенаправленную доставку к патологическим тканям. Эти свойства обуславливают их широкое применение в терапии, включая использование для транспортировки цитостатиков, антибиотиков, противогрибковых, противовирусных и противовоспалительных препаратов, а также нуклеиновых кислот в рамках генотерапии [27, 45].

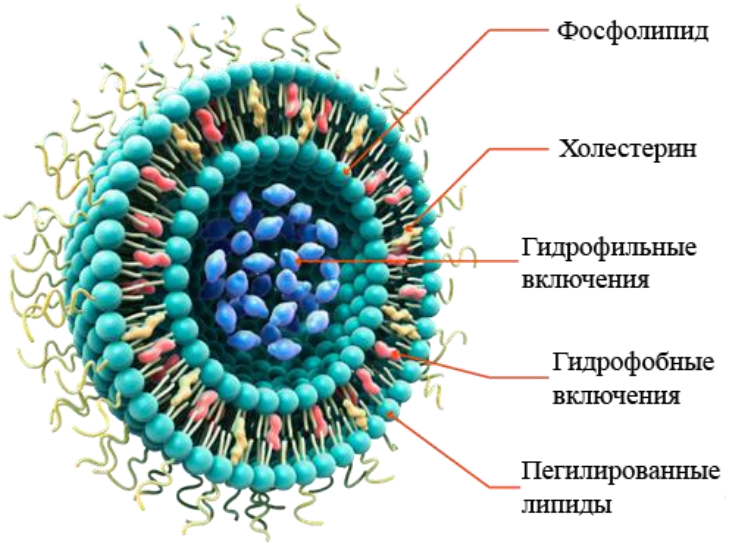

Рисунок 5 − Строение липосомы и структурные компоненты [8]

1.2.2. Строение и классификация липосом

В структуре липосомальных везикул различают мембрану, которая предназначена для включения гидрофобных ЛС, и ядро − для инкапсуляции гидрофильных веществ. Мембрана состоит из двух слоев фосфолипидов, ориентированных таким образом, что гидрофобные углеводородные хвосты обращены внутрь, а гидрофильные головки – наружу.

В зависимости от числа мембранных слоев выделяют:

- униламеллярные липосомы, имеющие один бислой, широко применяемые для доставки низкомолекулярных соединений;
- мультиламеллярные липосомы, состоящие из нескольких концентрических бислоев, отличающиеся большей механической устойчивостью, но более низкой проницаемостью [27, 33, 45].

Помимо фосфолипидов в состав липосом могут входить модифицирующие агенты:

- Холестерин — повышает жесткость мембраны, снижает ее текучесть при физиологических температурах, что повышает стабильность и уменьшает риск преждевременного высвобождения инкапсулированного вещества.
- Полиэтиленгликоль (ПЭГ) — создает гидрофильный «стерический барьер», снижающий поглощение липосом клетками мононуклеарной фагоцитарной системы, продлевая время циркуляции в кровотоке и повышая вероятность накопления в целевых тканях. ПЭГ также препятствует агрегации везикул и нежелательным взаимодействиям с сывороточными белками [27, 32].

Классификация липосом основывается на структурных и функциональных характеристиках, включая количество фосфолипидных мембран, размер, липидный состав и назначение. Такая систематизация позволяет выбирать оптимальный тип липосом для конкретных задач фармацевтической разработки и клинического применения (Таблица 2) [27, 32, 33, 40, 45, 92, 107, 119].

Таблица 2 − Классификация липосом

Классификация	Типы	Описание
1. По количеству мембран	Одномембранные липосомы (Униламеллярные)	Липосомы с одной мембраной, размером от 25 до 200 нм. Используются для инкапсуляции водорастворимых и жирорастворимых веществ.
	Многослойные липосомы (Мультиламеллярные)	Липосомы с несколькими концентрическими мембранами, размером до 5 мкм. Подходят для инкапсуляции больших молекул или длительного высвобождения.
2. По размеру	Микролипосомы	Размер от 25 до 200 нм. Применяются для доставки маломолекулярных препаратов и препаратов в водной среде.
	Макролипосомы	Размер более 1 мкм. Применяются для доставки более крупных молекул и для инкапсуляции препаратов с длительным высвобождением.
3. По составу фосфолипидов	Нативные липосомы	Липосомы из фосфолипидов, полученных из природных источников (соевые или яичные фосфолипиды). Высокая биосовместимость и низкая токсичность.
	Модифицированные липосомы	Липосомы, содержащие синтетические фосфолипиды или другие молекулы для улучшения стабильности или целенаправленного воздействия.
4. По назначению	Терапевтические липосомы	Используются для доставки лекарств, вакцин или других активных веществ в организм. Целевая доставка на опухолевые клетки или другие ткани.
	Диагностические липосомы	Применяются для визуализации заболеваний, например, с помощью радиоактивных или флуоресцентных меток.

1.2.3. Свойства липосом

Размер

Для системной доставки низкомолекулярных соединений оптимальными по размеру являются липосомы диаметром 50–100 нм, поскольку данные везикулы

обладают высокой удельной поверхностью и способностью к эндоцитозу. Крупные везикулы, включая мультиламеллярные липосомы размером свыше 200–300 нм, применяются преимущественно для инкапсуляции высокомолекулярных препаратов или реализации пролонгированного высвобождения ЛС [27, 40, 119].

Стабильность

Устойчивость липосом определяется липидным составом, размером и условиями хранения. Введение холестерина повышает устойчивость к термическим и механическим воздействиям. Несоблюдение оптимальных условий хранения может приводить к разрушению везикул и потере инкапсулированного вещества [27, 40, 119].

Проницаемость

Мембрана должна обеспечивать защиту активных компонентов до момента доставки в целевую область и их контролируемое высвобождение. Для регулирования проницаемости мембрану липосом модифицируют. Например, получают термо- и pH-чувствительные липосомы, высвобождающие препарат при локальном нагреве или изменении кислотности среды [27, 40, 119].

Благодаря своим свойствам липосомы имеют следующие преимущества:

- ***Таргетная доставка.*** Возможность функционализации поверхности лигандами (антителами, пептидами, фолатами и др.), обеспечивающими специфическое связывание с рецепторами патологических клеток, включая опухолевые.
- ***Контролируемое высвобождение.*** Реализация пролонгированной фармакокинетики, снижение частоты введений и повышение терапевтической эффективности.
- ***Защита активных веществ.*** Предотвращение деградации нестабильных молекул в биологических средах, увеличение биодоступности и времени действия препарата [27, 32, 92, 107].

1.2.4. Методы получения липосом и способы инкапсуляции лекарственных средств

Получение липосомальных систем включает комплекс технологических этапов, направленных на формирование стабильных фосфолипидных везикул с заданными физико-химическими параметрами и инкапсулированными активными веществами. Выбор метода определяется требуемыми характеристиками липосом − размером, многослойностью, составом мембраны, а также природой инкапсулируемых соединений [27, 30, 77, 83, 92, 96, 128, 124].

Методы получения липосом

- Механические методы:

- Метод тонкопленочной гидратации (thin-film hydration) − растворение липидов в органическом растворителе с последующим испарением и гидратацией пленки, что инициирует самопроизвольное образование липосом [92].
- Метод ультразвуковой обработки (sonication) − уменьшение диаметра липосом и получение униламеллярных везикул малого размера; ограничением является риск деградации термолабильных соединений [77].
- Метод экструзии (extrusion) − пропускание дисперсии липосом через поликарбонатные мембраны с определенным диаметром пор (обычно 100–200 нм) [92].

- Методы, основанные на использовании растворителей:

- Метод обратной фазы (reverse-phase evaporation) − формирование эмульсии «вода в масле» и удаление растворителя, что обеспечивает образование липосом с высокой степенью включения [124];
- Методы инжекции растворителя (этанол-инжекция, эфирная инжекция) − введение раствора липидов в водную фазу, приводящее к самопроизвольной сборке липосом [27];
- Метод преципитации (precipitation) − инициирование самосборки липосом при изменении ионной силы или pH среды [27, 45].

- Методы детергент-удаления: формирование липосом при постепенном удалении детергентов из мицеллярных растворов липидов [95].

Методы инкапсуляции ЛС в липосомы

Различают два **способа загрузки** ЛС в липосомальные носители:

- Пассивный: включение вещества в водную или липидную фазу на стадии формирования липосом (гидратация пленки, обратная фаза, этанол-инжекция). Подходит для гидрофильных и липофильных веществ, но характеризуется ограниченной эффективностью включения (обычно <30 % для гидрофильных соединений) [27, 40, 92].
- Активный способ основан на создании трансмембранного градиента, за счет которого лекарственное вещество накапливается внутри липосом. Для этого могут использоваться pH-градиент (кислая внутренняя среда и внешний буфер), ионный градиент, например, градиент сульфата аммония, а также осмотические градиенты и комплексообразования.

1.2.5. Методы повышения стабильности липосом

- ***Лиофилизация***

Сублимационная сушка, или лиофилизация, представляет собой метод удаления воды из замороженного образца путем сублимации в условиях пониженного давления, когда лед переходит в пар, минуя жидкую фазу. Процесс включает три этапа: замораживание, первичную сушку с удалением льда и вторичную сушку, направленную на удаление связанной воды и снижение остаточной влажности. Использование данного подхода повышает стабильность липосомальных систем при хранении, поскольку отсутствие свободной воды снижает вероятность гидролиза фосфолипидов и других процессов деградации, которые могут нарушать структуру и свойства липосом. Для сохранения структурной целостности липосом применяют криопротекторы (чаще всего

дисахариды — лактоза, сахароза, трегалоза). Их защитный эффект основан на способности формировать водородные связи с полярными группами липидов и заменять молекулы воды, стабилизируя мембрану в условиях замораживания и вакуумной сушки. Кроме того, при охлаждении криопротекторы переходят в аморфное стеклообразное состояние, образуя матрицу, которая предотвращает слияние и агрегацию везикул. Оптимальная концентрация криопротекторов составляет 5–20%; при содержании ниже 2,5% возрастает риск повреждения липосом [30, 96, 128].

- ***Введение антиоксидантов***

Кроме лиофилизации, одним из широко применяемых методов стабилизации липосом является введение в липосомальную композицию антиоксидантов. Антиоксиданты предотвращают перекисное окисление липидов, которое может вести к нарушению целостности бислоя, утечке связанного вещества и агрегации везикул.

Проведенные исследования, посвященные стабилизации липидных мембран, свидетельствуют о важной роли антиоксидантов в предотвращении окислительной деструкции липосомальных систем. Так, в работе P. Boonnoy, M. Karttunen и J. Wong-ekkabut [36] показано, что α-токоферол ингибирует образование пор в окисленных бислоях, тем самым предотвращая нарушение целостности мембран.

Таким образом, лиофилизация с введением криопротекторов и применение антиоксидантов представляют собой эффективные и взаимодополняющие подходы к повышению стабильности липосомальных систем. Лиофилизация способствует длительному сохранению препарата за счет удаления воды и образования защитной стекловидной структуры, в то время как антиоксиданты снижают риск окислительного повреждения липидов и помогают поддерживать целостность мембран.

1.2.6. Методы стерилизации липосомальных препаратов

Для обеспечения безопасности и соответствия требованиям, предъявляемым к ЛФ для парентерального применения, липосомальные препараты должны быть стерильными. Однако использование стандартных методов стерилизации в этом случае ограничено, поскольку липосомальные системы чувствительны к температурным, радиационным и химическим воздействиям. По этой причине при их разработке используются методы, которые позволяют обеспечить стерильность ЛС без существенного нарушения структуры везикул и их фармацевтических свойств.

- ***Мембранная фильтрация.*** Один из наиболее распространенных методов стерилизации, предполагающий использование мембран с размером пор 0,2–0,4 мкм. Этот метод обеспечивает удаление микроорганизмов и в то же время оказывает меньшее влияние на целостность липосом.
- ***Криорадиационная стерилизация.*** Метод основан на облучении замороженных липосомальных систем дозами до 30 кГр. Это позволяет сохранить дисперсность, мембранную структуру и биологическую активность ЛС. Метод предотвращает агрегацию и окислительные процессы, характерные для традиционного радиационного облучения при положительных температурах [97, 62].

1.2.7. Контроль и исследование физико-химических характеристик липосомальных препаратов

Контроль качества липосомальных систем является критическим этапом при их разработке и производстве, поскольку физико-химические характеристики везикул напрямую определяют терапевтическую эффективность и безопасность

препарата. Основными объектами контроля являются размер и распределение частиц, степень инкапсуляции активных веществ, ζ-потенциал, стабильность и стерильность. Ключевыми критериями оценки служат воспроизводимость технологических параметров, однородность дисперсии, сохранность инкапсулированного вещества, отсутствие агрегации и микробной контаминации, а также соответствие нормативным требованиям к парентеральным ЛФ.

- ***Оценка размера и распределения частиц***

Размер липосом оказывает существенное влияние на их фармакокинетическое поведение, проникновение в ткани и стабильность. Для систем доставки ЛС оптимальным считается диапазон менее 200 нм, что способствует пролонгированной циркуляции и повышенному накоплению в патологических тканях. Определение размеров и полидисперсности липосом проводится методом динамического светорассеяния (DLS).

В исследовании Federico и соавт. [70], посвященном разработке липосом для доставки гемцитабина, методы ультрафильтрации и экструзии позволили сформировать везикулы с диаметром <200 нм, что обеспечивало более эффективное накопление в опухолевой ткани.

- ***Оценка степени инкапсуляции***

Степень включения активного вещества в липосомы является ключевым параметром, определяющим дозозависимую эффективность препарата. Для количественного анализа применяются спектрофотометрические методы (СФМ), позволяющие оценивать концентрацию инкапсулированного вещества и его удержание в везикулах [110].

По данным [80], в случае гемцитабина эффективность инкапсуляции может достигать 80%, что является значимым показателем для систем целевой доставки цитостатиков и напрямую связано с достижением терапевтической дозы в опухоли при снижении системной токсичности.

- ***Оценка дзета (ζ)-потенциала***

ζ-потенциал является важным параметром, характеризующим поверхностный заряд липосом и определяющим их коллоидную стабильность.

Более высокие по модулю отрицательные или положительные значения ζ-потенциала способствуют электростатическому отталкиванию частиц и предотвращают их агрегацию в дисперсии. Измерение ζ-потенциала проводится методом электрофоретического светорассеяния и позволяет прогнозировать устойчивость липосомальных систем как при хранении, так и в физиологических условиях. В ряде исследований показано, что стабильность липосомальных форм гемцитабина обеспечивается при значениях ζ-потенциала ниже -25 мВ, что гарантирует сохранение дисперсности и препятствует укрупнению везикул в процессе хранения [17].

- ***Оценка стабильности***

Стабильность липосомальных систем включает способность везикул сохранять размер, целостность мембраны и удерживать активное вещество в процессе хранения и в условиях физиологической среды. На устойчивость влияют температура, pH, продолжительность хранения и состав мембраны.

Исследования показали, что лиофилизация с использованием криопротекторов (сахароза, маннит) существенно увеличивает срок хранения и предотвращает агрегацию везикул. Применение термосенсибилизированных липосом дополнительно позволяет контролировать высвобождение вещества в заданных физиологических условиях [30, 31].

- ***Стерильность***

Для инъекционных форм липосомальных препаратов обязательным условием является полная стерильность. Наиболее часто используется мембранная фильтрация через поры диаметром 0,2 мкм, обеспечивающая удаление микроорганизмов без разрушения структуры везикул. Контроль стерильности проводится методами тестирования на микробную контаминацию и эндотоксины.

Исследования [31, 134] показали, что фильтрация через стерилизующие мембраны с порами 0,2 мкм не оказывает значимого влияния на размер и полидисперсность липосом, что делает данный метод предпочтительным для сохранения физико-химических свойств ЛЛФ.

1.2.8. Липосомальные препараты в медицинской практике

Наиболее активно липосомальные технологии внедряются в онкологическую практику, где они позволяют повышать концентрацию химиотерапевтических агентов в опухолевых тканях, минимизируя их системную токсичность. Примером является липосомальная форма доксорубицина Doxil®, одобренная FDA для лечения саркомы Капоши, рака яичников, рака молочной железы и множественной миеломы. За счет EPR-эффекта Doxil® обеспечивает селективное накопление в опухоли и существенно снижает кардиотоксичность по сравнению с немодифицированным доксорубицином [32]. Схожие преимущества демонстрирует Myocet®, применяемый при метастатическом раке молочной железы в комбинации с циклофосфамидом, а липосомальная форма цисплатина Lipoplatin® характеризуется улучшенным фармакокинетическим профилем, удлиненным временем циркуляции и повышенным накоплением в опухолевых клетках [101, 122]. Помимо них, в клинической практике используется ряд других липосомальных химиопрепаратов, среди которых DaunoXome® (даунорубицин), Marqibo® (винкристин), Onivyde® (иринотекан), DepoCyt® (цитарабин) и др., что свидетельствует о широкой интеграции данной технологии в онкологическую фармакотерапию (Таблица 3).

Липосомальные препараты нашли применение и за пределами онкологии. Так, липосомальная форма амфотерицина B (AmBisome®) является стандартом терапии тяжелых инвазивных грибковых инфекций, включая аспергиллез, кандидоз и криптококковый менингит, при этом демонстрируя значительно меньшую нефротоксичность по сравнению с немодифицированным препаратом [9]. Липосомальные формы кортикостероидов, например будесонида, используются для лечения воспалительных заболеваний дыхательных путей, включая астму и хроническую обструктивную болезнь легких, обеспечивая локальную доставку в легкие и снижая системное действие [88]. Перспективным направлением остается и противовирусная терапия: липосомы рассматриваются

как носители для антиретровирусных препаратов, интерферонов и ингибиторов вирусных ферментов, что позволяет увеличить внутриклеточную концентрацию активных веществ и снизить их токсичность [99]. Кроме того, липосомы активно применяются в генотерапии для доставки ДНК и РНК, включая siRNA, микроРНК и плазмидные конструкции, при лечении генетических заболеваний и в разработке онколитических подходов [89].

Таблица 3 – Некоторые липосомальные препараты и их характеристики

Торговое название	**Активное вещество**	**Область применения**	**Ключевые преимущества**
Doxil® / Caelyx®	Доксорубицин	Саркома Капоши, рак яичников, множественная миелома, рак молочной железы	Снижение кардиотоксичности, улучшенная доставка в опухоль
Myocet®	Доксорубицин	Метастатический рак молочной железы	Снижение кардиотоксичности, улучшенный профиль побочных эффектов
Lipoplatin®	Цисплатин	Различные солидные опухоли	Повышенная селективность накопления в опухоли, снижение токсичности
DaunoXome®	Даунорубицин	Саркома Капоши	Снижение системной токсичности, повышение концентрации в опухоли
DepoCyt®	Цитарабин	Лимфоматозный менингит	Пролонгированное действие, улучшенная доставка в ЦНС
Marqibo®	Винкристин	Острый лимфобластный лейкоз	Увеличенная экспозиция, улучшенная доставка в опухоль
Onivyde®	Иринотекан	Метастатический РПЖ	Повышенная концентрация в опухоли, улучшенный фармакокинетический профиль
AmBisome®	Амфотерицин B	Инвазивные грибковые инфекции (аспергиллез, кандидоз, криптококковый менингит)	Снижение нефротоксичности, улучшенная доставка в очаг инфекции
Липосомальные кортикостероиды	Будесонид	Астма, хроническая обструктивная болезнь легких	Направленная доставка в легкие, снижение системных побочных эффектов

Таким образом, липосомальные препараты представляют собой важный инструмент современной лекарственной терапии, обеспечивающий улучшенную фармакокинетику, снижение побочных эффектов и возможность адресной доставки АФС. Перечень зарегистрированных липосомальных форм, приведенный в таблице 3, отражает широкий диапазон их клинического применения и перспективы дальнейшего развития.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Анализ литературы показал, что гемцитабин занимает важное место среди аналогов нуклеозидов с широким спектром противоопухолевой активности и используется в клинической практике более 30 лет. В главе рассмотрены его химическая структура, молекулярные механизмы действия, фармакокинетические характеристики и клинические данные о его применении при различных злокачественных новообразованиях, включая рак поджелудочной железы, легких, молочной железы, мочевого пузыря и яичников.

2. Несмотря на доказанную клиническую эффективность, применение гемцитабина связано с рядом ограничений, обусловленных его физико-химическими и фармакокинетическими свойствами. К этим ограничениям относятся гидрофильная природа молекулы, короткий период полураспада и быстрая ферментативная инактивация.

3. Обзор литературы показывает, что разрабатываются различные подходы для преодоления этих недостатков, включая создание липофильных производных гемцитабина, конъюгатов лекарственных средств и липосомальных систем доставки. Использование липосом может увеличить циркуляцию лекарственного средства, снизить системную токсичность и усилить накопление активного вещества в опухолевой ткани, в том числе за счет повышения проницаемости и удержания. Кроме того, липосомы, модифицированные лигандами, рассматриваются как средство более селективной доставки лекарственного средства к целевым клеткам.

4. Структура, свойства и подходы к классификации липосом подробно описаны в литературе. Показано, что изменения размера частиц, количества липидных бислоев и состава мембраны влияют на фармакокинетические характеристики инкапсулированных лекарственных средств. Также обсуждаются основные методы получения липосом и методы включения лекарственных средств, включая гидратацию тонкой пленки, ультразвуковую обработку и обратную фазу.

5. К наиболее важным показателям качества липосомальных лекарственных форм относятся размер частиц, равномерность их распределения, степень инкапсуляции и физико-химическая стабильность системы. Для липосомальных форм цитостатиков, включая гемцитабин, именно высокая степень включения активного ингредиента и поддержание стабильности системы в значительной степени определяют потенциал этого подхода с точки зрения повышения эффективности и снижения побочных реакций.

6. Наличие зарегистрированных липосомальных препаратов, включая Doxil®, Myocet®, Lipoplatin® и AmBisome®, подтверждает практическую значимость этой технологии. Опыт их применения показывает, что липосомальные носители могут улучшить селективность доставки лекарственных средств, снизить системную токсичность и обеспечить более длительный терапевтический эффект.

7. Таким образом, использование липосомальных технологий для доставки гемцитабина является научно обоснованным направлением, позволяющим преодолеть ограничения традиционной лекарственной формы препарата и создающим предпосылки для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и реактивы

При проведении технологических и химико-фармацевтических исследований ЛЛФ гемцитабина использовали химические субстанции и реактивы, соответствующие требованиям нормативной документации (ГОСТы, ТУ, фармакопейные статьи ГФ XV издания и Фармакопеи ЕАЭС).

***Действующее вещество*:**

Гемцитабин (субстанция синтезирована в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, содержание основного вещества 99,5%) – белый или почти белый кристаллический порошок без запаха. Молекулярная масса (М) = 263,2 г/моль.

Компоненты липосомальной мембраны:

Яичный фосфатидилхолин E PC S (Lipoid, Германия) (ЯФХ) − порошок белого цвета с кремоватым оттенком, растворим в хлороформе, метаноле и этаноле; нерастворим в воде. М = 760 г/моль, температура фазового перехода ($Т_{ф.п.}$) около ~ −15 °С.

Гидрогенизированный яичный фосфатидилхолин E PC-3 (Lipoid, Германия) (гЯФХ) **–** порошок белого цвета с желтоватым оттенком; растворим в хлороформе, метаноле, этаноле, толуоле, эфире; не растворим в воде и ацетоне. М = 750 г/моль, $Т_{ф.п.}$ ~ 44 °С.

Гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин S PC-3 (Lipoid, Германия) (гСФХ) − белый порошок; растворим в органических растворителях, нерастворим в воде. М = ~770 г/моль, $Т_{ф.п.}$ ~ 45 °С.

1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин DPPC (Avanti Polar Lipids, США) − белый или слегка желтоватый порошок, растворим в хлороформе, метаноле и этаноле; нерастворим в воде. М = 734,0 г/моль, $Т_{ф.п.}$ ~ 41 °С.

