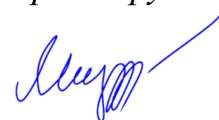


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Анурова Мария Николаевна

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

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

1.5.6. Биотехнология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Научные консультанты:

доктор фармацевтических наук, профессор

Демина Наталья Борисовна,

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН

Алешкин Андрей Владимирович

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	9
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	24
1.1. Разработка лекарственных форм биотехнологических субстанций, представляющих собой вирусы и белки.....	24
1.2. Определение, классификация гидрофильных мягких лекарственных форм.....	42
1.2.1. Определение гидрофильных мягких лекарственных форм	42
1.2.2. Классификация гелей как лекарственных форм.....	44
1.3. Требования к качеству гидрофильных мягких лекарственных форм	46
1.3.1. Фармакопейные требования к гидрофильным мягким лекарственным формам	47
1.3.2. Не фармакопейные требования к гидрофильным мягким лекарственным формам	52
1.4. Гелеобразователи – основа для разработки гидрофильных мягких лекарственных форм	61
1.4.1. Классификация гелеобразователей.....	61
1.4.2. Природные гелеобразователи.....	65
1.4.3. Синтетические гелеобразователи.....	75
1.4.4. Полусинтетические гелеобразователи.....	85
1.4.5. «Умные»/ «интеллектуальные» гели.....	89
1.5. Технология производства гидрофильных мягких лекарственных форм..	92
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.....	94
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	96
2.1. Объекты исследования.....	96
2.1.1. Лекарственные вещества.....	96
2.1.2. Вспомогательные вещества.....	100
2.1.3. Упаковка лекарственных форм.....	104

2.2. Методы исследования.....	105
2.2.1. Методы исследования технологических параметров качества лекарственных форм	105
2.2.2. Аналитические методы определения лекарственных веществ в составе лекарственных форм	113
2.2.2.1. Оценка спектра литической активности бактериофагов.....	113
2.2.2.2. Метод иммуноэлектрофореза.....	114
2.2.2.3. Определение специфической бактерицидной активности.....	114
2.2.2.4. Определение подлинности даларгина	119
2.2.2.5. Количественное определение даларгина	119
2.2.2.6. Тест «Растворение» офтальмологического геля интерферона альфа- 2b и даларгина.....	122
2.2.2.7. Реакция нейтрализации противовирусной активности интерферона альфа-2b.....	122
2.2.2.8. Определение специфической противовирусной активности интерферона альфа-2b.....	128
2.2.2.9. Определение подлинности декспантенола.....	137
2.2.2.10. Количественное определение декспантенола.....	137
2.2.2.11. Определение подлинности лидокаина.....	137
2.2.2.12. Количественное определение лидокаина.....	137
2.2.2.13. Валидация аналитических методик.....	138
2.2.3. Изучение стабильности и определение срока годности разработанных лекарственных форм	138
2.2.4. Изучение безопасности и эффективности лекарственных форм	139
2.2.4.1. Изучение фармакокинетических показателей бактериофагов в пероральном геля.....	139
2.2.4.2. Изучение безопасности геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP.....	141
2.2.4.3. Изучение местного-раздражающего действия офтальмологической лекарственной формы.....	144

2.2.4.4. Изучение местно-раздражающего действия геля для наружного и местного применения.....	146
2.2.5. Оценка цитотоксического действия действующих и вспомогательных веществ	147
2.2.6. Статистическая обработка результатов.....	149
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 2.....	150
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИЧЕСКОЙ КОНЦЕПЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ ГИДРОФИЛЬНЫХ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ СУБСТАНЦИЯМИ С УЧЕТОМ ЦЕЛЕВОГО ПРОФИЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ	151
3.1. Определение профиля качества гидрофильных мягких лекарственных форм для различных путей введения и выбор критических технологических параметров качества.....	153
3.2. Определение специфических критических параметров качества биотехнологических субстанций.....	160
3.3. Экспериментальное определение реологических оптимумов гидрофильных мягких лекарственных форм для различных путей введения.....	162
3.3.1. Экспериментальное определение реологических оптимумов дерматологических гидрофильных мягких лекарственных форм	163
3.3.2. Экспериментальное определение реологических оптимумов офтальмологических гидрофильных мягких лекарственных форм	172
3.3.3. Экспериментальное определение реологических оптимумов вагинальных гидрофильных мягких лекарственных форм	180
3.3.4. Экспериментальное определение реологических оптимумов стоматологических гидрофильных мягких лекарственных форм	188

3.4. Разработка методологической концепции фармацевтической разработки гидрофильных мягких лекарственных форм с биотехнологическими субстанциями с учетом целевого профиля качества лекарственных препаратов.....	195
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.....	201
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНЫХ ГИДРОФИЛЬНЫХ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С КОКТЕЙЛЯМИ БАКТЕРИОФАГОВ.....	203
4.1. Фармацевтическая разработка термореверсивного вагинального геля с коктейлем бактериофагов.....	204
4.1.1. Определение профиля качества вагинального геля с коктейлем бактериофагов.....	204
4.1.2. Разработка состава и технологии вагинального геля с коктейлем бактериофагов.....	209
4.1.3. Технология получения вагинального геля с коктейлем бактериофагов.....	218
4.1.4. Изучение стабильности и определение срока годности вагинального геля с коктейлем бактериофагов.....	226
4.2. Фармацевтическая разработка состава и технологии перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций.....	228
4.2.1. Определение профиля качества перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций.....	228
4.2.2. Разработка состава и технологии перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций.....	233
4.2.3. Технология получения перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций.....	243
4.2.4. Изучение стабильности и определение срока годности перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций.....	249

4.2.5. Изучение фармакокинетических показателей бактериофагов в пероральном геле.....	250
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....	253
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ГЕЛЯ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ С РЕКОМБИНАНТНЫМ ЭНДОЛИЗИНОМ LYSEC7-SMAP.....	255
5.1.1. Определение профиля качества геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP.....	255
5.1.2. Разработка состава и технологии геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP.....	261
5.1.3. Технология получения геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP.....	270
5.1.4. Изучение стабильности и определение срока годности геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP.....	277
5.1.5. Изучение безопасности геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP.....	277
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.....	285
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА КОМБИНИРОВАННЫХ ГИДРОФИЛЬНЫХ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С ИНТЕРФЕРОНОМ АЛЬФА-2b....	287
6.1. Фармацевтическая разработка комбинированного офтальмологического геля с интерфероном альфа-2b и даларгином.....	287
6.1.1. Определение профиля качества комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина.....	288
6.1.2. Изучение совместимости интерферона альфа-2b и даларгина.....	294
6.1.3. Разработка состава и технологии комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина.....	295
6.1.4. Технология получения комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина.....	306

6.1.5. Изучение возможности трансфера и масштабирования технологии производства комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина.....	312
6.1.6. Изучение стабильности и определение срока годности комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина.....	323
6.1.7. Изучение местно-раздражающего действия комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина.....	325
6.2. Фармацевтическая разработка комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения.....	326
6.2.1. Определение профиля качества комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения.....	326
6.2.2. Изучение совместимости интерферона альфа- 2b с декспантенолом и лидокаином.....	332
6.2.3. Разработка состава и технологии комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения.....	333
6.2.4. Технология получения комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения.....	347
6.2.5. Изучение возможности трансфера и масштабирования технологии производства комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения.....	353
6.2.6. Изучение стабильности и определение срока годности комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения.....	366
6.2.7. Изучение местно-раздражающего действия комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения.....	366
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.....	367
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	369
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	370
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	373

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	374
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	375
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	377
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Проекты спецификаций на разработанные лекарственные формы.....	424
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Изучение стабильности разработанных лекарственных форм.....	431
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Патенты.....	460
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Акты о внедрении.....	462
ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Решения этических комитетов по проведению исследований на животных.....	467

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Ключевыми приоритетами стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года является разработка оригинальных лекарственных препаратов (далее – ЛП) и развитие биотехнологического сектора фармацевтической отрасли [74]. Исследование Global Market Insight показало, что к 2027 году объем рынка биотехнологий достигнет порядка 950 миллиардов долларов [67], при этом более половины биотехнологических исследований в мире сконцентрировано в отрасли фармацевтического производства. Драйвером для развития биотехнологического сектора стала пандемия COVID-19, которая потребовала глобальных усилий по разработке вакцин, тестов на антитела, инноваций в создании новых противовирусных препаратов [83]. Биотехнологические ЛП порождают большие надежды на будущее для лечения ряда заболеваний и могут вывести оказание медицинской помощи на качественно новый уровень. К таким препаратам относятся лекарственные средства (далее – ЛС) на основе вирусов, например бактериофаги, ставшие вновь актуальными в связи с глобализацией проблемы антибиотикорезистентности, а также рекомбинантные белки, полученные с помощью генноинженерной технологии, направленные на терапию широкого круга заболеваний.

Одним из важнейших этапов создания биотехнологических препаратов является фармацевтическая разработка. На основании принципа «качество, запланированное при разработке» (далее – QbD, «Quality by Design») при создании лекарственных форм (далее – ЛФ) центральным по значению является определение целевого профиля качества препарата, установление критических показателей качества и разработка стратегии контроля ЛП. [80, 236]. Если технология и

производство синтетических и растительных ЛС достаточно хорошо разработаны и изучены, то работы по выбору научно-обоснованной методологии разработки ЛФ для биотехнологических субстанций отсутствует.

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

Степень разработанности темы исследования

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

В нашей стране большой вклад в развитие технологии мягких лекарственных форм (далее - МЛФ), в том числе ГМЛФ, внесли российские и советские ученые:

Тенцова А.И., Муравьев И.А., Аркуша А.А., Перцев И.М., Девяткина И.А., Суслина С.Н., Джавахян М.А. и др. В своих работах они подчеркнули важность обоснования выбора состава ЛФ в первую очередь с позиции биофармации, а затем производства.

Важную роль при разработке составов мягких лекарственных форм (далее – МЛФ) играет контроль реологических свойств, которые дают представление о физических характеристиках, структуре, стабильности и параметрах высвобождения ЛВ из ЛФ. В литературе приводятся описание реологических свойств гелей [137, 198, 240], однако отсутствуют критерии и значения реологических показателей, которых следует придерживаться или ориентироваться при создании новых составов ЛФ на гидрофильных основах. В работах Аркуши А.А. и Перцева И.М., проведенных более 40 лет назад, описаны реологические оптимумы для мазей на липофильных и абсорбционных основах актуальных на тот период, на эти работы до сих пор ссылаются и ряд современных авторов при фармацевтической разработке МЛФ, однако для гелей эти оптимумы не применимы.

Цель и задачи исследования

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

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. На основании изучения зарубежной и российской нормативной документации, материалов производителей и данных научных публикаций по актуальному современному ассортименту гелеобразователей выявить эксципиенты, перспективные для использования в рецептурах ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями в контексте способа применения ЛФ.

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

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

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

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

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

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

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

Научная новизна

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

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

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

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

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

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

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

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

Методология и методы исследования

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

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

Общие подходы к фармацевтической разработке были определены согласно руководству International conference on harmonisation of technical requirements for

registration of pharmaceuticals for human use ich harmonised tripartite guideline. Pharmaceutical development Q8(R2) (далее – ICH Q8), для чего применяли общие научные и фармакопейные методы анализа, а в связи с спецификой физико-химических свойств биотехнологических субстанций также специфические: метод Грация, метод определения спектра литической активности фагов, выявления лизогенных штаммов бактерий, определения частоты возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов, выделения и рестрикционного анализа ДНК бактериофагов, определения спектра противомикробной активности рекомбинантных эндолизиннов, иммуноэлектрофореза в агаровом геле, методике определения специфической противовирусной активности интерферона α -2b.

В работе использованы методы фармакопейного анализа, включенные в Государственную фармакопею Российской Федерации XV издания (далее – ГФ РФ) и Фармакопея Евразийского экономического союза (далее – ГФ ЕАЭС), фармацевтико-технологические, физико-химические, математические, статистические методы анализа и обработки результатов. Фармацевтическую разработку ЛФ биотехнологических субстанций проводили в соответствии с решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза". Проекты нормативных документов по качеству на ЛП разрабатывались в соответствии с Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 года №151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата» и решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза". Использованные в работе аналитические методики были валидированы в соответствии с требованиями Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. N 113 "Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств" Программу стабильности ЛФ осуществляли по требованиям Решения Евразийской

Экономической Комиссии от 10 мая 2018 года № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций».

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

Личный вклад автора

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

Положения, выносимые на защиту

- Методология фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями, представляющими собой вирусы и белки;
- результаты определения профилей качества ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями, представляющими собой вирусы и рекомбинантные белки, для различных путей введения и обоснованный выбор критических технологических параметров качества;
- принципы обоснования выбора гелеобразователей при разработке составов ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями для дерматологического, офтальмологического, вагинального, стоматологического применения и для нанесения на раны и ожоги;
- реологические оптимумы ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями для дерматологического, стоматологического, офтальмологического и вагинального путей введения;
- результаты апробации методологии фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями, представляющими собой вирусы и белки, на примере разработки следующих ЛС: термореверсивного вагинального геля с коктейлем бактериофагов, перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций; геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP; комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина и комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения;
- технология производства разработанных ЛФ: геля для приема внутрь с коктейлем бактериофагов, 30 г; геля для вагинального применения коктейлем бактериофагов, 30 г; геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP, 30 г; офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина 500 тыс. МЕ +4,0 мкг, 10 г; комбинированного геля наружного и

местного применения интерферона альфа-2b, декспантенола и лидокаина 400 тыс. МЕ +500 мкг+ 100 мкг на 10 г;

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Степень достоверности и апробация результатов

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

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

Апробация диссертационной работы состоялась на заседании научно-практической междисциплинарной конференции кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), при участии кафедр института: фармацевтической технологии, биотехнологии, фармацевтического естествознания, аналитической, физической и коллоидной химии, фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, химии, научно-образовательного исследовательского центра «ФАРМА–

ПРЕМИУМ»; а также представителей подразделений Федерального бюджетного учреждения науки “Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: лаборатории диагностики и профилактики инфекционных заболеваний, лаборатории биотехнологии и микробиологии бактериофагов, лаборатории иммунобиологических препаратов, отдела медицинской биотехнологии и Евразийской академии надлежащих практик, протокол №1 от 16 января 2025 года.

Внедрение результатов в практику

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

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

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

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Исследование выполнено в соответствии с Программой фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период – с 2021 по 2030 годы (утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 31.12.2020 года №3684–р); Стратегией развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года (утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 7 июня 2023 г. № 1495–р); Планом научно–исследовательских работ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и является фрагментом исследования по теме «Развитие научных и научно–методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01201261653).

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

Публикации по теме диссертации

Основное содержание работы отражено в 47 публикациях, в том числе 8 научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук; 10 статей в изданиях, индексируемых в международных базах (Scopus, PubMed, Springer), 12 - иные публикации по

результатам исследования, 1 монография, 2 патента, 14 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

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

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Разработка лекарственных форм биотехнологических субстанций, представляющих собой вирусы и белки

Двадцатый век был эрой антибиотиков, после открытия которых шла активная разработка новых групп данных препаратов и расширение номенклатуры существующих. Однако развитие разработок в области антибиотикотерапии на современном этапе существенно снизилось, что связано с растущими коммерческими рисками из-за бактериальной резистентности. Это привело к тому, что все большее внимание уделяется разработке производных известных антибиотиков, а не открытию противомикробных препаратов с принципиально новыми механизмами действия. Однако существенный недостаток такого подхода заключается в его неспособности противостоять росту устойчивости бактерий к антибиотикам. Поэтому ведется активный поиск иных подходов для ограничения или устранения возникновения устойчивых инфекционных агентов [412]. Развитие устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий усугубляется из-за неправильного и избыточного использования антибиотиков, особенно в медицинской и сельскохозяйственной промышленности. Ежегодно сотни тысяч людей становятся жертвами инфекционных заболеваний, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванные поли- и панрезистентными бактериями. Прогнозы экспертов вызывают серьезную тревогу: если не принять срочных мер, к 2050 году количество жертв, унесенных этими инфекциями, может достичь ужасающей цифры в 10 миллионов человек. Это число сопоставимо с общим количеством населения некоторых стран и подчеркивает масштабность и серьезность предстоящей угрозы. [113].

В 2017 году Всемирная организация здравоохранения (далее – ВОЗ) опубликовала список патогенных бактерий, обладающих высокой устойчивостью к

антибиотикам, назвав их “приоритетными патогенами” для поиска и разработки новых методов борьбы с ними, включая новые антибиотики и альтернативные препараты, к которым можно отнести бактериофаги и эндолизины. В список вошло 12 бактерий, разделённых на три группы: крайне приоритетные (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*), высокоприоритетные (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp., *Salmonellae*, *Neisseria gonorrhoeae*) и среднеприоритетные (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella* spp.) (далее – ESKAPE) [436]. Разработка новых лекарственных антибактериальных препаратов должна быть направлена в первую очередь против данных бактерий. Одним из возможных путей решения проблемы антибиоткорезистентности может быть бактериофаготерапия [9].

Бактериофаги были открыты еще в 20-х годах прошлого столетия, их начали активно использовать против бактериальных инфекций у животных и людей. Однако в западном мире от фаготерапии отказались в связи с широкой коммерциализацией антибиотиков, а в Советском Союзе фаготерапия применялась и ЛФ фагов выпускаются по сей день.

На российском рынке бактериофаги представлены препаратами, выпускающимися АО «Научно-производственное объединение Микроген» в виде растворов для приема внутрь, местного и наружного применения, и косметическими препаратами в виде гелей производства «Научно-производственный центр Микромир».

Существуют два фундаментально отличающихся подхода к разработке ЛП бактериофагов и терапии ими. Традиционный подход к производству коммерческих ЛП бактериофагов в России предполагает создание средств с широким спектром действия и фиксированным составом. Продукция компании «Микроген» является примером такого типа. Важно регулярно проводить мониторинг распространения и видового состава бактерий, на которые направлены бактериофаги, и обновлять штаммовый состав препаратов. Также следует учитывать, что бактерии могут изменяться и приобретать устойчивость к определённому фагу во время терапии, а

взаимодействие бактериофагов с иммунной системой пациента невозможно предсказать при использовании данного подхода [12].

Второй более современный подход — персонализированная фаготерапия, при которой терапию осуществляют одним или несколькими фагами, подобранными против штаммов патогена, выделенных у конкретного пациента, с обязательным тестированием чувствительности бактерий к фагам. [9, 43]. Основным недостатком данного подхода является недостаточная законодательно-нормативная база в Российской Федерации. При этом оба подхода производства ЛП бактериофагов могут успешно применяться для лечения инфекционных заболеваний, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью.

В иностранной литературе опубликовано значительное количество работ по созданию различных ЛФ бактериофагов [70], в том числе в виде гелей. При разработке препаратов на основе фагов возникает двойная задача: обеспечить биостабильность фагов и физическую стабильность препарата. Фаги представляют собой крупные белковые комплексы, содержащие генетический материал (ДНК или РНК), и, как и большинство белков, они лишь частично стабильны в растворе. Чтобы стать жизнеспособным терапевтическим продуктом, фаги в составе препаратов должны сохранять свою нативную структуру и биологическую активность во время производства и хранения. На сегодняшний день разработка стабильных фаговых препаратов для терапевтических целей всё ещё является относительно малоизученной областью исследований [70, 126, 332]. В таблице 1.1 показаны основные иностранные научные исследования по разработке ЛФ бактериофагов в виде гелей.

Как видно из представленных данных, большинство работ по созданию гелевых композиций с бактериофагами посвящено разработке препаратов для лечения инфицированных ран и ожогов и для имплантационного и инъекционного введения. При этом для данного типа субстанций не все варианты использования гидрогелей с их перспективами рассмотрены.

Одной из актуальных задач для борьбы с антибиотикорезистентностью, является терапия метициллинрезистентного золотистого стафилококка (Methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*, далее – MRSA), как одной из наиболее опасных инфекций. MRSA является патогеном человека, вызывающим многие инфекции, возникающие на поверхности слизистых оболочек. Одной из распространенных групп золотистого стафилококка является клональная группа USA200 (CC30), которая продуцирует токсин синдрома токсического шока-1 (TSST-1). Многие инфекции, вызванные USA200, возникают на слизистых оболочках, особенно во влагалище и желудочно-кишечном тракте.

Таблица 1.1 – Публикации, по разработке гелей с бактериофагами

Применение	Гелеобразователь	Фаги	Целевые бактерии	Ссылки
Для нанесения на раны и ожоги	ПВС и натрия альгинат	MR10 PA5 Kpn5	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i>	[264, 277]
Для нанесения на раны и ожоги	ГМПЦ	Kpn5	<i>K. pneumoniae</i>	[276]
Для имплантационного введения	Гидрогель из альгината и наногидрокси-апатита	LM99	<i>Enterococcus faecalis</i>	[201]
Для обработки имплантов	Коммерческий адгезивный гель	ФPaer4, ФPaer14, ФPaer22, ФW2005A	<i>P. aeruginosa</i>	[439]
Для имплантационного введения	Альгинат натрия	Модифицированный CRISPR-Cas9 бактериофаг	<i>S. aureus</i>	[173]
Обработка мочевого катетера	ПВС и поли(метил-метакрилат-со-метакриловая кислота) Eudragit® S 100	Фаг, выделенный из сточных вод	<i>Proteus mirabilis</i>	[346, 355]
Для нанесения на раны и ожоги	Поли(N-изопропилакриламид-ко-аллиламина	Фаг К	<i>S. aureus</i>	[346]
Для нанесения на раны и ожоги	Метакрилат гиалуроновой кислоты	Фаг К	<i>S. aureus</i>	[415]
Для инъекционного введения	Альгинат натрия	FRI фаги	<i>P. aeruginosa</i>	[106]

Ряд публикаций свидетельствуют о растущей распространенности MRSA у беременных и женщин в послеродовом периоде, что совпадает с увеличением частоты инфекций MRSA в отделениях интенсивной терапии новорожденных и

родильных домах [237, 250]. Более сотни тысяч беременных или рожениц во всем мире сталкиваются с инвазивной инфекцией MRSA, стоимость лечения которой составляет около 8,7 миллиарда долларов только в Соединенных Штатах Америки [207] и сотни тысяч случаев инфицирования и тысячи смертей происходят у детей в возрасте до одного года [374]. В стационарах Российской Федерации также наблюдается рост инфекций, вызванных MRSA, удельный вес которых достигает 30-70%, среди всех инфекций, вызванных золотистым стафилококком. Основную опасность создает возможность переноса *S. aureus* с наружных кожных покровов и слизистых оболочек во внутреннюю среду организма с развитием гнойно-септических инфекций и послеоперационных осложнений [87]. Беременные женщины особенно восприимчивы к стафилококковым инфекциям из-за высокого уровня эстрогена и глюкозы в крови. Наиболее частыми проявлениями заболевания MRSA у беременных и женщин в послеродовой период являются инфекции кожи и мягких тканей и послеродовой мастит, гнойно-воспалительные заболевания [409]. Доказана вертикальная передача стафилококковой инфекции от матери, которая может быть просто носителем, к новорожденным детям. У новорожденных детей, особенно недоношенных, или которым требуется госпитализация в отделение интенсивной терапии данный тип инфекции тяжело поддается терапии, могут развиваться следующие проявления бактериемия, менингит и инфекции мочевыводящих путей, токсический шок [430]. Инфекции *S. aureus*, тем более MRSA трудно поддаются лечению после ее развития, поэтому большое значение придается профилактике.

Еще одной приоритетной задачей является создание препаратов для лечения острых кишечных инфекций (далее – ОКИ), которые являются одними из самых распространенных патологий, в общей структуре заболеваний населения на них приходится около 20%. Наиболее часто встречаемыми бактериальными инфекциями данной группы являются сальмонеллезы и эшерихиозы (коли-инфекции).

Salmonella spp. Является причиной более 90 миллионов случаев заболеваний, связанных с диареей, в год во всем мире. Мировой уровень смертности от

сальмонеллеза превышает 150 тысяч человек ежегодно. Летальные исходы чаще всего наблюдаются у детей в возрасте до 4 лет, инфицированных серотипами *Enteritidis* или *Typhimurium* [161, 231, 408].

Согласно информации, предоставленной Роспотребнадзором, в 2021 году в России было зафиксировано 13,61 случаев сальмонеллёза на каждые 100 тысяч человек. В первом полугодии 2022 года количество зарегистрированных случаев этого заболевания достигло 16360, что соответствует показателю в 11,17 на 100 тысяч населения. [17]. Однако в эту статистику вошли только зарегистрированные случаи.

Заражение сальмонеллёзом может быть результатом прямого контакта с инфицированными животными или косвенного контакта через окружающую среду. Чаще всего, пищевое отравление вызвано употреблением инфицированных продуктов или пищи, приготовленной в зараженной среде. Основным источником патогенных сальмонелл, вызывающих пищевые отравления у людей, являются яйца и яичные продукты, свинина, мясо крупного рогатого скота и молочные продукты. Мясо заражается *Salmonella spp.* в процессе производства, когда бактерии, которые в изобилии содержатся в кишечнике животного, попадают на мясо в результате небрежной обработки или неправильной гигиены. Свежее мясо является благоприятной средой для роста патогенных видов *Salmonella spp.* из-за высокого содержания питательных веществ, pH 5,5–6,5. Кроме того, овощи, загрязненные фекальной микробиотой животных, могут представлять собой резервуар для *Salmonella spp.* [125, 238, 435].

Escherichia coli семейства *Enterobacteriaceae* – грамотрицательная факультативно-анаэробная, неспорообразующая, палочковидная, симменсальная и потенциально патогенная бактерия, обитающая в основном в желудочно-кишечном тракте теплокровных позвоночных животных, в том числе у человека. Большинство штаммов *E. coli* безвредны, и только некоторые из них патогенны и могут вызывать серьезные пищевые отравления, септический шок, менингит или инфекции мочевыводящих путей. Эти штаммы эволюционировали в патогенную *E. coli* путем приобретения факторов вирулентности через плазмиды, транспозоны,

бактериофаги и/или островки патогенности. Среди них выделяется энтерогеморрагическая кишечная палочка, которая продуцирует токсины Shiga (Stxs) и вызывает геморрагический колит и опасные для жизни последствия гемолитико-уремического синдрома [285, 379]. На долю этих штаммов в настоящее время приходится 1,3 миллиона смертей в мире ежегодно [204]. Кишечная палочка вторая по частоте причина диареи после ротавирусной инфекции (25,4%) в условиях стационара, особенно подвержены данной инфекции дети [329]. Вспышки эшерихиозов характерны не только для развивающихся государств или стран с жарким климатом, но и для экономически развитых государств. Так, в мае 2011 года в Германии началась крупная вспышка гастроэнтерита, вызванная патогенной *E. coli* : за 3 месяца было зарегистрировано 3816 случаев (включая 54 смертельных случая) [206].

Оба патогена относятся к приоритетным для поиска новых методов борьбы с ними. Основным механизмом передачи возбудителей является фекально-оральный, реализуемый преимущественно пищевым (алиментарным) путем. Для данной группы заболеваний является актуальным разработка ЛП как для профилактики, так и для лечения. Причем это могут быть препараты для персонализированного подбора фагов, например для пациентов стационаров, а могут быть препараты фиксированного состава для профилактики и лечения диареи путешественников, в этиологии которого ведущие позиции занимают именно эти патогены [222, 386].

Белки и пептиды выполняют жизненно важные функции в организме человека практически во всех биохимических процессах. Эти соединения также участвуют в ряде патологических состояний, включая рак, диабет и гипертонию и др. Учитывая разнообразие их функций и участие в контроле различных заболеваний, белки и пептиды являются перспективными терапевтическими средствами. Это достаточно широкая фармакологическая группа ЛВ, представленная как синтетическими пептидами, полученными методами органического синтеза, так и рекомбинантными белками, синтезированными биотехнологическим способом с использованием генетических конструкций. Зарегистрированные на российском фармацевтическом рынке рекомбинантные

белки представлены гормонами, цитокинами и моноклональными антителами. Последние достижения в области компьютерных технологий и стремительный рост объёма структурных, химических и биологических данных о постоянно растущем количестве терапевтических мишеней привел к активному развитию отрасли производства терапевтических белков [62, 316, 340]. Уже более 100 препаратов в мире на основе только антител одобрены для лечения множества серьёзных заболеваний человека и их количество стремительно растёт: с 2014 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и/или Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) одобряют 10-15 препаратов антител в год [153].

Основной сложностью разработки ЛФ терапевтических белков является их нестабильность. Деграция белка может быть вызвана множеством различных механизмов нестабильности, которые можно разделить на химические и физические. Эти виды нестабильности тесно взаимосвязаны, поскольку химические реакции могут приводить к физической нестабильности, а физическая нестабильность может привести к доступу к химически уязвимым остаткам или сократить расстояние между остатками, которые могут взаимодействовать, поэтому часто трудно понять, что стало первопричиной нестабильности [279]. Окисление, в том числе образование дисульфидных связей, является одним из наиболее распространённых видов химической деграции. Оно может происходить в присутствии окислителей (таких как пероксиды, свет или металлы) или без них, в этом случае это аутоокисление. Некоторые остатки особенно подвержены окислению, в том числе остатки метионина, гистидина и цистеина [393]. Другим важным процессом химической деграции белков является дезаминирование, затрагивающее в основном остатки аспарагина и, в меньшей степени, остатки глутамина. Это кислотно-щелочная реакция, которой способствует наличие определённых близлежащих остатков, которые могут выступать в качестве доноров протонов (например, треонин или серин), что приводит к образованию циклического промежуточного имида, и может вызвать искажение полипептидной структуры [393].

Основными видами физической нестабильности являются денатурация и агрегация. Денатурация белка, то есть потеря структуры в результате разворачивания молекулы может быть вызвана химическими нестабильностями или условиями окружающей среды, такими как температура или pH. Агрегация - сборка изначально нативных и свёрнутых белков в высокомолекулярные соединения, независимо от их размера или характера связывающих их связей. Агрегаты могут формироваться исключительно за счёт слабых неспецифических связей (ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей, гидрофобных и электростатических взаимодействий) без изменения первичной структуры, и это явление физическая агрегация или самоассоциация, или содержать ковалентные связи, в том числе дисульфидные, и тогда это ковалентная агрегация. Оба механизма могут привести к образованию растворимых или нерастворимых агрегатов, часто этот процесс необратимый [279, 434].

Кроме того, на стабильность белков в растворах влияет их концентрация и способность к адсорбции на гидрофобных поверхностях упаковки и границах раздела фаз. Высокая концентрация белка увеличивает вязкость растворов, повышает агрегационный потенциал белков за счёт усиления межбелковых взаимодействий и самоассоциации. Однако влияние высоких концентраций белка неоднозначно: некоторые исследования показывают, что при высоких концентрациях мелких частиц белка стабильность увеличивается, а крупных — уменьшается [397]. В других работах отмечено, что повышение концентрации белка может снижать скорость агрегации. [434].

Основными ЛФ для белковых препаратов являются лиофилизаты и растворы для инъекций. В последние годы значительные усилия ученых направлены на разработку систем доставки лекарств, которые позволяют пептидам и белкам эффективно достигать целевых участков, к которым относятся и гели. Создание гелей для доставки белковых препаратов изучается достаточно давно. Первый гель с инсулином на основе полиакриламида был представлен еще в 1972 г [177]. Усилия ученых направлены на разработку гелей с контролируемыми или программируемыми свойствами для инъекционного и имплантационного введения

[128, 247, 254], реагирующие на раздражители *in situ* гели [396], так и физические гели для местной доставки данной группы препаратов [190], чему посвящено достаточно большое количество обзоров литературы. Однако эти сведения разрозненны, не гармонизированы, нуждаются в дополнительных исследованиях.

Высвобождение белка из гелей происходит по нескольким механизмам: диффузия является доминирующим механизмом, контролирующим высвобождение белка из гидрогелей. Скорость высвобождения заключённых в гели лекарств во многом зависит от степени набухания. Помимо физического удержания белков в гелях, они могут быть химически связаны с цепочками полимера. Разрушение цепочек будет лимитирующим этапом высвобождения белка из этих гелей [98].

Существует ряд ограничений, которые необходимо учитывать при разработке ЛФ с биотехнологическими субстанциями, представляющими собой вирусы и белки или пептиды. А, именно, значительное влияние pH на стабильность субстанций, щелочная или кислая среда считается губительной. Кислая среда в желудке является основным препятствием для всех пероральных препаратов на основе фагов и пептидов. Влияние температуры необходимо тщательно изучать, чтобы понять, в каком температурном диапазоне субстанция может быть стабильна и встраиваться в носитель или ЛФ. Из-за чувствительности вирусов и белков к высоким температурам стерилизация паром (обычно при температуре 121 °C в течение минимум 15 минут), нецелесообразна. Для стерилизации ЛФ, содержащих данные типы субстанций, потенциально можно использовать другие методы, такие как газовая стерилизация этиленоксидом или гамма-облучение или стерилизующая фильтрация, однако необходимо доказывать отсутствие сорбции компонентов ЛФ на мембране или отсутствие деградации компонентов ЛФ. Кроме того, любой материал, используемый для внесения в него фагов или белков, необходимо стерилизовать перед процедурой внедрения, что может создать дополнительные трудности. Также присутствие органических растворителей, даже следовых количеств, может негативно влиять на активность фагов и белков, поэтому из-за этих практических ограничений в применении органических растворителей

используются водорастворимые полимеры, в синтезе которых они практически не используются.

Лекарственные препараты на основе *эндолизин*ов являются перспективными антибактериальными средствами и могут успешно дополнять существующий набор антибактериальных препаратов, особое внимание необходимо уделить патогенам, относящимся к группе ESKAPE [86, 127].

Проблема неэффективности антибактериальной терапии раневых инфекций стоит достаточно остро во всем мире, в Российской Федерации она усугублена на фоне проводимой Специальной военной операции. Помимо устойчивости бактерий к антибиотикам, образование биопленок является еще одним важным фактором, осложняющим развитие раневых и послеожоговых инфекций, что часто приводит к неэффективности лечения, хроническим инфекциям и к летальным исходам. Биопленки представляют собой организованные сообщества бактериальных клеток, которые встроены в полимерную матрицу, вырабатываемую бактериями, что позволяет им закрепляться на поверхностях. На образование биопленок обычно влияют факторы окружающей среды, и биопленки могут служить для защиты патогенов от иммунных реакций хозяина и антибиотиков, часто приводя к невосприимчивым инфекциям или даже сепсису. Наиболее распространенные инфекции у пациентов с ранами и ожогами, это *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, способные образовывать биопленки на изъязвленных участках ран и венозных катетерах и другие патогены, относящиеся к группе ESKAPE [99, 338, 437].

Литические ферменты бактериофагов, или эндолизины, вырабатываются бактериофагами во время репликации вируса внутри бактериальных хозяев. Во время высвобождения вирионов-потомков лизины продуцируются вместе с другими фаговыми белками, такими как холины. Эти молекулы приводят к разрушению бактериальной мембраны и клеточной стенки, что приводит к разрыву бактерий, гибели и высвобождению вирионов-потомков. Эндолизины способны расщеплять основные связи в пептидогликановом слое клеточных стенок бактерий [221]. Учитывая мишени и механизм действия эндолизинов, устойчивость к

лизинам на порядок менее вероятна, чем к обычным антибиотикам, кроме того, доказана их эффективность против бактериальных биопленок для лечения ран и ожогов.[143, 162, 229].

Таким образом, разработка ЛП на основе рекомбинантного модифицированного эндолизина LysECD7-SMAP, который создан в лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), является перспективной задачей.

В последнее время все активнее обсуждается вопрос о разработке и применении ЛП иммуномодуляторов — эффективных средств для неспецифической терапии и профилактики вирусных инфекций. *Интерфероны*, в частности, являются одним из наиболее изученных представителей этой категории препаратов. Их биологическое воздействие отличается широким спектром (интерфероны проявляют активность против большинства РНК- и ДНК-содержащих вирусов); высокой специфичностью к определенным типам клеток; продолжительным эффектом (даже после прекращения применения интерферон продолжает обеспечивать защиту от вирусов); внутриклеточной активностью с дистанционным характером действия, блокируя вирусную репликацию через рецепторы клеточной мембраны, а не напрямую влияя на генетический материал. Альфа-интерфероны взаимодействуют со специфическими рецепторами на поверхности клеток, что инициирует процессы транскрипции и трансляции генов, в результате чего синтезируются белки, отвечающие за противовирусное, антипролиферативное, противоопухолевое и иммуномодулирующее действие.

Интерферон альфа-2b широко используется при лечении вирусных инфекций (гепатиты В и С, заостренные кондиломы, опоясывающий лишай и др.), гематологических заболеваний (лейкоз, множественная миелома, Т-клеточная лимфома и эссенциальная тромбоцитемия) и солидных опухолей (светлоклеточный рак в стадии метастазирования, меланома, гепатоцеллюлярная карцинома и

неоплазия шейки матки) [19, 34, 42, 130, 146, 249, 383]. Разработка новых комбинированных препаратов с этим цитокином может решить ряд медицинских задач и расширить ассортимент препаратов при терапии распространенных заболеваний. В работе разрабатывали две лекарственные формы интерферона альфа-2b для офтальмологического применения и для нанесения на кожу и слизистые оболочки.

Многочисленные исследования доказали эффективность интерферона альфа-2b при лечении офтальмологических заболеваний, поражающих передний сегмент глаза (вирусные конъюнктивиты, папиллома конъюнктивы, плоскоклеточная неоплазия, лимфоидные опухоли, язва Мурена и весенний кератоконъюнктивит) и задний сегмент глаза (серпигинозная хориоидопатия, задний увеит, псевдофакический и диабетический кистозный макулярный отек и пролиферативная диабетическая ретинопатия) [102, 282, 383].

На российском фармацевтическом рынке присутствует шесть лекарственных препаратов интерферона альфа-2b как в виде монопрепаратов, так и в комбинации с дифенгидрамином или бекламетазоном в виде глазных капель или растворов/лиофилизатов для офтальмологического применения (таблица 1.2). Данные препараты имеют существенные недостатки связанные с неудобством применения, а, следовательно, с проблемой несоблюдения пациентами предписаний врача и с недостаточным охватом возможных показаний к применению данной группы ЛС.

В российской врачебной практике препараты на основе интерферона в офтальмологии применяют для лечения вирусных заболеваний, таких как конъюнктивит, кератоконъюнктивит, кератouveит, кератит; в том числе вызванные вирусами герпеса, а также вторичных инфекций на фоне аллергических процессов. Однако как показали исследования последних лет, о чем было сказано выше, показаний к применению интерферона гораздо больше.

Актуально создание комбинированных препаратов интерферона альфа-2b. Возможно включить в состав субстанцию, способную расширить спектр фармакологического действия готовой ЛФ.

Таблица 1.2 – Офтальмологические препараты на основе интерферона, зарегистрированные в РФ, по данным Государственного реестра лекарственных средств [17]

ЛП, торговое название	Состав действующих веществ	Лекарственная форма	Производитель
Интерферон-Офтальмо	Интерферон альфа-2b+Дифенгидрамин	Глазные капли	ЗАО «ЛЕККО», Россия
Аллергоферон® бета	Бетаметазон+Интерферон альфа-2b	Глазные и назальные капли	ООО «Фирн М», Россия
Лайфферон®	Интерферон альфа-2b	лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного, субконъюнктивального введения и закапывания в глаз	АО «Вектор-Медика», Россия
Лайфферон®	Интерферон альфа-2b	раствор для приготовления раствора для внутримышечного, субконъюнктивального введения и закапывания в глаз	АО «Вектор-Медика», Россия
Альфарона®	Интерферон альфа-2b	лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения	ООО «Научно-производственное предприятие «Фармаклон», Россия
Офтальмоферон®	Интерферон альфа-2b+Дифенгидрамин	капли глазные	ООО «Фирн М», Россия

Таким веществом является, например, даларгин. Даларгин – препарат, полученный впервые в лаборатории синтеза пептидов Всесоюзного кардиологического центра, ныне Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Он представляет собой опиоидный пептид, являющийся аналогом эндогенного лейцин-энкефалина, проявляет неспецифическое сродство к μ , δ и κ опиоидным рецепторам, благодаря чему проявляет широкий спектр биологической активности, такой как обезболивающее, антиоксидантное, снижающее кислотность желудочного сока и экзокринно-секреторную активность

поджелудочной железы, проявляет гипотензивный и положительный хронотропный эффект [317].

На российском рынке зарегистрировано девять ЛП в виде растворов и лиофилизатов для приготовления растворов для внутримышечного и внутривенного введения. Основным показанием к применению является лечение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки в связи с выраженными репаративными способностями пептида в отношении эрозивно-язвенных поражений. Существует значительное количество публикаций, доказывающих способность даларгина к нормализации обмена веществ, стимуляции синтеза пролактина, индукции орнитин-декарбоксилазы, которая выступает маркером процессов регенерации, угнетению перекисного окисления липидов, стимуляции способности иммунокомпетентных клеток изменять пролиферативный ответ лимфоцитов и увеличивать количество активных Т-клеток, таким образом оказывать противовоспалительное действие. ЛВ увеличивает сосудистую проницаемость, активирует лимфоотток, диапедез и фагоцитарную активность лейкоцитов. Кроме того, обладает кардиоваскулярными, а именно ангиоангиальным, антиатерогенным, антифибриляторными эффектами [25].

Ряд публикаций и патентов предлагают использовать даларгин в терапии офтальмологических заболеваний, таких как глаукомная оптическая нейропатия, отслойка сетчатки, дистрофические заболевания роговицы, буллезной кератопатии [39, 52, 53, 54, 55]. Даларгин способен стимулировать иммунный ответ на воспаление за счет увеличения образования антител, ускоряя процесс регенерации, восстанавливая тем самым функцию тканей глаза. Кроме того, есть данные, что даларгин способен подавлять ряд вирусных инфекций путем связывания с гликопротеиновой поверхностью вируса и достижения внутренней части эндосомы путем эндоцитоза, блокирования слияния вирусной и эндосомальной мембран и последующей деградацией вируса с высвобождением вирусной РНК [317].

Еще одним показанием к применению субстанции интерферона альфа-2b является лечение герпетической инфекции. По данным на апрель 2023, герпесвирусная инфекция является одним из самых распространенных вирусных

заболеваний в мире: подтипом 1 инфицированы около 3,7 миллиарда человек, что составляет 67% населения, а подтипом 2 около 491 миллионов человек (13% населения) [11]. Герпетическая инфекция относится к высококонтагиозным, хроническим заболеваниям, так как возбудитель не поддается окончательной эрадикации из организма после лечения [327]. В России ежегодно не менее двадцати трех тысяч человек переносят герпетическую нейроинфекцию, летальность которой составляет от 5 до 70%, 250–300 тысяч человек болеют офтальмогерпесом, и около 8 млн человек генитальным герпесом, 10–12 млн – герпесом оролабиальным и герпесом гладкой кожи. Герпетическая инфекция более распространена, чем все гепатиты В, С, D и вирус иммунодефицита человека вместе [10].

Оба подтипа вируса могут вызывать как лабиальные, так и генитальные формы заболевания. Визуально эти формы проявляются образованием высыпаний в виде болезненных пузырьков на поверхности кожи и слизистых оболочек. Помимо местных симптомов, возникающих, как правило, при ослаблении иммунитета в организме вирусоносителя, герпесвирусная инфекция также может давать осложнения, связанные с поражением нервной системы, такие как острый асептический менингит у взрослых и неонатальный энцефалит [136, 145].

В связи с широкой распространенностью данного заболевания является актуальным вопрос поиска новых эффективных ЛП или создания комбинированных ЛС, обладающих широким терапевтическим действием. Препараты местного действия для лечения герпетических инфекций на российском фармацевтическом рынке представлены несколькими активными фармацевтическими субстанциями (далее – АФС): ацикловиром, бромнафтохиноном, тромантадином, эпервудином, пенцикловиром, алпизарином и интерфероном альфа-2b. Существует вероятность развития резистентности у вирусов герпеса к синтетическим препаратам [349, 387], а интерферон альфа-2b, являющийся аналогом человеческого интерферона резистентность вызывать не может, кроме того, он безопасен для применения у всех возрастных групп пациентов.

В России зарегистрировано четыре препарата с интерфероном альфа-2b для лечения герпетической инфекции (таблица 1.3), три из них это монопрепараты, а один комбинированный с ацикловиром и лидокаином. Основными показаниями к применению являются герпетические поражения кожи и слизистых оболочек лица, гениталий. Однако, нужно сказать, что применение интерферона на слизистой ротовой полости для лечения герпетического стоматита и гингивита обосновано, так как белок способен проникать через слизистые и устойчив при pH ротовой полости, а вагинальное применение не обосновано, так как при pH ниже 5,5 активность интерферона резко падает.

Таблица 1.3 – МЛФ на основе интерферона, зарегистрированные в РФ, по данным Государственного реестра лекарственных средств [17]

Лекарственный препарат, торговое название	Состав действующих веществ	Лекарственная форма	Производитель
Виферон	Интерферон альфа-2b	гель для наружного и местного применения	ООО «ФЕРОН», Россия
Виферон	Интерферон альфа-2b	мазь для наружного и местного применения	ООО «ФЕРОН», Россия
Герпферон	Интерферон альфа-2b+ацикловир+лидокаин	мазь для местного и наружного применения	ООО «Фирн М», Россия
Инфагель	Интерферон альфа-2b	гель для местного и наружного применения	АО «Вектор-Медика», Россия

После первичного заражения вирус герпеса реплицируется в очаге инфекции и движется по немиелинизированным сенсорным волокнам к ганглию тройничного нерва, где устанавливается латентность. Провоцирующие факторы, такие как психологический или физиологический стресс, ультрафиолетовое излучение, травмы, менструации, лихорадочные заболевания и др. могут спровоцировать реактивацию вируса [164]. Течение заболевания при рецидивирующем герпесе обычно протекает в несколько стадий. На предшествующей стадии могут возникать ощущения боли, покалывания или жжения в пораженной области. За

этим следует появление пятна, которое превращается в папулу и приводит к образованию пузырька. Пузырь лопается и начинается образование мягкого струпа. Впоследствии мягкий струп заменяется твердым. Со временем струп отпадает, и очаг поражения полностью заживает без образования рубцов. Во время заживления процесс часто сопровождается такими симптомами, как боль и дискомфорт. Полное заживление занимает от семи до десяти дней [164, 325].

В состав комбинированного ЛП с интерферон альфа 2- β возможно включать субстанции, которые будут ускорять процесс заживления и снимать болезненные ощущения. Одним из самых распространенных веществ, обладающих ранозаживляющим действием является декспантенол. Он хорошо всасывается при местном применении и превращается в пантотеновую кислоту, которая является компонентом кофермента А и необходима для физиологической функции эпителия. Декспантенол поддерживает регенерацию кожи за счет усиления дифференцировки эпидермиса и облегчает заживление ран как на коже так и на слизистых оболочках; также обладает противовоспалительным действием, является увлажняющим средством, компенсируя снижение гидратации за счет увеличения содержания воды и благотворного влияния на молекулярную подвижность липидов и белков рогового слоя [188, 413].

Широко используемое обезболивающее средство - лидокаин. Этот анестетик был внедрен в клиническую практику с 1940-х годов и широко используется до сих пор во всем мире. Доказана его эффективность в лечении постгерпетической невралгии. Он является неселективным блокатором натриевых каналов, воздействующим на сенсорные афференты небольших поврежденных или дисфункциональных болевых волокон в месте нанесения, действует путем стабилизации мембран нейронов и влияет как на генерацию, так и на проведение нервных импульсов, может также активировать некоторые раздражающие рецепторы на кератиноцитах и иммунных клетках, что способствует его обезболивающему эффекту [284, 433].

Описанные в данном разделе субстанции, представляющие собой вирусы и белки: бактериофаги, эндолизины и интерферон альфа 2- β , относятся к

биотехнологическим лекарственным веществам. При разработке лекарственных форм на их основе необходимо учитывать их лабильность, то есть чувствительность к температуре, pH, буферной ёмкости, электролитам, детергентам и т.д., поэтому необходимо уделять большое внимание обоснованному выбору ВВ и технологии производства, так как от них будет зависеть стабильность, а следовательно и эффективность готовой лекарственной формы.

1.2. Определение, классификация гидрофильных мягких лекарственных форм

1.2.1. Определение гидрофильных мягких лекарственных форм

Традиционные системы доставки лекарств, представляющие собой МЛФ имеют длинный список ограничений в применении, связанных с низким высвобождением из ЛФ действующих веществ, образованием гидрофобных пленок на наносимой поверхности или наличием в составе большого количества сурфактантов. ГМЛФ не имеют данных недостатков, могут применяться в различных областях, включая заживление ран, глазные, вагинальные системы, каркасы для тканевой и костной инженерии и т.д. [88]

Гели как ЛФ обладают рядом несомненных преимуществ, выделяющих их по сравнению с другими МЛФ, а именно [36]:

1. это гидрофильные системы, обладающие в том числе настраиваемыми свойствами, в зависимости от состава и структуры полимеров, на основе которых разработаны;
2. благодаря наличию в составе ЛФ более 80% воды, не раздражают кожу, слизистые оболочки, не нарушают газообмен кожных покровов;

3. при нанесении на кожу образуют тонкие пленки, обеспечивая полное высвобождение ЛВ из ЛФ, способны к пролонгированному высвобождению;
4. с потребительской точки зрения комфортны при применении, имеют рН близкое к поверхности, на которую наносятся, обладают охлаждающим эффектом при дерматологическом применении, не оставляют жирных следов на одежде;
5. с технологической точки зрения относительно просты в изготовлении, не требуют сложного высокотехнологичного оборудования для производства и сложных методов очистки оборудования, так как чаще всего являются однофазными гидрофильными системами;
6. в состав ЛФ можно вводить различные по физико-химическим свойствам ЛВ, в том числе термолабильные, требующие асептического изготовления;
7. имеют оптимальные структурно-механические свойства, высокую намазываемость, тиксотропию, окклюзионные свойства;
8. обладают свойствами биodeградации, поэтому применяются в имплантационных и инъекционных системах;
9. могут использоваться в пероральных системах для пациентов, страдающих дисфагиями;
10. оптимальны из всех МЛФ для нанесения на слизистые оболочки глаза, ротовой полости, носа, влагалища, так как имеют выраженные биоадгезивные свойства .

ГФ РФ и ГФ ЕАЭС описывают гели в общих фармакопейных статьях 1.4.1.0008 и 2.5.1.40 «Мягкие лекарственные формы», соответственно.

В последние годы наблюдается неуклонно высокий уровень интереса к лекарственной форме «гели», который не только сохраняется на протяжении длительного времени, но и демонстрирует стабильность и устойчивость. С начала 2022 года ситуация с активностью научных исследований и публикаций в области ЛФ гелей достигла нового уровня: количество статей и работ, посвященных этой теме, превысило отметку в пять тысяч ежегодно. Данные, представленные на рисунке 1.1, были получены из биомедицинской базы данных PubMed с использованием поисковых запросов “фармацевтические гели”.

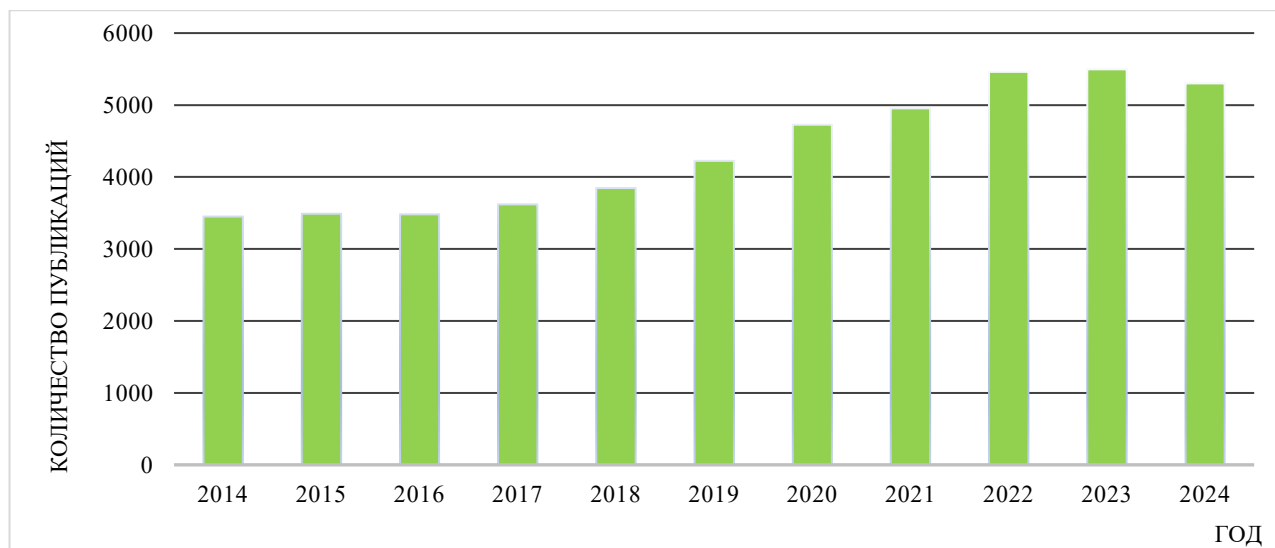


Рисунок 1.1 – Количество публикаций, посвященных гелям в области биомедицины за последние десять лет

1.2.2. Классификация гелей как лекарственных форм

Гели – это системы, состоящие из высокомолекулярного или низкомолекулярного полимера (полимеров), образовавшего трехмерную сеть в воде за счет химических ковалентных связей или физических не ковалентных связей. Гели обладают одновременно свойствами твердого тела и жидкости, а именно, текучести и пластичности, и одновременно прочности и упругости [7, 36, 104]. В соответствии с ОФС.1.4.1.0008 «Мягкие лекарственные формы» ГФ РФ и 2.5.1.40 «Мягкие лекарственные формы» ГФ ЕАЭС гели являются коллоидной дисперсией, образованной путём гелеобразования, полимер в них обладает частичной растворимостью, не образуя истинных растворов, но при этом данная система и не является суспензией [51]. В этих монографиях также приводятся определения гидрогелей и олеогелей, где под первыми подразумевают гели, образованные гидрофильными гелеобразователями и водой или гидрофильным неводным растворителем, а под вторыми – гели, полученные из липофильного гелеобразователя и гидрофобного растворителя. Олеогели, являются трехмерными структурами, образованными полимерами в органическом растворителе или как

частный вариант, растительном масле [138, 181, 200, 209, 262, 290, 320, 370, 371].

В Европейской Фармакопее 11.5 гели описаны в двух монографиях: «Гели» и «Гели для инъекций». Согласно этому документу, гели представляют собой полутвердые препараты для нанесения на кожу, состоящие из однофазной жидкой основы, «загущенной» подходящим гелеобразующим агентом. В Фармакопее Соединенных Штатов Америки (USP 43) гели также выделены в отдельную статью и описаны как полутвердые системы, представляющие собой тонкие коллоидные суспензии из неорганических частиц или органических молекул, образовавших трёхмерную сеть в воде.

Мировые фармакопеи выделяют гели как индивидуальную лекарственную форму вследствие того, что их свойства отличаются от других МЛФ, поскольку их физико-химические свойства, структура определяются полимером (гелеобразователем) входящие в состав ЛФ.

Гели могут быть классифицированы по типу дисперсной системы на гомогенные, суспензионные и эмульсионные гели. Гомогенные гели, однофазные, образованы гидрофильным полимером и водой. Двухфазные гели, могут быть суспензионными и эмульсионными. В суспензионных гелях твердые частицы ЛВ равномерно распределены по ЛФ за счет трехмерной структуры гелеобразователя или за счет поверхностно-активных свойств полимера или дополнительно введенного в состав эмульгатора. В эмульсионные или дифильные гели представляет собой эмульсию типа масло в воде или вода в масле, которая превращается в гель путем ее смешивания с гелеобразующим агентом. [101, 393, 419].

По пути введения гели классифицируют на дерматологические, для нанесения на раны, офтальмологические, вагинальные, ректальные, ушные, назальные, оральные, пероральные, имплантационные и др. гели.

В государственном реестре ЛС РФ на июнь 2024 года зарегистрировано 291 препарат в виде ЛФ «гель». По пути введения процентное соотношение зарегистрированных ЛП распределено следующим образом: более 80% составляют ЛФ для наружного и местного применения, которыми являются дерматологические

гели и гели для нанесения на раны и ожоги, следующими по распространенности стали гели для применения в полости рта (5,5%), затем гели для приема внутрь (4,2%), потом вагинальные (2,4%) и офтальмологические (2,0%) гели, и единичные для остальных способов применения, что показано на рисунке 1.2. [17].

По типу высвобождения выделяют ГМЛФ с не модифицированным и с пролонгированным или контролируемым высвобождением. К современным системам доставки ЛВ на основе полимеров относятся «smart gels» на основе материалов, которые способны реагировать на ряд физиологических раздражителей, присутствующих в организме, таких как pH, ионная сила и температура. [141, 154, 191].

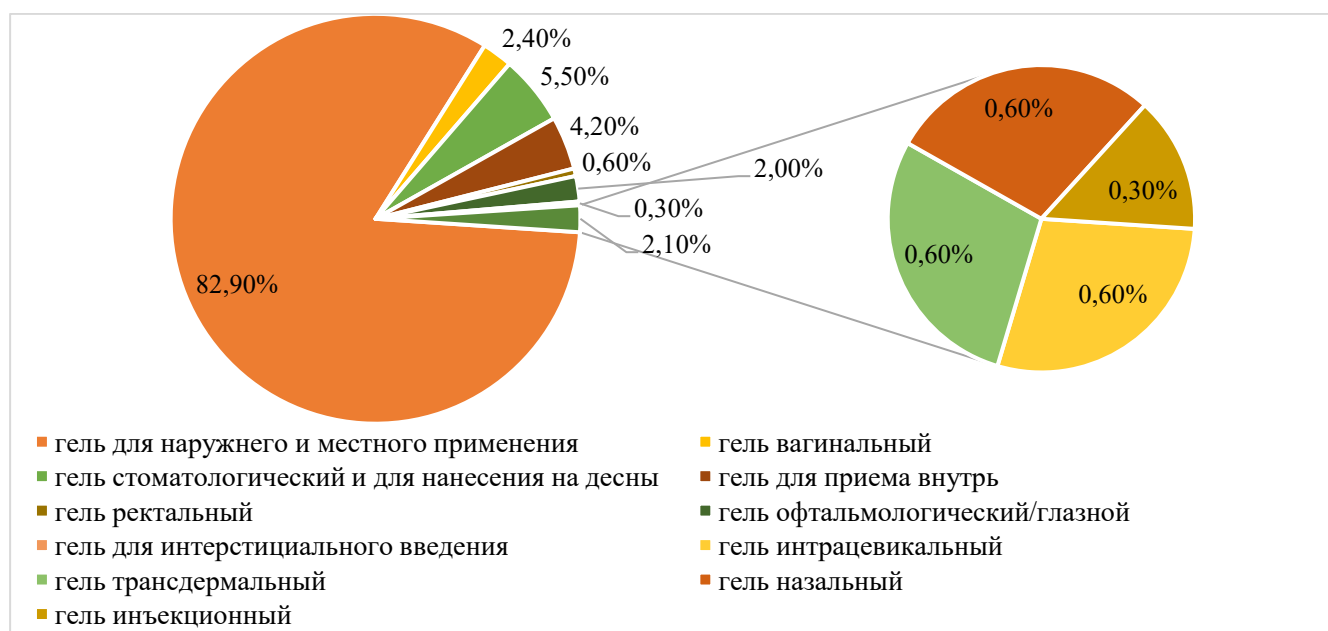


Рисунок 1.2 – Процентное соотношение зарегистрированных в РФ ЛП в виде ЛФ «гель» в зависимости от пути введения

1.3. Требования к качеству гидрофильных мягких лекарственных форм

В соответствии с приказом Минздрава РФ от 27 июля 2016 г. N 538н «Об утверждении перечня наименований ЛФ ЛП для медицинского применения»

выделяется 20 видов гелей. Требования к ним описаны в ГФ РФ и ГФ ЕАЭС. Фармакопейные требования к гелям и показатели качества, рекомендуемые для изучения в процессе разработки ЛФ на основании данных научных публикаций, приведены в сводной таблице 1.4 [1, 21, 22, 57, 58, 84].

1.3.1. Фармакопейные требования к гидрофильным мягким лекарственным формам

Гели как ЛФ должны согласоваться с требованиями ОФС «ЛФ» и выдерживать испытания, характерные для конкретной ГМЛФ в зависимости от способа применения. ГМЛФ должны соответствовать фармакопейным требованиям по: описанию, однородности по внешнему виду, массе содержимого упаковки, герметичности упаковки, однородности дозирования или количественному определению, МБЧ или стерильности (таблица 1.4). Для гелей в форме суспензий необходимо нормировать размер частиц. Для офтальмологических гелей, которые упакованы в металлические тубы, нормируется содержание металлических частиц. Если в составе гелей присутствуют вещества, способные подвергаться гидролизу, необходимо контролировать кислотное и пероксидное числа.

Обязательным является показатель качества – *pH*. Этот показатель оказывает значительное влияние на стабильность ЛВ в ЛФ, биодоступность и переносимость препарата, должен соответствовать поверхности, на которую наносится. При этом нормы для этого показателя в фармакопее отсутствуют.

Для дерматологических гелей pH в среднем должен составлять 5,5, хотя значение физиологического pH кожи колеблется в пределах 4,1–5,8 [331, 357]. При патологических состояниях кожи и в зависимости от возраста пациента pH изменяется, например, у доношенных детей в первый день жизни pH составляет от

6,0 до 7,1. Раневые и ожоговые поверхности имеют более щелочную реакцию около 6,5-8,0. Задача ЛП создавать рН способствующее заживлению [356, 429]

Различные слизистые оболочки в организме человека имеют различные значения рН и гели, наносимые на них, должны иметь близкое значение водородного показателя.

Для вагинальных ЛФ крайне важно не смещать значение рН в щелочную сторону, так как это приводит к развитию патогенной микрофлоры. Физиологическая кислотность влагалища у женщин зависит от возраста: до половой зрелости составляет 6-8, в период половой зрелости 3,5-4,5, во время и после менопаузы 6-7. Таким образом, гели для вагинального применения должны обладать кислотоустойчивостью и иметь слабокислое значение рН [172, 175, 263].

Нормальный средний рН слюны составляет 6,7 при диапазоне 6,2-7,6. рН полости рта поддерживается на уровне 6,7-7,3 за счет буферной способности слюны, при рН, равном 7, снижается частота возникновения кариеса и образования зубного камня, соответственно гели, применяемые в ротовой полости, должны иметь рН близкую к нейтральной [2].

Для офтальмологических лекарственных форм рН может находиться в широких диапазонах от 4,0 до 8,0, однако, когда значение кислотности не приближено к значению рН слезной жидкости, которое составляет от 6,3 до 7,8 при среднем значении 6,8. Если рН смещено в кислую сторону то пациент испытывает жжение, покалывание, покраснение и раздражение при применении препарата, что может в конечном итоге привести к отказу пациента от терапии [33, 252, 323, 330].

Системы интраназальной доставки являются перспективным неинвазивным способом транспорта ЛВ как для местного применения, так и для системного действия, и для доставки веществ в центральную нервную систему. Физиологическое значение рН среды носовой полости составляет 7,4. Большинство авторов предлагают использовать ЛФ со значением кислотности в диапазоне от 4,5 до 7,5 для предотвращения раздражения слизистой оболочки носа [213, 278, 417].

Доставка ЛВ в толстую кишку открывает доступ к уникальным терапевтическим целям и может повысить их биодоступность, одновременно

снижая риск побочных эффектов. Необходимо учитывать особенности физиологической среды толстой кишки. Кислотность кала здорового человека обусловлена жизнедеятельностью микрофлоры толстой кишки и равна 6,0–8,0, соответственно, гели, наносимые на данную область, должны иметь рН в том же интервале [47, 165, 358].

Вязкость гелей является фармакопейным показателем качества и описана в ОФС.1.2.1.0015 «Вязкость», однако этот параметр необязательно контролировать в готовой ЛФ, тем не менее его значение оказывает решающее влияние на терапевтическую эффективность ГМЛФ, стабильность при хранении, намазываемость, способность легко выдавливаться из упаковки. Вязкость это только один из реологических параметров, которые следует контролировать в процессе разработки ГМЛФ. С помощью метода ротационной вискозиметрии для гелей изучают динамическую и пластическую вязкость, предел текучести, степень и наличие тиксотропии. Кроме оценки постоянства реологических параметров в процессе хранения ЛФ, важно установить корреляцию между реологическими свойствами и структурой гелей, включая взаимодействие между диспергированными частицами и межфазное взаимодействие, кроме того, необходима разработка технологических методов оценки реологических параметров гелей, которые адекватно отражали бы их свойства [8, 246, 293, 296, 378, 423, 424].

Гель представляет собой многокомпонентную систему, образованную структурообразующим компонентом и абсорбируемой жидкостью, обычно низковязким растворителем (водой), способную удерживать большое количество влаги (>90%). Реологическая модель гелеобразования показана на рисунке 1.3 [51, 377].

Вязкость, η , исходного состава жидкости начинает расти из-за ее собственных межмолекулярных реакций, и в момент времени a (на рисунке 1.3) молекулярные взаимодействия приводят к образованию структуры, характеризующейся пределом текучести, σ_Y .

Таблица 1.4 – Требования к МЛФ в зависимости от пути введения

Наименование лекарственной формы	Фармакопейные требования										Не фармакопейные требования			
	описание	металлические частицы	герметичность упаковки	pH	масса содержимого упаковки	МБЧ	стерильность	количественное определение или однородность	консистенция (пенетрометрия)	вязкость	биоадгезия	намазываемость	осмотические свойства	адгезионные свойства
гель вагинальный	+	-	+	+	+	+	±	+	±	±	±	-	±	±
гель глазной/ офтальмологический	+	+	+	+	+	-	+	+	±	±	±	-	±	±
гель для инъекций	+	+	+	+	+	-	+	+	±	±	-	-	-	-
гель для местного применения/для наружного применения	+	-	+	+	+	+	±	+	±	±	-	±	±	±
гель для нанесения на десны/ стоматологический/ для нанесения на слизистую оболочку полости рта/зубной/ гель периодонтальный	+	-	+	+	+	+	±	+	±	±	±	-	±	±
гель для подкожного введения	+	+	+	+	+	-	+	+	±	±	-	-	-	-
гель для приготовления суспензии для приема внутрь/ гель для приема внутрь	+	-	+	+	+	+	-	+	±	±	-	-	-	-
гель кишечинальный	+	-	+	+	+	±	±	+	±	±	-	-	-	-
гель назальный	+	-	+	+	+	+	-	+	±	±	±	-	±	±
гель ректальный	+	-	+	+	+	+	-	+	±	±	±	-	±	±
гель трансдермальный	+	-	+	+	+	+	-	+	±	±	-	±	±	±
гель уретральный	+	-	+	+	+	-	+	+	±	±	±	-	±	±
гель ушной	+	-	+	+	+	+	-	+	±	±	±	-	±	±
гель эндоцервикальный	+	-	+	+	+	±	±	+	±	±	±	-	±	±

* «+» - обязательный показатель; «±» - рекомендуемый показатель; «-» - не требуется определение

Это соответствует переходу из жидкого состояния в текучее, которое существует в течение временного интервала ag . Этот интервал состоит из двух частей: гелеобразного состояния (при напряжениях ниже σ_Y) и жидкого состояния (при напряжениях выше σ_Y), как показано стрелками на рисунке 1.3.

