

**Бу Лугэнь**

**Разработка лекарственной формы противоопухолевого препарата на основе гликозидного производного индолокарбазола**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

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

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук, профессор

**Краснюк Иван Иванович**

**Официальные оппоненты:**

**Алексеев Константин Викторович**, доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», лаборатория готовых лекарственных форм, главный научный сотрудник

**Сулина Светлана Николаевна**, доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра общей фармацевтической и биомедицинской технологии, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Защита диссертации состоится «18» мая 2022 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2022 г.

И.о. Ученого секретаря  
диссертационного совета ДСУ 208.002.01  
доктор фармацевтических наук, профессор

  
Селиванова Ирина Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Рак – вторая по значимости причина смертности во всем мире. Страны с низким и средним уровнем дохода являются очагом смертности от злокачественных новообразований – на их долю приходится примерно 70% смертей. Рак возникает в результате измененной физиологии клетки, приводящей к самодостаточному потенциалу роста, потере контроля клеточного цикла, расширенному ангиогенезу, задержке репликативного старения, нерегулируемому апоптозу, инвазии и метастазированию. В настоящее время базовым методом лечения злокачественных опухолей является химиотерапия. Следовательно, создание новых противоопухолевых препаратов, действие которых направлено на избирательное разрушение опухолевой ткани, представляет актуальную задачу современной науки по всему миру. Традиционно открытие и разработка лекарственных препаратов от рака включает идентификацию и оптимизацию основных соединений с последующими доклиническими и клиническими исследованиями с целью всестороннего тестирования и характеристики их фармакологических свойств, противоопухолевых эффектов и токсичности. В ходе клинических исследований производных индолакарбазола был определен перечень потенциальных показаний к их применению, в том числе и в сочетании с традиционными препаратами. Высокой противоопухолевой активностью, обусловленной способностью ингибировать фермент топоизомеразу I и/или II обладают соединения, в состав которых входят такие компоненты, как индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазольный хромофор с одной N-гликозидной связью, в частности, ребеккамицин и его аналоги.

В результате биологических исследований в рамках скрининга новых гликозидных производных индолакарбазола, синтезированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, для дальнейшего углубленного изучения отобрано соединение ЛХС-1269, которое показало высокую противоопухолевую активность на моделях асцитных (Эрлиха, лимфолейкозе P388) и солидных (меланоме B16, эпидермоидной карциноме легкого Льюис, аденокарциноме молочной железы Ca755, раке шейки матки и раке толстого кишечника АКАТОЛ) опухолей. Отличительной особенностью механизма действия ЛХС-1269 является способность блокировать васкулогенную мимикрию, то есть оказывать антиангиогенное действие. Исследуемая субстанция ЛХС-1269 практически нерастворима в воде и большинстве органических растворителей, что является существенной проблемой для разработки ее инъекционной лекарственной формы (ЛФ). В связи с этим для улучшения биологической и фармацевтической доступности данного ГПИ предложено использование современного технологического подхода – включение гидрофобной субстанции в липидные наночастицы – липосомы.

### Степень разработанности темы исследования

В лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработан метод синтеза гликозидов производных бисиндола и родственных им карбазолов. При помощи данного метода был получен ряд гидрофобных производных индолокарбазола с различными углеводными остатками, два из которых – ЛХС-1208 и ЛХС-1269 показали наибольшую противоопухолевую активность и были отобраны для дальнейших исследований. В соответствии с планом научно-исследовательских работ по теме «Разработка лекарственных форм противоопухолевых препаратов с организацией лабораторного производства» (2014–2018 гг., Гос. рег. 012013713444) и в рамках государственного контракта №13411.1008799.13.20 от 24.06.13 г. «Доклинические исследования инновационного лекарственного средства на основе производного индолокарбазола для лечения онкологических заболеваний» в лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проводились исследования по созданию инъекционной лиофилизированной ЛФ (ИЛФ-лио) ЛХС-1208 и ее доклиническому изучению (патент РФ №2572691 «Противоопухолевое средство»). В качестве солюбилизаторов гидрофобной субстанции ЛХС-1208 в состав ИЛФ-лио включены такие вспомогательные вещества как органический растворитель диметилсульфоксид (ДМСО) и низкомолекулярный поливинилпирролидон Коллидон 17 PF. В качестве альтернативы ИЛФ-лио была разработана наноструктурированная лекарственная форма ЛХС-1208 на основе биосовместимой системы доставки лекарственного вещества (ЛВ) – липосом. В настоящее время проводятся исследования по созданию рациональной ЛФ второго из указанных ГПИ – ЛХС-1269.

**Целью исследования** являлась разработка липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ) ЛХС-1269 для инъекционного введения.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. На основании технологических и химико-фармацевтических исследований установить оптимальный состав стерически стабилизированной инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269.
2. Разработать технологию получения устойчивой при хранении ЛЛФ ЛХС-1269 для инъекционного введения.
3. Разработать методики качественного и количественного анализа для контроля качества инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269.
4. Выбрать показатели качества для стандартизации инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269 и изучить показатели ее стабильности в процессе хранения.
5. Подготовить проект нормативной документации на разработанную ЛЛФ ЛХС-1269.

### **Научная новизна работы**

В результате проведенных исследований впервые создана инъекционная ЛЛФ оригинального отечественного противоопухолевого препарата на основе ГПИ ЛХС-1269. Разработан оптимальный состав и способ получения инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269, которые имеют ряд особенностей, обусловленных наличием гидрофобных свойств у объекта исследования.

### **Теоретическая значимость работы**

Теоретическая значимость данной диссертационной работы заключается в обосновании выбора оптимального состава и способа получения стерически стабилизированной инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269, представляющего собой гидрофобное соединение. Доказано и экспериментально обосновано применение технологии лиофилизации для повышения стабильности при хранении ЛЛФ ЛХС-1269 для инъекционного введения. Приведенный в работе экспериментальный материал может служить теоретической базой для разработки ЛЛФ для инъекционного введения гидрофобных соединений.

### **Практическая значимость исследования**

В ходе реализации задач исследования создана лиофилизированная ЛЛФ (ЛЛЛФ) гидрофобного производного индокарбазола ЛХС-1269, рекомендованная для дальнейших доклинических исследований. На основании выбранных показателей качества проведена стандартизация и составлен проект нормативной документации ЛФ «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг». Результаты диссертационного исследования внедрены в деятельность лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

### **Методология и методы исследования**

Методологическую основу диссертационной работы составили научные труды отечественных и зарубежных авторов в области фармацевтической технологии, в частности, в вопросах разработки липосомальных форм лекарственных средств. В процессе исследования использованы: 1. фармакотехнологические методы: получение липосом, лиофилизация, стерилизующая фильтрация; 2. комплекс методов химико-фармацевтического анализа: лазерная спектроскопия рассеяния, определение электрофоретической подвижности частиц, потенциометрия, вискозиметрия, хроматография в тонком слое сорбента, спектроскопия в УФ и видимой области; 3. математические методы анализа и обработки результатов экспериментальной работы.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Результаты исследований по разработке состава и технологии получения стабильной при хранении инъекционной ЛЛФ ЛХС-1269.

2. Методики качественного и количественного анализа ЛЛФ ЛХС-1269 и ее лиофилизата.
3. Показатели качества для стандартизации ЛЛЛФ ЛХС-1269 и результаты изучения ее стабильности в процессе хранения.

### **Достоверность результатов научных положений и выводов**

При проведении экспериментальных исследований использовано современное специализированное оборудование, имеющее действительные свидетельства о поверке. Посредством методов статистической обработки установлена точность и достоверность результатов проведенных исследований. Научные положения и выводы диссертационной работы, выносимые на защиту, логичны и обоснованы.

### **Апробация диссертационного исследования**

Результаты проведенных исследований представлены на научных мероприятиях международного и всероссийского уровня: на 4-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием МедХим-Россия 2019 (10–14 июня 2019 г., Екатеринбург, Россия), XXVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (6–9 апреля 2020 г., Москва, Россия); VII международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации», организованный советом по науке при Фонде Нурсултана Назарбаева и Южно-Казахстанской медицинской академией (10–11 декабря 2020 г., Шымкент, Казахстан); III Международном симпозиуме «Innovations in Life Sciences» (27–28 мая 2021 г., Белгород, Россия). Апробация диссертационного исследования состоялась на кафедре фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 6 декабря 2021 г.