1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин DSPC (Avanti Polar Lipids, США) − белый порошок; растворим в органических растворителях (хлороформ, метанол), нерастворим в воде. M = 790,2 г/моль. $T_{ф.п.}$ ~ 55 °C.

1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин DOPE (Avanti Polar Lipids, США) − вязкое вещество или порошок от белого до желтого цвета. Растворим в хлороформе, этаноле и метаноле. M = 744,1 г/моль. $T_{ф.п.}$ ~ −16 °C.

1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан DOTAP (Avanti Polar Lipids, США) – порошок белого или кремового цвета, легко растворим в хлороформе, метаноле и этаноле, нерастворим в воде; относится к катионным липидам, используется для придания положительного заряда липосомальной мембране и повышения электростатического взаимодействия с клеточными мембранами. M = 698,1 г/моль. $T_{ф.п.}$ ~ 4 °C.

Холестерин (Avanti Polar Lipids, Inc., США) – кристаллический порошок от белого до бледно-желтого цвета без запаха или со слабым запахом, чувствителен к действию света. Легко растворим в хлороформе и диэтиловом эфире, растворим в 1,4-диоксане, умеренно растворим в ацетоне и этаноле, практически не растворим в воде и метаноле. M = 386,7 г/моль.

1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси (полиэтиленгликоль)-2000] аммониевая соль PEG-2000-DSPE 18:0 (ПЭГ-ДГФА) (Lipoid, Германия) – порошок белого цвета, растворим в хлороформе, толуоле, метаноле и этаноле, не растворим в воде и ацетоне. M = 2787,49 г/моль.

Криопротекторы:

Сахароза D (+) ((USP-NF, BP, Ph. Eur., JP) ДИА-М). M = ~342,3 г/моль.

Трегалоза дигидрат ОСЧ (Химмед, Россия). M = ~378,33 г/моль.

Растворители:

Вода очищенная (ФС.2.2.0019),

Вода для инъекций (ФС.2.2.0020),

Спирт этиловый 95% (ФС.2.1.0036) (ЗАО «РФК», Россия),

Хлороформ (трихлорметан) стабилизированный ХЧ (ТУ 2631-001-29483781-04 изм. 1, 2) (Химмед, Россия),

Диметилсульфоксид (ДМСО) ЧДА (Химмед, Россия),

Метанол, ХЧ (Химмед, Россия);

Метилен хлористый, ХЧ (ЗАО ЭКОС-1, Россия);

Н-октанол >99% для синтеза (CHEMSOLUTE®, Th.Geyer, Германия),

HEPES, буфер (AppliChem GmbH, Германия).

Реактивы и среды для in vitro исследований

L-глутамин 2 мМ (ПанЭко, Россия),

Пенициллин,

Раствор Версена (ПанЭко, Россия),

Среда RPMI-1640 (ПанЭко, Россия),

Стрептомицин,

Фетальная бычья сыворотка 10% (HyClone, США).

Клеточные линии

Клеточная линия рака легкого А549 (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России).

Вспомогательные материалы для фильтрации и экструзии:

Для получения и стандартизации липосомальных дисперсий использовались мембранные фильтры различных типов с диаметром 25 и 47 мм. В ходе работы было исследовано пять типов фильтров, различающихся по химической природе и физико-механическим свойствам:

1. Поликарбонатные (ПК) с размером пор 0,4 и 0,2 мкм,
2. Нейлоновые (Н) − 1,2, 0,45 и 0,22 мкм
3. Полиэфирсульфоновые (ПЭС) − 0,22 мкм,
4. Смесь эфиров целлюлозы (СЭЦ) − 0,22 мкм,
5. Поливинилиденфторидные (ПВДФ) − 0,22 мкм.

Вспомогательные материалы для СФМ и измерения гидродинамического диаметра и ζ-потенциала липосомальных частиц:

Кюветы кварцевые с крышкой размером 10 × 10 мм (Россия).

Одноразовые полистирольные кюветы DTS0012 (Malvern, Великобритания)

Вспомогательные материалы для гель-фильтрации и очистки липосом:

Хроматографические колонки NAP-5, заполненные сефадексом G-25 (GE Healthcare, США).

2.2. Оборудование

Весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия);

Весы лабораторные DL-120 (A&D Company, Япония);

Весы лабораторные GF-600 (A&D Company, Япония);

Вибромешалка лабораторная Vibramax 100 (Heidolph, Германия);

Вискозиметр вибрационный AND SV-10 (A&D Company, Япония);

Гомогенизатор Polytron PT 1200 E (Kinematica AG, Швейцария);

Дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern, Великобритания);

Испаритель роторный Heidolph Hei-VAP Advantage с отгонной колбой вместимостью 2 л (Heidolph, Германия);

Магнитная мешалка с подогревом (IKA C-MAG HS 7, Германия);

Моечно-дезинфекционная машина Lancer 1400 UP DIN (Lancer, Франция);

pH-метр HANNA HI 2211 (Hanna Instruments, Румыния);

Спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия);

Стерилизатор сухожаровой Binder ED (Binder, Германия);

Сублимационная установка Gamma 2-16 LSC (Christ, Германия);

Система получения воды для инъекций УВОИ-М-Ф/1812 (МедианаФильтр, Россия);

Ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия);

Фотометрический анализатор иммуноферментных реакций Multiscan EX (Thermo Electron, Германия);

Экструдер LipexTM Thermobarrel Extruder объемом 10 и 100 мл (Northern Lipids Inc., Канада).

2.3. Методы исследований

2.3.1. Получение липосом

Для получения липосомальных дисперсий использовали метод тонкопленочной гидратации с последующей экструзией, обеспечивающий формирование везикул с контролируемым размером и однородными характеристиками. В работе применялись как методы пассивной загрузки гидрофильного действующего вещества при гидратации липидной пленки, так и методы активной (дистанционной) загрузки, основанные на создании трансмембранных ионных градиентов. Для удаления неинкапсулированного гемцитабина полученные дисперсии подвергали очистке методом гель-фильтрации.

А. Получение липосом с гемцитабином

Липосомы с действующим веществом получали двумя подходами:

1. при пассивной загрузке гидратацию липидной пленки проводили раствором гемцитабина, в результате чего действующее вещество распределялось между внутренним водным компартментом липосом и внешней дисперсионной средой;

2. при активной загрузке использовали различные внутренние среды, формирующие условия для накопления гемцитабина:

- раствор сульфата аммония ($(NH_4)_2SO_4$, 250 мМ) − классическая схема градиентной загрузки, обеспечивающая удержание молекул за счет образования труднорастворимых комплексов;
- раствор хлорида натрия (NaCl, 0,9%) − физиологически совместимая система без специфического градиента;
- фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7,4) − среда с высокой ионной силой, способствующая стабилизации заряда липосом и поддержанию нейтрального pH.

Полученные многослойные липосомы (МСЛ) подвергали экструзии через поликарбонатные мембраны для формирования однослойных везикул с заданным диаметром.

Б. Получение «пустых» липосом

«Пустые» липосомы готовили по аналогичной методике, исключая добавление гемцитабина в раствор для гидратации липидной пленки.

2.3.2. Получение лиофилизированных липосом гемцитабина

Для обеспечения длительной стабильности ЛЛФ гемцитабина и предотвращения утечки активного вещества применяли метод сублимационной сушки. Основной целью был выбор криопротектора, обеспечивающего сохранение качества липосом, включая размер, полидисперсность и эффективность включения (ЭВ) препарата.

Криопротектор (сахарозу или трегалозу) добавляли либо на стадии гидратации липидной пленки, растворяя в растворе гемцитабина, либо после экструзии, вводя в готовую липосомальную дисперсию. Эвтектическую температуру препарата определяли термическим методом по датчику, фиксируя характерный скачок температуры при оттаивании замороженных образцов.

Липосомальную дисперсию дозировали по 2 мл флаконы объемом 10 мл при температуре 20–25 °C и помещали в камеру сублимационной установки Gamma 2-16 LSC. Процесс лиофилизации включал следующие этапы:

1. Замораживание. Полку охлаждали до -50 °C. Флаконы с дисперсией устанавливали после достижения температуры полки ниже -30 °C. Минимальная температура препарата составила -41 °C. Общая продолжительность стадии замораживания – 9,5 ч, включая выдержку при минимальной температуре в течение 3 ч.

2. Первичная сушка. Вакуум в камере устанавливали при давлении 0,025 бар. Процесс включал ступенчатый подъем температуры полки: от -50 до -30 °С (2,5 °С/ч), от -30 до -16 °С (1 °С/ч), от -16 до -3 °С (2 °С/ч). Общая продолжительность стадии составила 31 ч.

3. Вторичная сушка. Температуру полки доводили до +22 °С и выдерживали препарат 9 ч.

Общая продолжительность цикла лиофилизации составила около 49,5 ч. После завершения процесса флаконы укупоривали.

2.3.3. Методы анализа липосомальной лекарственной формы гемцитабина

− ***Количественное определение гемцитабина***

Количественное определение гемцитабина проводили методом СФМ с использованием рабочего стандартного образца (СО) при длине волны 268±2 нм. Поскольку вспомогательные вещества, входящие в состав липосом также поглощают в этой области спектра, измерения оптической плотности проводили в сравнении с раствором «пустых» липосом.

Приготовление СО. К точной навеске субстанции гемцитабина 3 мг добавляют 1 мл воды и помещают в УЗ-ванну, после растворения добавляют небольшое количество 95% спирта, перемешивают. Полученный спиртовой раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят спиртом до метки (Раствор А). Отбирают 5 мл раствора А в колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом до метки (Раствор Б).

Методика количественного спектрофотометрического анализа гемцитабина в липосомальной дисперсии (исходной). 1 мл липосомальной дисперсии гемцитабина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют небольшое количество спирта 95%, перемешивают и доводят спиртом до метки (Раствор А). Отбирают 10 мл раствора А в колбу вместимостью 25 мл и

доводят спиртом до метки (Раствор Б). Измеряют величину оптической плотности полученного спиртового разведения в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм в максимуме поглощения (268±2) нм относительно раствора сравнения – «пустых» липосом. Параллельно проводят измерение оптической плотности спиртового раствора СО относительно раствора сравнения – спирта этилового 95%. Концентрацию гемцитабина в липосомальной дисперсии (С, мг/мл) рассчитывают по формуле 1:

$$C = A \times a_0 \times V / A_0 \times V_0 \qquad (1),$$

где: А и A_0 – оптические плотности растворов образца липосомальной дисперсии и СО гемцитабина, соответственно; a_0 – навеска СО гемцитабина, в мг; V и V_0 – разведения образца липосомальной дисперсии и СО гемцитабина, соответственно.

Методика количественного спектрофотометрического анализа гемцитабина в липосомальной дисперсии, очищенной гель-фильтрацией. Всю фракцию очищенной липосомальной дисперсии гемцитабина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют небольшое количество спирта 95%, перемешивают, доводят спиртом до метки. Измеряют величину оптической плотности полученного спиртового разведения в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм в максимуме поглощения (268±2) нм относительно раствора сравнения – «пустых» липосом. Параллельно проводят измерение оптической плотности спиртового раствора СО относительно раствора сравнения – спирта этилового 95%. Концентрацию гемцитабина в липосомальной дисперсии (С, мг/мл) рассчитывают по формуле 1.

Методика количественного спектрофотометрического анализа гемцитабина в ЛЛФ-лио. Регидратированное содержимое флакона помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют небольшое количество спирта 95%, перемешивают и доводят спиртом до метки (Раствор А). Отбирают 10 мл раствора А в колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом до метки (Раствор Б). Измеряют величину оптической плотности полученного спиртового разведения в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм в максимуме поглощения (268±2) нм относительно раствора сравнения – «пустых» липосом. Параллельно проводят

измерение оптической плотности спиртового раствора СО относительно раствора сравнения – спирта этилового 95%. Содержание гемцитабина во флаконе (X, мг/флакон) рассчитывают по формуле 2:

$$X = A \times a_0 \times V / A_0 \times V_0 \qquad (2),$$

где: A и A_0 – оптические плотности растворов образца лиофилизата и СО гемцитабина, соответственно; a_0 – навеска СО гемцитабина, в мг; V и V_0 – разведения образца лиофилизата и СО гемцитабина, соответственно.

– ***Определение эффективности включения и загрузочной емкости***

Так как гемцитабин является гидрофильным веществом и при получении липосом включается в их водное ядро, для определения ЭВ необходимо отделить ЛС, находящееся вне везикул (свободный). С этой целью применяли метод гель-фильтрации. На хроматографическую колонку NAP-5, заполненную сефадексом, наносили 1 мл воды для инъекций. После прохождения воды на сухую поверхность колонки медленно наносили 1 мл липосомальной дисперсии. На выходе из колонки получали 2 фракции: 1-я – мутная жидкость – липосомальный гемцитабин, 2-я фракция – не включившийся в липосомы гемцитабин (прозрачный раствор). Фиксация смены фракций визуальная.

Эффективность включения гемцитабина в липосомы (ЭВ, %) рассчитывали по формуле 3:

$$ЭВ = (A_1 \times C_1 \times V_1 / A \times C \times V) \times 100\% \qquad (3),$$

где $\mathbf{A_1}$ – оптическая плотность раствора фракции с очищенными липосомами гемцитабина; **A** – оптическая плотность раствора исходной липосомальной дисперсии; $\mathbf{C_1}$ – величина разбавления фракции с очищенным липосомальным гемцитабином; **C** – величина разбавления исходной липосомальной дисперсии; $\mathbf{V_1}$ – объем фракции с очищенным липосомальным гемцитабином, мл; **V** – объем исходной липосомальной дисперсии, нанесенной на колонку, мл.

Загрузочную емкость (ЗЕ) гемцитабина, или соотношение drug/lipid (DL), рассчитывали по формуле 4:

ЗЕ = (масса загруженного гемцитабина / суммарная масса липидов) × 100% (4)

– ***Определение размера и индекса полидисперсности (PDI) липосом гемцитабина***

Автоматической пипеткой отмеривали 200 мкл исследуемого образца свежеприготовленных липосомальной дисперсии или регидратированного лиофилизата ЛЛФ гемцитабина, помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили водой до метки. 1 мл разведенного образца переносили в кювету, которую помещали в ячейку дзетасайзера и запускали прибор. Измерение показателя проводили не менее 6 раз.

– ***Определение ζ-потенциала липосом гемцитабина***

ζ-потенциал фосфолипидных везикул определяли путем измерения их электрофоретической подвижности. В мерную колбу объемом 50 мл помещали 150−200 мкл липосомальной дисперсии и доводили водой до метки. 1 мл разведения переносили в кювету, которую помещали в ячейку дзетасайзера, в кювету вставляли электрод и запускали прибор. Измерение показателя проводили не менее 6 раз.

– ***Определение динамической вязкости образцов липосомальной дисперсии***

Значение динамической вязкости оценивали с использованием вибрационного вискозиметра Vibro Viscometer SV-10 в интервале температур от 20 до 25 °С. Для этого 10 мл липосомальной дисперсии помещали в кювету прибора, в которую опускали медные пластинки и проводили измерение показателя в трех повторах.

– ***Определение значения pH липосомальной дисперсии гемцитабина до и после лиофилизации***

Значение pH в липосомальной дисперсии измеряли, не разбавляя. С целью определения pH лиофилизата к нему добавляли 5 мл воды и проводили измерение,

предварительно измерив значение pH воды. Все измерения осуществлялись в интервале температур от 20 до 25 °С.

– ***Определение потери в массе при высушивании***

Потерю в массе при высушивании (влажность) определяли, руководствуясь ОФС.1.2.1.0010 «Потеря в массе при высушивании». Результат выражали в виде массовой доли в процентах.

Для анализа навеску препарата (взвешенное содержимое флакона) помещали в предварительно высушенный и взвешенный бюкс и сушили до постоянной массы в вакуумном сушильном шкафу над пятиокисью фосфора при комнатной температуре и остаточном давлении 5 мм рт.ст.

– ***Определение липофильности гемцитабина***

Оценку липофильности исследуемого соединения проводили с использованием метода «Встряхивание в колбе».

– *Подготовка фаз*. Учитывая высокую растворимость воды в октаноле, перед использованием проводили взаимное насыщение растворителей путем перемешивания в течение 3 ч при скорости вращения 300–350 об/мин. Далее смесь октанола и воды переливали в делительную воронку и оставляли в покое для разделения. Насыщенные растворители сливали в отдельные емкости.

– *Введение ЛС в смесь октанол-вода*. Навеску гемцитабина растворяли в водной фазе, к которой добавляли октанол в объемном соотношении 1:1. Полученную смесь перемешивали на шейкере не менее 3 ч со скоростью 150 об/мин.

– *Разделение фаз*. После перемешивания смесь растворов осторожно переливали в делительную воронку и оставляли для достижения равновесия системы на 18–20 ч, что отмечали визуально по формированию четкой линии раздела фаз. С целью отбора проб приоткрывали запорный кран на воронке и каждую фазу сливали в отдельные емкости.

− *Спектрофотометрический анализ гемцитабина в водной и октанольной фазах*. 2 мл фазы с помощью автоматической пипетки переносили в колбу вместимостью 25 мл и доводили спиртом этиловым до метки. Полученное разведение анализировали в максимуме поглощения гемцитабина при 268±2 нм с использованием в качестве раствора сравнения спирт этиловый.

Далее рассчитывали показатель липофильности по формуле 5:

$$\log P_{окт/вода} = \log (C_{окт}/C_{вода}) \qquad (5),$$

где $C_{окт}$ и $C_{вода}$ – концентрации гемцитабина в октанольной и водной фазах, соответственно.

2.3.4. Сравнительное изучение цитотоксической активности лекарственных форм гемцитабина в опытах *in vitro*

Целью данного этапа работы являлась сравнительная оценка цитотоксической активности ЛЛФ гемцитабина и раствора свободного гемцитабина в отношении клеточной линии аденокарциномы легкого человека А549 при стандартных условиях культивирования *in vitro* [11].

В качестве тест-объекта использовали клеточную линию А549, культивируемую в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, а также антибиотиков пенициллина и стрептомицина. Клетки высевали в 96-луночные планшеты из расчета 7×10^3 клеток на лунку. Через 24 ч после посева в опытные лунки вносили исследуемые ЛФ в концентрациях 1 мМ; 100, 10, 1 мкМ; 100 и 10 нМ. В контрольные лунки для раствора свободного гемцитабина добавляли эквивалентный объем воды для инъекций, а для ЛЛФ гемцитабина – пустые липосомы в концентрации, соответствующей исследуемым образцам. Все варианты ставили в трехкратных повторах.

Инкубация с препаратами продолжалась 72 ч при 37 °C и 5% CO_2. Для оценки жизнеспособности клеток применяли колориметрический МТТ-тест, основанный на восстановлении желтого тетразолиевого красителя (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) до фиолетовых кристаллов формазана активными митохондриальными ферментами жизнеспособных клеток. После инкубации с МТТ в течение 4 ч надосадочную жидкость удаляли, кристаллы формазана растворяли в 150 мкл ДМСО и перемешивали на шейкере для равномерного окрашивания раствора. Оптическую плотность измеряли на фотометрическом анализаторе Multiscan EX при 540 нм.

Процент жизнеспособных клеток (N_0) вычисляли по формуле 5:

$$N_0 = \frac{N_1}{N_2} \times 100\% \qquad (5)$$

где N_1 – среднее значение оптической плотности в опытных лунках, N_2 – среднее значение в контрольных лунках.

Для определения концентрации, вызывающей гибель 50 % клеток (IC_{50}), применяли нелинейный регрессионный анализ дозозависимых кривых с использованием программы GraphPad Prism 5.

2.3.5. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных в ходе эксперимента данных проводили в программах Excel, Origin 6.1, руководствуясь ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний».

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГЕМЦИТАБИНА

3.1. Изучение свойств активной фармацевтической субстанции гемцитабина

3.1.1. Характеристика субстанции гемцитабина

Перед разработкой липосомальной системы доставки гемцитабина посредством комплексного анализа справочной информации и собственных экспериментальных данных была проведена физико-химическая характеристика АФС. По внешнему виду субстанция представляет собой белый кристаллический порошок с температурой плавления 227–231 °C. Гемцитабин является термически нестабильным соединением: при нагревании выше 70 °C он начинает разлагаться с образованием продуктов деградации, включая 2′,2′-дифтордезоксиуридин, причем скорость распада возрастает при воздействии влаги и щелочной среды [130]. Растворимость субстанции гемцитабина в воде при 20–25 °C составляет около 15 мг/мл, при этом в этаноле и метаноле она крайне низкая (<1 мг/мл) и требует использования ко-солвента для приготовления стандартов. В ДМСО гемцитабин хорошо растворим (более 50 мг/мл), что позволяет готовить концентрированные растворы для исследовательских целей. В органических неполярных растворителях, таких как хлороформ и метиленхлорид, субстанция нерастворима [47].

3.1.2. Кислотно-основные свойства гемцитабина (зависимость от pH)

По кислотно-основным свойствам гемцитабин является слабым основанием за счет наличия аминогруппы в положении 4 пиримидинового кольца. Значение pKa для аминогруппы составляет 3,6, что означает, что при физиологических значениях pH (7,2−7,4) молекула преимущественно находится в неионизированной форме [2].

Экспериментальные исследования показали, что растворимость гемцитабина существенно зависит от pH среды (Рисунок 6). Максимальная растворимость наблюдается в кислой среде (pH <5,0), где аминогруппа протонирована и молекула находится в ионизированной форме [67].

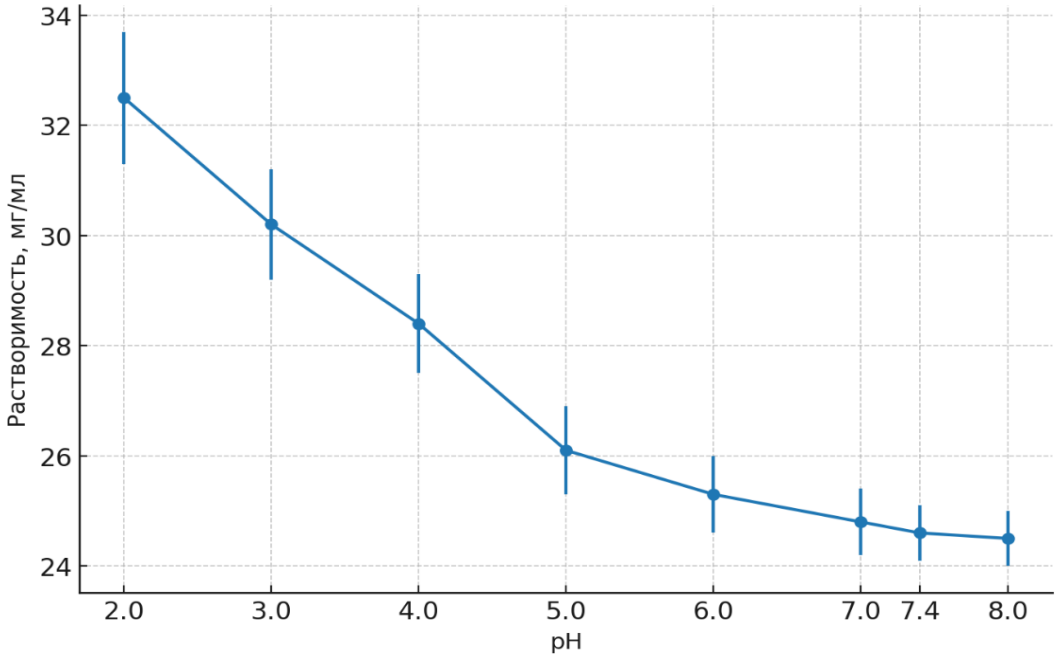

Рисунок 6 − Зависимость растворимости гемцитабина от pH среды [13]

При pH 2,0 растворимость гемцитабина достигает около 32,5 мг/мл, после чего последовательно снижается с ростом pH и выходит на стабильный уровень 24,5–24,8 мг/мл в диапазоне физиологически значимых значений (pH 7,0–8,0). Указанная зависимость имеет важное значение при прогнозировании биодоступности препарата и выборе ЛФ. Для разработки ЛЛФ данный фактор

определяет эффективность инкапсуляции гемцитабина, особенно при использовании методов активной загрузки, основанных на создании градиента pH [2].