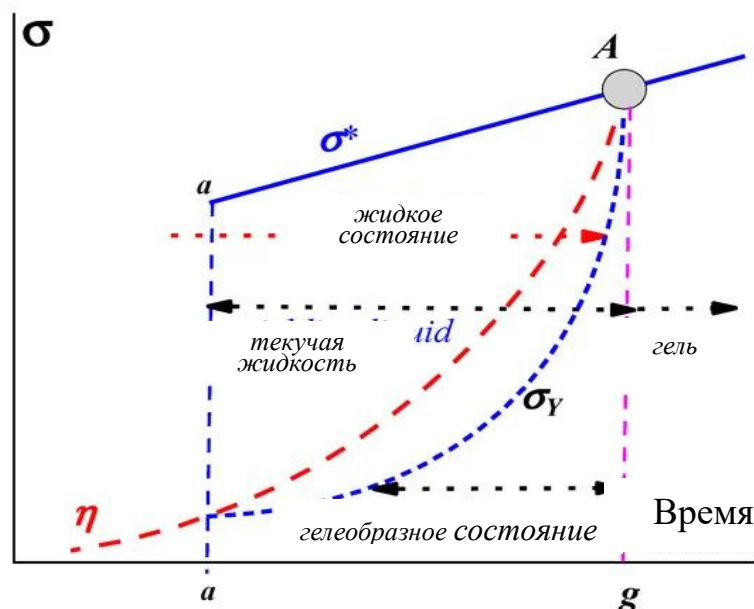


Рисунок 1.3 – Реологическая модель гелеобразования

Вещество в жидком состоянии может демонстрировать различные реологические свойства, включая вязкую текучесть и/или вязкоупругие деформации, в зависимости от приложенного напряжения и времени его действия. Верхний предел это напряжение σ^* (сдвиговое или нормальное), при котором гели разрушаются. Гели характеризуются определенной прочностью, разрушение геля, как и любого твердого вещества, связано с высвобождением накопленной упругой энергии. Таким образом, существуют два характерных параметра вещества — прочность, σ^* , и предел текучести, σ_Y . В процессе гелеобразования оба показателя со временем увеличиваются и в какой-то момент становятся равными в точке A. Это означает, что рассматриваемый объект становится настоящим не текучим гелем. Между тем граница между растворами и гелями может быть не жесткой, а несколько размытой. Это зависит от природы межмолекулярных взаимодействий. Ось X может обозначать не только время, но, например, температуру или изменение состава матрицы из-за добавления определенных химических веществ [124, 385].

Золь–гель-переход происходит со временем, его также можно рассматривать как переход через предел текучести, поскольку, согласно физическому смыслу, это переход из жидкого состояния в твердое. В технологической практике широко используются довольно простые “визуальные” методы перехода золя в гель. Они основаны на стандартной оценке момента потери текучести.

Измерение предела текучести, σ_y , вязкопластичных сред не однозначная задача [131, 132]. Значение предела текучести отражает прочность структуры, которая создается в результате межмолекулярных взаимодействий различных типов. Верхний предел предела текучести зависит как от природы связей, так и от концентрации структурообразующих компонентов. При расчете предела текучести существует несколько вариантов экстраполяции данных, уравнения Ньютона, Оствальда, Бингама, Кэссона, Гершель-Балкли. Предпочтение отдают той модели, которая наиболее точно описывает экспериментальные данные. Для фармацевтических гелей как правило пользуются моделями Бингама или Кэссона [294, 322, 442].

ГФ РФ для МЛФ предлагает определять консистенцию в соответствии с ОФС.1.4.2.0026 «Определение консистенции методом пенетрометрии». Пенетрометрия не требует дорогостоящего оборудования, специального программного обеспечения, более простая и быстрая с методической точки зрения по сравнению с ротационной вискозиметрией и дает представление о вязкости и пластичности ЛФ.

1.3.2. Не фармакопейные требования к гидрофильным мягким лекарственным формам

Для ГМЛФ, наносимых на слизистую оболочку и раневую или ожоговую поверхность немаловажной характеристикой является осмотическая активность, то есть способность ЛФ поглощать влагу с поверхности, на которую нанесена.

Данный параметр не является фармакопейным, однако ряд авторов предлагают его контролировать на этапе фармацевтической разработки [23, 25, 38].

Если гели обладают высокой **осмотической активностью**, то они могут вызывать неприятные ощущения у пациентов при нанесении на слизистые оболочки, особенно глаз, носа и влагалища. При этом наличие осмотической активности у ЛФ для лечения гнойных ран, инфицированных ожогов, пролежней, обморожений и других патологий, характеризующихся наличием экссудата, положительно сказывается на терапевтическом эффекте, так как происходит его удаление из раны и ускорение регенерации [25, 23, 38, 48, 82].

Некоторые МЛФ обладают **адсорбционной активностью**, которая определяется по способности сорбировать краситель метиленовый синий, и позволяет судить о возможности сорбции на ЛФ вирусных и бактериальных агентов, что может способствовать увеличению терапевтического эффекта гелей с антимикробным действием. Данная характеристика также не описана в регламентирующих документах, но широко используется в научных исследованиях [30, 38, 76, 85].

С биофармацевтической точки зрения одной из важнейших характеристик всех препаратов является **скорость и полнота высвобождения ЛВ из ЛФ**. Однако для оценки трандермального и дермального транспорта не существует фармакопейных методов. Высвобождение терапевтического средства из состава, нанесенного на поверхность кожи, или слизистой оболочки и его транспортировка в системный кровоток представляет собой многоступенчатый процесс: высвобождение ЛВ из ЛФ, проникновение во внешний слой кожи, роговой слой, диффузию через него, главным образом по липидному межклеточному пути, выделение из рогового слоя в эпидермис, диффузия через эпидермис в верхние слои дермы и попадание в местную капиллярную сеть и, в конечном итоге, в системный кровоток [49, 81, 260, 319].

Для оценки высвобождения МЛФ используют методы, основанные на диализе, чаще всего применяют метод равновесного диализа через полупроницаемую мембрану, поскольку метод прост и не требует сложного

оборудования. Кроме того, используют приборы I и II, описанные в ОФС.1.4.2.0017 «Растворение для пластырей трансдермальных» (рисунок 1.4). Лимитирующим фактором при использовании данных методов является мембрана, имитирующая кожный покров, размер пор диализной мембраны будет определяющим фактором данного исследования напрямую влияющим на скорость и степень высвобождения ЛВ из МЛФ, поэтому к этим методам прибегают для сравнения высвобождения при разработке ЛФ из различных основ [81].

Американская фармакопея USP 37 для проведения теста растворения мягких или жидких фармацевтических форм, таких как кремы, мази, глазные капли, регламентирует тестеры, рабочей частью которых является ячейка вертикальной диффузии или «ячейка Франца» (рисунок 1.4) [425]. Этот метод так же предполагает использование синтетических диализных мембран, что не дает корреляции с трандермальным высвобождением ЛВ из ЛФ у человека [155, 159, 218].

Методы *in vitro* разрабатываются для оценки качества ЛФ вместо экспериментов *in vivo* для прогнозирования чрескожного всасывания ЛВ для разработки ЛП и стандартизации. Ряд авторов предлагает использовать в диффузионной ячейке, иссеченную кожу животных. Исследования чрескожного всасывания у человека и других видов млекопитающих выявили умеренную корреляцию между методами *in vitro* и результатами *in vivo*, при условии, что методы исследования учитывали источник кожи, окклюзию кожи, время воздействия, состав среды растворения и площадь диффузии [281]. Наиболее распространенной моделью является кожа свиньи [223], некоторые авторы предлагают использовать кожу лягушек для изучения трандермального транспорта ЛВ [288], наиболее перспективным является использование реконструированного эпидермиса человека. Созданы трехмерные модели эпидермиса человека, например, полученные из первичных кератиноцитов новорожденных [174], из плюрипотентных стволовых клеток человека [226]. Биопечать является многообещающим альтернативным методом создания заменителей кожи, в том числе, и для изучения показателей качества МЛФ [309].

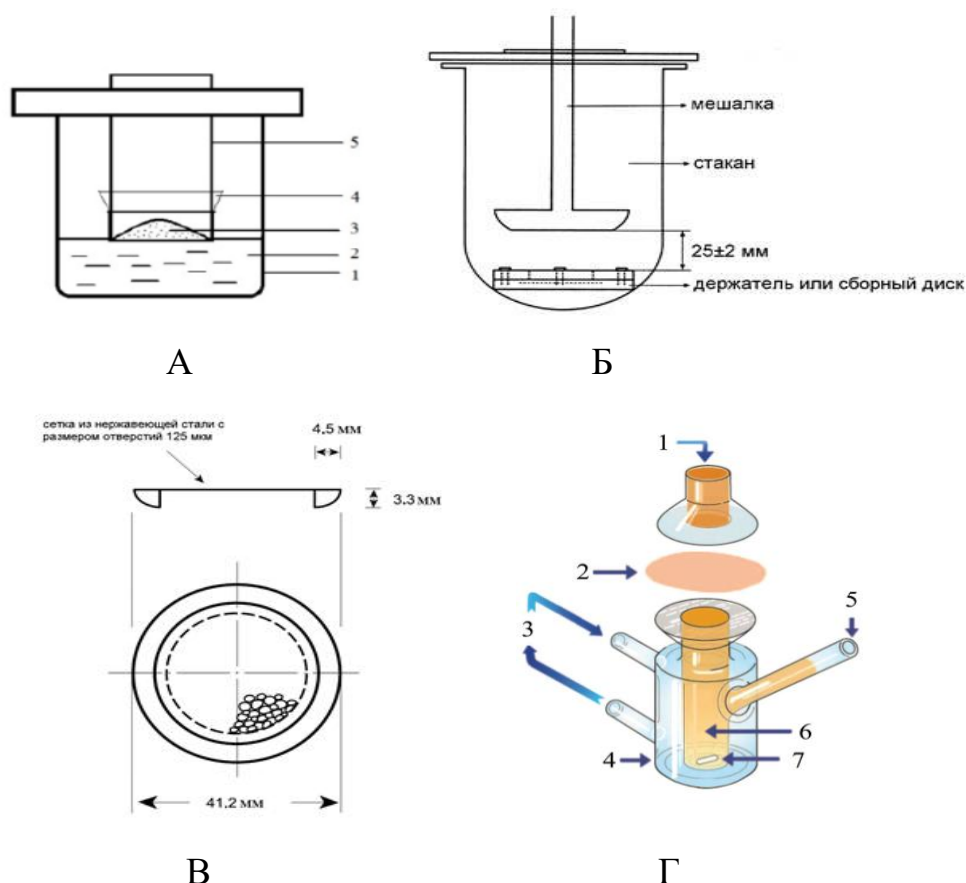


Рисунок 1.4 – Приборы для изучения высвобождения их ГМЛФ:
 А-схема аппарата для равновесного диализа: 1 – камера для диализа; 2 – диализная среда; 3 – исследуемая ЛФ; 4 – полупроницаемая мембрана; 5 – диализатор; Б – Прибор 2 ОФС ОФС.1.4.2.0017; В – схема сборного диска прибора 2 ОФС ОФС.1.4.2.0017; Г - вертикальной диффузии (ячейка Франца): 1 – донорное соединение; 2 – мембрана; 3 – нагрев/циркуляция; 4 – водяная рубашка; 5 – порт отбора проб; 6 –рецепторная камера; 7 – магнитная мешалка

Для ГМЛФ, предназначенных для применения на слизистых оболочках крайне важным является определение их **биоадгезивных свойств**. Термин "биоадгезия" впервые был введен в 1980-х годах, для ЛП с высокой степенью удерживания на биологических поверхностях [139]. Мукоадгезия, частный вариант биоадгезии, под которым понимают процесс взаимодействия ЛФ со слизистыми оболочками [89, 307]. Часто эти термины используются как синонимы. ЛФ, обладающие биоадгезивными свойствами, имеют преимущества, так как при увеличении времени удерживания на поверхности увеличивается всасывание ЛВ биологическими мембранами, что приводит к повышению терапевтического эффекта ЛП [41]. Биоадгезивные свойства ЛФ придают полимеры,

представляющие собой гидрофильные макромолекулы, содержащие многочисленные функциональные органические группы (карбоксильные, гидроксильные, амидные, аминогруппы и др.), которые взаимодействуют с муцином слизистых оболочек за счет ковалентных связей, ионных сил, гидрофильных взаимодействий и сил Ван-дер-Ваальса [183]. Для оценки степени биоадгезии готовых ЛФ или вспомогательных веществ используют различные методы как *in vitro*, так и *in vivo*. Методы *in vitro* предпочтительнее, поскольку они экономически более эффективны, относительно просты в выполнении и требуют меньше времени. Они используются для скрининга биоадгезивных вспомогательных веществ перед разработкой рецептуры или для тестирования экспериментальных образцов готовых ЛФ, позволяют проводить эксперименты без использования моделей на животных, однако обычно разрабатываются собственными силами и не валидируются.

Было предложено множество методов, которые используются для количественной оценки мукоадгезивных свойств фармацевтических ЛФ, включая прочность на растяжение, реологию, эллипсометрию, атомно-силовую микроскопию, калориметрию, инфракрасную, УФ-видимую спектроскопию поглощения и флуоресцентную эмиссию, методы рассеяния и ядерный магнитный резонанс. Первые два метода изучают физическое взаимодействие ЛФ или ВВ со слизистой оболочкой, а спектроскопические и оптические методы определяют их сродство к муцину на молекулярном уровне [89, 122, 183, 248, 255].

Остановимся на самых используемых методах. Самым распространенным является определение биоадгезии с помощью испытаний на растяжение, состоящим из трех фаз. Сначала ЛФ приводят в плотный контакт с субстратом, слизистой оболочкой или материалом ее имитирующим, для достижения заранее определенного усилия сжатия. Затем сила контакта поддерживается постоянной, и на этом этапе развиваются межфазные взаимодействия, ЛФ отделяется от поверхности с заданной скоростью деформации. Усилие регистрируется как функция смещения, и для характеристики мукоадгезивной прочности используется либо усилие отрыва (максимальное значение усилия), либо работа адгезии

(абсолютная площадь под кривой). Эти измерения могут быть выполнены при *ex vivo* и даже в условиях *in vivo* [95, 123, 178]. Этот тест может быть проведен с помощью модифицированных весов, анализатора текстур, устройства для растяжения или динамического анализатора угла контакта (рисунок 1.5). Анализатор текстур используется для измерения и количественной оценки фундаментальных, эмпирических и имитационных тестов на сжатие и на растяжение, охватывающих те, которые связаны с анализом текстуры, свойства материалов, а также влияния реологии твердых, полутвердых, вязких систем для широкого круга материалов.

Тестер на растяжение предназначен для оценки прочности на растяжение, отслаивание и разрыв материалов различной природы, используется для оценки качества пленок, нетканых и композитных материалов и др. Динамический измеритель угла контакта позволяет измерить статический угол соприкосновения методом "стоп-падение", динамический угол соприкосновения (включая прямой угол соприкосновения, угол обратного соприкосновения и угол качения) методом наклонной пластины, кроме того, измеряет поверхностное натяжение жидкости, поверхностную энергию твердого тела и смачиваемость. Широко используется в биохимической промышленности, нанотехнологиях, технологии нанесения покрытий, водостойких материалах и других наукоемких исследованиях.

Второй по распространённости метод оценки мукоадгезивных свойств это изучение реологических параметров смесей слизи или муцина в растворе или геле с мукоадгезивными полимерами. Измерения вязкости при постоянной или изменяющейся скорости сдвига и определение механических вязкоупругих модулей при колебательном сдвиге используются для изучения текучих и не текучих систем, соответственно.

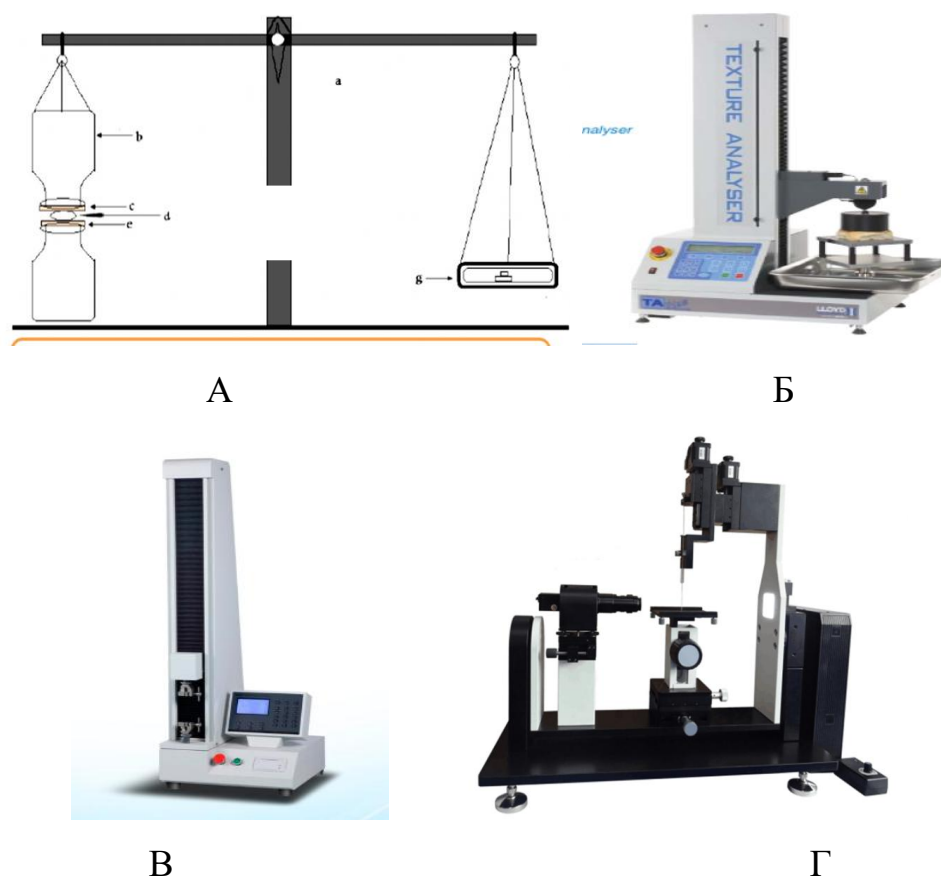


Рисунок 1.5 – Оборудования для определения предела прочности при растяжении и отрыве.

А – модифицированные рычажные весы: а – рычаг, b- устройство для удержания образцов ЛФ или ВВ и образцов слизистой оболочки; с – поверхность, к которой крепится ЛФ или ВВ; d -образец ЛФ или ВВ; e – слизистая оболочка или ее аналог; g – груз;

Б - анализатор текстур (LLOYD Instruments, TA plus Ametek, Великобритания);

В - электронный тестер на растяжение GBL-H (GBPI, Китай);

Г - динамический измеритель угла контакта (CY Scientific Instrument, Китай)

В общем случае, когда два различных макромолекулярных материала, например, полимер и муцин смешали в растворе, то возникают притягивающие, либо отталкивающие взаимодействия, что приводит к изменению реологического поведения смеси в отличие от индивидуальных компонентов. Силу мукоадгезии оценивают путем измерения увеличения вязкости, возникающей при смешивании раствора полимеров с коммерческим образцом муцина или экспериментально полученным образцам слизи [122, 169, 178, 376].

Еще один из вариантов изучения мукоадгезии это проточная система с ВЭЖХ-анализом или флуоресцентной меткой мукоадгезива. Схема метода

проточного анализа представлена на рисунке 1.6. Для проведения эксперимента используется канал, на который помещается ткань слизистой оболочки *ex vivo* (рисунок 1.6 2a). Затем на слизистую оболочку помещается образец ЛФ (рисунок 1.6 2b), и с помощью насосной системы на поверхность вымывается смоделированный биологический раствор (рисунок 1.6 2c), который собирается и анализируется для количественного определения концентрации мукоадгезива или лекарственного средства с помощью стандартных аналитических методов, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография (далее – ВЭЖХ). В качестве альтернативы мукоадгезив можно окрасить и сделать снимки, чтобы показать, как раствор удерживается непосредственно на слизистой оболочке [193, 280].

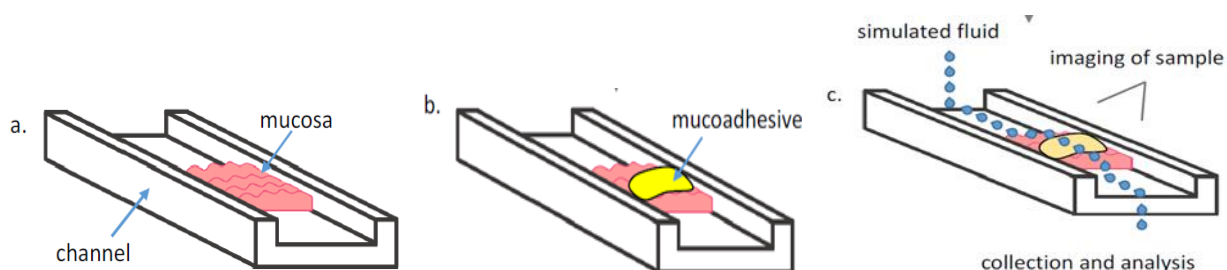


Рисунок 1.6 – Проточная система с ВЭЖХ-анализом или флуоресцентного мечения мукоадгезива

Общим для всех методов, используемых для оценки мукоадгезии, является использование тканей *ex vivo*. Наиболее адекватные данные по мукоадгезии получают с использованием тканей лабораторных животных, но срок хранения этих образцов ограничен несколькими часами после убоя, что создает неудобства и этические проблемы, связанные с использованием продуктов животного происхождения в исследованиях. Чаще всего используют ткани свиней, крупного рогатого скота и кроликов. Для замены и стандартизации тканей животных исследователи используют «имитаторы» слизистой оболочки, например, лиофилизированную дерму свиньи после регидратации, дубленую кожу свиньи [171].

Другой альтернативой тканям *ex vivo* для тестирования мукоадгезии является использование клеточной культуры. Некоторые клеточные линии могут быть

выращены таким образом, что на их поверхности образуется слизь, которая впоследствии может быть использована для тестирования мукоадгезии. Например, Keely, S. et al. использовали клеточную линию HT29-270 MTX-E12 для выращивания монослоя бокаловидных клеток, секретирующих слизь. После выделения слоя слизи на поверхности клеток монослой подвергали воздействию раствора флуоресцентного полимера. Количество полимера, прилипшего к слизи, можно было рассчитать, измерив интенсивность флуоресценции свободного полимера [242].

Ряд авторов предлагают использовать полностью синтетические заменители слизистой оболочки. В работе McInnes et al. в качестве модели слизистой оболочки использовали агар для изучения мукоадгезивных назальных составов, однако не подтверждали наличие корреляции этого материала со слизистыми оболочками [297]. Кроме того, изучалась возможность использования для этих целей поливинилхлорида, полиметилметакрилата, N-сукцинилхитозана, альгината, этилцеллюлозы, полиакриламида и сополимера полиакриловой кислоты с полиэтиленгликолем на полипропилене и обнаружилась корреляция со слизистыми оболочками крупного рогатого скота, хотя достаточно незначительная [242, 405].

Для замены слизистых можно использовать восстановленный муцин свиного желудка, нанесенный на подложку, что дает адекватные воспроизводимые результаты [228, 244].

В последнее время появились новые синтетические материалы, разработанные для имитации слизистой оболочки. Например, для оценки ЛФ Khutoryanskaya O.C. соавт. использовали интерполимерные комплексы с водородными связями, образованные из полиакриловой кислоты и метилцеллюлозы на предметном стекле для тестирования мукоадгезивных таблеток [267]. Материалы из N-акрилоилглюкозамина и 2-гидроксиэтилметакрилата идентифицированы как хорошие имитаторы слизистой оболочки, обладающие сопоставимой адгезией [242]. Т. Eshel-Green с соавт. [208] разработали гидрогели диакрилата полиэтиленгликоля, содержащие свободные тиолы, которые служат тканеимитирующим субстратом. Свободные тиоловые группы включены для

имитации – SH групп богатых цистеином субдоменов гликопротеинов муцина. Несмотря на многообещающие результаты на синтетических гидрогелевых моделях, сложная химическая функциональность муциновых гликопротеинов частично утрачена. Были предприняты некоторые попытки разработать полусинтетические многокомпонентные модели слизистой оболочки и слизи, в которых частицы муцина иммобилизованы в гидрогелях [306] или муцин преобразуют в гели с добавками, [92, 414] хотя химическое сшивание или добавление полианиона к муцину может изменить его структуру, функциональные группы или заряд поверхности. Работа по созданию таких материалов продолжается, основной их недостаток, это цена и недоступность для коммерческого приобретения.

1.4. Гелеобразователи – основа для разработки гидрофильных мягких лекарственных форм

1.4.1. Классификация гелеобразователей

Существует несколько подходов к классификации гелеобразователей, основанных на источнике их получения, химической природе, составе, устойчивости к воздействию окружающей среды, степени сшивания, структуры, способности к биоразложению и ионного заряда (рисунок 1.7) [103, 233].

По источникам получения гелеобразователи можно разделить на природные, синтетические и полусинтетические полимеры. К гелеобразователям природного происхождения относят целлюлозу, хитозан, коллаген, альгинат, агарозу, гиалуроновую кислоту, желатин, фибрин и т.д. [444]. Этим полимерам присущи биосовместимость, способность к биологическому разложению, но относительно низкая стабильность и механическая прочность. В редких случаях эти полимеры

проявляют аллергические свойства, то есть они обладают потенциальными иммунологическими рисками [105, 253, 256, 315]. Синтетические полимеры получают путем полимеризации мономера, такого как поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль, полиакриловая кислота и полиакриламид и др. [218]. Полусинтетические полимеры представляют собой химически модифицированные природные полимеры или комбинацию природных и синтетических полимеров. Примером химически модифицированных природных полимеров является модифицированный метакрилоилом желатин или модифицированная акрилатом гиалуроновая кислота и др.

Классификация по полимерному составу:

- гомополимерные, получают из одного вида мономера;
- сополимерные состоят из двух и более типов мономеров, один - гидрофильный, расположенным в случайной, блочной или чередующейся конфигурации вдоль цепочки полимерной сетки;
- «мультиполимерные» получают из двух независимых сшитых синтетических и/или натуральных полимеров, образующие полупроницающие сетки (Semi-interpenetrating polymer networks, semi-IPNs) или взаимопроницающие полимерные сетки (Interpenetrating polymeric networks, IPN), что зависит от их состава. Гомо- и сополимерные гелеобразователи содержат один тип полимерной цепи, а гелеобразователи semi-IPNs и IPN имеют два или более типа полимерных цепей. Semi-IPNs представляют собой полимерную сетку, встроенную в линейные полимерные цепи без сшивающего агента. IPN образуются из двух или более полимерных сеток, которые сшиваются друг с другом с помощью сшивающего агента. По сравнению с гомо- и сополимерными гелеобразователями semi-IPNs и IPN обладают более высокой механической прочностью и свойствами набухания [103, 225, 232, 233].

Гелеобразователи классифицируются по четырем основным типам в зависимости от их электрической нейтральности или наличия заряда: нейтральные, ионные, амфотерные и цвиттерионные [103, 225, 233].

По типу поперечных связей гелеобразователи можно разделить на химически сшитые с постоянными соединениями, и физически сшитые с переходными соединениями, возникающими в результате переплетения полимерных цепей, физических взаимодействий, ионные, водородных или гидрофобных взаимодействий [225].



Рисунок 1.7 – Классификация гелеобразователей

Гелеобразователи способны обратимо набухать в воде и удерживать большой объем жидкости в набухом состоянии. Они могут быть сконструированы с регулируемой реакцией на условия внешней среды, то есть они могут резко изменять объем в ответ на различные физические и химические воздействия, где физические воздействия включают температуру, электрическое или магнитное поле, свет, давление и звук, в то время как химические воздействия включают pH,

состав растворителя, ионную силу. Степень набухания в ответ на изменения во внешней среде гелеобразователя может быть настолько значительной, что это явление вызывает фазовый переход [388].

Гелеобразователи делят на биоразлагаемые (биodeградируемые) и небiorазлагаемые (небиodeградируемые). Гелеобразователи являющиеся природными полимерами, такие как хитозан, альгинат, агароза, фибрин, и т.д., полностью биоразлагаемы. Разлагаемые гели, изготовленные из водорастворимых полимеров, таких как поливинилацетат, полиэтиленгликоль и поливинилпирролидон, разлагаются за счет разрыва «виртуальных» или ковалентных поперечных связей. Для многих видов биомедицинского использования биоразлагаемость является основным критерием использования материала для инъекционного или внутрисполостного применения. Небиodeградируемые гелеобразователи получают из синтетических полимеров, их широко применяют для разработки систем контролируемого высвобождения лекарственных средств, решения стоматологических проблем и заживления ран. В последнее годы уделяется много внимания разработке биоразлагаемых синтетических гелеобразователей, для достижения этой цели в полимерную основу или в поперечные связи вводятся лабильные связи (т.е. сложные эфиры, карбонаты, амиды и т.д.), эти связи имеют тенденцию к расщеплению в физиологических условиях химическими или ферментативными методами. Для контроля деградации разрабатываются составы с использованием сшивающих веществ, которые являются субстратами для общих и специфических матриксных металлопротеаз, которые также дают возможность дополнительно регулировать скорость деградации за счет использования комбинаций с различными количествами гидролитически разлагаемых сшивающих веществ. Большой интерес представляет контроль кинетики разложения гелеобразователей для таргетной доставки ЛВ. При имплантации ЛФ понимание механизма и скорости разложения гелеобразователя крайне важно, хотя оно зависит от широкого спектра факторов из-за сложности окружающей среды, а стабильность и эксплуатационные характеристики ЛФ зависят от биосовместимости и токсичности продуктов её распада [310].

1.4.2. Природные гелеобразователи

Каррагинаны получают из красных морских водорослей, в основном из представителей класса *Rhodophyceae*, они представляют собой смеси анионных линейных полисахаридов, состоящих из сульфатных или несульфированных звеньев галактозы, связанных между собой α -1,3-гликозидными и β -1,4-галактозными связями (рисунок 1.8) [163].

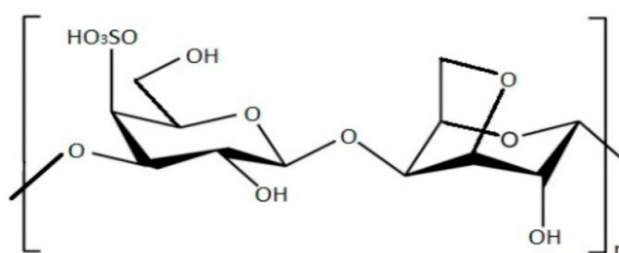


Рисунок 1.8 – Химическая структура к-каррагинана

Каррагинаны классифицируют на различные типы (к-каррагинан, i-каррагинан, λ -каррагинан, γ -каррагинан, ν -каррагинан, ξ -каррагинан, θ -каррагинан и μ -каррагинан) в зависимости от положения сульфатной группы, присоединенной к звену галактозы. Каррагинаны находят широкое применение в пищевой промышленности благодаря своей способности к гелеобразованию в качестве загустителей. Они одобрены в качестве пищевых добавок Управлением по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов (FDA) и Европейским агентством по безопасности пищевых продуктов [373], используются как эксципиенты в фармацевтическом производстве в основном в технологии твердых ЛФ и обладают собственным фармакологическим действием: проявляют антикоагулянтную и антитромботическую активность, противовирусные, противомикробные свойства, противоопухолевые эффекты и антиоксидантные, гипогликемические свойства [114, 115, 116, 245, 384, 435]. Каррагинаны имеют большой потенциал для использования в ЛФ, предназначенных для обработки ран, поскольку они способны поддерживать влажность раны и окружающей её области,

а также абсорбировать экссудат. Кроме того, они характеризуются низкой цитотоксичностью, не прилипают к раневой поверхности и являются биodeградируемыми. [152].

Каррагинаны легко растворимы в воде, хотя на растворимость влияют такие факторы, как температура, pH, ионная сила и присутствие катионов. Гидрофильная природа каррагинанов обусловлена сульфатными и гидроксильными группами, в то время как их гидрофобные характеристики в основном обусловлены 3,6-ангидро- α -D-галактопиранозными звеньями [289]. Каррагинаны в солевой форме обладают выраженной гелеобразующей способностью [238]. Доступные коммерческие марки каррагинанов образуют трехмерную сеть за счет сшивания близлежащих сульфатных групп, тогда как у λ -каррагинанов сульфатные группы не сшиваются и, соответственно, не способны образовывать гели. Каррагинаны обладают хорошей растворимостью в воде при повышенных температурах, после охлаждения в присутствии катионов Na^+ , K^+ или Ca^{2+} образуют термотропные и ионотропные гели. Гели на основе каррагинанов имеют низкую прочность, высокую степень набухания и низкую механическую стабильность. Кроме того, сложно контролировать и предсказывать процесс гелеобразования, стабильность и скорость разложения гелей на основе каррагинанов в физиологических условиях [151, 261].

Для преодоления данных недостатков полимеры подвергают химической модификации: окислению, метакрилированию, этерификации, тиолированию, ацетилированию и модификации альдегидом, или используют в составе гибридных гелей, то есть сочетают с другими гелеобразователями [227].

Альгинаты представляют собой природные анионные линейные полисахариды, источником которых являются бурые морские водоросли или, реже, из некоторые штаммов бактерий. Альгинаты образованы альгиновой кислотой с мономерными звеньями β -D-маннуроновой кислоты (M) и α -L-гулууроновой кислоты (G), соединенных 1,4-связями (рисунок 1.9) [106, 107, 156].

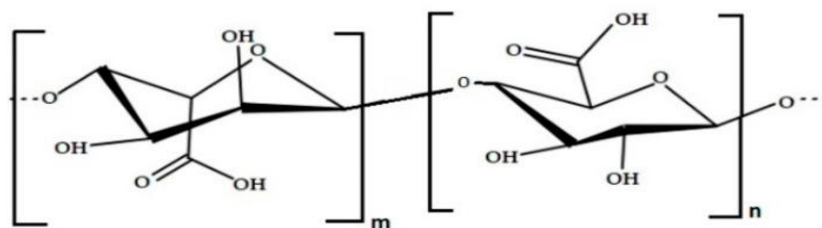


Рисунок 1.9 – Химическая структура альгиновой кислоты

Альгинаты имеют молекулярную массу в широком диапазоне, зависящем от соотношения М/Г, количества и длины монад (Г и М), диад (GG, MM, MG или GM) и частоты триад (MMG, GGM, MGM), которые предоставляют структурную информацию, влияющую на реологические свойства полимеров в растворе или в присутствии моновалентных (K^+ , Na^+) и дивалентных (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ионов. Расположение блоков Г и М в альгинатах, в зависимости от их природного источника, может быть последовательным (повторяющиеся блоки GGGG или блоки MMMM), чередующимся (GMGMGMGM) или случайным. Альгинаты коммерчески доступны в виде солей натрия, калия или аммония. Молекулярная масса коммерческих марок альгинатов обычно составляет от 60 000 до 700 000 дальтон, в зависимости от области применения [400].

Альгинаты способны образовывать гели независимо от изменений температуры. Гелеобразование может быть достигнуто двумя методами: ионного связывания с катионами (ионные гели) или кислотного осаждения (кислотные гели). Получение альгинатных гелей зависит от таких факторов, как тип используемого альгината (например, соотношение М/ Г), степень превращения в альгинат кальция, источник ионов кальция (хлорид, фосфат, лактат или ацетат кальция) и метод получения. В присутствии двухвалентных катионов, таких как кальций, происходит сильное взаимодействие между ионами и COO^- группами гулурановых кислот из разных цепей, создавая трехмерную решетку, нерастворимую в воде и термически необратимую. Эту структуру часто называют “коробкой для яиц” (рисунок 1.10) [156,399].

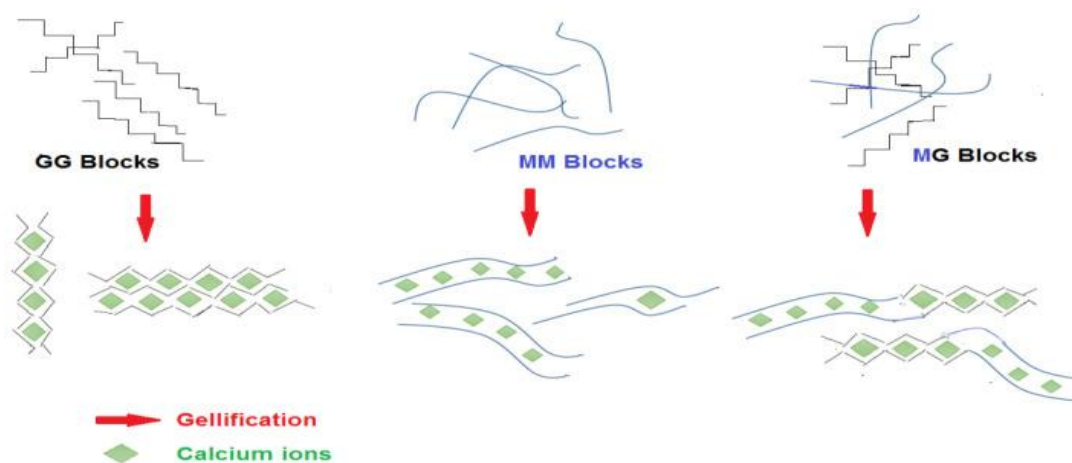


Рисунок 1.10 – Влияние кальция на содержание MG, MM и GG альгинатных единиц

Структура геля зависит от последовательности и состава альгинатной цепи. Эластичные гели состоят из альгината с высоким содержанием М, в то время как гели получаемые из альгината с низким соотношением М твердые и хрупкие. Прочность геля также зависит от степени взаимодействия альгината с двухвалентным катионом [192]. Альгинатные гели чувствительны к рН, что обусловлено присутствием групп COO^- в структуре. Начальное значение рН нативного раствора альгината обычно близко к 7,0, и показатель текучести уменьшается с уменьшением рН. При значении рН ниже 3,4 альгиновая кислота выпадает в осадок [363]. Гели альгинатов обладают термостойкостью, но могут проявлять синерезис во время цикла замораживания–оттаивания [93].

Альгинаты биосовместимы, обладают низкой токсичностью и высокой биодоступностью, более низкими затратами на экстракцию и очистку по сравнению с другими биополимерами. Благодаря рН-регулируемой реологии эти полимеры используются для создания систем с контролируемым высвобождением, как в виде твердых ЛФ, так и гидрогелей. Альгинатные гидрогели имеют преимущества для лечения ран, такие как уменьшение образования рубцов, стимулирование клеточной пролиферации, усиление активности цитокинов, снижение воспаления и создание влажной среды для раны [108, 109]. Их используют для создания конструкций раневых повязок, в процедурах регенерации тканей и инкапсуляции клеток. Гидрогели на основе альгинатов, обладают некоторыми сходными

свойствами с внеклеточным матриксом, таким образом, являясь перспективным материалом для тканевой инженерии и регенеративной медицины [150].

Камеди. Геллановую камедь в промышленных масштабах получают бактериальной экзополисахаридной ферментацией из *Pseudomonas elodea* или *Sphingomonas elodea*, и также могут выделять из *Sphingomonas paucimobilis*, но с меньшим выходом.

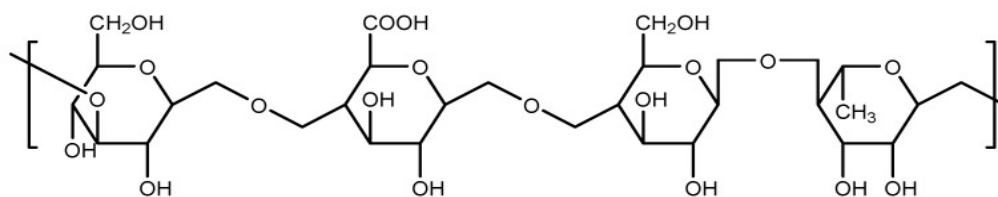


Рисунок 1.11 – Молекулярная структура геллановой камеди

Эта полимерная камедь содержит отрицательно заряженные линейные полисахариды, состоящие из четырех повторяющихся углеводов в основной цепи, которая включает два углевода D-глюкозы, одну D-глюкуроновую кислоту и одну L-рамнозу (рисунок 1.11). Молекулы геллана находятся в форме двойных спиралей при низких температурах и в виде беспорядочных витков при высоких температурах. Средняя молекулярная масса геллановой камеди составляет приблизительно 500 кДа [199].

Гели из геллановой камеди обладают прозрачностью, высокой прочностью на разрыв и приятным вкусом, температурной стабильностью в интервале от 10 - 45°C и устойчивостью к кислотным ферментам, стабильностью в диапазоне pH 3,0-5,0, хорошими мукоадгезивными свойствами, биоразлагаемостью, отсутствием токсичности и биосовместимостью. Этот полимер находит широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности в качестве загустителя, связующего вещества, стабилизатора, эмульгатора. Однако в составах МЛФ используются только для создания гибридных гидрогелей [97, 214, 372].

Ксантановая камедь представляет собой экзополисахарид, в основном вырабатываемый патогенными грамотрицательными бактериями рода *Xanthomonas*. Это водорастворимый углевод с целлюлозной основой, в качестве

повторяющегося звена находится целлобиоза, а боковая цепь состоит из D-маннозы, D-глюкуроновой кислоты (β -1,2) и D-маннозы (β -1,4), трисахарида, связанных друг с другом α -1,3 связями, как показано на рисунке 1.12. Относительный состав ксантановой камеди зависит от штамма *Xanthomonas*, используемого для его производства [101]. Она хорошо растворяется в воде как в горячих, так и в холодных условиях благодаря своим полиэлектролитным свойствам, для предотвращения агломерации необходимо постоянное перемешивание. Образует вязкие гели при низких концентрациях, которые демонстрируют высокую стабильность как в кислых, так и в щелочных средах. При увеличении температуры вязкость гелей снижается. На вязкость гелей влияют pH, концентрация буферного раствора и концентрация полимера в растворе. Средняя молекулярная масса цепей ксантановой камеди колеблется от 1×10^6 до 20×10^6 г/моль, которая варьируется в зависимости от условий ее биосинтеза [313].

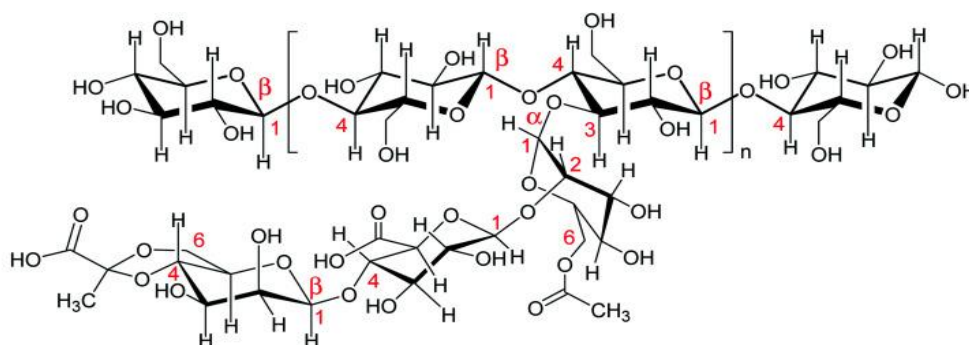


Рисунок 1.12 – Структура ксантановой камеди

Ксантановая камедь применяется в пищевой, нефтеперерабатывающей и фармацевтической отраслях. Этот полимер используют в разработке таблеток, гидрогелей, микросфер и мукоадгезивных гелей для длительного и контролируемого высвобождения лекарственных средств. Важными характеристиками ксантановой камеди для этих целей являются высокая стабильность при низком pH, что помогает защитить лекарственное средство от действия желудочного сока, и то, что скорость высвобождения лекарственного средства можно контролировать, изменяя pH среды высвобождения и ионную силу

[134, 440]. Для получения МЛФ ксантановая камедь используется как компонент сложных гидрогелевых и *in situ* систем [239].

Гуаровая камедь – это водорастворимый полисахарид, получаемый из семян *Cyamopsis tetragonolobus*, семейства бобовых. Она состоит из линейных цепочек (1,4)- β -d-маннопиранозильных звеньев с α -d-галактопиранозильными звеньями, соединенными (1,6) связями (рисунок 1.13). Эта камедь содержит около 80% галактоманнана, 12% воды, 5% белка, 2%, 0,7% золы и 0,7% жира.

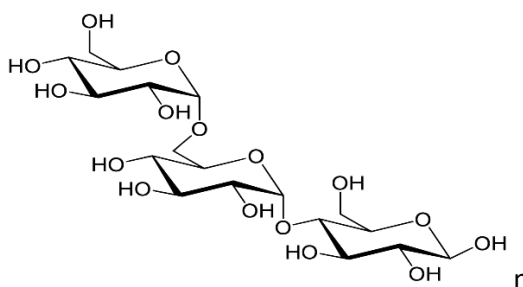


Рисунок 1.13 – Структура гуаровой камеди

В ЛП она применяется в роли связующего, суспендирующего и стабилизирующего агента, а так же как загуститель. Гуаровая камедь хорошо растворима в холодной воде, быстро гидратируется с образованием вязких псевдопластичных растворов, которые, несмотря на значительное падение вязкости при приложении силы (например, интенсивном перемешивании), имеют высокую вязкость. Гели на основе этого полимера стабильны при температуре не выше 80 °С и pH 4,0 – 10,5. Основной недостаток гуаровой камеди – это неустойчивость структуры в кислых средах, при pH менее 3,5, и очень высокая набухающая способность, трудно поддающаяся контролю [211, 350].

Аравийская камедь (гуммиарабик). Получают из стволов сенегальской акации. Камедь представляет собой высушенный сок из коры акации, является одним из самых давно известных связующих веществ. Молекулярная масса гуммиарабика составляет 200000–250000 кДа. Гуммиарабик полностью аморфный полимер, состоящих из глюкозидо-гуммикислот, арабиновой кислоты и ее кальциевых, магниевых и калиевых солей (рисунок 1.14).

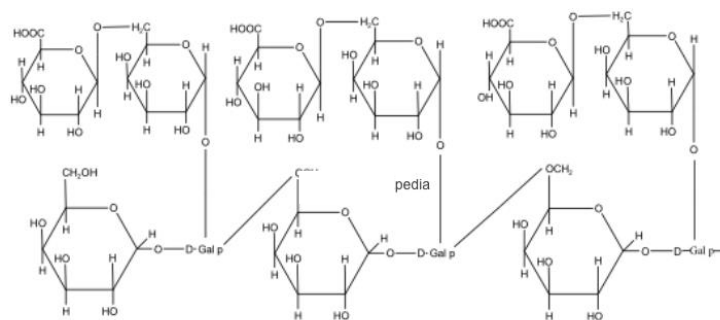


Рисунок 1.14 – Структура гуммиарабика

Гуммиарабик растворим в холодной воде, вязкость гелей ниже, чем у других камедей, гелеобразование наблюдается только при высоких концентрациях (30–50%). Он стабилен в кислых условиях, его гель является слабокислым (рН 4,5–5,0). Гели обладают низкой стабильностью и чувствительны к резкому изменению температуры и рН. Из всех камедей реже всего используется в технологии ЛФ, в основном применяется в пищевой промышленности, как стабилизатор эмульсий, загуститель, стабилизатор пены. На основе гуммиарабика предложены составы микро-, нанокапсул [205, 312, 404].

Хитозан представляет собой линейный сополимер, состоящий из 2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы и 2-амино-2-дезоксид-β-D-d-глюкопиранозы, соединенных в β-1,4-конфигурацию (рисунок 1.15).

Хитозан получают путем деацетилирования хитина, который встречается в ракообразных, моллюсках, насекомых и грибах. Промышленные источники хитозана включают отходы креветок и крабов, где его доля в высушенных экзоскелетах колеблется от 5% до 42% в зависимости от вида. Грибы и их отходы также представляют собой ценный источник хитозана, так как содержание хитина может достигать 50% от сухой биомассы [112, 224, 230, 274].

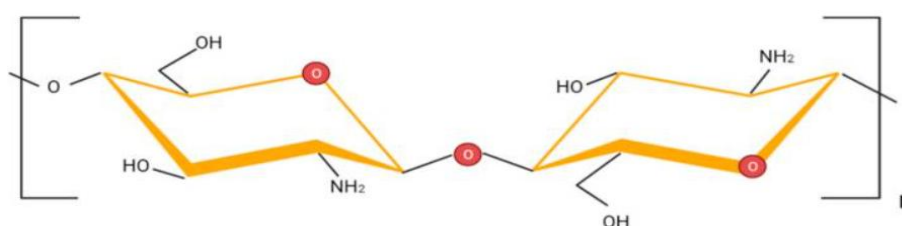


Рисунок 1.15 – Химическая структура хитозана

Свойства хитозана зависят от его молекулярной массы и степени деацетилирования. Средняя молекулярная масса хитозана находится в пределах 50-2000 кДА. [160]. Характерной особенностью хитозана является большое количество гидроксильных ($-OH$) и аминогрупп ($-NH_2$). Свойства полимера, которые определяют его функциональность, включают растворимость, поликатионный характер, пленкообразующую способность, антибактериальные, противогрибковые свойства, антиоксидантную активность, биodeградируемость и биосовместимость. На растворимость хитозана влияет ряд параметров, включая молекулярную массу полимера, степень ацетилирования, pH, температуру и кристалличность полимера. Полное растворение хитозана возможно только в слабокислой среде из-за протонирования групп $-NH_2$. Присутствие аммонийных групп ($-NH_3^+$) усиливает электростатическое отталкивание между полимером и молекулами растворителя, повышая растворимость хитозана. В то же время, сильные взаимодействия между положительно заряженными аммонийными группами и отрицательно заряженными объектами, такими как белки или липиды, делают хитозан эффективным для стабилизации комплексов хитозан-ДНК. [243, 366]. Кроме того, в кислых средах хитозан ведет себя как катионный полиэлектролит, который позволяет осуществлять ионные модификации, придающие хитозану амфифильные свойства [195]. Амфифильный хитозан ряд авторов изучал в системах доставки лекарств на предмет его способности защищать инкапсулированные лекарства от неблагоприятных условий, увеличивать проникающую способность ЛВ в клетки-мишени, улучшать мукоадгезивные свойства и повышать биодоступность лекарств [157, 158, 159, 406,].

Основным недостатком хитозана, является его значительный разброс свойств в зависимости от источника получения. Кроме того, природный хитозан, обладает не всегда достаточной растворимостью и стабильностью. Хитозан растворяется только в разбавленных растворах кислот при pH около 6,5, что ограничивает применение полимера. Химическое изменение цепей хитозана, такое как добавление гидроксильных, карбоксильных, ацильных и других гидрофильных групп, может значительно повысить его растворимость в воде,

улучшить биологическую активность и механические свойства [419]. Кроме того, хитозан может физически взаимодействовать через ионно-комплексные связи с отрицательно заряженными молекулами, такими как дикарбоновые кислоты, лимонная кислота, сульфаты, фосфаты, галловая кислота, альгинат, пектин, сульфэтилцеллюлоза и гиалуроновая кислота [406]. Некоторые соединения, например, глицерин, глюкозо-фосфатные соли или β -глицерофосфат динатрий за счет ионных взаимодействий эффективно превращают гели хитозана в термочувствительные системы.

Существует значительное количество публикаций, подтверждающих эффективность использования хитозана в различных системах доставки ЛВ. Гели на основе хитозана могут быть сконструированы таким образом, чтобы высвобождать лекарственные средства в течение длительного периода времени, обеспечивая контролируемую доставку ЛВ как при пероральном, так при инъекционном и офтальмологическом применении [159, 364]. Перспективным является создание материалов и ЛФ на основе этого полимера для повреждений кожи и костной ткани и для использования в тканевой инженерии [368, 369].

Гиалуроновая кислота (рисунок 1.16) представляет собой природный полисахарид — анионный несulfатированный гликозаминогликан, состоящий из повторяющихся звеньев N-ацетил-d-глюкозамина и d-глюкуроновой кислоты, моносахаридные звенья которых связаны между собой чередующимися β -1,3 и β -1,4 гликозидными связями, содержится в организме человека, в наибольших концентрациях в глазах и суставах [155, 445].

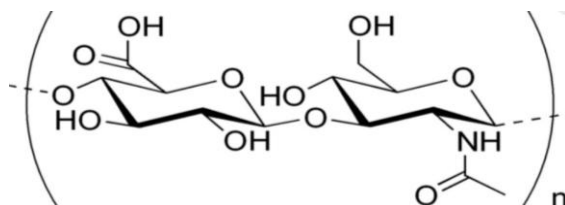


Рисунок 1.16 – Структурная формула гиалуроновой кислоты

Молекулярная масса гиалуроновой кислоты находится в широких пределах, обычно выделяют низко-, средне- и высокомолекулярную. Стандартные

молекулярные массы коммерчески доступных полимеров составляют 5 кДа, 60 кДа, 800 кДа, 3000 кДа и 10000 кДа, но можно заказать полимеры и с массой $>1,8$ МДа. Гиалурионовая кислота обладает исключительными физико-химическими и биологическими свойствами, такими как биосовместимость и биоразлагаемость, отсутствие токсичности и иммуногенности. Высокомолекулярная гиалурионовая кислота имеет антиангиогенный и иммуносупрессивный эффекты, среднемолекулярная – способствует эмбриогенезу, заживлению ран и регенерации тканей, низкомолекулярная – уменьшает воспаление, увеличивает ангиогенез, действует как антиапоптотический агент и индуктор белков теплового шока [133].

Гиалурионовая кислота является распространенным материалом для разработки систем контролируемой доставки ЛВ, принадлежащих к разным классам: антибиотикам, антиглаукомным препаратам, сосудорасширяющим веществам, цитокинам, белкам и др. [354, 380, 407].

Гиалурионовая кислота — это также важный биологический материал, который может функционировать как “терапевтический агент”, который выступает как биологическая смазка, обладающая трибологической функцией для лечения суставов [110], офтальмологических заболеваний [133], поэтому чаще всего используется для офтальмологических, внутрисуставных и инъекционных ЛФ.

1.4.3. Синтетические гелеобразователи

Полиэтиленгликоль (далее – ПЭГ) образован за счет взаимодействия оксида этилена с водой, этиленгликолем или олигомерами этиленгликоля. Структура формула ПЭГ: $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$, химическая формула: $\text{C}_{2n} \text{H}_{4n} + 2\text{O}_{n+1}$. Эти полимеры являются вязкими жидкостями при молекулярной массе до 400 г/моль, воскообразными при массе от 400 до 2000 г/моль и кристаллическими термопластами при массе свыше 2000 г/моль. Полиэтиленгликоль отличается высокой растворимостью как в воде, так и в органических растворителях, что

делает его подходящим для биологических применений благодаря его растворимости и отсутствию высокой токсичности. Высокая гидрофильность полимера повышает растворимость гидрофобных ЛС или носителей при конъюгировании с ними. Повышает физическую и химическую стабильность лекарств и предотвращает агрегацию высокомолекулярных соединений *in vivo* за счет образования конформационного облака, благодаря чему используется в технологии пегелирования [176, 344]. Полиэтиленгликоли очень широко применяются в технологии производства ЛП. Для получения МЛФ чаще используются в составе комбинированных основ, но есть гели, разработанные только на ПЭГах различной молекулярной массы. ПЭГ обладают высокой осмотической активностью, что делает их перспективными для использования на раневых поверхностях [117].

Поливинилпирролидон (далее – ПВП) — это водорастворимый полимер с молекулярной массой от 40000 до 360000 г/моль, способный к гелеобразованию. Его синтезируют полимеризацией винилпирролидона в воде или изопропанол. Структура ПВП приведена на рисунке 1.17.

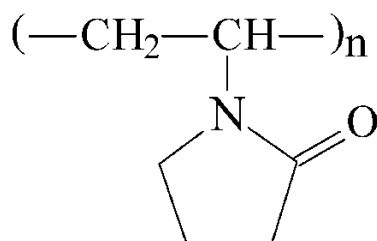


Рисунок 1.17 – Структура ПВП

В основном используется в качестве связующего агента в рецептурах таблеток. На основе растворимых типов ПВП получают твердые дисперсии. Применяют для физической стабилизации суспензий за счет гидрофилизации твердых частиц и их стерического разделения и полимер предотвращает кристаллизацию растворенной части активного вещества путем образования с ним растворимых комплексов. Вводится в комбинированные составы МЛФ, клеев и трансдермальных пластырей [428].

Поливиниловый спирт (далее – ПВС) синтезируется путем полимеризации винилацетата в поливинилацетат, который затем гидролизуется. Структура ПВС приведена на рисунке 1.18. Степень гидролиза и содержание ацетатных групп в ПВС влияют на кристаллизуемость и растворимость полимера.

ПВС растворим в высокополярных и гидрофильных растворителях, таких как вода, диметилсульфоксид, этиленгликоль и N-метилпирролидон, растворимость зависит от степени полимеризации и температуры раствора. Любое изменение этих факторов влияет на степень и характер водородных связей в растворах и, следовательно, на растворимость.

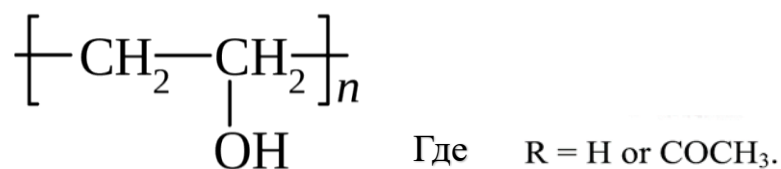


Рисунок 1.18 – Структура ПВС

Поливиниловый спирт благодаря своим гидрофильным, биоразлагаемым и биосовместимым свойствам, отсутствию токсичности и высокими биоадгезивным характеристикам используется для создания различных ЛФ. В первую очередь ПВС для создания пленок, клеев, трансдермальных и офтальмологических систем доставки, имплантов, микрочастиц, наночастиц. Может быть актуален при разработке комбинированных основ для МЛФ, суспензий и эмульсий. Диапазон рабочих концентраций у полимера достаточно широк от 0,5 до 10,0 %. [94, 286, 348].

ПВС также обладает высокой степенью набухания в воде (или биологических жидкостях) и эластичностью, поэтому способен имитировать ткани организма, что обеспечивает актуальность его применения в тканевой инженерии, в том числе и для 3D печати, для создания сердечных клапанов, имплантатов роговицы и заменителей хряща [144, 345].

Карбомеры – это самый распространённый гелеобразователь, более 80% ЛП в ЛФ «гель» производится на основе этого полимера. Разработчиком коммерческих

карбомеров является американская компания Lubrizol, выпускающая их под названием карбопол (carbopol) с 50-х годов двадцатого века. Сейчас на рынке существуют аналоги этих полимеров других производителей, в том числе Индии и Китая. Карбомеры – группа синтетических высокомолекулярных полимеров акриловой кислоты, общая структура представлена на рисунке 1.19. Эти полимеры можно разделить на три группы:

- гополимеры – полиакриловая кислота, кросс-сшитая аллилсахарозой или аллилпентаэритритолом.
- сополимеры, образованные акриловой кислотой или акрилакрилат C_{10} - C_{30} и кросс-сшитые с аллилпертаэритритом;
- интерполимеры, образованные блок-сополимером полиэтиленгликоля и эфиром алкиловой кислоты [139].
- Ассортиментный ряд карбомеров очень широк и насчитывает более 40 наименований, которые используются и в фармацевтической, и в косметической промышленности. Функции карбомеров в ЛФ заключаются в следующем: повышение вязкости, образование гелей, стабилизация эмульсий и суспендирование твердых нерастворимых частиц.

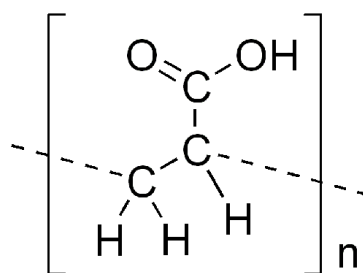


Рисунок 1.19 – Общая структура карбомера

На ряд полимеров есть монографии в фармакопеях США (USP/NF), Европы (Ph. Eur) и Японии (JPE). Характеристика основных марок карбополов, разрешенных для использования в составе ЛП, приведена в таблице 1.5.

Вследствие того, что карбомер находится в суспензионном состоянии в растворе четкое определение молекулярной массы затруднительно, в целом

находится в диапазоне от 3,0 до $4,5 \cdot 10^9$ дальтонов, в зависимости от степени сшивания. Коммерчески доступные карбомеры представляют собой мелкодисперсные аморфные порошки с размером частиц 0,2-6,0 мкм. Для получения гелей карбополов необходимо провести реакцию нейтрализации. В твердом состоянии молекула полимера сильно свернута (рисунок 1.20.(a)), при диспергировании полимера в воде молекулы начинают разворачиваться, особенно после нейтрализации (рисунок 1.20.(b)). В качестве нейтрализующих агентов используют гидроксид натрия, гидроксид калия, бикарбонат калия и триэтаноламин, получая гели с pH 6,5-8,0. После нейтрализации карбоксильные группы ионизируются, в результате чего полимерные цепи в значительной степени разворачиваются за счет электростатического отталкивания.

В качестве растворителей для полимеризации могут быть использованы различные органические растворители (таблица 1.5). Существуют нормативные ограничения на использование бензола в ЛП, поэтому для перорального применения и для нанесения на слизистые оболочки рекомендуется использовать марки, полученные на этилацетате, или в смеси этилацетата и циклогексана [292].

Таблица 1.5 – Характеристика марок карбопола, разрешенных для фармацевтического применения [72, 147, 291]

Марка	Растворитель для полимеризации	Тип карбомера	Вязкость, Па·с (0,5 % при pH 7,5)	Применение орально/ наружно
71G NF	этилацетат	гомополимер	4000-11000	+/+
971P NF	этилацетат	гомополимер	4000-11000	+/+
974P NF	этилацетат	гомополимер	29,4-39,4	+/+
980 NF	смесь циклогексана и этилацетата	гомополимер	40000-60000	-/+
981 NF	смесь циклогексана и этилацетата	гомополимер	4000-10000	-/+
5984 EP	смесь циклогексана и этилацетата	гомополимер	30500-39400	-/+
ETD2020 NF	смесь циклогексана и этилацетата	интерполимер	47000-77000	-/+
Ultrez 10 NF	смесь циклогексана и этилацетата	интерполимер	45000-65000	-/+
934 NF	бензол	гомополимер	30500-39400	+/+
940 NF	бензол	гомополимер	40000-60000	-/+
941 NF	бензол	гомополимер	4000-10000	-/+
1342 NF	бензол	сополимер	9500-26500	-/+

Карбополы как гелеобразователи обладают несомненными преимуществами по сравнению со всеми другими типами гелеобразователей, а именно: возможностью получения прозрачных высоковязких тиксотропных гелей при низких концентрациях полимера; стабильностью, стойкостью к температурным и микробиологическим воздействиям, способностью стабилизировать суспензии и эмульсии I и II рода без добавления эмульгаторов, а также гипоаллергенностью, лёгкостью нанесения и удаления с поверхности кожи, отсутствием следов на одежде, охлаждающим эффектом при нанесении на кожу, способностью образовывать пленки на коже обеспечивая пролонгированное действие ЛП, высокие биоадгезивные свойства, возможностью получение гибридных гелей. К недостаткам можно отнести: ограниченный диапазон pH, необходимость нейтрализации и неустойчивость в присутствии электролитов, для ряда марок – длительный процесс набухания [117]. Марки Carbopol™ ETD и Carbopol™ Ultrez нивелируют ряд недостатков «классических» марок карбополов благодаря простоте диспергирования и высокой скорости набухания.

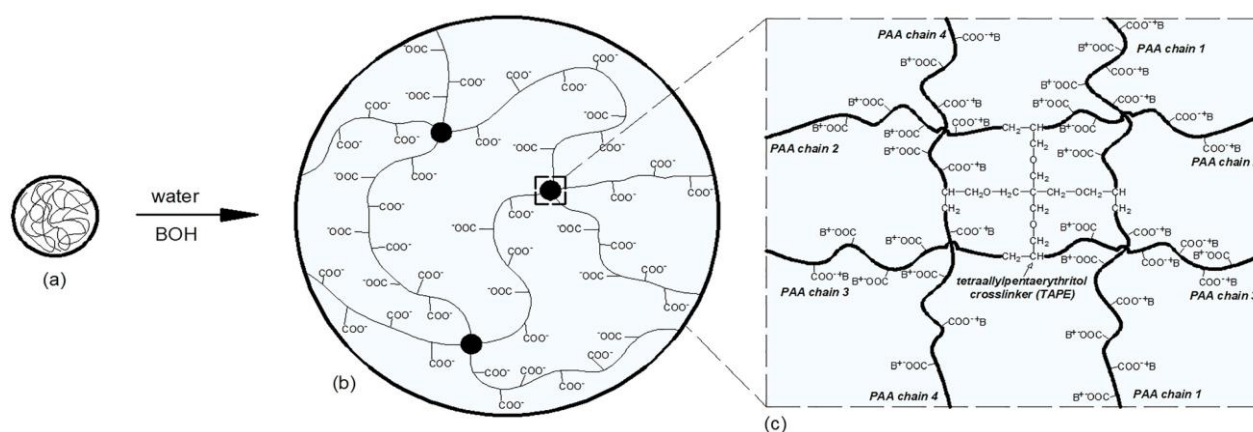


Рисунок 1.20 – Схематическая визуализация процесса золь-гель переход карбопола при изменении pH: (a) в твердом состоянии, (b) после нейтрализации в водном растворе щелочи с диссоциированными группами COO^- , где сплошные круги представляют один конкретный сшитый узел, более подробно показанный на рисунке (c) [147]

Несмотря на то, что карбомеры широко используются в фармацевтической технологии более 70 лет, интерес к этим полимерам не угасает. На их основе

создают пероральные системы с контролируемым высвобождением ЛП в виде таблеток, гидрогелей [179, 251, 403]; разрабатывают гели для нанесения на кожу, раны и слизистые оболочки [196, 203], «умные» комбинированные системы для различных типов высвобождения, включая *in situ* системы [148, 182, 212].

Полоксамеры, представляют собой тройные блок-сополимеры этиленоксида (далее – ЭО) и пропиленоксида (далее – ПО) (рисунок 1.21).

Полоксамеры представляют собой в зависимости от марки, которых более 50, и молекулярной массы, находящейся в диапазоне от 1100 до 15000, жидкости, пасты и твердые вещества. Растворимость полоксамеров в воде напрямую зависит от соотношения между цепями оксида пропилена и оксида этилена [170].

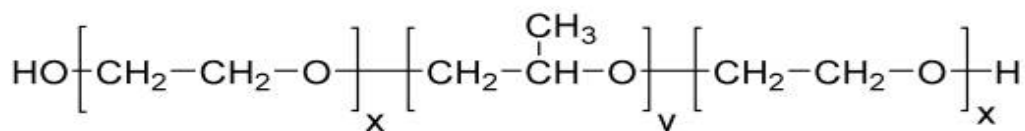


Рисунок 1.21 – Химическая формула полоксамеров:
x и y - длины цепей ЭО и ПО

Полоксамеры — первые блок-сополимеры, разработанные Wyandotte Chemical Corporation в середине XX века. Их коммерческие названия включают Pluronic®, Lutrol®, Kolliphor® (BASF), Antaroх® (Rhodia) и Synperonics® (Croda). BASF предложила систему номенклатуры для этих полимеров, где буквы обозначают агрегатное состояние: L (жидкость), P (паста), F (хлопья), за которыми следует число, указывающее молекулярную массу блока ЭО и долю блока ПО.

Основные физические параметры наиболее использующихся марок полоксамеров представлены в таблице 1.6 [187, 258, 343].