### **Личный вклад автора**

Вклад автора данного диссертационного исследования заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования и является определяющим. В частности, автором осуществлен выбор направления исследований, определены его цель и задачи с их последующей экспериментально-теоретической реализацией, вплоть до обсуждения их репрезентации в профильной научной литературе, а также внедрения в практику. Автору также принадлежит ведущая роль в реализации технологических и химико-фармацевтических экспериментальных исследований по разработке состава, технологии получения и методик анализа для контроля качества, аналитической и статистической обработке полученных результатов.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты исследований по разработке технологии получения и методик анализа ЛЛФ ЛХС-1269 успешно внедрены в работу лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ

«НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

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

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенных исследований соответствуют пунктам 3 и 4 паспорта специальности.

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

Данное диссертационное исследование выполнено в соответствии с тематикой и планом научных исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), комплексная тема: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования». Номер государственной регистрации 01.2.011.68237.

### **Публикации**

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

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа представлена на 138 листах машинописного текста, содержащем 25 таблиц и 33 рисунков. Структура диссертации включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, две главы собственных экспериментальных исследований, общие выводы и список литературы, приложения. Список литературы состоит из 161 источника, в том числе 71 – на иностранных языках.

## **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **Материалы и методы исследований**

Объектом исследований являлась субстанция оригинального производного индоло[2,3-а]карбазола – ЛХС-1269, представляющего собой индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионон-п-{12-(β-d-ксилопиранозил)-5,7-диоксо-индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-6-ил} пиридин -2-карбоксамид.

При проведении исследований по созданию ЛЛФ ЛХС-1269 использовали субстанции, вспомогательные вещества и реактивы, соответствующие требованиям нормативной документации (ГОСТы, ТУ, фармакопейные статьи ГФ XIV издания, Ph Eur 10.0, USP33-NF28).

### **Получение дисперсии многослойных липосом (МСЛ) ЛХС-1269**

Липосомы ЛХС-1269 получали методом гидратации липидной пленки в модификации

для гидрофобных субстанций. Отвешивали яичный фосфатидилхолин EPCS (ФХ, Lipoid, Германия), холестерин (Sigma-AldrichCo., Япония) и полиэтиленгликоль-2000-дистеароифосфатидилэтанолламин (ПЭГ-ДФФА; Lipoid, Германия) и растворяли в хлороформе. К навеске ЛХС-1269 добавляли ацетон и обрабатывали в УЗ-ванне *Transsonic T310* (Elma, Германия) в течение 10–15 мин для ускорения процесса растворения. Полученные растворы компонентов ЛФ смешивали и количественно переносили в круглодонную колбу. Далее органический растворитель отгоняли на роторном испарителе *HeidolphHei-VAPAdvantage* (Heidolph, Германия) при температуре водяной бани  $37 \pm 1$  °С при пониженном давлении до получения однородной полупрозрачной липидной пленки. После формирования липидной пленки ее досушивали при давлении <150 мбар до полного удаления остатков органического растворителя. Затем пленку гидратировали водой для инъекций с получением дисперсии МСЛ ЛХС-1269.

### **Получение дисперсии однослойных липосом (ОСЛ) ЛХС-1269**

Для получения ОСЛ ЛХС-1269 использовали методы экструзии и гомогенизации. Предварительно дисперсию МСЛ фильтровали под давлением через нейлоновые мембраны с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм для освобождения от возможных механических включений.

Экструзия. Липосомальную дисперсию пропускали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2–0,22 мкм: поликарбонатные (Whatman, Великобритания), нейлоновые «*Pall*» (ООО Палл Евразия, Россия), полиэфирсульфоновые «*ExpressPlus*<sup>®</sup>», поливинилденфторидовые и целлюлозные (Merck Millipore Ltd, Ирландия), на экструдере *Lipex*<sup>TM</sup> (NorthernLipidsInc., Канада) под давлением 0,9–1,0 МПа.

Гомогенизация. Липосомальную дисперсию в объеме 60 мл измельчали на гомогенизаторе высокого давления *MicrofluidiserM-110S* (Microfluidics, США) под давлением 40 psig (280 кПа) в течение 1–5 мин.

### **Лиофилизация липосом ЛХС-1269**

Стерильную дисперсию ОСЛ дозировали во флаконы по 6 мл и лиофилизировали в камере сублимационной сушки «*EdwardsMinifastDO.2*» (EroElectronicS.p. A., Италия).

### **Методы контроля качества ЛЛФ ЛХС-1269 и ее лиофилизата**

**Качественный анализ компонентов ЛЛФ ЛХС-1269.** Для установления подлинности компонентов препарата использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием хроматографических пластинок «*Sorbfil*» ПТСХ-АФ-А размером 10×15 см.

**Количественное определение ЛХС-1269 в ЛЛФ** проводили методом спектрофотометрии в УФ- и видимой области (ГФ XIV ОФС.1.2.1.1.0003.15) с использованием рабочего стандартного



образца (СО) при длине волны ( $317 \pm 3$  нм) на спектрофотометре *Cary 100* (Agilent Technologies, Австралия). Оптическую плотность анализируемого образца измеряли с использованием в качестве раствора сравнения этиловый спирт 95 %.

**Определение эффективности включения ЛХС-1269 в липосомы.** Поскольку ЛХС-1269 является гидрофобным веществом и непосредственно включается в липидный бислой при получении липосомы, количество включенного препарата (КВП) определяли как отношение концентрации препарата в липосомальной дисперсии после фильтрации с использованием мембраны с диаметром пор 0,22 мкм к концентрации ЛХС-1269 в дисперсии, полученной после гидратации липидной пленки. Показатель выражали в %.

**Анализ размера, значения дзета ( $\zeta$ )-потенциала и индекса полидисперсности (PDI) липосом ЛХС-1269.** Метод лазерной дифракции света, используемый для определения распределения частиц по размеру и PDI, основан на анализе профиля рассеяния света, возникающего при освещении частицы коллимированным лазерным лучом.  $\zeta$ -потенциал определяли путем измерения электрофоретической подвижности везикул. Для измерения показателей применяли анализаторы *Nicomp 380 Submicron Particle Sizer* (Particle Sizing Systems, США) и *дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600* (Malvern, Великобритания).

**Определение значения pH липосомального ЛХС-1269** проводили потенциометрически с использованием pH-метра *HANNAHI 2211* (Hanna Instruments, Румыния) в интервале температур 20–25 °С. Предварительно измеряли значение pH воды для инъекций.

**Определение динамической вязкости липосомальной дисперсии ЛХС-1269.** Значение динамической вязкости образцов липосомальной дисперсии ЛХС-1269, полученной после гидратации липидной пленки или регидратации лиофилизата, определяли с использованием вибрационного вискозиметра *VibroViscometer SV-10* (A&D Company Limited, Япония). Все измерения проводили в интервале температур от 21 до 25 °С.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Выбор растворителей для применения в технологии получения ЛЛФ ЛХС-1269

Растворимость – это одно из важнейших свойств фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, определяющее выбор технологических подходов при разработке ЛФ. Поэтому на первоначальном этапе исследования оценивали растворимость ЛХС-1269 и липидов в различных органических растворителях, применяемых в фармацевтической технологии, в частности при получении липосомальных препаратов. Степень растворения веществ определяли согласно обозначению растворимости фармацевтических субстанций и

вспомогательных веществ по ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость».

Согласно результатам исследования, представленным в таблице 1, субстанция ЛХС-1269 среди летучих растворителей наиболее растворима в ацетоне и бензоле. Поскольку ацетон менее токсичен, чем бензол, и имеет меньшую температуру кипения, данный растворитель выбран для растворения ЛХС-1269 на стадии получения липидной пленки. Хлороформ является наиболее оптимальным растворителем для приготовления органического раствора липидных компонентов. Для пробоподготовки образцов при проведении контроля качества ЛФ выбраны ДМСО и этанол.