Согласно Zhang et al. [137] стабильность гемцитабина в водных растворах обеспечивается при нейтральных значениях pH (≈6,5–7,5): в этом диапазоне не наблюдалось значимых изменений спектральных характеристик в пределах технологических операций. Вне указанного диапазона (более кислая или более щелочная среда) изменение степени протонирования и ионной силы приводит к снижению аналитической воспроизводимости и повышенному риску химических превращений; поэтому все операции приготовления и очистки дисперсий проводились при близком к нейтральному pH.

В то же время результаты собсвтенных исследований показали, что раствор гемцитабина в концентрации 0,5 мг/мл сохранял исходные физико-химические характеристики в более широком диапазоне pH. При инкубации в буферных системах со значениями pH 2,6; 2,8; 3,0; 3,9; 4,5; 5,4; 6,7; 7,6; 8,4; 9,1 и 10,4 раствор во всех случаях оставался прозрачным и бесцветным, без признаков опалесценции и выпадения осадка.

Таким образом, в условиях проведенного эксперимента гемцитабин сохранял стабильность в диапазоне pH 2,6-10,4 и не проявлял видимых признаков деградации. Полученные данные имеют практическое значение для разработки и стандартизации ЛФ гемцитабина, поскольку указывают на возможность использования различных буферных систем без ухудшения его исходных физико-химических свойств.

3.1.3. Липофильность гемцитабина

Липофильность - одна из ключевых характеристик лекарственного средства, влияющая в данном случае на его эффективность, включая проницаемость через

клеточные мембраны и взаимодействие с биологическими барьерами. Липофильность определяется количественно с помощью коэффициента распределения (P) или его десятичным логарифмом (logP), которые отражают соотношение растворимости вещества в двух несмешивающихся фазах - водной (полярной) и органической (неполярной). Н-октанол традиционно применяется в качестве органической фазы, так как по своим свойствам он приближен к липидному бислою клеточных мембран.

Значение logP служит показателем соотношения гидрофильных и липофильных свойств молекулы. Отрицательные значения logP указывают на высокую гидрофильность и ограниченную способность вещества диффундировать через липидные мембраны, тогда как положительные значения характеризуют соединение как преимущественно липофильное, с низкой растворимостью в воде и высокой аффинностью к липидной фазе. При logP, близком к нулю, молекула распределяется между фазами приблизительно равномерно [106].

В научной литературе отмечается, что экспериментальные значения липофильности для одного и того же соединения могут варьировать в зависимости от условий эксперимента и применяемой методики. Наиболее распространенным и эталонным подходом считается метод «Встряхивание в колбе», основанный на прямом измерении распределения вещества между н-октанолом и водой. Он обеспечивает высокую точность, хотя требует значительных затрат времени, реагентов и образцов высокой чистоты. Поэтому экспериментальное определение липофильности гемцитабина в настоящем исследовании проводили путем оценки распределения ЛС между водной и октанольной фазами [18]. Полученные значения logP варьировали от -1,10 до -1,21 (n=9), что соответствует выраженному гидрофильному характеру соединения (Таблица 4). Среднее значение logP составило -1,15, стандартное отклонение (S) 0,0346, а дисперсия (S^2) 0,0012. Низкое значение дисперсии, которое оказалось значительно ниже предельно допустимого уровня, свидетельствует о хорошей воспроизводимости полученных результатов.

Таблица 4 − Результаты определения липофильности гемцитабина

№ образца	logP	Статистические характеристики
1	-1,10	n=9, f=8, $x_{ср}$=-1,15, S^2=1,2 × 10^{-3}, S=3,464 × 10^{-2}, $x_{ср}\pm\Delta x$ (P=95%) =-1,150±0,027, ε=1,8%
2	-1,12	
3	-1,12	
4	-1,15	
5	-1,15	
6	-1,15	
7	-1,16	
8	-1,19	
9	-1,21	

Отрицательные значения logP указывают на то, что гемцитабин является полярным и хорошо растворимым в воде соединением, характеризующимся низкой растворимостью в липидной фазе. Это, в свою очередь, может ограничивать его способность самостоятельно проникать через клеточные мембраны. Эти данные еще раз подтверждают необходимость использования липосомальных систем для доставки гемцитабина, поскольку такие системы могут помочь защитить активное вещество от деградации и повысить эффективность его доставки. Сравнение экспериментально полученного значения logP с теоретически рассчитанным значением (XLogP3 = -1,5) выявило лишь незначительные различия, вероятно, связанные с условиями эксперимента и используемой методики.

3.1.4. Сорбционные свойства гемцитабина

При разработке ЛЛФ важное значение имеет характер взаимодействия АФС с материалами, используемыми на этапах получения и обработки дисперсий. Одним из факторов, способных повлиять на содержание действующего вещества, является его адсорбция на мембранных фильтрах, что может приводить к снижению концентрации препарата и, как следствие, влиять на точность

дозирования. Для оценки стабильности растворов гемцитабина и возможной сорбции препарата на мембранных фильтрах были проведены исследования с использованием фильтров различных типов (ПЭС, Н, ПК, ПВДФ, СЭЦ) с размером пор от 0,1 до 1,2 мкм.

На рисунке 7 представлена зависимость содержания гемцитабина после фильтрации от исходного уровня (%). Показано, что нейлоновые фильтры (с размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм) обеспечивали сохранение концентрации препарата на уровне 99–100%, что свидетельствует о минимальной сорбции. Поликарбонатные мембраны (с диаметром пор 0,4; 0,2 и 0,1 мкм) также характеризовались высокой степенью сохранения действующего вещества в пределах 98–99%. Для фильтров из смешанных эфиров целлюлозы (0,22 мкм) этот показатель был несколько ниже и составлял 96–97%, что может указывать на умеренное взаимодействие материала фильтра с препаратом. Мембраны из поливинилиденфторида (0,22 мкм) демонстрировали близкие значения сохранности около 98%. Наибольшая сорбция гемцитабина на фильтре наблюдалась при фильтрации раствора через полиэфирсульфоновые мембраны (0,22 мкм), при которой концентрация вещества снижалась до 95–96%.

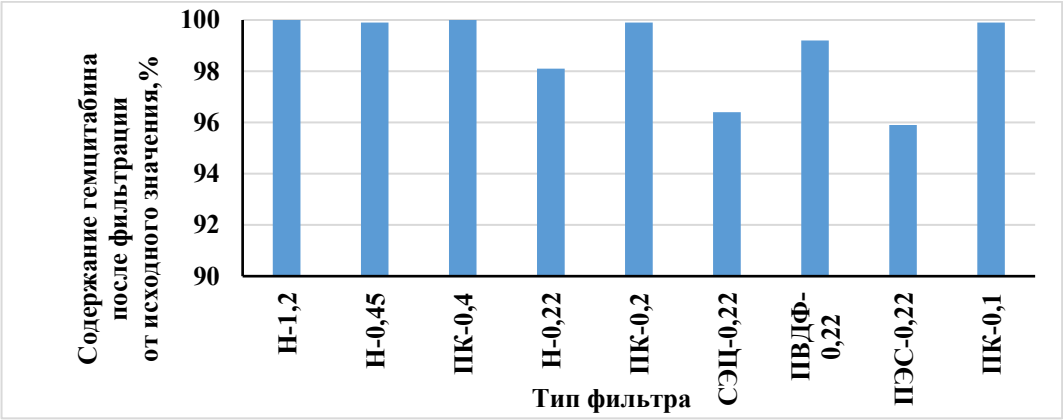

Рисунок 7 − Оценка сорбции гемцитабина на различных типах фильтра. Обозначения: Н-1,2/0,45/0,22 – нейлоновые фильтры с диаметром пор соответственно 1,2, 0,45 и 0,22 мкм; ПК-0,4/0,2/0,1 – поликарбонатные фильтры с диаметром пор соответственно 0,4, 0,2 и 0,1 мкм; СЭЦ-0,22 – фильтр из смешанных эфиров целлюлозы с диаметром пор 0,22 мкм, ПВДФ-0,22 – поливинилиденфторидные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, ПЭС-0,22 – полиэфирсульфоновые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм

Таким образом, минимальная сорбция гемцитабина характерна для нейлоновых и поликарбонатных мембран, что делает их оптимальными для операций экструзии липосом, содержащих ЛС. Использование мембран с более выраженными сорбционными свойствами, например, полиэфирсульфоновых, может приводить к существенным потерям действующего вещества, что необходимо учитывать при выборе технологических параметров стадий фильтрации и экструзии.

3.2. Разработка состава и технологии получения липосомальной лекарственной формы гемцитабина

3.2.1. Этап получения липидной пленки

Получение липидной пленки представляет собой подготовительный этап технологии инкапсуляции гемцитабина в липосомы и обеспечивает формирование исходной липидной матрицы для последующей гидратации. Данный этап включает следующие стадии:

- приготовление органического раствора липосомальных липидов;
- отгон растворителя и формирование липидной пленки.

Навески фосфолипида, холестерина и ПЭГ-ДГФА растворяли в хлороформе при интенсивном перемешивании в течение 5–10 мин. Полученный раствор количественно переносили в круглодонную колбу; для минимизации потерь стенки исходной емкости дополнительно обрабатывали свежей порцией растворителя, объединяя ее с основным раствором.

Удаление органического растворителя осуществляли на ротационном испарителе при температуре водяной бани, которая варьировала в зависимости от типа используемого фосфолипида (от 38 до 55 °C), при постепенном снижении

скорости вращения ротора от 90 до 10 об/мин для равномерного отложения липидной пленки на стенках колбы. Отгон хлороформа из раствора компонентов ЛЛФ проводили в условиях пониженного давления (до 300 мбар). Для обеспечения полного удаления остаточных следов растворителя пленку дополнительно сушили под вакуумом в течение 30–50 мин до постоянной массы содержимого колбы, при этом продолжительность стадии зависела от степени загрузки колбы.

Качество полученной пленки оценивали визуально: пленка имела однородную структуру, без видимых включений, трещин и зон неравномерной толщины. Сформированная липидная пленка использовалась для последующей гидратации и формирования дисперсии МСЛ.

3.2.2. Этап гидратации липидной пленки

Процесс гидратации липидной пленки является ключевым этапом технологии получения липосом. На данной стадии плоские липидные структуры самопроизвольно трансформируются в замкнутые сферические везикулы, способные инкапсулировать водорастворимые ЛС. В рамках данного этапа могут быть реализованы два метода загрузки гемцитабина: пассивный и активный.

3.2.2.1. Активная загрузка гемцитабина в липосомы

Метод активной загрузки основан на создании трансмембранного градиента ионов или pH, что обеспечивает возможность включения гидрофильных молекул, в том числе гемцитабина, с высокой эффективностью.

В исследуемой технологии были изучены три возможных варианта активной загрузки гемцитабина в липосомы на основе ЯФХ, холестерина и ПЭГ-ДГФА, различавшиеся составом гидратирующих растворов:

1. Раствор сульфата аммония $(NH_4)_2SO_4$, 250 мМ – классическая схема градиентной загрузки, при которой происходит обмен ионов аммония и гемцитабина с последующим удержанием молекул внутри липосом за счет образования труднорастворимых комплексов.

2. Фосфатно-солевой буфер (PBS), pH 7,4 – в данном случае возможна реализация метода загрузки малым объемом. Суть подхода заключается в инкубации предварительно сформированных липосом в минимальном количестве концентрированного раствора действующего вещества, что создает максимально высокий градиент концентрации через мембрану.

3. Раствор хлорида натрия (NaCl), 0,9% – данный вариант относится к методу гипертонической загрузки, при котором за счет создания повышенного осмотического давления во внутренней фазе липосомы обеспечивается диффузия ионов и частиц из внешнего раствора. Механизм основан на разнице ионных сил: вода с растворенным гемцитабином стремится проникнуть внутрь везикулы, что способствует включению молекул препарата.

Загрузка гемцитабина с использованием градиента сульфата аммония

Гидратацию липидной пленки осуществляли 250 мМ раствором сульфата аммония при температуре 22±2 °С в течение 1 ч и вращении ротора со скоростью 20–40 об/мин, что обеспечивало равномерный контакт ее поверхности с гидратирующим раствором. В результате формировалась дисперсия МСЛ, которая впоследствии подвергалась трехкратной экструзии через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм с целью получения однослойных липосом (ОСЛ) с контролируемыми размерами. К полученной дисперсии экструдированных липосом добавляли буферный раствор (HEPES) гемцитабина с концентрацией 5 мг/мл в объемном соотношении «дисперсия липосом/раствор гемцитабина» 1:1. Полученную смесь инкубировали при температуре 22±2 °С в течение 1 ч на вибрационной мешалке при постоянной скорости 150−200 об/мин. Теоретическая концентрация гемцитабина в конечной липосомальной дисперсии составляет 2,5 мг/мл.

Применение градиента сульфата аммония привело к низкой инкапсуляционной эффективности (ЭВ=10,5%) и умеренной ЗЕ (0,64% масс.) (Таблица 5). Кроме того, липосомы, полученные при таких условиях, характеризовались размером более 200 нм (239 нм) и высокой полидисперсностью (PDI=0,474), что указывает на низкую гомогенность системы. Несмотря на удовлетворительный ζ-потенциал (-21,3 мВ), ЭВ и ЗЕ делают данную модель малопригодной для воспроизводимого фармацевтического применения, особенно при парентеральной доставке. Эти результаты согласуются с литературными данными, согласно которым метод активной загрузки на основе $(NH_4)_2SO_4$ неэффективен для гемцитабина вследствие низкого значения pKa (3,6) и отсутствия достаточной разницы pH для удержания молекул во внутреннем водном объеме липосом [2].

Таблица 5 − Модель липосом с гемцитабином при активной загрузке с помощью сульфата аммония и оценка ее качества

Параметры сравнения		**Результаты**
Молярное соотношение ЯФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА		1/0,3/0,01
Контроль качества	Концентрация гемцитабина в дисперсии,	2,45
	Концентрация включенного в липосомы гемцитабина, мг/мл	0,258
	ЭВ, %	10,5
	ЗЕ, %мас.	0,64
	Размер липосом, нм	239,0±4,41
	PDI	0,474±0,314
	ζ-потенциал, мВ	-(21,3±2,13)
Примечание. * − данные представлены как среднее ± SD (среднеквадратичное отклонение), n=3		

Загрузка гемцитабина с использованием метода малого объема

Гидратацию липидной пленки осуществляли PBS с pH 7,4 при температуре 22±2 °C в течение 2 ч и скорости вращении ротора 20–40 об/мин. Полученную липосомальную дисперсию экструдировали через нейлоновые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм (1 раз) и поликарбонатные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (3 раза). Объем дисперсии измельченных липосом делили на две равные части.

К первой части липосомальной дисперсии добавляли раствор гемцитабина с концентрацией вещества 10 мг/мл в объемном соотношении «липосомальная дисперсия/раствор гемцитабина» 1:1 (Модель 1). Ко второй части липосомальной дисперсии добавляли раствор гемцитабина с меньшей концентрацией вещества – 5 мг/мл также в объемном соотношении 1:1 (Модель 2). Полученные смеси жидкостей инкубировали при температуре 22±2 °С в течение 2 ч на вибрационной мешалке при постоянной скорости 150−200 об/мин и далее оставляли в покое на 18 ч для выстаивания при температуре 4±1 °С. Теоретическая концентрация гемцитабина в конечной липосомальной дисперсии модели 1 составляет 5,0 мг/мл, модели 2 – 2,5 мг/мл.

Модели липосом гемцитабина, полученные при гидратации липидной пленки в PBS, показали низкую эффективность инкапсуляции (ЭВ=6,49–7,86%), однако отличались высокой однородностью (PDI=0,068–0,100) и оптимальными размерами липосом (156–161 нм) (Таблица 6). Эти физические параметры липосомальной дисперсии указывают на высокую воспроизводимость технологии и потенциал для применения в инъекционных формах, особенно при необходимости строгого контроля над размером. Однако низкая загрузочная способность гемцитабина ограничивает использование данной модели без дополнительной оптимизации, например, с применением градиентов или увеличением концентрации действующего вещества. PBS может быть полезен в качестве буфера стабилизации, но не обеспечивает условий для активной загрузки.

Таблица 6 − Модели липосом с гемцитабином при активной загрузке с помощью PBS и оценка их качества

Параметры сравнения		**Результаты**	
		Модель 1	**Модель 2**
Молярное соотношение ЯФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА		1/0,3/0,01	
Контроль качества	Концентрация раствора гемцитабина, мг/мл	5,0	2,5
	Продолжительность гидратации, ч	2	
	Продолжительность выстаивания дисперсии МСЛ в покое при 4 °С, ч	18	
	Концентрация включенного в липосомы гемцитабина, мг/мл	0,35	0,14

Продолжение Таблицы 6

	ЭВ, %	7,86	6,49
	ЗЕ, %мас.	0,85	0,34
	Размер липосом, нм	161,3±1,90	156,0±3,053
	PDI	0,068±0,056	0,100±0,040
	ζ-потенциал, мВ	-(17,8±1,03)	-(17,1±1,63)
Примечание. * данные представлены как среднее ± SD (среднеквадратичное отклонение), n=3			

Загрузка гемцитабина с использованием гипертонического метода

Гидратацию липидной пленки осуществляли гипертоническим раствором натрия хлорида с концентрацией вещества от 1,2 до 2,7% в зависимости от получаемой липосомальной модели (Таблица 7) при температуре 22±2 °С в течение 2 ч и скорости вращении ротора 20–40 об/мин. Полученную липосомальную дисперсию экструдировали через нейлоновые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм (1 раз) и поликарбонатные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (3 раза). К дисперсии экструдированных пустых липосом добавляли раствор гемцитабина с концентрацией ЛС от 5 до 10 мг/мл в зависимости от модели в различных объемных соотношениях «липосомальная дисперсия/раствор гемцитабина» (Таблица 7). Затем полученные смеси жидкостей инкубировали в течение 1 ч при температуре окружающей среды 22±2 или 37±1 °С и далее выстаивали при различных условиях, которые представлены в таблице 7.

Таблица 7 − Модели липосом с гемцитабином при активной загрузке с помощью натрия хлорида

Параметр сравнения	**Композиции**										
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
Молярное соотношение ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДГФА	1/0,3/0,01	1/0,1/0,003							1/0,2/0,003	1/0,1/0,003	
Объемное соотношение «дисперсия/раствор ЛС»	1:1			2:1				3:1		2:1	
Температура инкубации, °С	22				37	22	37				22
Режим выстаивания дисперсии	18 ч/4 °С				1,5 ч/ 22 °С	18 ч/4 °С	1,5 ч/22 °С				
Концентрация липидов в дисперсии после гидратации пленки, мг/мл	82	74,4		79,65		95,6		84,96	88,96	95,6	
Концентрация липидов в дисперсии после загрузки ЛС, мг/мл	41	37,2		53,1		63,72			66,72	63,72	
Концентрация NaCl в дисперсии после гидратации, %	2,7	1,8		1,35				1,2		1,35	
Концентрация NaCl в дисперсии после загрузки ЛС, %	1,35	0,9									
Концентрация раствора ЛС, мг/мл	5			7,5				10		3	
Концентрация ЛС в дисперсии, мг/мл	2,5									1	
Концентрация включенного в липосомы ЛС, мг/мл	0,165	0,269	0,258	0,33	0,575	0,405	0,737	0,661	0,817	0,365	0,58
ЭВ, %	7,32	10	9,7	12,1	21,3	14,8	27	25,8	32,3	44,35	61,3
ЗЕ, %мас.	0,4	0,72	0,69	0,62	1,07	0,63	1,14	1,04	1,23	0,99	1,45
Размер липосом, нм*	159±3,45	152±3,87	156±4,07	148±3,83	152±3,46	153±4,29	158±6,78	160±3,33	157±2,72	161±2,83	169±2,50
PDI*	0,162± 0,069	0,127± 0,069	0,063± 0,068	0,113± 0,077	0,082± 0,062	0,071± 0,037	0,065± 0,046	0,076± 0,064	0,132± 0,042	0,103± 0,064	0,235± 0,037
ζ-потенциал, мВ*	-12,7±3,6	-8,5±1,7	-9,5±0,6	-18,3±1,49	-12,1±4,4	-8,9±1,19	-10,1±0,47	-11,0±4,45	-8,7±3,92	-6,2±0,68	-8,1±1,8
Примечание. * данные представлены как среднее ± SD (среднеквадратичное отклонение), n=3											

Использование осмотического градиента на основе раствора NaCl обеспечивало наилучшие показатели инкапсуляции (Таблица 7). Для модельных систем ЭВ достигала 76,2%, ЗЕ − до 2,0% мас. (Модель 11). При этом сохранялись контролируемые размеры липосом (148–172 нм) и приемлемая дисперсность (PDI 0,063–0,129), что указывает на оптимальное сочетание высокой степени загрузки и технологической устойчивости. Несмотря на сравнительно низкие значения ζ-потенциала (-6…-13 мВ), дисперсии сохраняли коллоидную стабильность в течение 24 ч наблюдения, что объясняется сбалансированным составом мембраны и выбранным режимом обработки.

Наиболее оптимальные результаты наблюдались для моделей 9−11: ЭВ составляла 32–76%, ЗЕ − до 2,0%, средний диаметр − 157–172 нм, PDI≤0,13. По совокупности этих характеристик система с градиентом NaCl может быть признана наиболее эффективным и технологически перспективным вариантом активной загрузки гемцитабина.

Влияние отдельных технологических параметров на эффективность инкапсуляции и физико-химические характеристики липосомальных дисперсий проявлялось следующим образом:

- содержание холестерина: при снижении его доли с 0,3 до 0,1 (Таблица 7: модели 2−8, 10−11) отмечался рост уровня включения ЛС за счет повышения проницаемости мембраны;
- исходная концентрация гемцитабина: увеличение от 3 и 5 до 7,5 и 10 мг/мл сопровождалось ростом ЭВ и ЗЕ (Таблица 7: модели 5, 7–9);
- временной режим: сокращенное время выстаивания (Таблица 7: модели 5, 7−11) способствовало повышению включения ЛС без ухудшения размеров и дисперсности;
- осмотический градиент: оптимальным являлась комбинация 1,35% NaCl во внутренней фазе и 0,9% NaCl во внешней, что обеспечивало поступление гемцитабина во внутренний объем липосом и его удержание.

На основании комплексного скрининга оптимальные условия активной загрузки гемцитабина в липосомы формулируются следующим образом:

использование градиента NaCl (1,35% во внутренней фазе/0,9% во внешней), липидной мембраны на основе ненасыщенного ЯФХ с содержанием холестерина около 0,1–0,2 мол. долей, а также при необходимости включение следовых количеств пегилированного липида для увеличения циркуляционного времени без снижения ЭВ. Концентрация гемцитабина составляет 2–5 мг/мл при соотношении «фосфолипиды/раствор препарата» 1:1–3:1, режим инкубации – 1,5 ч при температуре 22 °C.

Таким образом, установлено, что осмотический градиент NaCl обеспечивает наиболее высокую и воспроизводимую активную загрузку гемцитабина при сохранении оптимальных физико-химических характеристик липосомальных дисперсий (размер, PDI, ζ-потенциал). Полученные результаты создают основу для разработки стабильных липосомальных форм гемцитабина с заданными параметрами инкапсуляции и сохранения структуры.

3.2.2.2. Пассивная загрузка гемцитабина в липосомы

Пассивная загрузка является наиболее универсальным методом инкапсуляции гидрофильных соединений, в том числе гемцитабина, в липосомальный носитель. Данный подход основан на гидратации сухой липидной пленки раствором активного вещества без применения трансмембранных градиентов. Несмотря на простоту, уровень включения и характеристики липосомальных дисперсий в значительной степени зависят от состава липидной мембраны и параметров процесса.