Водные растворы полоксамера проявляют температурную чувствительность, в частности “термообратимое гелеобразование” (рисунок 1.22) для образцов достаточной концентрации; они демонстрируют золь-гель-переход около 37°C и гель-золь-переход около 50°C, позволяя получать термообратимые гели, представляющие значимый интерес для создания систем доставки ЛВ и для тканевой инженерии [391].

Таблица 1.6 – Характеристика основных марок полуксамеров

Марка полуксамера	Pluronic	Средняя молекулярная масса	Температура плавления, °C	Вязкость, Па·с	Поверхностное натяжение, дин, см ⁻¹	ГЛБ
P108	F38	4700	48	0,260	52	>24
P124	L44	2200	16	0,440	45	12–18
P188	F68	8400	52	1,000	50	>24
P237	F87	7700	49	0.700	44	>24
P338	F108	14600	57	2,800	41	>24
P407	F127	12600	56	3,100	41	18–23

В водных растворах амфифильный характер сополимеров приводит к самоагрегации в мицеллы с внутренним ядром, образованным гидрофобными блоками, и внешней оболочкой, образованной гидрофильными звеньями. Это структуры наноразмерной величины, обычно от 10 до 200 нм, которые появляются при достижении критической концентрации мицеллообразования и критической температуры мицеллообразования.

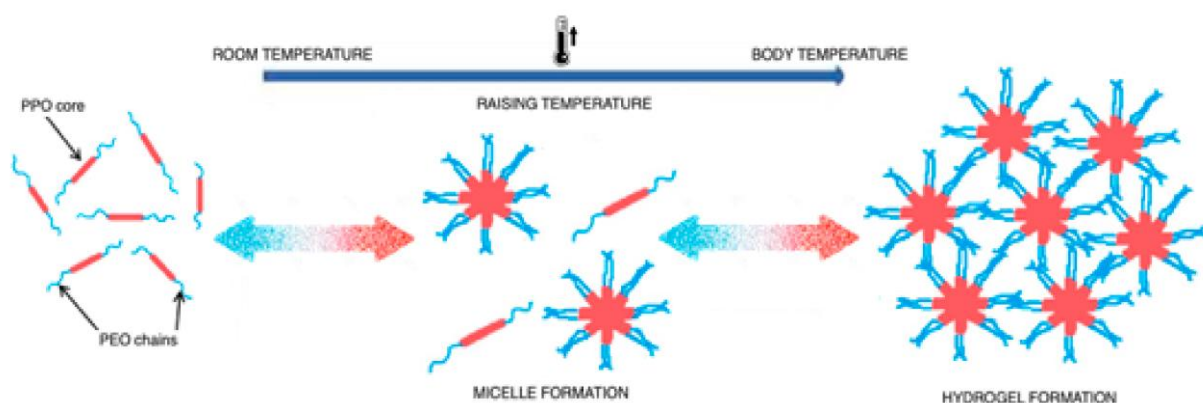


Рисунок 1.22 – Схематическое представление процесса формирования геля полуксамера

Значение критической концентрации мицеллообразования водных растворов полуксамеров снижается с повышением температуры и количества сегментов этилен оксида, что указывает на то, что полимеры с большим гидрофобным доменом образуют мицеллы при более низких концентрациях и температурах [65, 140]. Благодаря своему строению гидрофобное ядро может выступать в качестве

места загрузки ЛВ, создавая пространство для инкапсуляции гидрофобных веществ [347].

На гелеобразование влияет молекулярная масса полимеров, чем она выше, тем ниже концентрация гелеобразования, температура и присутствие электролитов, которое снижает температуру гелеобразования [170].

Полоксамеры широко используются в составах спреев, инъекционных растворов, трансдермальных пластырей и других ЛФ, в первую очередь, как солюбилизаторы, однако их термореверсивные свойства также вызывают большой интерес у разработчиков. Например, при офтальмологическом применении препараты на основе данного полимера при комнатной температуре действуют как глазные капли, а при повышении температуры, то есть после нанесения загустевают и действуют как мазь, увеличивая время пребывания ЛФ на слизистой оболочке. Полоксамеры Р407 и Р188 являются одними из наиболее часто используемых в офтальмологических ЛФ вследствие хорошей растворимости в воде, прозрачности раствора, оптимальной вязкости и безопасности [91, 241].

Для разработки систем трансдермальной доставки ЛВ наиболее изучен полоксамер Р407, его включали в ЛФ, обладающие противовоспалительной, обезболивающей, местной анестезирующей и ранозаживляющей и др. активностью [96, 210, 395, 421]. Другим интересным путем доставки ЛФ на основе полоксамеров является вагинальный путь. После применения таких ЛФ происходящее гелеобразование способствует длительному нахождению ЛВ в месте введения и контролируемому высвобождению [180, 308, 410].

Интерес к данной группе полимеров в последние годы стабильно растет и изучается возможность их использования для создания искусственных тканей, гибридных гидрогелей для контролируемого высвобождения действующих веществ, создания *in situ* систем, использования в биотехнологических препаратах для повышения их стабильности и др. [342, 410, 411, 431].

Полиакриламид был синтезирован в 1959 году и первоначально использовался в качестве матрицы-носителя для электрофореза, сейчас широко применяется как в микроанализе, так и макрофракционировании белков,

нуклеиновых кислот и других биомолекул. Последние годы возрос интерес к потенциалу полиакриламида в качестве биоматериала для получения систем доставки ЛВ. Полиакриламид - синтетический линейный полимер, получаемый из мономера акриламида. Он обладает высокой водопоглощающей способностью, образует высоковязкие гели. В линейной форме может использоваться в качестве загустителя и суспендирующего агента. Для получения высоковязких систем чаще всего вводят в состав сшивающие агенты, например, N,N'-метиленбисакриламид. Неионогенный полиакриламид может быть модифицирован для создания анионных и катионных форм. Это достигается путём гидролиза полимера или присоединения катионных групп. Амидная группа, присутствующая в молекуле полиакриламида, определяет его химические характеристики (рисунок 1.23). При повышении температуры и изменении pH происходит частичный гидролиз полиакриламида с образованием карбоксильных групп. При нагревании полимера выше 100 °С происходит уменьшение содержания азота из-за имидизации и появлению сшитых структур [215, 441].

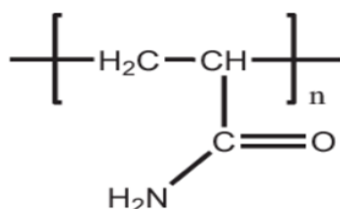


Рисунок 1.23 – Структура полиакриламида

Этот биосовместимый полимер, обладает превосходными биоадгезивными свойствами, на его основе получают материалы для тканевой инженерии и гели, например, для продления срока службы внутривенных имплантов [166], регенерации и восстановления хрящевой ткани [311], создания материалов для заживления и регенерации ран [362].

Бентонит — природная глина, богатая минералами группы смектитов, образовавшимися из вулканического пепла в водной среде. Название происходит от форта Бентон у Рок-Ривер, Вайоминг, США, где она была впервые обнаружена в 1898 году. Эта глина обладает превосходными набухающими, адсорбционными и

коллоидными свойствами. Благодаря этим свойствам бентонит используется во многих отраслях промышленности, в том числе, в качестве литейной глины, бурового раствора, клеев, герметиков, отбеливателей, абсорбентов. Основным компонентом бентонита является монтмориллонит, представляющий собой гидратированный гидроксид силиката натрия кальция алюминия магния $(\text{Na,Ca})_{0,33}(\text{Al,Mg})_2(\text{Si}_4\text{O}_{10}) (\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, который сейчас получают синтетическим путем. На основе монтмориллонита создаются системы контролируемой доставки ЛВ для перорального применения [304], комплексы с хитозаном, альгинатами, производными акриловой кислоты для получения гибридных гелей, наночастиц, микросфер, гранул, в том числе для нанесения на слизистые оболочки [170, 305, 352, 353]. Компания Brenntag предлагает коммерчески доступные марки бентонитов для использования их способности к гелеобразованию в качестве ингредиентов, повышающих вязкость, улучшающих реологические и тиксотропные свойства, предотвращающих синерезис МЛФ (кремов, мазей), шампуней, растворов [142].

1.4.4. Полусинтетические гелеобразователи

Наиболее распространёнными представителями этой группы гелеобразователей являются производные целлюлозы, а именно ее эфиры. Они обладают неоспоримыми достоинствами, такими как безопасность, индифферентность, биосовместимость, отсутствие токсичности, биodeградируемость, стабильность в широком диапазоне pH, возможность комбинации с другими гелеобразователями. Эфиры целлюлозы представляют собой высокомолекулярные соединения, получаемые путем замены атомов водорода гидроксильных групп в ангидроглюкозных звеньях целлюлозы на алкильные или замещенные алкильные группы. Коммерчески важные свойства простых эфиров целлюлозы определяются их молекулярной массой, видом

заместителей, степенью замещения, химической структурой, степенью этерификации и полимеризации эфира. Эти свойства обычно включают растворимость, вязкость в растворе, поверхностную активность, характеристики и устойчивость к биологическому разложению, нагреванию, гидролизу и окислению. Вязкость растворов эфиров целлюлозы напрямую связана с их молекулярными массами. К производным целлюлозы, которые могут использоваться для получения МЛФ, относят метилцеллюлозу (далее – МЦ), натрий карбоксиметилцеллюлозу (далее – NaКМЦ), гидроксиэтилцеллюлозу (ГЭЦ), гидроксипропилметилцеллюлозу (далее – ГПМЦ) и гидроксипропилцеллюлозу (далее – ГПЦ) (рисунок 1.24, таблица 1.7) [273].

Метилцеллюлоза – неионный амфифильный полимер с молекулярной массой от 10 000 до 220 000 Да. Она обладает низкой критической температурой растворения 40-50 °С: растворима в воде при температурах ниже 40 °С и нерастворима выше 50 °С. Приготовить насыщенный раствор метилцеллюлозы в холодной воде сложно: когда порошок вступает в контакт с водой, вокруг него образуется слой геля, резко замедляющий диффузию воды в порошок. Растворы полимера устойчивы при pH 5,0-9,0. Полимер широко используется в технологии ЛФ как загуститель, пленкообразователь и связующее вещество [299].

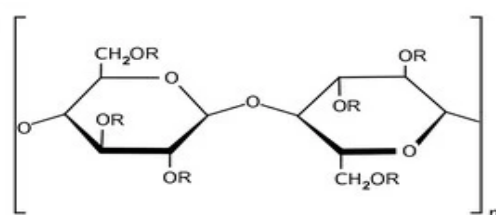


Рисунок 1.24 – Общая структурная формула эфиров целлюлозы. R указан в таблице 1.7

Натрий карбоксиметилцеллюлоза с момента коммерческого внедрения в Соединенных Штатах в 1946 году выполняет все больше функций в составе ЛФ: загустителя, суспендирующего агента, стабилизатора, связующего вещества и пленкообразователя. Это эфир целлюлозы ионного типа, часто используемым продуктом является натриевая соль, а также соли аммония и алюминия. Вязкость

растворов натрий-карбоксиметилцеллюлозы является наиболее стабильной при значении рН 6,5-9,0, при рН ниже 6, вязкость будет быстро снижаться, затем начнется образование карбоксиметилцеллюлозной кислоты, если рН превышает 9, вязкость также будет снижаться, но вначале относительно медленно до рН 11,5, затем резко упадет. Кроме того, на вязкость растворов влияют температура, она будет уменьшаться с повышением температуры, и наличие неорганических солей в растворе, что также приводит к снижению вязкости [121, 392].

Гидроксиэтилцеллюлоза представляет собой гидроксиэтиловый эфир целлюлозы, полученный обработкой целлюлозы гидроксидом натрия и окисью этилена. Полимер широко используется в качестве загустителя, модификатора реологических свойств во многих отраслях промышленности: в косметике, фармацевтических препаратах, строительных материалах и т.д. Полимер легко растворяется в холодной и горячей воде с образованием прозрачных растворов с различной вязкостью в зависимости от концентрации, типа полимера и температуры, совместим в растворах со многими неорганическими солями, поверхностно-активными веществами, солюбилизаторами и консервантами. Растворы ГЭЦ стабильны в широком диапазоне рН от 2 до 12, при этом вязкость растворов практически не изменяется. Молекулярная масса и степень полимеризации ГЭЦ прямо пропорциональны вязкости. рН и температура могут незначительно влиять время растворения полимера. [77, 121, 220, 234].

Гидроксипропилметилцеллюлоза представляет собой неионное производное целлюлозы с метильными (гидрофобными) и гидроксипропиловыми (гидрофильными) группами. ГМПЦ набухающий в воде полимер, который широко применяется в качестве загустителя, гелеобразователя, связующего вещества, стабилизатора суспензий и эмульсий, гелеобразующей матрицы для систем с пролонгированным и контролируемым высвобождением. Этот полимер входит в состав многих коммерческих ЛП. ГМПЦ работает в широком диапазоне рН 2,0-12,0 и демонстрирует высокую устойчивость в присутствии электролитов и поверхностно-активных веществ, образуя высоковязкие прозрачные составы. Гидроксипропилметилцеллюлоза не растворяется в горячей воде, на начальной

стадии растворения её рекомендуют равномерно диспергировать в горячей воде, а затем быстро растворять при охлаждении. Одним из вариантов получения геля является следующий вариант: наливают необходимое количество горячей воды в емкость и нагревают примерно до 70 °С. При медленном перемешивании постепенно добавляют ГМПЦ, и полимер начнёт всплывать на поверхность воды, затем постепенно образуется суспензия, и при перемешивании суспензию необходимо охладить. При нарушении технологии получения полимер может коагулировать или образовывать трудно растворимые комки. При этом гели ГМПЦ термостабильны, однако вязкость раствора находится в прямой зависимости от температуры, чем выше температура, тем ниже вязкость. Кроме того, вязкость раствора ГМПЦ пропорциональна степени полимеризации, молекулярной массе, длине молекулярной цепи, и увеличивается с увеличением степени полимеризации, вязкость также растет с увеличением концентрации полимера в водном растворе [129, 148, 235, 259].

Гидроксипропилцеллюлоза - неионный смешанный эфир целлюлозы. В основном используется в технологии твердых ЛФ, как пленкообразователь, связующее вещество, но обладает термопластичностью и поверхностной активностью, загущающими и стабилизирующими свойствами, характерными для других водорастворимых полимеров целлюлозы. ГПЦ растворима в холодной воде, но при температуре выше 40°C, происходит резкое уменьшение вязкости и увеличение мутности геля. Вязкость растворов зависит от концентрации полимера, его молекулярной массы, степени полимеризации, температуры и pH. Гели ГПЦ стабильны в диапазоне pH 5,0- 8,0 [135, 334, 365].

Характеристики производных целлюлозы приведены в таблице 1.7.

Существует ряд недостатков этой группы гелеобразователей. Это относительная трудоемкость получения гелей, а именно высокая склонность к комкованию и длительность процесса гелеобразования, невысокая антимикробная активность, необходимость введения в состав суспензионно-эмульсионных ЛФ стабилизаторов агрегативной устойчивости. Также некоторые марки гелеобразователей не рекомендуется автоклавировать, что может создавать

неудобство, например, при производстве биотехнологических лекарственных препаратов.

В таблице 1.8 описаны наиболее важные технологические параметры основных групп гелеобразователей.

Таблица 1.7 – Характеристика производных целлюлозы

<i>Полимер</i>	<i>R</i>	<i>Растворимость</i>	<i>Вязкость</i>
МЦ	-CH ₃	Растворим в холодной воде, этиленгликоле. Не растворим в горячей воде, этиловом эфире, этаноле (95%), насыщенных растворах солей	Вязкость 2% раствора 5 - 75000 МПа·с
NaКМЦ	- CH ₂ COONa	Растворим в горячей, холодной воде. Нерастворим в метаноле, этаноле, ацетоне, хлороформе, бензоле	Вязкость 1% раствора 25 - 8000 МПа·с
ГЭЦ	-CH ₂ CH ₂ OH	Растворим в горячей, в холодной воде. Нерастворим в метаноле, этаноле, ацетоне, хлороформе, бензоле	Вязкость 1% раствора 800 - 5000 МПа·с
ГПМЦ	- CH ₂ CH(OH)CH ₃	Растворим в холодной воде, нерастворим в горячей воде, растворим в метаноле, этаноле, дихлорметане, трихлорэтаноле, ацетоне, изопропанол	Вязкость 2% раствора 2000 - 40000 МПа·с
ГПЦ	- CH ₂ CH(OH)CH ₃	Растворим в холодной воде. Не растворим в горячей воде. Растворим в органических растворителях.	Вязкость 1% раствора 50 - 4500 МПа·с
МКЦ+ NaКМЦ	-CH ₃ + - CH ₂ COONa	Растворим в холодной воде. Не растворим в метаноле, этаноле, ацетоне, изопропанол	Вязкость 2% раствора 10 - 120000 МПа·с

1.4.5. «Умные»/ «интеллектуальные» гели

Одним из направлений развития технологии гелей является разработка «*in situ*» систем, часть авторов их называет «умными» или «интеллектуальными» гелями, способных совершать фазовый золь-гель переход под действием химических или физических факторов [100, 217, 266, 269, 283, 287, 337, 396, 410, 411].

Таблица 1.8 – Характеристика основных видов гелеобразователей

Вид гелеобразователя	Рабочая концентрация, %	Необходи- мость введения добавок для гелеобра- зования	Термо- стабильность	Возможность термической стерилизации	Чувстви- тельность к рН	Чувстви- тельность к электролитам
Природные гелеобразователи						
Каррагинаны	1,0-2,0	Na ⁺ , K ⁺	-	-	+	+
Альгинаты	0,5-1,0 5,0-10,0	Ca ²⁺ , Ba ²⁺ Na ⁺ , K ⁺	+	-	+	+
Геллановая камель	0,5-1,0	-	-	-	+	+
Ксантановая камель	0,1-2,0	-	-	-	-	-
Гуаровая камедь	2,5-10,0	-	-	-	+	+
Гуммиарабик	30,0-50,0	-	-	-	+	+
Хитозан	1,0-10,0	Кислоты	+	-	+	+
Гиалуроновая кислота	0,5-3,0	-	+	+	-	-
Синтетические гелеобразователи						
ПЭГ	5-30	-	+	+	-	-
ПВП	5-30	-	+	-	-	-
ПВС	0,5-10,0	-	+	+	-	-
Карбополы	0,5-2,0	Щелочь	+	+	+	+
Полоксамеры	15,0-50,0	-	+	+	-	-
Полиакриламид	2,0-5,0	-	-	-	-	-
Полусинтетические гелеобразователи						
МЦ	2 – 4	-	-	-	+	+
NaKMЦ	5 – 15	-	-	-	+	+
ГЭЦ	4 – 8	-	+	+	-	-
ГПМЦ	2 – 10	-	+	+	-	-
ГПЦ	5 – 15	-	+	-	+	+
МКЦ+ NaKMЦ	2 – 10	-	-	-	+	+

Наиболее изученные «интеллектуальные» гели являются термочувствительными системами, их разрабатывают на основе комбинаций гелеобразователей и специально кроссшитых полимеров включая амиды, акрилаты, эфиры и т.д., среди которых поли-N-изопропилакриламид наиболее широко используется, следующие по распространённости полоксамеры, карбополы и др. Температура фазового перехода должна быть близкой к физиологической температуре человеческого тела, что делает эти гели перспективными для различных биомедицинских применений, например для вагинального, офтальмологического, внутриместного применения и т.д. [100, 287, 328, 367, 390].

Определенные успехи достигнуты в разработке светочувствительных гелей, реагирующих на облучение определенной интенсивности и длины волны, регулируя эти параметры можно управлять дистанционно фазовым переходом ЛФ. Существуют три основных механизма, посредством которых светочувствительные гели проявляют характерные изменения при световой стимуляции: во-первых, при введении в гель светочувствительных молекул, которые при поглощении определенного количества фотонов, запускают механизм фазового перехода. Во-вторых, светочувствительные вещества в гидрогеле могут поглощать световую энергию и преобразовывать ее в тепло, повышая температуру гидрогеля до температуры фазового перехода и третий механизм включает разложение фоточувствительных молекул внутри гидрогеля под воздействием света, что приводит к реакциям или изменениям в сетке гидрогеля, изменению осмотического давления и вызывает набухание геля или переход в золь [283, 337].

В электрочувствительных гидрогелях изменение электрического поля вызывает движение ионов, создавая разницу их концентрации и изменяя осмотическое давление. Этот процесс зависит от контакта с электродами, напряженности поля и содержания электролита. Хотя реакцию этих гидрогелей можно точно контролировать путем приложения внешнего электрического поля, их недостатком является относительно низкая скорость реакции [198].

Путем включения магнитных частиц в различные гидрогелевые матрицы

можно получить широкий спектр магнитно-чувствительных гидрогелей с различными свойствами и функциональными возможностями, обычно используемыми магнитными частицами являются $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, Fe_3O_4 , CoFe_2O_4 и т.д. [427]. В 2024 году было опубликовано около тысячи статей, посвященных этой теме. Основываясь на исследованиях последних пяти – десяти лет, можно сказать, что разработка «интеллектуальных» гелей и придание им новых сложных функций является актуальной задачей современной науки. В ближайшем будущем исследования будут направлены на синтез программируемых «интеллектуальных» гелей, способных реагировать на сложные комбинированные стимулы и включать в свой состав различные по физико-химическим свойствам ЛВ. Однако в этой области существуют определенные проблемы: до настоящего времени были разработаны и внедрены различные «интеллектуальные» системы, но коммерциализация этих ЛФ в качестве систем доставки лекарств пока неубедительна, что связано в первую очередь с необходимостью доказательства безопасности таких систем. Лишь несколько ЛП дошли до промышленного производства, включая Jelmyto® (UGN-101), представляющий собой термочувствительный гель митомицина С для лечения уротелиальной карциномы верхних отделов пищеварительного тракта, который был выпущен UroGen Pharma (Израиль) и получил одобрение FDA в апреле 2020 года [268, 336].

1.5. Технология производства гидрофильных мягких лекарственных форм

Промышленное производство ГМЛФ происходит в полностью автоматическом режиме с использованием стандартного фармацевтического оборудования, в зависимости от требований по МБЧ и стерильности в помещениях класса чистоты D, для нестерильных ЛФ, и в комплексе чистых помещений классов C, B и A, для стерильных гелей.

Технология производства ГМЛФ складывается из следующих стадий:

1. подготовительного, когда проводят подготовку растворителя, отвешивают и отмеривают ингредиенты лекарственного препарата;
2. получение гелевой основы, обычно осуществляют в реакторах с мешалкой, чаще лопастной или якорной. Гомогенизацию гелей не проводят, это может привести к разрушению структуры геля. На этой стадии критическим является проведение диспергирования гелеобразователя в растворителе и выбор оптимального режима перемешивания, для предотвращения образования комков полимера;
3. введение ЛВ и ВВ в основу могут осуществлять разными способами. Возможно получение раствора ЛВ и ВВ, его фильтрация, и затем введение гелеобразователя или получение концентрата из компонентов ЛФ и затем введение этого концентрата в предварительно полученный раствор гелеобразователя. Для осуществления этих манипуляций используются фармацевтические реакторы;
4. упаковка гелей. В качестве первичной упаковки чаще всего используют алюминиевые или ламинарные тубы с различной формой носиков или с наладками для разных способов применения. Упаковку осуществляют на тубонаполняющих машинах различной производительности. Возможна опционально их установка в помещениях класса А и розлив гелей под током инертного газа - азота или аргона. Маркировка и вторичная упаковка туб.

Кроме стандартной технологии, общей для всех МЛФ, для гелей, особенного офтальмологического применения может быть актуально использование технологии выдув-наполнение запайка, так как обеспечиваются асептические условия и возможно получение однодозовых ЛФ, что удобно, так как не требуется введение консерванта [61, 318, 359].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Производство лекарственных препаратов на основе биотехнологических субстанций включено в перечень приоритетных направлений для обеспечения технологического суверенитета Российской Федерации. Доля биотехнологических препаратов на рынке стремительно растет, увеличиваясь на 15-25% ежегодно. Актуальным является разработка субстанций и лекарственных препаратов на основе биотехнологического синтеза.

2. Низкая стабильность, чувствительность к изменениям температурного режима, pH, давлению, УФ-излучению, кислороду воздуха и т.д. биотехнологических субстанций создает сложности при разработке состава и технологии ЛФ, их трансфера и масштабирования на производственную площадку. Несмотря на то, что разработки в этой области ведутся, однако сведения о них разрозненные, подходы к их разработке ЛФ биотехнологических субстанций не гармонизированы.

3. Гели являются «традиционной» ЛФ, описанной фармакопее РФ и ЕАЭС составе статьи на МЛФ, однако они обладают свойствами, принципиально отличающимися от свойств других МЛФ. Эти отличия связаны с наличием гелей внутренней пространственной структуры. За счет гидрофильности, возможности использования для различных путей введения и отсутствия стрессовых условий при производстве ГМЛФ являются перспективными для ЛП с биотехнологическими субстанциями.

4. Требования к ГМЛФ описаны в ГФ РФ и ГФ ЕАЭС, однако в настоящее время помимо фармакопейных требований к ЛП при разработке в целевой профиль качества часто закладывают не фармакопейные требования, обеспечивающие эффективность и комплаентность конкретного ЛП в контексте пути введения. Эти не фармакопейные показатели качества нуждаются в теоретическом и практическом обосновании.

5. Вопреки существующим в настоящее время ограничениям на поставки ВВ в Россию, на фармацевтическом рынке присутствует широкий ассортимент гелеобразователей американского, европейского и азиатского производства. ВВ данной группы обладают различными физико-химическими свойствами, на основе которых необходимо проводить выбор полимера для разработки конкретной ЛФ. В главе приведено описание, классификация основных видов гелеобразователей и систематизированы их технологические характеристики.

6. Производство лекарственной формы гель не требует экстремальных условий производства так как растворителем чаще всего выступает вода очищенная или вода для инъекций, используется стандартное оборудование для МЛФ, при этом можно использовать в том числе технологию выдув-наполнение запайка (Blow-Fill-Seal (далее - BFS)) для получения стерильных ГМЛФ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Лекарственные вещества

Бактериофаги. Для разработки ЛФ с бактериофагами, стерильные бесклеточные концентраты фаголизатов предоставляла лаборатория клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Получение субстанции проводилось в соответствии с патентом РФ 2525141. Наименование, таксономия и номер депонирования бактериофагов во Всероссийской государственной коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных (1) или Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (2) указаны в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Характеристика штаммов бактериофагов

<i>Наименование бактериофага</i>	<i>Номер депонирования</i>
Escherichia phage ECD7	BF-1372 (1)
Escherichia phage V18	BF-1373 (1)
Escherichia phage Ec13-52	BF-1382 (1)
Escherichia phage Ec732	BF-1420 (1)
Salmonella phage FG1m	BF-1430 (1)
Salmonella phage FM4b	BF-1431 (1)
Salmonella phage SE40	BF-1354 (1)
Salmonella phage ST11	BF-1356 (1)
Staphylococcus phage Sa30	BF-1400 (1)

Продолжение таблицы 2.1

Наименование бактериофага	Номер депонирования
Staphylococcus phage CH1	BF-1358 (1)
Staphylococcus phage SCH1	Ph-66 (2)
Staphylococcus phage SCH111	Ph-95 (2)

Эндолизины. Использованный в работе рекомбинантный модифицированный эндолизин LysECD7-SMAP разработан и предоставлен лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи [185].

Литические ферменты бактериофагов, которые могут гидролизовать пептидогликан клеточной стенки, вызывая лизис и гибель бактериальных клеток это эндолизины. Эндолизин LysECD7-SMAP образован LysECD7, представляющим собой цинковую d-аланил-d-аланинкарбоксипептидазу (семейство пептидаз M15) из литического бактериофага ECD7 (NCBI: KY683735.1, *Escherichia coli*), инфицирующего виды *Escherichia* и N-концевого миелоидного пептида 29 аминокислот (SMAP) [303].

Субстанция эндолизина LysECD7-SMAP представляет собой лиофилизат, хранящийся при температуре минус $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Для исследований получали концентраты белка в стерильных буферных растворах (Трис-HCl или PBS, pH=7,5), которые хранили при $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ и использовали в течение не более, чем двух недель.

Интерферон альфа-2b. Субстанция интерферон альфа-2b производства АО «Биннофарм», Россия. Структурная формула представлена на рисунке 2.1.

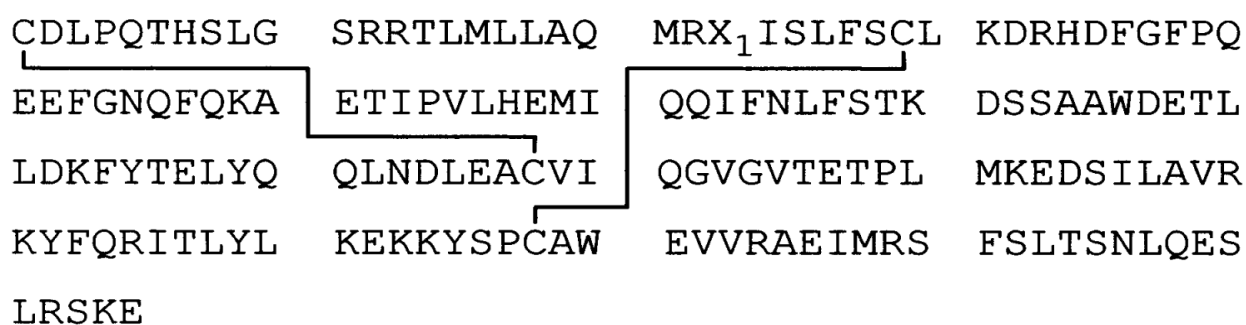


Рисунок 2.1 – Структурная формула интерферон альфа-2b

Эмпирическая формула: $(C_{860}H_{1353}N_{229}O_{255}S_9)$ состоит из 165 аминокислот.

Молекулярная масса: 19 269 Да.

Производственные штаммы: штамм *Escherichia coli* KMEX 511 получен в АО «Биннофарм», депонирован во Всероссийской Коллекции Микроорганизмов (VKM), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Скрябина Российской академии наук коллекционный номер VKM В-2473D. Морфологические и физико-биохимические свойства штамма-продуцента должны быть стабильными в течение срока хранения в лиофилизированном виде при температуре не ниже минус $(8 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Субстанция представляет собой прозрачный, бесцветный водный раствор, с температурой хранения 5-8 $^\circ\text{C}$.

Даларгин. Субстанция производства ООО «Бион», Россия (ЛС-000531-270611). Структурная формула приведена на рисунке 2.2.

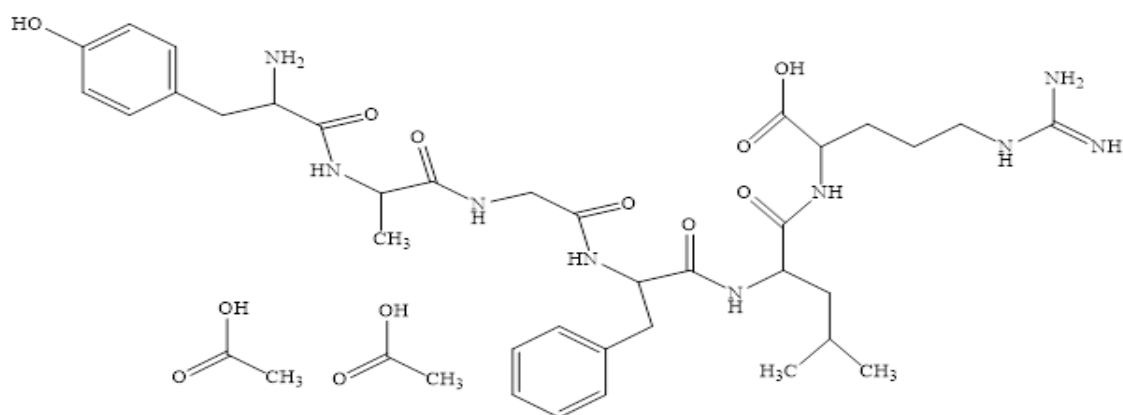


Рисунок 2.2 – Структурная формула даларгина

Эмпирическая формула. $C_{35}H_{51}N_9O_8 \cdot n \text{ CH}_3\text{COOH}$, $1 \leq n \leq 2$. Молекулярная масса: 846,1. Химическое название: тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат.

Описание: белый аморфный порошок с запахом уксусной кислоты.

Растворимость: хорошо растворим в воде, в растворе хлористоводородной кислоты с pH около 1,0, в этаноле и практически нерастворим в хлороформе. [28, 39].

Декспантенол. Субстанция производства BASF, Германия). Структурная формула приведена на рисунке 2.3.

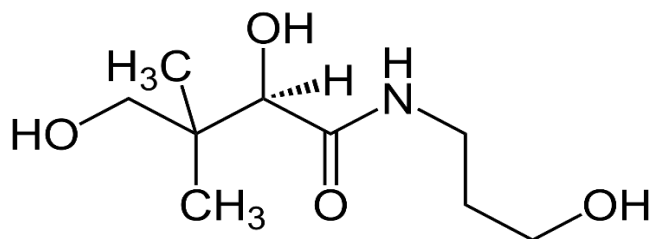


Рисунок 2.3 – Структурная формула декспантенола

Эмпирическая формула. $C_9H_{19}NO_4$. Молекулярная масса: 205,25.

Химическое название: (2R)-2,4-Дигидрокси-N-(3-гидроксипропил)-3,3-диметилбутанамид. Содержит не менее 98,0 % и не более 101,0 % декспантенола $C_9H_{19}NO_4$ в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество. Описание: прозрачная бесцветная или слегка желтоватая вязкая жидкость. Растворимость: легко растворим в спирте 96%, легко растворим или растворим в воде.

Лидокаин. Субстанция производства MAHENDRA CHEMICALS, Индия). Структурная формула приведена на рисунке 2.4.

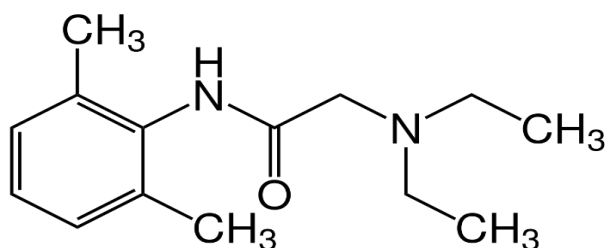


Рисунок 2.4 – Структурная формула лидокаина

Эмпирическая формула. $C_{14}H_{22}N_2O \cdot HCl \cdot H_2O$. Молекулярная масса: 288,82.

Химическое название: N-(2,6-Диметилфенил)-2-(диэтиламино)ацетамида гидрохлорид моногидрат. Описание: белый или почти белый кристаллический порошок.

Растворимость: очень легко растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %, растворим в хлороформе.

2.1.2. Вспомогательные вещества

Все вспомогательные вещества (далее – ВВ), использованные в процессе разработки ЛФ, разрешены для медицинского применения и соответствуют требованиям российской, европейской или американской фармакопей, или соответствующим ГОСТам.

Гелеобразователи:

Гидрокиэтилцеллюлоза марок Natrosol 250 ННХ, Natrosol® 250Н, Natrosol® 250G (Ashland, США). Полимеры выполняют функции гелеобразователей, загустителей, являются эфирами целлюлозы. Хорошо растворяются в воде без нагревания с образованием стабильных прозрачных гелей в диапазоне pH от 3,0 до 8,5, устойчивы к воздействию органических растворителей и солей поливалентных ионов [202]. Марки различаются молекулярной массой Natrosol® 250G 300 кДа, Natrosol® 250Н 1000 кДа, Natrosol 250 ННХ 1300 кДа.

Гидроксипропилметилцеллюлоза марки Venecel K100М (Ashland, США) гигроскопичный белый или слегка желтовато-белый порошок без запаха и вкуса. 1% раствор ГПМЦ имеет pH 5,5-7,5. Полимер хорошо растворим в воде, образуя прозрачные гели разной вязкости, при повышении температуры или скорости перемешивания, вязкость обратимо уменьшается. ГМПЦ практически нерастворим в этаноле, ацетоне. Гели ГПМЦ стабильны в диапазоне pH от 3 до 11, совместимы с солями [121].

Метилцеллюлоза марки Metolose™SM-100 (Shin-Etsu, Япония) неионогенный водорастворимый эфир целлюлозы, получаемый из целлюлозы. Metolose™SM-100 представляет собой волокнистый или гранулированный порошок, от белого до слегка белесого цвета, практически без запаха и без вкуса. Metolose™SM-100 совместима с электролитами, однако, если концентрация электролита превышает определенный предел, полимер будет высаливаться. Растворы Metolose™SM-100 сохраняют постоянную вязкость в диапазоне pH 3-11.

Если pH геля ниже 5,5, его вязкость при хранении будет постепенно снижаться из-за деполимеризации [300].

Натрий-карбоксиметилцеллюлоза марки Blanose™ СМС (Ashland, США) - анионный водорастворимый полимер. Это порошок белого или желто-белого цвета без запаха хорошо растворимый в воде, pH водных растворов 6,5-8,5 [121].

Смесь микрокристаллической целлюлозы и натрий карбоксиметилцеллюлозы NEOCEL®-C11 от производителя MingTai Chemical Co., LTD. (Тайвань). NEOCEL® - совместно произведенная смесь микрокристаллической целлюлозы и NaКМЦ средней вязкости, широко используется в качестве стабилизатор коллоидных растворов и гелеобразователь. NEOCEL®-C11 представляет собой белый порошок без запаха.

Полоксамер 407 марки Kolliphor® Р 407 (BASF, Германия) порошок белого или слегка желтоватого цвета без запаха. Он легко растворим в воде, этаноле и других преимущественно полярных растворителях. Нерастворим в эфире, парафине и жирных маслах. Полоксамер 407 - триблок-сополимер, состоящий из центрального гидрофобного блока полипропиленгликоля, окруженного двумя гидрофильными блоками полиэтиленгликоля. Приблизительная длина двух блоков ПЭГ составляет 101 повторяющуюся единицу, в то время как приблизительная длина блока пропиленгликоля составляет 56 повторяющихся единиц [272, 401].

Карбопол 974 - карбоксивиниловый полимер (марки Carbopol® 974 Р NF, Lubrizol, США). Белый порошок без запаха, pH 0,5% водной дисперсии 2,7 - 3,5. Набухает в воде и других полярных растворителях после перемешивания и образует вязкие прозрачные стабильные гели после нейтрализации растворами веществ щелочного характера или при взаимодействии с полиолами. Наблюдается несовместимость с катионными веществами, электролитами в высокой концентрации и с ионами поливалентных металлов, поэтому в растворы рекомендуется добавлять хелатные агенты типа ЭДТА. Для приготовления геля карбомер должен быть полностью смешан с водой и гидратирован. При увеличении pH до 7 (диапазон 5-8) карбомер создает структуру геля. Нейтрализация выполняется неорганическими основаниями (NaOH, KOH) или аминами. Марка

974P NF: растворитель полимера - этилацетат; тип продукта-гомополимер; вязкость, кПа (0,5% при pH 7,5%) 29,400 - 39,400. Способен обеспечить пролонгированное высвобождение готовой ЛФ путем варьирования концентрации полимера [6, 149].

Поверхностно-активные вещества:

Изопропилмиристат марки Kollicream IPM (производитель: BASF, Германия). Структурная формула приведена на рисунке 2.5.

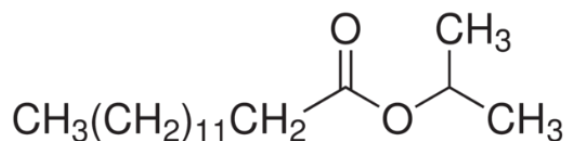


Рисунок 2.5 - Структурная формула изопропилмиристата

Прозрачная бесцветная жидкость почти без запаха. Получен этерификацией миристиновой кислоты изопропанолом. Пластификатор, эмомент; применяется местно для увеличения проницаемости кожи с целью лучшего проникновения действующего вещества [270, 402].

Октилдодеканол марки Kollicream® OD (BASF, Германия). Структурная формула приведена на рисунке 2.6.

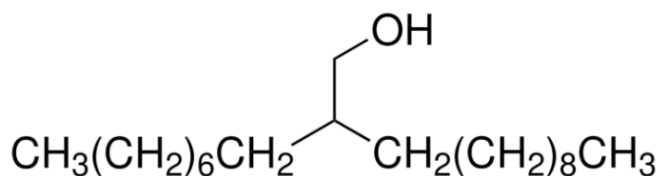


Рисунок 2.6 - Структурная формула октилдодеканола

Kollicream® OD – это бесцветная маслянистая жидкость, широко используемая как эмомент [270].

Полисорбат 20 (Твин-20) (Acros Organics, Бельгия) представляет собой неионное ПАВ, образующееся в результате этоксилирования монолаурата сорбитана. В процессе этоксилирования в молекуле остается 20 повторяющихся единиц полиэтиленгликоля. Это маслянистая жёлтая или коричневатожёлтая

прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, хорошо растворимая в воде, этаноле, практически нерастворим в жирных маслах и парафине.

Полисорбат 80 (Твин-80) (Acros Organics, Бельгия) – это окислированный моноолеат сорбитана, гидрофильный неионный ПАВ. Это вязкая жидкость желтого цвета с характерным запахом. рН 5-10% водного раствора составляет 5-7. Полисорбат 80 хорошо растворим в воде, этаноле и маслах. Номер полисорбата указывает на тип жирных кислот, соединенных с частью молекулы - полиоксиэтилен сорбитана. Моноолеат обозначается числом 80 [295].

Полоксамер 188 марки Kolliphor® Р 188 (BASF, Германия) представляет собой белый или слегка желтоватый крупнозернистый порошок воскообразной консистенции. Он легко растворим в этаноле, в воде и нерастворим в диэтиловом эфире, парафине и жирных маслах. Этот вид полоксамера обладает консистенцией и степенью чистоты, необходимые для биотехнологических препаратов [271, 341].

Другие группы вспомогательных веществ:

Полиэтиленгликоль 400, 1500, 3000 и 6000 (Химмед, Россия). Полимеры этиленгликоля с молекулярной массой 4000 и 8000 соответственно. Воскообразные чешуйки или плотная масса белого цвета. Образуют эмульсии с углеводородами, растворяются в воде, малочувствительны к изменению рН, стабильны при хранении. Производитель: Sigma-Aldrich

Метилпарагидроксibenзоат (Pharmaffiliates, Индия) - мМетил(4-гидроксibenзоат). Содержит не менее 98,0 % и не более 102,0 % метилпарагидроксibenзоата $C_8H_8O_3$. ВВ хорошо растворимо в этиловом и метиловом спиртах, мало растворимо в воде, является распространенным консервантом.

Маннитол (Shijiazhuang Huaxi pharmaceutical CO.,LTD, Китай) полиол, кристаллический белый порошок без запаха и со сладким вкусом (индекс сладости 0,8-0,9). Он служит низкокалорийным подсластителем, так как слабо усваивается кишечником и разрешён для диабетиков.

Ксилитол производства Shijiazhuang Huaxi pharmaceutical CO.,LTD (Китай) – полиол, белый порошок со сладеим вкусом, гигроскопичен, хорошо растворимы в

воде, этаноле, индекс сладости около 1,0. Используется так же в качестве низкокалорийного подсластителя, разрешен для применения у больных сахарным диабетом.

Сорбитол производства Shijiazhuang Huaxu pharmaceutical CO.,LTD (Китай) – полиол представляющий собой бесцветные гигроскопические кристаллы сладкого вкуса, растворимые в воде, спирте, индекс сладости 0,5-0,6. Используется так же в качестве низкокалорийного подсластителя, разрешен для применения у больных сахарным диабетом, широко применяется для производства суспензий и сиропов. Как и в случае с другими полиолами, при длительном применении или высокой концентрации, может вызывать расстройства желудочно-кишечного тракта [2].

Буферные растворы и стабилизаторы pH:

Натрия хлорид производства HiMedia Laboratories, Индия (ФС.2.2.0014 «Натрия хлорид» ГФ РФ). Натрия ацетата тригидрат (для фармацевтического производства в соответствии с европейской и американской фармакопеями) (NeoFroxx GmbH, Германия). Этилендиаминтетрауксусная кислота (далее - ЭДТА) производства Angene International, Китай (ГОСТ 10652-73). Трис-HCl буфер (20 мМоль/л, pH = 7,5), ОФС.1.3.0003 «Буферные растворы» ГФ РФ (Bio-Rad, США). PBS таблетки для приготовления раствора (Phosphate buffered saline, Натрий-фосфатный буфер, pH = 7,4), ОФС.1.3.0003 «Буферные растворы» ГФ РФ (NeoFroxx GmbH, Германия). Ацетатный буферный раствор и фосфатный буферный раствор соответствующие требованиям ГФ РФ, полученные из сухих солей.

2.1.3. Упаковка лекарственных форм

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

2.2. Методы исследования

Все разработанные ЛФ должны соответствовать ОФС.1.4.1.0008 «Мягкие лекарственные формы» ГФ РФ.

2.2.1. Методы исследования технологических параметров качества лекарственных форм

Описание. ЛФ описывают в соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0008 «Мягкие лекарственные формы» ГФ РФ по параметрам: внешний вид, консистенция, однородность (отсутствие признаков агрегативной нестабильности), цвет, запах.

pH гелей определяли непосредственно в самой ЛФ с использованием рН-метра Mettler Toleo S220 (Швейцария) согласно ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия» ГФ РФ.

Стерильность. Для гелей с интерфероном альфа-2b стерильность определяли методом прямого посева, для гелей с бактериофагами и эндолизинами методом стерилизующей фильтрации в соответствии с требованиями ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» ГФ РФ. Испытание проводили на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Микробиологическую чистоту ГМЛФ определяли согласно ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» ГФ РФ. Испытание проводили на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Массу содержимого упаковки определяют в соответствии с ОФС.1.4.2.0007 «Масса (объём) содержимого упаковки» ГФ РФ на весах лабораторных A&D GX-600 (Япония).

Аномальную токсичность ЛФ определяли в соответствии с ОФС.1.2.4.0004.15 «Аномальная токсичность» ГФ РФ на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора на 5 здоровых белых беспородных мышах обоего пола массой 19-21 г.

Бактериальные эндотоксины определяли по методу А по ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины» ГФ РФ.

Осмолярность контролировали у офтальмологической ЛФ по ОФС.1.2.1.0003 «Осмолярность» ГФ РФ на криоскопическом полумикроосмометре К-7400 (БиоХимМак СТ, Россия).

Механические включения видимые определяли невооруженным глазом на черном и белом фонах по ОФС.1.4.2.0005.18 «Видимые механические включения в лекарственных препаратах для парентерального применения и глазных лекарственных формах» ГФ РФ на приборе СветоЧек®–ФМ (Россия).

Металлические частицы определяли для офтальмологического геля в соответствии с ОФС.1.4.2.0023 «Металлические частицы в мазях глазных» ГФ РФ с использованием оптического микроскопа Микромед (Россия).

Цветность и прозрачность офтальмологического геля контролировали по ОФС.1.2.1.0006 «Степень окраски жидкостей» ГФ РФ по Методу 1 и по ОФС.1.2.1.0007 «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей» ГФ РФ визуальным методом, соответственно.

Определение герметичности упаковки/ определение герметичности туб проводили по ОФС.1.4.2.0025 «Определение герметичности упаковки».

Эффективность антимикробных консервантов для комбинированного геля с интерфероном альфа-2b для наружного и местного применения определяли в соответствии с ОФС.1.2.4.0011.15 «Определение эффективности антимикробных консервантов» на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Тест «Растворение» для перорального геля с бактериофагами проводили на приборе Тестер растворения DT128 ERWEKA (Германия) по методике для твердых ЛФ в соответствии с ОФС.1.4.2.0014 «Растворение для твёрдых дозированных» ГФ РФ.

Агрегативную устойчивость ГМЛФ определяли с использованием коэффициента кинетической стабильности [18, 20], на центрифуге Biosan LMC-3000 (Латвия). В ходе эксперимента было взято 5 мл ЛФ, которая была подвергнута центрифугированию в течение пяти минут при 3000 об/мин. Для расчета коэффициента кинетической стабильности использовали следующую формулу:

$$K_k = H_1/H_2, \text{ где} \quad [1]$$

H_1 – высота слоя отделившейся фазы геля;

H_2 – высота геля в пробирке.

Осмотическую активность изучали на модели диализа в приборе из стеклянной трубки диаметром 30-35 мм, один конец которой затянут диализной пленкой с размером пор 12-14 кДа (OrDial D14b, Orange Scientific, Бельгия) и емкости в водой очищенной. Использовали весы лабораторные A&D GX-600 (Япония) и термостат электрический суховоздушный ТС-80М-2 (Украина). Образец геля массой около 2 г наносили на поверхность пленки, которая затем закреплялась на трубке и помещалась в сосуд с водой очищенной на 2-3 мм. Эксперимент проводили при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение суток. Через 1 час и о истечении суток после начала эксперимента диализную трубку взвешивали с точностью до 0,01 г. Изменение массы указывает на количество жидкости, поглощенной или выделенной ЛФ по сравнению с первоначальной массой [15, 18, 75].

Величину осмотической активности определяли по формуле:

$$P = M_0/M_i \times 100\%, \text{ где} \quad [2]$$

P – осмотическая активность, M_0 – масса диализного блока до термостатирования, г, M_i – масса диализного блока через определенный промежуток времени, г

Изучение реологических характеристик. Ключевыми реологическими параметрами являются динамическая и структурная вязкость, напряжение сдвига, скорость сдвига, предел текучести, степень тиксотропии. Их определение проводят по ОФС.1.2.1.0015 «Вязкость» на вискозиметре Lamy Rheology RM 200 (Франция), программное обеспечение Lamy Rheomatic P.

Реологические свойства образцов гелей определяли с помощью измерительной системы типа «цилиндр в цилиндре» MS DIN 33 MS DIN 11 (объем ячейки 17 и 32 мл соответственно), предназначенных для измерения образцов различной вязкости. Динамическую вязкость изучали по системе «малый сдвиг-большой сдвиг-малый сдвиг» при температуре 20, 32 или 37°C в диапазонах скоростей сдвига от 0 до 300 с⁻¹ для всех типов гелей, кроме офтальмологических, для них при температуре 37°C – в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 1000 с⁻¹.

Диапазон скоростей сдвига находится в интервале от 0 до 300 с⁻¹, что соответствует условиям производства [4, 31, 73]. Значение градиента зависит от объема реактора, типа перемешивающего устройства, частоты вращения и диаметра мешалки, а также от плотности и структурной вязкости геля. Температура исследования, воспроизводящая условия производства геля, составляла 20 °C.

Изучение офтальмологических ГМЛФ при параметрах, имитирующих терапевтическое применение – температура 37°C, напряжение сдвига от 0 до 1000 с⁻¹ [40, 422].

Для расчетов использовали модель (уравнение) Кэссона:

$$\sigma^{1/2} = \sigma_{\gamma}^{1/2} + (\eta_p \gamma)^{1/2}, \text{ где [3]}$$

σ – сдвиговое напряжение;

γ – скорость сдвига;

σ_{γ} - предел текучести;

η_p – пластическая вязкость [40, 50].

Модель Кэссона относится к уравнениям с пределом текучести, и может быть применена для оценки реологических свойств материалов, которые не текут при низких скоростях сдвига, или имеют столь высокие значения вязкости, что при технологических приложениях ими можно пренебречь. В материалах с высокими напряжениями сдвига проявляется поведение типичных вязко-пластичных жидкостей, таких как ЛФ «гели» [339].

Измерение биоадгезивных свойств гелей. Биоадгезию гелей определяли методом потока [5, 168].

Методика №1. На мембрану из боросиликатного стекловолокна с плотностью 125 г/м² (AND, Япония) размером 70 x 100 мм пропитывали 4% раствором муцина, что соответствует физиологической норме его содержания в слизи [219] и помещали на плоскость стеклянной пластины, неподвижно закрепленной под углом 45° относительно горизонтальной поверхности. Слой геля муцина был около 0,1 мм, толщину определяли микрометром GRIFF МКЦ 25 (Россия). Измерение осуществляли при температуре 20±1 °С и 37±1 °С. При помощи аппликатора отбирали 1 мл экспериментального состава и наносили на верхний край прикреплённой к стеклянной пластине мембраны. Время ее стекания фиксировали с помощью секундомера. Величину мукоадгезии выражали в единицах скорости стекания образца раствора полимера, средней из пяти последовательных измерений (мм/с) [298].

Методика №2. Для определения биоадгезивных свойств гелей использовали глаза кроликов (рисунок 2.7).



Рисунок 2.7 – Глаз кролика, закрепленный на подставке

Образцы гелей окрашивали метиленовым оранжевым. Далее пипеткой на глаз наносили каплю образца и замеряли время и расстояние, на которое перемещалась капля образца геля, определяли скорость в миллиметрах в секунду и делали вывод о биоадгезивных свойствах по времени стекания.

Метод 3. Определение биоадгезии проводили по силе отрыва и времени удерживания навески лекарственной формы на подложке, обработанной водным раствором муцина свиного желудка типа Пс содержанием связанной салициловой кислоты 0,5% (SIGMA, Sigma-Aldrich, США, кат. номер М 2378) [168].

Оценку силы отрыва проводили при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ с использованием рычажного механизма (рисунок 2.8). К нижней стороне подвижной части рычага (А) с закрепленной на нем стеклянной пластиной (1) и к неподвижной пластине (4), закрепленной на столешнице Б, прикреплялся в качестве подложки нетканый материал спанбонд (SPANLAB, Россия). На поверхность неподвижной пластины (4) наносился 20% (массо-объемная концентрация) водный раствор муцина свиного желудка типа II (3), на нижнюю часть пластины (1) – испытуемый образец массой 1,0 г (2), равномерно распределенный по площади рабочей поверхности (1820 мм^2) пластины (1) с помощью шпателя. На второе плечо рычага помещался груз (М). Сила отрыва рассчитывалась как произведение массы груза, при которой верхний рычаг (А) с закрепленной пластиной (1) отрывался от пластины (4), закрепленной на столешнице (Б), на ускорение свободного падения ($g = 9,81\text{ м/с}^2$).

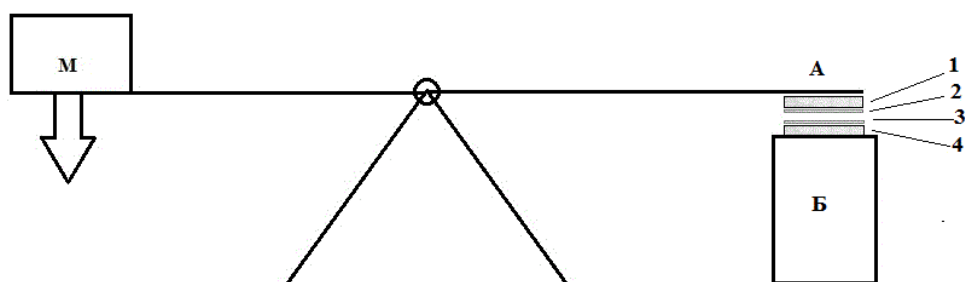


Рисунок 2.8 – Принципиальная схема рычажного механизма для определения мукоадгезии лекарственных форм методом на отрыв *in vitro*

Высыхаемость экспериментальных образцов геля для наружного и местного применения изучали в термостате Binder ED 115 (Германия) в кюветах с постоянной площадью 28 см^2 при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и относительной влажности 45%. Навеску геля помещали в кювету на высоту 1 см. Кюветы с навесками взвешивали и выдерживали в термостате в течение 30 суток. Высыхаемость образцов оценивали путем взвешивания кювет на 1ый, 5ый, 10ый и 30ый сутки эксперимента. Убыль в массе, происходящую за счет испарения влаги образца, выражали в процентах по отношению к первоначальной массе навески ЛФ [37, 79].

Адсорбционную активность образцов гелей оценивали по способности навески геля сорбировать краситель метиленовый синий. Готовили рабочий раствор метиленового синего: 0,1 г субстанции (точная навеска) растворяли в колбе с 1000 мл воды очищенной. 1 мл раствора содержит 0,0001 г метиленового синего.

В коническую колбу на 200 мл помещали 0,3 г пробы (образец ЛФ), прибавляют 100 мл рабочего раствора метиленового синего и в течение часа перемешивали на магнитной мешалке при скорости оборотов не менее 120 об/мин. Содержимое колбы после перемешивания фильтровали через беззольный фильтр, затем отбирали 5 мл фильтрата. Параллельно проводили контрольный опыт: фильтровали исходный рабочий раствор метиленового синего и также отбирали 5 мл фильтрата. 5-миллилитровые аликвотные доли были добавлены в колбы объемом 100 мл, разбавлены водой очищенной до метки и затем измерена поглощающая способность метиленового синего на спектрофотометре Leki Instruments SS 1207 (Финляндия) при длине волны 667 ± 1 нм. В качестве раствора сравнения использовалась вода очищенная, а в качестве раствора контроля - разведение фильтрата исходного рабочего раствора метиленового синего.

Адсорбционную активность образцов вычисляли по формуле:

$$X = ((A_{\text{к.о.}} - A) * C * 100) / (A_{\text{к.о.}} * m * (1 - 0,01 * W)), \text{ где [4]}$$

X – адсорбционная активность образца, г;

$A_{\text{к.о.}}$ – величина оптической плотности фильтрата исходного раствора метиленового синего;

A – величина оптической плотности фильтрата смеси образца и исходного раствора метиленового синего;

C – концентрация исходного раствора метиленового синего, г;

100 – объем раствора метиленового синего, добавленного к образцу, мл;

m – масса навески препарата, г; [85]

Намазываемость гелей определяли методом «параллельных пластин», для этого брали две стеклянные пластины размером 20 x 20 см, одинаковой массы, затем навеску образца геля массой $2,00 \pm 0,05$ г размещали в центре первой

пластины, сверху накрывали второй пластиной. Рассчитывали намазываемость в мм² по формуле:

$$Si = d^2 \times \pi / 4, \text{ где} \quad [5]$$

S – зона распределения (мм²) в зависимости от массы i;

d – диаметр зоны распределения, мм [24].

Степень увлажнения кожи после нанесения геля определялась измерением уровня влаги в коже при помощи корнеометра AZKJ_MU_JM17864 (Китай), работающего по принципу биоимпедансного анализа, суть которого заключается в измерении электрического сопротивления между разными точками на коже человека. Значения фиксировались сразу после нанесения на кожу, а также через 5, 15 и 30 минут [13, 257].

Температуру гелеобразования для вагинального геля с коктейлем бактериофагов измеряли в соответствии с методикой, описанной в ряде публикаций [90, 186, 420] методом «переворачивания пробирки». Образец геля (0,5 мл) переносили в небольшой флакон (2 мл, 12 × 32 мм), который герметично закрывали и погружали в водяную баню с термостатом при начальной температуре 20°C. Температуру водяной бани повышали с шагом 0,5°C/мин. Ртутную колбу термометра с минимально читаемой шкалой 0,2°C помещали на одном уровне с гидрогелем. Когда мениск образца геля не двигался, флакон наклоняли на 90 градусов, температуру на термометре считали температурой гелеобразования.

Прочность гелей для вагинального геля с коктейлем бактериофагов определяли в соответствии с методикой, приведенной Shmolka et al. and Choi et al. [194, 216, 265]. Жидкая гелевая основа (50 грамм) помещалась в градуированный цилиндр объемом 100 мл и выдерживалась 60 минут в термостате при 37±0,5°C. Груз для определения прочности геля (диаметром 1,5 см, весом 35 г) помещался на поверхность геля в цилиндре. Время (с), потребовавшееся грузу для преодоления 5 см геля, было зафиксировано и принято за индекс прочности. В случаях, когда время измерения превышало 5 мин, грузы большей массы помещались на поверхность и индекс прочности рассчитывался исходя из соответствующей массы груза, преодолевшей 5 см. Оптимальными значениями прочности является

диапазон более 300 секунд, что обеспечивает удобное введение и отсутствие вытекания [184].

Время гелеобразования. 10 мл жидкого геля помещали в прозрачный стакан объемом 20 мл с магнитной мешалкой. Образец, выдерживаемый при 37°C, подвергали непрерывному перемешиванию при вращении магнита 100 оборотов в минуту. Время, при котором вращение магнита остановилось, было принято как время гелеобразования [184, 351].

Оценку *вкуса* экспериментальных образцов перорального геля с коктейлем бактериофагов проводили по методу А.И. Тенцовой [7, 59]. В эксперименте участвовали 20 добровольцев, которые органолептически исследовали образцы гелей и определяли вкус, выставяя каждому образцу баллы и занося их в специально подготовленную ведомость. Для подсчета индекса вкуса, который представляет собой среднюю оценку всех параметров, участники теста оценивают ЛФ выставяя баллы. Оценка производится по четырем критериям: «сладость» (1 – несладкий, 5 – очень сладкий), «наличие послевкусия» (1 – отсутствует, 5 – присутствует сильное), «характер послевкусия» (1 – неприятный, 5 – очень приятный), «вкус в целом» (1 – неприятный, 5 – приятный) [7, 59].

2.2.2. Аналитические методы определения лекарственных веществ в составе лекарственных форм

2.2.2.1. Оценка спектра литической активности бактериофагов

Спектр литической активности бактериофагов определяли методами Аппельмана или Грациа (метод агаровых слоев) по ОФС 1.7.1.0002.15 «Бактериофаги лечебно-профилактические» ГФ РФ.

Спектр литической активности бактериофагов определяли методом spot-теста. В чашки Петри заливали 1,5% мясопептонный агар, после застывания добавляли 0,1 мл 16-18-часовой бульонной бактериальной культуры, равномерно распределяя её для сплошного роста. На агар капали бактериофаги (spot-тест). После впитывания фагов в среду чашки переворачивали и инкубировали в термостате при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24 часов, затем оценивали наличие или отсутствие «пятна лизиса».

2.2.2.2. Метод иммуноэлектрофореза

Подлинность эндолизина в составе готовой ЛФ определяли методом иммуноэлектрофореза по ОФС.1.8.2.0002.15 «Имуноэлектрофорез в агаровом геле» ГФ РФ.

2.2.2.3. Определение специфической бактерицидной активности

Определение специфической бактерицидной активности эндолизинов проводили по специфической активности в отношении грамотрицательных бактерий, указанных в таблице 2.2. Исследование активности эндолизинов проводилось по опубликованным ранее методикам с модификациями разработанными совместно с Воробьевым А.М. (рисунок 2.9) [179].

Подготовка бактериальных суспензий. В первый день готовят бактериальные культуры путем внесения при помощи микробиологической петли в 4-4,5 мл мясопептонный бульон и термостатирования при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16-18 часов в термостате Binder BD (Германия). На второй день 100 мкл 16-18-

часовой бактериальной культуры помещают в 4-4,5 мл мясопептонного бульона и инкубируют при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ до достижения мутности по МакФарланду равной 0,5 единиц. Величину мутности определяли денситометром Densi-La-Meter II (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Затем культуры центрифугируют в 1 мл при $6000 \times g$ в течение 10 минут, надосадочную жидкость удаляют, осадок ресуспендируют в фосфатном буферном растворе до достижения мутности по МакФарланду равной 0,5 единиц. Суспензию бактериальных клеток разбавляют в 100 раз при помощи фосфатного буферного раствора, получая рабочую суспензию, которую используют для проведения анализа.

Проведение анализа. 100 мкл рабочей суспензии бактериальных клеток перемешивают со 100 мкл изучаемого образца эндолизина в 96-луночном полистироловом планшете (Eppendorf, Германия). В качестве контроля используют смесь рабочей суспензии бактериальных клеток смешивают и образца плацебо в том же объеме. Планшеты инкубируют при $+37 \pm 0,4^\circ\text{C}$ в течение 30 мин при постоянном шутеллировании при 200 rpm на шейкере шейкере-термостате ST-3M (ELMI, Латвия). Затем образцы разводят в фосфатным буферным раствором в 10 и 100 раз и их наносят на поверхность агара Мюллера-Хинтона в чашках Петри. Чашки термостатируют при $+37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16-18 часов.

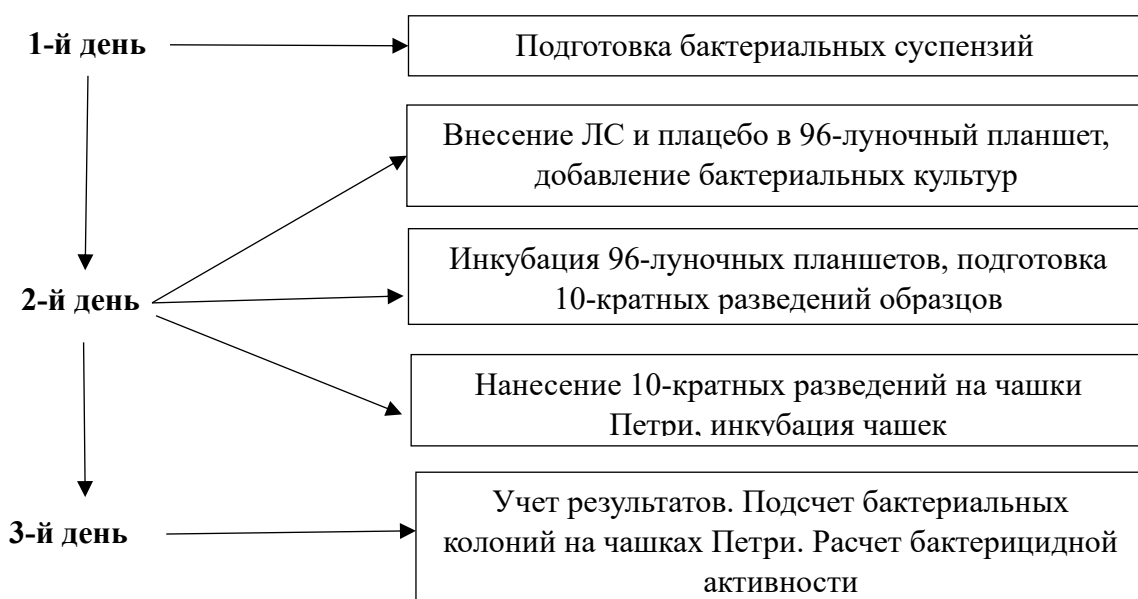


Рисунок 2.9 – Схема проведения испытания определение специфической бактерицидной активности эндолизина

Учет результатов. На третий день после ночной инкубации проводят подсчет бактериальных колоний на чашках Петри. Учет результатов проводят при условии отсутствия признаков контаминации образцов или чашек другими микроорганизмами. Учет бактерицидной активности проводят путем подсчета бактериальных колоний на чашках с образцами ЛС и плацебо. Бактерицидную активность вычисляют по следующей формуле:

$$X = (1 - A/B) * 100, \text{ где:} \quad [6]$$

X – бактерицидная активность, %;

A – количество бактериальных клеток в опыте, КОЕ/мл.