Таблица 1–Растворимость действующего вещества(ДВ) и липидных компонентов ЛЛФ ЛХС-1269 в органических растворителях

Органический растворитель	Т кипения, °С	Класс токсичности растворителя	Растворимость ЛХС-1269	Растворимость		
				ФХ	холестерин	ПЭГ-ДГФА
Ацетон	56,1	3	Мало растворим	Практически нерастворим	Мало растворим	Практически нерастворим
Бензол	80,1	1	Мало растворим	Растворим	Растворим	Легкорастворим
Хлороформ	61,2	2	Практически не растворим	Легко растворим	Легко растворим	Растворим
Этанол	78,4	3	Очень мало растворим	Легко растворим	Очень мало растворим	Легко растворим
ДМСО	189	3	Легко растворим	Практически не растворим	Практически не растворим	Растворим

### Разработка состава ЛЛФ ЛХС-1269

В ходе исследования было получено и проанализировано 7 экспериментальных моделей состава липосомального ЛХС-1269 с различными молярными соотношениями компонентов (таблица 2). Полученные образцы липосомальной дисперсии оценивали по критическим показателям – КВП, вязкость дисперсии, размеры, ζ-потенциал и PDI липосом.

Таблица 2–Модельные составы липосомальной ЛФ ЛХС-1269

Состав	Молярное соотношение		Общая концентрация липидов в дисперсии, мг/мл	Размер ОСЛ, нм	PDI	ζ-потенциал липосом, мВ
	ЛХС-1269/ФХ	ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА				
1	1:150	1:0,1:0,003	64,2	208±12	0,297±0,021	-(25,0±1,5)
2		1:0,2:0,003	67,2	191±9	0,206±0,012	-(27,0±2,4)
3		1:0,33:0,003	71,2	192±14	0,283±0,015	-(26,0±1,8)
4	1:160	1:0,2:0,003	71,6	197±12	0,239±0,024	-(24,3±2,1)
5		1:0,2:0,004	71,8	236±15	0,105±0,013	-(27,9±1,8)
6		1:0,33:0,003	75,8	190±11	0,172±0,016	-(33,0±2,5)
7	1:170	1:0,2:0,003	76,0	190±10	0,185±0,019	-(28,1±2,2)

Поскольку исследуемое ЛВ является гидрофобным веществом, эффективность его включения в липосомальный бислой определяется, в первую очередь, концентрацией фосфолипида, который связывает активное соединение и удерживает внутри липосомы, то есть соотношением ЛХС-1269/ФХ. Так, при снижении отношения ЛВ к фосфолипиду от 1:150 до

1:170 в составах 2, 4 и 7, соответственно, отмечалось зависимое повышение уровня включения ЛХС-1269 – от 93,5 до 97,0% (рисунок 1). Однако из представленных результатов также видно, что на эффективность инкапсуляции гидрофобного вещества в липосомы значительно влияет количественное соотношение липидных компонентов бислоя – ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА.

Установлено, что вязкость дисперсии ЛХС-1269 коррелирует с общей концентрацией липосомальных липидов, и ее значения находятся в пределах от 7,0 до 13,6 мПа·с (рисунок 1). Согласно данным таблицы 2, независимо от соотношения ЛХС-1269/ФХ и липидов в липосомальной мембране средний диаметр практически всех модельных липосом кроме состава 5 не превышает заявленный размер везикул 220 нм, а значения PDI составляют менее 0,3. По исследуемым составам липосомы ЛХС-1269 имеют высокий отрицательный заряд, причем наибольшее значение  $\zeta$ -потенциала отмечено для 6-й композиции -33,0 мВ.

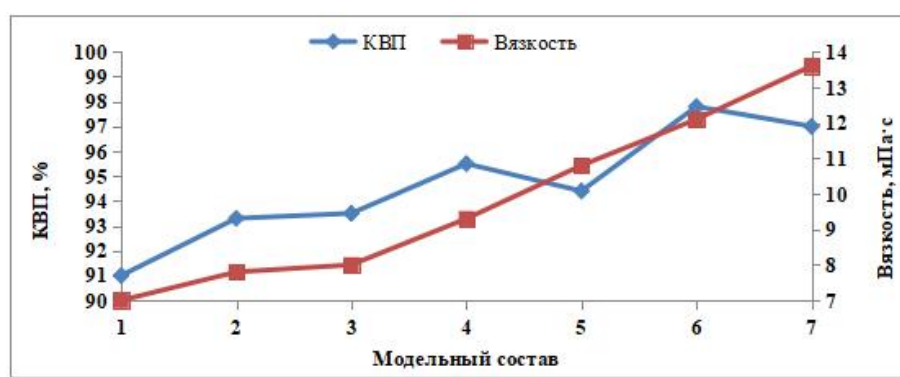


Рисунок 1 –Уровень включения ЛХС-1269 в липосомы и вязкость липосомальной дисперсии при приготовлении с использованием модельных составов

Таким образом, в результате обобщения полученных данных из исследуемых составов выбрана композиция 6 с молярным соотношением ЛХС-1269/ФХ=1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА=1:0,33:0,003, которая обеспечивает включение ЛХС-1269 на уровне 98% и приемлемые физико-химические характеристики.

### Разработка технологии получения ЛЛЛФ ЛХС-1269

Технологический процесс получения липосом с гидрофобным веществом по методу Бенгхема включает следующие основные стадии:

- получение липидной пленки из органического раствора компонентов ЛЛФ;
- формирование МСЛ посредством гидратации пленки;
- получение дисперсии ОСЛ приемлемого размера;
- лиофилизация стерильной дисперсии ОСЛ.

#### 1. Особенности получения МСЛ ЛХС-1269

С учетом растворимости компонентов ЛЛФ получают растворы ЛХС-1269 и липидов, смешивают и переливают в круглодонную колбу. На роторном испарителе в условиях

пониженного давления органические растворители отгоняют с образованием равномерной пленки на внутренних стенах колбы. Поскольку ацетон и хлороформ являются токсичными растворителями необходимо добиться их полного удаления из липидной пленки в процессе получения липосом. Для этого пленку «досушивают» при давлении <150 мбар до постоянной массы содержимого колбы. После получения и сушки липидную пленку гидратируют с получением дисперсии МСЛ ЛХС-1269. Для установления оптимальных условий гидратации липидной пленки сравнивали показатели качества МСЛ, получаемых при температуре 20, 30 и 37 °С и давлении 1000 и 150 мбар.

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что с повышением температуры воды для инъекций отмечается увеличение размера и  $\zeta$ -потенциала (по модулю) липосом и вязкости дисперсии, а при температуре выше 30 °С – снижение уровня включения ДВ в бислой. Однако образование более крупных МСЛ не является ограничивающим фактором для гидратации пленки при температуре, отличной от 20 °С.

Таблица 3 – Зависимость показателей дисперсии МСЛ ЛХС-1269 от температуры воды для инъекций

Т, °С		20±1	30±1	37±1
КВП, %		98,9±1,5	99,0±1,2	88,5±1,9
Вязкость, мПа·с		6,7±1,6	8,5±0,5	10,2±1,3
Размер, нм	МСЛ	219±18	661±25	652±21
	ОСЛ	195±10	190±14	191±11
$\zeta$ -потенциал, мВ	МСЛ	-(26,0±0,5)	-(32,3±0,3)	-(29,9±0,9)
	ОСЛ	-(29,7±1,7)	-(25,5±1,9)	-(22,8±0,8)
PDI	МСЛ	0,701±0,065	0,495±0,046	0,982±0,012
	ОСЛ	0,160±0,025	0,080±0,047	0,241±0,092

С учетом данных, представленных в таблице 4, гидратацию липидной пленки, содержащей ЛХС-1269, следует проводить в условиях атмосферного давления при температуре не выше 30 °С.

Таблица 4–Зависимость показателей дисперсии МСЛ ЛХС-1269 от уровня давления

Значение давления, мбар		1000	150
КВП, %		99,6±0,4	94,5±1,3
Вязкость, мПа·с		9,8±1,1	6,3±1,7
Размер, нм	МСЛ	379±20	523±23
	после экструзии	188±5	189±4
$\zeta$ -потенциал, мВ	МСЛ	-(25,4±1,2)	-(24,6±2,0)
	после экструзии	-(23,0±1,3)	-(24,9±0,7)
PDI	МСЛ	0,766±0,084	0,426±0,059
	после экструзии	0,195±0,024	0,176±0,025

## 2. Сравнение методов получения ОСЛ ЛХС-1269

Размер липосом является одним из жизненно важных факторов, который следует контролировать, особенно препараты предназначены для инъекционного применения. Для

контроля размера липосом доступны многочисленные процедуры, например, экструзия и гомогенизация. Поэтому целью данного этапа исследования являлась оценка возможности применения данных способов для уменьшения диаметра липосом ЛХС-1269 и выбор оптимальных условий процесса.