В настоящем исследовании пассивная загрузка гемцитабина осуществлялась с использованием моделей липосом, полученных на основе ЯФХ с добавлением холестерина и ПЭГ-ДГФА. Метод гидратации липидной пленки широко применяется при получении липосомальных форм гемцитабина и позволяет оценить влияние ключевых факторов рецептуры, включая концентрацию липидов

и действующего вещества, содержание холестерина и пегилированного липида. Для анализа вклада указанных факторов был проведен расширенный скрининг (Таблица 8).

Первые четыре модели продемонстрировали ограниченные возможности пассивной загрузки: ЭВ не превышала 33%, а ЗЕ оставалась ниже 2%. При низком содержании липидов наблюдалось ухудшение дисперсионных характеристик, включая увеличение размера частиц и полидисперсности. Эти результаты согласуются с литературными данными [20], согласно которым недостаточная концентрация липидов препятствует образованию компактных и гомогенных везикул.

Анализ влияния концентрации гемцитабина в гидратирующем растворе показал, что этот параметр существенно отражается на показателях загрузки. При увеличении концентрации действующего вещества с 2,5 до 5 мг/мл загрузочная способность возрастала незначительно (на 0,3–0,4%мас.), одновременно ЭВ снижалась в 1,4–1,7 раза. Вероятно, это связано с насыщением системы и ограниченной возможностью дальнейшего распределения гемцитабина во внутреннем водном объеме липосом. При этом дальнейшее увеличение концентрации ЛС не сопровождалось повышением уровня инкапсуляции, что указывает на наличие предельной емкости системы. Таким образом, использование чрезмерно концентрированных растворов гемцитабина для гидратации липидной пленки является нецелесообразным, поскольку может приводить к снижению уровня загрузки при сохранении неизменного внутреннего объема везикул.

Снижение доли холестерина сопровождалось повышением уровня включения, что также подтверждено в публикациях [107]: увеличение содержания стерола стабилизирует бислой, но одновременно уменьшает его проницаемость и, как следствие, снижает степень загрузки гидрофильных соединений. Таким образом, избыток холестерина является неблагоприятным фактором для пассивной инкапсуляции гемцитабина.

Таблица 8 − Модели липосом с гемцитабином при пассивной загрузке

№ модели	Молярное соотношение ЯФХ/холестерин/ ПЭГ-ДГФА	Общая концентрация липидов, мг/мл	Концентрация гемцитабина, мг/мл	Концентрация холестерина в бислое, % мол.	Концентрация ПЭГ-ДГФА в бислое, %мол.	ЭВ, %	ЗЕ, %мас.	Размер липосом, нм*	PDI*	ζ-потенциал, мВ*
1	1/0,1/0,003	36,1	5	9,1	0,27	14,1	1,8	143,8±3,384	0,119 ±0,052	-(14,8±0,31)
2			2,5			20,3	1,5	146,0±3,601	0,105 ±0,068	-(14,8±0,18)
3		53,1	5			22,0	1,9	167,6±3,896	0,099 ±0,070	-(17,2±0,95)
4			2,5			32,8	1,6	155,1±3,659	0,034 ±0,030	-(16,3±1,12)
5		63,7	5			37,5	2,9	156,0±7,253	0,159 ±0,015	-(10,3±0,67)
6			2,5			64,9	2,5	169,9±12,96	0,219 ±0,114	-(12,5±1,66)
7			1			55,2	0,9	151,0±2,303	0,163 ±0,012	-(8,8±0,62)
8	1/0,2/0,003	66,7	2,5	16,6		62,6	2,3	159,7±2,538	0,093 ±0,066	-(11,8±4,13)
9	1/0,3/0,003	69,7		23,0		48,7	1,7	163,0±3,610	0,126 ±0,037	-(16,5±1,40)
10	1/0,4/0,003	73,0		28,5		40,6	1,4	149,7±2,831	0,100 ±0,042	-(16,9±2,59)
11	1/0,5/0,003	57,0		33,3		30,1	1,4	144,3±3,808	0,117 ±0,050	-(12,1±0,59)
12	1/0,1/0,004	63,9		9,1	0,36	63,8	2,5	169,2±4,728	0,184 ±0,037	-(10,7±0,70)
13	1/0,1/0,005	64,1			0,45	64,8	2,7	151,8±4,576	0,132 ±0,090	-(16,4±0,58)
14	1/0,1/0,010	65,2			0,90	76,7	3,4	142,3±1,717	0,127 ±0,037	-(22,5±1,63)

Примечание. * данные представлены как среднее ± SD, n=3

Существенно более высокие результаты были достигнуты в моделях с повышенной концентрацией липидов, в частности холестерина и пегилированного липида ПЭГ-ДГФА (Таблица 8: модели 6, 8 и 12–14). При увеличении их содержания до 60–65 мг/мл эффективность инкапсуляции достигала 60–77%, при этом сохранялись оптимальные размеры липосом (~170 нм) и низкие значения PDI (менее 0,3), что указывает на формирование однородных дисперсий. Полученные результаты подтверждают решающую роль соотношения липидных компонентов в формировании структурных и инкапсуляционных характеристик липосомальных систем.

Вместе с тем, не менее значимым параметром выступает и качественный состав фосфолипидов, формирующих бислой. Химическая природа липидов, степень насыщенности жирных кислот и $T_{ф.п.}$ напрямую влияют на стабильность мембраны, ее проницаемость и способность удерживать загруженное вещество. В связи с этим на следующем этапе исследования была проведена оценка липосомальных композиций, основанных на различных фосфолипидах, что позволило установить дополнительные закономерности, представленные в таблице 9 [50, 125].

Следует учитывать, что ненасыщенные липиды, такие как ЯФХ, содержащие остатки полиненасыщенных жирных кислот, склонны к гидролитическому и окислительному распаду [59]. В противоположность им насыщенные фосфолипиды характеризуются большей стабильностью, повышенной $T_{ф.п.}$ и формированием более плотного и малопроницаемого бислоя [92]. Как видно из данных таблицы 9, липосомы на основе насыщенных фосфолипидов гЯФХ, DPPC и DSPC, соответственно модели 2, 4 и 5, продемонстрировали более высокие показатели загрузки гемцитабина. В целом по результатам экспериментов установлено, что эффективность инкапсуляции изменяется в зависимости от природы и насыщенности липидов в следующем порядке: гСФХ>ЯФХ>DSPC>DPPC>гЯФХ, а по величине соотношения D/L:гСФХ=ЯФХ>DPPC>DSPC>гЯФХ [2].

При анализе моделей, представленных в таблице 9, установлено, что для липосом на основе насыщенных фосфолипидов наблюдаются отличия в характере влияния холестерина и ПЭГ-ДГФА на инкапсуляционные свойства системы. В частности, для композиций с DSPC (Модели 5 и 6) снижение содержания холестерина при одновременном увеличении доли пегилированного липида сопровождалось уменьшением как ЭВ гемцитабина, так и загрузочной способности. Данный эффект противоположен выявленному для липосом на основе ЯФХ, где повышение концентрации ПЭГ-ДГФА способствовало росту эффективности инкапсуляции. Вероятно, это связано с различием в физико-химических свойствах фосфолипидной матрицы: насыщенные липиды, обладающие высокой $Т_{ф.п.}$, формируют более жесткий и малопроницаемый бислой. Введение длинноцепочечных ПЭГ-групп в такую уплотненную структуру нарушает плотную упаковку углеводородных цепей и повышает проницаемость мембраны, что приводит к частичной утечке гидрофильного вещества. Напротив, холестерин стабилизирует структуру бислоя, заполняя дефекты кристаллической решетки фосфолипидов и уменьшая потери действующего вещества. Таким образом, в липосомах на основе DSPC холестерин выступает ключевым фактором структурной устойчивости и удержания гемцитабина, тогда как избыточное количество ПЭГ-ДГФА оказывает дестабилизирующее действие.

Таблица 9 − Липосомальные композиции на основе насыщенных фосфолипидов

№ модели	**Липидная композиция и молярное соотношение**	**Общая концентрация липидов, мг/мл**	**ЭВ, %**	**ЗЕ, мас.%**
1	ЯФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА 1/0,1/0,003	63,7	64,9	2,5
2	гЯФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА 1/0,7/0,089	59,8	85,3	3,4
3	гСФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА 1/0,7/0,089	74,5	63,5	2,5
4	DPPC/холестерин/ПЭГ-ДГФА 1/0,58/0,083	73,0	81,5	2,9
5	DSPC/холестерин/ПЭГ-ДГФА 1/0,67/0,005	60,5	67,3	3,2
6	DSPC/холестерин/ПЭГ-ДГФА 1/0,5/0,083	69,3	60,6	2,7
7	DSPC/холестерин/DOTAP 1/0,2/0,1	42,8	83,7	4,8

На основании совокупности данных таблицы 9 аибольшие значения ЭВ (до 85%) отмечены для модели 2 (гЯФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА 1/0,7/0,089), что подтверждает оптимальность сочетания насыщенного фосфолипида с умеренным содержанием стерола и пегилированного липида. В то же время композиции на основе DPPC и DSPC (Модели 4–6) продемонстрировали сбалансированные показатели загрузочной способности (2,7–3,2%мас.) при сохранении стабильности частиц, тогда как чрезмерное снижение доли холестерина (Модель 6) приводило к ухудшению удерживающей способности липосом. В связи с полученными результатами была дополнительно исследована модельная липосомальная композиция на основе DSPC, включающая катионный липид DOTAP (Модель 7). Введение катионного компонента в структуру мембраны способствовало существенному повышению эффективности инкапсуляции гемцитабина. Несмотря на то, что при физиологических значениях pH степень ионизации гемцитабина невелика, в катионных липосомах отмечено увеличение загрузочной способности до ~4,8%мас. и рост эффективности включения до 83%. Данный эффект обусловлен электростатическим взаимодействием между молекулами гемцитабина и положительно заряженными группами DOTAP, что способствует их связыванию с липидным бислоем и повышению удержания вещества в везикулах.

Таким образом, установлено, что эффективность пассивной загрузки гемцитабина определяется соотношением компонентов липидной мембраны и их концентрацией, а также типом структурообразующего фосфолипида. Оптимальными по совокупности показателей были признаны системы, характеризующиеся умеренным содержанием холестерина и повышенной концентрацией липидов, что обеспечивало достижение высокой эффективности инкапсуляции при сохранении однородности и стабильности дисперсии. Указанные параметры могут рассматриваться в качестве основы для дальнейшей оптимизации состава и разработки липосомальной лекарственной формы гемцитабина.

3.2.3. Сравнение методов загрузки лекарственного средства и выбор модельного состава липосом гемцитабина

Сопоставление полученных результатов показало, что активная и пассивная загрузка гемцитабина в липосомы существенно различаются по эффективности инкапсуляции и качеству формируемых систем.

При использовании активной загрузки ЭВ гемцитабина не превышала 20-30%. Более высокие значения были получены только для моделей на основе яичного фосфатидилхолина (таблица 7, модели 9–11), где эффективность включения составляла 46–76%. Однако такие результаты сопровождались увеличением полидисперсности и нестабильностью ζ-потенциала, что ограничивает возможность практического применения этих систем с фармацевтической точки зрения. В отличие от этого, пассивная загрузка обеспечивала более высокие и воспроизводимые значения эффективности включения (в диапазоне 60–85%). Наилучшие результаты были получены при гидратации липидной пленки при 37 °C (таблица 9, модели 1–7).

Загрузочная емкость липосомальных систем, полученных методом активной загрузки, не превышала 2,0%мас., тогда как при пассивной загрузке этот показатель находился в пределах 2,0-4,8%мас. Это указывает на более эффективное использование липидной матрицы.

Размер липосом при активной загрузке находился в пределах 148–172 нм, однако значения PDI часто превышали 0,12 и в отдельных случаях достигали 0,34, что характеризует гетерогенность системы. При пассивной загрузке средний диаметр везикул составлял 144–170 нм, а показатели PDI в основном не превышали 0,12, что указывает на формирование более однородных и технологически воспроизводимых дисперсий.

Значения ζ-потенциала при активной загрузке варьировали от -5 до -18 мВ, что недостаточно для обеспечения устойчивости коллоидной системы. Для липосом, полученных методом пассивной загрузки, данный показатель составлял

от -13 до -23 мВ, что отражает более выраженную электростатическую стабилизацию и устойчивость к агрегации.

Активная загрузка характеризуется многостадийностью, необходимостью создания градиентов солевых растворов и длительной инкубацией, при этом не обеспечивает воспроизводимых и фармацевтически значимых характеристик. Пассивная загрузка технологически проще, не требует формирования градиентов, а получаемые липосомы отличаются высокой степенью инкапсуляции, узким распределением по размерам и стабильным отрицательным ζ-потенциалом.

Таким образом, использование активной загрузки гемцитабина на основе градиента натрия хлорида не позволяет достичь требуемых фармацевтических параметров (ЭВ <50%, высокая полидисперсность, низкая коллоидная устойчивость). И, напротив, пассивная загрузка обеспечивает формирование стабильных и воспроизводимых липосомальных систем с высокой эффективностью инкапсуляции (до 85%), достаточной ЗЕ и оптимальными физико-химическими характеристиками. Полученные результаты обосновывают выбор пассивной стратегии в качестве приоритетного подхода для разработки липосомальной формы гемцитабина.

3.2.4 Оптимизация технологических параметров липосомальной формы гемцитабина

На основании данных, полученных при исследовании влияния факторов рецептуры (раздел 3.2.2.2), в качестве оптимальной липидной композиции для инкапсуляции гемцитабина была выбрана система на основе гидрогенизированного фосфолипида гЯФХ, холестерина и ПЭГ-ДГФА в молярном соотношении 1/0,7/0,089. На следующем этапе было проведено исследование технологических параметров процесса получения липосомальной дисперсии для обеспечения высокой воспроизводимости и стабильности характеристик.

Целью данного этапа являлась оптимизация условий гидратации липидной пленки, процессов гомогенизации и экструзии для получения однородной и стабильной липосомальной дисперсии с заданными размерами и высокой ЭВ.

На первом этапе исследования проводили варьирование температуры диспергирования при гидратации липидной пленки раствором гемцитабина (2,5 мг/мл). Рассматривались значения температуры 22, 44 и 54 °С. Полученные результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 − Влияние температуры гидратации на характеристики липосом гемцитабина

Температура, °С	**Время гидратации, мин**	**Размер, нм**	**PDI**	**ζ-потенциал, мВ**	**ЭВ, %**
22	90	189,6±6,135	0,066±0,043	-(27,8±4,19)	58,5
44		180,6±4,131	0,024±0,025	-(28,2±1,67)	88,1
54		187,5±2,512	0,066±0,048	-(26,4±1,53)	88,1
Примечание. * данные представлены как среднее ± SD, n=3					

Результаты, представленные в таблице 10, показали, что оптимальными условиями гидратации липидной пленки являются температура 44 °С и продолжительность 90 мин. При данных параметрах обеспечивалась высокая ЭВ (88,1%) и узкое распределение по размерам (PDI<0,03). Повышение температуры до 54 °С не сопровождалось существенным улучшением характеристик, тогда как при 22 °С наблюдалось увеличение среднего диаметра липосом и снижение эффективности инкапсуляции.

На следующем этапе была проведена оптимизация условий гомогенизации дисперсии МСЛ гемцитабина. Сравнивали условия механической гомогенизации при скоростях 10 000 и 20 000 об/мин и при интервалах времени обработки в течение 1, 3 и 5 мин (Таблица 11). Наиболее оптимальные физические показатели качества липосом получены при механической гомогенизации образцов в течение 5 мин при обоих исследуемых уровнях скорости, обеспечивавшей формирование дисперсии с контролируемыми размерами липосом. В то же время установлено, что с увеличением скорости и времени обработки наблюдается постепенный рост ЭВ

гемцитабина. При этом наиболее высокий уровень включения ЛС в везикулы 95,2% отмечается при максимальном воздействии на дисперсию: обработка при скорости 20 000 об/мин в течение 5 мин.

Таблица 11 − Влияние условий гомогенизации на характеристики липосом гемцитабина

Скорость, об/мин	**Время гомогенизации, мин**	**Размер, нм**	**PDI**	**ζ-потенциал, мВ**	**ЭВ, %**
10 000	1	1484±118,5	0,987±0,157	-(32,2±1,65)	72,8
	3	947,6±173,0	0,994±0,017	-(28,0±1,23)	83,9
	5	523,8±161,7	0,853±0,157	-(30,1±2,12)	80,0
20 000	1	1694±155,4	0,990±0,002	-(28,3±1,45)	81,5
	3	1139±177,7	0,939±0,095	-(23,1±1,89)	92,7
	5	613,2±169,9	0,066±0,048	-(22,9±1,02)	95,2
Примечание. * данные представлены как среднее ± SD, n=3					

Финальным этапом являлась экструзия липосомальной дисперсии через поликарбонатные мембраны с диаметром пор 0,4 и 0,2 мкм (соответственно 1 и 5 циклов). Данный процесс обеспечивал уменьшение среднего гидродинамического диаметра липосом до 170–180 нм и достижение монодисперсности (PDI <0,07) (Таблица 12).

Таблица 12 − Влияние количества циклов экструзии на характеристики липосом гемцитабина

Параметр сравнения	**Цикл**	**Размер, нм**	**PDI**	**ζ-потенциал, мВ**
Исходная дисперсия	-	5774±488,0	0,798±0,232	-(31,7±3,12)
ПК 0,4	1	854,5±61,58	0,421±0,052	-(28,1±2,14)
ПК 0,2	1	237,2±3,735	0,115±0,069	-(20,5±1,12)
	2	197,1±3,327	0,079±0,040	-(19,3±1,02)
	3	196,0±3,947	0,092±0,043	-(22,0±1,23)
	4	183,6±4,207	0,075±0,046	-(18,1±1,09)
	5	177,9±4,732	0,064±0,052	-(18,0±0,98)
Примечание. * данные представлены как среднее ± SD, n=3				

Следовательно, оптимальные технологические условия получения липосомальной дисперсии гемцитабина включают: гидратацию липидной пленки при 44 °C в течение 90 мин, механическую гомогенизацию при 20 000 об/мин и

экструзию через поликарбонатные мембраны с диаметром пор 0,4 (1 цикл) и 0,2 мкм (3 цикла). Полученные показатели дисперсии соответствуют установленным критериям качества и подтверждают высокую воспроизводимость процесса.

Результаты подтверждают, что выбранный состав обладает высокой эффективностью и стабильностью, а также может быть масштабирован и использован в последующих стадиях доклинической разработки.

3.3. Исследование стабильности липосомальной лекарственной формы гемцитабина

Для изучения стабильности липосомальной формы гемцитабина в виде водной дисперсии были наработаны 3 экспериментальные серии ЛЛФ гемцитабина в условиях *ex tempore* с использованием лабораторного оборудования.

Стадия 1. Получение липидной пленки

Для однократной загрузки отгонной колбы вместимостью 1 л в лабораторный стакан брали следующие навески липидных компонентов ЛФ:

гЯФХ	432 мг
Холестерин	149 мг
ПЭГ-ДГФА	137 мг
Общая масса	718 мг

Навески растворяли в 20−30 мл хлороформа в течение 10−15 мин и переносили в колбу. Для снижения потерь стакан от хлороформного раствора компонентов ЛФ обмывали хлороформом и сливали в колбу. Органический растворитель отгоняли при пониженном давлении (200−300 мбар) до образования на стенках колбы полупрозрачной липидной пленки, которую досушивали при давлении 100−150 мбар в течение 50 мин для удаления остаточного растворителя.

Стадия 2. Гидратация липидной пленки

Пленку гидратировали раствором гемцитабина с концентрацией 2,5 мг/мл с получением дисперсии МСЛ при температуре 44 °С скорости вращения ротора 20−40 об/мин.

Стадия 3. Фильтрация/экструзия дисперсии МСЛ

Для получения ОСЛ гемцитабина дисперсию МСЛ последовательно пропускали на экструдере через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 0,4 мкм (1 раз) и 0,2 мкм (3 раза). Процесс фильтрации и измельчения дисперсии с использованием мембран с диаметром пор 0,2−0,22 мкм также обеспечивает ее стерилизацию. Полученную дисперсию собирали в стерильный флакон, укупоривали резиновой пробкой и закатывали алюминиевым колпачком.

Результаты контроля качества липосомальной дисперсии гемцитабина сразу после приготовления и в процессе хранения представлены в таблице 13.

Согласно данным, полученным в результате мониторинга показателей качества ЛЛФ гемцитабина при хранении при температуре +4 °С, отмечается постепенное увеличение среднего гидродинамического диаметра частиц в течение трёх месяцев хранения − с 176–178 нм до ≈207 нм, что свидетельствует о тенденции к агрегации или слиянию отдельных везикул во времени. При этом показатель полидисперсности также возрастал, достигая к третьему месяцу значений 0,31–0,33, что указывает на уменьшение однородности дисперсии.

Изменения ζ-потенциала характеризовались снижением модуля отрицательного заряда (с -30…-35 мВ до -20 мВ), что может быть связано с частичной десорбцией пегилированных фрагментов или ионным экранированием заряда липидной мембраны при хранении. Ослабление поверхностного заряда способствует снижению электростатической стабилизации и, вероятно, дополнительно способствует росту частиц.

Таблица 13 − Мониторинг качества липосомальной дисперсии гемцитабина в процессе хранения при температуре +4 °С

Показатель качества	**Срок хранения, мес.**	**Серия липосомальной дисперсии гемцитабина**		
		010225	**020525**	**030525**
Вязкость	0	6,9	7,3	7,4
Размер, нм*	0	176,0±3,328	175,6±3,531	177,5±4,478
	1	182,6±3,360	192,2±3,044	187,3±4,914
	2	188,2±3,408	189,0±3,404	190,0±3,405
	3	207,3±5,236	206,5±5,204	208,8±5,202
PDI*	0	0,053±0,039	0,102±0,083	0,060±0,062
	1	0,113±0,070	0,063±0,055	0,079±0,069
	2	0,115±0,101	0,110±0,095	0,118±0,105
	3	0,321±0,360	0,315±0,350	0,328±0,365
ζ-потенциал, мВ*	0	-(19,5±0,776)	-(35,8±2,26)	-(29,5±2,95)
	1	-(25,0±0,679)	-(30,1±1,93)	-(30,2±1,02)
	2	-(22,0±1,360)	-(28,5±1,80)	-(27,8±1,60)
	3	-(24,3±2,820)	-(20,5±2,50)	-(20,7±1,32)
ЭВ, %	0	97,4	84,2	100,0
	1	91,1	81,3	90,5
	2	85,1	84,6	88,2
	3	84,7	79,1	70,4
ЗЕ, мас. %	0	3,9	3,3	4,2
	1	3,85	3,85	3,99
	2	3,4	3,3	3,7
	3	3,3	3,0	3,4
pH	0	6,9	6,9	6,9
	1	6,1	6,5	5,3
	2	6,0	6,1	5,4
	3	5,4	5,5	5,0
Примечание. * данные представлены как среднее ± SD, n=3				

В процессе хранения наблюдалось постепенное снижение ЭВ и ЗЕ. В течение трех месяцев ЭВ уменьшалась примерно с 90–100% до 70–85%, тогда как ЗЕ снижалась менее выраженно - в среднем с 3,9–4,2 до 3,0–3,4%мас. Вероятно, уменьшение эффективности включения связано с медленной реорганизацией липидного бислоя, сопровождающейся изменением ориентации молекул фосфолипидов и повышением проницаемости мембраны. Это, в свою очередь, приводит к частичному выходу гемцитабина во внешнюю водную фазу.

Значение pH дисперсии изменилось с 6,9 до 5,0, что может указывать на постепенное закисление среды и возможное протекание гидролитических процессов. Несмотря на выявленные изменения, в течение первых двух месяцев липосомальная форма сохраняла удовлетворительную стабильность по основным

физико-химическим показателям. В дальнейшем отмечалось более выраженное ухудшение дисперсности системы и снижение удерживающей способности везикул.