Помимо валидированной методики определения специфической активности оценивали чувствительность патогенных штаммов бактерий к эндолизину LysECD7, были использованы штаммы микроорганизмов, указанные в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Список штаммов бактерий для оценки специфической активности и чувствительности к эндолизину LysECD7

№	Название штамма	Источник	Организация, осуществившая идентификацию или депонирование	Метод идентификации
Для оценки специфической активности ЛФ и АФС				
1	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	Клинический изолят	ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России	Культурально-морфологические и биохимические
2	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Коллекция ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика	ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика	
3	<i>S. aureus</i> ATCC 25923			
Для оценки чувствительности к эндолизинуLysECD7				
1	<i>S. enterica</i> Enteritidis «Калуга»	Куры, Калужская обл.	ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН	Согласно МУ 4.2.2723-10. Идентификация путем изучения их культуральных, тинкториальных, морфологических и биохимических свойств на базе лаборатории микробиологии с музеем типовых культур ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Серотипизация с использованием наборов сывороток сальмонеллезных О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих, набор №1, набор №2 производства ФКП «Курская биофабрика – Фирма «БИОК»
2	<i>S. enterica</i> Tiphymurium №3	Утки, Краснодарский край	ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН	
3	<i>S. enterica</i> London№2	Индейка, Пензенская обл.	ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН	
4	<i>S. enterica</i> Enteritidis 3Б	Куры, Белгородская обл.	ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН	
5	<i>S. enterica</i> Enteritidis SEM4	Стоки животноводческого комплекса, Белгородская обл.	ФБУН «ГНЦ ПМБ», номер штамма в коллекции «ГКПМ-Оболensk»: В-7156	Культурально-морфологические, биохимические.
6	<i>P. aeruginosa</i> PA01	Общелабораторный штамм	ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора	Культурально-морфологические, биохимические и масс-спектрометрические (MALDI-TOF Biotyper, Bruker, Германия)

Продолжение таблицы 2.2

№	Название штамма	Источник	Организация, осуществившая идентификацию или депонирование	Метод идентификации
7	<i>P. aeruginosa</i> 11	Пациенты стационаров РФ	НИИАХ ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России	Культурально-морфологические, биохимические и масс-спектрометрические (MALDI-TOFBiotyper, Bruker, Германия)
8	<i>P. aeruginosa</i> 12			
9	<i>P. aeruginosa</i> 13			
10	<i>P. aeruginosa</i> 14			
11	<i>K. pneumoniae</i> 4	Пациенты стационара	ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии имени академика Н. Н. Бурденко»	Культурально-морфологические, биохимические (VITEK 2, Biomerieux, Франция)
12	<i>K. pneumoniae</i> 5			
13	<i>K. pneumoniae</i> 6			
14	<i>K. pneumoniae</i> 7			
15	<i>K. pneumoniae</i> 8			
16	<i>E. coli</i> 663	Пациенты стационара	НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России	Культурально-морфологические, биохимические и масс-спектрометрические (MALDI-TOFBiotyper, Bruker, Германия)
17	<i>E. coli</i> 682			
18	<i>E. coli</i> 502			
19	<i>E. coli</i> 185			
20	<i>E. coli</i> 96	Пациенты стационара	ГБУЗ г. Москвы ГКБ №67 им. Л.А. Ворохобова ДЗ г. Москвы	
21	<i>A. baumannii</i> 145			
22	<i>A. baumannii</i> 402			
23	<i>A. baumannii</i> 474			
24	<i>A. baumannii</i> 869			
25	<i>A. baumannii</i> Бор			
26	<i>Enterobacter</i> spp. 6	Пациенты КДЦ	КДЦ ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского	
27	<i>Enterobacter</i> spp. 7			
28	<i>Enterobacter</i> spp. 8			
29	<i>Enterobacter</i> spp. 9			
30	<i>Enterobacter</i> spp. 10			
31	<i>C. jejuni</i> 5	Коллекция ФБУН «ГНЦ ПМБ»	ФБУН «ГНЦ ПМБ»	
32	<i>C. jejuni</i> 12			
33	<i>C. jejuni</i> 17			
34	<i>C. jejuni</i> 18, 28			

2.2.2.4. Определение подлинности даларгина

Подлинность даларгина определяли методом спектрофотометрии в среде искусственной слезной жидкости в диапазоне от 250 до 300 нм при длине волны 275 ± 2 нм должен наблюдаться максимум, в сравнении со стандартом, которым выступает субстанция даларгина (рисунок 2.10) [71].

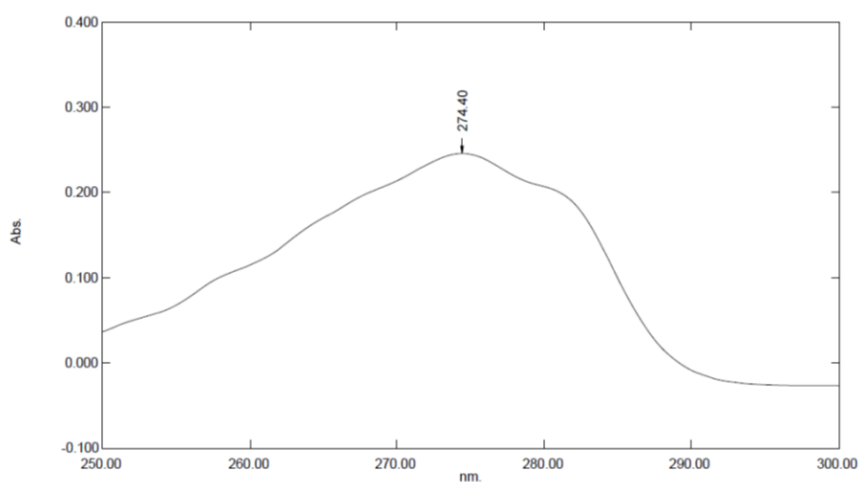


Рисунок 2.10 – Спектр поглощения комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

2.2.2.5. Количественное определение даларгина

Для разработки аналитических методик ЛФ изучали абсорбцию растворов даларгина в среде искусственной слезной жидкости, при 220 ± 2 нм, установлена линейная зависимость между концентрацией даларгина и оптической плотностью растворов. Используемое оборудование: аналитические весы SARTORIUS QUINTIX 65-1ORU (Финляндия); магнитная мешалка с нагревом ЭКРОС С-6123Н Digital (Экротех, Россия); ультразвуковая баня Scientz SB-120D с нагревом (Китай); хроматограф Shimadzu HPLC LC30 (Япония).

Приготовление растворов. Подвижная фаза А. (ПФ А): 6,8 г калия фосфата однозамещённого (ГОСТ 4198-75, «хч») растворяли в 950 мл воды очищенной. Доводили рН до значения 3,0-3,5 ортофосфорной кислотой конц. (ГОСТ 6552-80, «чда»). Раствор помещали в мерную колбу на 1000 мл, затем объем раствора доводили водой очищенной до метки, перемешивали, фильтровали и дегазировали.

Подвижная фаза В (ПФ Б): 700 мл ацетонитрила, разводили водой очищенной до объема 1 литр. Испытуемый раствор: точную навеску ЛФ растворяли в 100 мл очищенной воды в мерной колбе. Раствор сравнения: около 0,025 г субстанции даларгина растворяли в 100 мл очищенной воды в мерной колбе. Все растворы готовили непосредственно перед использованием. Параметры хроматографической системы указаны в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Основные параметры хроматографической системы

Хроматограф	Shimadzu HPLC LC30			
Колонка	250 мм х 4,6 мм, заполненная сорбентом с обращенной фазой C ₁₈ , размер частиц 5 мкм			
ПФ А	0,05М раствор калия фосфата однозамещенного в воде			
ПФ Б	Ацетонитрил для хроматографии : вода в соотношении 70 : 30 по объему			
Подвижная фаза	Градиентное элюирование			
	Время, мин	ПФ А, %	ПФ Б, %	Режим
	0-30	80→20	20→80	Линейный градиент
Скорость потока	1 мл/мин			
Температура колонки	20°C			
Детектор	УФ, λ 220±2 нм			
Объем пробы	20 мкл			
Время регистрации	30 минут			

Последовательно хроматографировали испытуемый раствор и раствор сравнения (рисунок 2.11, 2.12).

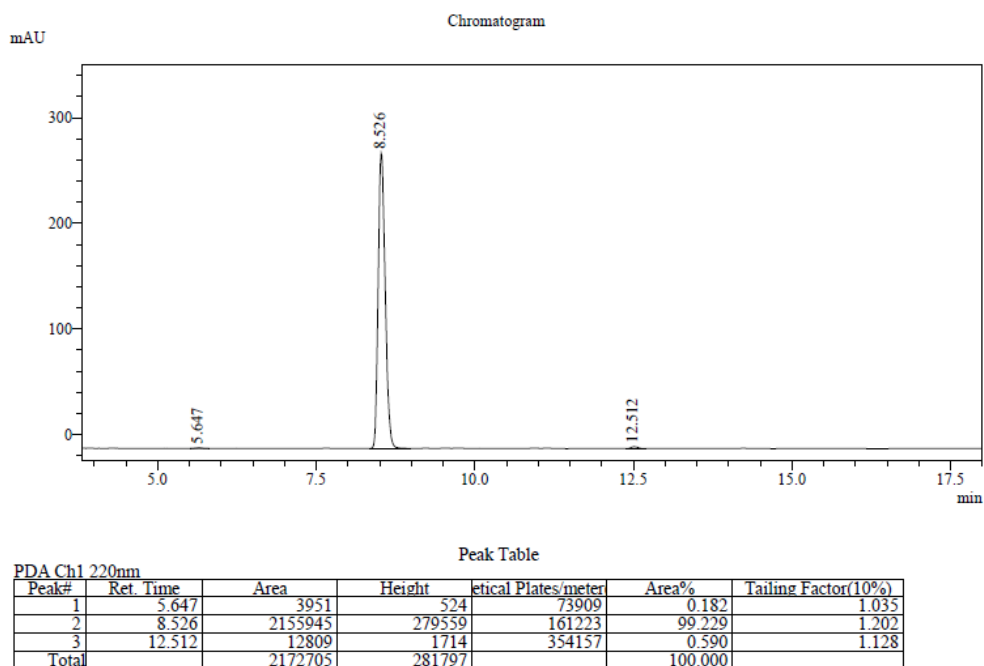


Рисунок 2.11 – Хроматограмма офтальмологического комбинированного геля интерферона альфа-2b и даларгина

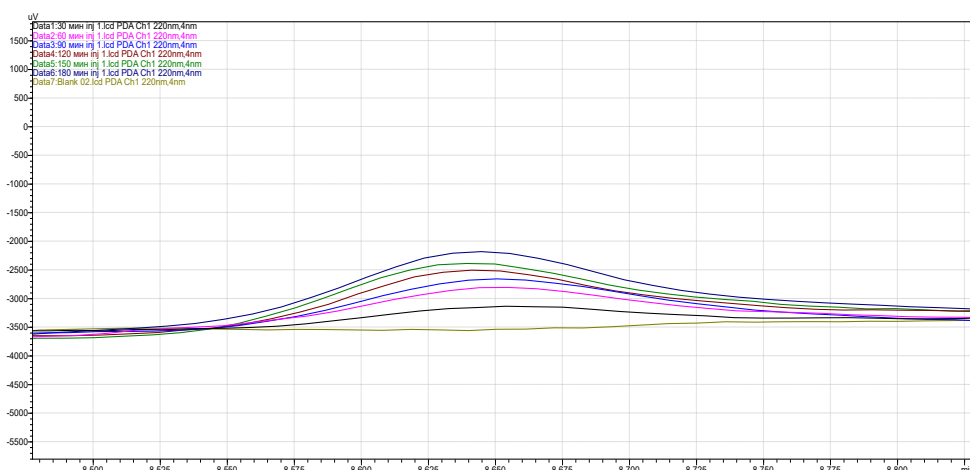


Рисунок 2.12 – Хроматограммы офтальмологического комбинированного геля интерферона альфа-2b и даларгина при проведении теста растворение

Расчет содержания даларгина в геле проводили с помощью формулы:

$$X = (S_1 * a_0) / (S_0 * a_1), \text{ где} \quad [7]$$

S_1 – площадь пика на хроматограмме после высвобождения;

a_0 – навеска стандартного образца (далее – СО) даларгина, г (0.0125 г);

S_0 – площадь основного пика на хроматограмме СО даларгина (2155945);

a_1 – масса даларгина в пробе, г.

2.2.2.6. Тест «Растворение» офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

Тест растворения осуществляли на тестере растворения ERWEKA Т 820 (ERWEKA, Германия), средой растворения выступала искусственная слезная жидкость следующего состава: натрия хлорид, натрия гидрокарбонат, кальция хлорид дигидрат, вода очищенная, 0,1М раствор хлористоводородной кислоты до pH 7,4, на аппарате 5 «Лопасть над диском». Объем среды растворения составлял 100,0 мл, скорость вращения мешалки 50 об/мин, температура среды $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Используемая диализная пленка имела размер пор 25кДа OrDial D-Clean, (Orange Scientific, Бельгия). Пробы отбирали с интервалом 0,5 часа в течение 3 часов. Объемом по 5 мл. Количественное определение метилэтилпиридинола в пробах анализировали при длине волны 325 ± 2 нм на спектрофотометре ShimadzuUV-3600 (Япония), программное обеспечение UV Probe 2.42. В качестве раствора сравнения использовали искусственную слезную жидкость.

2.2.2.7. Реакция нейтрализации противовирусной активности интерферона альфа-2b

Интерферон должен нейтрализоваться анти-альфа-интерфероновыми антителами аналогично международному стандартному образцу активности интерферона альфа-2b (WHO International Standard INTERFERON ALPHA 2b (Human rDNA derived) NIBSC code 95/656 или аналогичный). Испытание проводят по ГФ РФ, ОФС.1.7.2.0002.15 «Биологические методы испытаний препаратов интерферона с использованием культур клеток», разделом «Подлинность». Используемые реактивы, стандарты, материалы и оборудование указаны в таблице 2.4.

Реакцию нейтрализации противовирусной активности интерферона проводят с использованием следующих видов оборудования, материалов и стандартов.

Клетки и вирусы. Перевиваемая клеточная линия почки быка MDBK (NBL-1) в Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П), НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи;

1. Перевиваемая клеточная линия почки африканской зеленой мартышки Vero в Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П), ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (используется для получения суспензии индикаторного вируса);

2. Референсный штамм вируса везикулярного стоматита (VSV) сем. Rhabdoviridae, с инфекционным титром не менее 10^5 ТЦД₅₀/0,1 мл в коллекции ATCC № МК-158 (штамм «Индиана» депонирован в Государственной коллекции ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития РФ).

Питательная среда без сыворотки. В асептических условиях во флакон с 450 мл питательной среды ИГЛА MEM вносят последовательно один флакон лиофилизированного L-глутамина, 2,5 мл раствора гентамицина с концентрацией 10 мг/мл.

Ростовая среда (5-10% сыворотки). Сыворотку эмбрионов коров добавляют к питательной среде без сыворотки в день использования из расчета содержания 5-10 % сыворотки в растворе ростовой среды.

Поддерживающая среда (2-5% сыворотки). Сыворотку эмбрионов коров добавляют к питательной среде без сыворотки в день использования из расчета содержания 2-5 % сыворотки в растворе поддерживающей среды.

Диссоциирующий раствор (раствор для снятия клеток). В стерильную пробирку вместимостью 50 мл вносят равные объемы раствора Версена и трипсина раствора 0,25 %. Содержимое пробирки тщательно перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Международный стандартный образец интерферона альфа-2b. Ампулу с лиофилизированным Международным стандартным образцом (далее – МСО) Интерферона альфа-2b разводят в 1,0 мл ВДИ, вращая ампулу вокруг оси до

растворения вещества. Конечный раствор содержит интерферон альфа-2b в концентрации, указанной в инструкции к МСО в 1,0 мл (для NIBSC code 95/656, концентрация 24000 МЕ/мл). Полученный раствор с концентрацией 24000 МЕ/мл последовательно разводят до концентрации 1200 МЕ/мл.

Стандартный раствор разливают по 490 мкл в пробирки с низким связыванием белка (Protein LoBind Tubes), Eppendorf вместимость 0,5 мл и замораживают. Размораживают при комнатной температуре в течение не более 10 мин.

Таблица 2.4 – Реактивы, стандарты, материалы и оборудование проведения реакция нейтрализации противовирусной активности интерферона альфа-2b

<i>Реактивы и стандарты:</i>	
<i>Наименование</i>	<i>Производитель</i>
Международный стандартный образец (МСО) интерферона альфа-2b	Сертифицирован ВОЗ, code 95/656
Антитела нейтрализующие к интерферону-альфа, моноклональные*	MerckMillipore Chemicon® MAB 411
Антитела нейтрализующие к интерферону альфа, поликлональные*	R&D Systems, PAb to Human Interferon Alpha, Rabbit Serum, 31101-1
Игла МЕМ с солями Эрла, без глутамина, с HEPES "	ПанЭко
Краситель трипановый синий	BioRad
L-Глутамин, стерильный	ПанЭко
Сыворотка эмбрионов коров	Gibco
Гентамицин (10 мг/мл), 1000-кратный, стерильный	ПанЭко
Раствор трипсина 0,25 %, стерильный	ПанЭко
Раствор Версена	ПанЭко
Диметилсульфоксид	Sigma-Aldrich
<i>Материалы:</i>	
<i>Наименование</i>	<i>Производитель</i>
Планшет 96-луночный культуральный	Corning Costar
Планшет 24-луночный культуральный	Corning Costar
Флакон культуральный, различного объема	Corning Costar
Пробирка мерная, центрифужная, пластиковая, стерильная вместимостью 15 мл , 50 мл	Corning Costar
Пробирка для криозаморозки, 2,0 мл	Corning Costar
Пробирки микроцентрифужные пластиковые, с низким связыванием белка (Protein LoBind Tubes)	Eppendorf: вместимостью 0,5 - 2,0 мл 5,0 мл,
Наконечники для автоматических пипеток	Eppendorf: вместимостью 50-1250 мкл, вместимостью 20-200 мкл,
Планшет глубоколоночный для титрования (DeepWell Plate) 96/2000 мкл	Eppendorf
Пипетка, пластиковая, стерильная, серологическая, 50 мл, 25 мл, 10 мл, 2 мл	Corning Costar,

Продолжение Таблицы 2.4

<i>Оборудование:</i>	
Наименование оборудования	Производитель/ модель
Низкотемпературный морозильник	Sanyo, MDF-U3286S
Шейкер для CO ₂ -инкубатора	Infors-HT, Celltron
Холодильник	Атлант
Инвертированный микроскоп	Olympus, CKX41
Центрифуга	Eppendorf, 5810R
Вортекс-миницентрифуга	Biosan, Microspine FV-2400
CO ₂ -инкубатор	Sanyo, MCO-18UC
Бокс ламинарный	NuAire, Nu-425-400E
Термостат суховоздушный	TCO-1/80 СПУ
Криохранилище	Barnstead international, Locator 4Plus
Дозатор электронный переменного объема, одноканальный различного объема	Eppendorf,
Система очистки воды	Millipore, Milli-Q Gradient
Автоматический счетчик клеток	BioRad, TC20™

Антитела. Приготовление аликвот антител. Раствор размораживают при комнатной температуре, аккуратно перемешивают пипетированием, не допуская образования пены. Аликвоты помещают в пробирки с низким связыванием белка 0,2- 0,5 мл. Хранят при температуре не выше -70 °С в течение 1 года, размораживают непосредственно перед использованием. Все разведения антител делают на поддерживающей среде.

Приготовление разведений нейтрализующих антител. Для получения разведений нейтрализующих антител к 15 мкл аликвоты добавляют 135 мкл поддерживающей среды (разведение 1/10), тщательно перемешивают. В микроцентрифужных пробирках с низким связыванием белка готовят ряд десятикратных разведений, перенося по 100 мкл полученного разведения в 900 мкл поддерживающей среды. Готовят восемь последовательных рабочих разведений (1/100, 1/1000 и т.д.).

Постановка реакции нейтрализации противовирусной активности. Для постановки реакции нейтрализации подготавливают 96-луночные планшеты с монослоем клеток. Разводят испытуемого раствора и МСО интерферона альфа-2b так, чтобы в конечном разведении содержалось 10 ед/мл противовирусной активности интерферона.

Все разведения испытуемого раствора, МСО и антител готовят последовательно в глубоколоночных планшетах или пробирках типа Protein LoBind. При этом шаг разведения не должен быть больше 10, в качестве растворителя использовать поддерживающую среду. Каждое последующее разведение делать из предыдущего, перемешивая пипетированием получившийся раствор не менее 10 раз, а отбор и перенос проводить новым наконечником.

Далее рабочие разведения нейтрализующих антител помещают в 24-луночный планшет в объеме 300 мкл каждого разведения по схеме (рисунок 2.13).

	ИП		МСО			
	1	2	3	4	5	6
A	10^{-2}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-6}		
B	10^{-3}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-7}		
C	10^{-4}	10^{-8}	10^{-4}	10^{-8}		
D	10^{-5}	10^{-9}	10^{-5}	10^{-9}		

Рисунок 2.13 – Схема разведения нейтрализующих антител

В лунки 1-2 рядов с антителами прибавляют по 300 мкл рабочего разведения ИП, а в лунки 3-4 рядов - по 300 мкл рабочего разведения МСО. Планшет инкубируют в CO_2 -инкубаторе при температуре $37,0 \pm 2^\circ\text{C}$ и концентрации углекислого газа $5,0 \pm 0,5\%$ в течение 1 ч, при постоянном перемешивании (скорость перемешивания 125-135 об/мин).

После инкубации из рабочих 96-луночных планшетов с монослоем клеток удаляют культуральную среду и помещают по 100 мкл нейтрализованной смеси согласно схеме (рисунок 2.14).

Определение титра вируса проводят одновременно с внесением нейтрализованной смеси в дополнительный контрольный планшет в соответствии с описанием

Контроль культуры клеток. Не менее 4 лунок на планшете оставляют с чистой культурой клеток для оценки качества монослоя клеток.

Контроль дозы вируса. В контрольном планшете оставляют не менее 16 лунок с культурой клеток для контроля дозы индикаторного вируса, культуральную среду в них заменяют на поддерживающую.

			Контроль монослоя		Титр нейтрализующих антител							Контроль монослоя	
					10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Нейтрализующая смесь	МСО	A											
		B											
		C											
		D											
	ИП	E											
		F											
		G											
		H											

Рисунок 2.14 – Схема инкубации из рабочих 96-луночных планшетов с монослоем клеток

Контроль дозы испытуемого раствора и стандартного образца. Проверяют выбранное рабочее разведение (дозу) испытуемого раствора и МСО активности интерферона. Для этого из выбранного рабочего разведения делают ряд последовательных разведений испытуемого раствора и МСО активности интерферона, соответствующих 4 ед/мл, 2 ед/мл, 1 ед/мл, 0,5 ед/мл и 0,25 ед/мл титра противовирусной активности. Первое разведение в 2,5 раза и четыре двукратных.

Из контрольного планшета удаляют культуральную среду и вносят по 100 мкл каждого полученного разведения испытуемого раствора и МСО, не менее 4 лунок на каждое разведение. Планшеты выдерживают в СО₂-инкубаторе при температуре 37,0±2°С и концентрации углекислого газа 5,0±0,5% в течение 24±2 ч. По окончании инкубации определяют титр вируса и рассчитывают рабочую дозу индикаторного вируса, соответствующую 100 ТЦД₅₀/мл.

В лунки рабочих планшетов и в лунки контроль дозы испытуемого раствора и МСО, кроме лунок, оставленных для контроля качества клеточного монослоя, вносят по 100 мкл рабочей дозы вируса.

Контроль дозы вируса. Одновременно с внесением на рабочие планшеты вируса индикатора, проводят контроль дозы вируса. Для этого суспензию вируса, соответствующую 100 ТЦД₅₀ мл, разводят с интервалом разведения – 10, так, чтобы получить разведения, содержащие 10, 1,0 и 0,1 ТЦД₅₀ в 1 мл. В лунки с культурой клеток, оставленные для контроля дозы вируса, вносят разведения 100; 10; 1,0 и 0,1 ТЦД₅₀ в 1 мл, не менее 4 лунок на каждую дозу. Планшеты инкубируют в СО₂-инкубаторе при температуре 37,0±2°С и концентрации углекислого газа 5,0±0,5% в течение 24±2 ч.

Проверку пригодности системы и учет результатов проводят в соответствии с ОФС.

Учет результатов реакции нейтрализации интерферона. Учет результатов реакции проводят через 24±2 часа, визуально при 100-кратном увеличении.

Идентификация считается установленной, если нейтрализация противовирусной активности испытуемого раствора и МСО интерферона произошла в аналогичном разведении антител.

2.2.2.8. Определение специфической противовирусной активности интерферона альфа-2b

Определение проводят в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.7.2.0002.15 «Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток», раздел «Специфическая активность». Специфическую активность интерферона альфа-2b определяют в международных единицах (далее – МЕ), сравнивая его противовирусную активность с активностью МСО интерферона альфа-2b рекомбинантного человеческого, активностью 24000 МЕ в ампуле (WHO International Standard Interferon alpha 2b, NIBSC code 95/656 или аналогичного качества). Используются реактивы, стандарты, материалы и оборудование указаны в таблице 2.5.

Специфическую активность интерферона альфа-2b определяют в реакции подавления интерфероном цитопатического действия вируса индикатора на культуре перевиваемых клеток, чувствительных к интерферону альфа-типа.

При определении противовирусной активности используются следующие виды оборудования, материалов и стандартов.

Клетки и вирусы

1. Перевиваемая клеточная линия почки быка MDBK (NBL-1) в Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П), ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России или аналогичная из другой аттестованной коллекции;
2. Перевиваемая клеточная линия почки африканской зеленой мартышки Vero в Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П), ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России или аналогичная из другой аттестованной коллекции (используется для получения суспензии индикаторного вируса);
3. Референсный штамм вируса везикулярного стоматита (VSV) сем. Rhabdoviridae, с инфекционным титром не менее 10^5 ТЦД₅₀/мл в коллекции АТСС № МК-158 (штамм «Индиана» депонирован в Государственной коллекции ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития РФ) или из другой аттестованной коллекции.

Питательная среда без сыворотки

В асептических условиях во флакон с 450 мл питательной среды ИГЛА МЕМ прибавляют последовательно: один флакон лиофилизированного L-глутамина (содержимое одного флакона, 146 мг, растворяют в 5 мл среды и помещают во флакон); 2,5 мл раствора гентамицина с концентрацией 10 мг/мл.

Ростовая среда (5-10% сыворотки). Сыворотку эмбрионов коров добавляют к питательной среде без сыворотки в день использования из расчета содержания 5-10 % сыворотки в растворе ростовой среды.

Поддерживающая среда (2-5% сыворотки). Сыворотку эмбрионов коров добавляют к питательной среде без сыворотки в день использования из расчета содержания 2-5 % сыворотки в растворе поддерживающей среды.

Питательная среда для криоконсервации (30% сыворотки). Сыворотку эмбрионов добавляют к питательной среде без сыворотки Игла-МЕМ в день использования из расчета содержания 30 % сыворотки в растворе ростовой среды. Добавляют DMSO, в количестве 7-10 % DMSO в растворе среды, если в паспорте на культуру клеточной линии не указано иное.

Диссоциирующий раствор (раствор для снятия клеток). В стерильную пробирку вместимостью 50 мл вносят равные объемы раствора Версена и трипсина раствора 0,25 %. Содержимое пробирки тщательно перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

МСО интерферона альфа-2b. Ампулу с МСО интерферона альфа-2b разводят в 1,0 мл воды для инъекций, вращая ампулу вокруг оси до растворения вещества. Полученный раствор с концентрацией 24000 МЕ/мл последовательно разводят до концентрации 1200 МЕ/мл.

Стандартный раствор разливают по 490 мкл в пробирки с низким связыванием белка (Protein LoBind Tubes), Eppendorf вместимость 0,5 мл и замораживают. Срок годности раствора – 12 месяцев при хранении при температуре не выше минус 70 °С.

Хранение культуры клеток (криоконсервация). Стартовую культуру клеток, чувствительных к интерферону альфа-типа, получают из аттестованной коллекции федеральной организации, при условии подтверждения видовой идентичности и свойств (чувствительность к вирусам, кариологическая характеристика, биохимические маркеры), контроля контаминации.

Для приготовления запаса клеток стартовую культуру клеток выращивают во флаконах культуральных на 75 см² /175 см², используя ростовую среду при температуре 37,0±1 °С в атмосфере 5,0±0,5 % CO₂ в течение 24- 48 ч до образования полного монослоя. Из флакона со сформировавшимся клеточным монослоем убирают культуральную среду, промывают раствором Версена с температурой (37,0±1,0) °С. Вносят 1,5- 2,5 мл диссоциирующего раствора, в зависимости от размера культурального флакона, равномерно распределяют его по всей поверхности.

Таблица 2.5 – Реактивы, стандарты, материалы и оборудование для определения специфической противовирусной активности интерферона альфа-2b

<i>Реактивы и стандарты:</i>	
<i>Наименование</i>	<i>Производитель</i>
Международный стандартный образец (МСО) интерферона альфа-2b	Сертифицирован ВОЗ , NIBSC, code 95/656
Игла МЕМ с солями Эрла, без глутамина, с HEPES	ПанЭко
Краситель трипановый синий	BioRad
L-Глутамин, стерильный	ПанЭко
Сыворотка эмбрионов коров	Gibco
Гентамицин (10 мг/мл), 1000-кратный, стерильный	ПанЭко
Раствор трипсина 0,25 %, стерильный	ПанЭко.
Раствор Версена	ПанЭко
Диметилсульфоксид	Sigma-Aldrich
Вода для инъекций	ФС.2.2.0019.18
<i>Материалы:</i>	
<i>Наименование</i>	<i>Производитель</i>
Планшет 96-луночный культуральный	Corning Costar
Планшет 24-луночный культуральный	Corning Costar
Флаконы культуральные различного объема	Corning Costar
Фильтр-насадка на шприц	Corning
Пробирка мерная, центрифужная, пластиковая, стерильная вместимостью 15 мл, 50 мл	Corning Costar
Пробирка для криозаморозки, пластиковая, стерильная, вместимостью 2,0 мл	Corning Costar
Пробирки микроцентрифужные пластиковые, с низким связыванием белка	Eppendorf: 0,5 мл, 2,0 мл 5,0 мл,
Наконечники для автоматических пипеток	Eppendorf: 50-1250 мкл, 20-200 мкл
Планшет глубоколоночный 96/2000 мкл	Eppendorf
Пипетка, 50 мл, 25 мл, 10 мл, 2 мл	Corning Costar
<i>Оборудование:</i>	
<i>Наименование оборудования</i>	<i>Производитель/ модель</i>
Низкотемпературный морозильник	Sanyo, MDF-U3286S
Холодильник	«Атлант»
Инвертированный микроскоп	Olympus, CKX41
Центрифуга	Eppendorf, 5810R
Вортекс-миницентрифуга	Biosan, Microspine
CO ₂ -инкубатор	Sanyo, MCO-18UC
Бокс ламинарный	NuAire, Nu-425-400E
Термостат суховоздушный	TCO-1/80 CIY
Криохранилище	Barnstead international, Locator 4Plus,
Дозатор электронный переменного объема, многоканальный, различного объема	Eppendorf
Система очистки воды	Millipore, Milli-Q Gradient, или аналогичная
Автоматический счетчик клеток	BioRad, TC20TM, или аналогичный

Монослой клеток инкубируют при температуре около 20°C несколько минут для отслаивания клеток от стенок флакона. Снять клетки с подложки культурального флакона диссоциирующим раствором и ресуспендировать в 3-5 мл бессывороточной среды. Произвести подсчет клеток с помощью автоматического счетчика клеток или камеры Горяева. Развести клеточную суспензию до концентрации $(3-4) \cdot 10^6$ кл/мл бессывороточной средой (если в паспорте клеточной линии не указано иное).

К полученной суспензии добавить равное по объему количество питательной среды для криоконсервации. Полученную суспензию клеток в криоконсервирующей среде разлить по 1,5-1,8 мл в пробирки для криозаморозки вместимостью 2,0 мл. Срок хранения клеток в жидком азоте, при температуре минус 196 °C, в течение 10 и более лет.

Восстановление культуры клеток после криоконсервации. проводят на водяной бане при $(37,0 \pm 1,0)$ °C в течение 3-5 мин). Клетки перемещают из крио пробирки во флакон площадью 25 см² с 10 мл ростовой питательной среды, прогретой до 37 ± 1 °C. Во флаконах культуру клеток инкубируют в течение 48-96 ч при температуре $37,0 \pm 1$ C в атмосфере $5,0 \pm 0,5$ % CO₂. Через $4,0 \pm 0,1$ ч от начала инкубации сливают из культурального флакона ростовую питательную среду и добавляют 10 мл свежей ростовой среды, прогретой до $37,0 \pm 1$ °C.

Пассирование культур клеток. Для сохранения жизнеспособности и свойств клеток, через каждые 2-4 дней проводят пересев клеток на новую питательную среду, перенося не менее 1,5 млн клеток на 1 флакон 75 см² или 3,5 млн клеток на 1 флакон 175 см². Для биологических методов испытания используют клетки, восстановленные после криоконсервации (3 пассажа) и прошедшие в лаборатории не более 30 пассажей.

Подготовка клеточного монослоя. В асептических условиях из флакона со сформировавшимся клеточным монослоем удаляют культуральную среду, трижды промывают раствором Версена $(37,0 \pm 1,0)$ C. Вносят 1,5- 2,5 мл диссоциирующего раствора, затем термостатируют при температуре 20-25° минут до набухания и

начала отслоения клеток от стенок флакона. Во флакон культуральный вносят 5-10 мл ростовой среды, клетки перемешивают плавными круговыми движениями.

В полученной взвеси подсчитывают количество клеток с помощью автоматического счетчика клеток BioRad TC20™ или в камере Горяева. Доводят концентрацию клеток до $1,8 \cdot 10^5$ - $2,0 \cdot 10^5$ клеток в мл добавлением ростовой среды. Полученную взвесь клеток разливают по 100 мкл в 96-луночные культуральные планшеты, которые выдерживают при температуре $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в атмосфере $5,0 \pm 0,5\%$ CO_2 в течение суток.

Подготовленные 96-луночные планшеты с культурой клеток используют для определения активности (титра) дозы индикаторного вируса, в биологических методах испытания интерферона человеческого альфа-типа.

Приготовление вирусной суспензии. Для наращивания вирусной биомассы подготавливают флаконы культуральные 75 см² с суточным монослоем клеток VERO. Монослой трижды промывают раствором Версена. В полученную из коллекции ампулу с лиофилизированной суспензией вируса добавляют 1 мл питательной среды без сыворотки. Содержимое ампулы переносят в подготовленные культуральные флаконы 75 см² с суточным монослоем клеток, ампулу промывают дополнительным объемом (2-4 мл) питательной среды без сыворотки и также переносят на клетки. Флаконы выдерживают при комнатной температуре в течение 1 часа, затем добавляют 15 мл питательной среды без сыворотки и выдерживают при температуре $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в атмосфере $5,0 \pm 0,5\%$ CO_2 в течение двух суток (пассаж 1). Через каждые 24 часа культивирования просматривают флаконы под инвертированным микроскопом, оценивая степень поражения клеток вирусом. При отсутствии поражения через 48 ч., 2-3 мл среды из флакона с 1 пассажем переносят на новый флакон с отмытым от сыворотки раствором Версена суточным монослоем клеток VERO, добавляют 10 мл питательной среды без сыворотки и инкубируют при температуре $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в атмосфере $5,0 \pm 0,5\%$ CO_2 в течение 24-48 ч (пассаж 2). Пассирование вируса на новый флакон с отмытым от сыворотки раствором Версена суточным монослоем клеток VERO проводят до тех пор, пока 100 % поражение клеток не будет

достигаться за 1 сутки. При наступлении 100 % цитопатического поражения за 1 сутки, культуральную среду сливают в стерильную центрифужную пробирку объемом 50 мл, центрифугируют 10 мин при 4000-10000 об/мин для осаждения клеточного дебриса. Осветленную центрифугированием среду с вирусом разливают в микроцентрифужные пробирки аликвотами по 500 мкл.

Определение титра индикаторного вируса. Пробирку с вирусом везикулярного стоматита размораживают при комнатной температуре. В микроцентрифужных пробирках с низким связыванием белка или титр- трубах готовят ряд десятикратных разведений от 10^{-1} до 10^{-10} , перенося по 100 мкл полученного разведения в 900 мкл поддерживающей среды.

В подготовленных 96-луночных планшетах с монослоем клеток, культуральную среду заменяют на поддерживающую 100 мкл на лунку, затем вносят 100 мкл разведений индикаторного вируса и термостатируют 24 часа при температуре 37 ± 1 °C в атмосфере с $5,0 \pm 0,5$ % CO_2 .

За титр (активность) вируса принимают величину, обратную разведению вируса, при котором клеточный монослой в 50 % лунок оказался полностью пораженным цитопатическим действием. За титр (активность) вируса принимают величину, обратную разведению вируса, при котором клеточный монослой в 50 % лунок оказался полностью пораженным цитопатическим действием. Титр вируса выражают в тканевых цитопатических дозах –ТЦД 50/мл. Титр вируса вычисляют методом Спирмена-Кербера по ОФС.

Для постановки анализа используется вирус с инфекционным титром не ниже 10^5 ТЦД/мл. Определение противовирусной активности проводят на монослое клеток в 96-ти луночных планшетах.

Подготовка испытуемого образца лекарственного препарата и подготовка МСО для проведения анализа

Готовят объединенную пробу лекарственного препарата (здесь и далее ИП), смешав три емкости образца в пробирках с низким связыванием белка. В пробирках с низким связыванием белка делают серию предварительных кратных (но, не более

чем в 10 раз) разведений до 200 МЕ исходя из номинального содержания интерферона альфа-2b в дозировке.

МСО размораживают и готовят разведения до 200 МЕ/мл.

Для NIBSC code 95/656 из размороженной аликвоты (1200 МЕ/мл) отбирают 470 мкл в пробирку с низким связыванием белка, добавляют 2350 мкл поддерживающей питательной среды (разведение 1/6), получая рабочую концентрацию МСО 200 МЕ/мл.

Приготовление рабочих разведений испытуемого образца и МСО

Из последнего предварительного разведения делают ряд из восьми последовательных рабочих двукратных разведений в глубоколоночном планшете.

Объем каждого разведения должен быть таким, чтобы хватило на внесение в 4 лунки в двух повторностях + 100- 200 мкл.

Для приготовления ряда двукратных разведений в двойной повторности, вносят в титровальный планшет по 900 мкл поддерживающей среды. В первую лунку вносят 900 мкл образца из последнего предварительного разведения, тщательно перемешивают и проводят дальнейшее титрование, последовательно перенося по 900 мкл полученного двукратного разведения в следующую лунку ряда.

Из всех лунок рабочего и одного контрольного планшетов удаляют культуральную среду в емкость, содержащую дезинфицирующий раствор. В лунки рабочего планшета помещают по 100 мкл приготовленных разведений испытуемый раствор и МСО интерферона.

Контроль клеточного монослоя и дозы индикаторного вируса. В рабочем планшете оставляют не менее 4 лунок с чистой культурой клеток для оценки качества монослоя. В этих лунках меняют культуральную среду на поддерживающую. В контрольном планшете также меняют питательную среду на поддерживающую. Все планшеты инкубируют сутки при температуре $37,0 \pm 1$ °C и содержании CO_2 $5,0 \pm 0,5\%$. После установления активности вируса проводят подсчет дозы для последующего внесения в лунки рабочего планшета 100 ТЦД₅₀. Вирусную суспензию разводят до рабочей концентрации 100 ТЦД₅₀/мл

поддерживающей средой. Вносят подготовленную суспензию вируса с концентрацией 100 ТЦД₅₀ в лунки рабочих 96-луночные планшетов, кроме лунок оставленных для контроля клеточного монослоя. В лунки, предназначенные для контроля клеточного монослоя, вносят по 100 мкл поддерживающей среды, для сохранения равенства объемов.

Контроль дозы вируса. Одновременно с внесением на рабочие планшеты вируса индикатора, на дополнительном планшете проводят контроль дозы вируса. Для этого суспензию вируса, соответствующую 100 ТЦД₅₀ мл, разводят с интервалом разведения – 10, так, чтобы получить разведения, содержащие 10, 1,0 и 0,1 ТЦД₅₀ в мл. В лунки с культурой клеток, оставленных для контроля дозы вируса, вносят разведения 100; 10; 1,0 и 0,1 ТЦД₅₀, не менее 4 лунок на каждую дозу. Планшеты инкубируют сутки при температуре $37,0 \pm 1$ °С в атмосфере $5,0 \pm 0,5\%$ CO₂.

Учет результатов проводят визуально при стократном увеличении. Система считается пригодной и результаты анализа подлежат учету в соответствии с критериями, указанными в ОФС.

За титр интерферона принимают величину, обратную разведению препарата, при котором клеточная культура в 50 % лунок оказалась полностью защищенной от цитопатического действия вируса. Титр интерферона вычисляют методом Спирмена-Кербера по формуле, описанной в ОФС.

Противовирусную активность интерферона альфа 2b в испытуемом образце, выраженную в МЕ/мл, вычисляют как среднее арифметическое 2 измерений специфической противовирусной активности.

2.2.2.9. Определение подлинности декспантенола

Подлинность декспантенола в ЛФ определяют методом тонкослойной хроматографии и качественной реакции раствором натрия гидроксида и сульфата меди в соответствии с ФС.2.1.0659 «Декспантенол» ГФ РФ.

2.2.2.10. Количественное определение декспантенола

Количественное определение декспантенола проводят методом титриметрии по ФС.2.1.0659 «Декспантенол» ГФ РФ.

2.2.2.11. Определение подлинности лидокаина

Подлинность лидокаина в ЛФ определяют в соответствии с ФС.2.1.0123 «Лидокаина гидрохлорид» по качественной реакции на хлориды и УФ-спектроскопии, раствор ЛФ должен иметь характерный максимум при 201 ± 2 нм и минимум при 261 ± 2 нм [35].

2.2.2.12. Количественное определение лидокаина

Количественное определение лидокаина в составе лабиального геля проводили методом УФ-спектрофотометрии в растворе 0,1 моль/л

хлористоводородной кислоты при длине волны 201 ± 2 нм на спектрофотометре SPECORD 50 plus производства компании Analytik Jena (Германия) [35].

2.2.2.13. Валидация аналитических методик

Валидацию аналитических методик контроля качества ЛП проводили по ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ. Все использованные в работе аналитические методы валидированы.

2.2.3. Изучение стабильности и определение срока годности разработанных лекарственных форм

Изучение стабильности и определение срока годности разработанных ЛФ проводилось в соответствии с ОФС.1.1.0009 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» и Решением Коллегии ЕАЭС от 10.05.2018 № 69 "Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций". Для каждого из разработанных в данном исследовании ЛП составлялась программа изучения стабильности, включающая ускоренные испытания, фотостабильность в первичной и вторичной упаковке, стрессовые испытания, долгосрочные испытания. Однако в диссертационном исследовании, было решено показать часть исследований в первичной упаковке, для демонстрации данных подтверждающих стабильность ЛП и сроки годности.

2.2.4. Изучение безопасности и эффективности лекарственных форм

2.2.4.1. Изучение фармакокинетических показателей бактериофагов в пероральном геле

Изучение фармакокинетических показателей перорального геля бактериофагов проводилось на 12 кроликах породы шиншилла (самцы) с весом от 3,5 до 4 кг. До эксперимента кролики находились на карантине в течение двух недель. Обращение с животными было в соответствии Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Изучение фармакокинетических показателей бактериофагов одобрено этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (Приложение Д). За 30 минут до введения геля бактериофагов кроликам нейтрализовали рН желудочного сока за счет перорального введения каждому животному по 3 мл суспензии Алмагель® (Teva, Россия). Было решено предварительно вводить антацидный препарат, так как известно, что многие бактериофаги при пероральном приеме могут терять активность под действием желудочного сока и в кислой среде желудка. Все изучаемые фаги неустойчивы при рН менее 6. Через 30 минут после введения препарата Алмагель®, кролики были поделены на 2 группы по 6 особей. Каждому животному перорально вводилось по 3 мл коктейля бактериофагов, первой группе давался коктейль №1, второй группе – коктейль №2. За 20 ч до начала эксперимента животных переставали кормить, за 1 ч до начала процедуры — убирали поилки. Интервалы забора крови у кроликов были следующие: 15, 30, 45, 90 минут, 3, 6, 9 часов и 24 часа. Весь кал и мочу собирали в течение 48 часов наблюдения.

Кровь экспериментальных животных отбирали из ушной вены в пробирки с ЭДТА. Мочу смешивали с хлороформом в соотношении 1:10, взбалтывали 15 минут и центрифугировали 30 минут при 5000 об/мин (центрифуга Eppendorf Mini Spin,

Erpendorf, Германия), после чего использовали надосадочную жидкость. Кал смешивали с 10-15 мл физиологического раствора, добавляли хлороформ в соотношении 1:10, взбалтывали 15 минут и центрифугировали аналогично, отбирая надосадочную жидкость.

В ходе изучения фармакокинетических показателей, с целью подтверждения присутствия в крови, моче и кале фаговых частиц, материал до и после однократного введения животным бактериофагов исследовали микробиологическими методами спот-тестом и методом Грация, и затем молекулярно-генетическим методом – полимеразной цепной реакцией (далее – ПЦР). Количество фаговых частиц в фаголизате определяли методом Грация. Для подтверждения подлинности и бактериофагов в биологических жидкостях использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени (qPCR). Извлечение фаговой ДНК из образцов осуществляли набором для выделения суммарной ДНК (ExtractDNA Blood&Cells, Евроген) согласно протоколу производителя. Далее брали 1 мкл выделенной ДНК. В качестве основы реакционной смеси ПЦР использовали qPCRmix-HS SYBR (ЗАО Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя. В состав реакционной смеси входило 3 мМ ионов магния и по 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров. Для проведения реакций использовали олигонуклеотидные последовательности, приведенные в таблице 2.6. Реакционные смеси с каждой парой праймеров готовили в отдельных микропробирках при общем объеме реакционной смеси 25 мкл, в том числе 5 мкл ДНК образца или контроля.

Положительным контролем послужили образцы ДНК, выделенные из бактериофагов до их введения в коктейли. В качестве отрицательного контроля была взята готовая стоковая реакционная смесь без образцов ДНК. Амплификацию и учет результатов в режиме реального времени проводили с использованием термоциклера C1000Touch с блоком детекции CFX96 (Bio-Rad, США). Режим амплификации включал 35 циклов денатурации ДНК при 95°C в течение 10 с, отжига праймеров при 58°C – 10 с, элонгации при 72°C – 20 с.

Таблица 2.6 – Праймеры для выявления фрагментов ДНК фагов

Наименование фага	Назначение олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'
FM4b	Прямой праймер	GCGTAAAAACCAAGCACCGT
	Обратный праймер	TGTAGGGTTAAGCAAGCCCG
FG1m	Прямой праймер	GGCCAGTCTGGAAACCCATC
	Обратный праймер	ACCACCGTTATCAGGAGTCT
Ec732	Прямой праймер	TTGCCGTCTCCGTCGTAAA
	Обратный праймер	ACTGTGAGATCTTCGCTGGC
Ec13-52	Прямой праймер	GCTCACGACGGAAGTAACCA
	Обратный праймер	TTAACGACGGAGACGGCAA

Анализ результатов ПЦР проводился автоматически с использованием программного обеспечения для ПЦР амплификатора. Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для красителя SYBR. Регистрация роста сигнала по каналу SYBR в пробах анализируемого образца свидетельствовала о наличии в образце специфических фрагментов ДНК геномов бактериофагов. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывалась программой прибора, как N/A.

2.2.4.2. Изучение безопасности геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

Изучение безопасности геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP проводили на базе лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора и лаборатории микробиологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН в соответствии с действующей нормативной базой [66]. Изучали острую токсичность, субхроническую токсичность (кумуляцию), хроническую токсичность, местно-раздражающее действие, аллергизирующее действие, иммуотоксичность.

Все исследования были одобрены локальным Этическим комитетом ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол №541 от 09.07.2019, Приложение Г).

Животные. Исследования острой токсичности проводились на 18 самках и 18 самцах аутбредных мышей (плюс запас 4 мыши), распределенных в три экспериментальные группы по 6 самок и 6 самцов в каждой, а также на 18 особях кроликов породы Советская шиншилла (9 самцах и 9 самках), которые были разбиты на 3 экспериментальные группы (по 3 самца и 3 самки в каждой).

Исследования субхронической токсичности проводились на 30 самках и 30 самцах аутбредных мышей, распределенных в три экспериментальные группы по 10 самок и 10 самцов в каждой. Исследования хронической токсичности проводились на 72 крысах: 36 – самцы и 36 – самки и на 36 кроликах: 18 – самцы и 18 – самки, из которых было сформировано 12 подгрупп (крысы по 6 животных, кролики по 3 животных в каждой). Исследования реактогенности и аллергенности проводились на 30 крысах (15 самцах и 15 самках), распределенных в три экспериментальные группы по 5 самок и 5 самцов в каждой. Исследования иммунотоксичности проводились на мышах, из которых было сформировано 6 подгрупп по 10 животных в каждой. Самцы и самки формировались в разные группы.

Исследование анализа мочи проводили по следующим показателям: цвет мочи, прозрачность, кислотность (pH), белок, глюкоза, кетоновые тела, относительная плотность (SpG), билирубин, гемоглобин, эритроциты, лейкоциты, эпителий, цилиндры: бактерии, слизь (цилиндромы), неорганизованный осадок.

Исследование гематологического анализа крови проводилось по следующим параметрам: гематокрит (PCV), гемоглобин (Hb), эритроциты (RBC), среднее содержание Hb в эритроците (MCH), средняя концентрация Hb в эритроците (MCHC), средний объем эритроцита (MCV), СОЭ (ESR), лейкоциты (WBC), количество ядерных эритроцитов/100 лейкоцитов (nRBC), скорректированное количество лейкоцитов, а также лейкограмма - нейтрофильные миелоциты (Myelocyte), нейтрофильные метамиелоциты (Metamyelocyte), палочкоядерные нейтрофилы (Bands), сегментоядерные нейтрофилы (Neu), эозинофилы (Eos),

моноциты (Mon), базофилы (Bas), лимфоциты (Lym), тромбоциты (PLT). Исследование биохимического анализа крови проводилось по следующим параметрам: билирубин общий, билирубин прямой, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, мочевины, креатинин, общий белок, альбумин, глобулин, щелочная фосфатаза, α -амилаза, глюкоза, калий, натрий, фосфор, кальций, ионизированный кальций, хлор, кислотность, осмолярность, холестерин, триглицериды.

Плановая эвтаназия выполнялась на 30-й день исследования. Животные подвергались эвтаназии путем наркотизации смесью Золетил/Ксилазан (Золетил из расчета 20 мг/кг в/м («Virbac» Франция), Ксиланит 10 мг/кг в/м (ЗАО «НИТА-ФАРМ, Россия, г. Саратов) с последующим обескровливанием путем тотального забора крови из нижней полой вены.

Патоморфологическое исследование тел животных с описанием отклонений в макроскопическом строении проводилось по следующим внутренним полостям и органам: лимфатические узлы, щитовидная железа, аорта, сердце, легкие (два), тимус, пищевод, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник, печень, селезенка, почки (две), мочевого пузыря, надпочечники (два), головной мозг, семенники (два) (самцы), яичники (два) (самки). Оценку местно-раздражающего действия осуществляли на основании данных осмотра при вскрытии, а также по результатам гистологического исследования. Для гистологического исследования брали места нанесения препарата.

Были взвешены следующие органы: сердце, легкие (два), тимус, печень, селезенка, почки (две), надпочечники (два), головной мозг, семенники (самцы) (два) / яичники (самки) (два). Парные органы были взвешены вместе. Кроме абсолютной массы органов, было определено процентное отношение массы органа к массе тела, определенное непосредственно перед некропсией.

Был проведен гистологический анализ внутренних органов (головной мозг, лимфатические узлы, щитовидная железа, сердце, легкие, кишечник, поджелудочная железа, печень, селезенка, почка, надпочечник, мочевого пузыря, семенник (самцы)/ яичник (самки) и тканей (мышцы скелетные, место нанесения

препарата кожа и подлежащие ткани). Для получения стекол с образцами органов и тканей, их после фиксации обезвоживали, пропитывали парафином и из парафиновых блоков делали срезы толщиной 4-5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Стекла исследуют с помощью светового микроскопа. У крыс и кроликов гистологический анализ был выполнен для самок и самцов, подвергнутых эвтаназии на 30-й день.

Для всех количественных данных была применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение и стандартное отклонение, которые вместе со значением N (количество вариантов в группе) были представлены в итоговых таблицах. Вычислялось групповое среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD), а также стандартная ошибка среднего (SEM). Описательный статистический анализ проводился для каждого пола отдельно, данные по всем группам представлены в обобщающих таблицах. Сравнение данных каждой экспериментальной группы проводилось с аналогичным значением в контрольной группе. Статистический критерий сравнения выбирался исходя из вида распределения, типа и зависимости данных, а также количества сравниваемых выборок. Различия считались статистически значимыми при 95 % уровне значимости ($p \leq 0,05$). Значимо различающиеся данные отмечались в обобщающих таблицах с указанием использованного критерия сравнения.

2.2.4.3. Изучение местного-раздражающего действия офтальмологической лекарственной формы

Определение местного-раздражающего действия офтальмологического геля проводили методом конъюнктивной пробы на кроликах породы шиншилла массой 3,5 – 4,3 кг в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [26, 65, 416, 432] на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора. Все эксперименты на животных были

одобрены этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Местно-раздражающее действие оценивали на 10 кроликах. ЛФ в объеме 0,1 мл вводили три раза в день в течение 7 дней. Один глаз служил для нанесения средства, другой – в качестве контроля, соответственно вводили плацебо (плацебо – стерильный физиологический раствор). Отмечали выраженность гиперемии, отека конъюнктивы, инъекцию сосудов склеры, состояние роговицы и радужной оболочки, количество и качество выделений из глаза в течение 14 дней, которые оценивали в баллах (таблицы 2.7, 2.8).

Таблица 2.7 – Оценка интенсивности местно-раздражающего действия средства на глаза

Признаки местно-раздражающего действия	Оценка/ баллы
А. Покраснение века и бульбарная конъюнктивит не затрагивающая роговицу и радужную оболочку	
Состояние сосудов нормальное	0
Сосуды расширены больше нормы	1
Разлитая гиперемия, отдельные сосуды трудноразличимы	2
Диффузная, ярко красного цвета гиперемия	3
В. Отек век	
Отека нет	0
Слабый отек включая мигательную перепонку	1
Явный отек и частичное выворачивание века	2
Отек, веки наполовину закрылись	3
Отек, веки закрыты более чем на половину или полностью закрыты	4
С. Выделения	
Выделений нет	0
Минимальное количество в углу глазной щели	1
Количество выделений с увлажнением век и шерсти, прилегающей к векам	2
Сумма баллов А+В+С	1
А. Помутнение роговицы – степень плотности, участок наибольшей плотности	
Помутнения нет	0
Рассеянное или диффузное, детали радужной оболочки хорошо видны	1
Хорошо различимые полупрозрачные участки, детали радужной оболочки слегка замутнены	2
Непрозрачная, радужная оболочка не видна	3
В. Площадь поражения роговицы	
Роговица не поражена	0
Одна четверть или менее, но более нуля	1
Более одной четверти, но менее половины	2
Более половины, но менее трех четвертей	3
Более трех четвертей, но менее всей площади	4
Сумма баллов А+В	0

Результаты обследования каждого животного суммируются и вносятся в заключение о степени и характере поражения глаз, при действии на него изучаемого средства.

Таблица 2.8 – Классификация опасности по выраженности местно-раздражающих свойств геля

Выраженность раздражающего действия	Средний суммарный балл
Резко выраженное	Более 6
Выраженное	4,1-6,0
Умеренное	2,1-4,0
Слабое или отсутствие	0 - 2,0

2.2.4.4. Изучение местно-раздражающего действия геля для наружного и местного применения

Изучение местно-раздражающего действия геля для наружного и местного применения проводилось методом накожных аппликаций на кроликах породы шиншилла массой 3,5 – 4,3 кг (таблица 2.9).

В исследовании было задействовано 6 животных. Всем кроликам за одни сутки до начала эксперимента выбривали два боковых участка поверхности туловища размером 4х4 см. В течение 7 суток на участок правого бока пять раз в день по 1 г наносился лабиальный гель, на левый бок наносился стерильный физиологический раствор в объеме 1 мл, таким образом левый боковой участок служил для сравнения. Реакцию кожи оценивали одноразово каждые сутки в течение недели проведения эксперимента и затем еще 7 суток после окончания аппликаций. Кожные реакции оценивали в баллах по показателям, указанным в таблице 2.7 [167, 381]. Все эксперименты на животных были одобрены этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.

Таблица 2.9 – Оценка интенсивности местно-раздражающего действия

Признаки местно-раздражающего действия	Оценка/баллы
А. Отек	
Отека нет	0
Слабый отек	1
Явный отек	2
Выраженный отек	3
В. Гипертермия и эритема	
Гипертермии нет	0
Очаговая эритема по всему участку и по его периферии	1
Сплошное бледно-розовое пятно или сливающаяся очаговая эритема (красные пятна на розовом фоне)	2
Красная эритема по всему участку	3
Инфильтрация кожи	4
Эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления.	5
С. Боль	
Боли нет	0
Слабая боль	2
Выраженная боль	5
Д. Утолщение кожной складки	
Нет утолщения	0
Слабое утолщение	2
Выраженное утолщение	4

2.2.5. Оценка цитотоксического действия действующих и вспомогательных веществ

Все работы по пробоподготовке и добавлению к клеткам растворов ЛВ и ВВ проводили в ламинарном боксе. Клетки линии Vero культивировались в культуральных флаконах в CO₂-инкубаторе с содержанием углекислого газа 5% в питательной среде MEM с двойным набором аминокислот, с L-глутамином, фирмы Биолот, с добавлением пирувата натрия (ПанЭко x100 раствор), 10% сыворотки (Sigma) и антибиотика гентамицина (Биолот). Клетки пересеивались дважды в неделю, для этого использовался раствор Трипсина-Версена (1:1, Биолот) и раствор Дальбекко 10х(DPBS) фирмы Биолот. Для оценки цитотоксического эффекта готовились 96-луночные планшеты, в лунки которых разливалось по 0,1 мл суспензии клеток с концентрацией клеток 1-1,5·10⁵ мл⁻¹. До проведения теста

приготовленную культуру клеток на планшетах инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение суток для формирования полноценного монослоя. Пробы, изучаемых на цитотоксичность образцов предварительно подвергали стерилизующей фильтрации. В 96-луночном планшете готовили серийные разведения исследуемых образцов в среде Игла, содержащей 10% сыворотки, с шагом 2 с использованием многоканального дозатора (рисунок 2.15).

С помощью дозатора добавляли согласно схеме в каждую лунку приготовленных как описано выше планшетов с клетками Vero по 11 мкл серийных разведений тестируемых образцов в двух повторах, т.е. каждое разведение тестируемого образца добавлялось в две лунки. В контрольные лунки добавлялось по 11 мкл среды Игла (с 10% сыворотки) вместо тестируемых образцов. Далее планшет с клетками центрифугировали при 500 об/мин, 1 минуту и оставили инкубироваться при температуре плюс 37°C, 5% CO₂, на 3 суток.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		1 10	1 10	1 10	1 10	1 10	1 10	1 10	1 10	конт-роль	конт-роль	
C		1 20	1 20	1 20	1 20	1 20	1 20	1 20	1 20	конт-роль	конт-роль	
D		1 40	1 40	1 40	1 40	1 40	1 40	1 40	1 40	конт-роль	конт-роль	
E		1 80	1 80	1 80	1 80	1 80	1 80	1 80	1 80	конт-роль	конт-роль	
F		1 160	1 160	1 160	1 160	1 160	1 160	1 160	1 160	конт-роль	конт-роль	
G		1 320	1 320	1 320	1 320	1 320	1 320	1 320	1 320	конт-роль	конт-роль	
H												

Рисунок 2.15 – Схема расположения образцов на 96-луночном планшете

Оценка цитотоксического эффекта проводится визуально под микроскопом (увеличение в 100 раз). Если клеточный монослой в экспериментальной лунке остается неповреждённым, без признаков дегенерации и не отличается от контроля, то данное ЛВ или ВВ считается нетоксичным.

2.2.6. Статистическая обработка результатов

В процессе проведения статистической обработки полученных данных был применен высокоэффективный пакет прикладных программ «SAS» (SAS Institute Inc., USA). В рамках нашей работы мы прибегли к использованию ряда ключевых параметров, которые позволили нам провести глубокий и всесторонний анализ. В частности, метод визуализации данных, который включал в себя построение различных графиков и гистограмм. Это дало нам возможность наглядно оценить характер распределения данных, что является важным этапом в понимании структуры исследуемых показателей. Далее расчет средних значений и элементарной статистике, что позволило определить основные параметры распределений показателей, Т-критерия Стьюдента, а также различных непараметрических критериев для выявления и анализа различия средних значений показателей в выборках. Благодаря использованию пакета программ «SAS» и вышеописанных методов статистического анализа, мы смогли провести качественную обработку результатов и получить достоверные данные, которые легли в основу исследований и выводов.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 2

1. Объектами исследования диссертационной работы являются штаммы бактериофагов, активные в отношении антибиотикорезистентных патогенов и рекомбинантные белки: эндолизин LysECD7-SMAP и интерферон альфа-2b. В качестве ВВ для разработки ГМЛФ использовались вещества, разрешенные для фармацевтического применения, отечественного и иностранного производства, удовлетворяющие требованиям ГФ РФ и ГФ ЕАЭС.

2. Исследование было выполнено с использованием современных методов, включая физико-химические, технологические, микробиологические, иммунологические, генетические, биофармацевтические, биотехнологические и прочие методы анализа. Разработанные ГМЛФ изучали в соответствии с нормативными требованиями ГФ РФ и ГФ ЕАЭС, а также решениями Совета Евразийской экономической комиссии. В ходе исследования применялись аналитические методы, валидарованные в соответствии Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. N 113 "Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств". Анализ статистических данных, полученных в ходе эксперимента, убедительно продемонстрировал их точность и воспроизводимость, подтвердив, надежность исследования.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИЧЕСКОЙ КОНЦЕПЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ ГИДРОФИЛЬНЫХ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ СУБСТАНЦИЯМИ С УЧЕТОМ ЦЕЛЕВОГО ПРОФИЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Используемая сейчас в мировой и отечественной практике концепция Quality-by-Design направлена на упреждающий подход к разработке ЛП, который начинается с заранее определенных целей и делает упор на понимание продукта и процесса, на контроль и управление рисками качества ЛП [418, 443].

Целями фармацевтической разработки ГМЛФ, в соответствии с концепцией Quality-by-Design, должны быть следующие:

- ✓ определение целевого профиля качества ЛП: выбор дозировки, пути введения и системы доставки ЛВ, упаковки; параметров качества, влияющих на фармакокинетические характеристики (скорость и условия растворения и/или высвобождения ЛВ) и обоснование критических параметров качества таких как, стерильность, стабильность, реологические параметры и др.;
- ✓ определение критических параметров процесса, контролируемые до и в процессе производства, которые существенно влияют на качество ЛП;
- ✓ выявление и контроль источников вариабельности сырья, продукта и производственного процесса;
- ✓ повышение производительности процесса производства ЛП. [189, 333, 359, 360, 361]

Дизайн исследования

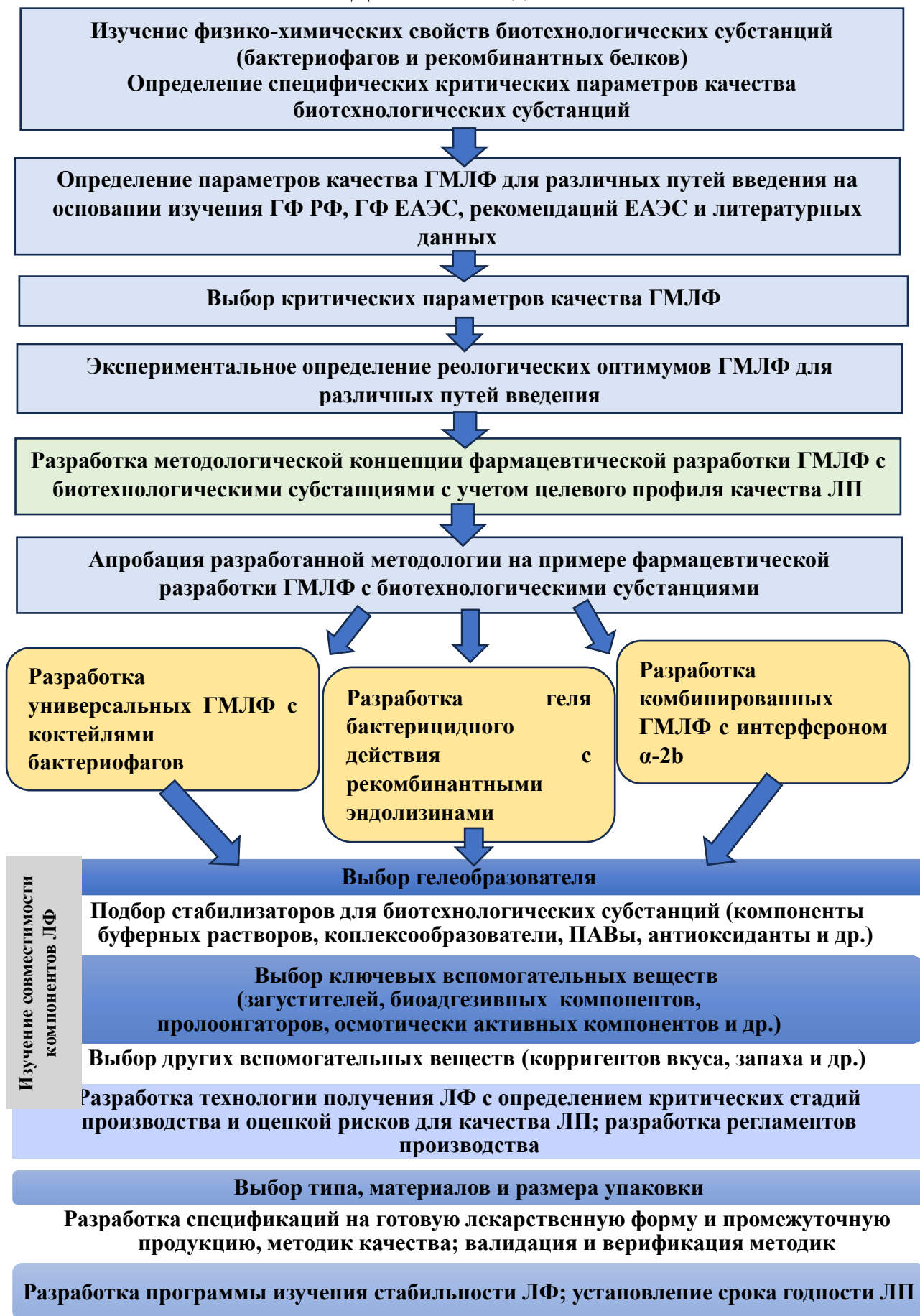


Рисунок 3.1 – Дизайн диссертационного исследования

3.1. Определение профиля качества гидрофильных мягких лекарственных форм для различных путей введения и выбор критических технологических параметров качества

В Главе 1 рассмотрены требования к МЛФ в зависимости от пути введения, однако необходимо оценить какие показатели качества являются определяющими при фармацевтической разработке ГМЛФ для различных путей введения. Рассмотрим самые распространенные для данной ЛФ пути введения: местный/дерматологический, местный/ для нанесения на раны и ожоги, офтальмологический, местный/для нанесения на слизистую оболочку ротовой полости, вагинальный, назальный и для приема внутрь. Все показатели качества оценивались по степени их влияния на качество ЛП и его комплаентность в баллах от 1 до 5 на основе литературных данных. Для всех ГМЛФ критичными показателями являются стабильность АФС в составе ЛФ и стабильность технологических параметров качества: рН, вязкость, описание, агрегативная стабильность.

Для дерматологических ГМЛФ помимо фармакопейных требований значимыми параметрами являются консистенция, адгезионные свойства и намазываемость, то есть как ЛФ распределяется по коже и удерживается на ней (рисунок 3.2). Важными для пациента параметрами будут отсутствие липкости и стянутости, увлажненность кожи после применения, органолептические свойства (цвет, запах); они будут определять приверженность пациента назначению врача и в случае безрецептурных препаратов возможность повторного приобретения данного препарата.