**Экструзия.** Дисперсию МСЛ пропускали по 7 раз через каждый из 5 типов мембран – нейлоновые (Н), полиэфирсульфоновые(ПЭС), поликарбонатные (ПК), на основе сложных эфиров целлюлозы(СЭЦ) и поливинилиденфторидовые (ПВДФ) с размером пор 0,2–0,22 мкм. Эффективность экструзии оценивали по КВП, размеру и  $\zeta$ -потенциалу везикул, PDI.

**Уровень включения** ЛХС-1269 в липосомы (рисунок 2). Незначительная сорбция ЛХС-1269 отмечена при пропускании липосомальной дисперсии через фильтры из поликарбоната и поливинилиденфторида – общие потери ЛВ составляют не более 4% от первоначального количества.

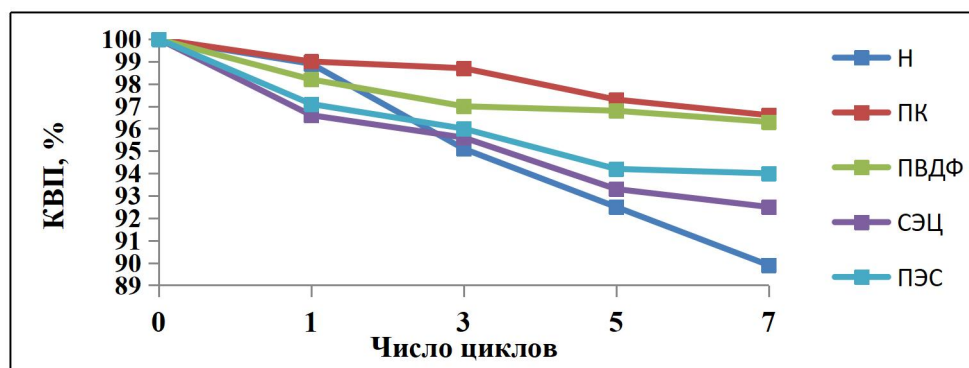
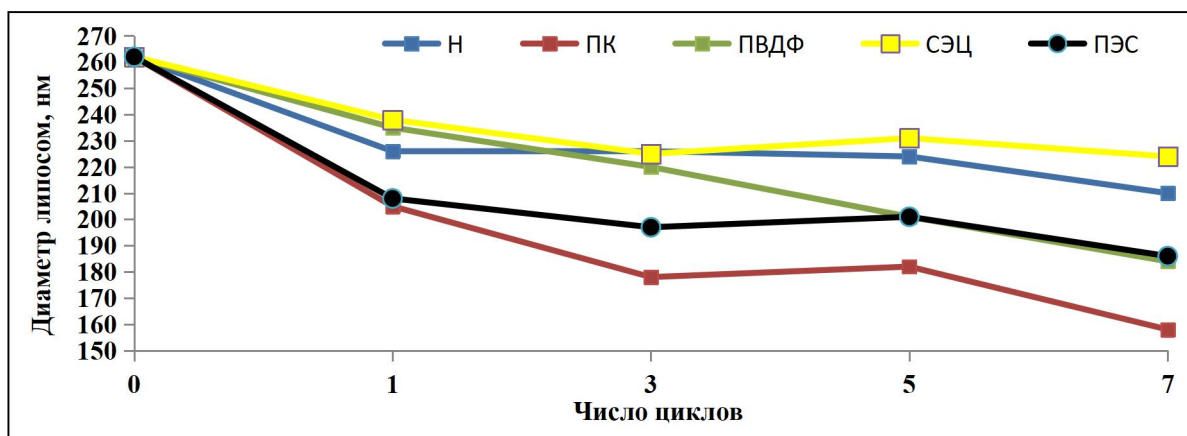
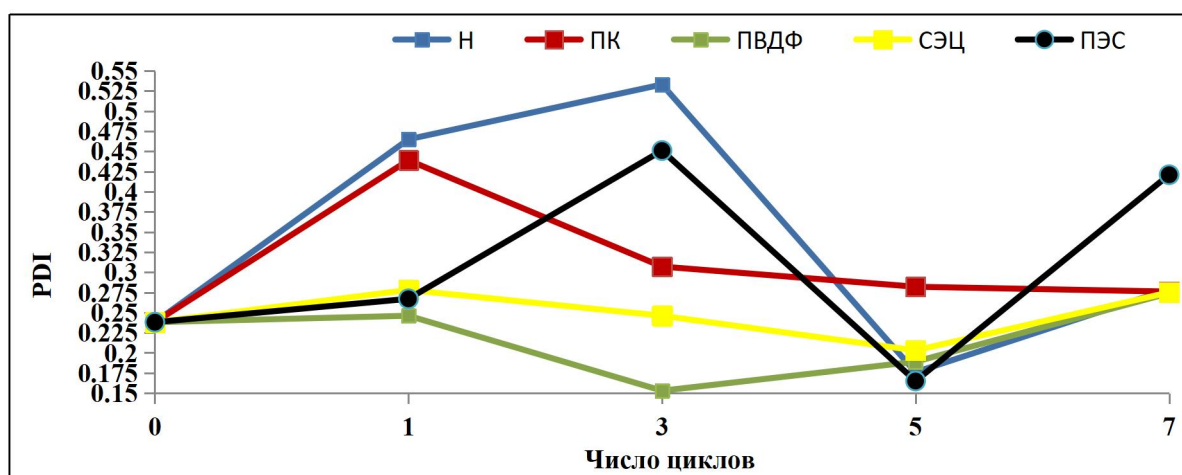


Рисунок 2 – Значения КВП при экструзии с использованием различных типов фильтров **Размер липосом.** Согласно данным диаграммы (рисунок 3а) из 5 типов фильтров наиболее эффективной оказалась мембрана из поликарбоната – за 7 циклов экструзии диаметр везикул уменьшается от 262 до 158 нм. При этом значения показателя практически не изменяются спустя сутки хранения при температуре +4 °С. **PDI** образцов дисперсии, полученных при экструзии с поликарбонатными фильтрами, постепенно снижалось от 0,439 при однократном пропускании до 0,276 после 7 циклов экструзии (рисунок 3б), при этом через сутки отмечалось уменьшение данных значений, что вероятно обусловлено стабилизацией липосом. Установлено, что  **$\zeta$ -потенциал** липосом ЛХС-1269 практически не зависит от материала применяемого фильтра и количества циклов экструзии (рисунок 3в). Значения поверхностного заряда везикул варьируется в диапазоне от -17 до -29 мВ.

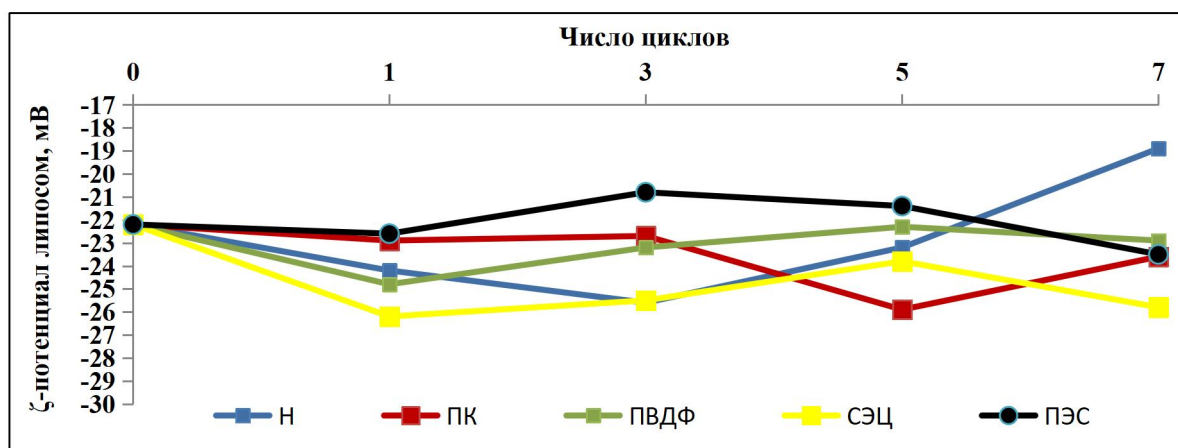
Обобщая данные по исследуемым показателям качества, можно сделать вывод, что экструзия с применением поликарбонатных фильтров способствует получению наиболее качественной липосомальной дисперсии, характеризующейся оптимальным размером везикул и высоким уровнем включения активной субстанции.