Таким образом, хранение липосомальной дисперсии гемцитабина при +4 °C в течение трех месяцев сопровождалось увеличением размера частиц, полидисперсности, снижением ζ-потенциала и уменьшением эффективности инкапсуляции. Это указывает на ограниченный срок стабильного хранения в жидкой форме, что подтверждает необходимость перехода дисперсии в лиофилизированное состояние для обеспечения длительной стабильности препарата.

3.4. Разработка технологии лиофилизации липосомальной дисперсии гемцитабина

Лиофилизация, представляет собой эффективный метод стабилизации липосом, позволяющий значительно продлить срок годности и повысить устойчивость препарата к внешним факторам (температуре, свету, влаге).

Цель этапа заключалась в выборе оптимального криопротектора, обеспечивающего сохранение липосом, высокой эффективности инкапсуляции гемцитабина, физических параметров (размер, PDI, ζ-потенциал) и способности лиофилизата к регидратации.

В качестве криопротекторов исследовали сахарозу и трегалозу, широко применяемые вспомогательные вещества для защиты липидных мембран при замораживании и сушке. Их стабилизирующее действие связано с формированием стеклообразной матрицы и предотвращением агрегации липосом. Дисахариды вводили в дисперсию в молярном соотношении к фосфолипиду (криопротектор/фосфолипид (КП/ФЛ)) 5:1. Криопротекторы добавляли либо на стадии гидратации липидной пленки, растворяя их в растворе гемцитабина, либо

после экструзии, вводя в готовую липосомальную дисперсию. Эвтектическая температура дисперсии определялась термическим методом и составила ≈ –3 °C.

Лиофилизацию липосомальной дисперсии гемцитабина проводили по ранее описанной методике (см. раздел 2.3.4). После завершения процесса полученый лиофилизат оценивали по основным показателям качества. После регидратации определяли размер липосом, PDI, ζ-потенциал, эффективность включения, pH среды, содержание остаточной влаги и способность образца к регидратации.

Анализ полученных данных (Таблица 14) показал, что и сахароза, и трегалоза способствовали сохранению структурных характеристик липосом гемцитабина после лиофилизации. Существенного влияния стадии замораживания на размер частиц и PDI не выявлено. В то же время дальнейшее изменение параметров после регидратации в большей степени зависело от типа использованного криопротектора и способа его введения

Сопоставление образцов показало, что оба дисахарида обеспечивали сохранение высокой доли инкапсулированного гемцитабина. При этом наименьшие потери действующего вещества в процессе сушки наблюдались при использовании сахарозы, введенной после экструзии, при соотношении КП/ФЛ 5:1. Для остальных вариантов уменьшение ЭВ после лиофилизации составляло от 5,4 до 17,6 процентных единиц, DL снижалась на 0,2–0,7%мас. Выраженной корреляции между ростом концентрации криопротектора и удержанием гемцитабина не выявлено.

Сравнительный анализ криопротекторов по ключевым показателям:

- ЭВ/ЗЕ: наилучшие значения показателей, а также минимальная утечка гемцитабина отмечены при применении сахарозы (КП/ФЛ=5:1) с введением криопротектора после экструзии.

- Размер/PDI (Рисунок 8–11): размеры везикул оставались стабильными в течение 24 ч после регидратации при применении сахарозы (КП/ФЛ=5:1) с введением криопротектора после экструзии; PDI варьировал в узком диапазоне 0,09–0,1. Введение после экструзии ассоциировано с меньшими диаметрами везикул.

Таблица 14 − Характеристики липосом гемцитабина с криопротектором сахарозой и трегалозой в различных концентрациях до и после замораживания, после лиофилизации

Криопротектор			**До замораживания**					**После замораживания**					**После лиофилизации**				
Вещество	ФЛ/КП	Концентрация, %	ЭВ, %	ЗЕ, %мас.	Размер	PDI	ζ-потенциал, мВ	ЭВ, %	ЗЕ, %мас.	Размер	PDI	ζ-потенциал, мВ	ЭВ, %	ЗЕ, %мас.	Размер	PDI	ζ-потенциал, мВ
Сахароза	1:4г	6,3	89,7	3,4	185,1	0,063	-32,2	62,4	2,4	159,0	0,067	-22,0	72,1	2,74	176,4	0,068	-20,5
	1:5г	7,9	96,6	3,7	182,8	0,054	-28,0	78,2	3,0	169,1	0,069	-30,6	82,6	3,2	168,0	0,674	-25,9
	1:5э		87,2	3,3	144,7	0,102	-30,1	88,3	3,3	137,3	0,064	-22,2	80,7	3,0	150,1	0,091	-22,9
	1:6г	9,4	98,9	3,8	276,5	0,198	-28,3	87,8	3,4	185,6	0,572	-30,7	92,2	3,55	175,1	0,050	-26,7
Трегалоза	1:4г	6,9	94,4	3,3	274,1	0,195	-23,1	59,0	2,1	166,2	0,046	-28,8	82,8	2,86	183,4	0,102	-26,8
	1:5г	8,7	83,9	3,4	183,7	0,062	-22,9	64,6	2,6	165,2	0,090	-34,1	63,5	2,56	172,5	0,185	-27,2
	1:5э		84,6	3,3	144,6	0,067	-20,9	85,7	3,3	139,5	0,105	-31,5	85,4	3,3	158,8	0,061	-28,7
	1:6г	10,4	86,3	3,3	180,9	0,065	-23,4	68,6	2,63	164,2	0,086	-31,3	80,9	3,1	194,6	0,113	-28,3
Обозначения: (г) – гидратация, (э) – экструзия, ФЛ/КП – соотношение фосфолипид/криопротектор																	

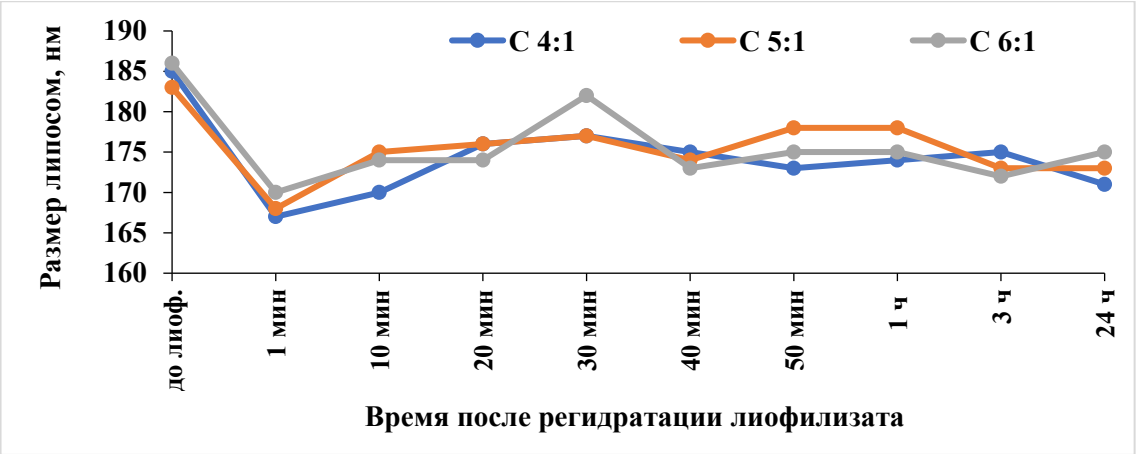

Рисунок 8 − Размер липосом с криопротектором сахарозой

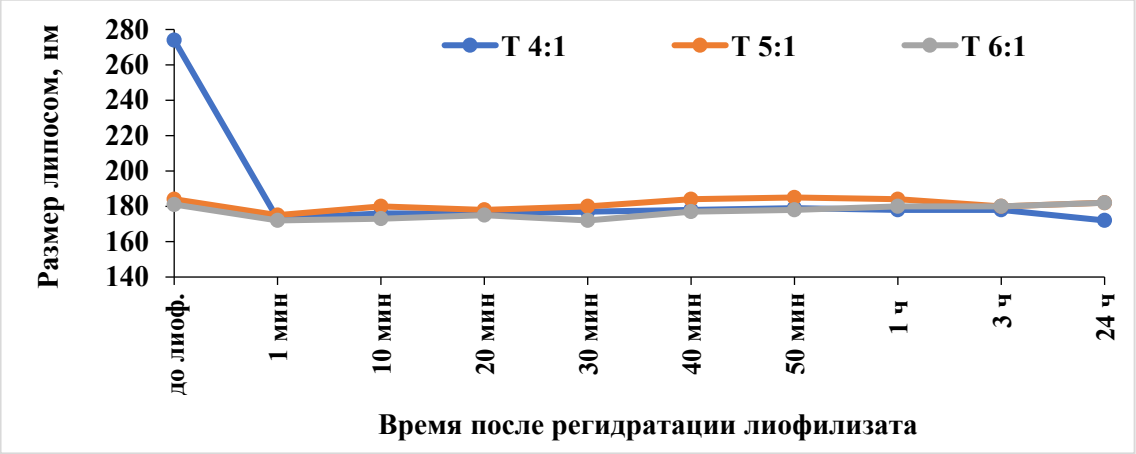

Рисунок 9 − Размер липосом с криопротектором трегалозой

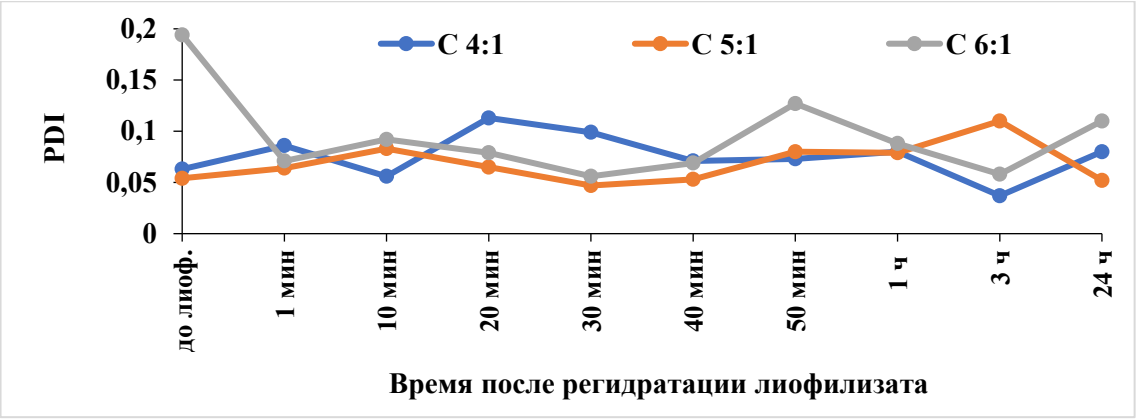

Рисунок 10 − PDI липосомальной дисперсии с криопротектором сахарозой

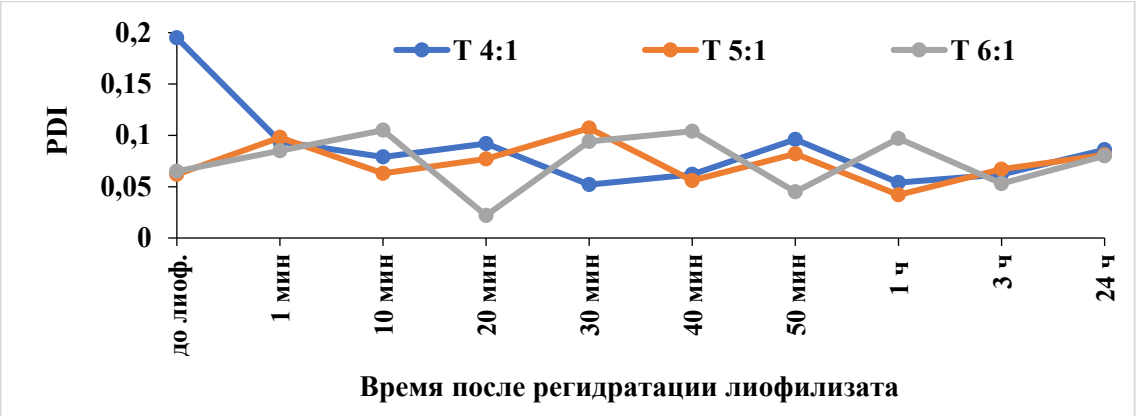

Рисунок 11 – PDI липосомальной дисперсии с криопротектором трегалозой

- ζ-потенциал (Рисунки 12, 13): после регидратации значения смещались в более отрицательную область, что отражает процесс стабилизации дисперсии. Максимальное падение через 24 ч отмечено для трегалозы при КП/ФЛ 4:1 и 5:1.

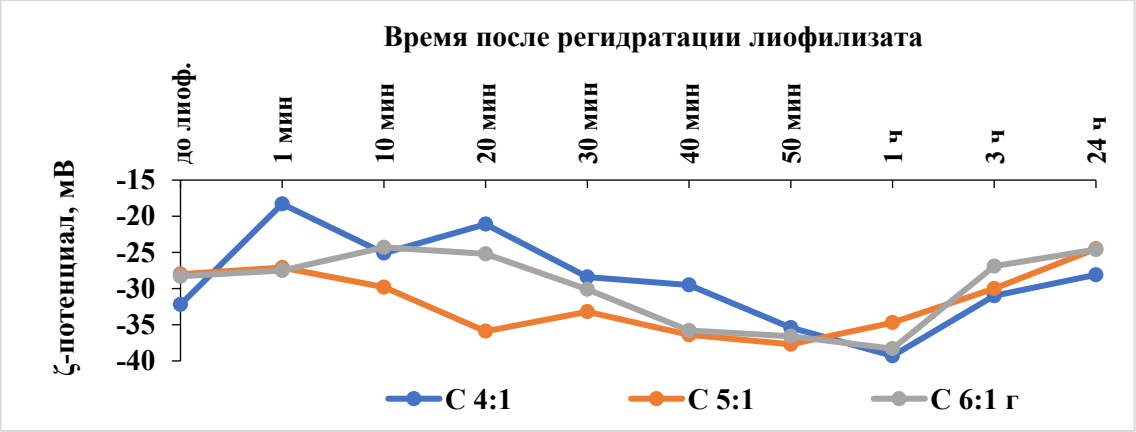

Рисунок 12 – ζ-потенциал липосом с криопротектором сахарозой

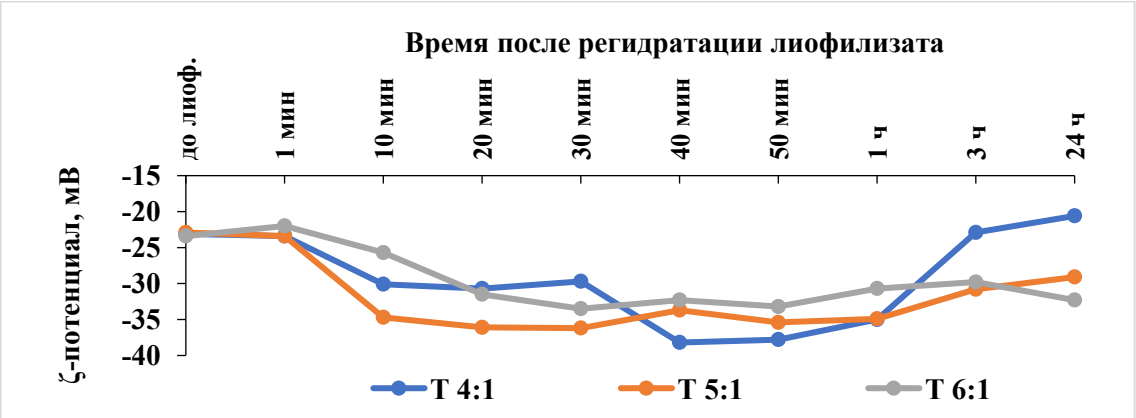

Рисунок 13 – ζ-потенциал липосом с криопротектором трегалозой

Таким образом, сахароза проявила более высокую эффективность в качестве криопротектора. Оптимальной условием использования является ее введение после экструзии в соотношении КП/ФЛ 5:1, при котором достигается минимальная утечка гемцитабина и сохраняются исходные дисперсионные характеристики липосомальной системы.

3.5. Обобщенная технология получения и состав лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гемцитабина

На основании проведенных исследований был разработан воспроизводимый и технологически обоснованный процесс получения лиофилизированной ЛЛФ гемцитабина. Этот процесс охватывает все ключевые стадии: от образования липидной пленки до получения стабильного лиофилизированного продукта. Основные этапы процесса приведены в таблице 15, полная схема на рисунке 14.

Было установлено, что оптимизированные параметры упаривания, гидратации, экструзии, гель-фильтрации и лиофилизации обеспечивают получение липосомальной дисперсии с воспроизводимыми характеристиками: средний размер частиц 170-180 нм, PDI≤0,1 и ζ-потенциал от -25 до -30 мВ. Использование сахарозы поддерживало эффективность введения гемцитабина после лиофилизации на уровне 72-82%, подтверждая высокую защитную способность данного криопротектора.

Таким образом, разработанная технология обеспечивает получение липосомальных систем гемцитабина с высокой степенью инкапсуляции и стабильными характеристиками после лиофилизации, что делает ее перспективной для дальнейших доклинических исследований.

Таблица 15 − Обобщенная технология получения ЛЛФ гемцитабина

№	Стадия	Ключевые параметры
1	Подготовка липидов	гЯФХ, холестерин, ПЭГ-ДГФА (молярное соотношение 1/0,7/0,089); растворение в хлороформе
2	Получение липидной пленки	Упаривание на роторном испарителе при 44±1 °С, 200−300 мбар; досушивание − 100−150 мбар
3	Гидратация (пассивная загрузка)	Раствор гемцитабина 2,5 мг/мл в воде для инъекций; 44 °С, 90 мин, 20−40 об/мин
4	Экструзия	Мембраны 0,4 → 0,2 мкм, 1 и 5 циклов соответственно, давление 0,7−1,0 МПа
5	Добавление криопротектора	Сахароза, вводимая в молярном соотношении КП/ФЛ 5:1 после экструзии
6	Стерилизующая фильтрация	Мембрана 0,2 мкм
7	Лиофилизация	**Этап 1 (замораживание):** охлаждение полки до –50 °С, установка флаконов при температуре ниже –30 °С; минимальная температура препарата –41 °С; выдержка при минимальной температуре 3 ч. **Этап 2 (первичная сушка):** вакуум 0,025 бар; ступенчатый подъем температуры полки: от –50 до –30 °С со скоростью 2,5 °С/ч, от –30 до –16 °С со скоростью 1 °С/ч, от –16 до –3 °С со скоростью 2 °С/ч. **Этап 3 (вторичная сушка):** +22 °С, 9 ч.
8	Укупорка, маркировка, контроль качества	Контроль: pH, размер, PDI, ЭВ, ζ-потенциал, остаточная влага, внешний вид флаконов и лиофилизата. Показатели стандартизации.

Рисунок 14 − Схема получения ЛЛФ гемцитабина

Итоговый состав разработанной ЛЛФ-лио гемцитабина представлен в таблице 16.

Таблица 16 − Теоретический состав ЛЛФ-лио гемцитабина на 1 флакон

Компонент	**Содержание, мг**	**Назначение**
Гемцитабина гидрохлорид	5	АФС
Гидрогенизированный яичный фосфатидилхолин	70	Структурообразующий компонент липосомальной мембраны
Холестерин	24	Регуляция плотности и стабильности липидного бислоя
1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси (полиэтиленгликоль)-2000] аммониевая соль	22	Модификатор поверхности липосом для пролонгирования циркуляции и снижения клиренса
Сахароза	148	Криопротектор для стабилизации липосом при лиофилизации
Общая масса	269	

3.6. Получение экспериментальных серий лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гемцитабина

С целью проведения фармацевтических и биологических исследований наработаны 3 экспериментальные серии ЛЛФ-лио гемцитабина.

Стадия 1. Получение липидной пленки

Навески липидов (Таблица 17) растворяли в 90 мл хлороформа, периодически перемешивая в течение 10−15 мин. Полученный хлороформный раствор делили на 3 равные части и переносили в колбы. Для снижения потерь стакан от хлороформного раствора компонентов ЛФ обмывали хлороформом и сливали в колбу. Органический растворитель отгоняли при пониженном давлении (200−300 мбар) до образования на стенках колбы полупрозрачной липидной пленки, которую досушивали при давлении 100−150 мбар до постоянной массы не менее 40 мин для удаления остаточного растворителя.

Таблица 17 − Параметры стадии получения липидной пленки

Параметры		Серия ЛЛФ-лио гемцитабина		
		010625	**020625**	**030625**
Количество нарабатываемых колб вместимостью 2 л		3	3	3
Навески липидов на 3 колбы, мг	гЯФХ	2520		
	Холестерин	868		
	ПЭГ-ДГФА	798		
	Общая масса липидов	4186		
Хлороформ, мл		90		

Стадия 2. Гидратация липидной пленки

Пленку гидратировали 24 мл раствора гемцитабина с концентрацией 2,5 мг/мл с получением дисперсии МСЛ при температуре 44 °С и скоростью вращения ротора 20−40 об/мин. Гидратация проводилась до полного смыва пленки со стенок колбы от 1,1 до 2,2 ч (Таблица 18).

Таблица 18 − Параметры стадии гидратации липидной пленки и промежуточный контроль качества липосомальной дисперсии гемцитабина

Параметры		Серия ЛЛФ-лио гемцитабина		
		010625	**020625**	**030625**
Продолжительность смыва пленки	Колба 1	1 ч 35 мин	1 ч 3 мин	2 ч
	Колба 2	1 ч 32 мин	1 ч 4 мин	1 ч 45 мин
	Колба 3	1 ч 5 мин	1 ч 25 мин	2 ч 12 мин
Общий объем дисперсии, мл		72	74	73,5
Показатели качества дисперсии МСЛ	Вязкость, мПа·с	50,2	50,8	67,1
	Размер везикул, мкм	5,565±4,155	8,851±2,496	9,021±2,765
	PDI	0,825±0,272	0,387±0,366	0,444±0,321
	ζ-потенциал, мВ	-(25,0±4,96)	-(36,8±3,72)	-(35,5±1,99)

Стадия 3. Фильтрация/экструзия дисперсии МСЛ гемцитабина

Для получения ОСЛ гемцитабина дисперсию МСЛ последовательно пропускали на экструдере через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 0,4 мкм (1 раз) и 0,2 мкм (3 раза). Процесс фильтрации и измельчения дисперсии с использованием мембран с диаметром пор 0,2−0,22 мкм также обеспечивает ее стерилизацию. Основные параметры стадии 3 и показатели качества дисперсии ОСЛ гемцитабина представлены в таблице 19.

Таблица 19 − Параметры стадии фильтрации/экструзии и промежуточный контроль качества липосомальной дисперсии гемцитабина

Параметры		**Серия ЛЛФ-лио гемцитабина**		
		010625	**020625**	**030625**
Продолжительность пропускания дисперсии, мин	фильтр ПК-0,4	27	77	50
	фильтр ПК-0,2 (1)	18	35	71
	фильтр ПК-0,4 (2)	4	9	10
	фильтр ПК-0,4 (3)	6	15	10
Общая продолжительность стадии, мин		55	136	141
Количество использованных фильтров, шт	фильтр ПК-0,4	1	1	1
	фильтр ПК-0,2 (1)	1	1	1
	фильтр ПК-0,4 (2)	1	1	1
	фильтр ПК-0,4 (3)			1
Общий объем дисперсии, мл		68	69,5	67
Показатели качества дисперсии ОСЛ	Вязкость, мПа·с	9,6	6,6	7,7
	Размер везикул, мкм	182,2±6,976	183,3±1,697	178,2±5,663
	PDI	0,123±0,081	0,054±0,050	0,066±0,025
	ζ-потенциал, мВ	-(26,8±2,28)	-(26,8±3,69)	-(27,7±1,78)
	Концентрация гемцитабина, мг/мл	2,516	2,526	2,760
Показатели качества дисперсии ОСЛ	ЭВ, %	88,4	83,9	92,3
	ЗЕ, %мас.	3,83	2,83	3,53

Стадия 4. Введение криопротектора в липосомальную дисперсию и ее дозирование во флаконы

Учитывая объем дисперсии ОСЛ гемцитабина, рассчитывали и отвешивали сахарозу. Навеску сахарозы растворяли в дисперсии. Полученную дисперсию пропускали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. При наработке серий ЛЛФ-лио гемцитабина продолжительность фильтрации дисперсии с сахарозой составила 4 мин. Полученную дисперсию дозировали по 2,03–2,07 мл во флаконы объемом 10 мл и передавали на лиофилизацию. Обобщенные данные по стадии 4 и результаты контроля качества ЛЛФ гемцитабина представлены в таблице 20.