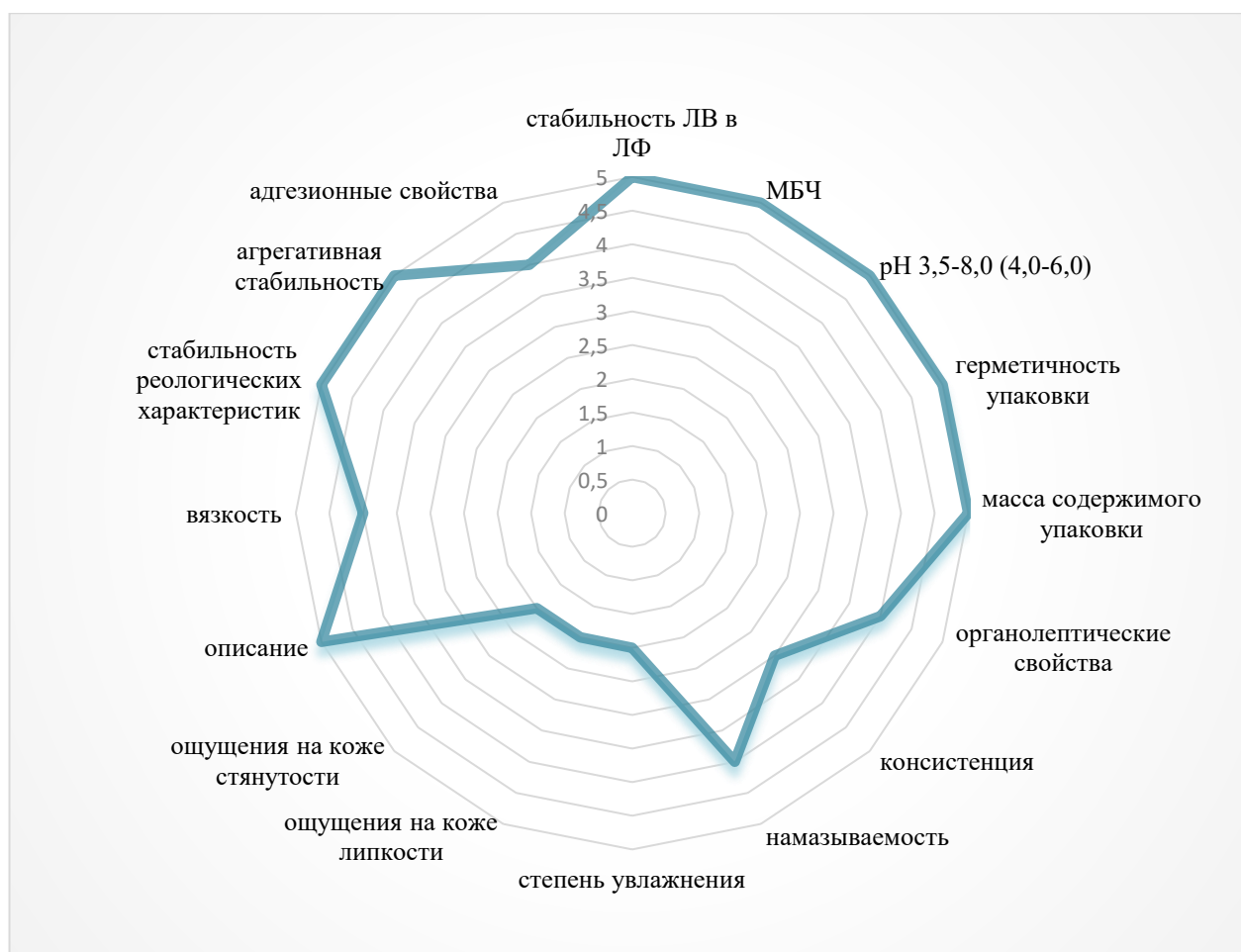


Рисунок 3.2 – Профиль качества ГМЛФ для местного/дерматологического применения

ГМЛФ для ран и ожогов должны отличаться равномерным распределением по раневой или ожоговой поверхности, обеспечением оттока гнойного экссудата и сорбции вирусных и бактериальных частицы благодаря высокой осмотической и адсорбционной активности. В случае использования препарата на хирургических ранах или ожогах большой площади или глубокого поражения ЛФ должна быть стерильна (рисунок 3.3).

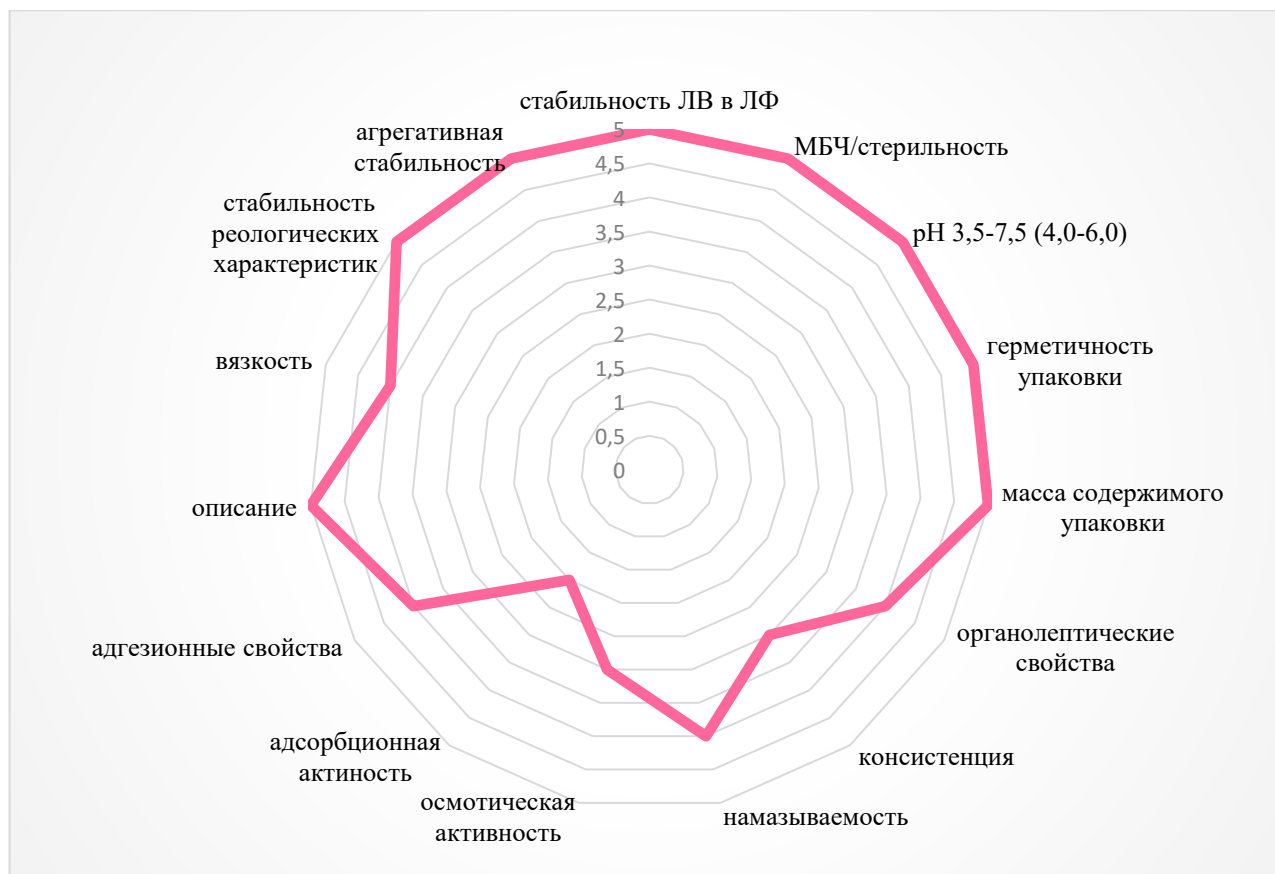


Рисунок 3.3 – Профиль качества ГМЛФ для местного применения/для нанесения на раны и ожоги

Для гелей офтальмологических помимо фармакопейных требований значимым параметром является степень биоадгезии (как и для всех ЛФ наносимых на слизистые оболочки), так при взаимодействии ЛФ со слизистой оболочкой глаза удастся добиться не только пролонгированного действия, но и более полного высвобождения ЛВ. Для пациента важно равномерное распределение геля по слизистой, отсутствие неприятных ощущений после нанесения (жжения, стянутости, чувства инородного тела), удобство применения (ЛФ не должна вытекать из глаза), отсутствие влияния на качество зрения (не должно быть «затуманивания», ощущения «пелены» перед глазами и др.) (рисунок 3.4) [326].

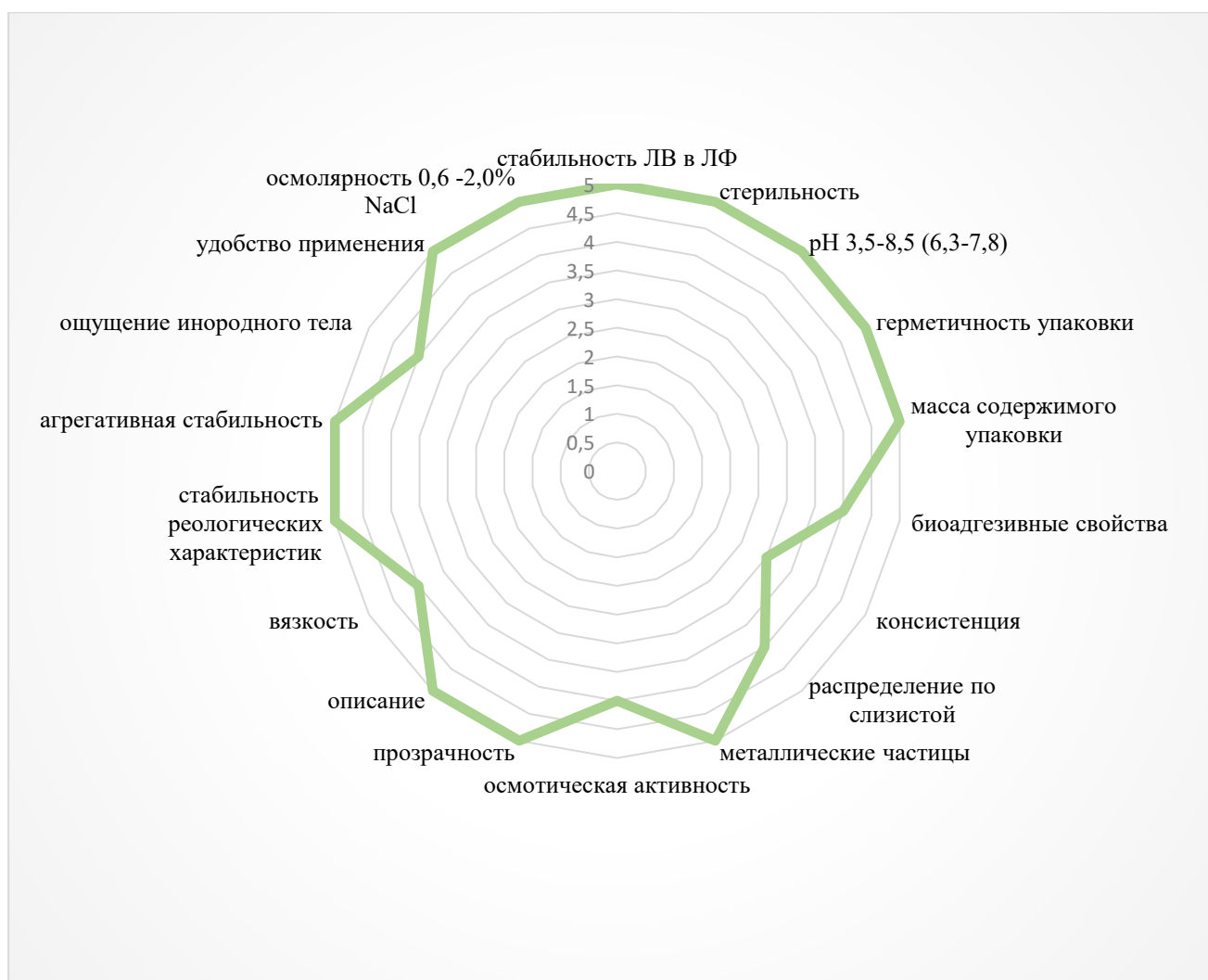


Рисунок 3.4 – Профиль качества ГМЛФ офтальмологического применения

Также как и для офтальмологических гелей для вагинальных гелей важным параметром являются биоадгезивные характеристики. С потребительской точки зрения не должно быть неприятных ощущений на слизистой оболочке, поэтому осмотические свойства ЛФ не должны быть высокими, а адсорбционная активность должна быть средней или низкой для отсутствия сорбции нормальной микрофлоры влагалища. Основная проблема вагинальных ЛФ, что их необходимо применять на ночь (пациентка в течение продолжительного времени должна находиться в горизонтальном положении) и они вытекают после применения, что крайне неудобно для пациенток. Гели, имеющие достаточную вязкость и способность закрепляться на слизистой имеют несомненные маркетинговые и терапевтические преимущества перед аналогами (рисунок 3.5).

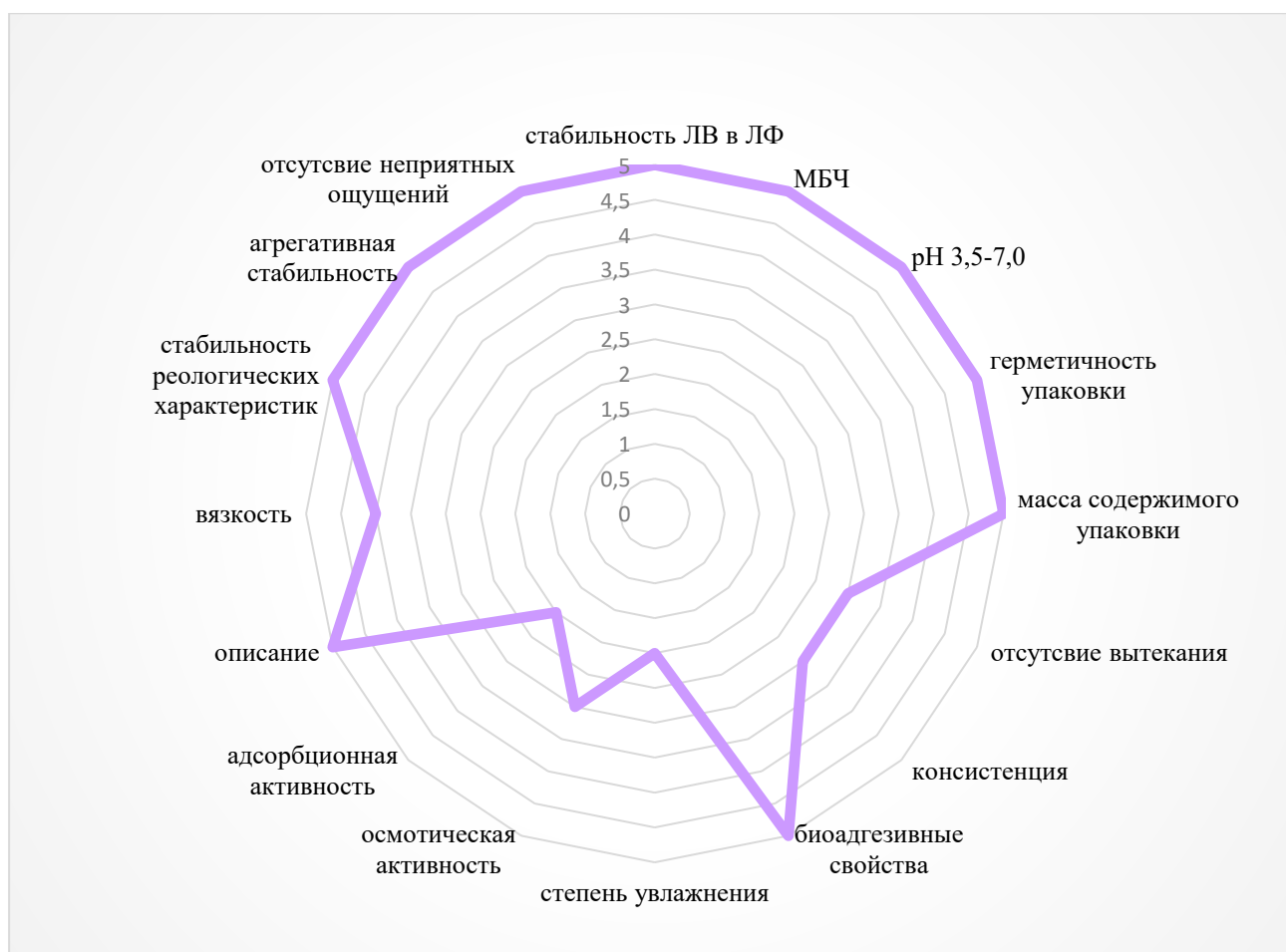


Рисунок 3.5 – Профиль качества ГМЛФ вагинального применения

ГМЛФ для назального применения также должны обладать высокими биоадгезивными свойствами и умеренной осмотической активностью, хорошо крепиться и распределяться по слизистой оболочке носа. Для этого способа применения особенно актуально создание *in situ* систем. Для пациентов важны приятные органолептические свойства, внешний вид, запах и консистенция ЛФ (рисунок 3.6).

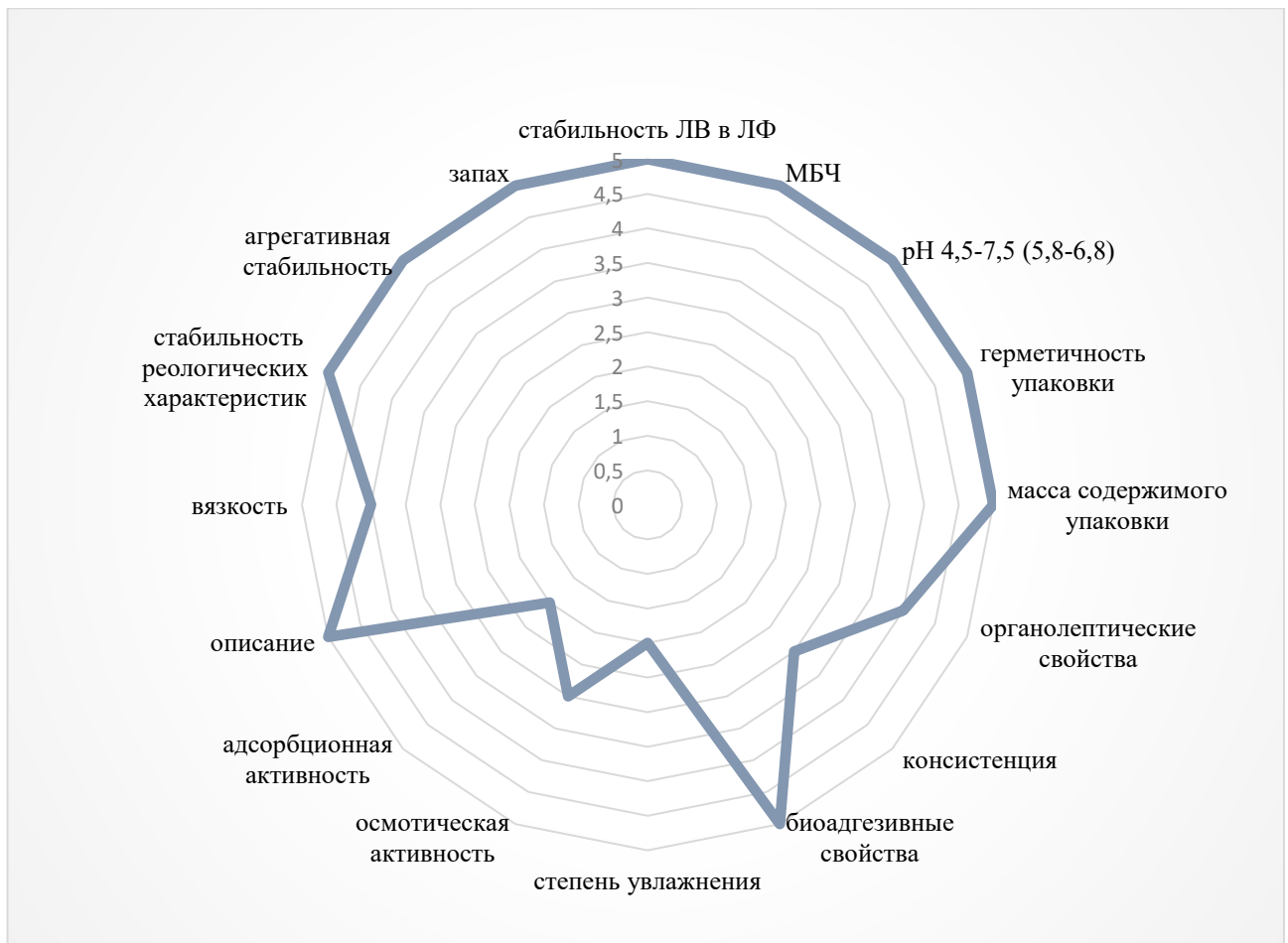


Рисунок 3.6 – Профиль качества ГМЛФ назального применения

ГМЛФ, предназначенные для нанесения на слизистую оболочку ротовой полости, должны аналогично обладать высокими биоадгезивными свойствами, умеренной осмотической активностью. Адсорбционная активность может быть высокой для терапии инфекционных заболеваний ротовой полости. ЛФ должна крепиться в месте нанесения и удерживаться некоторое время для оказания терапевтического эффекта. Определяющими факторами с точки зрения пациентов будет вкус, запах и консистенция препарата (рисунок 3.7). При выборе корригентов вкуса и запаха необходимо ориентироваться на возрастную группу пациентов. В целом эффективно использование интенсивных подсластителей и корригентов вкуса и запаха с легким охлаждающим эффектом, например масла мяты перечной.

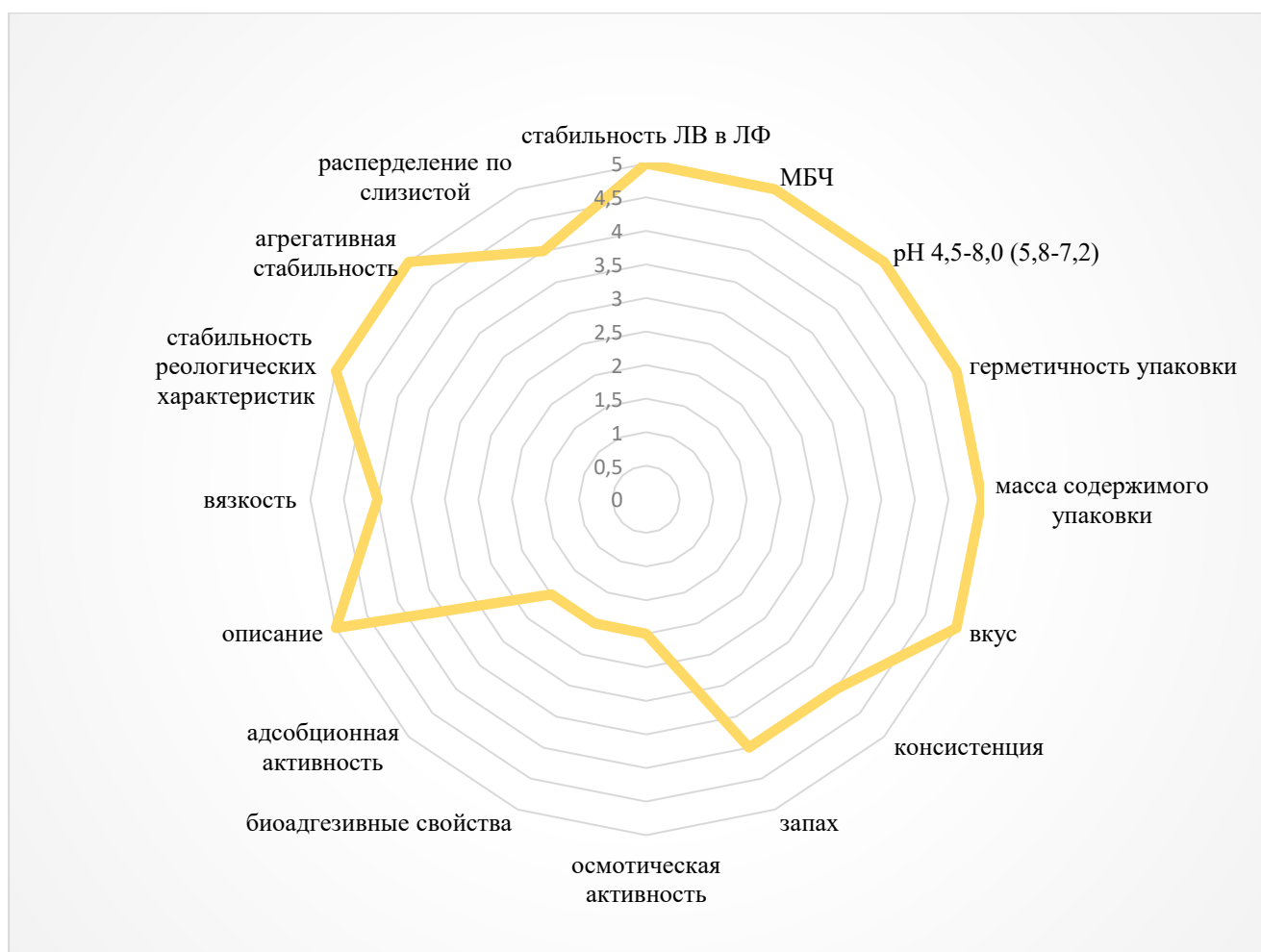


Рисунок 3.7 – Профиль качества ГМЛФ местного действия/для нанесения на слизистую оболочку ротовой полости

Для пероральных лекарственных форм, которые оказывают системный эффект, определяющим является полнота и скорость высвобождения ЛВ из ЛФ, хотя этот показатель качества не является обязательным для ГМЛФ [292]. На первый план для этого пути введения выходят органолептические показатели, так как ЛФ в основном предназначена для детей и взрослых старшей возрастной группы или пациентов с дисфагиями. Вкус и запах должны быть приятными, также важна консистенция геля. Если консистенция напоминает клей или слишком «тягучая» это может вызвать рвотный рефлекс у ряда пациентов. В качестве корригентов вкуса рекомендуется использовать те, что не влияют на выработку инсулина, безопасны для зубов и разрешены для приема у детей до 3 лет (рисунок 3.8).

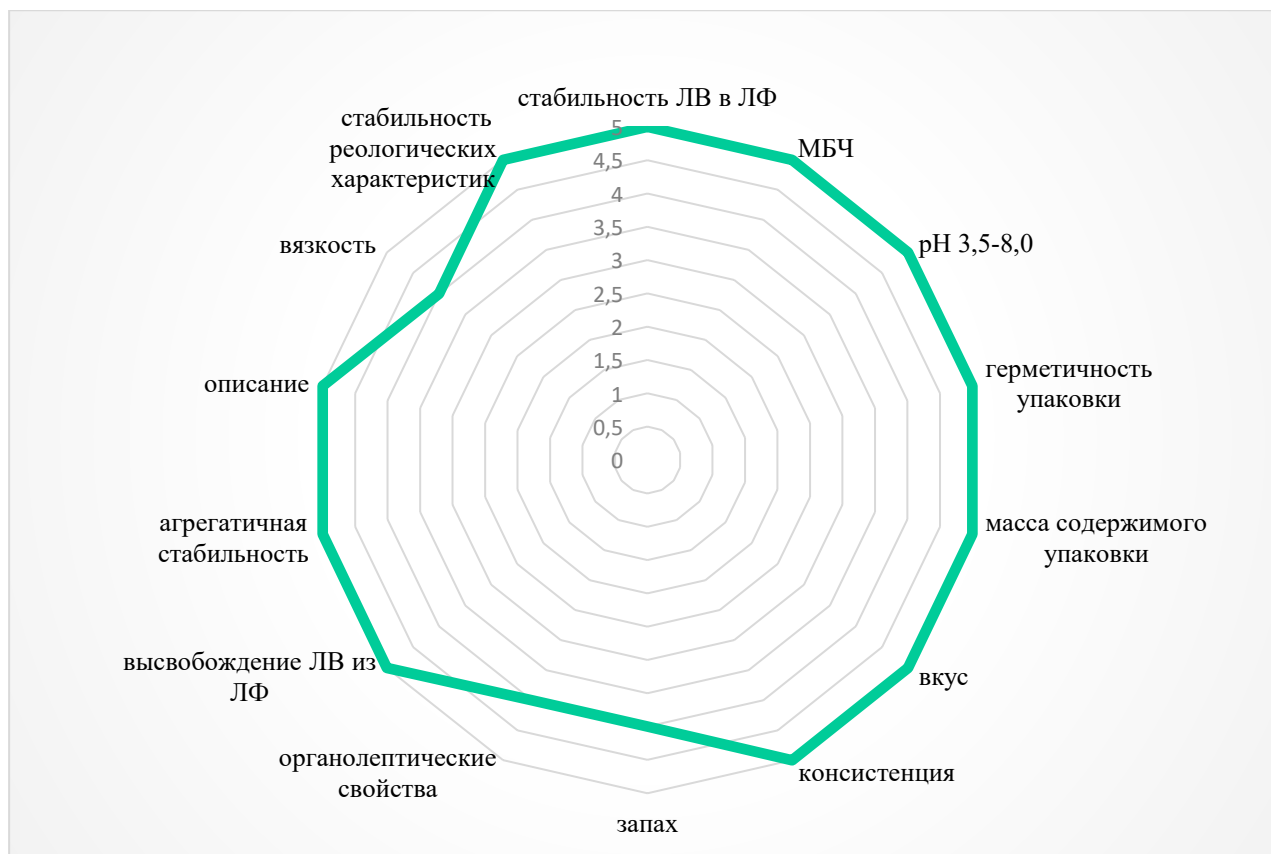


Рисунок 3.8 – Профиль качества ГМЛФ для приема внутрь

3.2. Определение специфических критических параметров качества биотехнологических субстанций

В соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза" спецификация на ЛП с биотехнологическими субстанциями должна включать следующие показатели качества: описание, подлинность, чистоту и примеси (если качественное и количественное содержание примесей совпадает с таковым у АФС включение их спецификацию не требуются), активность, количественное содержание (если производство ЛП основывается на биологической активности, определение количественного содержания не требуется), общие испытания (рН,

осмолярность, аномальная токсичность, бактериальные эндотоксины, стерильность, МБЧ и др.) и дополнительные испытания ЛФ (вязкость, растворение и др.).

Важнейшим критическим показателем качества ЛП с биотехнологическими субстанциями является стабильность или деградация ЛВ. Стабильность ЛП определяют по комплексу показателей качества, основным из которых является биологическая активность (синоним специфическая активность), от которой в свою очередь зависит терапевтическая эффективность ЛП. Так как содержание в препарате белка или нуклеиновой кислоты может быть одинаковыми, а биологическая активность препарата разная. На данный показатель влияет множество факторов внешней среды в процессе производства и хранения и ВВ входящие в состав ЛФ. Поэтому на первом этапе фармацевтической разработки ЛФ необходимо выбрать ВВ не с позиции вида ЛФ, места введения, потребительских характеристик, а по совместимости с ЛВ. Достаточно сложно оценить, как будут влиять на активность препарата ВВ в процессе хранения, так как часто биотехнологические АФС — это сложные не линейные молекулы, и приходится оценивать данное влияние только в условиях изучения стабильности и в долгосрочных испытаниях, так данные ЛВ термолабильны и ускоренные испытания дают приблизительные результаты.

Одной из самых важных групп ВВ в составе ЛП с биотехнологическими субстанциями являются стабилизаторы, к которым относятся буферные растворы и стабилизаторы pH, структуры молекулы ЛВ. Причем в подавляющем большинстве случаев подбор этих эксципиентов проводится эмпирически, из-за сложности структуры молекул ЛВ и прогнозирования их поведения.

Еще одним критическим показателем качества биотехнологических субстанций является стерильность или в ряде случаев МБЧ. Если лекарственные формы не предназначены для офтальмологического или парентерального введения, то допустима их стандартизация по показателю МБЧ. Однако бактериальная нагрузка способна влиять на активность молекул биотехнологических ЛВ и требуется чтобы ее значение было минимально. Обеспечение стерильности или

минимальной бактериальной нагрузки достаточно сложный процесс, требующий работы в асептических условиях в помещениях высоких классов чистоты или применения изолирующих технологий. Для снижения бактериальной нагрузки полупродукты, например, буферный раствор или гелевую основу подвергают стерилизации перед введением в их состав биотехнологической субстанции. Сами биотехнологические субстанции нельзя подвергать термической стерилизации, основной метод — это стерилизующая фильтрация, которая также имеет ограничения в связи с возможной сорбцией на мембране ЛВ.

3.3. Экспериментальное определение реологических оптимумов гидрофильных мягких лекарственных форм для различных путей введения

При фармацевтической разработке МЛФ большое внимание должно уделяться изучению их реологических свойств, так как структурно-механические параметры определяют стабильность высокодисперсных систем, к которым относятся гели. Комплексное изучение реологических характеристик представляет как теоретический, так и практический интерес, поскольку они могут быть эффективным и объективным критерием контроля качества на этапе создания, производства, хранения и применения ЛП. Реологические свойства влияют на высвобождение ЛВ, их терапевтическую эффективность, удобство дозирования и нанесения на кожу или слизистые, а также на производственные процессы, включая процессы перемешивания и дозирования в упаковку [246, 318].

Гели — это нерастворимые сшитые структуры, которые содержат большое количество воды и обладают эластичной структурой, характеризуются вязкоупругими свойствами. Ключевые реологические параметры, которые оценивают у ГМЛФ, включают динамическую и пластическую вязкость, напряжение сдвига, скорость сдвига, предел текучести, степень тиксотропии. Кривые течения и вязкости позволяют оценивать структуру, прочность и поведение гелей в процессе

производства, применения и хранения. За счет особенностей строения гелей, а именно наличия трехмерной сетчатой структуры, они широко используются как системы доставки в том числе для инъекционного и внутриместного введения и как материалы для тканевой инженерии [375].

Следующий этап исследования заключался в определении реологических оптимумов для ГМЛФ для различных путей введения, чтобы опираться на полученные данные при проведении в первую очередь собственных разработок ЛФ и также для получения обобщенных данных по реологии существующих ЛП в данной лекарственной форме [27, 44, 45, 46, 69].

3.3.1. Экспериментальное определение реологических оптимумов дерматологических гидрофильных мягких лекарственных форм

По данным Государственного реестра ЛС на 11.2024г. в РФ в виде гелей для наружного и местного применения зарегистрировано 230 наименований [17].

Основными используемыми гелеобразователями в составе дерматологических гелей являются карбомеры различных марок, их доля составляет примерно 80%, в комбинации с полоксамерами около 3-4%, на использование производных целлюлозы приходится около 13-15% и 1-2% составляют другие полимеры, такие как ПЭГ, камеди, агар-агар и др.

В таблице 3.1 приведены дерматологические гели, зарегистрированные в РФ как лекарственные препараты, выбранные для исследования. Выбор ЛП проводили, таким образом, чтобы охватить препараты с основными типами гелеобразователей. Всего в исследование включили 25 препаратов, из них 15 на основе карбополов различных марок (Азелик, Кеторол, Троксерутин Ветпром, Венолайф, Метрогил, Диклак, Вольтарен Эмульгель, Флуцинар Быструмгель, Найз, Гепатромбин, Дип Рилиф, Ревма-гель, Диклофенак-Акрихин), 2 на основе полиакриловой кислоты (Долобене, Скинорен), 2 на основе NaКМЦ (Димексид, Солкосерил), в Кармолисе

в качестве гелеобразователя использована комбинация двух марок карбомеров: карбопол 980 и пемулен, в Нимулиде комбинация карбопола и ГПЦ, в геле Доктор Тайсс Венен сепигель, представляющий собой полиакриламид, изопарафин С13-14 и лаурет-7, в Финалгеле ГПМЦ, в геле Нурофен Экспресс ГЭЦ, в Контрактубексе ксантановая камедь, в Долгите Полоксамер 407.

Из 15 гелей на основе карбополов в составы препаратов входят различные ВВ оказывающее влияние на реологические свойства, это эмульгаторы, пластификаторы, загустители и растворители. Исследование проводилось на основе изучения реологических свойств как препаратов отечественного, так и иностранного производства. На основании выше сказанного данную выборку можно считать репрезентативной

На начальном этапе исследования провели оценку пластической вязкости и предела текучести образцов, указанных в таблице 3.1, при температуре 20°C, что отражено в таблице 3.2.

Значения пластической вязкости колеблются в достаточно широких пределах от 0,112 до 0,910 Па·с. Предел текучести исследованных препаратов варьируется от 11,6 до 187,2 Па. Не наблюдается прямой связи между вязкостью и прочностью геля, определяемой по пределу текучести.

Таблица 3.1 – Дерматологические гели, зарегистрированные в России, основные представители

№	Торговое наименование	Фирма-производитель	Состав	Гелеобразователь
1	Азелик®	АО "АКРИХИН", (Россия)	Азелаиновая кислота , бензойная кислота, метилпирролидон, сквалан, пропиленгликоль, динатрия эдетат , натрия гидроксид, диметикон 100 cst , макрогола цетостеариловый эфир, карбомер интерполимер (тип А), вода очищенная	Карбомер
2	Кеторол®	Dr. Reddy's Laboratories (Индия)	Кеторолака трометамин , пропиленгликоль, диметилсульфоксид , карбомер 974Р , метилпарагидроксибензоат натрия, пропилпарагидроксибензоат натрия , трометамин, вода очищенная, ароматизатор "Дримон Инде" (триэтилцитрат, клещевины обыкновенной семян масло, изопропилмиристат, диэтилфталат) , этанол, глицерол	Карбомер 974Р
3	Кармолис®	Iromedica AG (Швейцария)	Кармолное масло, которое состоит из: левоментола, метилсалицилата, камфоры, сосны обыкновенной масла, эвкалипта листьев масла, терпентинового масла, розмаринового масла, лавандового масла, тимьяна обыкновенного травы масла, мяты индийской масла, шалфейного масла, ореха мускатного масла, анисового масла, гвоздичного масла, этанол, вода, глицерол, карбопол 980, трометамолг, ягуар hp 120 (гидроксипропиловая смола), пемулен (акрилат/с 10-30 алкил акрилат кроссполимер) 2,0 мг	Карбопол 980 Пемулен
4	Троксерутин Ветпром®	VETPROM, AD (Болгария)	Троксерутин, карбомер, троламин, динатрия эдетат, бензалкония хлорид, вода	Карбомер
5	Венолайф®	АО "АКРИХИН" (Россия)	Троксерутин, гепарин натрия, декспантенол, фенилэтанол, пропиленгликоль, карбомер 940 или 980, трометамол, вода очищенная	Карбомер 940 (980)
6	Метрогил®	UNIQUE PHARMACEUTICAL LABORATORIES (Индия)	Метронидазол, динатрия эдетат, карбомер-940, метилпарагидроксибензоат, натрия гидроксид, пропилпарагидроксибензоат, пропиленгликоль, вода очищенная	Карбомер 940
7	Диклак®	Sandoz (Словения)	Диклофенак натрия, d-альфа-токоферол, карбомер, децилолеат, октилдодеканол, лецитин, аммиак водный 10 %, динатрия эдетат дигидрат, ароматическое масло "Vert de Creme", изопропанол, вода	Карбомер

Продолжение Таблицы 3.1

№	Торговое наименование	Фирма-производитель	Состав	Гелеобразователь
8	Вольтарен Эмульгель®	АО "ГлаксоСмитКляйн Хелскер" (Россия)	Диклофенака диэтиламина, карбопол 974 Р, макрогола цетостеарат, кокоил каприлокапрат, диэтиламин, изопропанол, жидкий парафин, ароматический крем 45 (содержит бензилбензоат), пропиленгликоль, вода	Карбомеры 974
9	Флуцинар®	Ельфа фармзавод А.О. (Польша)	Флуоцинолона ацетонид, пропиленгликоль, этанол, динатрия эдетат, лимонная кислота, метилпарагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, карбомер 980, троламин, вазелин, вода	Карбомер
10	Скинорен®	АО "Байер" (Россия)	Азелаиновая кислота, пропиленгликоль, полисорбат 80, лецитин, полиакриловая кислота 0,01 г, триглицериды, натрия гидроксид, динатрия эдетат, бензойная кислота, вода очищенная	Полиакриловая кислота
11	Нимулид®	Panacea Biotec (Индия)	Нимесулид, гипролоза, карбомер, этанол 95%, вода очищенная, триацетин, диметилацетамид, фосфорная кислота, ароматизатор MSC- 03, ароматизатор - 0106- G	Карбомер ГПЦ
12	Быструмгель®	ОАО "АКРИХИН" (Россия)	Кетопрофен, этанол, карбомер 940 или 980, трометамол, метилпарагидроксибензоат, лаванды масло, апельсина цветков масло (неролиевое масло), вода	Карбомер 940
13	Долобене®	Merkle GmbH (Германия)	Гепарин натрия, декспантенол, диметилсульфоксид 90 %, полиакриловая кислота, трометамол, макрогола глицерилгидроксистеарат, изопропанол, розмарина масло, сосны горной масло, цитронеллы масло, вода	Полиакриловая кислота
14	Найз®	Dr. Reddy's Laboratories (Индия)	Нимесулид, N-метил-2-пирролидон, пропиленгликоль, макрогол, изопропанол, вода очищенная, карбомер-940, бутилгидроксианизол, тиомерсал, калия дигидрофосфат, ароматизатор (Нарцисс-938)	Карбомер 940
15	Гепатромбин®	HEMOFARM A.D (Сербия)	Гепарин натрия, аллантоин, декспантенол, левоментол, динатрия эдетат, троламин, сосны горной хвои масло, сосны обыкновенной хвои масло, лимона масло, сорбитол, изопропанол, софтиген 767, полисорбат, вода	Карбомер
16	Дип Рилиф®	MENTHOLATUM COMPANY LIMITED (Великобритания)	Ибупрофен, левоментол (ментол), вода очищенная, этанол денатурированный 96%, пропиленгликоль, диизопропаноламин, карбомер	Карбомер

Продолжение Таблицы 3.1

№	Торговое наименование	Фирма-производитель	Состав	Гелеобразователь
17	Ревма-гель [®]	Deutsche Homöopathie-Union DHU-Arzneimittel (Германия)	Toxicodendron quercifolium / Rhus toxicodendron extern (токсикодендрон кверцифолиум / рус токсикодендрон экстерн) , Ledum palustre / Ledum extern (ледум палюстре / ледум экстерн), Symphytum ad usum externum (симфитум ад узум экстернум) , раствор гидроксида натрия , карбомер (карбопол 980 NF) , вода	Карбомер 980
18	Диклофенак-Акрихин [®]	АО "АКРИХИН" (Россия)	Диклофенак натрия, этанол пропиленгликоль , карбомер 940 (карбопол 980), диэтаноламин , парафин жидкий, кокоилкаприлкапрат , макрогола цетостеарат , лаванды масло г, апельсина цветков масло, вода	Карбомер 940 (980)
19	Доктор Тайсс Венен гель [®]	Dr. Theiss Naturwaren GmbH (Германия)	Конского каштана семян экстракт жидкий , календулы цветков экстракт густой, этанол 96% , сепигель (Полиакриламид+C13-14 Изапарафин+Лаурет-7), глюкоамат SSE , парфюмерное масло, вода	Сепигель
20	Димексид [®]	ООО "Биофармакс" (Россия)	Димексид, нипагин, нипазол, натрий карбоксиметилцеллюлоза, вода	NaКМЦ
21	Солкосерил [®]	MEDA PHARMACEUTICALS SWITZERLAND (Швейцария)	Солкосерил (депротеинизированный диализат из крови молочных телят, метилпарагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, кармеллоза натрия, пропиленгликоль, кальция лактатпентагидрат, вода для инъекций	NaКМЦ
22	Финалгель [®]	Boehringer Ingelheim (Германия)	Пироксикама, пропиленгликоль; изопропанол; макрогола глицерилкокоат; гипромеллоза; натрия гидроксид; натрия метабисульфит; калия дигидрофосфат; вода	ГМПЦ
23	Нурофен [®] Экспресс	Reckitt Benckiser (Великобритания)	Ибупрофен, гиэтиллоза, натрия гидроксид , спирт бензиновый , изопропанол , вода	ГЭЦ
24	Контрактубекс [®]	Merz Pharma GmbH & Co. KGaA (Германия)	Экстракт луковиц лука репчатого жидкого, гепарин натрия, аллантоин , кислота сорбиновая, метилпарагидроксибензоат, камедь ксантановая, макрогол 200, масло ароматизированное, вода	Ксантановая камедь
25	Долгит [®]	DOLORGIET, GmbH & Co. KG. (Германия)	Ибупрофена , изопропанол, диметилгидроксиметилдиоксолан , полоксамер 407, триглицериды среднецепочные , вода очищенная, лаванды масло, апельсина цветков масло (нероловое масло)	Полоксамер 407

Например, гель Димексид с максимальной вязкостью 0,910 Па·с обладает минимальным пределом текучести в 11,6 Па. В то время как гель с самым высоким пределом текучести 187,2 Па имеет среднюю вязкость 0,480 Па·с. Это говорит о том, что на реологические характеристики гелей оказывают значимое влияние не только вид и концентрация гелеобразователя, но и природа и свойства ЛВ и ВВ.

Таблица 3.2 – Значения пластической вязкости и предела текучести образцов дерматологических гелей при 20° С

Торговое наименование	Пластическая вязкость, Па·с	Предел текучести, Па
Димексид	0,910	11,6
Диклак	0,764	117,7
Финалгель	0,687	37,0
Найз	0,650	109,8
Кеторол	0,558	69,9
Солкосерил	0,494	22,8
Азелик	0,486	52,3
Долгит	0,480	187,2
Скинорен	0,469	119,0
Вольтарен Эмульгель	0,448	60,5
Доктор Тайсс Венен	0,357	75,5
Кармолис	0,351	70,7
Ревма-гель	0,322	114,3
Дип Рилиф	0,321	46,4
Венолайф	0,286	55,2
Гепатромбин	0,234	72,2
Диклофенак-Акрихин	0,221	30,3
Нурофен Экспресс	0,218	61,4
Метрогил	0,213	117,0
Долобене	0,212	38,0
Флуцинар	0,185	52,4
Быструмгель	0,185	45,2
Нимулид	0,140	41,8
Троксерутин Ветпром	0,172	70,5
Контрактубекс	0,112	13,0

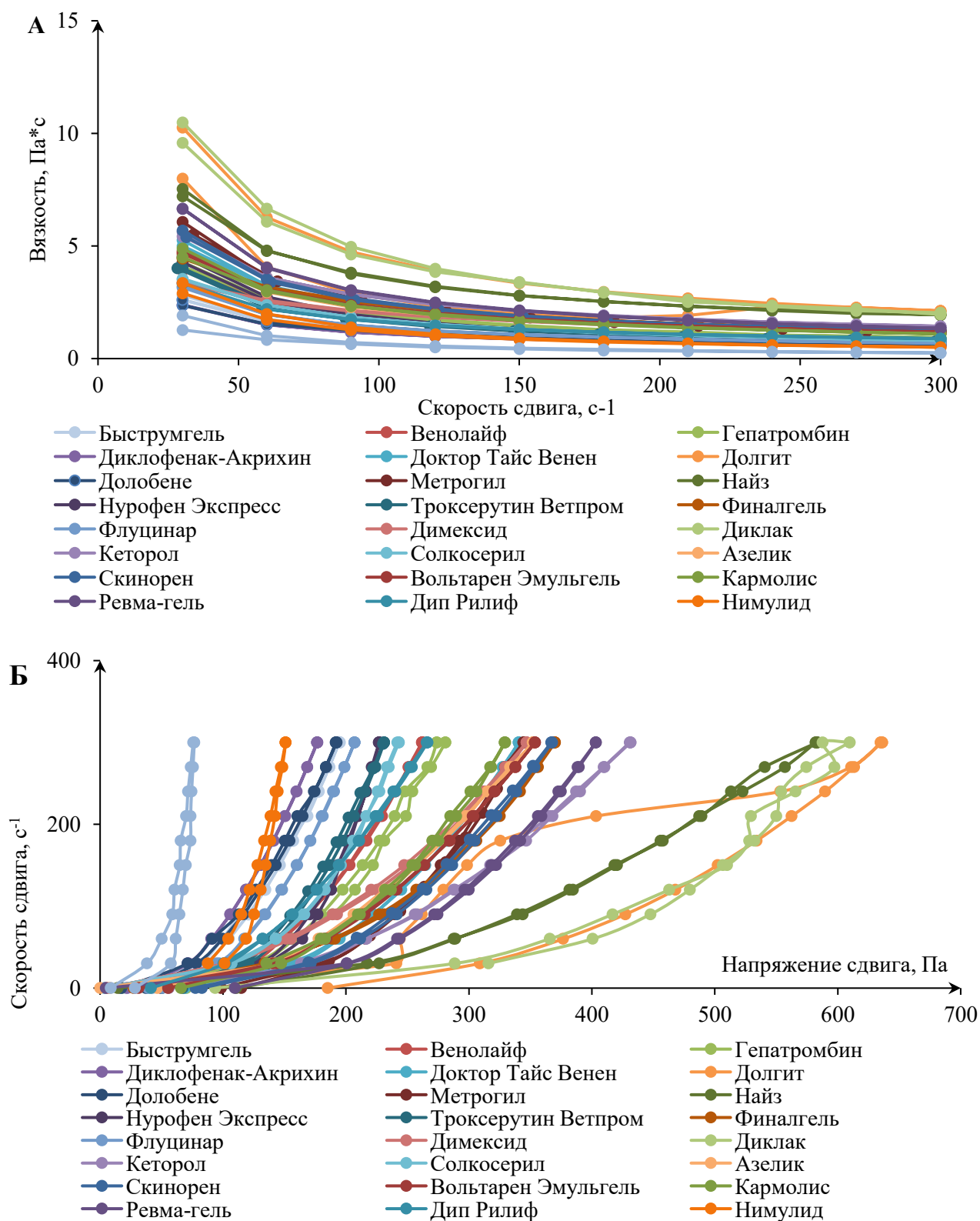


Рисунок 3.9 – А – Кривые вязкости дерматологических гелей, измеренных при температуре 20°C; Б – Кривые течения дерматологических гелей, измеренных при температуре 20°C

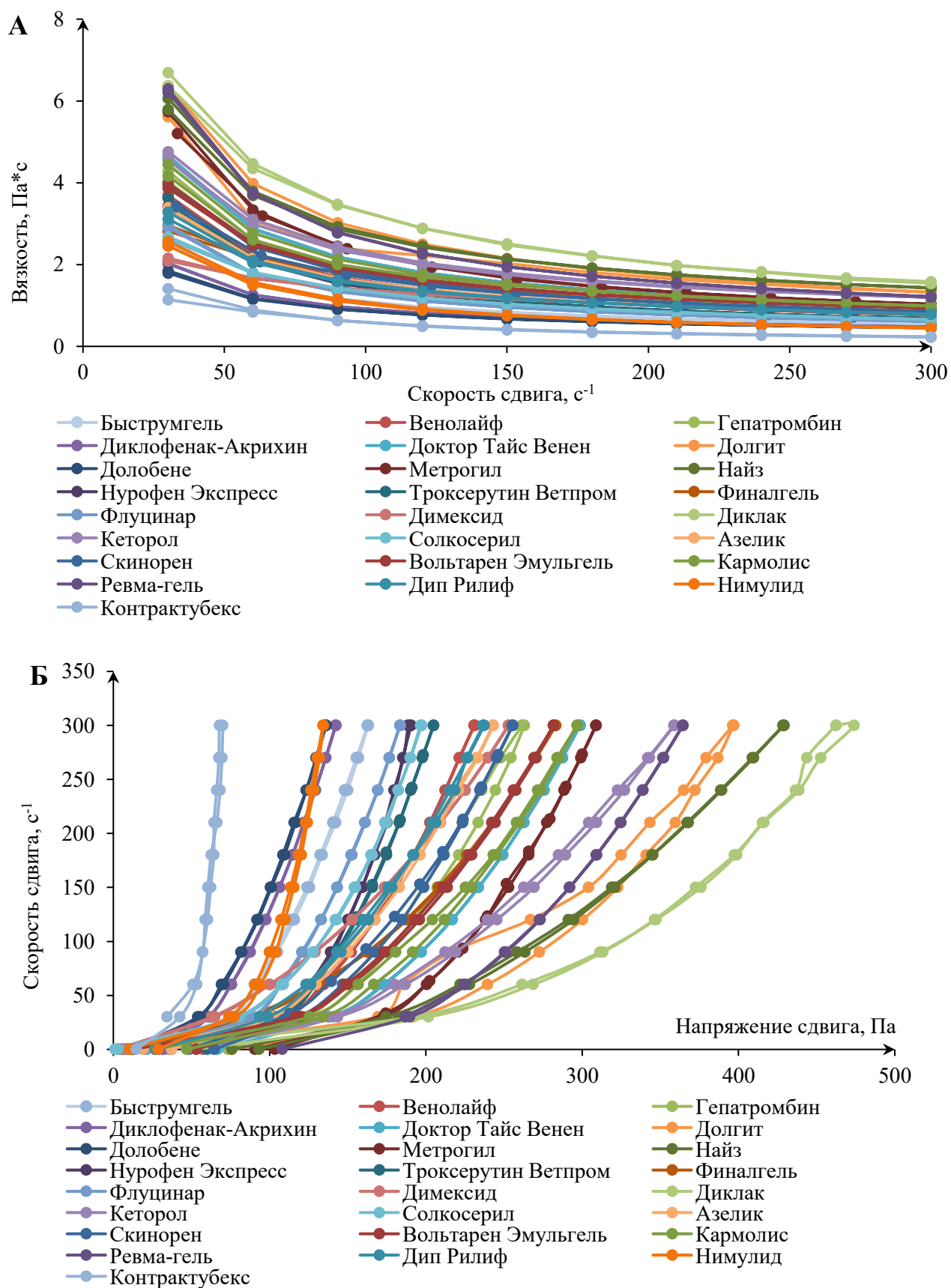


Рисунок 3.10 – А – Кривые вязкости дерматологических гелей, измеренных при температуре 32°C; Б – Кривые течения дерматологических гелей, измеренных при температуре 32°C

Для всех гелей строили кривые течения и вязкости при двух температурах 20°C, соответствующей условиям производства и хранения, и при 32°C, соответствующей усредненной температуре кожного покрова (рисунки 3.9, 3.10). Из графиков видно, что данные ЛП имеют неньютоновской тип течения, являются псевдопластическими системами. Напряжение сдвига характеризует ответ системы на вращение рабочего шпинделя вискозиметра, что в режиме измерения «малый сдвиг – большой сдвиг – малый сдвиг» позволяет судить о структуре геля. У большей части образцов кривые течения от 0 до 300 и от 300 до 0 с⁻¹ близки, что говорит о стабильности структуры гелей.

Можно отметить, что для всех образцов характерно уменьшение вязкости при увеличении температуры с 20 до 32°C, кроме геля Долгит, в котором гелеобразователем является полксамер 407, для которого характерно термореверсивное гелеобразование. Также, при увеличении температуры наблюдается увеличение степени тиксотропии гелей, что видно почти по полному совпадению нисходящей и восходящей петель кривых течения всех образцов, за исключением геля Долгит при 20°C и геля Диклат. Как упоминалось, прочность гелей полксамеров выше при 32°C, чем при 20°C из-за их структуры, что повышает степень тиксотропии при более высокой температуре. Диклак гель, будучи эмульсионной системой с высоким содержанием масла, ведет себя как крем с реологической точки зрения, несмотря на то, что его основа - карбомер.

На рисунке 3.11 представлены полученные оптимумы вязкости. Рассчитанные диапазоны достаточно широкие, что способствует гибкости в выборе гелеобразователей и загустителей. Данные оптимумы могут служить руководством при выборе и оптимизации реологических параметров гелей и, соответственно, могут быть использованы при разработке составов дерматологических гелей, а также для оптимизации существующих. При температуре 20°C оптимальные значения динамической вязкости лежат в диапазоне 0,9 - 10,8 Па·с при 30 с⁻¹ и 0,15 - 2,9 Па·с при 300с⁻¹, при температуре 32°C – 1,4 - 6,85 Па·с при 30 с⁻¹ и 0,18 - 1,83 Па·с при 300с⁻¹.

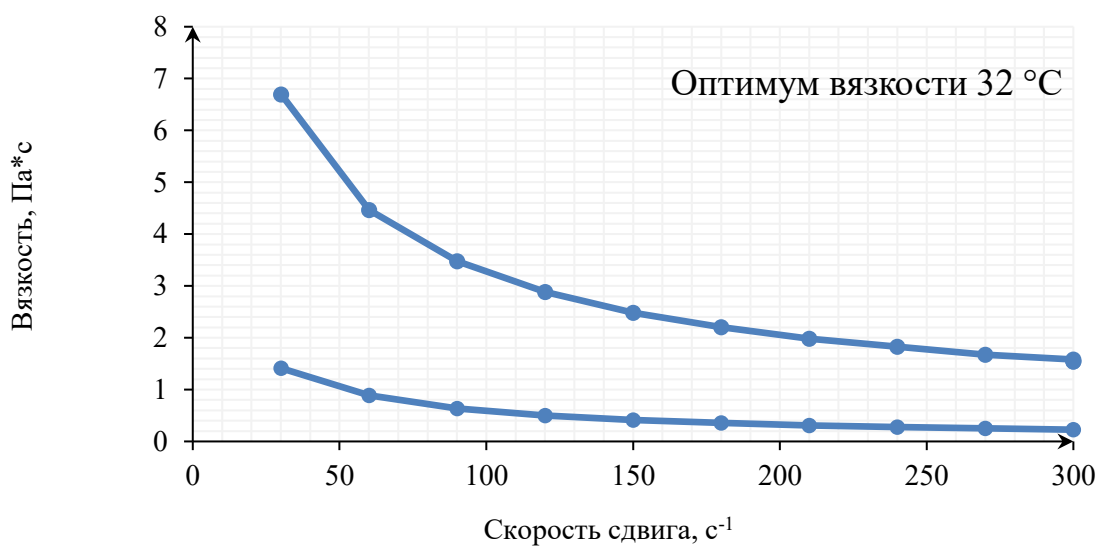
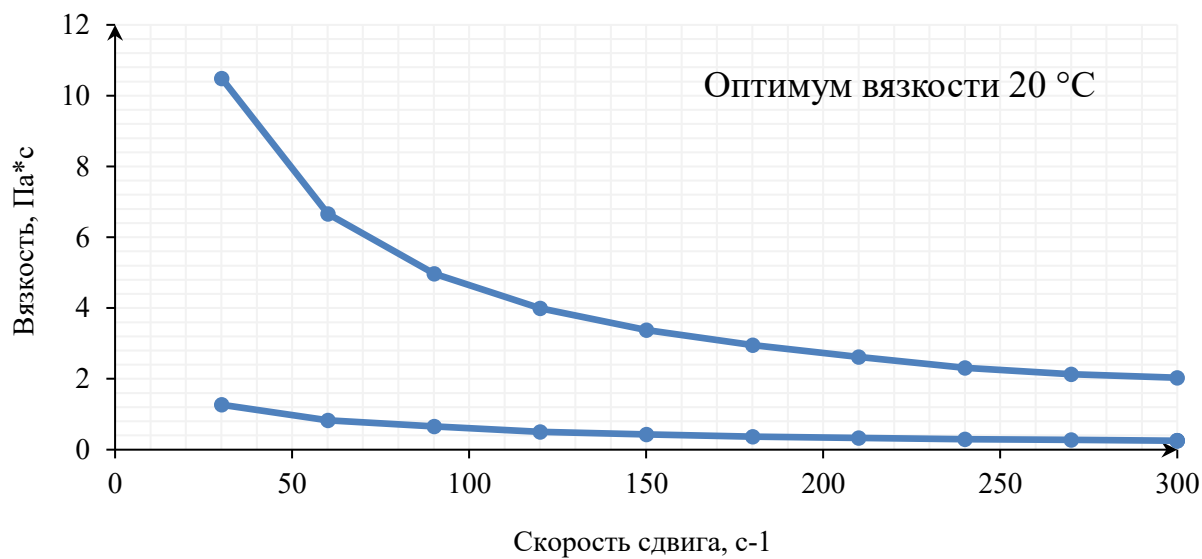


Рисунок 3.11 – Оптимумы вязкости дерматологических гелей при температурах: 20°C; 32°C

3.3.2. Экспериментальное определение реологических оптимумов офтальмологических гидрофильных мягких лекарственных форм

При разработке ЛФ для нанесения на слизистые оболочки глаза стремятся создать препарат близкий по свойствам к слезной жидкости. Человеческие слёзы

обладают неньютоновским вязкоупругим поведением с уменьшением вязкости при приложении силы, что продлевает время контакта при открытых веках и защищает поверхность глаза за счёт снижения вязкости во время моргания. При проведении реологических измерений важно выбрать правильные временные масштабы и скорости сдвига. Предполагается, что веко перемещается на максимальное расстояние от 1 до 2 см (вниз и вверх), и зная диапазон продолжительности моргания, расчетная максимальная скорость сдвига, связанная с циклом моргания, составляет примерно от 1000 с^{-1} до $20\,000 \text{ с}^{-1}$ [120, 275, 438]. В работе использовали режимы реологических измерений, соответствующие процессу производства при скорости сдвига от 0 до 300 с^{-1} при температуре 20°C , и процессу применения пациентом ЛФ, то есть морганию - от 0 до 1000 с^{-1} при температуре 37°C .

Ассортимент и составы офтальмологических гелей, зарегистрированных на российском фармацевтическом рынке представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Лекарственные препараты и изделия медицинского назначения в форме офтальмологических гелей, зарегистрированных в РФ

Торговое наименование	Фирма-производитель	Состав	Гелеобразователь
Лекарственные препараты			
Корнерегель®	ВАЛЕАНТ ООО (Россия)	Декспантенол, карбомер, цетримид, динатрия эдетат, натрия гидроксид, вода для инъекций	Карбомер
Солкосерил®	Valeant Pharmaceuticals Germany GmbH (Германия)	Натрий-карбоксиметилцеллюлоза, кальция лактат, пропиленгликоль, метилпарагидрокси-бензоат, пропилпарагидрокси-бензоат, вода для инъекций	Натрий-карбоксиметилцеллюлоза
Видисик®	ВАЛЕАНТ ООО (Россия)	Карбомер, цетримид, сорбитол, натрия гидроксид, вода для инъекций	Карбомер
Офтагель®	URSAPHARM Arzneimittel GmbH (Германия)	Карбомер 974Р, бензалкония хлорид, сорбитол, лизина моногидрат, натрия ацетат, поливиниловый спирт, вода для инъекций	Карбомер 974Р

Продолжение таблицы 3.3

Торговое наименование	Фирма-производитель	Состав	Гелеобразователь
Лекарственные препараты			
Офтан-Тимогель®	EXCELVISION AG(Швейцария)	Тимолол, бензалкония хлорид, карбомер, лизин моногидрат, поливиниловый спирт, натрия ацетат тригидрат, сорбитол, вода для инъекций	Карбомер
Декспантель®	Татхимфармпрепараты (Россия)	Декспантенол, карбомер, цетримид, динатрия эдетат, натрия гидроксид, вода очищенная	Карбомер (концентрация не указана)
Изделия медицинского назначения			
Систейн-гель®	Alcon Cusi (Испания)	ПЭГ 400, пропиленгликоль, гидроксипропилгуар, сорбитол, аминометилпропанол, борная кислота, калия хлорид, натрия хлорид, динатрия эдетат, поликвад®, кислота хлористоводородная и/или натрия гидроксид для доведения pH, вода очищенная	Гидроксипропил-гуар
Блефарогель®	Гетель-медика ООО (Россия)	Карбомер, сок алоэ, метилпарабен, пропилпарабен, глицерин, пропиленгликоль, вода деионизированная	Карбомер, гиалуроновая кислота/концентрации не указаны
Визмед®	TRB Chemedica AG (Германия)	Гиалуронат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, дигидрофосфат натрия, хлорид кальция, хлорид магния, цитрат натрия, вода для инъекций	Гиалуронат натрия
Сферо Око®	Биомир Сервис АО (Россия)	экстракт коллагенсодержащий (животного происхождения), ПЭГ 400, натрия хлорид, калия хлорид, натрия гидрофосфата додекагидрат, калий дигидрофосфата дигидрат, вода очищенная	Экстракт коллагенсодержащий

Всего на рынке присутствует 10 препаратов в виде офтальмологических гелей, часть из них зарегистрирована как лекарственные препараты, а часть как изделия медицинского назначения. В основном в качестве гелеобразователя используется в данных препаратах карбопол (в 6 из 10 препаратов), в одном натрий-карбоксиметилцеллюлоза, в одном камедь, в двух натрия гиалуронат и в одном коллаген.

В работе проводили изучение реологических характеристик следующих гелей: корнерегель, солкосерил, видисик, офтагель, офтан-Тимогель, систейн-гель и блефарогель. Декспантель не изучали, так как он является аналогом корнерегеля, и его реологические показатели будут полностью с ним совпадать. Визмед и Сферо-око, изделия медицинского назначения, в которых действующее вещество, является гелеобразователем, и несмотря на то, что на упаковке указано, что они являются гелями, по сути это глазные капли, с соответствующими значениями вязкости, поэтому их из исследований по определению реологических оптимумов также исключили.

Результаты определения реологических характеристик ГМЛФ представлены в таблице 3.4. Изучаемые офтальмологические ГМЛФ можно условно разделить на две категории по значениям пластической вязкости и пределов текучести.

Таблица 3.4 – Значения пластической вязкости и пределов текучести изучаемых препаратов при 20°C

Препарат	Пластическая вязкость, Па·с	Предел текучести, Па
Офтагель®	0,075	7,65
Офтан-Тимогель®	0,118	5,92
Систейн-гель®	0,079	2,37
Блефарогель®	0,121	9,4
Корнерегель®	0,188	21,7
Солкосерил®	0,175	13,1
Видисик®	0,141	23,7

Первая категория – это препараты, имеющие низкие значения вязкости и предела текучести (Офтагель®, Офтан-Тимогель®, Систейн-гель® и Блефарогель®), пластическая вязкость этих гелей находится в диапазоне от 0,075 до 0,121 Па·с, пределы текучести – от 2,37 до 9,4 Па. Согласно ГФ РФ, оптимальные значения кинематической вязкости для глазных капель составляют от 5 до 15 мм²/с, и не должны превышать значения 150 мм²/с, что в пересчете на пластическую вязкость, приблизительно равно 0,005-0,015 Па·с и 0,15 Па·с соответственно. Исходя из этого

образцы гелей Офтагель[®], Офтан-Тимогель[®], Систейн-гель[®] и Блефарогель[®] по значению вязкости являются глазными каплями, а не гелями.

Ко второй категории изучаемых офтальмологических гелей относятся препараты Корнерегель[®], Солкосерил[®] и Видисик[®]. Значения их пластических вязкостей лежат в диапазоне от 0,141 до 0,188 Па·с, диапазон пределов текучести, составляет от 13,1 до 23,7 Па и на этом основании данные ЛФ представляют собой вязко-упругие тела в состоянии покоя, а при сдвиговом напряжении начинают течь, что характерно для гелей.