а



б



в

Рисунок 3 – Показатели качества липосомальной дисперсии ЛХС-1269:  
а – диаметр липосом, б – PDI, в –  $\zeta$ -потенциал

**Гомогенизация.** В отличие от экстразии, измельчение в условиях высокого давления в гомогенизаторах характеризуется более высокой производительностью. Контроль образцов получаемой дисперсии проводили путем сравнительного анализа среднего размера и  $\zeta$ -потенциала липосом и PDI сразу после гомогенизации и спустя сутки. Контрольным показателем приемлемости использования данного метода являлся уровень включения ЛВ. Как

показали результаты продолжительность цикла гомогенизации 60 мл дисперсии липосом исследуемого гликозидного производного составляет 20 сек. При этом с каждым циклом пропускания дисперсия нагревается в среднем на 2–3 °С. При оценке уровня включения ДВ было установлено, что количество ЛХС-1269 в липосомах значительно снижалось с каждым циклом гомогенизации. Так, через 1 мин гомогенизации дисперсии, в результате которой образуются липосомы оптимального размера, КВП исследуемого индолюкарбазола в везикулы составило 92,3% (рисунок 4).

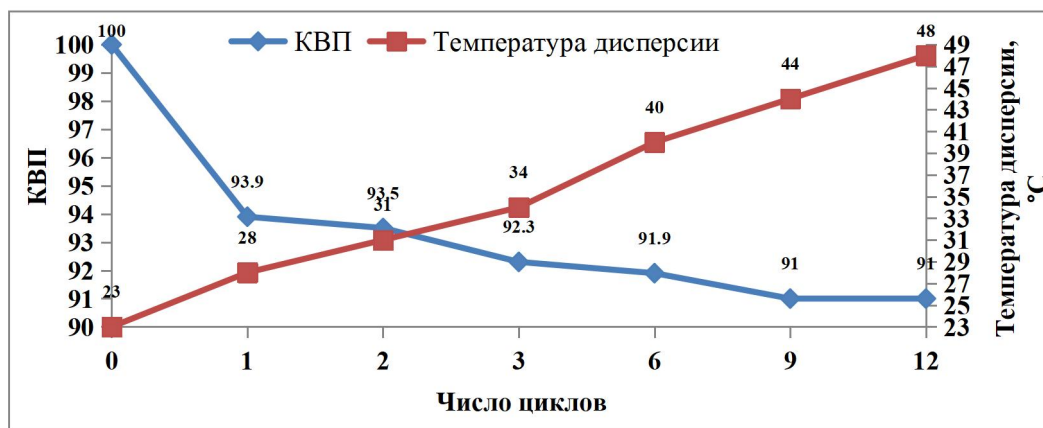


Рисунок 4 – Графики изменения уровня включения ЛХС-1269 в липосомы и температуры дисперсии при гомогенизации

В отличие от экструзии при гомогенизации липосомальной дисперсии ЛХС-1269 отмечалось образование не менее 2 фракций везикул (рисунок 5 а и б). При последующей циркуляции отмечалось постепенное снижение диаметра, при этом липосомы с требуемыми значениями показателя – менее 200 нм – были получены уже спустя 1 мин обработки. Размер липосом второй (меньшей) фракции везикул ЛХС-1269 на протяжении всего периода гомогенизации находился в диапазоне 22–58 нм. В то же время согласно графикам, представленным на рисунке 7 (в и г), время циркуляции напрямую не влияет на поверхностный заряд фосфолипидных везикул и дисперсность образца.

В результате сравнительного анализа полученных данных по двум вышеуказанным методам установлено, что 3-х-кратная экструзия под давлением с применением поликарбонатных фильтров является более щадящим методом получения ОСЛ ЛХС-1269. В связи с этим метод гомогенизации при дальнейших технологических исследованиях не использовали.



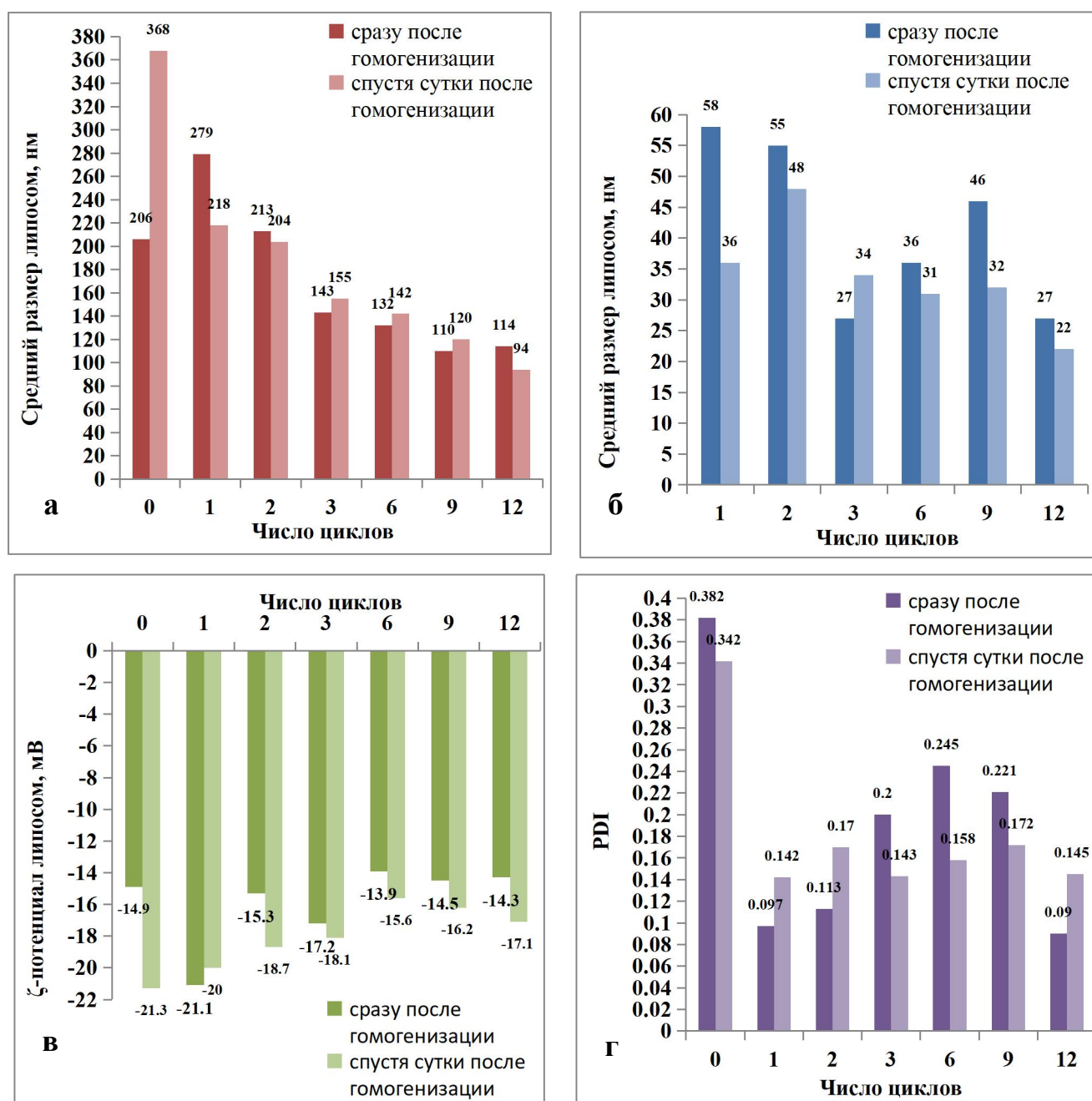


Рисунок 5 – Средний размер липосом сразу и спустя сутки после гомогенизации: а – 1-я фракция (преобладающая), б – 2-я фракция; в –  $\zeta$ -потенциал; г – PDI

### 3. Стабилизация ЛЛФ ЛХС-1269 посредством лиофилизации

Сублимационная сушка – один из наиболее часто используемых методов сушки и повышения стабильности некоторых фармацевтических продуктов, включая липосомы.