Таблица 20 − Параметры стадии 4 и показатели качества дисперсии ОСЛ гемцитабина с сахарозой

Параметры	**Серия ЛЛФ-лио гемцитабина**		
	010625	**020625**	**030625**
Общий объем дисперсии до растворения криопротектора, мл	65	67	64,5

Продолжение Таблицы 20

Масса навески сахарозы, г		4,968	4,983	4,930
Общий объем дисперсии после растворения криопротектора, мл		67,5	69,5	67
Показатели качества дисперсии ОСЛ	Вязкость, мПа·с	3,4	3,3	3,7
	pH	6,3	6,4	6,6
	Размер везикул, мкм	143,5±2,473	144,9±2,292	143,9±4,935
	PDI	0,092±0,050	0,090±0,042	0,067±0,044
	ζ-потенциал, мВ	-(25,5±1,65)	-(28,9±1,69)	-(26,5±1,36)
	Концентрация гемцитабина, мг/мл	2,478	2,449	2,507
	ЭВ, %	87,5	86,9	92,5
	ЗЕ, %мас.	3,7	2,9	3,1
Объем дозирования, мл		2,05	2,07	2,03
Количество флаконов, шт		31	32	31

Стадия 5. Сублимационная сушка липосомальной дисперсии гемцитабина

График процесса лиофилизации представлен на рисунке 15.

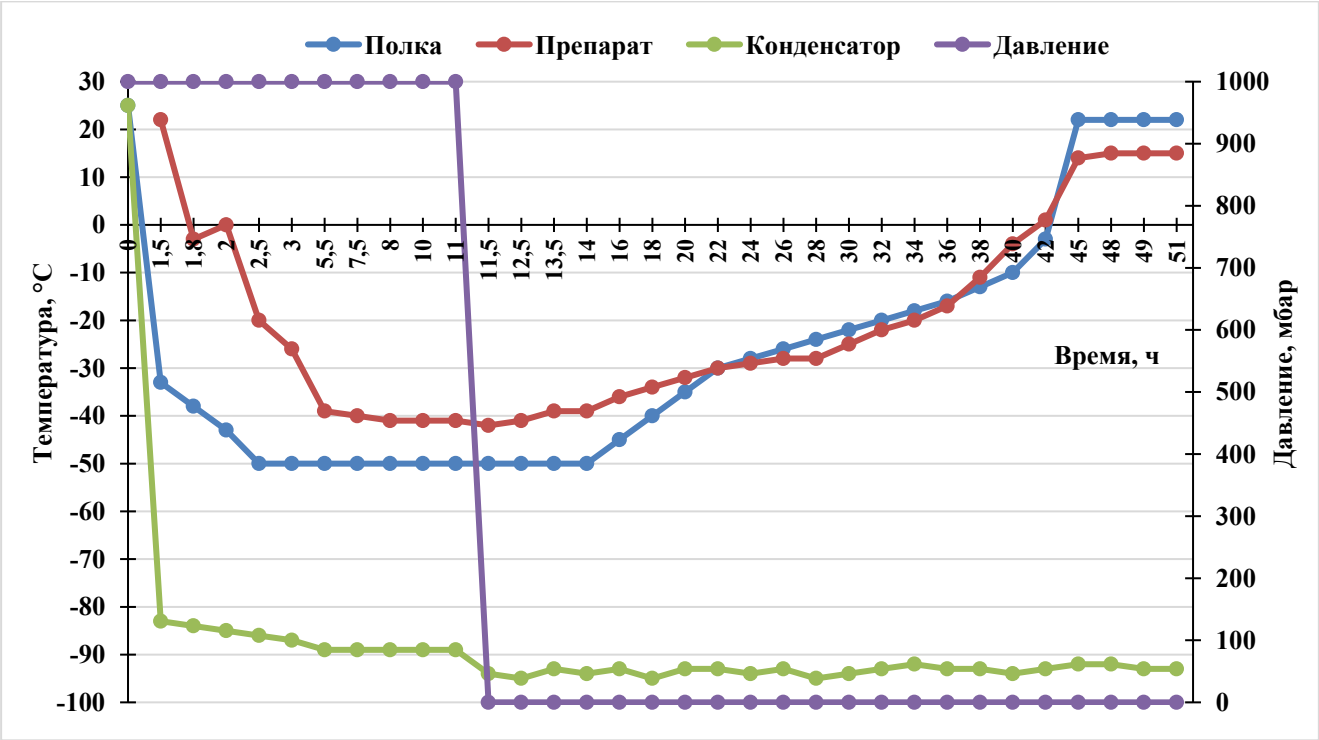

Рисунок 15 − График сублимационной сушки липосом гемцитабина

В результате проведенных работ получены 3 экспериментальные серии ЛЛФ-лио гемцитабина. Выход продукции составил 100%.

Полученные лиофилизированные образцы липосом гемцитабина соответствовали заданным технологическим параметрам и были переданы для

проведения дальнейших исследований по оценке их стабильности и характеристик при хранении (Таблица 21).

Таблица 21 − Показатели качества серий лиофилизата

Показатель	**Серия ЛЛФ-лио гемцитабина**		
	010625	**020625**	**030625**
Размер везикул, нм	176,4±3,122	165,7±4,569	167,9±4,012
PDI	0,194±0,038	0,124±0,080	0,188±0,059
ζ-потенциал, мВ	-(36,4±1,33)	-(37,1±1,15)	-(35,4±1,19)
ЭВ, %	89,5	89,3	96,4
ЗЕ, %мас.	3,9	2,7	3,4
pH	6,9	6,9	6,9

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. В ходе проведённого исследования установлены физико-химические свойства субстанции гемцитабина, определяющие подходы к разработке липосомальной лекарственной формы. Соединение характеризуется выраженной гидрофильностью (logP = −1,15), высокой растворимостью в воде и удовлетворительной стабильностью в слабокислом–нейтральном диапазоне pH. Указанные свойства в сочетании с низким значением pKa ограничивают эффективность классических методов активной загрузки через трансмембранные градиенты и обусловливают необходимость применения альтернативных подходов инкапсуляции.

2. Сравнительное изучение различных стратегий загрузки показало, что активная загрузка с использованием градиентов солей (NaCl, $(NH_4)_2SO_4$) и буферных систем не обеспечивает требуемых фармацевтических характеристик липосомальных дисперсий: эффективность включения остаётся низкой и сопровождается увеличением полидисперсности и снижением устойчивости систем. Пассивная загрузка позволила получить липосомы на основе различных фосфолипидов в комбинации с холестерином и ПЭГ-ДГФА.

3. По результатам сравнительного анализа в качестве оптимальной выбрана липидная композиция гЯФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА. Установлено, что состав с молярным соотношением компонентов 1/0,7/0,089 при массовом соотношении гемцитабин/липиды 1/25 обеспечивает высокую эффективность включения и узкое распределение липосом по размерам, соответствующее требованиям к парентеральным лекарственным формам.

4. При исследовании технологических параметров процесса установлено, что гидратация липидной плёнки при 44 °C в течение 90 мин обеспечивает стабильное формирование мультиламеллярных липосом. Механическая гомогенизация способствует уменьшению размера частиц, однако сопровождается риском утечки гемцитабина и вариабельностью показателей дисперсности. Экструзия через

поликарбонатные мембраны обеспечивает получение липосом с требуемым размером и узким распределением частиц, а также способствует повышению асептичности дисперсии, в связи с чем данный метод выбран в качестве основного этапа формирования липосомальной системы.

5. Разработана технология лиофилизации липосомальной формы гемцитабина. Установлено, что использование сахарозы в качестве криопротектора в соотношении КП/ФЛ 5:1 обеспечивает сохранение инкапсулированного препарата и стабильность физико-химических характеристик липосом после регидратации.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА, СТАНДАРТИЗАЦИЯ, ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГЕМЦИТАБИНА

4.1. Разработка методики спектрофотометрического анализа гемцитабина в составе липосомальной лекарственной формы

4.1.1. Изучение спектральных характеристик действующего вещества липосомальной лекарственной формы гемцитабина

На начальном этапе разработки методики спектрофотометрического количественного определения гемцитабина в составе ЛЛФ были исследованы спектральные характеристики действующего вещества.

В электронном спектре поглощения спиртового раствора субстанции гемцитабина в диапазоне длин волн 200–800 нм зарегистрированы два максимума при 240±2 и 268±2 нм (Рисунок 16).

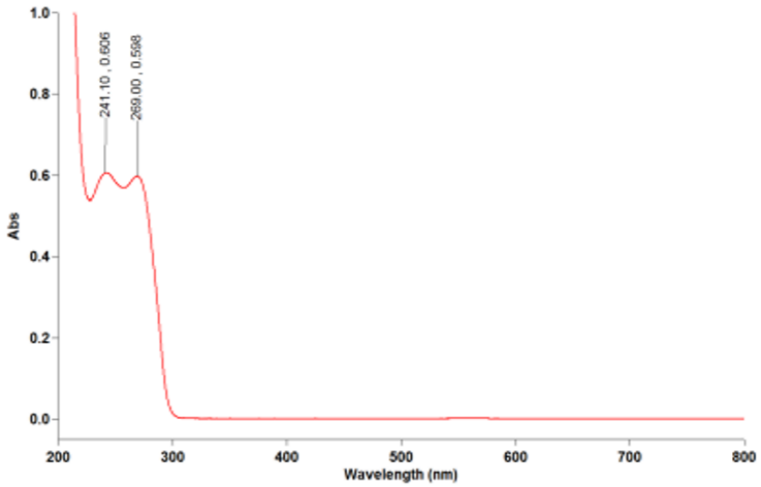

Рисунок 16 − Электронный спектр поглощения раствора гемцитабина с концентрацией $2{,}15 \cdot 10^{-2}$ мг/мл в диапазоне длин волн от 200 до 800 нм

Для количественного анализа гемцитабина в составе ЛЛФ выбран пик с наибольшей длиной волны 268±2 нм.

Для установления линейной зависимости оптической плотности от концентрации ЛС и подбора разведения липосомальной дисперсии для анализа готовили спиртовые разведения гемцитабина в диапазоне концентраций от 0,006 до 0,044 мг/мл.

Для спиртовых растворов гемцитабина линейную зависимость оптической плотности от концентрации при длине волны 268 нм наблюдали во всем исследуемом диапазоне концентраций (Рисунок 17), что указывает на соблюдение основного закона светопоглощения – закона Бугера-Ламберта-Бера.

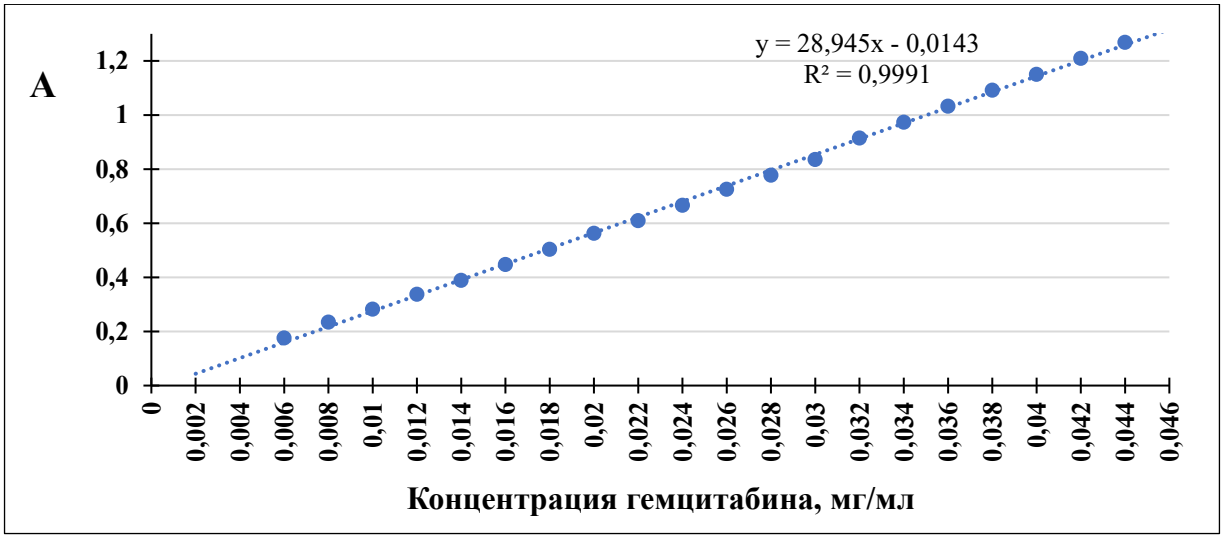

Рисунок 17 – График зависимости оптической плотности спиртового раствора гемцитабина от его концентрации при длине волны 268±2 нм

4.1.2. Количественное определение гемцитабина в составе липосомальной лекарственной формы

Количественное определение гемцитабина в составе ЛЛФ-лио проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 268±2 нм с использованием

методики, представленной в разделе 2.3.4. Для расчетов применяли раствор СО субстанции гемцитабина и раствор пустых липосом в качестве раствора сравнения.

Результаты количественного определения гемцитабина в липосомальной дисперсии приведены в таблице 22.

Таблица 22 − Результаты количественного определения липосомального гемцитабина

№ образца ЛЛФ гемцитабина	Оптическая плотность исследуемого раствора	Концентрация гемцитабина в образце ЛЛФ-лио	Статистические характеристики
1	1,203	2,301	n=6, f=5, $x_{ср}$=2,301, $S^2=2,57\times10^{-6}$, $S=1,60\times10^{-3}$, $x_{ср}\pm\Delta x$ (P=95%)=2,301±0,0017, ε=0,07%
2	1,200	2,299	
3	1,203	2,301	
4	1,204	2,303	
5	1,202	2,300	
6	1,204	2,303	

Полученные данные свидетельствуют о высокой прецизионности методики: среднее содержание гемцитабина в образцах составило 2,3 мг/мл, относительная ошибка определения не превышала 0,1%. Таким образом, разработанная методика обеспечивает корректное и статистически достоверное количественное определение гемцитабина в составе ЛЛФ.

4.2. Показатели для стандартизации лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гемцитабина

Основной задачей стандартизации ЛФ является установление единой системы показателей качества готовой продукции, методов и средств ее испытания и контроля, а также необходимого уровня надежности препарата в течение всего срока хранения с учетом его назначения и области применения.

При оценке качества ЛЛФ учитывают как характеристики, связанные со структурой и свойствами липидных везикул, так и показатели, относящиеся к действующему веществу и вспомогательным веществам [3].

Методы контроля выбираются на стадии фармацевтической разработки и направлены на обеспечение воспроизводимости технологического процесса, стабильности характеристик готовой продукции и соответствия требованиям нормативной документации. Для липосомальных цитостатических препаратов особое значение имеют показатели, отражающие устойчивость липидных мембран, сохранность инкапсулированного соединения и отсутствие деградационных изменений в ходе хранения.

Для контроля качества ЛЛФ-лио гемцитабина как на стадии производства, так и при хранении установлены следующие параметры: описание, способность к регидратации, подлинность, количественное содержание действующего вещества, однородность дозирования и массы дозированных форм, средний гидродинамический размер частиц и показатель полидисперсности, ζ-потенциал, значение pH восстановленной дисперсии, а также потеря в массе при высушивании.

1. Описание (внешний вид)

Образцы лиофилизата представляют собой пористую сухую массу белого цвета, равномерной консистенции, без признаков слеживания.

2. Время растворения

При добавлении 1,7 мл воды для инъекций во флакон и медленном перемешивании в течение 10 мин формируется однородная белая дисперсия без осадка и видимых агрегатов.

3. Подлинность (качественный анализ)

Подлинность препарата подтверждали спектрофотометрическим методом (см. раздел 4.1). В электронном спектре поглощения спиртового разведения ЛЛФ-лио гемцитабина в диапазоне 200–350 нм отмечали два максимума − при 240±2 и 268±2 нм (Рисунок 18).

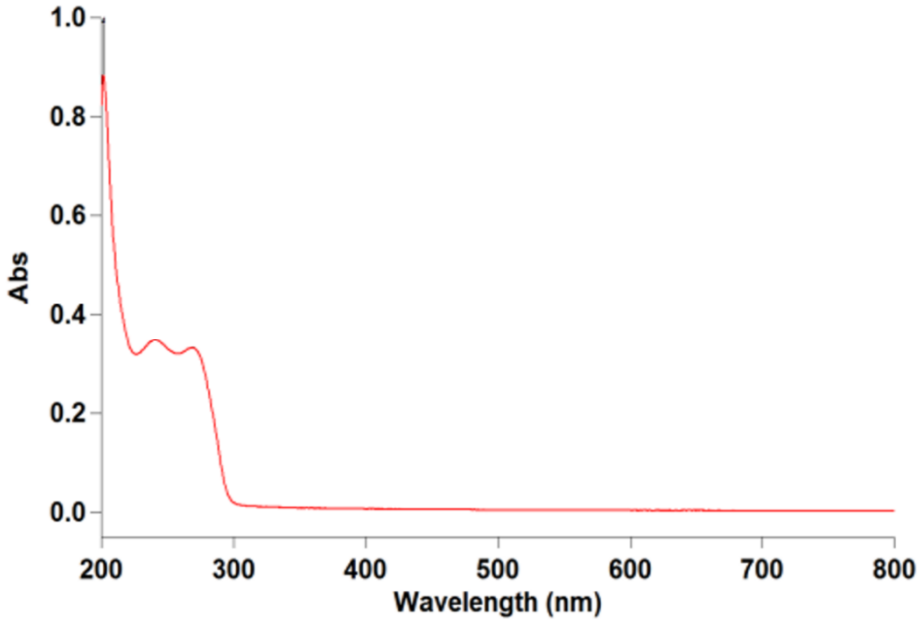

Рисунок 18 – Электронный спектр поглощения спиртового раствора ЛЛФ-лио гемцитабина

4. Количественное определение

Содержание гемцитабина в липосомальной дисперсии определяли методом СФМ при длине волны 268±2 нм с использованием рабочего СО субстанции по методике, представленной в разделе 4.1.2.

Результаты анализа приведены в таблице 23.

Анализ полученных данных показал, что содержание гемцитабина в образцах ранжировалась от 4,52 до 4,61 мг во флаконе, что представляет собой допустимую норму отклонения от номинала – 5,0 мг.

Таблица 23 − Содержание гемцитабина в экспериментальных сериях ЛЛФ-лио

№ флакона	**Содержание гемцитабина, мг/флакон**		
	Серия ЛЛФ-лио		
	010625	**020625**	**030625**
1	4,55	4,55	4,57
2	4,55	4,55	4,61
3	4,54	4,60	4,61
4	4,55	4,56	4,60
5	4,52	4,59	4,61
6	4,57	4,57	4,59

Продолжение Таблицы 23

7	4,57	4,57	4,57
8	4,52	4,57	4,57
9	4,52	4,56	4,60
10	4,54	4,59	4,60
Статистические характеристики	n=10, f=9, $x_{ср}$=4,545, $S^2=4,28\times10^{-4}$, S=0,0207, $x_{ср}\pm\Delta x$ (P=95%)= 4,545±0,015, ε=0,33%	n=10, f=9, $x_{ср}$=4,571, $S^2=2,99\times10^{-4}$, S=0,0173, $x_{ср}\pm\Delta x$ (P=95%)= 4,571±0,0124, ε=0,27%	n=10, f=9, $x_{ср}$=4,593, $S^2=2,90\times10^{-4}$, S=0,0170, $x_{ср}\pm\Delta x$ (P=95%)= 4,593±0,012, ε=0,27%

5. Однородность массы

Для однодозовых ЛФ в индивидуальных упаковках, включая лиофилизаты для приготовления дисперсий, проводится испытание на «однородность массы дозированных лекарственных форм» в соответствии с требованиями ГФ XV. Испытание осуществляли на 20 флаконах ЛЛФ-лио гемцитабина из трех опытных серий − 010625, 020625 и 030625, отобранных случайным образом. Результаты анализа приведены в таблице 24.

Анализ полученных данных показал, что масса содержимого флаконов во всех исследованных сериях находилась в пределах допустимых отклонений от средней массы, регламентированных требованиями ГФ XV издания. Средние значения для серий 010625, 020625 и 030625 составили соответственно 0,264, 0,279 и 0,279.

Таблица 24 − Масса содержимого флакона экспериментальных серий препарата ЛЛФ-лио гемцитабина

№ флакона	**Серия**		
	010625	**020625**	**030625**
1	0,264	0,269	0,272
2	0,266	0,269	0,283
3	0,263	0,299	0,280
4	0,266	0,274	0,281
5	0,259	0,283	0,284
6	0,268	0,279	0,278
7	0,269	0,278	0,274
8	0,255	0,276	0,274

Продолжение Таблицы 24

9	0,258	0,285	0,282
10	0,265	0,278	0,281
11	0,263	0,277	0,282
12	0,264	0,277	0,275
13	0,260	0,282	0,279
14	0,269	0,281	0,279
15	0,268	0,281	0,279
16	0,265	0,281	0,283
17	0,270	0,290	0,279
18	0,267	0,277	0,282
19	0,260	0,276	0,279
20	0,266	0,275	0,280

Таким образом, однородность массы во всех исследованных сериях ЛЛФ-лио гемцитабина соответствует фармакопейным нормативам, что подтверждает воспроизводимость процесса ее получения и стабильность технологического цикла.

6. Размер липосом

Определение среднего гидродинамического диаметра частиц проводили методом DLS согласно методике, представленной в разделе 2.3.4. В соответствии с полученными данными (Таблица 25), средний размер везикул после регидратации составил 176,4 нм (серия 010625), 166,1 нм (серия 020625) и 167,9 нм (серия 030625), а разброс внутри каждой серии не превышал 5 нм, что соответствует требованиям.

Таблица 25 − Оценка качества серий препарата «Гемцитабин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 5 мг» по показателям «Размер липосом» и «pH»

Показатель	**№ флакона**	**серия**		
		010625	**020625**	**030625**
Размер везикул, нм	1	176,4	165,7	167,9
	2	174,8	166,2	168,4
	3	177,1	167,0	166,8
	4	175,6	165,1	167,2
	5	178,0	166,5	169,1
	Среднее значение	176,4	166,1	167,9

Продолжение Таблицы 25

pH	1	6,9	6,9	6,9
	2	7,0	6,9	7,0
	3	6,9	7,0	7,0
	4	7,0	6,9	7,1
	5	7,0	7,1	6,9
	Среднее значение	7,0	7,0	7,0

7. Значение pH

Потенциометрическое определение проводили по методике, представленной в разделе 2.3.4. Значения pH регидратированных дисперсий находились в узком диапазоне 6,9–7,1 во всех сериях; средние значения составили 7,0 (серии 010625, 020625 и 030625), что соответствует целевому интервалу для ЛЛФ гемцитабина и не требует корректировки состава (Таблица 25).

Исследования по стандартизации препарата «Гемцитабин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 5 мг» по дополнительным показателям качества, включая «Пирогенность», «Аномальная токсичность», «Стерильность» и «Остаточные органические растворители», находятся в стадии разработки.

На основании полученных результатов стандартизации ЛФ «Гемцитабин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 5 мг» составлена спецификация, представленная в Приложении А.