Для всех изучаемых препаратов строили кривые течения и вязкости (рисунки 3.12, 3.13), по характеру которых судят о типе течения вязко-пластичного тела, прочности структуры и степени тиксотропности. Гели Офтагель[®], Систейн-гель[®], Офтан-Тимогель[®], и Блефарогель[®] имеют неньютоновский характер течения, значения предела текучести находятся в диапазоне 5-10 Па. Гели Солкосерил[®], Корнерегель[®] и Видисик[®] также имеют неньютоновский характер течения, все изучаемые гели тиксотропны при различных температурах измерений, их вязкости возвращаются к исходным значениям при уменьшении скорости сдвига от 300 до 0 с⁻¹ и от 1000 до 0 с⁻¹ соответственно. По графикам видно, как с течением времени измерения вязкость образцов Офтагель[®], Систейн-гель[®], Офтан-Тимогель[®], и Блефарогель[®] снижается до 0,1-0,3 Па·с, а затем возвращается к значениям 0,5-0,7 Па·с для 25°C и 0,4 Па·с для 37°C. Небольшое увеличение вязкости по сравнению с начальными значениями можно отнести к погрешности измерения и возможного неравномерного распределения образца в измерительной системе.

Кривые вязкости и течения гелей Офтагель[®] и Офтан-Тимогель[®] близки, это можно объяснить тем фактом, что эти гели имеют сходный состав, где качестве гелеобразователя использовался карбомер. Небольшое различие имеется на кривой текучести 20°C, и его можно объяснить расхождением в соотношении входящих в состав препарата компонентов. Систейн-гель[®], гелеобразователем в котором является гидроксипропилгуар, демонстрирует более низкие значения вязкости.

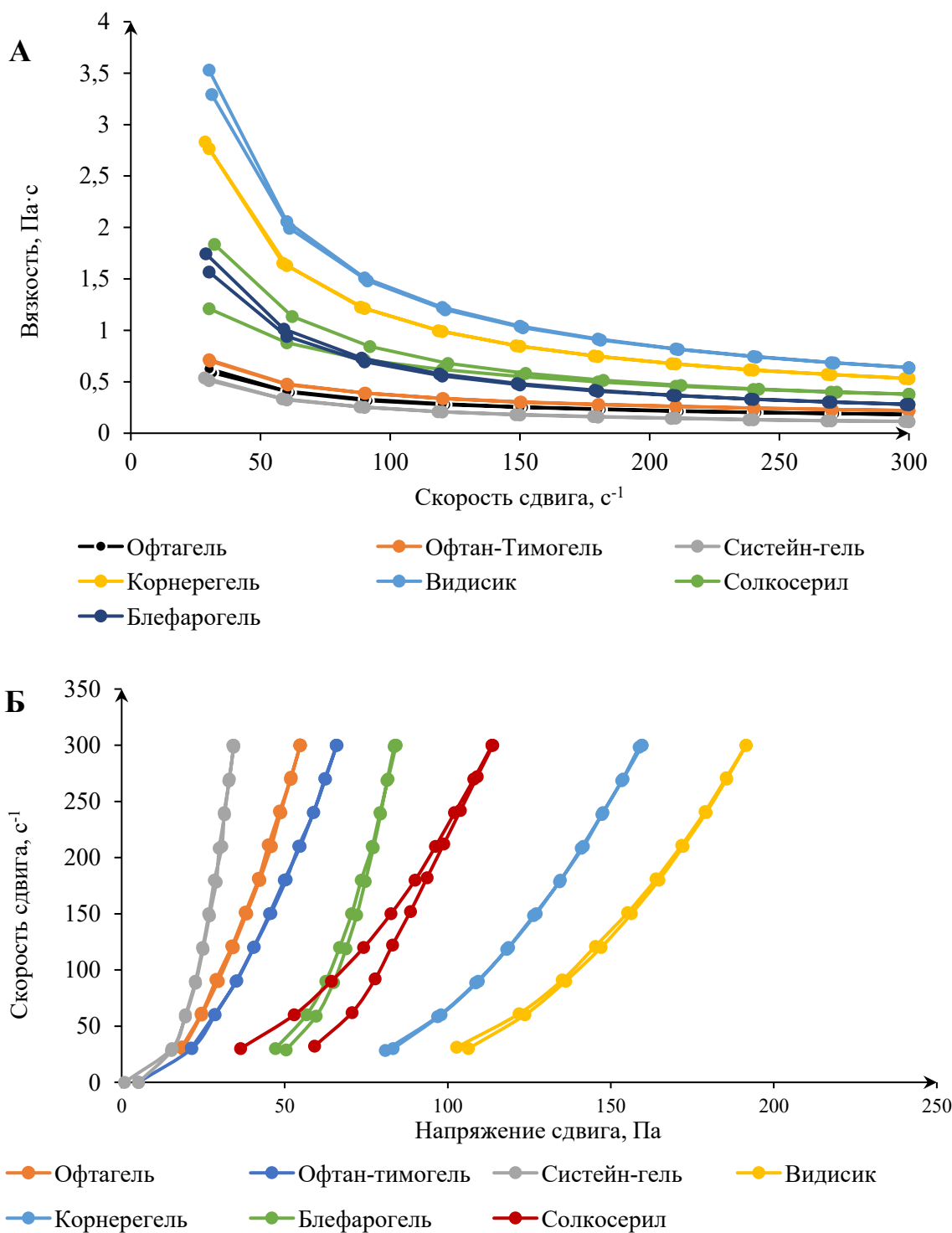


Рисунок 3.12 – А – Кривые вязкости офтальмологических гелей, измеренных при температуре 20°C; Б – Кривые течения офтальмологических гелей, измеренных при температуре 20°C

Кривые вязкости препаратов Корнерегель® и Видисик® при температуре 37°C лежат в одном диапазоне и значительно отличаются от реологических профилей других гелей. Аналогичный характер имеют и кривые течения этих образцов.

Таким образом, препараты Корнерегель® и Видисик® после закладывания за нижнее веко, в отличие от других глазных гелей, представленных на российском фармацевтическом рынке, обладают сравнительно высокими значениями вязкости, что позволяет им длительно обеспечивать терапевтический эффект.

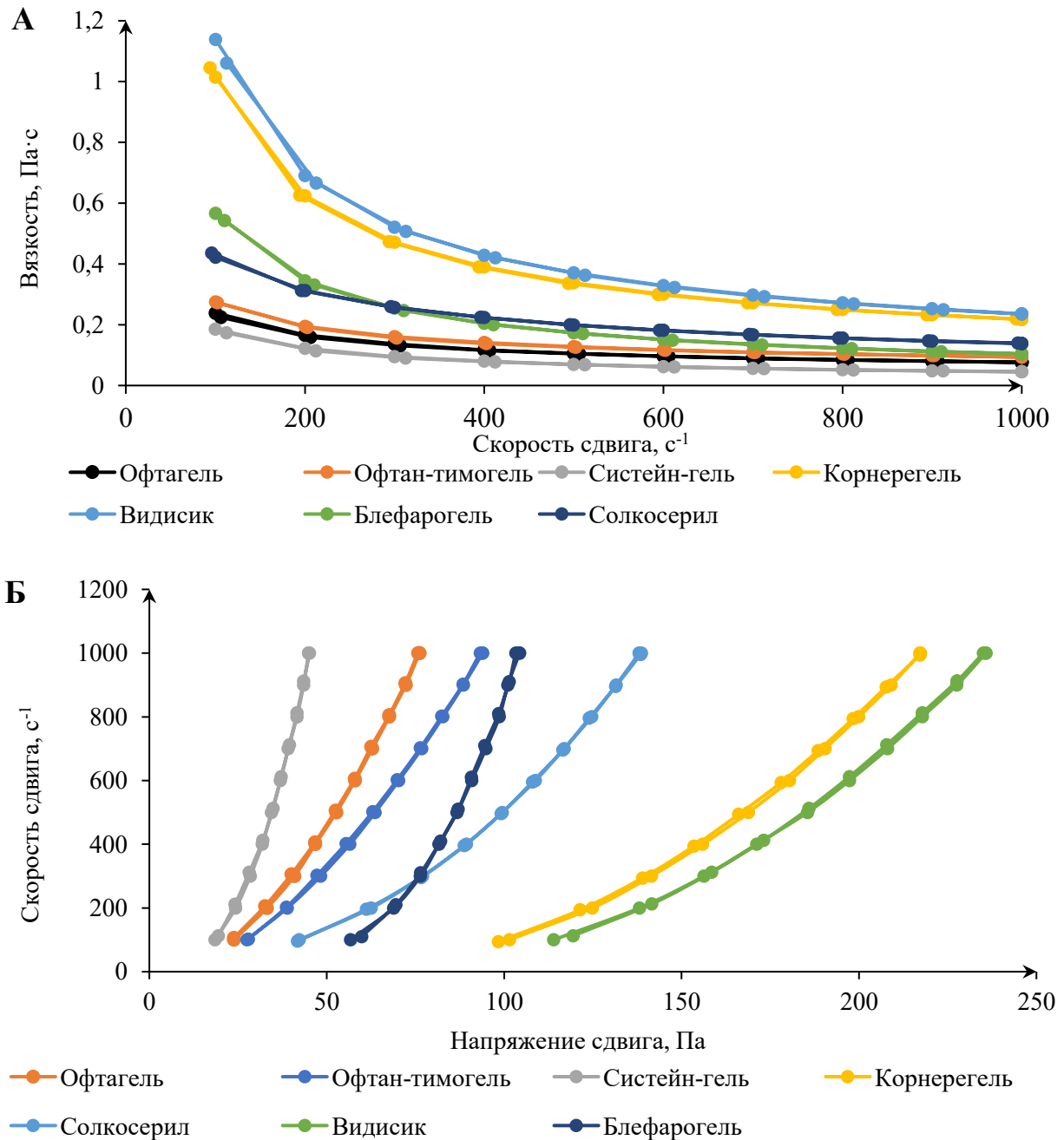


Рисунок 3.13 – А – Кривые вязкости офтальмологических гелей, измеренных при температуре 37°C; Б – Кривые течения офтальмологических гелей, измеренных при температуре 37°C

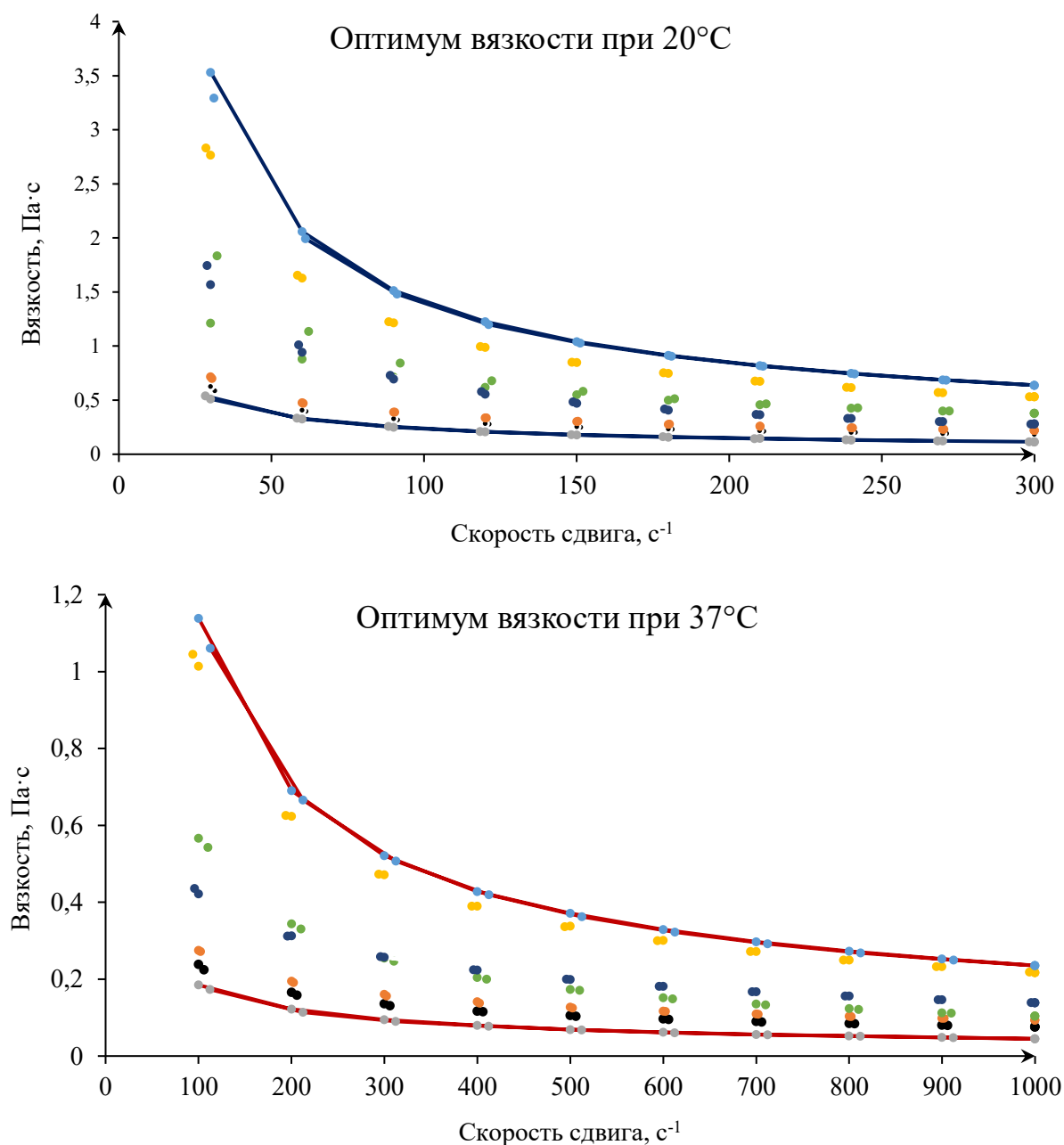


Рисунок 3.14 – Оптимумы вязкости офтальмологических гелей при температуре 20°C и 37°C

На основании проведенных реологических исследований были экспериментально обоснованы оптимумы вязкостей офтальмологических гелей при двух температурах – производства/хранения и применения (рисунок 3.14). При температуре 20°C оптимальные значения динамической вязкости лежат в диапазоне от 0,5 до 3,5 $\text{Па} \cdot \text{с}$ при 30 с^{-1} и от 0,11 до 0,64 $\text{Па} \cdot \text{с}$ при 300 с^{-1} , при температуре 37°C – от 0,17 до 1,12 $\text{Па} \cdot \text{с}$ при 30 с^{-1} и от 0,045 до 0,25 $\text{Па} \cdot \text{с}$ при 1000 с^{-1} [69].

3.3.3. Экспериментальное определение реологических оптимумов вагинальных гидрофильных мягких лекарственных форм

На российском фармацевтическом вагинальные гели представлены ЛП и косметическими средствами, в таблице 3.5 представлены основные представители этой категории продуктов.

Таблица 3.5 – Лекарственные и косметические препараты в форме вагинальных гелей, зарегистрированных в РФ

Торговое наименование	Фирма-производитель	Состав	Гелеобразователь
Лекарственные препараты			
Кандид®	Гленмарк Фармасьютикалз Лтд (Индия)	Клотримазол, цетиловый спирт, пропиленгликоль, глицерол, бензиловый спирт, цетомакрогольный эмульсионный воск, карбопол 940 (карбомер 940), натрия гидроксид, хлорокрезол, вода	Карбомер 940
Метрогил®	UNIQUE PHARMACEUTICAL Laboratories (Индия)	Метронидазол, динатрия эдетат, карбомер 940, метилпарагидроксибензоат, натрия гидроксид, пропилпарагидроксибензоат, пропиленгликоль, вода	Карбомер 940
Праджисан®	SUN PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, Ltd. (Индия)	Прогестерон, глицерол, парафин легкий жидкий, пальмового масла гидрогенизированного глицериды (Dynasan P 60-F), карбомера гомополимер тип В (Carbomer 934P), поликарбофил (Noveon AA1), сорбиновая кислота, натрия гидроксид, вода.	Карбомер 934P, Noveon AA1
Крайнон®	DENDRON BRANDS, Limited (Великобритания)	Прогестерон, глицерол, парафин жидкий, глицериды гидрогенизированного пальмового масла, карбомер 974P, сорбиновая кислота, поликарбофил, натрия гидроксид, вода	Карбомер 974P, поликарбофил

Продолжение Таблицы 3.5

Торговое наименование	Фирма-производитель	Состав	Гелеобразователь
Лекарственные препараты			
Миражэль®	ВЕРТЕКС, АО (Россия)	Прогестерон, глицерол, парафин жидкий, поликарбофил, твердый жир, карбомер (карбомер гомополимер тип В), сорбиновая кислота, натрия гидроксид, вода	Поликарбофил, карбомер (карбомер гомополимер тип В)
Блиссель®	ITALFARMACO (Италия)	Эстиол, поликарбофил, карбопол 971Р, глицерол, метилпарагидроксibenзоат натрия, пропилпарагидроксibenзоат натрия, хлористоводородная кислота, натрия гидроксид, вода	Поликарбофил, карбопол 971Р
Косметические препараты			
Кандинорм®	Юнайтед Фарма Лэбораториз (Россия)	Инулин, каприловая кислота (форма Caprylyl Glycol), тимол, сапонин, алоин, эмодин алоэ, система CrystalMatrix-FS, вода, глицерин	Инулин
Кольпоцид®	ЗАО «Лаборатория ЭМАНСИ» (Россия)	дикалия глицерризинат (экстракт Glycyrrhiza glabra L.), комплекс пептидогликанов и липотейховой кислоты, эхинацея пурпурная, глицерин; вода	Комплекс пептидогликанов и липотейховой кислоты
Монтавит гель®	Фармацойтише Фабрик Монтавит (Австрия)	ГЭЦ, глицерин, вода очищенная, хлоргексидина дигидрохлорид	ГЭЦ
Мульти-ГинАктигель®	BioClin (Нидерланды)	Сетчатый сополимер галактоарабинана и полиглюкуроновой кислоты*, ксантановая смола, глицерин, каприлилгликоль — pH 4,1 *комплекс 2QR — запатентованный комплекс биоактивных полисахаридов	Сетчатый сополимер галактоарабинана и полиглюкуроновой кислоты, ксантановая смола
Сальвагин®	Лаборатория ЭМАНСИ (Россия)	Цитробактер, каприлилгликоль, инулин, молочная кислота, гель Aloe vera, глицерин; деионизированная вода	Инулин, гель AloeVera
Фагагин®	ООО НПЦ «МикроМир» (Россия)	стерильная суспензия фаговых частиц в физиологическом растворе, вода очищенная; карбопол; экстракт календулы	Карбопол
Биофам®	Laboratorios Liconsa, S.A. (Испания)	Молочная кислота, гликоген, тимьяновое масло, триэтаноламин, карбопол 974, пропиленгликоль, кремофор RH40, вода	Карбопол 974

На первом этапе определяли пределы текучести и пластическую вязкость представленных образцов, результаты приведены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Пределы текучести и пластическая вязкость образцов по модели Кэссона при температуре 20°C

Торговое название образца	Предел текучести, Па	Пластическая вязкость, Па·с
Кандид®	134,7	0,266
Метрогил®	88,2	0,239
Монтавит гель®	44,1	0,338
Кандинорм®	39,6	0,189
Мульти-гинАктигель®	37,4	0,049
Кольпоцид®	27,2	0,168
Сальвагин®	21,0	0,087
Праджисан®	144,1	0,291
Крайнон®	138,5	0,294
Миражэль®	132,9	0,308
Блиссель®	128,5	0,284
Фагагин®	140,5	0,275
Биофам®	121,8	0,245

Реологические характеристики определяли в двух температурных режимах 20±1°C и 37±1°C, соответствующих хранению и применению вагинальных гелей в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 с⁻¹ [5, 423].

Предел текучести и пластическая вязкость изучаемых образцов гелей находятся в широком диапазоне от 21,0 до 144,1 Па и 0,087 до 0,338 Па·с, соответственно. Обращает на себя внимание то, что значения пластической вязкости и пределов текучести не имеют корреляции между собой – так, как например, образец Монтавит гель®, с наибольшей пластической вязкостью (0,338 Па·с) имеет среднее значение предела текучести (44,1 Па). Образцы, где в качестве гелеобразователя использован карбопол, кроме препарата Кандид, характеризуются близкими значениями предела текучести (от 121,8 до 144,1 Па) и пластической вязкости (0,245 до 0,308 Па·с). Поэтому для дальнейших исследований были выбраны объекты таким образом, чтобы в выборке имелись различные типы основ и их комбинаций со вспомогательными и активными фармацевтическими субстанциями, оказывающими влияние на реологические свойства системы. Так, в состав Монтавит геля® в качестве единственного

гелеобразователя входит производное целлюлозы – гидроксипропилцеллюлоза, в составе геля Метрогил® и Кандид® используется редкосшитый акриловый полимер Карбопол-940, однако в состав препарата Кандид® дополнительно введен эмульгатор цетомакрогольный эмульсионный воск, который может значимо влиять на структуру геля. В изучаемых препаратах Сальвагин®, Кандинорм®, Кольпоцид®, а также Мульти-гин Актигель® в качестве гелеобразователя используется ряд гелеобразователей: инулин, гель алоэ, комплексы сополимеров кислот, камеди, оказывающими как фармакологическое действие, так и значимо влияющими на реологические свойства систем.

На рисунке 3.15 приведены кривые течения и вязкости исследуемых образцов, измеренные при температуре 20°C. По характеру и расположению кривых течения относительно начала координат можно судить о типе течения образца, прочности его структуры. Напряжение сдвига характеризует отклик исследуемой системы на вращение измерительной геометрии с определенной скоростью сдвига, особенно показательным для понимания реологического поведения образца является режим измерения «малый сдвиг-большой сдвиг-малый сдвиг», при котором в результате измерений можно судить о сохранении или же потере гелем постоянства своей трехмерной структуры. Для большинства образцов (Кольпоцид®, Мульти-гинАктигель®, Кандинорм®, Сальвагин®, Метрогил®, Монтавит®) значения напряжений сдвига при определенных сдвиговых скоростях на восходящей и нисходящей частях цикла полностью эквивалентны, что говорит о сохранении постоянства структуры при приложении к системе скоростей сдвига в диапазоне от 0 до 300 с⁻¹.

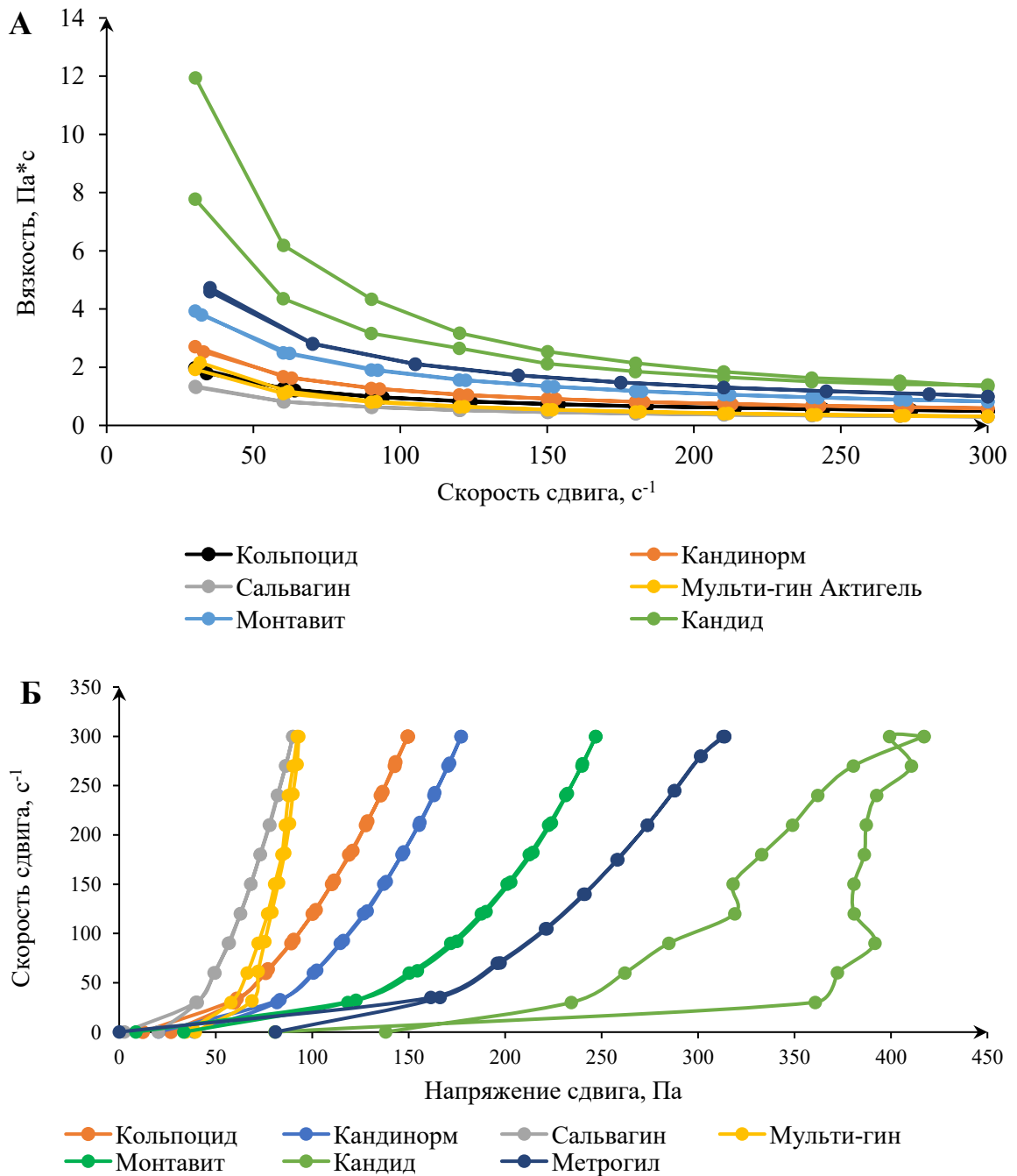


Рисунок 3.15 – А – Кривые вязкости вагинальных гелей, измеренных при температуре 20°C; Б – Кривые течения вагинальных гелей, измеренных при температуре 20°C

Образец вагинального геля Кандид® имеет кривую течения в измеряемых диапазонах сдвиговых скоростей от 0 до 300 и от 300 до 0 с⁻¹ в виде широкой петли, значения напряжения сдвига на восходящей части которой в среднем в 1,5 раза выше, чем на нисходящей. По данной кривой течения можно судить о снижении прочности структуры геля при приложении к нему скоростей сдвига в измеряемом

диапазоне. Данное явление связано с входящим в состав геля Кандид® эмульсионным воском, нарушающим тиксотропию системы в диапазоне проводимых измерений и приближающем структуру геля к структуре крема, для которых наличие высокой тиксотропии не является показательным и при приложении силы у кремов, как правило, снижается вязкость [45].

Кривые вязкости образцов Кольпоцид®, Мульти-гинАктигель®, Кандинорм®, Сальвагин®, Метрогил®, Монтавит® (рисунок 3.15, 3.16) имеют сходный характер, по ним можно судить об высокой тиксотропности образцов в измеряемом диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 с⁻¹. На кривой вязкости геля Кандид® наблюдается так называемая «петля гистерезиса» – значения динамической вязкости при последовательном уменьшении скорости сдвига от 200 до 0 с⁻¹ меньше соответствующих значений динамической вязкости при увеличении сдвиговых скоростей от 0 до 300 с⁻¹ в 1,2 раза. Однако образец вагинального геля Кандид® также проявляет тиксотропные свойства, так как через некоторое время (134,5 с) его вязкость после снятия сдвигового напряжения возвращается к исходным значениям.

Таким образом, по реограммам можно сделать вывод, что при температуре 20°C все изучаемые образцы являются тиксотропными системами с пределом текучести и псевдопластическим типом течения.

На рисунке 3.16 приведены реограммы, иллюстрирующие реологическое поведение исследуемых препаратов при температуре 37°C. Показано, что общий характер кривых и их положение относительно осей и друг друга на кривых вязкости и течения, характерный для измерений при температуре 20°C, сохраняется и при повышении температуры измерительной системы до 37°C. Все образцы при повышении температуры сохраняют свои высокие тиксотропные свойства, псевдопластическое течение.

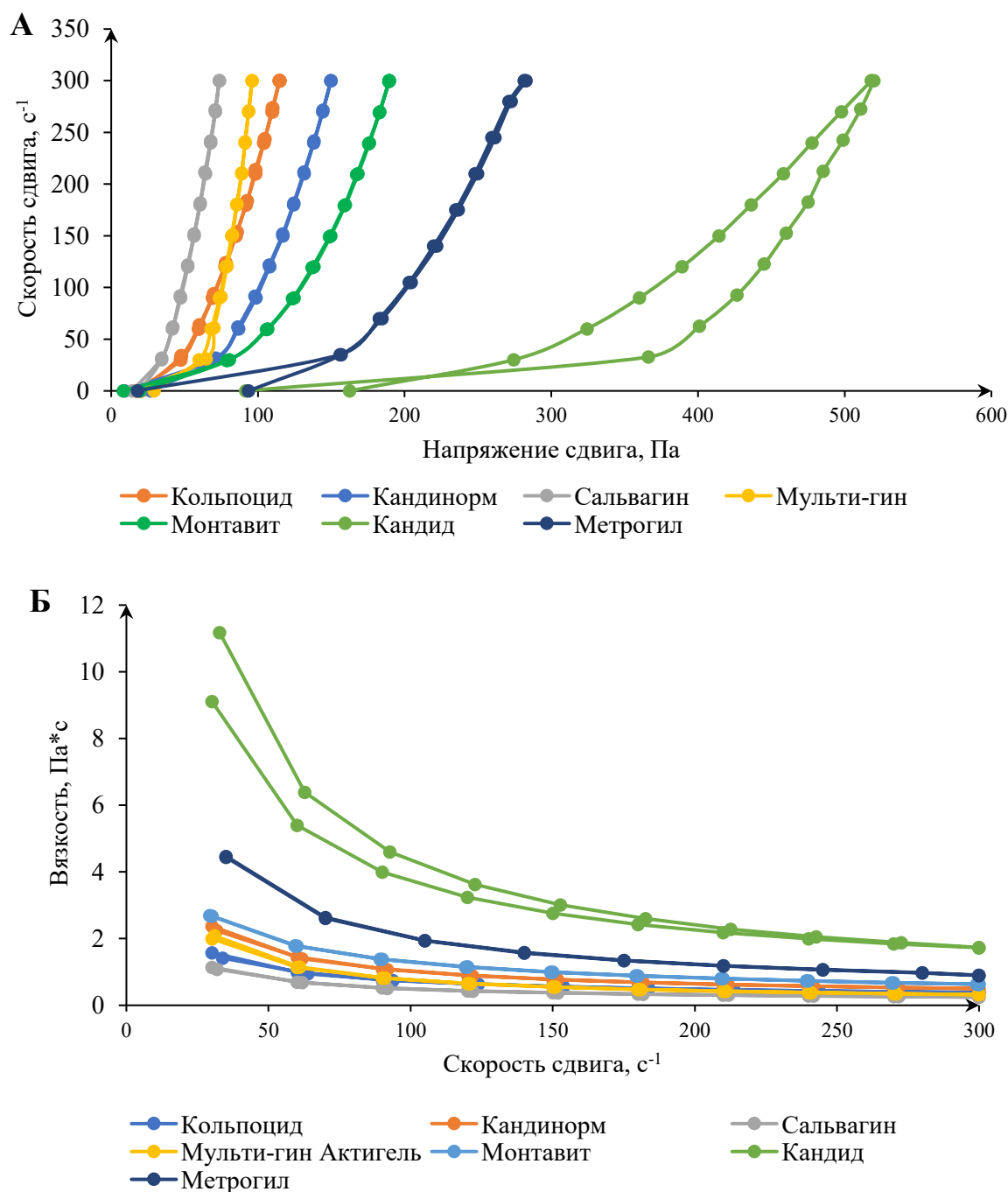


Рисунок 3.16 – А – Кривые вязкости вагинальных гелей, измеренных при температуре 37°C ; Б – Кривые течения вагинальных гелей, измеренных при температуре 37°C

На основании проведенных реологических исследований препаратов в форме вагинальных гелей были построены реологические оптимумы вязкости при температурах, соответствующих производству/хранению (20°C) и применению (37°C) вагинальных гелей (рисунок 3.17). При температуре 20°C оптимальные значения динамической вязкости вагинальных гелей при скорости сдвига 30 с^{-1}

лежат в диапазоне от 1,3 до 12 Па·с, при скорости сдвига 300 с^{-1} – от 0,3 до 1,4 Па·с; при температуре 37°С – при скорости сдвига 30 с^{-1} в диапазоне от 1,0 до 11 Па·с, а при скорости сдвига 300 с^{-1} – от 0,3 до 1,7 Па·с [45]. Таким образом, особенностью реологических оптимумов вагинальных гелей является незначительное отличие (менее, чем в 1,5 раза) оптимумов, определенных при температурах хранения и применения.

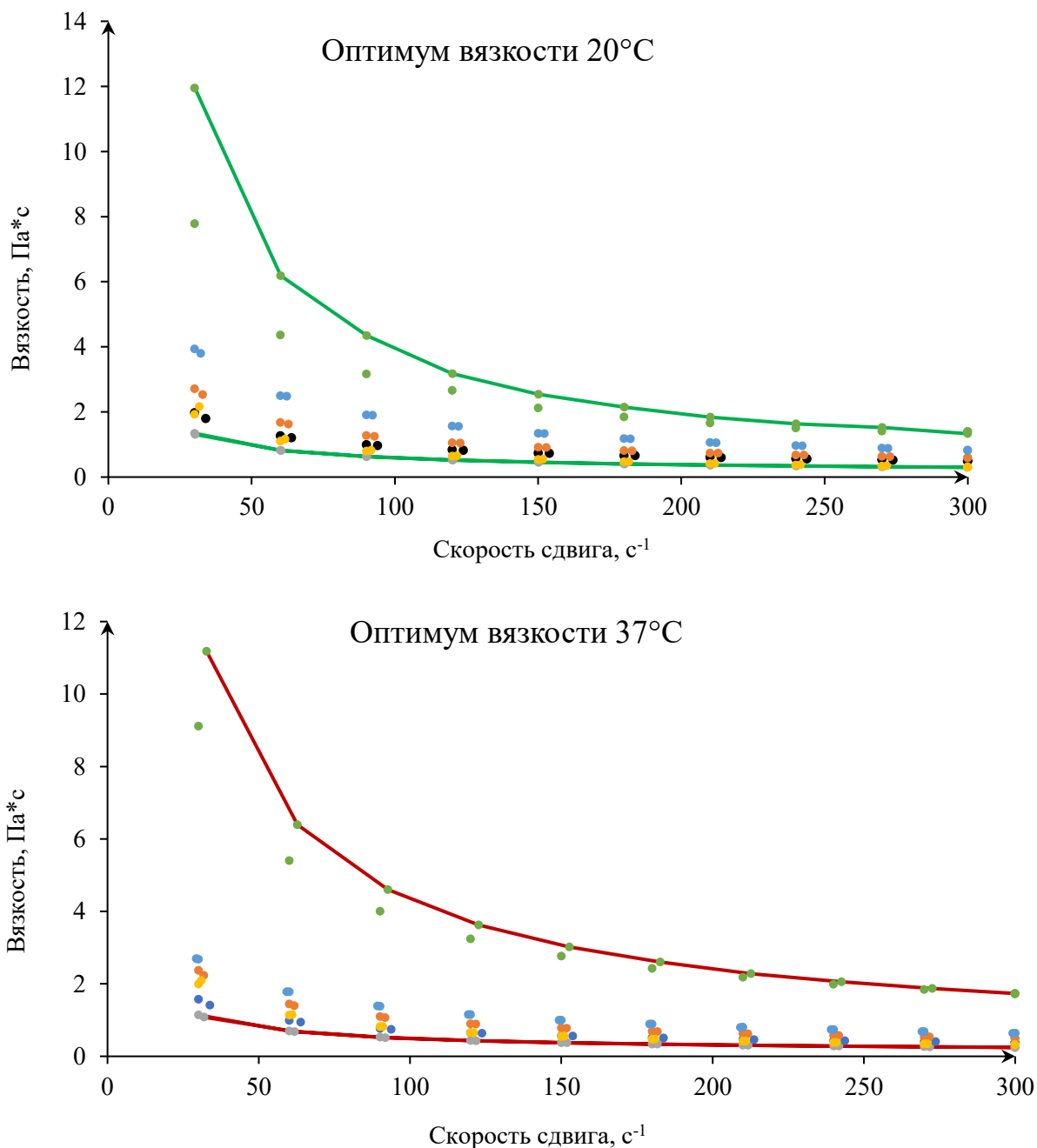


Рисунок 3.17 – Оптимумы вязкости вагинальных гелей при температурах: 20°С ; - 37°С

3.3.4. Экспериментальное определение реологических оптимумов стоматологических гидрофильных мягких лекарственных форм

На рынке присутствует ряд стоматологических гелей, зарегистрированных как ЛП, основные представители которых отражены в таблице 3.7. Кроме того существует достаточно много гелей для ухода за полостью рта и фиксации зубных протезов, которые являются изделиями медицинского назначения или косметическими препаратами. Определение реологических оптимумов стоматологических гелей решено было проводить на основании измерения реологических параметров при двух режимах: 20°C на скорости сдвига до 300 с⁻¹, и 37°C на скорости сдвига до 300 с⁻¹ для ЛП, так как их ассортимент достаточно широк, а требования к ним в НД прописаны более четко, чем к изделиям медицинского назначения или косметике, для которых, в первую очередь, учитывают коммерческие преимущества.

Таблица 3.7 – ЛП в форме стоматологических гелей, зарегистрированных в РФ

Торговое наименование	Фирма-производитель	Состав	Гелеобразователь
Калгель®	DELPHARM POZNAN, S.A. (Польша)	Лидокаина гидрохлорид, цетилпиридиния хлорид, сорбитол, ксилитол, этанол, ГЭЦ, макрогола глицерилгидроксистеарат, лауромакрогол 600, макрогол-300, натрия сахаринат, левоментол, ароматизатор травяной 17.42.5490, карамель E150, натрия цитрат, лимонной кислоты моногидрат, вода	ГЭЦ
Дентесгель®	Тульская фармацевтическая фабрика, ООО (Россия)	Лидокаина гидрохлорид, цетилпиридиния хлорид, сорбитол, ксилитол, этанол 95%, глицерол, ГЭЦ, макрогола глицерилгидроксистеарат, лауромакрогол 600, макрогол 300, натрия сахаринат, левоментол, ароматизатор травяной, карамель E150, натрия цитрат, лимонной кислоты моногидрат, вода о	ГЭЦ

Продолжение Таблицы 3.7

Торговое наименование	Фирма-производитель	Состав	Гелеобразователь
Лидокавер [®]	ВЕРТЕКС АО (Россия)	Лидокаина гидрохлорид, цетилпиридиния хлорид, сорбитол, ксилитол, этанол 95%, глицерол, ГЭЦ, макрогола глицерилгидроксистеарат, лауромакрогол 600, макрогол 300, натрия сахаринат, левоментол, ароматизатор травяной, карамель E150, натрия цитрат, лимонной кислоты моногидрат, вода	ГЭЦ
Холисал [®]	PHARMACEUTICAL WORKS JELFA, S.A. (Польша)	Холина салицилат, цеталкония хлорид ГЭЦ, метилпарагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, глицерол, масло семян аниса обыкновенного, этанол 96%, вода	ГЭЦ
Метрогил-Дента [®]	«UNIQUE PHARMACEUTICAL Laboratories (Индия)	Метронидазола бензоат, хлоргексидина диглюконат 20% раствор, пропиленгликоль, карбомер-980, динатрия эдетат, натрия сахаринат, левоментол, натрия гидроксид, вода	Карбомер 980
Дентамет [®]	АЛТАЙВИТАМИНЫ, АО (Россия)	Метронидазол, хлоргексидина биглюконата раствор 20%, левоментол, глицерол, пропиленгликоль, троламин, карбомер, натрия сахарината дигидрат, вода 86,28г	Карбомер
Аджиметрил [®]	AGIO PHARMACEUTICALS, Ltd. (Индия)	Метронидазол, хлоргексидина биглюконата раствор 20%, карбомер 940, динатрия эдетат, натрия сахаринат, левоментол, метил парагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, пропиленгликоль, глицерол, натрия гидроксид, вода	Карбомер 940
Гекмет [®]	Тульская фармацевтическая фабрика, ООО (Россия)	Метронидазол, хлоргексидина биглюконата раствор, пропиленгликоль, карбомер 980, динатрия эдетат, сахарин, левоментол, натрия гидроксид, вода	Карбомер 980

Продолжение Таблицы 3.7

Торговое наименование	Фирма-производитель	Состав	Гелеобразователь
Метродент®	SYNMEDIC LABORATORIES, Ltd. (Индия)	Метронидазол, хлоргексидина биглюконата раствор карбомер 934Р, метилпарагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, пропиленгликоль, натрия сахарината дигидрат, полисорбат 60, левоментол, троламин, ароматизатор ананасовый или лимонный или клубничный, вода	Карбомер 934Р
Камистад®	STADA Arzneimittel, AG (Германия)	Лидокаина гидрохлорид, ромашки аптечной цветков экстракт, бензалкония хлорид, масло коры коричника цейлонского, натрия сахаринат, карбомер, трометамол, муравьиная кислота, этанол 96%, вода	Карбомер
Камилидин®	Тульская фармацевтическая фабрика, ООО (Россия)	Лидокаина гидрохлорид, ромашки аптечной цветков экстракт, бензалкония хлорида, коричника камфорного масло, натрия сахаринат, карбомер, трометамол, муравьиная кислота безводная 98%, этанол 96%, вода	Карбомер

Для образцов стоматологических гелей определяли пластичекую вязкость и предел текучести (таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Значения пластической вязкости и пределов текучести стоматологических гелей при 20°C

Торговое наименование препарата	Пластическая вязкость, Па*с	Предел текучести, Па
Калгель	0,398	164,4
Дентесгель	0,392	166,2
Лидокавер	0,389	163,2
Холисал	0,344	37,0
Дентамет	0,174	79,4
Метрогил Дента	0,354	138,8
Аджиметрил	0,351	138,1
Гекмет	0,349	135,2
Метродент	0,354	138,0
Камистад	0,274	90,0
Камилидин	0,279	91,8

Значения пластической вязкости образцов находятся в диапазоне от 0,174 до 0,398 Па·с, величины пределов текучести – от 37,0 до 166,2 Па·с. Наблюдается следующая зависимость – более вязкие ЛП обладают более высоким пределом текучести и, как следствие, большей прочностью структуры. Исключением является препарат холисал, обладающий низким пределом текучести (37,0 Па) при среднем значении пластической вязкости 0,344 Па·с. При этом предел текучести препарата калгель, где в качестве гелеобразователя также используется ГЭЦ выше в 4,5 раза, что может быть связано с наличием в составе калгель производных стеариновой кислоты, которые способны повысить прочность структуры геля. Препараты дентесгель и лидокавер являются аналогами калгеля и имеют наналогичные этому стоматологическому гелю предел текучести и вязкость. Гели дентамет, аджиметрил, гекмет и метродент – аналоги метрогил-дента, а камилидин аналог камистала, и они имеют реологические характеристики сходные с оригинальным препаратом. Дальнейшие исследования проводили изучая, реологические характеристики следующих препаратов: калгель, холисал, дентамет, метрогил Дента и камистад.

На рисунках 3.18 и 3.19 приведены кривые течения и вязкости изучаемых образцов при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ и $37 \pm 1^\circ\text{C}$. По кривым течения образцов можно судить о неньютоновском типе течения гелей в заданном температурном диапазоне с выраженным пределом текучести, значимо не изменяющемся при повышении температуры. Анализируемые образцы сохраняют прочность гелевой структуры при нанесении на слизистую оболочку ротовой полости, что позволяет им локализовано воздействовать на область воспаления. Все образцы тиксотропны, причем с повышением температуры измерений – степень тиксотропии увеличивается. Об этом можно судить по фактической эквивалентности значений динамической вязкости изучаемых образцов гелей на восходящей и нисходящей петлях.

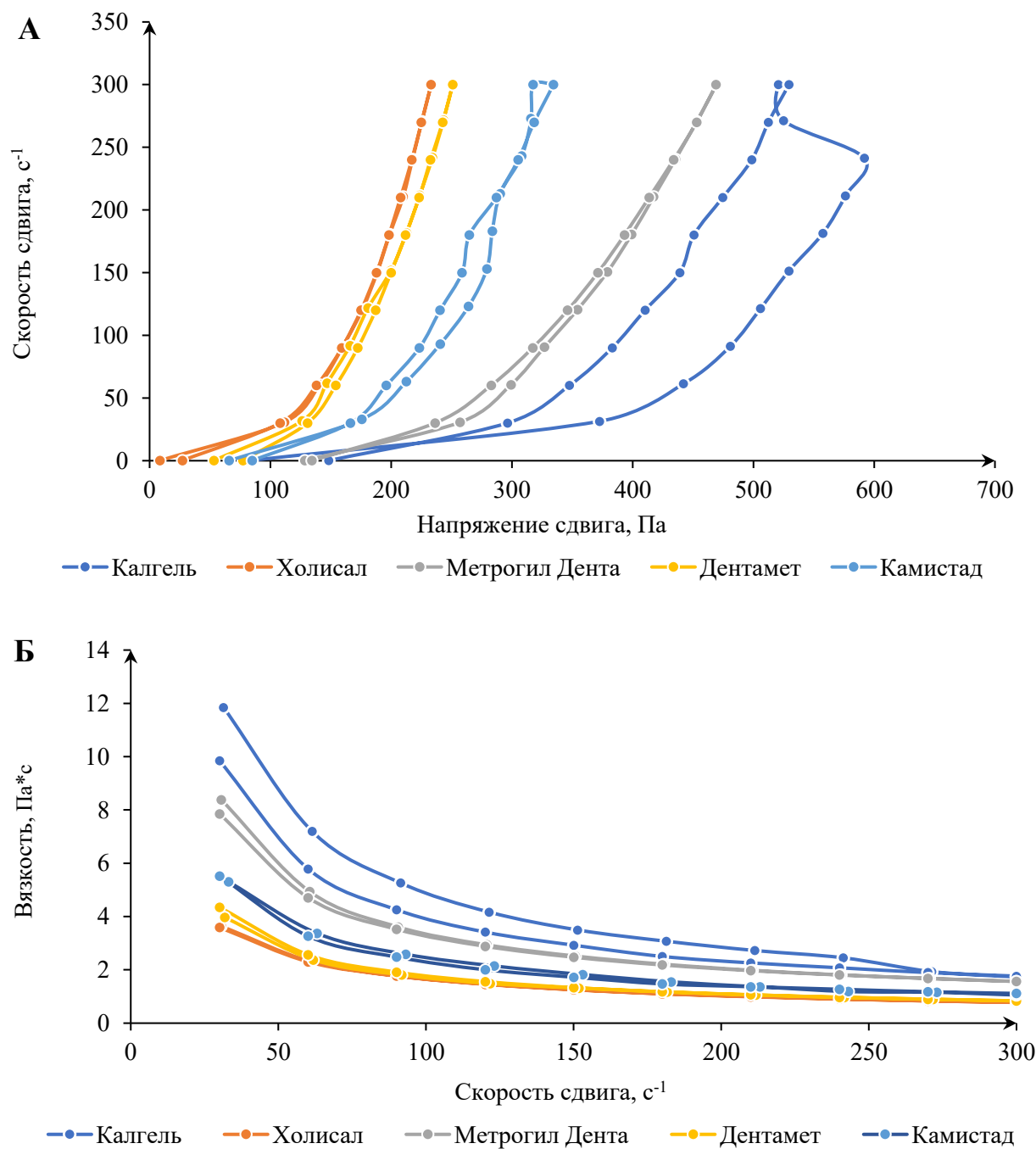


Рисунок 3.18 – Кривые течения (А) и вязкости (Б) изучаемых образцов в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 с^{-1} при температуре 20°C

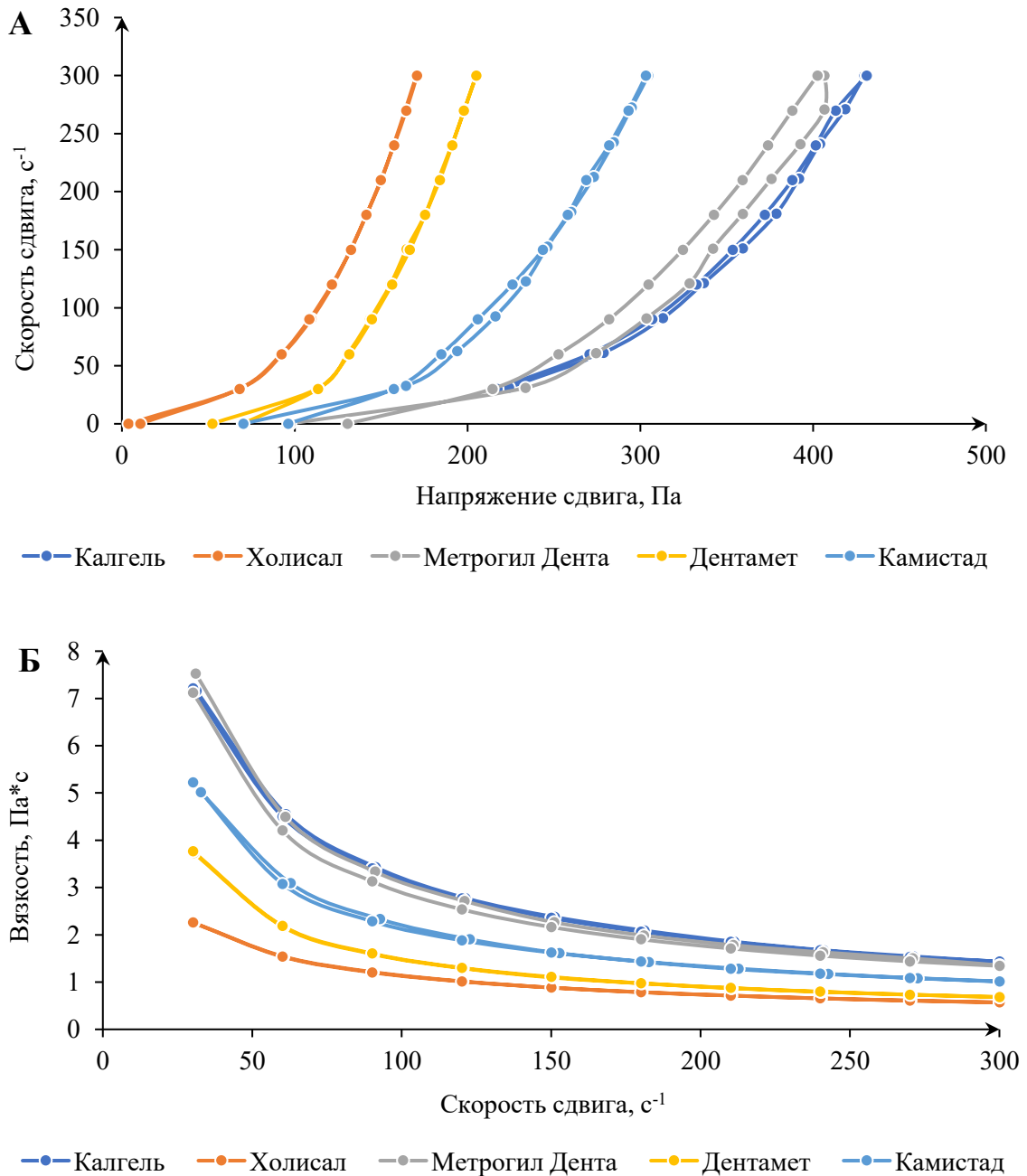


Рисунок 3.19 – Кривые течения (А) и вязкости (Б) изучаемых образцов в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 с^{-1} при температуре 37°C

Из кривых вязкости, построенных по данным измерений при температурах 20°C и 37°C видно, что с повышением температуры измерения динамическая вязкость гелей на основе карбомеров Метрогил-Дента®, Дентамет® и Камистад® значительно не изменяется, в то время как образцы на основе целлюлозы (Калгель® и Холисал®) становятся менее вязкими, сохраняя общий характер реологических кривых.

Проведенные реологические исследования стоматологических гелей позволили эмпирически вывести оптимумы вязкости в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 с^{-1} при температуре 20°C и 37°C (рисунок 3.20). При температуре 20°C оптимальные значения динамической вязкости стоматологических гелей при скорости сдвига 30 с^{-1} лежат в диапазоне от 4,0 до 12 Па·с, при скорости сдвига 300 с^{-1} – от 2,0 до 3,0 Па·с; при температуре 37°C – при скорости сдвига 30 с^{-1} в диапазоне от 2,0 до 7,8 Па·с, а при скорости сдвига 300 с^{-1} – от 1,1 до 2,3 Па·с. На основании проведенных исследований можно рекомендовать применение полученных оптимумов для разработки стоматологических лекарственных форм, так как изучаемые в работе препараты обладают доказанной фармакологической эффективностью, производятся отечественными и иностранными компаниями в течение длительного времени [44].

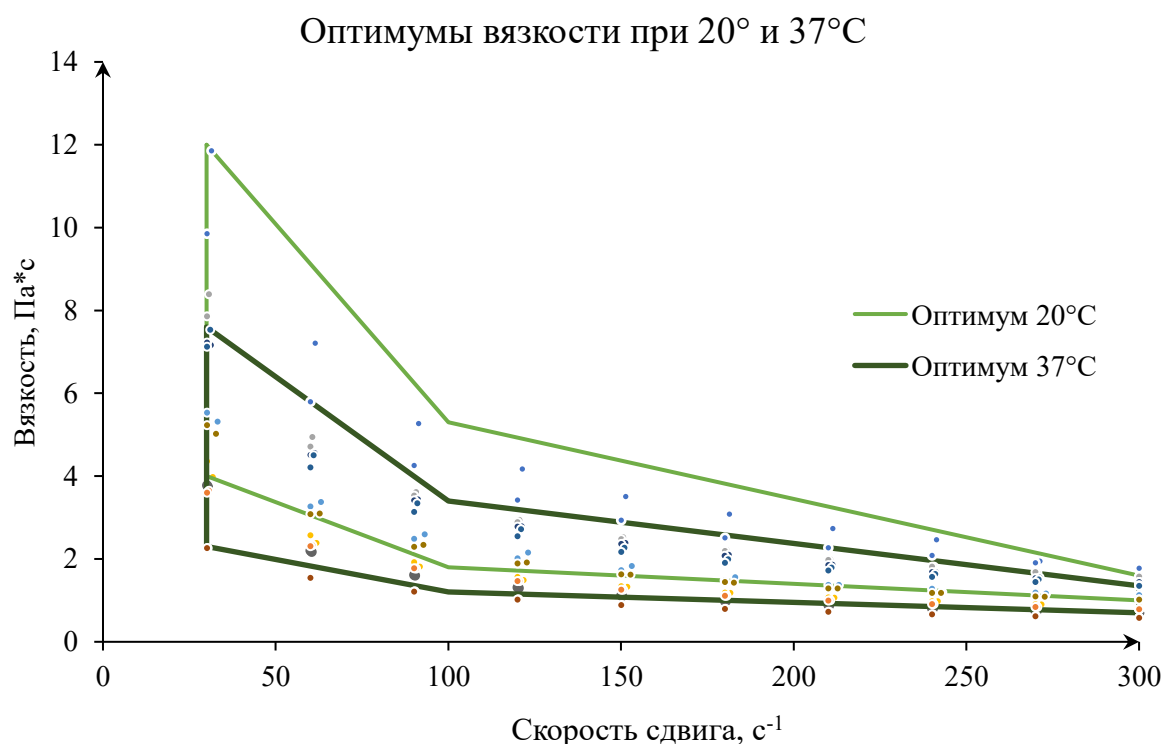


Рисунок 3.20 – Оптимумы динамической вязкости в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 с^{-1} при различных температурах

В таблице 3.9 представлены установленные расчетные оптимумы реологических показателей ГМЛФ для различных путей введения.

Таблица 3.9 – Реологические оптимумы ГМЛФ

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

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

На основе вышеизложенного методология фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями с учетом целевого профиля качества ЛП представлена в виде блок-схемы процесса разработки состава и технологии ЛФ на рисунке 3.21.

Фармацевтическая разработка ГМЛФ, должна начинаться с изучения свойств лекарственной субстанции, так как от глубокого понимания процессов происходящих с ЛВ зависит успех дальнейшей разработки. Минимальным объемом исследований на данном этапе является изучение физико-химических свойств лекарственной субстанции, ее растворимость, реактогенность, устойчивость в различных диапазонах pH, термостабильность и т.д.

Следующим этапом является собственно фармацевтическая разработка, которая должна начинаться с определения профиля качества ЛП. Исходя из выбора пути введения, ЛФ, дозировки, объема и вида упаковки, требований по стабильности, для обоснования которых необходимы данные по фармакокинетике и фармакодинамике ЛВ и знания о свойствах лекарственной субстанции, формируют показатели качества готовой ЛФ, которые войдут в спецификацию на ЛП. Затем следует определять критические параметры качества ЛП. Этот этап разработки является самым критичным, так как проводится выбор показателей качества ЛП, которые будут контролироваться в процессе фармацевтической разработки, и если не учесть какой-либо фактор, то в целом вся разработка может привести к неудаче. В качестве критических показателей нужно выбирать не только те, которые регламентируются в соответствии с ГФ РФ или ГФ ЕАЭС, то есть фармакопейные, но и те, которые могут повлиять на качество препарата или его терапевтические или потребительские свойства. Например, вязкость не является обязательным показателем качества гелей, однако значимо влияет на стабильность, потребительские и биофармацевтические эффекты ЛФ.

Биотехнологические субстанции в своем большинстве, достаточно нестабильные, поэтому подбор способов стабилизации ЛВ в водном растворе (так как гели гидрофильные системы) является важнейшей стадией. При этом стабильность в ЛФ ЛВ будет выше, чем в водном растворе, так как при увеличении вязкости системы стабильность молекул увеличивается вследствие меньшей подвижности. К этому этапу разработки относится: выбор буферного раствора, стабилизаторов рН, антиоксидантов, стабилизаторов белковой или нуклеотидной структуры и др.

Не менее важным является выбор гелеобразователя, который осуществляют на основе данных о способе применения ЛП, физико-химических свойств ЛВ и совместимости с ЛВ. Причем детерминирующим фактором будет именно совместимость полимера и ЛВ, и стабильность биотехнологической субстанции в присутствии гелеобразователя. Для ЛП, требующих стерильности готовой ЛФ, выбор основы для её получения ограничен, так как многие гелеобразователи не

сохраняют постоянную вязкость после термической стерилизации. Кроме того, биотехнологические субстанции требуют введения в состав ЛФ солей для создания буферной ёмкости и определенного значения pH, что дополнительно ограничивает выбор полимера.

На следующем этапе целесообразно проводить подбор ВВ: формообразующих, загустителей, веществ, обеспечивающих биофармацевтические и терапевтические характеристики препарата, такие как биоадгезивные, осмотически активные компоненты, пролонгаторы, активаторы всасывания. Важным является подбор вспомогательных веществ, обеспечивающих технологические и потребительские свойства гелей: корригенты вкуса и запаха, консерванты, эмульгенты и увлажняющие агенты. Затем, параллельно осуществляют разработку технологии получения ЛФ и методов анализа. Под разработкой технологии обычно понимают определение технологических стадий производства, последовательности введения компонентов, диапазоны технологических параметров. К разработке методов анализа, относится разработка аналитических методик входного контроля ЛВ и ВВ, полупродуктов и готовой ЛФ, также валидация аналитических методик и верификация фармакопейных методов.

На основании данных, полученных в предыдущем этапе, разрабатываются документация на ЛП: НД по качеству, лабораторный регламент, спецификации на полупродукты и готовую ЛФ, СОПы, технологические инструкции и др. Чаще всего фармацевтической разработку заканчивают на данном этапе составлением НД и отчета по разработке.

Однако без оценки и обоснования уровня риска технологического процесса для его масштабирования на производственную площадку фармацевтическая разработка не имеет смысла, поэтому данный этап один из ключевых. Нужно понимать, что разработанная технология может быть произведена на конкретной уже существующей производственной площадке или специально для данного продукта сконструированной.

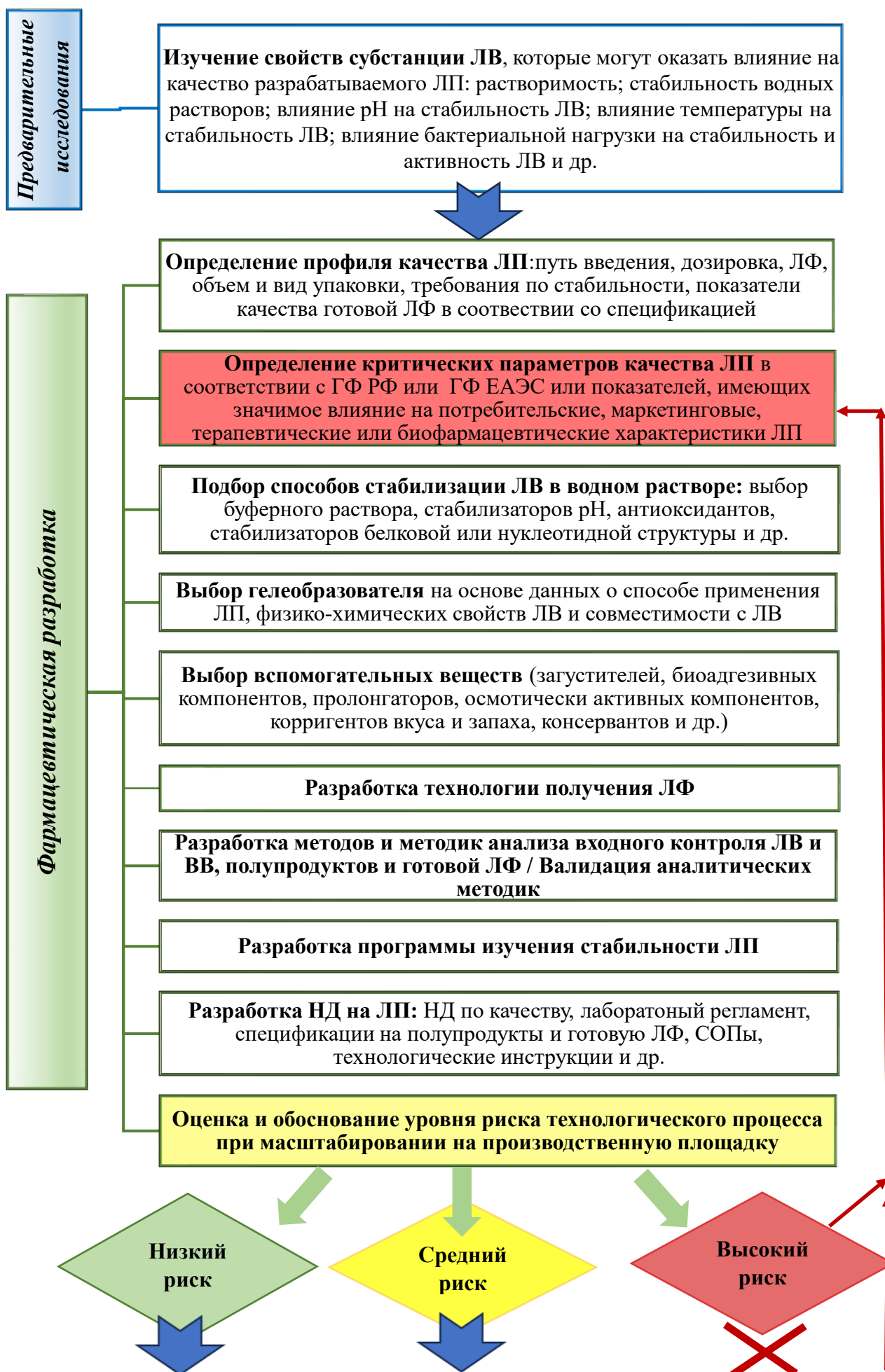
После оценки рисков, если он не превышает средний, может быть осуществлен процесс масштабирования и трансфера технологии. Если риск

является высоким, то требуется пересмотр критических параметров качества ЛП, который заключается во введении дополнительных критических параметров качества или изменении диапазона их значений, и повторная фармацевтическая разработка. Под масштабированием понимается получение от одной и более серий ЛФ на производственной площадке, корректировка технологических параметров производства для перехода к следующему этапу – трансферу, в течение которого, обычно выпускают не менее трех серий ЛФ и проводят валидацию технологического процесса и очистки оборудования. Несмотря на то, что фармацевтическая разработка заканчивается составлением отчета, конечной целью всего данного процесса должна являться подача регистрационного досье и дальнейшее серийное производство разработанного ЛП.

Для апробации разработанной методологической концепции фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями с учетом целевого профиля качества ЛП в качестве объектов исследования выбраны ЛС представляющие собой вирусы и рекомбинантные белки.

Вирусным ЛС являются бактериофаги, хорошо изученные, и на фоне роста антибиотикорезистентных инфекций, вновь становящиеся актуальными для терапии. Защищенная в 2023 году докторская диссертация Бочкаревой С.С. [9], продемонстрировала возможности применения персонализированной фаготерапии в нашей стране, и на этом фоне, в связи с активным получением новых штаммов бактериофагов, новых методов терапии, перспективным является разработка методологии создания ЛФ на их основе.

Рынок рекомбинантных белков расширяется с каждым годом по данным ResearchAndMarkets.com в 2021 году мировой рынок этих продуктов оценивался в 3 892,78 млн долларов США, в 2022 году — в 4 436,22 млн долларов США, а к 2027 году, согласно прогнозам, вырастет в среднем на 14,21% и достигнет 8 641,69 млн долларов США [68], это связано удешевлением и автоматизацией производства. Количество ЛП, относящихся к этой группе стремительно растет, самым известным и распространенным считается инсулин, затем интерферон, эритропоэтин, колониестимулирующий фактор, филграстим, дорназа альфа, соматотропин и др.