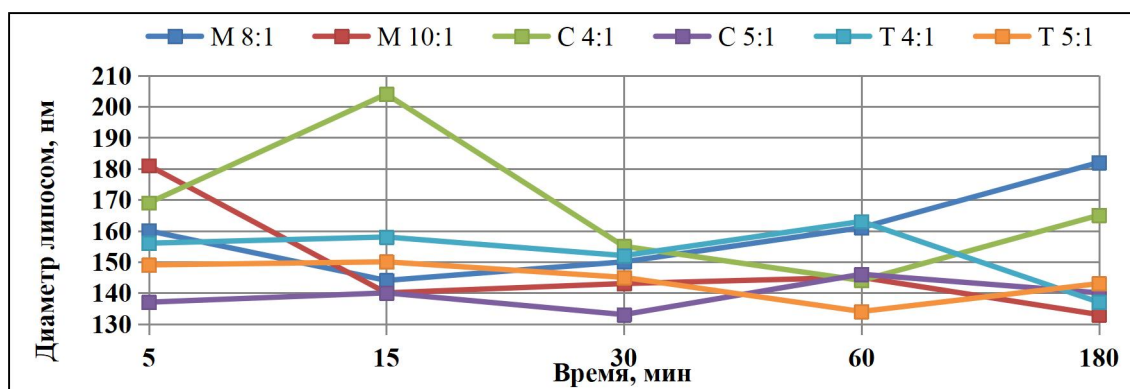
#### *Выбор криопротектора для получения лиофилизата ЛЛФ ЛХС-1269*

При проведении эксперимента по выбору оптимального криопротектора для получения лиофилизата липосом ЛХС-1269 исследовали 3 наиболее широко используемых углевода – маннозу, сахарозу и трегалозу. Маннозу вводили в липосомальную дисперсию ЛХС-1269 в молярных соотношениях криопротектор/ФХ 8:1 и 10:1, дисахара – 4:1 и 5:1. Сравнительную

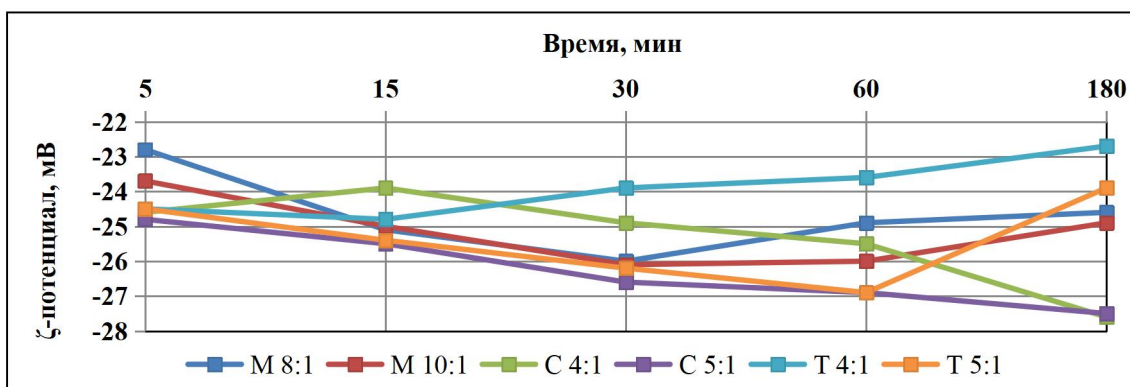


оценку качества полученных лиофилизатов проводили по таким показателям как описание, редиспергируемость, средний размер и  $\zeta$ -потенциал липосом до сублимационного высушивания и после регидратации в воде через определенные промежутки времени – 5, 15, 30, 60 и 180 мин.

При сравнении образцов дисперсии, содержащих криопротекторы, показано, что наилучшими криопротективными свойствами в отношении липосом ЛХС-1269 обладает сахароза, вводимая в дисперсию в молярном соотношении 5:1. При регидратации данного образца отмечается стойкое повышение уровня  $\zeta$ -потенциала везикул в течение 3 ч с -24,8 до -27,5 мВ с сохранением среднего размера 133–146 нм (рисунок 6), что указывает на стабилизацию липосомальной системы.



а



б

Рисунок 6 – Средние значения размера (а) и  $\zeta$ -потенциала (б) липосом ЛХС-1269 в фиксированные точки времени после регидратации лиофилизата. Обозначения:

М – манноза, С – сахароза, Т – трегалоза

#### **Выбор технологической стадии для введения криопротектора**

Для оценки стадии введения криопротектора, сравнивали вязкость, КВП, PDI, размер липосом и  $\zeta$ -потенциал липосомальных дисперсий, полученных путем введения криопротектора на стадии гидратации липидной пленки и после экструзии. Согласно приведенной таблице 5, растворение сахарозы в дисперсии ОСЛ ЛХС-1269 обеспечивает получение полупродуктов с лучшими показателями качества, поэтому для введения КП в состав ЛФ выбрана стадия экструзии.

Таблица 5 – Оценка показателей качества липосомальных дисперсий ЛХС-1269 для выбора стадии введения КП

Стадия введения КП	Образец для анализа	Показатель качества				
		размер везикул, нм	ζ-потенциал, мВ	PDI	КВП, %	вязкость, мПа·с
Гидратация липидной пленки	МСЛ	378±34	-(20,7±1,1)	0,396±0,020	91,0±0,9	12,3±1,8
	ОСЛ	195±7	-(21,5±0,4)	0,374±0,042	87,8±1,1	-
Экструзия	МСЛ	523±27	-(24,9±1,4)	0,549±0,046	97,9±1,0	7,9±1,2
	ОСЛ	175±9	-(26,7±0,5)	0,122±0,031	94,3±0,7	-

## Разработка методик контроля качества ЛЛФ и ЛЛЛФ ЛХС-1269

### 1. Разработка методики ТСХ-анализа ЛЛЛФ ЛХС-1269

**Выбор подвижной фазы.** Для приготовления элюента использовали растворители, широко применяемые в химико-фармацевтическом анализе: хлороформ, этанол 95%, пропанол-2, н-бутанол, метанол, бензол, ацетон, этилацетат, аммиак водный 25%, ледяную уксусную кислоту (ЛУК), гексан и воду. Было изучено 16 элюирующих систем различного качественного и количественного состава (таблица 6). Оценка эффективности системы растворителей проводили по таким параметрам как количество зон адсорбции (пятен) веществ, образующихся при разделении смеси компонентов; значение фактора удерживания  $R_f$  анализируемых веществ; время пробега подвижной фазы.

Таблица 6 – Оценка эффективности различных систем растворителей при ТСХ-анализе ЛЛЛФ ЛХС-1269

№	Система растворителей	Значение $R_f$								Время, мин
		ЛХС-1269		ФХ		Холестерин		Сахароза		
		ЛФ	СОВС-	ЛФ	СОВС-	ЛФ	СОВС-	ЛФ	СОВС-	
1	хлороформ–ЛУК–бутанол–аммиак 12:6:3:1	0,72	0,68	0,72	0,60	0,87	0,87	-	-	260
2	хлороформ–метанол–вода–аммиак 16:10:1:1	0,78	0,83	0,58	0,54	0,88	0,86	0,31	0,34	120
3	бутанол–гексан 1:1	старт	старт	0,85	0,92	0,85	0,73	-	-	127
4	бутанол–ЛУК–вода 9:3:2	0,58	0,44	старт	старт	0,68	0,61	-	-	244
5	бутанол–ЛУК–вода 6:3:2	0,62	0,56	0,11	0,10	0,67	0,62	-	-	210
6	хлороформ–этанол 1:1	0,79	0,78	0,08	0,14	0,79	0,78	-	-	122
7	хлороформ–этанол–ЛУК–ацетон–вода 6:2:2:1:1	0,84	0,84	0,55	0,50	0,85	0,85	-	-	220
8	пропанол–ЛУК–вода 12:3:1	0,67	0,61	старт	старт	0,72	0,52	-	-	231
9	этанол	0,59	0,58	старт	старт	0,66	0,65	0,23	0,31	145
10	бутанол–ЛУК–гексан 1:1:1	0,41	0,55	0,08	0,06	0,9	0,88	-	-	151
11	ацетон–этилацетат–ЛУК–вода 15:10:3:5	0,85	0,83	старт	старт	0,94	0,82	0,18	0,21	77
12	хлороформ–этанол–ЛУК 8:4:1	0,70	0,70	0,08	0,08	0,88	0,81	-	-	120
13	ацетон–ЛУК–вода 15:3:2	0,92	0,90	0,08	0,08	0,97	0,68	0,65	0,61	99
14	пропанол–хлороформ–ЛУК–вода 27:23:3:1	0,69	0,73	0,18	0,10	0,50	0,50	-	-	130
15	хлороформ–этанол–ЛУК–вода 40:7:7:5	0,93	0,93	0,38	0,38	0,97	0,97	-	-	149
16	этилацетат–этанол–аммиак (9 : 1 : 2)	0,23	0,23	0,76	0,83	0,76	0,71	-	-	52

В результате установлено, что ни одна система не может анализировать всех определяемых компонентов ЛЛЛФ одновременно. Система «этанол» выбрана для ТСХ-анализа ЛХС-1269 и холестерина, ФХ – система 2 «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)», сахарозы – система 13 «ацетон–ЛУК–вода (15:3:2)».