4.3. Мониторинг стабильности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гемцитабина при хранении

С целью оценки стабильности ЛФ «Гемцитабин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 5 мг» три серии препарата (010625, 020625 и 030625) были заложены на хранение при температуре -(18±2) °C. Контроль качества осуществляли ежемесячно по показателям, предложенным для

стандартизации ЛЛФ-лио гемцитабина: описание, регидратируемость лиофилизата, подлинность, количественное содержание гемцитабина, однородность массы содержимого флакона, средний размер липосом, PDI, ζ-потенциал, значение pH, а также оценивали ЭВ и ЗЕ.

Результаты контроля качества исследуемых серий препарата представлены в таблице 26. На начальном этапе (0 мес.) все серии соответствовали установленным критериям: размеры везикул не превышали 200 нм, показатели PDI находились в пределах, характерных для монодисперсных наноструктур, а ζ-потенциал сохранялся на уровне ниже -30 мВ, что указывает на достаточную электростатическую стабилизацию липосом. Концентрация действующего вещества во всех сериях была сопоставимой, ЭВ составила в среднем около 86–95%, при ЗЕ около 3%. Значения pH оставались стабильными (6,9 во всех сериях).

В течение шести месяцев хранения не выявлено критических изменений указанных параметров: липосомы сохраняли размер ниже 200 нм, ζ-потенциал оставался отрицательным с незначительными колебаниями, концентрация ЛС и значения ЭВ/ЗЕ оставались в пределах целевых показателей.

Таблица 26 − Мониторинг качества лиофилизированных липосом гемцитабина

Показатель	**Срок хранения, мес.**	**Серия ЛЛФ-лио гемцитабина**		
		010625	**020625**	**030625**
Размер везикул, нм	0	176,4±3,122	165,7±4,569	167,9±4,012
	1	175,6±4,123	165,1±4,786	167,2±3,266
	2	178,0±4,216	166,5±4,699	169,1±3,987
	3	177,2±3,942	169,3±5,125	166,2±4,256
	6	176,4±4,309	166,1±5,854	167,9±4,156
PDI	0	0,194±0,038	0,124±0,080	0,188±0,059
	1	0,187±0,012	0,176±0,050	0,181±0,040
	2	0,198±0,051	0,193±0,055	0,190±0,048
	3	0,190±0,023	0,187±0,059	0,195±0,069
	6	0,179±0,011	0,172±0,030	0,178±0,032
ζ-потенциал, мВ	0	-(36,4±1,33)	-(37,1±1,15)	-(35,4±1,19)
	1	-(30,4±1,04)	-(31,0±1,05)	-(30,2±1,08)
	2	-(32,1±1,12)	-(33,0±1,10)	-(32,5±1,11)
	3	-(27,3±1,31)	-(33,1±1,21)	-(30,4±1,13)
	6	-(28,3±1,01)	-(29,0±1,00)	-(28,6±1,03)
ЭВ, %	0	89,5	89,3	96,4
	1	87,4	87,0	93,5
	2	91,5	86,0	95,0

Продолжение Таблицы 26

ЭВ, %	3	90,7	89,4	89,8
	6	86,2	90,8	92,2
ЗЕ, мас. %	0	3,9	2,7	3,4
	1	3,9	3,1	3,5
	2	3,4	3,3	3,2
	3	3,2	3,0	3,0
	6	3,0	3,1	3,3
pH	0	6,9	6,9	6,9
	1	7,0	6,9	7,1
	2	7,0	7,1	6,9
	3	7,1	6,9	6,9
	6	7,0	7,0	7,0

Полученные результаты показали высокую стабильность ЛЛФ-лио гемцитабина в течение всего периода наблюдения.

После регидратации образцов сохранялись оптимальные размеры липосом (165–170 нм), низкие значения индекса полидисперсности (PDI<0,2) и отрицательный ζ-потенциал в диапазоне от -28 до -30 мВ, обеспечивающий коллоидную устойчивость дисперсий. Эффективность включения и загрузочная емкость также оставались на высоком уровне: через шесть месяцев хранения ЭВ достигала 92%, а ЗЕ составляла около 3,5%.

Таким образом, ЛЛФ-лио гемцитабина характеризуется стабильностью и сохраняет воспроизводимые физико-химические параметры в течение шести месяцев хранения. Полученные результаты подтверждают целесообразность применения метода лиофилизации для повышения стабильности липосомальной системы и обосновывают выбор данной стратегии для дальнейшей разработки препарата. Исследование стабильности и уточнение срока годности продолжаются.

4.4. Изучение биологической активности липосомальной лекарственной формы гемцитабина

Результаты эксперимента представлены на рисунке 19. Согласно полученным данным, липосомальная форма гемцитабина продемонстрировала значительно более выраженную цитотоксическую активность по сравнению со свободным препаратом. Значение IC_{50} для ЛЛФ гемцитабина составило 0,47 мкМ, что почти в 20 раз ниже, чем для раствора свободного гемцитабина (9,6 мкМ). Это свидетельствует о существенном повышении эффективности действия препарата при его инкапсуляции в липосомы.

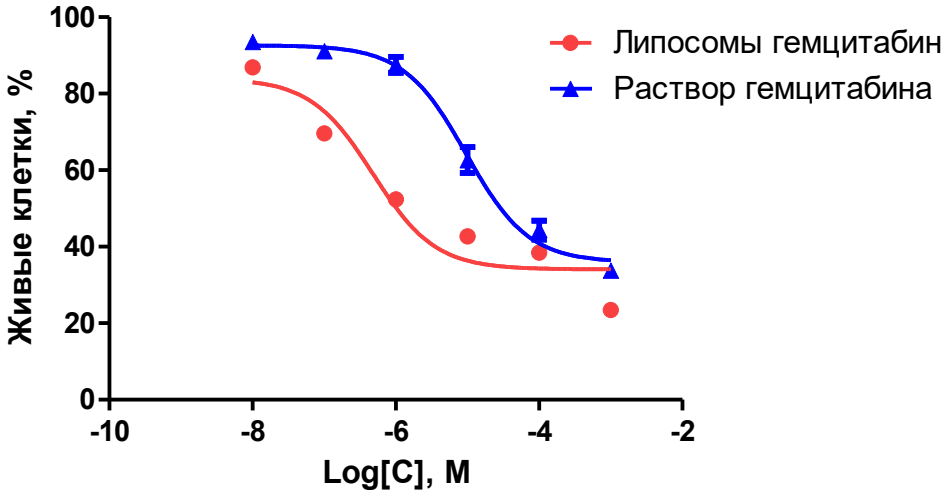

Рисунок 19 − Цитотоксическая активность липосомального гемцитабина и раствора гемцитабина [11]

Более высокая активность ЛЛФ гемцитабина, вероятно, обусловлена улучшенной способностью липосом проникать в опухолевые клетки и обеспечивать пролонгированное высвобождение действующего вещества в их цитоплазме. Липидная оболочка защищает гемцитабин от быстрого метаболического разрушения, увеличивая его стабильность в биологических жидкостях. Влияние EPR-эффект в условиях не проявляется, однако повышенная

клеточная доступность инкапсулированной формы очевидна, что подтверждается значительным снижением IC_{50}.

Различия в кривых дозозависимости (Рисунок 19) показывают, что уже при концентрации 10^{-5}–10^{-6}М ЛЛФ гемцитабина снижает жизнеспособность клеток до 25–50%, тогда как свободный препарат при этих же концентрациях демонстрирует значительно меньший эффект (55–80% живых клеток соответственно).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Разработана методика спектрофотометрического количественного определения гемцитабина в составе липосомальной лекарственной формы при длине волны 268±2 нм. Установлено, что зависимость оптической плотности от концентрации подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера в диапазоне 0,006-0,044 мг/мл, а относительная ошибка определения не превышает 0,1%, что подтверждает воспроизводимость и точность разработанной методики.

2. Для стандартизации лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гемцитабина определены основные показатели качества: описание, регидратируемость, подлинность, количественное содержание действующего вещества, однородность дозирования и массы дозированных форм, средний размер липосом, индекс полидисперсности, ζ-потенциал и значение pH восстановленной дисперсии.

3. Установлено, что экспериментальные серии препарата «Гемцитабин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 5 мг» соответствуют требованиям фармакопейной нормативной документации по показателям однородности массы, количественного содержания действующего вещества, размеров липосом и значения pH, что подтверждает воспроизводимость разработанной технологии получения препарата. На основании полученных результатов составлена спецификация.

4. В результате исследования стабильности трех опытных серий препарата при температуре -(18±2) °C установлено, что в течение шести месяцев хранения лиофилизированная форма сохраняет оптимальные физико-химические характеристики: средний размер липосом 165-170 нм, PDI < 0,2, ζ-потенциал -28…-30 мВ, эффективность инкапсуляции до 92% и загрузочную способность около 3,5%, что свидетельствует о высокой стабильности разработанной системы.

5. В исследованиях in vitro установлено, что липосомальная форма гемцитабина обладает значительно более выраженной цитотоксической

активностью по сравнению со свободным препаратом. Значение IC_{50} для ЛЛФ гемцитабина составило 0,47 мкМ, что почти в 20 раз ниже, чем для раствора свободного гемцитабина (9,6 мкМ).

6. Полученные результаты подтверждают, что инкапсуляция гемцитабина в липосомы способствует повышению его противоопухолевой активности и свидетельствуют о перспективности разработанной липосомальной системы доставки для дальнейших доклинических и клинических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведённого комплексного фармацевтического исследования решена актуальная научно-практическая задача разработки состава и технологии получения липосомальной лекарственной формы противоопухолевого препарата гемцитабин. На основании системного изучения физико-химических свойств активной фармацевтической субстанции, обоснования выбора липидной матрицы и методов инкапсуляции разработана воспроизводимая технология получения липосомальной лекарственной формы гемцитабина, включающая стадии получения липидной плёнки, гидратации, экструзии и лиофилизации.

Установлены критические параметры рецептуры и технологии, определяющие эффективность инкапсуляции, физико-химические характеристики и стабильность липосомальной системы. Разработаны и применены методики количественного определения гемцитабина и оценки эффективности его включения, что позволило обосновать показатели качества и подходы к стандартизации липосомальной лекарственной формы.

Показано, что разработанная липосомальная форма гемцитабина обладает воспроизводимыми физико-химическими характеристиками и повышенной цитотоксической активностью *in vitro* по сравнению со свободным препаратом, что подтверждает целесообразность использования липосомальных систем доставки для оптимизации фармакологических свойств гидрофильных противоопухолевых препаратов. Полученные результаты обобщены в общих выводах диссертационной работы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Подходы к разработке состава и технологии получения липосомальной лекарственной формы гемцитабина могут быть рекомендованы для использования на этапах фармацевтической разработки инъекционных липосомальных препаратов. Предложенные методики количественного анализа, оценки эффективности инкапсуляции и контроля физико-химических характеристик целесообразно применять при стандартизации липосомальных лекарственных форм гидрофильных противоопухолевых препаратов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективами дальнейшей разработки темы являются расширенные доклинические исследования разработанной липосомальной лекарственной формы гемцитабина, включая оценку фармакокинетики, безопасности и противоопухолевой эффективности in vivo, а также совершенствование липосомальной системы доставки и адаптация технологии к условиям масштабирования. Полученные подходы могут быть использованы при разработке липосомальных лекарственных форм других гидрофильных цитостатических препаратов.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. На основании проведенных химико-фармацевтических и технологических исследований установлен оптимальный состав стерически стабилизированной ЛЛФ гемцитабина для инъекционного введения. В качестве компонентов липосомальной мембраны выбраны гидрогенизированный яичный фосфатидилхолин, холестерин и пегилированный фосфотидилэтаноламин в молярном соотношении 1/0,7/0,089.

2. Разработана технология получения устойчивой при хранении ЛЛФ гемцитабина методом тонкопленочной гидратации с последующей экструзией. Определены критические факторы рецептуры и установлены оптимальные условия технологического процесса получения ЛЛФ гемцитабина. Разработана технология лиофилизации дисперсии с использованием сахарозы в качестве криопротектора, что обеспечивает сохранение физико-химических характеристик липосом и предотвращает утечку действующего вещества из везикул.

3. Разработана методика спектрофотометрического анализа гемцитабина в составе ЛЛФ при длине волны 268±2 нм с использованием раствора «пустых липосом» в качестве раствора сравнения. Методика обеспечивает количественное определение действующего вещества в диапазоне концентраций 0,006–0,044 мг/мл с относительной погрешностью не более 0,1%.

4. Определены показатели качества для стандартизации ЛЛФ-лио гемцитабина, включающие описание, регидратируемость лиофилизата, подлинность, количественное содержание ЛС, однородность массы дозированных форм, средний размер липосом, индекс полидисперсности, ζ-потенциал и значение pH. На основании полученных результатов разработан проект НД на препарат «Гемцитабин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций». Проведённые исследования показали стабильность критических параметров препарата в течение шести месяцев хранения при температуре -(18±2) °C.

5. В опытах *in vitro* на культуре клеток аденокарциномы легкого человека A549 установлено, что липосомальная форма гемцитабина обладает значительно более высокой цитотоксической активностью по сравнению со свободным препаратом. Значение IC_{50} составило 0,47 мкМ против 9,6 мкМ для свободного гемцитабина, что подтверждает эффективность липосомальной системы в повышении доставки действующего вещества в опухолевые клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-ФУ – 5-фторурацил

АФС – активная фармацевтическая субстанция

ВБП – выживаемость без прогрессирования

гСФХ – гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин

ГФ – государственная фармакопея

гЯФХ – гидрогенизированный яичный фосфатидилхолин

ДМСО – диметилсульфоксид

ЗЕ – загрузочная емкость

КП – криопротектор

КП/ФЛ – молярное соотношение криопротектор/фосфолипид

ЛЛФ – липосомальная лекарственная форма

ЛС – лекарственное средство

ЛФ – лекарственная форма

МСЛ – многослойные липосомы

НД – нормативная документация

ОВ – общая выживаемость

ОСЛ – однослойные липосомы

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭГ-ДГФА – 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси (полиэтиленгликоль)-2000] аммониевая соль

РКИ – рандомизированное клиническое исследование

РПЖ – рак предстательной железы

СО – стандартный образец

СФМ – спектрофотометрия

$\mathbf{T_{ф.п.}}$ – температура фазового перехода

ЧОО – частота объективного ответа

ЭВ – эффективность включения

ЯФХ – яичный фосфатидилхолин

AUC – площадь под фармакокинетической кривой

CDA – цитидиндезаминаза

dCK – дезоксицитидинкиназа

dFdC – гемцитабин

dFdCDP – гемцитабиндифосфат

dFdCMP – гемцитабинмонофосфат

dFdCTP – гемцитабинтрифосфат

dFdU – 2′,2′-дифтор-2′-дезоксиуридин

DL – соотношение drug/lipids

DLS – динамическое светорассеяние

DOPE – 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин

DOTAP – 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний пропан

DPPC – 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин

DSPC – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин

EPR-эффект – эффект повышенной проницаемости и удерживания

hNT – переносчики нуклеозидов

IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования

P – коэффициент распределения

PBS – phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буфер

PDI – polydispersity index, индекс полидисперсности

SD – standart deviation, стандартное отклонение

ζ-потенциал – дзета-потенциал

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буцанец, А.В. Стандартизация исследования активности фермента цитидиндезаминазы / А.В. Буцанец, А.А. Леваненко, Н.В. Кузьмич // Молодой ученый. – 2018. – № 13(199). – С. 69–71.

2. Влияние факторов рецептуры на эффективность пассивной загрузки гемцитабина в липосомы / Г. А. Оборотов, М. В. Дмитриева, М. А. Барышникова [и др.] // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2025. – Т. 27. – № 6. – С. 75-86.

3. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания [Электронный ресурс]. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/ (Дата обращения: 07.06.2025).

4. Государственный реестр лекарственных средств: https://grls.minzdrav.gov.ru/default.aspx. Дата обращения: 08.03.2025 г. State Register of Medicines: https://grls.minzdrav.gov.ru/default.aspx. Date of access: 03/08/2025.

5. Игнатова, Г.Л. Современные способы доставки лекарств при лечении бронхообструктивных заболеваний / Г.Л. Игнатова, А.С. Белевский // Астма и аллергия. – 2018. – № 2. – С. 21–28.

6. Ингаляционная терапия / под. Ред. С.Н. Авдеева, В.В. Архипова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 318 с.

7. Козеев, С.Г. Разработка липосомальной лекарственной формы противоопухолевого препарата араноза: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук: специальность 14.04.01. «Технология получения лекарств» / Сергей Геннадьевич Козеев; Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова. – Москва, 2013. – 24 с.

8. Липосомы [Электронный ресурс] – URL: https://www.precisionnanosystems.com/workflows/formulations/liposomes (дата обращения 11.03.2025).

9. Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение / Н. И. Бурдаев, Л. Л. Николаева, В. В. Косенко [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2023. – Т. 13. – № 2-1. – С. 316-332.

10. Оборотов, Г.А. Лиофилизация липосом гемцитабина / Г.А. Оборотов, М.В. Дмитриева, И.И. Краснюк // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2025. – Т. 27. – № 8. – С. 112–119.

11. Оценка цитотоксического потенциала липосомального гемцитабина / Г. А. Оборотов, А. А. Рудакова, М. А. Барышникова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2025. – Т. 24. – № 2. – С. 83-87.

12. Переводчикова, Н.И. Гемцитабин (Гемзар) и его место в современной противоопухолевой химиотерапии / Н.И. Переводчикова // РМЖ. –2007. – № 25. – С. 1884.

13. Перспективы создания липосомальной системы доставки гемцитабина / Г. А. Оборотов, М. В. Дмитриева, А. П. Колпаксиди [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2025. – Т. 24. – № 1. – С. 46-56.

14. Реестр клинических испытаний ClinicalTrials.gov: [Электронный ресурс]. URL: https://clinicaltrials.gov (дата обращения: 08.03.2025 г.)

15. Роль адъювантной лекарственной терапии в комбинированном лечении холангиоцеллюлярного рака / Ю. А. Коваленко, И. А. Кукеев, Ю. О. Жариков, А. А. Пайчадзе // Вопросы онкологии. – 2018. – № 2. – С. 171-176.

16. Токсичность и эффективность комбинации гемцитабина и nab-паклитаксела (паклитаксел + альбумин) в российской популяции больных раком поджелудочной железы: результаты многоцентрового ретроспективного исследования / И. А. Покатаев, М. А. Лядова, М. Ю. Федянин [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т. 9. – № 3. – С. 20-30.

17. Чжан, Си. Разработка инъекционных лекарственных форм цифетрилина: диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук: 14.04.01 «Технология получения лекарств» / Си Чжан; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2017. – 147 с.

18. Экспериментальное определение липофильности гемцитабина / М. В. Дмитриева, Г. А. Оборотов, А. П. Колпаксиди, С. Д. Щеглов // Новые перспективные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы : материалы XVIII Всерос. науч.-практ. конф. им. А. Ю. Барышникова (Москва, 24-25 апреля 2025 г.). – Москва : ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, 2025. – С. 15-16.

19. A combination of gemcitabine and 5-fluorouracil in advanced pancreatic cancer, a report from the Italian Group for the Study of Digestive Tract Cancer (GISCAD) / S. Cascinu, R. R. Silva, S. Barni [et al.] // British Journal of Cancer. – 1999. – Vol. 80. – №. 10. – P. 1595–1598.

20. A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents / V.V.S.N.L. Andra, S.V.N. Pammi, L.V.K.P. Bhatraju, L.K. Ruddaraju // Bionanoscience. – 2022. – Vol. 12. – №. 1. – P. 274–291.

21. A Liposomal Gemcitabine, FF-10832, Improves Plasma Stability, Tumor Targeting, and Antitumor Efficacy of Gemcitabine in Pancreatic Cancer Xenograft Models / T. Matsumoto, T. Komori, Y. Yoshino [et al.] // Pharm Res. – 2021. – Vol. 38. – №. 6. – P. 1093–106.

22. A novel gemcitabine derivative-loaded liposome with great pancreas-targeting ability / P.W. Li, S. Luo, L.Y. Xiao [et al.] // Acta Pharmacol Sin. – 2019. – Vol. 40. – №. 11. – P. 1448–56.

23. A phase 1, first-in-human, dose-escalation and biomarker trial of liposomal gemcitabine (FF-10832) in patients with advanced solid tumors / E.H. Borazanci, F.

Janku, E.P. Hamilton [et al.] // Journal of Clinical Oncology. –2022. – Vol. 40. – №. 16. – P. 3097.

24. A phase 2a safety run-in and preliminary efficacy study of liposomal gemcitabine (FF-10832) in combination with pembrolizumab in patients with advanced solid tumors / C.J. Langer, B.D. Curti, C.M. Farber [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2024. – Vol. 42. – №. 16(suppl). – P. 2615.

25. Adler-Moore, J. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience / J. Adler-Moore, R.T. Proffitt // J Antimicrob Chemother. – 2002. – Suppl 1. – P. 21–30.

26. Alberts, B. Molecular biology of the cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis [et al.]. – 6th ed. – New York: Garland Science, 2015. – 1464 p.

27. Allen, T.M. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications / T.M. Allen, P.R. Cullis // Adv Drug Deliv Rev. – 2013. – Vol. 65. – №. 1. – C. 36–48.

28. American Cancer Society. Key statistics for lung cancer [Электронный ресурс]. – URL: https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/key-statistics.html (дата обращения: 14.05.2025).

29. American Cancer Society. Pancreatic cancer: About pancreatic cancer [Электронный ресурс]. – URL: https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/about/what-is-pancreatic-cancer.html (дата обращения: 14.05.2025).

30. An overview of liposome lyophilization and its future potential / C. Chen, D. Han, C. Cai [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2010. – Vol. 142. – №. 3. – P. 299–231.

31. Anderson, M. The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations / M. Anderson, A. Omri // Drug Deliv. –2004. – Vol. 11. – №. 1. – P. 33–9.

32. Barenholz, Y. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned / Y. Barenholz // J Control Release. – 2012. – Vol. 160. – №. 2. – P. 117–34.

33. Barenholz, Y. Liposome application: problems and prospects / Y. Barenholz // Current Opinion in Colloid and Interface Science. – 2001. – №. 6. – P. 66–77.

34. Berg, T. Gemcitabine for recurrent ovarian cancer – a systematic review and meta-analysis / T. Berg, T.J. Nøttrup, H. Roed // Gynecol Oncol. –2019. – Vol. 155. – №. 3. – P. 530–7.

35. Beutel, A.K. Barriers and opportunities for gemcitabine in pancreatic cancer therapy / A.K. Beutel, C.J. Halbrook // Am J Physiol Cell Physiol. – 2023. – Vol. 324. – №. 2. – P. 540–52.

36. Boonnoy, P. Alpha-tocopherol inhibits pore formation in oxidized bilayers / P. Boonnoy, M. Karttunen, J. Wong-ekkabut // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2017. – Vol. 19. – №. 8. – P. 5699–5704.

37. Bukowski, K. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy / K. Bukowski, M. Kciuk, R. Kontek // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21. – №. 9. – P. 3233.

38. Cellular pharmacology of gemcitabine / E. Mini, S. Nobili, B. Caciagli [et al.] // Ann Oncol. – 2006. – №. 17 (Suppl 5). – P. 7–12.

39. Chemotherapeutic drugs: Cell death- and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells? / M. Mollaei, Z.M. Hassan, F. Khorshidi, L. Langroudi // Transl Oncol. – 2021. – Vol. 14. – №. 5. – P. 101056.

40. Chonn, A. Recent advances in liposomal drug-delivery systems / A. Chonn, P.R. Cullis // Curr Opin Biotechnol. – 1995. – Vol. 6. – №. 6. – P. 698–708.

41. Cisplatin and gemcitabine in non-small-cell lung cancer / G. Cartei, C. Sacco, A. Sibau [et al.] // Ann Oncol. – 1999. – Suppl 5. – P. 57–62.