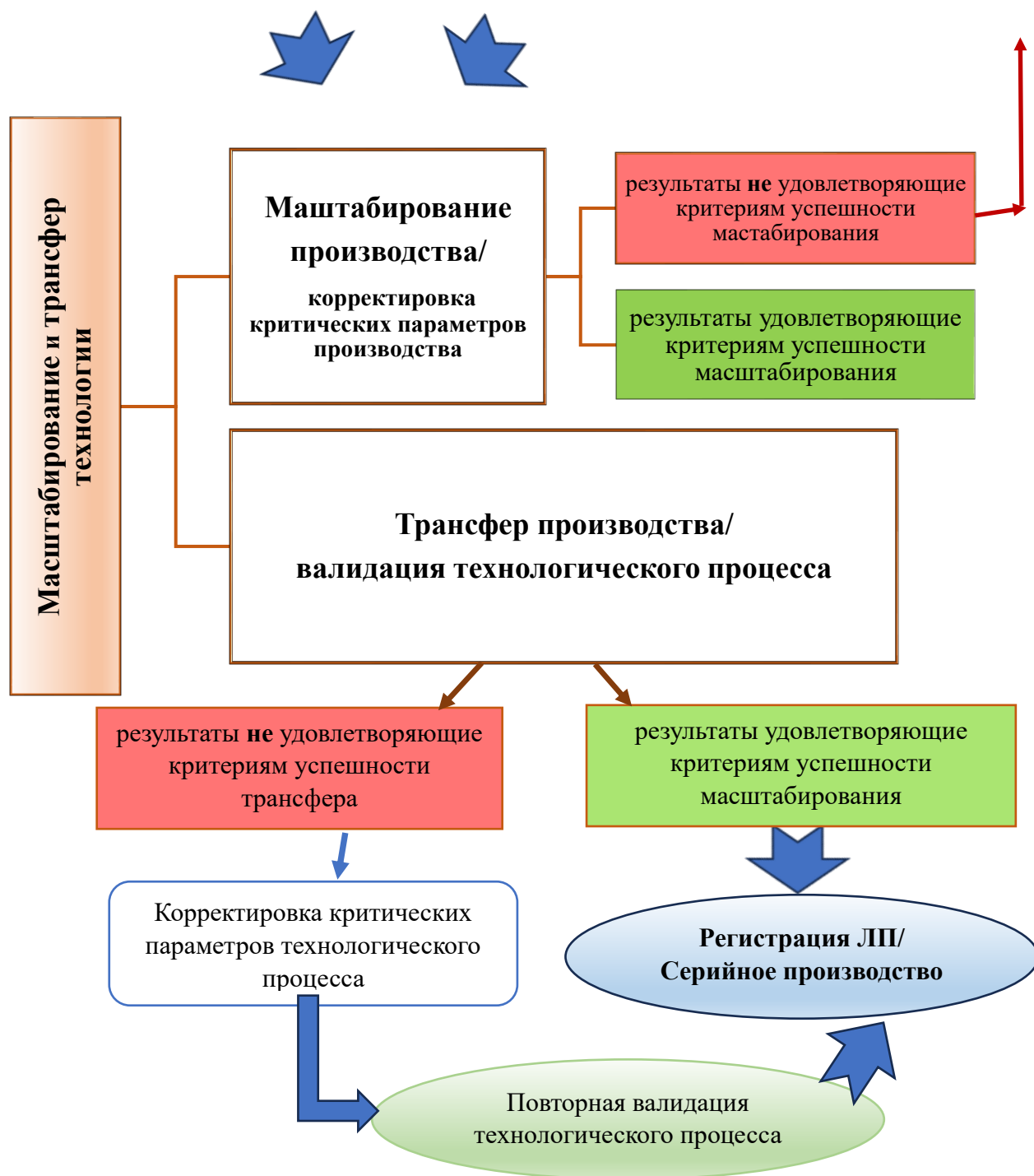


Рисунок 3.21 – Блок-схема процесса разработки состава и технологии ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями

Для апробации разработанной методологии были выбраны один рекомбинантный белок, являющийся инновационным продуктом, впервые синтезированный и находящийся в стадии активного изучения – это эндолизин LysECD7-SMAP; и второй белок, хорошо изученный, технология получения которого многократно отработана – интерферон альфа-2b.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. На основании всестороннего изучения нормативной и научной литературы определены и обоснованы профили качества ГМЛФ для местного/дерматологического применения, для местного применения/для нанесения на раны и ожоги, офтальмологического, вагинального, назального, местного действия/для нанесения на слизистую оболочку ротовой полости и для приема внутрь, которые необходимо учитывать при фармацевтической разработки ЛС для данных путей введения.

2. В рамках проведенного исследования были охарактеризованы специфические критические параметры качества биотехнологических субстанций, которые играют ключевую роль при разработке ЛФ для обеспечения их эффективности и безопасности.

3. Впервые в фармацевтической отрасли экспериментально определены реологические оптимумы ГМЛФ для различных способов применения: дерматологического, офтальмологического, стоматологического, вагинального и для нанесения на слизистую оболочку ротовой полости.

4. Разработана методологическая концепция фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями с учетом целевого профиля качества ЛП, представленная в виде блок-схемы процесса, состоящая из следующих основных этапов: предварительные исследования, заключающиеся в изучении свойств ЛВ; фармацевтическая разработка, складывающаяся из определения целевого профиля качества ЛП, определения критических параметров качества ЛП, подбора способов стабилизации ЛВ в водном растворе, выбора гелеобразователя, выбора вспомогательных веществ, разработки технологии получения ЛФ, разработки методов и методик анализа входного контроля ЛВ и ВВ, полупродуктов и готовой ЛФ / валидации аналитических методик, разработки программы изучения стабильности ЛП, разработки НД на ЛП, оценке и

обоснования уровня риска технологического процесса при масштабировании на производственную площадку; масштабирования и трансфера технологии.

5. Обоснован выбор в качестве объектов исследования ЛС, представляющих собой вирусы и рекомбинантные белки, а именно бактериофаги, эндолизин LysECD7-SMAP и интерферон альфа-2b.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНЫХ ГИДРОФИЛЬНЫХ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С КОКТЕЙЛЯМИ БАКТЕРИОФАГОВ

Разработку ЛФ бактериофагов осуществляли в соответствии с рекомендациями Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза", конкретно главе 6 «Спецификации. Методы испытания и критерии приемлемости биотехнологических (биологических) препаратов», главе 13 «Фармацевтическая разработка биотехнологических и биологических препаратов» и главе 18 «Производство, качество, доклинические, клинические исследования лечебно-профилактических препаратов бактериофагов».

Проводили разработку ЛФ бактериофагов против высокоприоритетных бактерий *Staphylococcus aureus*, рода *Salmonellae* и крайне приоритетных бактерий рода *Enterobacteriaceae*, а именно *Escherichia coli*, так как это является актуальной задачей современной медицинской практики.

Разрабатываемые ЛФ могут быть «универсальными» для включения в состав коктейлей бактериофагов различного штаммового состава, но также могут быть использованы для получения ЛП с фиксированным/постоянным составом штаммов. То есть ЛФ могут быть воспроизведены в рамках внутрибольничной аптеки и на крупномасштабном производстве. Разрабатываемые составы ЛФ можно использовать для персонализированного подбора штаммов для конкретного больного, для подтверждения мы проводили изучение стабильности ЛФ с различным штаммовым составом.

4.1. Фармацевтическая разработка термореверсивного вагинального геля с коктейлем бактериофагов

Штаммы бактериофагов, использованные в работе, выбраны на основании их широкого спектра литического действия и эффективности против антибиотикорезистентных штаммов *S. aureus*. Изучение физико-химических, молекулярно-генетических, биологических и терапевтических характеристик штаммов бактериофагов проводилось в лаборатории Клинической микробиологии и биотехнологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского [1, 9].

4.1.1. Определение профиля качества вагинального геля с коктейлем бактериофагов

Первым этапом разработки ЛФ являются предварительные исследования, посвященные изучению свойств АФС. Так как штаммы бактериофагов были изучены в рамках других исследований [9], то в данной работе они не рассматриваются.

В целом штаммы бактериофагов Sa30, CH11, SCH1, SCH111 обладают следующими физико-химическими свойствами: стабильны в диапазоне температур от -20 до +45°C, наибольшая стабильность наблюдается в диапазоне pH 6-7, в водных растворах стабильны в течение 24 месяцев исследований [9].

Определение целевого профиля качества ЛС в виде вагинального геля с коктейлем бактериофагов представлено в таблице 4.1. Целевой профиль и критические параметры качества вагинального геля определяли по фармакопейным требованиям, так как эти показатели закладывались в спецификацию на Нормативный документ (далее - НД) по качеству на ЛП (Приложение А) и

контролировались в процессе изучения стабильности ЛФ, однако, в процессе разработки в соответствии с профилем качества ГМЛФ вагинального применения изучали дополнительные показатели: биоадгезивные свойства, вязкость, стабильность реологических показателей, адсорбционную и осмотическую активности. Консистенцию ЛФ и отсутствие вытекания при применении вагинального геля, вследствие не возможности оценки на пациентах, определяли с помощью методик, обоснованных по литературным данным для термореверсивных/ *in situ* систем, определяли наличие золь/гель перехода, температуру и время гелеобразования и прочность геля.

Определение критических параметров качества ЛП крайне важно для последующей разработки. Критические параметры качества вагинального геля с коктейлем бактериофагов и их обоснование представлены в таблице 4.2.

Разработанная спецификация на гель для вагинального применения с коктейлем бактериофагов, 30 г, представлена в Приложении А, перечень показателей качества соответствует рекомендациям Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза". Показатель «примеси» не включен в спецификацию на готовую ЛФ, так примеси, родственные и производственные соединения, связанные с культивированием и очисткой (остаточные ДНК и белки клетки хозяина), определяются в субстанции и входят в спецификацию на АФС. При получении ЛФ данные примеси не могут быть привнесены с ВВ и в готовой ЛФ содержатся в таких количествах, которые не могут уловить даже самые чувствительные методы анализа.

Таблица 4.1 – Целевой профиль качества вагинального геля с коктейлем бактериофагов

Элемент целевого профиля качества ЛП		Цель	Обоснование
Лекарственная форма		Вагинальный гель	Удобная для применения ЛФ с потребительской точки зрения, обеспечивающая однородность доставляемых доз, точность попадания и распределения ЛФ по слизистой оболочке влагалища
Путь введения		Вагинальный/местный	Соответв. ГФ РФ
Дозировка		Не менее 10^7 в 1 г ЛП для каждого штамма	Для обеспечения фармакологического эффекта.
Объем упаковки		30 г	Алюминиевые тубы
Фармакокинетика		Препарат местного действия, нет требований по всасыванию	По литературным данным белки и пептиды могут проникать в ткани глаза, но достаточно незначительно, основной фармакологический эффект будут проявлять на слизистой оболочке
Стабильность		2 года. При температуре 2-8°C.	Минимальный по ЕАЭС срок годности для первой регистрации препарата
Качественные параметры ЛП	Описание	Необходимо для терапевтической эффективности и для безопасности	Требование ГФ РФ
	Идентификация		
	pH		
	Специфическая активность		
	Стерильность		
	Аномальная токсичность		
	Бактериальные эндотоксины		
	Масса содержимого упаковки		
	Герметичность упаковки		
Упаковка		Материал упаковки должен обеспечить соответствующее качество ЛП и не оказывать отрицательного воздействия на ЛФ, обеспечить удобство в применении	Выбор разработчика и соответствие потребительским характеристикам. Необходимо для клинической эффективности, безопасности. Обеспечение стабильности ЛП на протяжении заявленного срока годности
Способ применения		Согласно инструкции по применению	Необходимо для клинической эффективности и безопасности

Таблица 4.2 – Критические параметры качества вагинального геля с коктейлем бактериофагов

Параметр качества лекарственного препарата	Цель	Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
Описание	Вид ЛФ должен удовлетворять потребительским характеристикам	Нет	Физические свойства содержимого напрямую не связаны с безопасностью и эффективностью препарата, следовательно, внешний вид не является критическим параметром.
Идентификация	Препарат должен специфически лизировать бактерии <i>Staphylococcus epidermidis</i> и/или <i>Staphylococcus aureus</i> (в зависимости от фагового состава коктейля)	Да	Идентификация оказывает большое влияние на безопасность и эффективность лекарственного препарата, но этот критический параметр качества (CQA) должен эффективно контролироваться системой управления качеством. Различие составов и переменные процесса производства не влияют на подлинность. Следовательно, этот параметр не будет обсуждаться во время разработки состава и технологии производства.
pH	6,0 – 7,0	Да	Обеспечивает стабильность АФС
Специфическая активность	ЛП должен лизировать бактерии <i>Staphylococcus epidermidis</i> и/или <i>Staphylococcus aureus</i> в разведении не менее 10^7 в 3 г	Да	Содержание действующего вещества будет влиять на безопасность и терапевтическую эффективность препарата. Переменные процесса активно влияют на количественное содержание действующего вещества. Следовательно, данный параметр должен оцениваться в процессе разработки состава и технологии производства.
Стерильность	Должен быть стерилен	Да	Вагинальные ЛФ не обязательно должны быть стерильными, так же как препараты бактериофагов могут характеризоваться МБЧ, однако, в связи со спецификой возможного применения ЛФ у беременных женщин перед родами ЛФ разрабатывают стерильной. Этот показатель достаточно контролировать у готовой ЛФ

Продолжение Таблицы 4.2

Параметр качества лекарственного препарата	Цель	Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
Аномальная токсичность	Должен быть не токсичным	Нет	Требование ГФ РФ. АФС не токсичны, поэтому параметр не критический
Бактериальные эндотоксины	Не более 100 ЕЭ/доза	Да	Требование ГФ РФ. Параметр обязательно контролируются у АФС, производство ЛФ и различие в технологии может оказать влияние на содержание эндотоксинов
Масса содержимого упаковки	Не менее 28,5 г	Нет	Масса не связана с безопасностью и эффективностью препарата. Следовательно, этот параметр не является критическим
Герметичность упаковки	Должна быть герметична	Да	При отсутствии герметичности может произойти обсеменение посторонней микрофлорой и будет нарушена стерильность, что скажется на качестве и безопасности препарата

4.1.2. Разработка состава и технологии вагинального геля с коктейлем бактериофагов

В качестве ЛФ выбран термореверсивный гель или *in situ* система, которые перед введением в организм находятся в золеобразной форме, но после введения подвергаются гелеобразованию *in situ* при изменении внешних факторов, в данном случае температуры. Для получения таких систем используют камеди, альгинаты, полуксамеры и специально синтезированные полимерные матрицы в моно вариантах и в комбинации с другими полимерами: производными целлюлозы, карбополами, ПЭГ и др. Природные полимеры для разработки ЛФ с биотехнологическими препаратами не всегда удачный вариант, так как часто требуется термическая стерилизация, а не все полимеры термостабильны. Кроме того, сами полимеры часто имеют ограниченный срок годности, поэтому целесообразнее проводить разработку ЛФ с синтетическими или полусинтетическими гелеобразователями.

В соответствии с методологией фармацевтической разработки ГМЛФ следующим этапом должно быть обоснование и подбор стабилизаторов в водном растворе АФС. Так как данные штаммы бактериофагов достаточно стабильны в водных растворах с рН от 6-7 (не менее 24 месяцев), то в качестве стабилизатора использовали изотонический раствор натрия хлорида.

Далее проводили выбор гелеобразователя, для этого изучали возможность использования в качестве гелеобразователей следующие полимеры: ГЭЦ Natrosol 250 G, Natrosol 250 H, ГМПЦ Benecel K100M, NaКМЦ Blanose™ СМС, полуксамеры Kolliphor® P 407 и Kolliphor® P 188, карбопол Carbopol® 974 P NF, ПЭГ 3000 и 6000 [64].

На первом этапе исследования необходимо проверить совместимость ЛВ с ВВ, для этого получали растворы ВВ, в них вводили коктейли бактериофагов и контролировали стабильность растворов в условиях ускоренных испытаний

(температура 25°C, относительная влажность 60%). Результаты представлены в таблице 4.3

Таблица 4.3 – Изучение совместимости гелеобразователей и бактериофагов

Время Состав растворов ВВ		Титр бактериофагов, БОЕ/мл*				
		1 сутки	7 суток	1 месяц	2 месяца	3 месяца
Natrosol 250 ННХ, 3,5%	Sa30	$2,5 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$8,6 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$
	CH11	$5,8 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$	$5,9 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^8$
	SCH1	$6,4 \cdot 10^8$	$5,8 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^8$
	SCH111	$1,5 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$	$5,7 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$
Benecel K100M, 2%	Sa30	$5,4 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$
	CH11	$5,9 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	SCH1	$3,2 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$	$5,2 \cdot 10^8$
	SCH111	$5,1 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^9$	$5,1 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$
Blanose™ CMC, 5%	Sa30	$5,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$
	CH11	$3,6 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$
	SCH1	$0,9 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$8,9 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^7$
	SCH111	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$
Kolliphor® P 407, 20%	Sa30	$6,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^7$
	CH11	$2,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	SCH1	$2,5 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	SCH111	$4,8 \cdot 10^7$	$3,8 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$
Kolliphor® P 188, 20%	Sa30	$1,0 \cdot 10^8$	$8,2 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$
	CH11	$4,4 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$
	SCH1	$1,7 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	SCH111	$7,1 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$
Carbopol® 974 P NF 0,75%	Sa30	$2,0 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^4$
	CH11	$3,9 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$
	SCH1	$1,1 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^5$
	SCH111	$1,0 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^6$	$8,1 \cdot 10^4$
ПЭГ 3000	Sa30	$1,8 \cdot 10^8$	$9,2 \cdot 10^7$	$6,8 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$
	CH11	$8,4 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^7$
	SCH1	$1,9 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	SCH111	$7,6 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^7$	$3,9 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^7$
ПЭГ6000	Sa30	$5,6 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$
	CH11	$3,6 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$
	SCH1	$1,9 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$
	SCH111	$6,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$

*В таблице приведены средние значения титра бактериофагов трех измерений, RSD не превышало 10%, что для биологического метода исследования соответствует требованиям

Результаты исследований показали, что бактериофаги стабильны в гелях на основе производных целлюлозы и полоксамеров, но нестабильны в геле на основе карбопола. Так как, карбопол это кислота и для проведения реакции гелеобразования требуется нейтрализация, возможно по этой причине, несмотря на

нейтральное значение pH готового геля, это оказывает негативное влияние на стабильность бактериофагов, титр падает от исходных значений 10^8 - 10^7 до 10^5 - 10^4 БОЕ/мл (Бляшкообразующие единицы, далее - БОЕ) Поэтому карбопол из дальнейших исследований исключили.

Затем получали экспериментальные составы вагинального геля с коктейлем бактериофагов на основе полоксамеров и с добавлением производных целлюлозы. Составы выбирали с учетом проанализированных литературных данных [301, 382, 410] (таблица 4.4).

В соответствии с целевым профилем качества экспериментальные образцы вагинального геля с коктейлем бактериофагов оценивали по наиболее критическим показателям, это: описание, pH до и после стерилизации, вязкость до и после стерилизации и агрегативная устойчивость. Результаты приведены в таблице 4.5.

Составы 5, 16 и 20 не соответствовали по внешнему виду, были неоднородные, с комками. Составы 3-4, 17-19 не соответствовали требованиям по показателю вязкость после стерилизации, ее значение падало более чем в два раза. У составов 14, 15 и 24 наблюдалась агрегативная нестабильность, то есть при хранении, после центрифугирования гели расслаивались, что говорит о том, что возможно такое поведение гелей при хранении в естественных условиях. Таким образом, эти составы были исключены из дальнейших исследований. Оставшиеся составы изучали по следующим параметрам: температура гелеобразования (перехода золь-гель), время гелеобразования, прочность геля, осмотическая и адсорбционная активность, сила биоадгезии (таблица 4.6).

Температура гелеобразования определяет переход золь-гель ЛФ, и она должна быть значительно выше комнатной температуры но не выше температуры тела, то есть находиться в интервале от 29 до 37°C. У образцов с 9 по 19 температура гелеобразования ниже 28 градусов, это может создать неудобство в применении препарата. У образцов 21 по 23 температура гелеобразования выше физиологической, то есть больше 37°C, таким образом данные образцы при введении в организм не будут увеличивать свою вязкость и будут вытекать. Образец

№ 7 имеет температуру гелеобразования близкую к физиологической, то есть $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

Время гелеобразования – еще один важный с потребительской точки зрения параметр, если вязкий гель образуется быстро, его может быть проблематично ввести в полость, если долго, то пациентке неудобно долго ждать и при движении гель не будет вытекать. Оптимальным посчитали время гелеобразования от 7 до 15 минут. Все изучаемые образцы имеют время гелеобразования близкое к оптимальному.

Прочность гелей должна быть достаточная, чтобы удерживаться в месте введения. Как видно из данных таблицы все представленные образцы обладают достаточной прочностью.

Так как разрабатываемая ЛФ предназначена для нанесения на слизистую оболочку влагалища, то значимым параметром выступает биоадгезия, которую определяли двумя методами по силе отрыва и методом потока [3]. Образцы 7, 8 и 12 обладают максимальной силой отрыва, около 28Н. Образец №7 имеет минимальную скорость стекания из изучаемых образцов, которая составила $23,8 \pm 2,6$ мм/с.

Для вагинальных гелей высокая осмотическая активность может привести к обезвоживанию слизистой оболочки, ощущениям стянутости, дискомфорта, поэтому выбирали гели с минимальным или средним значением данного параметра.

Адсорбционная активность гелей позволяет сорбировать на себе вирусы и бактериальные агенты, поэтому высокая адсорбционная активность должна положительно отразиться на фармакологическом эффекте ЛФ.

По комплексу изученных показателей качества наиболее перспективным для дальнейших исследований выбрали образец № 7.

Таблица 4.4 – Составы экспериментальных образцов вагинального геля с коктейлем бактериофагов

Компонент	Составы																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Фаголизат коктейля Sa30, CH11, SCH1	10 ⁹ -10 ¹¹ БОЕ																							
Натрия хлорид, г	0,9																							
Kolliphor® Р 407, г	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Kolliphor® Р 188, г	-	5	-	-	5	-	-		5	5			5		5	5				5				
ГМПЦ Benecel K100M	-	-	1,5	2,0	1,0	-	-	-	-															
ГЭЦ Natrosol 250 G, г	-	-	-	-	-	1,0	1,5	2,0	1,0	1,5														
ГЭЦ Natrosol 250 ННХ, г	-	-	-	-	-	-	-	-	-		1,0	1,5	2,0	1,0	1,0	1,5								
NaКМЦ Blanose™ СМС, г	-	-	-	-	-	-	-	-	-								1,0	2,0	3,0	1,5				
ПЭГ 3000																					1,5	3,0		
ПЭГ 6000																							1,0	2,0
Вода для инъекций	До 100 г																							

Таблица 4.5 – Показатели качества экспериментальных образцов вагинального геля с коктейлем бактериофагов

показатель № образца	Описание	рН до стерилизации	рН после стерилизации	Пластическая вязкость, Па·с при 20°С до стерилизации	Пластическая вязкость, Па·с при 20°С после стерилизации	Коэффициент агрегативной устойчивости	
						После 48 ч при 20°С	После 7 сут. при 20°С
1	соотв.	6,7±0,1	6,5±0,1	0,625	0,628	0	0
2	соотв.	6,7±0,1	6,6±0,1	0,598	0,610	0	0
3	соотв.	6,4±0,1	5,5±0,1	0,785	0,268	0	0
4	соотв.	7,1±0,1	6,3±0,1	0,865	0,425	0	0,01
5	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	4,2	8,5
6	соотв.	6,5±0,1	6,3±0,1	0,725	0,700	0	0
7	соотв.	6,5±0,1	6,2±0,1	0,768	0,759	0	0
8	соотв.	6,4±0,1	6,2±0,1	0,789	0,795	0	0
9	соотв.	6,8±0,1	6,6±0,1	0,805	0,798	0	0,02
10	соотв.	6,8±0,1	6,8±0,1	0,812	0,810	0	0
11	соотв.	6,4±0,1	6,5±0,1	0,912	0,900	0	0
12	соотв.	6,8±0,1	6,8±0,1	0,932	0,928	0	0
13	соотв.	6,4 ±0,1	6,3±0,1	0,954	0,956	0	0
14	соотв.	6,8±0,1	6,4±0,1	1,052	1,068	2,5	4,3
15	соотв.	6,6±0,1	6,5±0,1	1,072	1,059	5,4	8,6
16	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	3,2	5,4
17	соотв.	6,7±0,1	6,5±0,1	0,868	0,128	0	0,2
18	соотв.	6,8±0,1	6,6±0,1	0,876	0,245	0	0,5
19	соотв.	6,7±0,1	6,6±0,1	0,898	0,315	0,1	0,6
20	не соотв.*	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	8,5	10,4
21	соотв.	6,7±0,1	6,8±0,1	0,925	0,920	0	0,01
22	соотв.	6,6±0,1	6,5±0,1	0,956	0,960	0	0,2
23	соотв.	6,8±0,1	6,8±0,1	1,025	1,029	0	0,2
24	соотв.	6,5 ±0,1	6,3±0,1	1,059	1,067	1,2	2,1

*Не соответствие описания, это наличие плохо расходящихся комков, неоднородный внешний вид образца гелей

Таблица 4.6 – Показатели качества экспериментальных образцов вагинального геля с коктейлем бактериофагов отобранных после первичного скрининга

показатель № состава	Наличие перехода золь-гель эффекта, +/-	Температура гелеобразования, °	Время гелеобразования, мин	Прочность геля, мин		Биоадгезия, силе отрыва, Н	Биоадгезия, скорость стекания, мм/мин	Осмотическая активность, %		Адсорбционная активность, мг
				35 г	50 г			1 ч	24 ч	
1	+	29 ± 1	8,0± 1,1	>5	4,5± 1,0	18,5± 1,6	89,5± 3,4	86,5± 2,0	205,6± 1,9	0,028±0,003
2	+	29± 1	8,2± 1,2	>5	4,6± 1,2	19,0± 1,9	91,5± 3,4	87,2± 2,1	210,1± 2,0	0,029±0,003
6	+	30± 1	6,5± 1,1	>5	5,8± 1,2	27,4± 1,8	35,2± 1,9	99,2± 2,3	252,4± 2,6	0,058±0,004
7	+	32± 1	8,5± 1,0	>5	5,5± 1,0	28,2± 1,9	23,8± 2,6	105,6± 1,9	249,1± 2,9	0,058±0,005
8	+	30± 1	6,7± 1,2	>5	5,0± 1,1	28,9± 2,0	25,6± 3,5	110,3± 1,5	309,0± 3,1	0,051±0,002
9	+	28± 1	6,5± 1,0	>5	6,1± 1,0	26,5± 2,1	28,2± 2,4	95,4± 1,7	251,2± 2,3	0,033±0,004
10	+	28± 1	6,7± 1,1	>5	6,2± 1,1	25,4± 1,5	31,4± 2,8	99,5± 2,3	246,4± 2,4	0,022±0,002
11	+	25± 1	7,0± 0,9	>5	5,9± 0,9	27,3± 1,9	30,2± 2,4	100,2± 1,9	312,4± 2,9	0,025±0,003
12	+	26± 1	6,4± 1,2	>5	5,8± 1,2	28,2± 1,5	35,6± 2,7	102,6± 1,6	328,5± 1,9	0,039±0,004
13	+	27± 1	6,8± 1,0	>5	6,8± 1,0	27,9± 1,8	39,4± 2,5	111,4± 2,1	355,4± 2,1	0,041±0,003
21	+	38± 1	7,2± 1,1	>5	7,1± 1,4	16,4± 1,3	135,2± 1,3	115,2± 1,5	368,5± 3,2	0,058±0,002
22	+	39± 1	7,2± 1,2	>5	6,2± 1,0	18,2± 1,4	140,4± 1,5	125,4± 2,0	374,1± 2,9	0,065±0,005
23	+	40± 1	7,5± 1,1	>5	6,5± 1,3	17,5± 1,5	518,2± 1,7	138,2± 2,2	378,2	0,058±0,003

Для данного образца изучили реологические характеристики: влияние хранения ЛФ на пластическую вязкость, динамическую вязкость и предел текучести, данные представлены в таблице 4.7.

Таблица 4.7 – Реологические характеристики экспериментального образца вагинального геля с коктейлем бактериофагов № 7

Показатель	Пластическая вязкость при 25°C, Па·с			Динамическая вязкость при скорости сдвига 300 с ⁻¹ , Па·с	Предел текучести, Па
	0 мес.	3 мес.	6 мес.		
Значение показателя	0,766	0,768	0,764	1,25 ± 0,05	152,5

Данный образец вагинального геля обладает стабильной вязкостью в процессе хранения, изученной в условиях ускоренных испытаний, достаточной прочностью и динамической вязкостью, находящейся в оптимуме для вагинальных гелей (при скорости сдвига 300 с⁻¹ – от 0,3 до 1,4 Па·с) [45]. Изучали зависимость динамической вязкости для образцов №1, 6-8, на основе полоксамера 407 20%, и пололоксамера 407 20% с добавлением ГЭЦ в концентрациях 1,0, 1,5 и 2,0%. Как видно из представленных на рисунке графиков, у всех образцов при температуре выше 20°C начинает расти вязкость и резко повышается при температуре около 30°C выходя на плато, демонстрируя термозависимый переход золь-гель. Максимальной вязкостью при 37°C обладают образцы № 7 и 8, однако существенной разницы между ними нет, что подтверждает правильность выбора для дальнейших исследований образца №7.

На рисунке 4.1 показана кривая вязкости образца вагинального геля №7 при различных температурах. Графически продемонстрировано, что вязкость при температуре ниже 20°C резко отличается от вязкости при температуре выше 30°C. Кроме того видно, что гель является высокотиксотропной системой и при приложении усилия, после его снятия значение вязкости быстро возвращается к первоначальным значениям (рисунок 4.2).

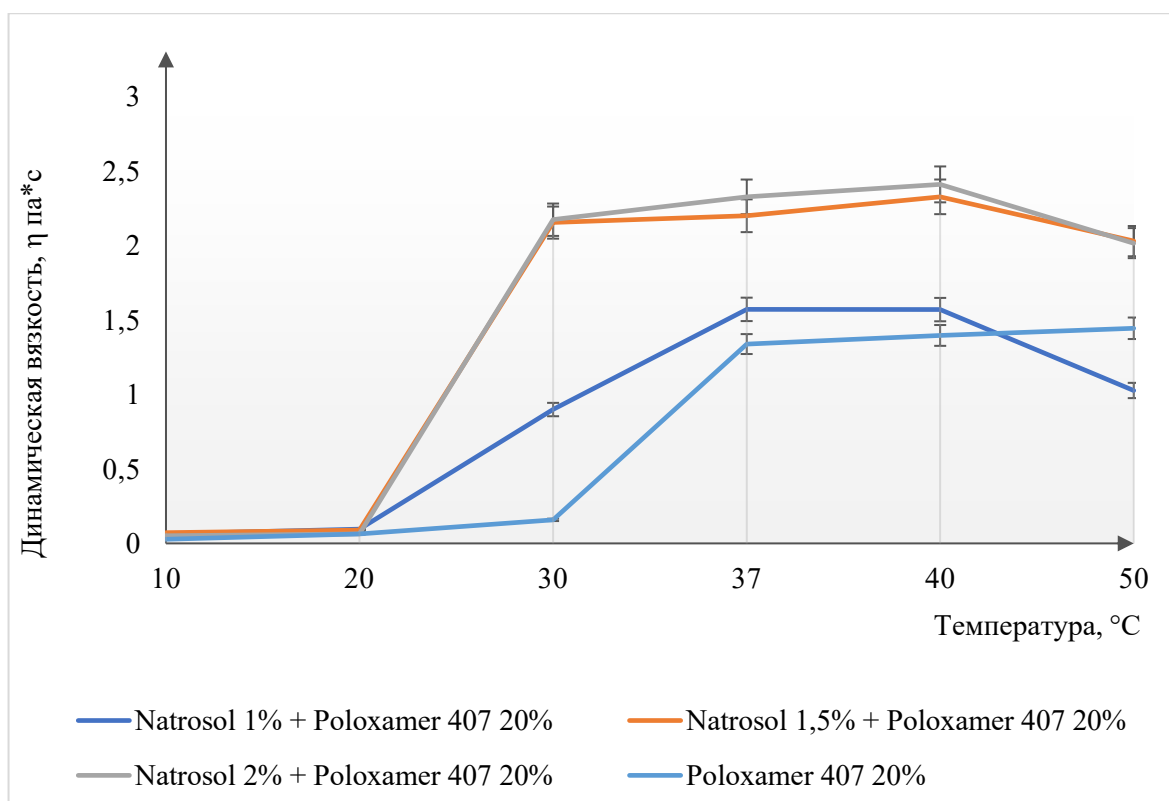


Рисунок 4.1 – Зависимость динамической вязкости от температуры для экспериментальных образцов вагинального геля с коктейлем бактериофагов № 1, 6-8

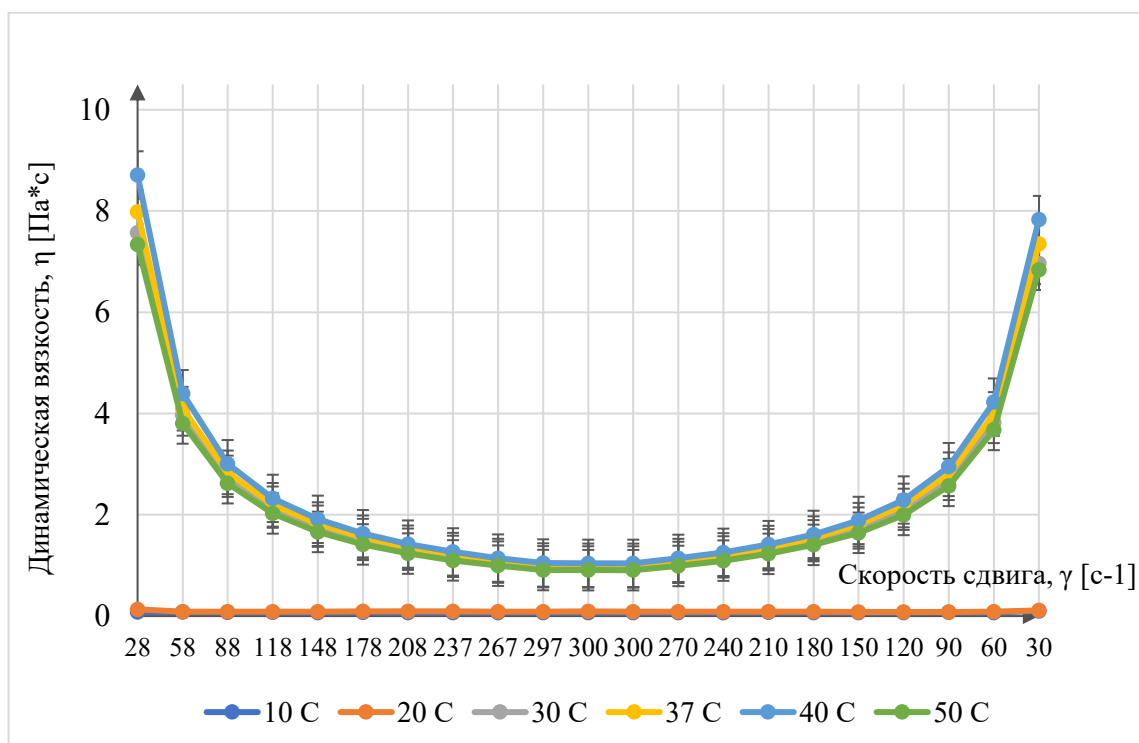


Рисунок 4.2 – Кривая вязкости экспериментального образца вагинального геля с коктейлем бактериофагов №7 при различных значениях температуры

На основе проведенных исследований разработан состав вагинального геля с коктейлем бактериофагов, указанный в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Состав вагинального геля с коктейлем бактериофагов

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

4.1.3. Технология получения вагинального геля с коктейлем бактериофагов

В соответствии с методологией фармацевтической разработки ГМЛФ после разработки состава ЛФ, необходимо параллельно разработать аналитические методики, использующиеся для анализа ЛС и технологию производства. Методики контроля качества готовой ЛФ приведены в Главе 2, спецификация на ЛФ в Приложении А.

Описание технологического процесса.

ВР 3. Подготовка тары. Тубы извлекались из транспортной упаковки и обрабатывались УФ перед наполнением в ламинарном боксе в течение 30 мин.

ВР 4. Подготовка сырья.

ВР 4.1. Подготовка субстанций бактериофагов. Субстанция бактериофагов (фаголизат) может быть получена в виде раствора или подвергнута лиофилизации. Предпочтительна технология использования жидкого фаголизата, так как при лиофилизации происходит потеря титра фага, по крайней мере, на один порядок почти для всех видов фагов. Жидкий фаголизат стерилен, температура хранения 2-8°, предварительная подготовка не требуется. ЛС отмеривают в рассчитанном

объеме в зависимости от исходного титра. Лиофилизат хранят при температуре не ниже минус 40°C и требуется разморозка при температуре 2-8°C в течение 12-24 часов.

ВР 4.2. Взвешивание ВВ. ВВ отвешивают в стерильные емкости на лабораторных электронных весах в ламинарном боксе «Ламинар-С» (Россия).

ТП 5. Получение буферного раствора.

ТП 5.1. Растворение компонентов буфера в ВДИ. Натрия хлорид растворяют при температуре 20-25°C в рассчитанном объеме воды для инъекций на верхнеприводной мешалке ИКА Eurostar 20 digital (Германия) при скорости 100-150 об/мин до полного растворения на протяжении 10-15 минут при визуальном контроле, температура комнатная, в ламинарном боксе.

ТП 5.2. Фильтрация буферного раствора. Фильтрация буферного раствора осуществляют через шприцевой фильтр или фильтровальную установку (в зависимости от объема серии) в ламинарном боксе, мембрана фильтра – полиэфирсульфон Merck (Millipore) (Германия), диаметр пор 0,3 мкм (так как основу затем подвергают термической стерилизации, то на данном этапе проводят предфильтрацию от механических включений, материал фильтра подбирали экспериментально, на основе отсутствия сорбции ЛВ на мембране фильтра).

ТП 6. Получение гелевой основы.

ТП 6.1. Растворение ВВ в буферном растворе. Полоксамер 407 растворяют в буферном растворе при температуре 60-65°C до полного растворения на верхнеприводной мешалке ИКА Eurostar 20 digital (Германия) при скорости 100-150 об/мин на протяжении 10-15 минут, затем раствор охлаждают до температуры 20-25°C и вводят, не выключая мешалку, в получившуюся воронку Natrosol® 250 G PHARM, перемешивая в течение 20-30 мин при скорости 75-100 об/мин и том же температурном режиме.

ТП 6.2. Стерилизация гелевой основы. Основу переливают в стеклянные флаконы укупоривают резиновой крышкой вручную и вальцуют алюминиевым колпачком с помощью ручной машины для вальцовки флаконов (Россия). Затем стерилизуют при температуре 120-125°C и давлении 120-125 кПа в течение 27-32

минут в лабораторном стерилизаторе Thermo Scientific (Thermo Fisher, США), время стерилизации подбирали эмпирически, основываясь на режимы работы автоклава и ОФС 1.1.0016.18 «Стерилизация».

ТП 7. Введение стерильного коктейля бактериофагов в основу. Фаголизаты, как субстанции, представляют собой стерильные растворы (метод стерилизации-стерилизующая фильтрация). В остывшую до температуры не выше 37 °С основу вводят раствор фаголизата в ламинарном боксе, перемешивают на магнитной мешалке ИКА С-MAG HS 7 Package со скоростью 100-150 об/мин в течение 15-30 минут в зависимости от объема серии.

ТП 8. Наполнение туб. Алюминиевые тубы с мембраной и пластиковыми колпачками производства Россия, объемом 30 мл, заполняют гелем на ручном дозаторе кремов и мазей Smartcream, производства FARMALABOR, с контролем массы по 30 г в ламинарном боксе. Затем тубы закрывают ручным станком для укупорки (закрытия) тюбиков Flash Z-01 (Россия).

УМО.9. Укупорка, маркировка, вторичная упаковка.

УМО 9.2. Маркировка. На этикетке на русском языке указывают название ЛП, ЛФ, количество геля в граммах, концентрацию, номер серии, срок годности. Этикетки наклеивают вручную. Визуально проверяют внешний вид туб. Некондиционные тубы собираются в отдельную емкость и отправляются на уничтожение, как производственные отходы.

УМО 9.3. Упаковка в пачки. Тубы вручную помещают в коробки картонные, на которые вручную наклеивают этикетки.

Контрольные точки производства лабораторных серий вагинального геля с коктейлем бактериофагов приведены в таблице 4.9.

Для производства лабораторных серий использовали алюминиевые тубы объемом 30 мл. Для промышленного производства возможно использовать два типа упаковки: многодозовую со специальными насадками или однодозовую (рисунок 4.3).



А



Б



Рисунок 4.3 – Упаковка для вагинального геля:
А – многодозовая; Б -одноразовая

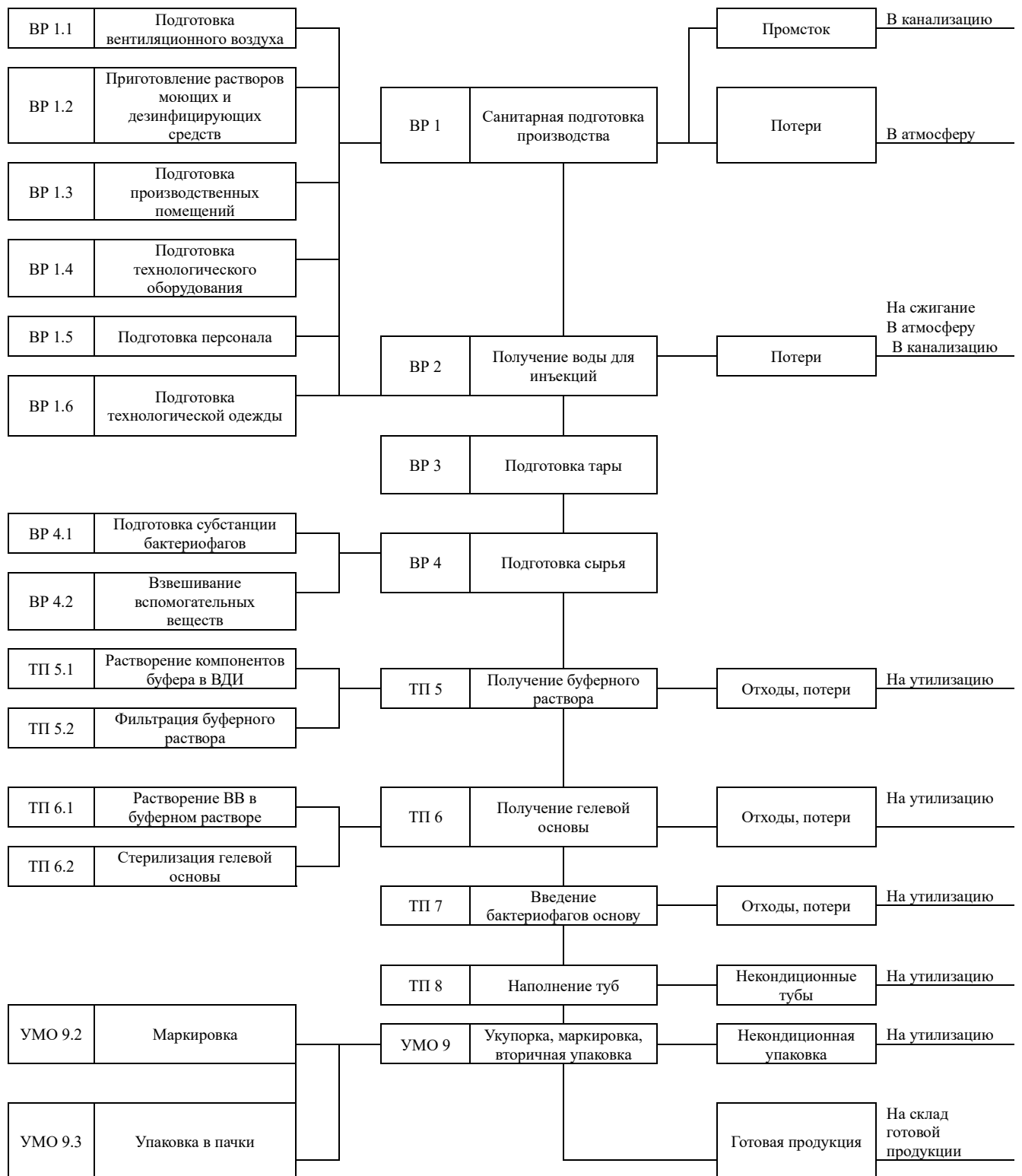


Рисунок 4.4 – Технологическая схема получения вагинального геля с коктейлем бактериофагов

Таблица 4.9 – Контрольные точки при производстве лабораторных серий вагинального геля с коктейлем бактериофагов

	Промежуточный/ готовый продукт	Наименование показателя	Норма
ВР 3. Подготовка тары	Алюминиевые тубы	Внешний вид, целостность	Визуально оценивают отсутствие повреждений упаковки
ВР 4 Подготовка сырья			
ВР 4.1. Подготовка субстанции бактериофагов	Субстанция бактериофагов/ если использовали лиофилизат	Температура размораживания Время разморозки	2-8°C 12-24 ч
ВР 4.2. Взвешивание ВВ	ГЭЦ , Полоксамер 407	Масса	Контроль массы на соответствие расчетам
ТП 5. Получение буферного раствора			
ТП 5.1. Растворение компонентов буфера в ВДИ	Буферный раствор не отфильтрованный	Время растворения Скорость вращения мешалки	10-15 мин 100-150 об/мин
ТП 5.2. Фильтрация буферного раствора	Отфильтрованный буферный раствор	рН	6,0-7,0
ТП 6.Получение гелевой основы			
ТП 6.1.Растворение ВВ в буферном растворе	Гелевая основа	Внешний вид Время растворения Скорость вращения мешалки Температура	Визуально оценивается отсутствие неоднородности и включений 35-60 мин 100-150 об/мин 60-65 °C при растворении полоксамера при введении остальных ВВ 20-30°C
ТП 6.2. Стерилизация гелевой основы	Стерильная гелевая основа	рН Температура Время Давление	6,0-7,0 120-125°C 27-32 мин 120-125 мПа

Продолжение Таблицы 4.9

	Промежуточный/ готовый продукт	Наименование показателя	Норма
ТП 7. Введение бактериофагов в основу	Гель бактериофагов не расфасованный	Температура Внешний вид	Не выше 37 °С Визуально оценивается отсутствие неоднородности и включений
ТП 8. Наполнение туб	Гель с бактериофагами расфасованный	Внешний вид Герметичность	Оценка отсутствия повреждений В соотв. ГФ РФ
УМО.9. Укупорка, маркировка, вторичная упаковка			
УМО 9.2. Маркировка	Тубы наполненные маркированные	Внешний вид	Оценка отсутствия повреждений и наличия маркировки
УМО 9.3. Упаковка в пачки	Тубы в картонных пачках	Внешний вид	Оценка отсутствия повреждений и наличия маркировки

Для обоснования возможности масштабирования разработанной технологии получения вагинального геля бактериофагов проводили анализ рисков параметров технологического процесса в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической N 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Для градации риска использовали общепринятый относительный уровень оценки риска, описанные в таблице 4.10.

Таблица 4.10 – Уровни градации риска

Низкий	Приемлемый риск в широком смысле. Дальнейшего исследования не требуется
Средний	Риск является приемлемым. Может потребоваться дальнейшее исследование для снижения риска.
Высокий	Риск неприемлем. Для снижения риска необходимы дальнейшие исследования.

В таблице 4.11 приведена оценка уровня риска технологического процесса. Взвешивание ВВ и ЛВ не влияет на критические показатели качества. От стадии получения буферного раствора зависит рН. Например, если процесс растворения ВВ не завершен, и раствор передали на фильтрование, то данный параметр может выйти за пределы проектного поля, для снижения данного риска рекомендуется при внутрипроизводственном контроле определять рН буферного раствора. Кроме того,

с компонентами буфера можно привнести бактериальные агенты, что влияет на показатель бактериальные эндотоксины, чтобы снизить этот риск, буферный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,3 мкм. Растворение ВВ в буферном растворе влияет на показатели описание и рН, так как от равномерности распределения компонентов зависит однородность геля и его свойства, для снижения риска на внутрипроизводственном контроле определяют внешний вид основы и рН после стерилизации. Стерилизация гелевой основы влияет как на рН, который, как выше сказано, необходимо контролировать у полупродукта, так и на показатели стерильности и бактериальные эндотоксины. Для снижения данного риска необходимо проводить валидацию технологического процесса. Введение бактериофагов в основу способно влиять почти на все критические показатели, риски возможно снизить только после валидации технологического процесса, также как и риски связанные с упаковкой ЛФ в тубы.

Масштабирование технологии предполагается либо во внутрибольничную аптеку или на промышленное производство. В первом случае требуются асептические условия и стандартное оборудование, которое использовалось при лабораторной отработке процесса, во втором случае производство должно быть в классах чистоты С, В и А. Кроме обеспечения класса чистоты помещений для производства ЛФ требуется стандартное технологическое оборудование: реакторы, фильтрующая установка, тубонаполняющая машина, оборудование для упаковки в пачки. Поэтому риски масштабирования технологии оцениваются как низкие и средние. Таким образом разработанная технология может быть перенесена из лаборатории в производственную аптеку или крупномасштабное производство.

Таблица 4.11 – Оценка уровня риска технологического процесса

Этап процесса	Критический параметр качества (Critical Quality Attribute)					
	Идентификация	pH	Специфическая активность	Стерильность	Бактериальные эндотоксины	Герметичность
Взвешивание	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий
Получение буферного раствора	Низкий	Средний	Низкий	Низкий	Средний	Низкий
Растворение ВВ в буферном растворе	Низкий	Средний	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий
Стерилизация гелевой основы	Низкий	Средний	Низкий	Средний	Средний	Низкий
Ведение бактериофагов в основу	Средний	Средний	Средний	Средний	Средний	Низкий
Наполнение туб	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Средний

4.1.4. Изучение стабильности и определение срока годности вагинального геля с коктейлем бактериофагов

Изучение стабильности ЛФ осуществляли на трех последовательных сериях вагинальных гелей с двумя различными штаммовыми составами для того, чтобы продемонстрировать универсальность разработанной ЛФ. Первый коктейль представлен 4 фагами против стафилококка: Sa30, CH11, SCH1, SCH111; второй против кишечной палочки, как распространённого патогена мочеполовой системы штаммами: ECD7, V18, Ec13-52.

Программа изучения стабильности включала: долгосрочные исследования при хранении ЛФ при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ (температура хранения $2-8^\circ\text{C}$, в

исследовании продемонстрировали хранение при одной температуре, как среднее значение для сокращения объема, так как разницы в значениях параметров между 2 и 8°C не наблюдалось) и относительной влажности 60% в течение 2 лет, ускоренные исследования при температуре 25°C и относительной влажности 60 % в течение 6 месяцев. Исследования на влияние стресс факторов не демонстрировали в рамках данной работы. Влияние температуры в диапазоне от -20 до 65 °C, замораживания, pH и др. изучается для каждого депонированного бактериофага, но в общую программу исследований обязательно включаются стресс-исследования как АФС так и готовой ЛФ. Обязательно изучение влияния УФ, температуры, pH и процессов размораживания-замораживания в соответствии с требованиями решений Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10 мая 2018 г. N 69 "Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций" и от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза".

Результаты изучения стабильности вагинальных гелей представлены в таблицах 1-4 Приложение Б, по ним можно судить что разработанные ЛФ с тремя вариантами коктейлей бактериофагов стабильны в течение 24 месяцев. Таким образом срок годности препаратов составляет 2 года. ЛФ получали стерильной, однако, используемая упаковка является многодозовой, для промышленного производства возможен переход на однодозовую упаковку, поэтому в состав не вводили консерванты. Проводили изучение стабильности ЛФ после вскрытия упаковки в течение 1 недели в условиях хранения $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ на двух сериях препарата в соответствии с требованиями Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10.05.2018 N 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций» (Таблица 5 Приложение Б).

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

Объектами исследования являются бактериофаги *Escherichia* phage ECD7, V18, Ec13-52, Ec732, *Salmonella* phage FG1m, FM4b, SE40, ST11. Данные фага, выбраны на основании широкого спектра литического действия и активности в отношении устойчивых к антибиотикам патогенов. У бактериофагов охарактеризованы фенотипические свойства, терапевтические, молекулярно-генетические, они являются производственно-перспективными [16, 32].

4.2.1. Определение профиля качества перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

В рамках предварительных исследований были изучены физико-химические свойства штаммов бактериофагов, а именно влияние температуры и pH на стабильность субстанций бактериофагов. Данные приведены в таблице 4.12, из которых видно что все данные штаммы стабильны в диапазоне pH от 6-8, и при температуре от -20°C до 37°C в течение 30 суток и при температуре до 8°C в течение 24 месяцев.

Первым этапом фармацевтической разработки ЛФ является определение целевого профиля качества ЛП в виде перорального геля с коктейлем бактериофагов, представленного в таблице 4.13. Целевой профиль качества и критические параметры качества определяли в соответствии с ГФ РФ, критические показатели вошли в спецификацию на разработанную ЛФ (Приложение А). Однако, в дополнительно в процессе разработки контролировались показатели, описанные в профиле качества МГЛФ для приема внутрь, а именно: вязкость, стабильность реологических показателей, высвобождение ЛВ из ЛФ, консистенцию, вкус и запах.

+ сохранений титра бактериофага
- падение титра бактериофага более чем на один порядок

Таблица 4.13 – Целевой профиль качества перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

Элемент целевого профиля качества ЛП		Цель	Обоснование
Лекарственная форма		Пероральный гель	Удобная для применения ЛФ с потребительской точки зрения, обеспечивающая однородность доставляемых доз, точность попадания и распределения ЛФ по слизистой оболочке влагалища
Путь введения		Перорально	Сооотв. ГФ РФ
Дозировка		Не менее 10^7 в 1 г ЛП для каждого штамма	Для обеспечения фармакологического эффекта.
Объем упаковки		30 г для лабораторной разработки	Алюминиевые тубы
Фармакокинетика		Препарат системного действия	Будет изучаться на экспериментальных животных для подтверждения наличия системного действия
Стабильность		2 года. При температуре 2-8°C.	Минимальный по ЕАЭС срок годности для первой регистрации препарата.
Качественные параметры ЛП	Описание	Необходимо для терапевтической эффективности и для безопасности	Требование ГФ РФ
	Идентификация		
	pH		
	Специфическая активность		
	Стерильность		
	Аномальная токсичность		
	Бактериальные эндотоксины		
	Масса содержимого упаковки		
	Герметичность упаковки		
Упаковка		Материал упаковки должен обеспечить соответствующее качество ЛП и не оказывать отрицательного воздействия на ЛФ, обеспечить удобство в применении	Выбор разработчика и соответствие потребительским характеристикам. Необходимо для клинической эффективности, безопасности. Обеспечение стабильности ЛП на протяжении заявленного срока годности
Способ применения		Согласно инструкции по применению	Необходимо для клинической эффективности и безопасности

Таблица 4.14 – Критические параметры качества перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

Параметр качества лекарственного препарата	Цель	Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
Описание	Вид ЛФ должен удовлетворять потребительским характеристикам	Нет	Физические свойства содержимого напрямую не связаны с безопасностью и эффективностью препарата. Следовательно, внешний вид не является критическим параметром.
Идентификация	Препарат должен специфически лизировать бактерии <i>Escherichia coli</i> и/или <i>Salmonella typhimurium</i> и/или <i>Salmonella enteriditis</i> (в зависимости от фагового состава коктейля)	Да	Идентификация оказывает большое влияние на безопасность и эффективность лекарственного препарата, но этот критический параметр качества (CQA) должен эффективно контролироваться системой управления качеством. Различие составов и переменные процесса производства не влияют на подлинность. Следовательно, этот параметр не будет обсуждаться во время разработки состава и технологии производства.
pH	6,0 – 7,0	Да	Обеспечивает стабильность АФС
Специфическая активность	ЛП должен лизировать бактерии <i>Escherichia coli</i> и/или <i>Salmonella typhimurium</i> и/или <i>Salmonella enteriditis</i> в разведении не менее 10^7 в 3 г	Да	Содержание действующего вещества будет влиять на безопасность и терапевтическую эффективность препарата. Переменные процесса активно влияют на количественное содержание действующего вещества. Следовательно, данный параметр должен оцениваться в процессе разработки состава и технологии производства.

Продолжение Таблицы 4.14

Параметр качества лекарственного препарата	Цель	Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
Стерильность	Должен быть стерилен	Да	Пероральные ЛФ не обязательно должны быть стерильными, так же как препараты бактериофагов могут характеризоваться МБЧ, однако в связи со спецификой возможного применения ЛФ у беременных женщин перед родами, ЛФ разрабатывают стерильной. Этот показатель достаточно контролировать у готовой ЛФ
Аномальная токсичность	Должен быть не токсичным	Нет	Требование ГФ РФ. АФС не токсичны, поэтому параметр не критический
Бактериальные эндотоксины	Не более 100 ЕЭ/доза	Да	Требование ГФ РФ. Параметр обязательно контролируется у АФС, производство ЛФ и различие в составах и технологии может оказать влияние на содержание эндотоксинов
Масса содержимого упаковки	Не менее 28,5 г	Нет	Масса не связана с безопасностью и эффективностью препарата. Следовательно, этот параметр не является критическим
Герметичность упаковки	Должна быть герметична	Да	При отсутствии герметичности может произойти обсеменение посторонней микрофлорой и будет нарушена стерильность, что скажется на качестве и безопасности препарата

Определение критических параметров качества ЛП крайне важно для последующей разработки. Критические параметры качества перорального геля с коктейлем бактериофагов и их обоснование представлены в таблице 4.14

4.2.2. Разработка состава и технологии перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

Следующим этапом разработки состава является изучение совместимости ЛВ и ВВ, для этого получали растворы эксципиентов в концентрации, которая планируется для включения в ЛФ, затем туда вводили фаголизат коктейля бактериофагов. Результаты представлены в таблице 4.15, ЛВ стабильны в присутствии всех выбранных ВВ. В качестве стабилизатора также как для вагинального геля использовали изотонический раствор натрия хлорида. На основе выбранных ВВ получали экспериментальные образцы перорального геля с коктейлем бактериофагов (таблица 4.16). Полиолы в составе ЛФ выступают как в роли подсластителей, так и компонентов основы, которые значимо влияют на реологические характеристики ЛФ. Затем проводили первичный скрининг экспериментальных образцов по следующим показателям качества: описание, рН до и после стерилизации, пластическая вязкость до после стерилизации, коэффициенту агрегативной устойчивости (таблица 4.17). Составы с номерами 2, 4, 6, 8, 14-16, 18, 20, 22, 24, 26, 29, 32 не соответствовали описанию, то есть образовывались неоднородные по внешнему виду системы, с комками. У составов № 13 и 17 падало значение рН ниже нормы, то есть менее 6,0. У составов 19, 21 и 23 значение вязкости после стерилизации падало ниже изначального более чем в два раза. На этом основании перечисленные составы их дальнейших исследований были исключены.

Таблица 4.15 – Изучение совместимости гелеобразователей и бактериофагов

Время Состав растворов ВВ		Титр бактериофагов, БОЕ/мл*				
		1 сутки	7 суток	1 месяц	2 месяца	3 месяца
Смесь МЦ и NaKMIЦ NEOCEL®-C11, 8%	FG1m	$3,2 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$7,8 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$
	FM4b	$5,6 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$	$5,9 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^8$
	SE40	$7,4 \cdot 10^8$	$5,8 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^8$
	ST11	$3,2 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$	$5,7 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$
	ECD7	$2,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$
	V18	$8,0 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$
	Ec13-52	$5,1 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$
	Ec732	$6,4 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$
Benecel K100M, 5%	FG1m	$5,4 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$
	FM4b	$5,9 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$
	SE40	$3,2 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$	$5,2 \cdot 10^8$
	ST11	$5,1 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^9$	$5,1 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^9$
	ECD7	$8,6 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$
	V18	$8,3 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	Ec13-52	$1,5 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$
	Ec732	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$
Blanose™ CMC, 7%	FG1m	$5,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$
	FM4b	$3,6 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$
	SE40	$1,9 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$8,9 \cdot 10^7$	$8,4 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^7$
	ST11	$3,9 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$
	ECD7	$5,9 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$
	V18	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	Ec13-52	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$
	Ec732	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$
Маннитол, 5%	FG1m	$6,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^7$
	FM4b	$2,7 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	SE40	$2,5 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	ST11	$4,8 \cdot 10^7$	$3,8 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$
	ECD7	$8,5 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^7$	$6,1 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$
	V18	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	Ec13-52	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$
	Ec732	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$
Сорбитол 35%	FG1m	$1,0 \cdot 10^8$	$8,2 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$
	FM4b	$4,4 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$
	SE40	$1,7 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	ST11	$7,1 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$
	ECD7	$6,2 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$
	V18	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	Ec13-52	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$
	Ec732	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$
Ксилитол, 20%	FG1m	$2,0 \cdot 10^8$	$7,0 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^7$
	FM4b	$3,9 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$
	SE40	$1,1 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^7$
	ST11	$1,0 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^7$	$8,1 \cdot 10^4$
	ECD7	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$
	V18	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	Ec13-52	$5,8 \cdot 10^8$	$5,8 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$
	Ec732	$7,4 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$

*В таблице приведены средние значения титра бактериофагов трех измерений, RSD не превышало 10%, что для биологического метода исследования соответствует требованиям

Таблица 4.16 – Составы экспериментальных образцов перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

Компонент	Составы																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
Фаголизат коктейля	10 ⁹ -10 ¹¹ БОЕ																																				
Натрия хлорид, г	0,9																																				
Смесь МЦ и NaKMЦ NEOCEL®- C11, г	5	5	8	8	5	5	8	8	5	5	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ГМПЦ Benecel K100M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	4	4	2	2	4	4	2	2	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaKMЦ Blanose™ СМС, г	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	5	5	3	3	5	5	3	3	5	5	
Сорбитол, г	15	30	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	15	30	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	15	30	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ксилитол, г	-	-	-	-	15	30	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	15	30	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	15	30	10	20	-	-	-	-	
Маннитол, г	-	-	-	-	-	-	-	-	10	15	5	10	-	-	-	-	-	-	-	-	10	15	5	10	-	-	-	-	-	-	-	-	10	15	5	10	
Вода для инъекций	До 100 г																																				

Таблица 4.17 – Показатели качества перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

показатель № образца	Описание	рН до стерилизации	рН после стерилизации	Пластическая вязкость, Па·с при 20°С до стерилизации	Пластическая вязкость, Па·с при 20°С после стерилизации	Коэффициент агрегативной устойчивости	
						После хранения 48 часов при 25°С	После хранения 7 суток при 25°С
1	соотв.	6,5±0,1	6,4±0,1	0,925	0,728	0,01	0,1
2	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	0,6	2,3
3	соотв.	6,4±0,1	6,2±0,1	0,985	0,868	0	0
4	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	2,5	7,1
5	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	3,2	5,8
6	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	2,4	6,5
7	соотв.	6,5±0,1	6,2±0,1	0,898	0,759	0,01	0,05
8	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	2,3	104
9	соотв.	6,5±0,1	6,4±0,1	0,825	0,698	0	0,02
10	соотв.	6,6±0,1	6,4±0,1	0,802	0,710	0	0
11	соотв.	6,6±0,1	6,5±0,1	0,912	0,802	0,2	0,4
12	соотв.	6,5±0,1	6,2±0,1	0,932	0,908	0	0,2
13	соотв.	6,6 ±0,1	5,3±0,1	1,235	1,025	0,05	0,3
14	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	2,3	5,2
15	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	3,1	8,6
16	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	2,7	6,4
17	соотв.	6,6±0,1	4,5±0,1	1,325	1,069	0,8	4,2
18	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	2,3	4,8
19	соотв.	6,7±0,1	6,2±0,1	1,285	0,312	2,7	5,6
20	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	3,4	8,6
21	соотв.	6,7±0,1	6,2±0,1	1,101	0,216	0,05	0,4
22	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	8,6	12,6
23	соотв.	6,7±0,1	6,3±0,1	1,125	0,129	0,6	1,2

Продолжение Таблицы 4.17

показатель № образца	Описание	рН до стерилизации	рН после стерилизации	Пластическая вязкость, Па·с при 20°С до стерилизации	Пластическая вязкость, Па·с при 20°С после стерилизации	Коэффициент агрегативной устойчивости	
						После хранения 48 часов при 25°С	После хранения 7 суток при 25°С
23	соотв.	6,7±0,1	6,3±0,1	1,125	0,129	0,6	1,2
24	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	1,2	5,4
25	соотв.	6,6±0,1	6,5±0,1	1,286	1,256	0	0
26	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	8,9	15,7
27	соотв.	6,6±0,1	6,4±0,1	1,385	1,165	0	0
28	соотв.	6,6±0,1	6,3±0,1	1,425	1,236	0	0,2
29	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	9,4	17,2
30	соотв.	6,5±0,1	6,4±0,1	1,258	1,089	0	0,7
31	соотв.	6,5±0,1	6,4±0,1	1,312	1,125	0	0,3
32	не соотв. *	не определяли	не определяли	не определяли	не определяли	6,5	18,4
33	соотв.	6,7±0,1	6,5±0,1	0,987	0,812	0,9	2,5
34	соотв.	6,6±0,1	6,4±0,1	1,028	0,869	0,4	3,1
35	соотв.	6,7±0,1	6,5±0,1	1,106	0,935	0,8	2,4
36	соотв.	6,6±0,1	6,4±0,1	1,125	1,002	0,6	3,5

*Не соответствие описания, это наличие плохо расходящихся комков, неоднородный внешний вид образца гелей

У отобранных образцов изучали вкусовые характеристики. Помимо вкуса решено было изучить также консистенцию гелей. Вкус и консистенция играют решающую роль при определении потребительских и маркетинговых характеристик препарата. Необходимо, что бы пациенты соблюдали предписание врача в полной мере. Неприятный вкус и консистенция (например, слишком «тягучая», похожая на клей, неприятное послевкусие) могут вызывать отторжение у пациентов и отказ от лечения.

Таблица 4.18 – Изучение вкуса экспериментальных составов перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

<i>№ состава</i>	<i>Консистенция</i>	<i>Сладость</i>	<i>Наличие послевкусия</i>	<i>Характер послевкусия</i>	<i>Вкус в целом</i>
3	2,2	4,2	3,3	2,3	3,5
5	2,4	4,3	3,2	3,2	3,4
7	2,0	4,4	3,4	2,8	3,2
9	1,2	4,5	3,1	2,5	3,4
10	1,4	3,9	3,3	2,6	3,3
11	1,0	3,8	3,1	1,9	3,0
12	4,5	4,5	1,0	4,9	4,5
25	4,6	4,9	1,0	5,0	4,6
27	4,8	4,8	1,0	5,0	5,0
28	4,9	4,9	1,0	5,0	5,0
30	4,8	4,7	2,1	4,5	4,3
31	4,6	4,7	2,2	4,5	4,4
33	4,1	4,5	1,1	4,9	4,6
34	4,2	4,3	1,0	5,0	4,5
35	4,0	4,3	1,2	4,8	4,3
36	4,1	4,2	1,2	4,8	4,2

Как видно из результатов, представленных в таблице 4.18, образцы на основе NEOCEL®-C11 имели не очень приятную консистенцию, и добровольцы не высоко оценили вкус образцов (3,0-3,4). Среди образцов на основе NaКМЦ лучшими вкусовыми свойствами обладали образцы с сорбитолом № 27 и 28, причем существенных отличий во вкусовых и консистентных характеристиках между ними нет. Дальнейшие исследования решено было проводить с ними.

Одним из важнейших параметров качества МЛФ является стабильность реологических характеристик в процессе хранения, поэтому её изучали для выбранных образцов и образца аналогичного состава, но с содержанием сорбитола 15% (таблица 4.19).

Таблица 4.19 – Реологические характеристики экспериментальных образцов перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций № 27, 28, 27"

Показатель Значение показателя	Пластическая вязкость при 25°C, Па·с			Динамическая вязкость при скорости сдвига 300 с ⁻¹ , Па·с	Предел текучести, Па
	0 мес.	3 мес.	6 мес.		
27	1,381	1,285	0,902	2,35 ± 0,05	179,5
27"	1,397	1,390	1,385	2,78 ± 0,06	185,2
28	1,420	1,380	1,325	2,89 ± 0,05	191,5

У образца геля №27 с содержанием сорбитола 10% в процессе хранения падала вязкость более чем на 30%, у образцов с содержанием сорбитола 15% и 20%, она была стабильна. Для дальнейших исследований выбрали образец с меньшим содержанием сорбитола, так как показатели качества образцов близки.