**Оценка пригодности хроматографических систем.** Для оценки пригодности выбранной хроматографической системы был определен предел обнаружения анализируемых веществ. Проводили испытания образцов с различными известными количествами анализируемого вещества (ЛХС-1269, холестерин, ФХ и сахароза) и устанавливали минимальное значение. Результаты исследования показали, что предел обнаружения ЛХС-1269 в системе «этанол» составил 0,1 мкг, холестерина – 0,5 мкг, ФХ в системе «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)» – 0,5 мкг, сахарозы в системе «ацетон–ЛУК–вода (15:3:2)» – 0,1 мкг.

## 2. Разработка и валидация методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1269

### *Изучение спектральных характеристик ЛХС-1269 и вспомогательных веществ ЛФ.*

В электронном спектре поглощения спиртового раствора субстанции ЛХС-1269 в анализируемом диапазоне 200–800 нм обнаружено 4 максимума – при длинах волн (203±3), (285±3), (317±3) и (408±3) нм (рисунок 7). Для количественного анализа липосомального ЛХС-1269 выбран наиболее интенсивный пик при (317±3) нм.

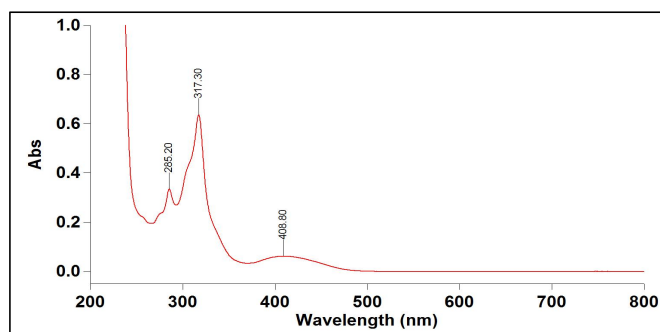


Рисунок 7 – Электронный спектр поглощения спиртового разведения субстанции ЛХС-1269

Для изучения влияния вспомогательных веществ на абсорбционные характеристики ЛХС-1269 в ЛЛФ и лиофилизата исследовали спектр поглощения «пустых» липосом без субстанции ЛХС-1269. В диапазоне 200–400 нм отмечено 2 пика – при (268±1) и (279±5) нм, соответствующих максимумам поглощения вспомогательных ингредиентов ЛФ. Оптическая плотность вспомогательных веществ при рабочей длине волны 317 нм близка к нулю.

Для выбора рабочей концентрации и проверки соблюдения закона Бугера–Ламберта–Бера при длине волны (317±3) нм готовили спиртовые разведения субстанции ЛХС-1269 в диапазоне концентраций 0,001–0,010 мг/мл. Для спиртовых разведений линейную зависимость оптической плотности от концентрации при длине волны 317 нм наблюдали во всем исследуемом

диапазоне, что указывает на соблюдение закона Бугера-Ламберта-Бера. Для анализа образец разводим до получения спиртового раствора с теоретической концентрацией ДВ 0,0064 мг/мл, характеризующегося средним значением поглощения 0,648.

**Количественное определение ЛХС-1269 в ЛЛФ. Приготовление стандартного образца (СО).**

К точной навеске субстанции ЛХС-1269 0,9 мг добавляют 1 мл ДМСО, после растворения добавляли 95% спирт. Полученный спиртовой раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом до метки (раствор А). Отбирают 4 мл раствора А в колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом до метки (раствор Б). Раствор Б используют свежеприготовленным.

*Методика количественного спектрофотометрического анализа ЛХС-1269 в липосомальной дисперсии.* 1 мл липосомальной дисперсии ЛХС-1269 помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют небольшое количество спирта 95 %, перемешивают, доводят спиртом до метки и вновь перемешивают. Измеряют величину оптической плотности полученного спиртового разведения в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм в максимуме поглощения (317±3) нм относительно раствора сравнения. Параллельно проводят измерение оптической плотности спиртового раствора СО относительно раствора сравнения. Концентрацию ЛХС-1269 в липосомальной дисперсии (С, мг/мл) рассчитывают по формуле:  $C = A \times a_0 \times V / A_0 \times V_0$ ,

где: –А и А<sub>0</sub> – оптические плотности растворов образца липосомальной дисперсии и СО ЛХС-1269, соответственно; а<sub>0</sub> – навеска СО ЛХС-1269, в мг; V и V<sub>0</sub> – разведения образца липосомальной дисперсии и СО ЛХС-1269, соответственно.

*Методика количественного спектрофотометрического анализа ЛХС-1269 в лиофилизате.* К содержимому флакона препарата добавляют 5 мл воды и перемешивают до получения гомогенной липосомальной дисперсии. Дисперсию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют небольшое количество спирта 95 % и перемешивают, доводят спиртом до метки (раствор А). Отбирают 4 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 относительно раствора сравнения. Параллельно проводят измерение оптической плотности спиртового раствора СО относительно раствора сравнения. Содержание ЛХС-1269 во флаконе (Х, мг) рассчитывают по формуле:  $X = A \times a_0 \times V / A_0 \times V_0$ ,

где: А и А<sub>0</sub> – оптические плотности растворов образца ЛЛЛФ и СО ЛХС-1269, соответственно; а<sub>0</sub> – навеска СО ЛХС-1269, мг; V и V<sub>0</sub> – разведения образца ЛЛЛФ и СО ЛХС-1269, соответственно.

По результатам валидационной оценки по характеристикам «специфичность», «линейность», «правильность», «прецизионность» установлено, что разработанная методика

применима для количественного определения ЛХС-1269 в ЛЛФ и ЛЛЛФ в диапазоне концентраций ЛВ 80–120 %.

### Стандартизация и мониторинг стабильности в процессе хранения ЛЛФ ЛХС-1269

В результате проведенных исследований разработан препарат «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг», который имеет следующий состав на 1 флакон:

ЛХС-1269	1,8 мг
Яичный фосфатидилхолин	380 мг
Холестерин	64 мг
Пегелированный фосфатидилхолин	4,2 мг
Сахароза	855 мг
Общая теоретическая масса во флаконе	1305 мг

Для стандартизации препарата как после изготовления, так и в процессе хранения с целью изучения их стабильности, используют следующие основные показатели: описание, редиспергируемость (растворимость лиофилизата), подлинность, количественное определение, однородность дозирования, однородность массы дозированных ЛФ, размер липосом, значение рН, вязкость, ζ-потенциал везикул, потеря в массе при высушивании. На основании выбранных показателей был разработан проект НД на препарат «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг».

Для изучения стабильности и установления срока годности 3 серии ЛЛЛФ ЛХС-1269 (010319, 020419, 030419) были заложены на хранение. Препарат хранили в морозильной камере при температуре -18 °С, поскольку такая температура установлена для хранения липидов.

Из данных табл. 7 видно, что при анализе качества ЛЛЛФ ЛХС-1269 в процессе хранения не наблюдались значимые изменения в показателях качества, заложенных в проекте НД. Проведенные исследования позволили установить предварительный срок годности для препарата «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» 24 мес. Изучение стабильности и срока годности препарата продолжаются.