42. Clinical phase I and pharmacology study of gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) administered in a two-weekly schedule / G.J. Peters, M. Clavel, P. Noordhuis [et al.] // J Chemother. – 2007. – Vol. 19. − №. 2. – P. 212–21.

43. Complications following antidotal use of intravenous lipid emulsion therapy / M. Levine, A.B. Skolnik, A.M. Ruha [et al.] // J Med Toxicol. –2014. – Vol. 10. – №. 1. – P. 10–4.

44. Construction of Cisplatin-18-Crown-6 Complexes Through Supramolecular Chemistry to Improve Solubility, Stability, and Antitumor Activity / Gao Y., Huang Y., Ren C. [et al.] // Int J Mol Sci. – 2024. – Vol. 25. – №. 24. – P. 13411.

45. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients / C. Tibaldi, E. Giovannetti, E. Vasile [et al.] // Clin Cancer Res. – 2008. – Vol. 14. − №. 6. – P. 1797−803.

46. Cytotoxic effects of gemcitabine-loaded liposomes in human anaplastic thyroid carcinoma cells / M. Celano, M.G. Calvagno, S. Bulotta [et al.] // BMC Cancer. – 2004. – №. 4. – P. 63.

47. de Sousa Cavalcante, L. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer / L. de Sousa Cavalcante, G. Monteiro // Eur J Pharmacol. – 2014. – №. 741. – P. 8–16.

48. Dent, S. Gemcitabine in the management of metastatic breast cancer: a systematic review / S. Dent, H. Messersmith, M. Trudeau // Breast Cancer Res Treat. – 2008. – Vol. 108. – №. 3. – P. 319–31.

49. Derissen, E.J.B. Intracellular Pharmacokinetics of Pyrimidine Analogues used in Oncology and the Correlation with Drug Action / E.J.B. Derissen, J.H. Beijnen // Clin Pharmacokinet. – 2020. – Vol. 59. – №. 12. – P. 1521–50.

50. Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Oscillatory Rheology / L. Budai, M. Budai, T. Bozó [et al.] // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – №. 13. – P. 5125.

51. Development of high-content gemcitabine PEGylated liposomes and their cytotoxicity on drug-resistant pancreatic tumour cells / H. Xu, J. Paxton, J. Lim [et al.] // Pharm Res. – 2014. – Vol. 31. − №. 10. – P. 2583–92.

52. Development of Liposomal Gemcitabine with High Drug Loading Capacity / H. Tamam, J. Park, H.H. Gadalla [et al.] // Mol Pharm. – 2019. – Vol. 16. − №. 7. – P. 2858–71.

53. Effect of size and pH-sensitivity of liposomes on cellular uptake pathways and pharmacokinetics of encapsulated gemcitabine / M. Tang, S.B. Yarragudi, P. Pan [et al.] // J Liposome Res. – 2025. – Vol. 35. − №. 1. – P. 44–54.

54. Efficient Delivery of Gemcitabine by Estrogen Receptor-Targeted PEGylated Liposome and Its Anti-Lung Cancer Activity In Vivo and In Vitro / H. Tang, Z. Zhang, M. Zhu [et al.] // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. − №. 3. – P. 988.

55. Encapsulating taurine into liposomes: A promising therapeutic for liver fibrosis / X.J. Zhang, X.Y. Jiang, Y.L. Ma [et al.] // World J Gastroenterol. – 2024. – Vol. 30. − №. 41. – P. 4509–13.

56. Externally Triggered Novel Rapid-Release Sonosensitive Folate-Modified Liposomes for Gemcitabine: Development and Characteristics / M.M. Omar, O.A. Hasan, R.M. Zaki, N.E. Eleraky // Int J Nanomedicine. – 2021. – №. 16. – P. 683–700.

57. FF-10832 enables long survival via effective gemcitabine accumulation in a lethal murine peritoneal dissemination model / T. Higuchi, T. Yokobori, R. Takahashi [et al.] // Cancer Sci. – 2019. – Vol. 110. – №. 9. – P. 2933–40.

58. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer / T. Conroy, F. Desseigne, M. Ychou [et al.] // N Engl J Med. – 2011. –Vol. 364. – №. 19. – P. 1817–25.

59. Fukuzawa, K. Lipid peroxidation in egg phosphatidylcholine liposomes: comparative studies on the induction systems Fe2+/ascorbate and Fe(3+)-chelates/xanthine-xanthine oxidase / K. Fukuzawa, M. Iemura, A. Tokumura // Biol Pharm Bull. –1996. – Vol. 19. – №. 5. – P. 665–71.

60. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines / J.R. Mackey, R.S. Mani, M. Selner [et al.] // Cancer Res. – 1998. – Vol. 58. – №. 19. – P. 4349–57.

61. Gabizon, A. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: Review of animal and human studies / A. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz // Clin. Pharmacokinet. – 2003. – Vol. 42. – №. 5. – P. 419–436.

62. Gamma-irradiation of liposomes composed of saturated phospholipids: effect of bilayer composition, size, concentration and absorbed dose on chemical degradation and physical destabilization of liposomes / N.J. Zuidam, C. Versluis, E.A. Vernooy, D.J. Crommelin // Biochim Biophys Acta. – 1996. – Vol. 1280. − №. 1. – P. 135−48.

63. Gemcitabine as single agent chemotherapy in elderly patients with stages III-IV non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase II study / V. Bianco, A. Rozzi, G. Tonini [et al.] // Anticancer Res. – 2002. – Vol. 22. – №. 5. – P. 3053–6.

64. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial / C. Louvet, R. Labianca, P. Hammel [et al.] // J Clin Oncol. – 2005. – Vol. 23. – №. 15. – P. 3509–16.

65. Gemcitabine plus carboplatin compared with carboplatin in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: an intergroup trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG / J. Pfisterer, M. Plante, I. Vergote [et al.] // J Clin Oncol. − 2006. – Vol. 24. − №. 29. – P. 4699−707.

66. Gemcitabine Plus Paclitaxel Versus Paclitaxel Monotherapy in Patients With Metastatic Breast Cancer and Prior Anthracycline Treatment / K.S. Albain, S.M. Nag, G. Calderillo-Ruiz et al. // J Clin Oncol. – 2008. – Vol. 26. – №. 24. – P. 3950–7.

67. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentiation / W. Plunkett, P. Huang, Y.Z. Xu [et al.] // Semin Oncol. − 1995. – Vol. 22. − №. 4 (Suppl 11). – P. 3−10.

68. Gemcitabine-induced cardiomyopathy: a case report and review of the literature / M.F. Khan, S. Gottesman, R. Boyella, E. Juneman // J Med Case Rep. – 2014. – №. 8. – P. 220.

69. Gemcitabine-loaded DSPE-PEG-PheoA liposome as a photomediated immune modulator for cholangiocarcinoma treatment / D.H. Kim, B.N. Im, H.S. Hwang, K. Na // Biomaterials. – 2018. – №. 183. – P. 139–50.

70. Gemcitabine-loaded liposomes: rationale, potentialities and future perspectives / C. Federico, V.M. Morittu, D. Britti [et al.] // Int J Nanomedicine. – 2012. – №. 7. – P. 5423–36.

71. Gemcitabine-loaded RGD modified liposome for ovarian cancer: preparation, characterization and pharmacodynamic studies / Z. Tang, W. Feng, Y. Yang, Q. Wang // Drug Des Devel Ther. – 2019. − №. 13. – P. 3281–90.

72. Gemcitabine-Phospholipid Complex Loaded Lipid Nanoparticles for Improving Drug Loading, Stability, and Efficacy against Pancreatic Cancer / C.P. Dora, V. Kushwah, V. Yadav [et al.] // Mol Pharm. – 2024. – Vol. 21. – №. 6. – P. 2699–712.

73. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel [et al.] // CA Cancer J Clin. – 2021. – Vol. 71. − №. 3. – P. 209−249.

74. Growth inhibition of pancreatic cancer by targeted delivery of gemcitabine via fucoidan-coated pH-sensitive liposomes / Z. Zheng, M. Li, J. Yang [et al.] // Int J Biol Macromol. – 2024. – Vol. 277. − №. (Pt 3). – P. 134517.

75. Heinemann, V. Role of gemcitabine in the treatment of advanced and metastatic breast cancer / V. Heinemann // Oncology. – 2003. – Vol. 64. – №. 3. – P. 191–206.

76. Huang, P. Action of 2′,2′-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis / P. Huang, S. Chubb, L.W. Hertel // Cancer Research. – 1991. – Vol. 51. – №. 22. – P. 6110–7.

77. Huang, S.L. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery / S.L. Huang // Adv Drug Deliv Rev. – 2008. – Vol. 60. – №. 10. – P. 1167–76.

78. Hybrid Nanoparticles of Extracellular Vesicles and Gemcitabine Prodrug-Loaded Liposomes with Enhanced Targeting Ability for Effective PDAC Treatment / B. Kim, H. Park, H. Liu [et al.] // ACS Appl Bio Mater. – 2024. – Vol. 7 – №. 9. – P. 6025–33.

79. Ilic, M. Epidemiology of pancreatic cancer / M. Ilic, I. Ilic // World J Gastroenterol. – 2016. – Vol. 22. – №. 44. – P. 9694–9705.

80. Immordino, M.L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential / M.L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel // Int J Nanomedicine. – 2006. – Vol. 1. – №. 3. – P. 297–315.

81. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial / H.A. Burris 3rd, M.J. Moore, J. Andersen [et al.] // J Clin Oncol. – 1997. –Vol. 15. – №. 6. – P. 2403–13.

82. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine / D.D. Von Hoff, T. Ervin, F.P. Arena [et al.] // N Engl J Med. – 2013. – Vol. 369. − №. 18. – P.1691−703.

83. Influence of different sugar cryoprotectants on the stability and physicochemical characteristics of freeze-dried 5-fluorouracil plurilamellar vesicles / M. Nounou, L.K. El-Khordagui, N. Khalafallah, S. Khalil // DARU – journal of faculty of pharmacy. – 2005. – Vol. 13. – №. 4. – P. 133.

84. Inhalable liposomal dry powder of gemcitabine-HCl: Formulation, in vitro characterization and in vivo studies / M. Gandhi, T. Pandya, R. Gandhi [et al.] // Int J Pharm. – 2015. – Vol. 496. – №. 2. – P. 886–95.

85. Intravesical Gemcitabine for Non-Muscle Invasive Bladder Cancer after Bacillus Calmette-Guerin Treatment Failure: A Prospective Study / E. Mirzaee, K. Novin, P. Fadavi [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. –2024. – Vol. 25. – №. 9. – P. 3173–7.

86. Lansakara-P, D.S. Synthesis and in vitro evaluation of novel lipophilic monophosphorylated gemcitabine derivatives and their nanoparticles / D.S. Lansakara-P, B.L. Rodriguez, Z. Cui // Int J Pharm. – 2012. – Vol. 429. – №. 1–2. – P. 123–34.

87. Lee, Y. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery / Y. Lee, D.H. Thompson // Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. – 2017. – Vol. 9. – №. 5. –P. 10.1002/wnan.1450.

88. Liposomal corticosteroids for the treatment of inflammatory disorders and cancer / B. Ozbakir, B.J. Crielaard, J.M. Metselaar [et al.] // J Control Release. – 2014. – №. 190. – P. 624–36.

89. Liposomal delivery of gene therapy for ovarian cancer: a systematic review / J.S. Son, R. Chow, H. Kim [et al.] // Reprod Biol Endocrinol. – 2023. − №. 21. – P. 75.

90. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application / D.E. Large, R.G. Abdelmessih, E.A. Fink, D.T. Auguste // Adv Drug Deliv Rev. – 2021. – №. 176. – P. 113851.

91. Liposome drugs' loading efficiency: a working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties / D. Zucker, D. Marcus, Y. Barenholz, A. Goldblum // J Control Release. – 2009. – Vol. 139. − №. 1. – P. 73–80.

92. Liposome: classification, preparation, and applications / A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran [et al.] // Nanoscale Res Lett. –2013. – Vol. 8. – №. 1. – P. 102.

93. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process / S. Shah, V. Dhawan, R. Holm [et al.] // Adv Drug Deliv Rev. – 2020. − №. 154–155. – P. 102–22.

94. Liu, Y. Mixed Liposome Approach for Ratiometric and Sequential Delivery of Paclitaxel and Gemcitabine / Y. Liu, H. Tamam, Y. Yeo // AAPS PharmSciTech. – 2018. – Vol. 19. – №. 2. – P. 693–9.

95. Lombardo, D. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application / D. Lombardo, M.A. Kiselev // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14. – №. 3. – P. 543.

96. Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging / S. Franzé, F. Selmin, E. Samaritani [et al.] // Pharmaceutics. – 2018. – Vol. 10. – №. 3. – P. 139.

97. Maquille, A. Radiosterilization of drugs in aqueous solutions may be achieved by the use of radioprotective excipients / A. Maquille, J.L. Jiwan, B. Tilquin // Int J Pharm. – 2008. – Vol. 349. – №. 1–2. – P. 74–82.

98. Metronomic chemotherapy in cancer treatment: new wine in an old bottle / H.L. Wu, H.X. Zhou, L.M. Chen, S.S. Wang // Theranostics. – 2024. – Vol. 14. − №. 9. – P. 3548–64.

99. Mondal, S. Liposome-Mediated Anti-Viral Drug Delivery Across Blood-Brain Barrier: Can Lipid Droplet Target Be Game Changers? / S. Mondal, S. Ghosh // Cell Mol Neurobiol. – 2023. – Vol. 44. – №. 1. – P. 9.

100. Moysan, E. Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: a review of several promising chemical modifications / E. Moysan, G. Bastiat, J.P. Benoit // Mol Pharm. – 2013. – Vol. 10. – №. 2. – P. 430–44.

101. Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy / G. Batist, J. Barton, P. Chaikin [et al.] // Expert Opin Pharmacother. – 2002. – Vol. 3. – №. 12. – P. 1739–51.

102. Nanomedicines: Redefining traditional medicine / W. Lu, J. Yao, X. Zhu, Y. Qi // Biomed Pharmacother. – 2021. – №. 134. – P. 111103.

103. NIR-responsive CN-Pt-GEM hydrogel induces necroptosis and immunotherapeutic responses prevent postoperative recurrence and wound infection in lung carcinoma / M. Wang, R. Cai, Z. Zhang [et al.] // J Nanobiotechnology. – 2024. – Vol. 22. − №. 1. – P. 355.

104. Noble, S. Gemcitabine. A review of its pharmacology and clinical potential in non-small cell lung cancer and pancreatic cancer / S. Noble, K.L. Goa // Drugs. – 1997. – Vol. 54. – P. 447–472.

105. Oun, R. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists / R. Oun, Y.E. Moussa, N.J. Wheate // Dalton Trans. – 2018. – Vol. 47. – №. 19. – P. 6645–53.

106. Patel, S. In vivo site-directed radiotracers: a mini-review / S. Patel, R. Gibson // Nuclear Medicine and Biology. – 2008. – Vol. 35. – №. 8. – P. 805–815.

107. Pattni, B.S. New Developments in Liposomal Drug Delivery / B.S. Pattni, V.V. Chupin, V.P. Torchilin // Chem Rev. – 2015. – Vol. 115. – №. 19. – P. 10938–66.

108. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective / J. Ciccolini, C. Serdjebi, G.J. Peters, E. Giovannetti // Cancer Chemother Pharmacol. – 2016. – Vol. 78. – №. 1. – P. 1–12.

109. Phase III trial of gemcitabine compared with pegylated liposomal doxorubicin in progressive or recurrent ovarian cancer / G. Ferrandina, M. Ludovisi, D. Lorusso [et al.] // J Clin Oncol. – 2008. – Vol. 26. – №. 6. – P. 890–6.

110. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes / P. Panwar, B. Pandey, P.C. Lakhera, K.P. Singh // Int J Nanomedicine. – 2010. – №. 5. – P. 101-8.

111. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs / M.L. Immordino, P. Brusa, F. Rocco [et al.] // J. Control. Release. – 2004. – Vol. 100. – №. 3. – P. 331–346.

112. Randomized phase III trial of 2nd line gemcitabine and paclitaxel chemotherapy in patients with advanced bladder cancer: short-term versus prolonged treatment [German Association of Urological Oncology (AUO) trial AB 20/99] / P. Albers, S.I. Park, G. Niegisch [et al.] // Ann Oncol. – 2011. –Vol. 22. – №. 2. – P. 288–94.

113. Randomized phase III trial of gemcitabine compared with pegylated liposomal doxorubicin in patients with platinum-resistant ovarian cancer / D.G. Mutch, M. Orlando, T. Goss [et al.] // J Clin Oncol. – 2007. – Vol. 25. – №. 19. – P. 2811–8.

114. Role of Cholesterol in Modifying the Physical and Stability Properties of Liposomes and In Vitro Release of VitaminB12 / N. Pavlovic, J. Mijalković, B. Balanč [et al.] // Eng. Proc. – 2025. – Vol. 99. – №. 1. – P. 10.

115. Role of gemcitabine in cancer therapy / L. Toschi, G. Finocchiaro, S. Bartolini [et al.] // Future Oncol. – 2005. – Vol. 1. − №. 1. – P. 7−17.

116. Sabat, C. Gemcitabine and nab-paclitaxel induced interstitial pneumonia / C. Sabat, C. Ginestet, G. Chassagnon // Diagn Interv Imaging. – 2021. – Vol. 102. − №. 12. – P. 763–4.

117. Sandler, A. Gemcitabine: single-agent and combination therapy in non-small cell lung cancer / A. Sandler, D.S. Ettinger // Oncologist. – 1999. – Vol. 4. − №. 3. – P. 241–51.

118. Second-line single-agent versus doublet chemotherapy as salvage therapy for metastatic urothelial cancer: a systematic review and meta-analysis / D. Raggi, R. Miceli, G. Sonpavde [et al.] // Ann Oncol. – 2016. – Vol. 27. − №. 1. – P. 49−61.

119. Shakeel, F. Recent Advances in Liposomal Drug Delivery System for Drug Targeting / F. Shakeel // Curr Drug Deliv. – 2020. – Vol. 17. − №. 10. – P. 824−825.

120. Shin, D.H. Herceptin-conjugated temperature-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine for breast cancer / D.H. Shin, M.J. Koo, J.S. Kim // Arch Pharm Res. – 2016. – Vol. 39. − №. 3. – P. 350–8.

121. Smart thermosensitive liposomes for effective solid tumor therapy and in vivo imaging / K. Affram, O. Udofot, M. Singh [et al.] // PLoS One. –2017. –Vol. 12. – №. 9. –e0185116.

122. Stathopoulos, G.P. Lipoplatin formulation review article / G.P. Stathopoulos, T. Boulikas // J Drug Deliv. – 2012. − №. 2012. – P. 581363.

123. Survival rates and tolerability of platinum-based chemotherapy regimens for elderly patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) / G.J. Costa, A.L. Fernandes, J.R. Pereira [et al.] // Lung Cancer. – 2006. –Vol. 53. – №. 2. – P. 171–6.

124. Szoka, F. Jr. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation / F. Szoka Jr., D. Papahadjopoulos // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1978. – Vol. 75. − №. 9. – P. 4194−8.

125. Tailoring the multi-functional properties of phospholipids for simple to complex self-assemblies / T. Waghule, R.N. Saha, A. Alexander, G. Singhvi // J Control Release. – 2022. − №. 349. – P. 460–74.

126. The association of four genetic variants with myelosuppression in gemcitabine-treated Japanese is not evident in gemcitabine/carboplatin-treated Swedes / N. Björn, I. Jakobsen, C. Udagawa [et al.] // Basic Clin Pharmacol Toxicol. – 2022. – Vol. 130. – №. 4. – P. 513–21.

127. The EPR effect and beyond: Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy / Y. Shi, R. van der Meel, X. Chen, T. Lammers // Theranostics. – 2020. – Vol. 10. − №. 17. – P. 7921–4.

128. The Role of Cryoprotective Agents in Liposome Stabilization and Preservation / G.F. Boafo, K.T. Magar, M.D. Ekpo [et al.] // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23. – №. 20. – P. 12487.

129. Thermal decomposition mechanism and kinetics of gemcitabine / Y. Yang, J. Gao, Y. Zhang [et al.] // Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. – 2018. – Vol. 133. – P. 75–82.

130. Thermosensitive Liposomes for Gemcitabine Delivery to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / C.B. Aparicio-Lopez, S. Timmerman, G. Lorino [et al.] // Cancers (Basel). – 2024. – Vol. 16. – №. 17. – P. 3048.

131. Torchilin, V. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers / V. Torchilin // Nat. Rev. Drug Discov. – 2005. – Vol. 4. − №. 2. – P. 145−160.

132. Tumor-specific delivery of gemcitabine with activatable liposomes / S.T. Tucci, A. Kheirolomoom, E.S. Ingham [et al.] // J Control Release. – 2019. − №. 309. – P. 277–88.

133. Unlocking the power of immunotherapy: Combinatorial delivery of plasmid IL-15 and gemcitabine to synergistically remodeling the tumor microenvironment / J. Liu, Y. Han, M. Zhao [et al.] // Int J Pharm. – 2024. – №. 655. – P. 124027.

134. Wagner, A. Liposome technology for Industrial Purposes / A. Wagner, K. Vorauer-Uhl // Journal of Drug Delivery. – 2011. – Vol. 2011. – P. 591325.

135. Wei, M.Y. Gemcitabine for the treatment of patients with osteosarcoma / M.Y. Wei, Y.F. Zhuang, W.M. Wang // Asian Pac J Cancer Prev. – 2014. – Vol. 15. − №. 17. – P. 7159–62.

136. Yousfan, A. Encapsulation of paclitaxel into date palm lipid droplets for enhanced brain cancer therapy / A. Yousfan, N. Moursel, A. Hanano // Sci Rep. – 2024. – Vol. 14. − №. 1. – P. 32057.

137. Zhang, J. A Systematic Degradation Kinetics Study of Gemcitabine: PhD in Pharmaceutical Chemistry / J. Zhang – University of Kansas, 2006. – 168 p.

138. Zheng, H. Gemcitabine in treating patients with refractory or relapsed multiple myeloma / H. Zheng, F. Yang // Asian Pac J Cancer Prev. – 2014. – Vol. 15. − №. 21. – P. 9291–3.

Приложение А. СПЕЦИФИКАЦИЯ

Таблица А.1 – Спецификация на «Гемцитабин липосомальный лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 5 мг» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМА
Описание	Визуальный	Сухая пористая масса белого цвета, без признаков слеживания
Регидратируемость	Визуальный	При добавлении к содержимому флакона 1,7 мл воды для инъекций и перемешивании в течение 10 мин должна образовываться однородная дисперсия белого цвета без осадка и видимых агрегатов
Подлинность	Спектрофотометрия	В электронном спектре поглощения спиртового раствора препарата в диапазоне 200-350 нм должны наблюдаться максимумы при 240±2 нм и 268±2 нм
Количественное определение гемцитабина	Спектрофотометрия при 268±2 нм	От 4,5 до 5,5 мг/флакон
Однородность массы	По ГФ XV / ФЕАЭС	Масса содержимого флакона от 0,25 до 0,30 г; отклонение от средней массы - в соответствии с требованиями ГФ XV / ФЕАЭС
Размер липосом	Метод динамического светорассеяния (DLS)	Не более 200 нм
pH восстановленной дисперсии	Потенцио-метрически	От 6,8 до 7,2
Потеря в массе при высушивании	ОФС «Потеря в массе при высушивании»	Не более 3,0%
Упаковка	В соответствии с НД	По 5 мг ЛС во флаконах вместимостью 10 мл, укупоренных резиновыми пробками и обжатых алюминиевыми колпачками
Маркировка	В соответствии с НД	В соответствии с требованиями НД
Хранение	В соответствии с НД	-(18±2) °C
Срок годности	По данным исследования стабильности	6 месяцев; исследования по уточнению срока годности продолжаются