Таблица 7–Основные показатели качества ЛЛЛФ ЛХС-1269 после получения и в процессе хранения

Наименование показателя	Норма	Срок хранения, мес.	Результаты контроля качества		
			Серии		
			010319	020419	030419
1. Описание 2. Редиспергируемость 3. Подлинность	1. Сухая пористая масса желтого цвета 2. При добавлении к содержимому флакона 5 мл воды 3. ЭСП/ТСХ	0	Соответствует норме		
		3			
		6			
		9			
		12			
		18			
		24			
		30			
Содержание цифетрилина во флаконе, мг	1,75–1,91	0	1,76	1,86	1,82
		3	1,78	1,83	1,81
		6	1,78	1,75	1,75
		9	1,78	1,82	1,89
		12	1,79	1,82	1,89
		18	1,75	1,86	1,91
		24	1,76	1,77	1,83
		30	1,74	1,81	1,78

Продолжение таблицы 7

Однородность массы содержимого флакона, г	1,294–1,434	0	1,371	1,434	1,293
		3	1,367	1,325	1,294
		6	1,326	1,331	1,304
		9	1,333	1,319	1,312
		12	1,329	1,335	1,300
		18	1,324	1,318	1,296
		24	1,326	1,319	1,296
		30	1,325	1,317	1,292
Размер липосом, нм	не более 195	0	138 ± 0,5	170 ± 0,8	187 ± 2,0
		3	129 ± 2,6	178 ± 4,3	192 ± 1,6
		6	126 ± 1,1	187 ± 2,4	195 ± 0,7
		9	194 ± 1,2	185 ± 0,8	183 ± 0,4
		12	150 ± 0,5	184 ± 0,8	191 ± 2,9
		18	132 ± 2,3	184 ± 5,3	178 ± 2,7
		24	127 ± 1,6	169 ± 0,8	177 ± 1,6
		30	172 ± 0,4	193 ± 2,4	187 ± 2,3
Значение pH	6,1-7,0	0	7,05	6,15	6,60
		3	6,95	6,10	6,62
		6	7,00	6,12	6,55
		9	6,90	6,05	6,61
		12	6,96	6,09	6,58
		18	6,91	6,13	6,66
		24	6,79	6,07	6,52
		30	6,66	6,52	6,76
ζ-потенциал везикул, mV	-(18,6–30,1)	0	-(22,8±2,4)	-(28,2±1,8)	-(26,7±1,9)
		3	-(24,4±0,1)	-(30,1±0,8)	-(23,6±1,5)
		6	-(23,3±0,3)	-(25,4±0,6)	-(25,3±0,7)
		9	-(21,6±0,8)	-(24,4±1,1)	-(26,6±0,8)
		12	-(23,2±0,6)	-(21,3±1,2)	-(18,6±1,4)
		18	-(21,0±1,1)	-(20,5±0,3)	-(21,5±0,8)
		24	-(19,7±0,7)	-(19,0±1,7)	-(21,7±1,2)
		30	-(19,0±1,3)	-(18,1±1,4)	-(18,8±1,4)
Вязкость, мПа·с	3,2–4,2	0	3,26	4,29	3,32
		3	4,30	4,62	4,80
		6	4,17	4,42	3,85
		9	3,18	3,86	3,51
		12	3,47	4,68	3,88
		18	-	-	-
		24	3,57	3,88	3,41
		30	3,76	-	4,09
Потеря в массе при высушивании, %	не более 3,00	0	0,31	0,51	0,26
		3	0,42	0,42	0,24
		6	0,41	0,53	0,37
		9	0,33	0,45	0,22
		12	0,39	0,46	0,31
		18	0,32	0,32	0,39
		24	0,40	0,43	0,30
		30	0,43	0,55	0,36

### Общие выводы

1. Установлен оптимальный состав стерически стабилизированной ЛЛФ ЛХС-1269 для внутривенного введения с молярным соотношением компонентов ЛХС-1269/ФХ=1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА=1:0,33:0,003.
2. Разработана технология получения устойчивой при хранении ЛЛЛФ ЛХС-1269 для внутривенного введения. Подобран эффективный КП – сахараза, вводимая в состав ЛФ в молярном соотношении КП/ФХ 5:1 с целью обеспечения максимальной стабилизации липосом в процессе лиофилизации.
3. Разработана методика качественного хроматографического анализа компонентов ЛФ ЛХС-

1269 с использованием хроматографических пластинок «Sorbfil». Для обнаружения ЛХС-1269 и холестерина выбрана и протестирована система на основе этанола, ФХ – «хлороформ–метанол–вода–аммиак (16:10:1:1)», сахарозы – «ацетон-ЛУК–вода (15:3:2)». Разработана и валидирована методика количественного спектрофотометрического анализа липосомального ЛХС-1269 при длине волны  $317 \pm 3$  нм с использованием стандартного образца.

4. Выбраны показатели качества для стандартизации ЛЛЛФ ЛХС-1269 для инъекционного введения. В результате изучения параметров ее стабильности установлен предварительный срок хранения препарата – 24 мес.

5. Подготовлен проект нормативной документации на ЛФ «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг».

### **Практические рекомендации**

Целесообразна разработка и внедрение в практику лабораторного регламента и проекта НД на препарат «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг». Актуальным является масштабирование технологии получения препарата «ЛХС-1269 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» с целью его дальнейшего внедрения в производственную практику.

**Перспективой дальнейшей разработки темы** является проведение биологических исследований *in vivo* липосомального ЛХС-1269 для оценки его противоопухолевой активности.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. **Б. Лугэнь**, Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индокарбазола/Дмитриева М.В., Орлова О.Л., Краснюк И.И., Краснюк И.И. (мл.), Боков Д.О., Степанова О.И., Беляцкая А.В. // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2020. – № 9(3). – С. 21–26. [Scopus].
2. **БуЛугэнь**, Метод экструзии в технологии получения липосом/Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Краснюк И.И., Краснюк И.И. (мл.), Беляцкая А.В., Степанова О.И., Боков Д.О., Нарышкин С.Р., Мазяркин Е.В. // **Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация.** – 2020. – № 3. – С. 88–97. [ВАК].
3. **БуЛугэнь**, Выбор криопротектора для получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индокарбазола ЛХС-1269/Дмитриева М.В., Полозкова А.П., Орлова О.Л., Краснюк И.И., Краснюк И.И. (мл.). // **Российский биотерапевтический журнал.** – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 74–9. [ВАК].
4. **БуЛугэнь**, Оценка растворимости фармацевтической субстанции производного индокарбазола в различных растворителях/Дмитриева М.В., Колпаксиди А.П., Орлова О.Л., Краснюк И.И. // Сборник материалов XXVII Российского национального конгресса

- «Человек и лекарство». 6–9 апреля 2020 г.–Москва. – С. 56.
5. **БуЛугэнь**, Стандартизация лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола/Дмитриева М.В., Орлова О.Л., Игнатьева Е.В., Краснюк И.И.//Сборник материалов XXVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». 6–9 апреля 2020 г.–Москва. – С. 64.
  6. **БуЛугэнь**, Контроль качества лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1269/Дмитриева М.В., Краснюк И.И. // Вестник ЮКМА. – 2020. – № 4(91), Т. IV. – С. 141–2.
  7. **БуЛугэнь**, Получение экспериментальных серий липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола с использованием полупромышленного оборудования/Дмитриева М.В., Краснюк И.И.// Сборник материалов III международного симпозиума. – 2021(1). – С.166–8.
  8. **В. Lugén**, Hydration of the lipid film under normal and low-pressure in the technology of liposomal preparations/Dmitrieva M.V., Timofeeva T.A., Orlova O.L., Oborotova N.A., Krasniuk I.I. //Abstract book – Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences.–2019. – P. 339.
  9. **В. Lugén**, The determination of optimal cryoprotectant for lyophilization of liposomal forms derived indolocarbazole/Dmitrieva M.V., Timofeeva T.A., Polozkova A.P., Orlova O.L., Oborotova N.A., Krasniuk I.I.//Abstract book – Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences.–2019. – P. 373.

### Список сокращений и условных обозначений

ДВ– действующее вещество  
 ДМСО – диметилсульфоксид  
 КВП – количество включенного препарата  
 КП – криопротектор  
 ЛВ – лекарственное вещество  
 ЛЛЛФ – лиофилизированная липосомальная лекарственная форма  
 ЛЛФ – липосомальная лекарственная форма  
 ЛУК – ледяная уксусная кислота  
 ЛФ – лекарственная форма  
 МСЛ – многослойные липосомы  
 Н – нейлоновый  
 ОСЛ – однослойные липосомы  
 ПВДФ – поливинилиденфторидовый  
 ПЭС – полиэфирсульфоновый  
 ПК – поликарбонатный  
 ПЭГ-ДГФА – полиэтиленгликоль-2000-дистеароил-фосфатидилэтаноламин  
 СЭЦ – сложный эфир целлюлоза  
 ФХ – фосфатидилхолин  
 PDI – индекса полидисперсности