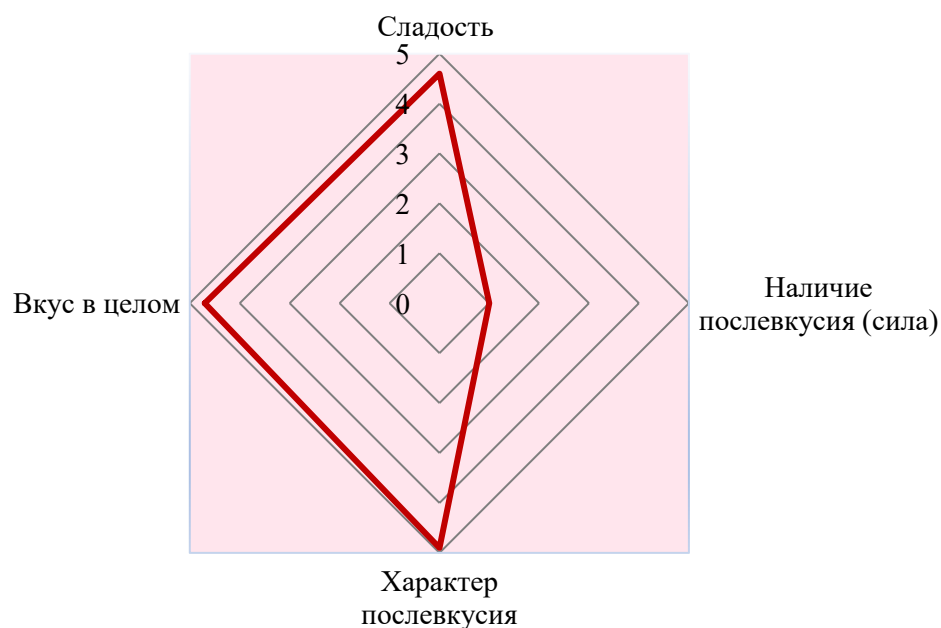


Рисунок 4.5 – Оценка вкуса образца перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций №27"

Для образца №27" (содержание сорбитола 15%) определяли вкусовые характеристики, которые представлены на рисунке 4.5. Образец обладает приятным сладким вкусом без послевкуся.

Для данного образца получали кривые вязкости и течения (рисунок 4.6), по которым можно оценить степень тиксотропии геля (высокая), так как нисходящая и восходящая части кривой течения практически совпадают и гели после приложении силы (увеличения скорости сдвига) возвращается к первоначальным значениям вязкости. Гель не будет растекаться, имеет вязкую консистенцию.

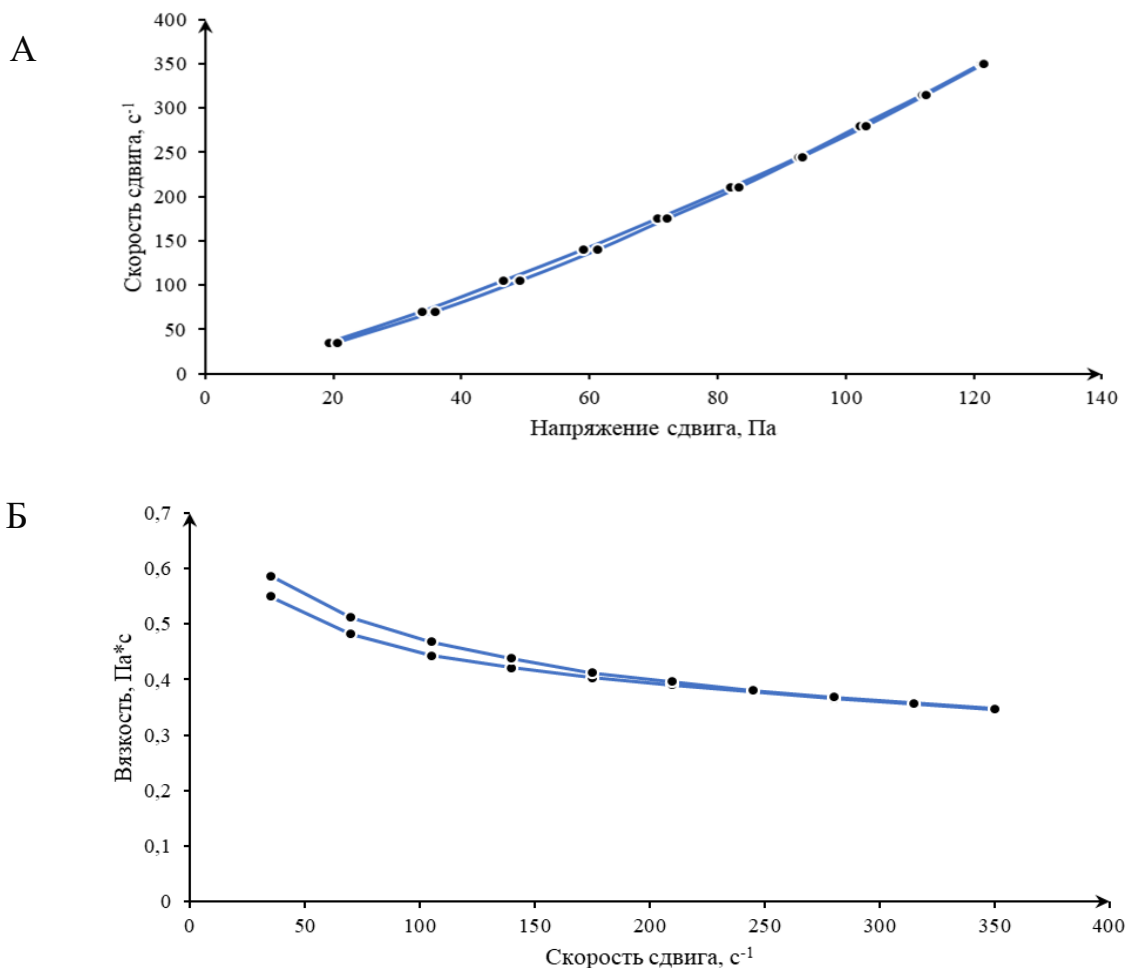


Рисунок 4.6 – Кривая вязкости (А) и кривая течения (Б) перорального геля с коктейлем бактериофагов

Для полученного образца перорального геля с бактериофагами изучали кинетику растворения на приборе «Качающаяся корзинка» в двух средах: буферном

ацетатном растворе pH 4,5 и фосфатном буферном растворе pH 6,8 (рисунок 4.7). Несмотря на то, что изучение растворения для пероральных гелей необязательно, представляло интерес поведение геля в условиях, имитирующих желудочно-кишечную среду. Кроме того, гель достаточно вязкий и его возможно было отмерить в корзинку прибора. Бактериофаги не стойки в кислой среде желудка, в растворе хлористоводородной кислоты теряют активность достаточно быстро, поэтому при терапии рекомендуется за 15-30 минут до приема применять антацид, например Алмагель А или аналогичный. На Российском фармацевтическом рынке зарегистрированы кишечнорастворимые таблетки с бактериофагами производства НПО «Микроген», но они не нашли широкого применения и сейчас не выпускаются. Разработка таблеток переменного штаммового состава или для персонализированной терапии нерациональна. В состав таблеток включают лиофизизат бактериофагов, при получении которого теряется титр ЛВ, и в процессе производства из-за воздействия давления и температуры также происходит потеря титра, поэтому получение таблеток с титром 10^7 - 10^9 затруднительно.

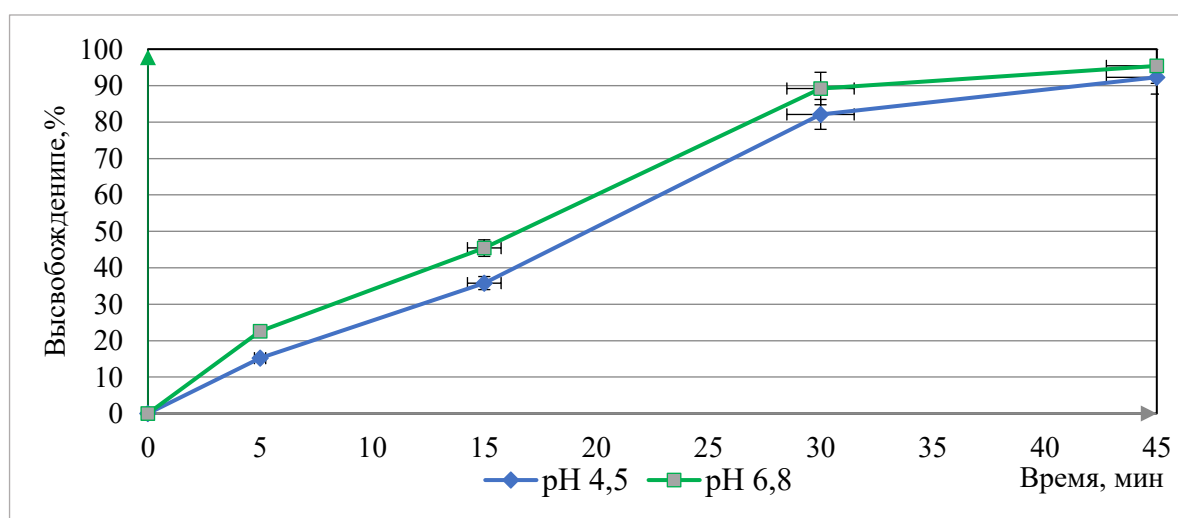


Рисунок 4.7 – Кинетика высвобождения бактериофагов из перорального геля в средах растворения

В буферных растворах pH 4,5 и pH 6,8 высвобождение ЛВ происходит по схожей динамике, и через 30 минут превышает 80%. Процент высвобождения

считали как среднее значение титров четырех фагов FG1m, FM4b, SE40, ST11, включенных в состав образца геля.

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

Таблица 4.20 – Составы перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

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

4.2.3. Технология получения перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

В соответствии с методологией фармацевтической разработки ГМЛФ после разработки состава ЛФ проводилась разработка аналитических методик, использующиеся для анализа ЛС и технологии производства. Методики контроля качества готовой ЛФ приведены в Главе 2, спецификация на ЛФ в Приложении А.

Описание технологического процесса

ВР 3. Подготовка тары. Тубы извлекались из транспортной упаковки и обрабатывались УФ перед наполнением в ламинарном боксе в течение 30 мин.

ВР 4. Подготовка сырья.

ВР 4.1. Подготовка субстанций бактериофагов. Субстанция бактериофагов (фаголизат) может быть получена в виде раствора или подвергнута лиофилизации. Предпочтительна технология использования жидкого фаголизата, так как при лиофилизации происходит потеря титра фага по крайней мере на один порядок почти для всех видов фагов. Жидкий фаголизат не требует особой подготовки (температура хранения 2-8°C), только отмеривание. Лيوфилизат хранят при температуре не ниже минус 40°C и требуется разморозка при температуре 2-8°C в течение 12-24 часов.

ВР 4.2. Взвешивание ВВ. ВВ отвешивают в стерильные емкости на лабораторных электронных весах в ламинарном боксе «Ламинар-С» (Россия).

ТП 5. Получение буферного раствора.

ТП 5.1. Растворение компонентов буфера в воде для инъекций (далее – ВДИ). Растворение натрия хлорида проводят в подходящей емкости при температуре 20-25°C в рассчитанном объеме воды для инъекций на верхнеприводной мешалке ИКА Eurostar 20 digital (Германия) при скорости вращения 100-150 об/мин до полного растворения в течение 10-15 минут, процесс контролируется визуально.

ТП 5.2. Фильтрация буферного раствора. Фильтрация буферного раствора осуществляют через шприцевой фильтр или фильтровальную установку

(в зависимости от объема серии) с мембраной из полиэфирсульфона Merck (Millipore) (Германия) диаметром пор 0,3 мкм в ламинарном боксе, выбор диаметра фильтра осуществляли по аналогично разработанному вагинальному гелю с бактериофагами.

ТП 6. Получение гелевой основы.

ТП 6.1. Растворение ВВ в буферном растворе. Сорбитол растворяют в буферном растворе при температуре 20-25°C, перемешивают до полного растворения на верхнеприводной мешалки ИКА Eurostar 20 digital (Германия) при скорости 100-150 об/мин в течение 10-15 минут, затем, не выключая мешалку, в получившуюся воронку вводят Blanose™ СМС, продолжают перемешивание еще на протяжении 20-30 мин при скорости 75-100 об/мин без изменения температурного режима.

ТП 6.2. Стерилизация гелевой основы. Основу переливают в стеклянные флаконы укупоривают резиновой крышкой вручную и вальцуют алюминиевым колпачком с помощью ручной машины для вальцовки флаконов (Россия). Затем стерилизуют при температуре 120-125°C и давлении 120-125 кПа в течение 30-35 минут в лабораторном стерилизаторе Thermo Scientific (Thermo Fisher, США), время стерилизации выбирали эмпирически, основываясь на режимы работы автоклава и рекомендации ОФС 1.1.0016.18 «Стерилизация».

ТП 7. Введение коктейля бактериофагов в основу В остывшую до температуры не выше 37 °C основу вводят раствор фаголизата в ламинарном боксе, перемешивают на мешалке ИКА C-MAG HS 7 Package со скоростью 100-150 об/мин в течение 15-30 минут в зависимости от объема серии.

ТП 8. Наполнение туб. Алюминиевые тубы с мембраной и пластиковыми колпачками, производства Россия объемом 30 мл заполняют гелем на ручном дозаторе кремов и мазей Smartcream производства FARMALABOR, с контролем массы по 30 г в ламинарном боксе. Затем тубы закрывают ручным станком для укупорки (закрытия) тубиков Flash Z-01 (Россия).

УМО.9. Укупорка, маркировка, вторичная упаковка.

УМО 9.2. Маркировка. На этикетке на русском языке указывают название ЛП, ЛФ, количество геля в г, концентрацию, номер серии, срок годности. Этикетки наклеивают вручную. Визуально проверяют внешний вид туб. Некондиционные тубы собираются в отдельную емкость и отправляются на уничтожение как производственные отходы.

УМО 9.3. Упаковка в пачки. Тубы вручную помещают в коробки картонные, на которые также вручную наклеивают этикетки. В пачки вручную вкладывают мерные пластиковые ложки.

Контрольные точки производства лабораторных серий перорального геля с коктейлем бактериофагов приведены в таблице 4.21.

Помимо многодозовой упаковки в виде туб с мерной ложкой или стеклянного флакона с мерным шприцом можно предложить стики или пакеты саше для однократного применения (рис 4.8).



Рисунок 4.8 – Варианты упаковки перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций:
А-многодозовые, Б – однократовые

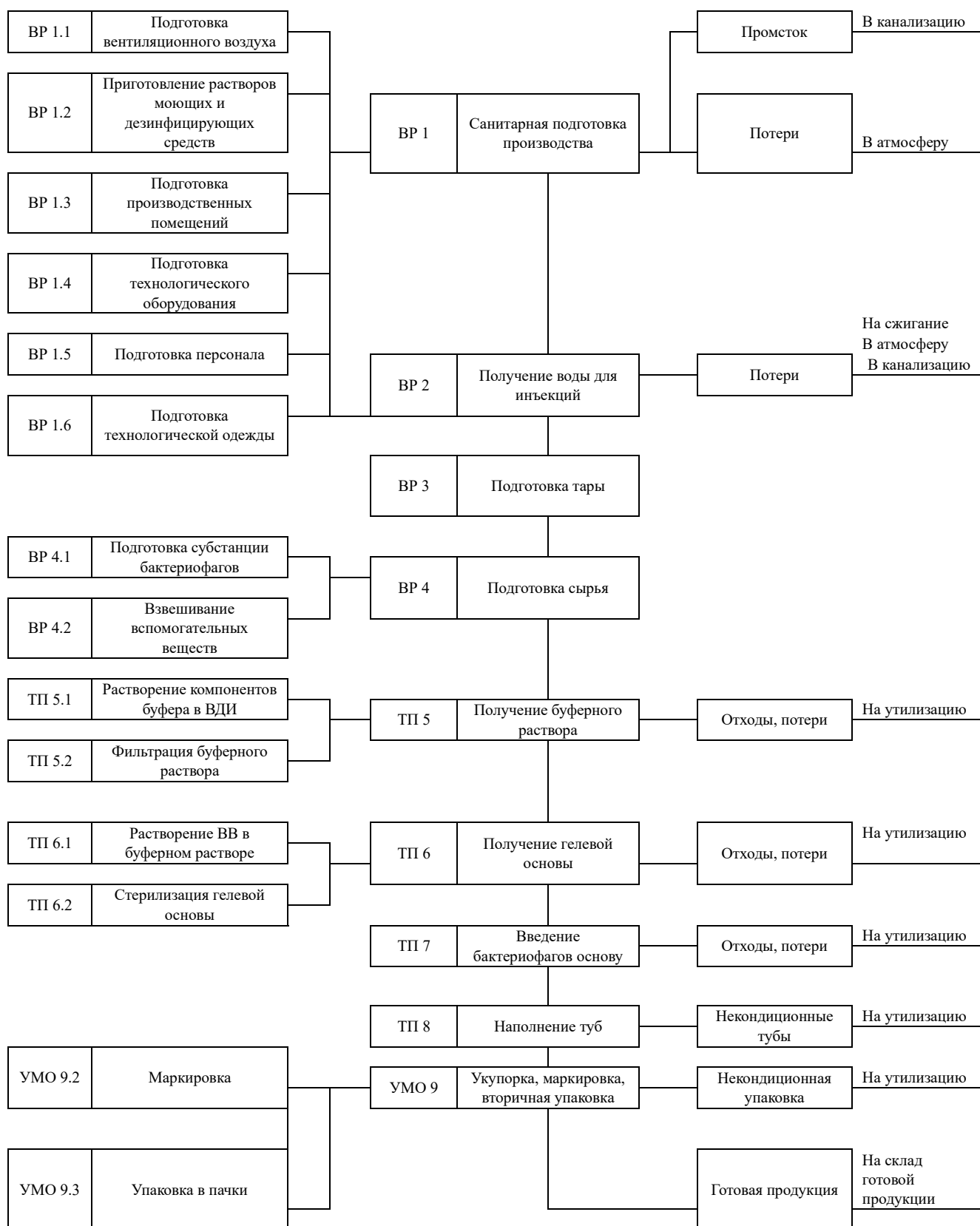


Рисунок 4.9 – Технологическая схема получения перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

Таблица 4.21 – Контрольные точки при производстве лабораторных серий перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

	Промежуточный/готовый продукт	Наименование показателя	Норма
ВР 3. Подготовка тары	Алюминиевые тубы	Внешний вид, целостность	Визуально оценивают отсутствие повреждений упаковки
ВР 4 Подготовка сырья			
ВР 4.1. Подготовка субстанции бактериофагов	Субстанция бактериофагов/ если использовали лиофилизат	Температура размораживания Время разморозки	2-8°C 12-24 ч
ВР 4.2. Взвешивание ВВ	NaКМЦ Сорбитол	Масса	Контроль массы на соответствие расчетам
ТП 5. Получение буферного раствора			
ТП 5.1. Растворение компонентов буфера в ВДИ	Буферный раствор не отфильтрованный	Время растворения Скорость вращения мешалки	10-15 мин 100-150 об/мин
ТП 5.2. Фильтрация буферного раствора	Отфильтрованный буферный раствор	рН	6,0-7,0
ТП 6.Получение гелевой основы			
ТП 6.1.Растворение ВВ в буферном растворе	Гелевая основа	Внешний вид Время растворения Скорость вращения мешалки Температура	Визуально оценивается отсутствие неоднородности и включений 35-60 мин 100-150 об/мин при введении ВВ 20-30°C
ТП 6.2. Стерилизация гелевой основы	Стерильная гелевая основа	рН Температура Давление Время	6,0-7,0 120-125°C 120-125 кПа 30-35 мин

Продолжение Таблицы 4.21

	Промежуточный/готовый продукт	Наименование показателя	Норма
ТП 7. Введение бактериофагов в основу	Гель бактериофагов не расфасованный	Температура Внешний вид	Не выше 37°C Визуально оценивается отсутствие неоднородности и включений
ТП 8. Наполнение туб	Гель с бактериофагами расфасованный	Внешний вид Герметичность	Оценка отсутствия повреждений В соотв. ГФ РФ
УМО.9. Укупорка, маркировка, вторичная упаковка			
УМО 9.2. Маркировка	Тубы наполненные маркированные	Внешний вид	Оценка отсутствия повреждений и наличия маркировки
УМО 9.3. Упаковка в пачки	Тубы в картонных пачках	Внешний вид	Оценка отсутствия повреждений и наличия маркировки

Таблица 4.22 – Оценка уровня риска технологического процесса

Этап процесса	Критический параметр качества (Critical Quality Attribute)					
	Идентификация	pH	Специфическая активность	Стерильность	Бактериальные эндотоксины	Герметичность
Взвешивание	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий
Получение буферного раствора	Низкий	Средний	Низкий	Низкий	Средний	Низкий
Растворение ВВ в буферном растворе	Низкий	Средний	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий
Стерилизация гелевой основы	Низкий	Средний	Низкий	Средний	Средний	Низкий
Ведение бактериофагов в основу	Средний	Средний	Средний	Средний	Средний	Низкий
Наполнение туб	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Средний

В таблице 4.22 приведена оценка уровня риска технологического процесса для масштабирования процесса, она аналогична гелю вагинальному с коктейлем бактериофагов. Риски масштабирования технологии оцениваются как низкие и средние и разработанная технология может быть перенесена из лаборатории в производственную аптеку или крупномасштабное производство.

4.2.4. Изучение стабильности и определение срока годности перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций

Изучение стабильности проводили в соответствии с требованиями решений Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10 мая 2018 г. N 69 "Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций" и от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза" на трех последовательных сериях перорального геля с коктейлем бактериофагов для лечения кишечных инфекций с тремя различными штаммовыми составами для того чтобы продемонстрировать универсальность разработанной ЛФ. Первый коктейль представлен фаголизатом коктейля против *Salmonella spp*: FG1m, FM4b, SE40, ST11; второй фаголизатом коктейля против *Escherichia coli*: ECD7, V18, Ec13-52, Ec732; и третий для лечения диареи путешественников фаголизатом коктейля против *Salmonella spp*: FG1m, FM4b, ST11 и против *Escherichia coli* Ec13-52, Ec732.

В рамках исследования стабильности ЛФ в были проведены следующие эксперименты: долгосрочные исследования при хранении ЛФ при температуре $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, относительной влажности 60%, продолжавшееся два года; ускоренные исследования при температуре 25°C и относительной влажности 60 % продолжительностью шесть месяцев. Испытания на стресс условия в общую программу стабильности входят, но не отражены в тексте диссертации.

Результаты изучения стабильности вагинальных гелей представлены в таблицах 6-11 Приложение Б, по ним можно судить, что разработанные ЛФ с тремя вариантами коктейлей бактериофагов стабильны в течение 24 месяцев, таким образом срок годности препаратов составляет 2 года.

Кроме того, изучали стабильность ЛФ после вскрытия упаковки в течение 1 недели в условиях хранения $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ на двух сериях препарата с одним вариантом коктейля фагов комбинированного состава: FG1m, FM4b, ST11, Ec13-52 и Ec732 (таблица 12 Приложение Б).

4.2.5. Изучение фармакокинетических показателей бактериофагов в пероральном геле

Изучение фармакокинетических показателей бактериофагов проводилось на базе МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского совместно с младшим научным сотрудником Пасивкиной М.А.

Шести кроликам давали перорально гель с коктейлем бактериофагов FG1m, FM4b, SE40, другим шести кроликам вводили перорально гель с коктейлем бактериофагов Ec13-52, Ec732, V18. Все отобранные пробы крови, мочи и кала сначала изучали качественным методом (Spot-тест) и после получения положительных результатов анализировали методом Грация. После введения коктейля бактериофагов ЛВ достигают системного кровотока. Максимум концентрации сальмонеллезных бактериофагов в крови наблюдается через 45 минут, эшерихиозных через 6ч, за исключением Ec13-52, у которого пик концентрации в крови обнаруживается через 6 часов. Через 24 часа в крови фаги не обнаруживаются (рисунок 4.10).

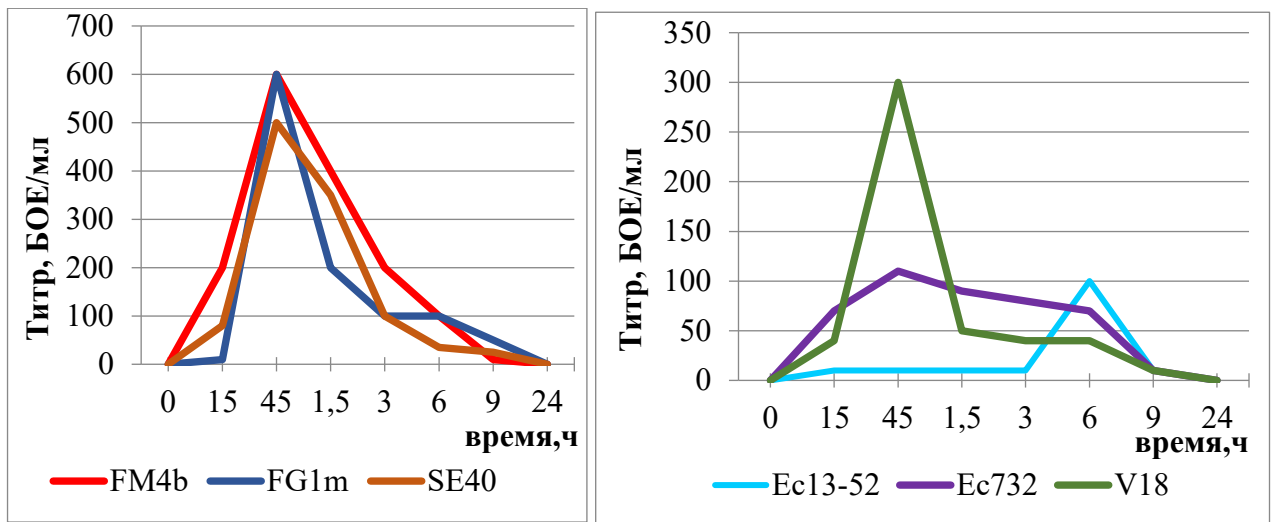


Рисунок 4.10 – Динамика концентрации бактериофагов в крови кроликов

Динамика нахождения бактериофагов в моче следующая (рисунок 4.11): фаги начинают обнаруживаться через 1,5 часа после введения (первая точка наблюдения) и достигают первого пика концентрации (FM4b, FG1m, SE40, Ec13-52, Ec732), затем концентрация фагов FG1m и SE40 снижается, они медленно выводятся. Титры остальных фагов достигают второго пика через 24 часа (FM4b, Ec13-52, Ec732). Для фага V18 наблюдается иная картина, пик концентрации в моче один в 24 часа и он обнаруживается в моче до 48 часов. При этом максимальные концентрации сальмонеллезных фагов в моче более чем в 3 раза выше, чем для эшерихиозных.

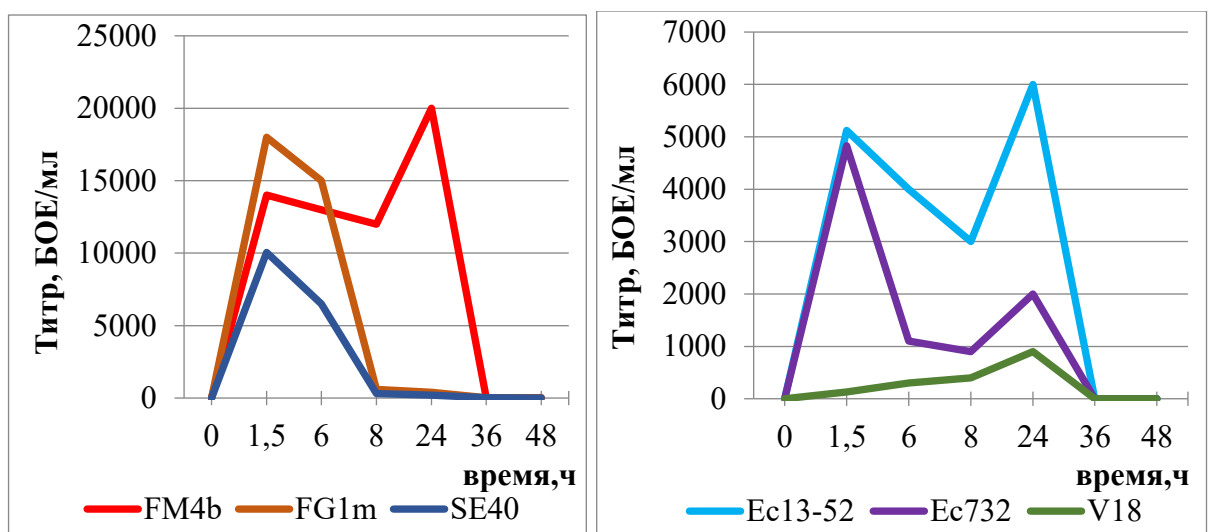


Рисунок 4.11 – Динамика концентрации бактериофагов в моче кроликов

Бактериофаги начинают обнаруживаться в кале через 6 часов после введения (первая точка наблюдения). Максимум концентрации бактериофагов FM4b, FG1m, Ec13-52 в кале при пероральном приеме достигается через 6 часов, для фагов SE40, V18 и Ec732 пик концентрации приходится на 24 часа. При этом Ec13-52 не обнаруживался уже после 24 часов наблюдения, FG1m и Ec732 – после 36 часов, а FM4b, SE40 и V18 обнаруживался в кале и через 48 часов (рисунок 4.12).

Следующим этапом фармакокинетических исследований было подтверждение подлинности ДНК фагов в крови кроликов после введения раствора. Для этого был применен метод ПЦР в режиме реального времени. В 100% образцов было подтверждено наличие исследуемых бактериофагов.

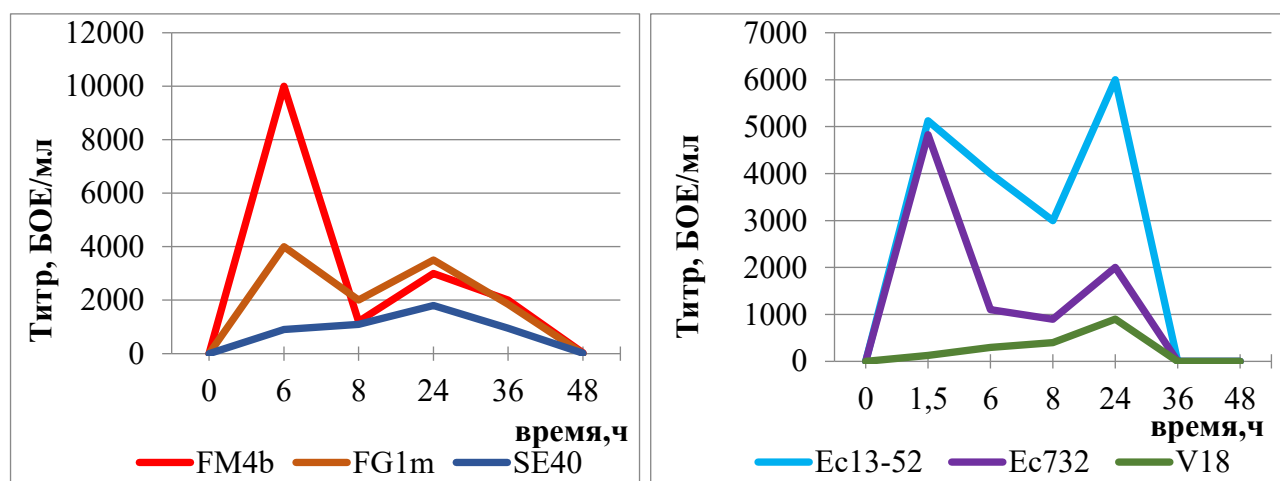


Рисунок 4.12 – Динамика концентрации бактериофагов в кале кроликов

В целом пероральный прием обеспечивает доставку фагов в желудочно-кишечный тракт, а транзит фагов через кишечник (выведение с калом) подтверждает эффективность терапии. Результаты наших исследований совпадают с данными литературы, кроме данных о концентрации фагов в моче. В ряде исследований сообщается, что после перорального приема в моче обнаруживаются только единичные фаги, а в наших исследованиях мы находим их в значимых концентрациях, то есть фаги элиминируются почками. Основным результатом изучения фармакокинетики гелей бактериофагов является подтверждение системного эффекта у ЛФ.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Разработаны составы двух «универсальных» ЛФ для коктейлей бактериофагов переменного или постоянного состава. Подтверждено, что разработанные ЛФ стабильны с коктейлями разного штаммового состава. В качестве стабилизатора использован изотонический раствор натрия хлорида. В качестве гелеобразователей для вагинального геля обосновано применение комбинации гидроксипропилцеллюлозы марки Natrosol® 250 G PHARM 1,5% и полоксамера Kolliphor® P 407 20%. Для перорального геля гелеобразователем выступает натрий-карбоксиметилцеллюлоза марки Blanose™ СМС в концентрации 5%, а сорбитол производства Shijiazhuang Huaxi pharmaceutical CO.,LTD в концентрации 15% является загустителем, структурообразующей добавкой и корригентом вкуса.

2. Вагинальный гель с бактериофагами обладает оптимальными потребительскими и терапевтическими свойствами благодаря наличию термозависимого перехода золь-гель при температуре $32,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, время гелеобразования составляет $8,5 \pm 1,0$ мин, что обеспечивает удобство применения, пластическая вязкость составляет 0,759, что укладывается в реологический оптимум. Кроме того, разработанный состав обладает выраженными биоадгезивными свойствами, биоадгезия по силе отрыва составляет $28,2 \pm 1,9$ Н, по скорости стекания $23,8 \pm 2,6$ мм/мин.

3. Пероральный гель для лечения кишечных инфекций обладает удовлетворительными органолептическими свойствами, вкусом и запахом, консистенцией, может применяться у пациентов различных категорий (детей, взрослых, пожилых, пациентов с дисфагиями). Высвобождение при pH 4,5 и pH 6,8 фагового коктейля в тесте растворение за 30 минут превышает 80%. Изучены фармакокинетические показатели перорального геля, доказано наличие системного действия разработанной ЛФ.

4. Разработана технология получения гелей с бактериофагами, состоящая из стадий: подготовка сырья, получение буферного раствора, получение гелевой основы, стерилизация основы, введение в основу стерильной субстанции коктейля бактериофагов, наполнение туб и укупорка, маркировка, вторичная упаковка. Оценены риски при масштабировании технологического процесса и показано, что они являются низкими или средними, и таким образом разработанная технология может быть воспроизведена как во внутрибольничной аптеке, так и на промышленном фармацевтическом заводе.

5. Определен срок годности ЛФ для перорального и вагинального применения в рамках долгосрочных и ускоренных испытаний, который составил 2 года.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ГЕЛЯ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ С РЕКОМБИНАНТНЫМ ЭНДОЛИЗИНОМ LysECD7-SMAP

В рамках данного исследования проводилась разработка лекарственной формы с рекомбинантным модифицированным эндолизином LysECD7-SMAP для наружного и местного применения для лечения ран и ожогов. При проведении разработки опирались на проведенное ранее совместное с Воробьевым А.М. исследование, в котором были разработаны состав, технология геля ранозаживляющего действия с комбинацией трех рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22, показана стабильность ЛФ в течение 6 месяцев, доказана эффективность ЛФ на модели раневой инфекции у кроликов (возбудитель – *Fusobacterium necrophorum*) [14, 197, 335].

Разработку ЛФ эндолизинов осуществляли в соответствии с рекомендациями Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза", конкретно главе 5.1 «Производство и контроль качества биотехнологических лекарственных препаратов, полученных методом рекомбинантной ДНК и главе 6 «Спецификации. Методы испытания и критерии приемлемости биотехнологических (биологических) препаратов».

5.1.1. Определение профиля качества геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

В рамках предварительных исследований изучали физико-химические свойства лекарственной субстанции эндолизина LysECD7-SMAP совместно с лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных

микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Данные по стабильности представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Изучение влияния физико-химических факторов на стабильность эндолизина LysECD7-SMAP

Образец ЛВ Время, сут.	Температура, °C										pH								
	-20			8			25			37		5		6		7		8	
	1	7	30	1	7	30	1	7	30	0,1	1	1	7	1	7	1	7	1	7
LysECD7-SMAP	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
+ сохранений активности эндолизина																			
- падение активности эндолизина более чем на 15%																			

Данная субстанция крайне чувствительна к температуре и стабильна в течение 30 суток в замороженном состоянии или при хранении в холодильнике, при комнатной температуре через сутки теряет активность, а также при температуре тела через 2-2,5 часа. Эндолизин LysECD7-SMAP наиболее стабилен при pH 7-8.

Разрабатываемый гель должен соответствовать требованиям действующей документации: ГФ РФ и рекомендациям Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза" главе 5.1. Производство и контроль качества биотехнологических лекарственных препаратов, полученных методом рекомбинантной ДНК и главе 6. Спецификации. Методы испытания и критерии приемлемости биотехнологических (биологических) препаратов и главе 13. «Фармацевтическая разработка биотехнологических и биологических препаратов».

На начальном этапе разработки определяли целевой профиль качества геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP. Для белковых молекул ЛВ одним из самых критических параметров качества является специфическая активность, потому что содержание белка в ЛП не отражает его способность оказывать фармакологический эффект. Для определения

специфической бактерицидной активности эндолизина LysECD7-SMAP были использованы три бактериальных штамма: *Acinetobacter baumannii* TS 50-16, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Escherichia coli* ATCC 25922, так как эти бактерии относятся к группе ESKAPE патогенов и хорошо культивируются, что важно для посерийного контроля ЛФ. Методика валидирована и опубликована [426]. Эндолизин LysECD7-SMAP имеет широкий спектр действия против грамотрицательных бактерий. При изучении чувствительности различных штаммов бактерий, указанных в таблице 2.2, было обнаружено снижение количества клеток бактерий в опытных образцах по сравнению с контролем по меньшей мере на 33,33% и наблюдалось у следующих видов:

- *A. baumannii* у всех штаммов в диапазоне от 99,49% до 100,00%;
- *E. coli* у всех штаммов в диапазоне от 77,92% до 99,22%;
- *S. enterica* у 2 из 5 штаммов в диапазоне от 69,29% до 85,20%;
- *K. pneumoniae* у всех штаммов в диапазоне от 53,46% до 83,49%;
- *Enterobacter spp.* у 4 из 5 штаммов в диапазоне от 49,04% до 96,25%;
- *P. aeruginosa* у 4 из 5 штаммов в диапазоне от 61,27% до 99,91%;
- *C. jejuni* у 2 из 5 штаммов в диапазоне от 45,02% до 52,45%.

Несмотря на то что специфическую активность определяют только на трех штаммах, сам препарат имеет широкий спектр действия.

Целевой профиль качества и критические параметры качества определяли по фармакопейным требованиям, однако в процессе разработки изучали параметры качества в соответствии с профилем качества МГЛФ для местного нанесения на раны и ожоги. Контролировали следующие параметры помимо фармакопейных: вязкость, стабильность реологических показателей, осмотическую и адсорбционную активность. Консистенцию и намазываемость, а также адгезионные свойства полноценно возможно оценить только в рамках использования препарата на людях, поэтому эти показатели не определяли, поскольку нет достоверных моделей, способных имитировать раневую поверхность.

Таблица 5.2 – Целевой профиль качества продукта геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизинном LysECD7-SMAP

Элемент целевого профиля качества ЛП		Цель	Обоснование
Лекарственная форма		Гель для наружного и местного применения/	Удобная для применения ЛФ хорошо распределяющаяся и удерживающаяся на раневой поверхности
Путь введения		местный /для нанесения на раны и ожоги	Сооотв. ГФ РФ
Дозировка		20 мг/г	Для обеспечения фармакологического эффекта.
Объем упаковки		30 г для лабораторной разработки	Алюминиевые тубы
Фармакокинетика		Препарат местного действия, нет требований по всасыванию	Изучена в рамках доклинических исследований для подтверждения отсутствия системного действия
Стабильность		от 6 мес. При температуре 2-8°C.	Минимальный срок годности для промышленного производства ЛП
Качественные параметры ЛП	Описание	Необходимо для терапевтической эффективности и для безопасности	Требование РФ РФ
	Идентификация		
	pH		
	Специфическая активность		
	Стерильность		
	Аномальная токсичность		
	Бактериальные эндотоксины		
	Масса содержимого упаковки		
	Герметичность упаковки		
Упаковка		Материал упаковки должен обеспечить соответствующее качество ЛП и не оказывать отрицательного воздействия на ЛФ, обеспечить удобство в применении	Выбор разработчика и соответствие потребительским характеристикам. Необходимо для клинической эффективности, безопасности. Обеспечение стабильности ЛП на протяжении заявленного срока годности
Способ применения		Согласно инструкции по применению	Необходимо для клинической эффективности и безопасности

Определение критических параметров качества ЛП для разрабатываемого ЛП из целевого профиля качества продукта основано на рисках нанесения вреда пациенту, если разрабатываемый ЛП выходит за пределы приемлемого диапазона для определенных параметров.

Критические параметры качества геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP и их обоснование представлены в таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Критические параметры качества геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

Параметр качества ЛП	Цель		Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
Описание	Вид ЛФ должен удовлетворять потребительским характеристикам		Нет	Физические свойства содержимого напрямую не связаны с безопасностью и эффективностью препарата. Следовательно, внешний вид не является критическим параметром.
Идентификация	Образует линию преципитации с антисывороткой специфичной к эндолизину LysECD7-SMAP)		Да	Идентификация оказывает большое влияние на безопасность и эффективность ЛП, но различие составов и переменные процесса производства не влияют на подлинность. Следовательно, этот параметр не будет обсуждаться во время разработки состава и технологии производства.
рН	7,0-8,0		Да	Обеспечивает стабильность АФС
Специфическая активность	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Не менее 80%	Да	Специфическая активность будет влиять на безопасность и эффективность препарата. Переменные процесса могут влиять на количественное содержание действующего вещества. Следовательно, данный параметр будет оцениваться в процессе разработки состава и технологии производства
	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	Не менее 80%		
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Не менее 30%		

Продолжение Таблицы 5.3

Параметр качества ЛП	Цель	Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
Стерильность	Препарат должен быть стерильным	Да	Нарушение стерильности препарата может привести к потере специфической активности белка и к инфицированию раны или ожога, что не допустимо, поэтому этот показатель критичный
Аномальная токсичность	Должен быть нетоксичен	Нет	Должен контролироваться у готовой ЛФ, так как сама субстанция не обладает токсичностью, считали показатель не критичным
Бактериальные эндотоксины	Не более 100 ЕЭ/г	Да	Так контролируется у субстанции, а в процессе асептического производства должен повышаться незначительно. Считали не критичным и контролировали у готовой ЛФ
Масса содержимого упаковки	Не менее 28,5	Нет	Масса не связана с безопасностью и эффективностью препарата. Следовательно, этот параметр не является критическим.
Герметичность упаковки	Должна быть герметична	Да	При отсутствии герметичности может произойти обсеменение посторонней микрофлорой и будет потеряна стерильность, что скажется на безопасности препарата при применении на ранах и ожогах

5.1.2. Разработка состава и технологии геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

Начальным этапом разработки состава геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP являлся выбор гелевой основы а не стабилизаторов. Разработчики субстанции провели выбор буферного раствора, в котором белок наиболее стабилен и в работе он был взят за основу. На момент начала разработки полноценные данные о стабильности субстанции отсутствовали, и было высказано предположение, что введение в гелевую основу повысит стабильность ЛВ, что было затем подтверждено, поэтому разработку начали именно с выбора основы. В качестве гелеобразователей рассматривали возможность использования следующих полимеров: ГМПЦ, ГЭЦ, ПЭГ 1500, 3000 и 6000, полоксамера 407. Первое требование к вспомогательному веществу – это отсутствие влияние на активность ЛВ. Получали растворы ВВ в рабочих концентрациях, смешивали с эндолизином, растворенном в буферном растворе и изучали стабильность растворов по параметру специфическая активность в течение 30 суток (температура 5 ± 2 °С и относительная влажность $60 \pm 5\%$).

Как видно из данных, представленных в таблице 5.4 активность эндолизина стабильна в растворах с ГМПЦ 0,75-1,5%, ГЭЦ 0,75-1,5% и ПЭГ 1500 1%, в растворах с другими полимерами активность белка падала через сутки или в процессе хранения.

На основании полученных результатов получали составы экспериментальных образцов гелей, приведенные в таблице 5.5.

Полученные составы были проанализированы по следующим параметрам: описание ЛФ, рН до стерилизации, после стерилизации, вязкость до стерилизации и после стерилизации, осмотическая и адсорбционная активность, агрегативная стабильность (таблица 5.6)

Таблица 5.4 – Изучение совместимости эндолизина LysECD7-SMAP и вспомогательных веществ

Время Концентрация ВВ	Активность эндолизина в присутствии ВВ, %											
	1 сутки			7 суток			14 суток			30 суток		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Benecel™ K100M 0,75%	98,5±0,3	95,4±0,5	65,2±0,4	95,4±0,5	92,3±0,3	62,0±0,4	90,2±1,2	86,2±1,2	55,6±0,5	85,6±1,0	84,5±0,5	51,8±0,9
Benecel™ K100M 1,50 %	93,6±1,3	96,4±1,2	54,6±0,3	90,2±1,0	92,6±0,3	51,5±1,4	85,6±0,9	89,2±1,5	49,2±1,4	82,5±1,0	83,6±0,5	45,2±1,0
Natrosol 250ННХ 0,75 %	99,5±0,5	98,9±1,4	65,4±1,4	98,9±0,4	97,5±1,2	62,1±1,1	98,4±1,0	96,6±1,2	56,5±0,4	95,2±1,2	92,5±1,4	55,4±1,2
Natrosol250ННХ 1,5%	99,2±1,4	97,5±1,2	60,2±1,0	99,8±0,9	96,5±0,4	58,5±1,4	98,9±0,5	95,2±1,8	55,8±0,9	97,5±2,5	94,5±1,2	53,2±2,4
Natrosol G 0,75 %	97,5±1,5	96,8±1,9	60,4±2,4	95,5±1,4	91,5±1,2	56,1±1,5	90,4±1,5	86,1±1,3	50,5±1,4	82,2±2,2	81,5±1,4	45,4±2,2
ГЭЦ Natrosol G 1,5%	98,9±1,4	97,9±1,2	58,2±1,3	95,8±1,9	93,5±1,4	55,5±1,4	91,9±0,5	85,5±1,8	45,8±1,9	83,5±1,5	82,5±2,2	43,2±2,0
ПЭГ 1500 1%	98,7±0,5	99,69±1,0	52,6±1,4	97,5±1,2	98,2±0,5	51,2±0,3	95,4±1,7	93,9±0,4	51,8±0,4	90,4±0,4	84,6±0,5	50,1±0,9
ПЭГ 1500 2,5%	95,5±1,2	100,0±0,5	56,8±1,4	94,1±0,9	95,2±1,1	55,4±1,2	85,2±1,4	80,5±1,5	45,2±0,3	75,6±0,6	74,2±1,0	40,5±0,6
ПЭГ 1500 5,0%	84,9±1,0	85,1±1,5	32,1±0,6	75,4±0,4	70,2±1,0	28,5±0,9	65,2±0,4	68,2±1,4	25,5±1,7	56,5±1,5	50,2±0,4	18,7±1,1
ПЭГ 3000 1%	85,4±1,4	100,0±0,4	45,8±1,7	82,5±1,4	90,2±1,2	40,4±1,4	78,5±1,7	85,6±1,8	35,2±0,8	68,5±0,4	75,4±0,3	20,5±0,8
ПЭГ 3000 2,5%	75,2±1,2	74,8±1,8	40,5±0,9	50,2±1,8	45,2±0,3	25,2±0,9	35,6±0,6	40,2±1,7	18,2±0,2	20,5±0,8	5,5±0,1	0
ПЭГ 3000 5,0%	55,2±0,4	52,3±1,5	20,4±1,0	40,2±0,9	30,5±1,8	10,8±0,2	12,5±0,9	8,5±0,1	3,2±0,8	5,2±0,1	0	0
ПЭГ 6000 1%	70,2±0,4	65,2±0,9	31,0±0,2	55,6±1,4	40,2±0,2	12,6±0,8	10,2±1,1	12,3±0,2	0	0	0	0
ПЭГ 6000 2,5%	60,5±0,3	65,5±1,1	28,5±0,4	55,6±1,0	45,4±0,9	20,5±0,6	15,4±1,1	11,2±0,1	10,5±1,0	0	0	5,2±0,2
Полоксамер 407 5,0%	95,6±0,4	98,2±0,3	58,4±1,5	92,5±1,6	94,8±0,6	54,2±1,5	85,2±1,4	81,2±1,9	45,2±1,5	76,2±1,5	74,2±1,2	36,5±0,3
Полоксамер 407 10,0%	95,1±1,0	93,5±0,4	45,2±1,4	92,2±1,2	90,5±1,5	42,5±1,5	82,9±0,2	83,5±0,2	36,5±1,0	72,5±1,5	70,5±1,8	29,4±0,6
Полоксамер 407 15,0%	75,4±1,3	72,5±1,4	43,4±1,5	60,2±1,8	63,5±1,2	30,8±1,7	52,4±1,1	50,1±1,6	28,2±0,6	48,2±1,5	45,2±0,3	25,4±0,2

Таблица 5.5 – Составы экспериментальных образцов геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

Компонент	Составы																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
рекомбинантный эндолизин LysECD7- SMAP, г	2																	
PBS, табл., мг	72,5																	
ГМПЦ Benecel K100M	0,75	1,0	1,25	-	-	-	-	-	-	1,0	1,0	-	-	-	-	1,25	-	-
ГЭЦ Natrosol 250ННХ, г	-	-	-	0,75	1,0	1,25	-	-	-	-	-	1,0	1,0	-	-	-	1,25	-
ГЭЦ Natrosol 250G, г	-	-	-	-	-	-	0,75	1,0	1,25	-	-	-	-	1,0	1,0	-	-	1,25
ПЭГ 1500, г	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	1,5	1,0	1,5	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0
Вода для инъекций	До 100 г																	

Таблица 5.6 – Показатели качества экспериментальных образцов геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизинном LysECD7-SMAP

показатель № образца	Описание	рН до стерилизации	рН до стерилизации	Пластическая вязкость, Па·с при 20°С до стерилизации	Пластическая вязкость, Па·с при 20°С после стерилизации	Осмотическая активность, %		Адсорбционная активность, мг	Коэффициент агрегативной устойчивости	
						1 час	24 часа		После 48 ч при 20°С	После 7 сут, при 20°С
1	соотв.	6,8±0,1	6,0±0,1	0,170	0,041	25±1,5	42±1,2	0,012±0,004	0	0
2	соотв.	6,2±0,1	5,8±0,1	0,192	0,053	32±1,8	54±1,3	0,018±0,003	0	0
3	соотв.	6,4±0,1	5,8±0,1	0,211	0,065	41±1,3	58±1,4	0,022±0,002	0	0
4	соотв.	7,3±0,1	8,2±0,1	0,185	0,161	54±1,6	68±1,6	0,033±0,004	0	0
5	соотв.	7,4±0,1	8,2±0,1	0,198	0,167	58±1,5	71±1,9	0,028±0,005	0	0
6	соотв.	7,5±0,1	8,3±0,1	0,205	0,226	60±1,9	81±1,4	0,029±0,004	0	0
7	соотв.	6,5±0,1	6,2±0,1	0,091	0,085	45±1,8	68±1,2	0,034±0,005	0	0
8	соотв.	6,4±0,1	6,0±0,1	0,115	0,110	49±1,3	65±1,5	0,035±0,006	0	0
9	соотв.	5,8±0,1	5,6±0,1	0,118	0,112	50±1,7	75±1,7	0,041±0,009	0	0
10	соотв.	7,2±0,1	6,8±0,1	0,211	0,065	36±1,5	45±1,4	0,025±0,007	0	0,2
11	соотв.	7,4±0,1	6,5±0,1	0,221	0,068	36±1,3	54±1,5	0,028±0,005	0	0,3
12	соотв.	7,7±0,1	8,1±0,1	0,151	0,144	65±1,6	115±2,5	0,055±0,004	0,01	0,05
13	соотв.	7,4 ±0,1	7,3±0,1	0,159	0,168	71±1,5	121±2,1	0,058±0,009	0	0
14	соотв.	6,8±0,1	6,4±0,1	0,123	0,124	56±1,8	85±1,5	0,045±0,005	0,01	0,1
15	соотв.	7,1±0,1	6,8±0,1	0,128	0,124	65±1,5	98±2,5	0,048±0,003	0,02	0,2
16	соотв.	6,5±0,1	5,9±0,1	0,216	0,054	41±1,4	65±1,6	0,033±0,002	0	0,1
17	соотв.	7,8±0,1	8,1±0,1	0,215	0,210	75±1,5	124±2,5	0,061±0,006	0	0,1
18	соотв.	7,3±0,1	6,5±0,1	0,158	0,149	71±1,6	112±2,2	0,058±0,005	0,02	0,09

Основным параметром, по которому отсеялось большинство образцов, это не соответствие нормам pH (7,0-8,0) и сильное падение значения вязкости более чем на 50%. Выбранный образец № 13 обладает стабильным значением pH, на которое не влияет процесс стерилизации ($7,4 \pm 0,1$ до стерилизации и $7,3 \pm 0,1$ после), стабильной вязкостью (0,159 Па·с до стерилизации и 0,168 Па·с после), максимальным значением осмотической ($121 \pm 2,1\%$ через 244 часа) и адсорбционной активности ($0,058 \pm 0,009$ мг) и низким значением коэффициента агрегативной устойчивости (0%).

У выбранного образца № 13 изучены реологические характеристики, вязкость и предел текучести в процессе хранения и представлены на рисунке 5.1 кривые вязкости и течения, полученные при температуре применения 32°C. При хранении геля в естественных условиях в рамках долгосрочных исследований вязкость образца и его предел текучести были постоянными, без существенных изменений значений ($\pm 5\%$ от изначальных значений). Как видно из данных кривых, гель легко изменяет свою вязкость при приложении силы, то есть будет хорошо распределяться по поверхности на которую наносится, при этом он обладает высокой степенью тиксотропии, поэтому после снятия напряжения быстро восстанавливает свою вязкость до изначального значения, то есть он не будет растекаться. Для данного вида геля, предназначенного для лечения ран и ожогов, изначальной задачей было получение текучих гелей, которые бы помимо непосредственного нанесения на раны и ожоги можно было бы вводить через катетеры. Поэтому вязкость у разрабатываемого геля невысокая и мы не сравниваем его реологические характеристики с оптимумами, так как он обладает уникальными характеристиками с фармакологической точки зрения и нет достаточного количества аналогов на рынке для сравнения.

Эндолизины нестабильные белковые молекулы. По опыту предыдущей разработки препарата с комплексом эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22, удалось получить ЛФ со сроком годности лишь 6 месяцев. Несмотря на то, что сам белок LysECD7-SMAP в виде субстанции более стабилен в растворе чем субстанции LysECD7, LysAm24 и LysAp22 (более чем в три раза), актуальной

задачей являлась стабилизация эндолизина в разрабатываемом геле для увеличения срока годности, и подбор стабилизаторов осуществляли не в той последовательности, что в методологии, то есть не на первом этапе разработки, однако, это частный случай.

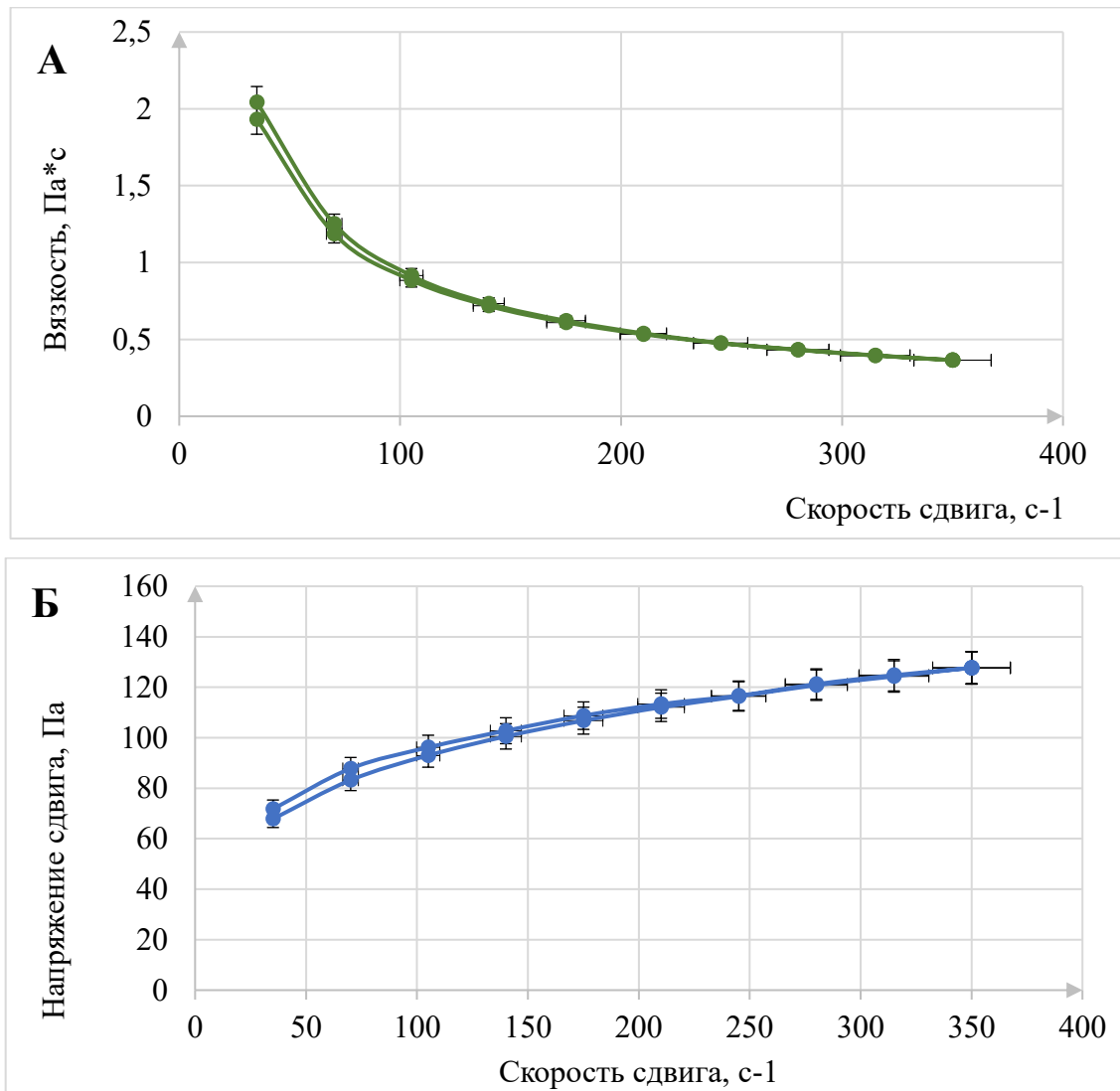


Рисунок 5.1 – Кривые вязкости (А) и течения (Б) экспериментального образца геля №13 бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP 7

Структурная стабильность белков в значительной степени зависит от взаимодействий между молекулами белка и окружающими молекулами растворителя. Стабилизация белка основана на ослаблении молекулярных взаимодействий и, следовательно, устранении конформационных переходов, чтобы

молекула находилась в нативном (трехмерно свернутом) состоянии. Еще одна сложная проблема заключается в стабилизации мультимерных белков с диссоциацией субъединиц, вызывающих инактивацию фермента, с сопутствующим загрязнением продукта. Стабильность мультимерных белков зависит от концентрации их в растворе, то есть они имеют низкую стабильность в разбавленных растворах [130].

Для повышения стабильности в состав ЛФ вводят стабилизаторы с различным механизмом действия. Поверхностно-активные вещества, повсеместно используются в ЛП для стабилизации белковых молекул. В первую очередь это достигается за счет их адсорбции на поверхности раздела фаз, что предотвращает агрегацию белка. Второй возможный механизм включает образование комплексов белок–поверхностно-активное вещество, что, в свою очередь, сводит к минимуму взаимодействие белка с другими белковыми молекулами. Третьим механизмом стабилизации является то, что некоторые поверхностно-активные вещества увеличивают стабильность белка через химический шапероновый механизм [111]. Самыми изученными и широко используемыми стабилизаторами из данной группы являются полисорбаты, включая полисорбат 20 (Tween 20) и полисорбат 80 (Tween 80). Для достижения стабилизирующего эффекта они используются в рецептуре белковых препаратов в диапазоне концентраций 0,003–3 мг/мл [341, 389, 394].

Триблок-сополимеры полиэтиленоксида-полипропиленоксида-полиэтиленоксида (РОЕ-РРО-РОЕ), коммерчески доступные в виде полоксамеров и плуроников, обладают свойствами поверхностно-активных веществ и являются эффективными стабилизаторами растворов белковых биотерапевтических средств. Одним из наиболее известных представителей этой группы является полоксамер® 188, он входит в состав коммерческих препаратов, таких как Газива®, Оренсия®, Нордитропин® и Хемлибра® [398].

Также для стабилизации белков широко используются дисахариды и их производные, сахарные спирты, циклодекстрины и полусинтетические полисахариды, самыми распространенными являются сахароза и трегалоза. Эти

соединения обладают приемлемым профилем безопасности и чаще вводятся в составы, подвергающиеся лиофилизации [321].

Согласно одному из последних обзоров, опубликованных в 2021 году, из 131 коммерчески доступных белковых ЛП, 82 содержит в качестве стабилизатора полисорбат 20, а 32 полоксамер 188 [111].

На основании литературных данных в качестве стабилизаторов изучали возможность введения в состав полисорбата 20 в диапазоне концентраций 0,03-0,3 мг и полоксамера 188 в диапазоне концентраций 2-8 мг. Для этого готовили образцы на основе образца № 13 с введением стабилизаторов в различном количестве. Затем изучали стабильность экспериментальных составов гелей в условиях ускоренных испытаний (температура $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и относительная влажность $60 \pm 5\%$), понимая, что полученные данные дадут предварительные результаты, которые потребуется подтвердить в условиях долгосрочных испытаний.

Как видно, из данных таблицы 5.7 стабильность препарата удастся увеличить включением в состав полисорбата 20 в концентрации от 0,06%. Так как, существенной разницы между стабильностью гелей с полисорбатом 20 в концентрациях 0,06, 0,12 и 0,3% нет, то использовали в дальнейших исследованиях минимальную концентрацию. На основе проведенных исследований разработан состав геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизинном LysECD7-SMAP, указанный в таблице 5.8.

Таблица 5.7 – Изучение влияния стабилизаторов на специфическую активность экспериментальных образцов геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизин LysECD7-SMAP

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

Таблица 5.8 – Состав геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

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

5.1.3. Технология получения геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

Следующим этапом согласно методологии фармацевтической разработки ГМЛФ является разработка методов и методик анализа входного контроля ЛВ и ВВ, полупродуктов и ЛФ, а так же их валидация или верификация. Методики анализа приведены в главе 2, а разработанная спецификация на готовую ЛФ в приложении А. В спецификацию не включены методики по показателю качества «примеси», так как осадочное содержание ДНК и белков клеток продуцента определяют в субстанции эндолизина LysECD7-SMAP, а при внесении его в состав геля она разбавляется в 20 раз, и определить примеси становится невозможным из-за их низкого содержания в ЛФ. Так как источниками примесей не могут являться компоненты ЛФ или процесс ее производства, то данный показатель исключается из нормативного документа по качеству. Определение общего белка также невозможно в ЛФ в связи с недостаточной чувствительностью методов. Разработанная технология получения геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP представлена ниже.

Описание технологического процесса

ВР 3. Подготовка тары. Тубы извлекались из транспортной упаковки и обрабатывались УФ перед наполнением в ламинарном боксе в течение 30 мин.

ВР 4. Подготовка сырья.

ВР 4.1. Подготовка субстанции эндолизина LysECD7-SMAP. Субстанция АФС поступает в замороженном виде от лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (температура хранения не выше минус 40°C). Размораживание субстанции эндолизина LysECD7-SMAP осуществляют в холодильнике в течение 12-24 часов при температуре 2-8°C.

ВР 4.2. Взвешивание ВВ. ВВ отвешивают в стерильные емкости на лабораторных электронных весах в ламинарном боксе «Ламинар-С» (Россия).

ТП 5. Получение буферного раствора.

ТП 5.1. Растворение компонентов буфера в ВДИ. Таблетки PBS растворяют в расчетном объеме воды для инъекций при температуре 20-25°C в стеклянном флаконе на верхнеприводной мешалке ИКА Eurostar 20 digital (Германия) (скорость вращения 100-150 об/мин) до полного растворения в течение 10-15 минут при визуальном контроле, температура комнатная, растворение проводят в ламинарном боксе.

ТП 5.2. Фильтрация буферного раствора. Полученный буферный раствор фильтруют через шприцевой фильтр или фильтровальную установку (в зависимости от объема серии) с мембраной из полиэфирсульфона Merck (Millipore, Германия) диаметром пор 0,3 мкм в ламинарном боксе. Так как основу, в которую будет входить буферный раствор, затем стерилизуют, то на данном этапе фильтрацию осуществляют с целью очистки от механических включений, материал фильтра выбирали на основе отсутствия сорбции ЛВ на мембране фильтра.

ТП 6. Получение гелевой основы.

ТП 6.1. Растворение ВВ в буферном растворе. ПЭГ 1500 вводят в буферный раствор и перемешивают при температуре 55-65°C до полного растворения на

мешалке ИКА Eurostar 20 digital (Германия) при скорости 100-150 об/мин на протяжении 10-15 минут, после чего охлаждают до температуры 20-25 °С и вводят при перемешивании в получившуюся воронку ГЭЦ и полисорбат 20, продолжая перемешивание еще 20-30 минут на скорости 75-100 об/мин при той же температуре.

ТП 6.2. Стерилизация гелевой основы. Основу переливают в стеклянные флаконы укупоривают резиновой крышкой вручную и вальцуют алюминиевым колпачком с помощью ручной машины для вальцовки флаконов (Россия). Затем стерилизуют при температуре 120-125°С и давлении 120-125 кПа в течение 30-35 минут в лабораторном стерилизаторе Thermo Scientific (Thermo Fisher, США), время стерилизации подбирали эмпирически, основываясь на режимы работы автоклава и ОФС 1.1.0016.18 «Стерилизация».

ТП 7. Введение эндолизина LysECD7-SMAP в основу. В остывшую до комнатной температуры основу вводят раствор эндолизина АФС в ламинарном боксе, перемешивают на магнитной мешалке мешалке ИКА C-MAG HS 7 Package со скоростью 100-150 об/мин в течение 15-30 минут.

ТП 8. Наполнение туб. Алюминиевые тубы с мембраной и пластиковыми колпачками производства Россия, объемом 30 мл, заполняют гелем на ручном дозаторе кремов и мазей Smartcream, производства FARMALABOR, с контролем массы по 30 г в ламинарном боксе. Затем тубы закрывают ручным станком для укупорки (закрытия) тюбиков Flash Z-01 (Россия).

УМО.9. Укупорка, маркировка, вторичная упаковка.

УМО 9.2. Маркировка. На этикетке на русском языке указывают название ЛП, ЛФ, количество геля в г, концентрацию, номер серии, срок годности. Этикетки наклеивают вручную. Визуально проверяют внешний вид туб. Некондиционные тубы собираются в отдельную емкость и отправляются на уничтожение как производственные отходы.

УМО 9.3. Упаковка в пачки. Тубы вручную помещают в коробки картонные, на которые также вручную наклеивают этикетки.

Контрольные точки производства лабораторных серий геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP приведены в таблице 5.9. В таблице 5.10 описана оценка уровня риска технологического процесса. Процесс взвешивания ВВ и ЛВ не влияет на критические показатели качества. От правильности выполнения технологических параметров стадии получения буферного раствора зависит рН, поэтому для снижения данного риска при внутрипроизводственном контроле следует определять рН буферного раствора. С компонентами буферного раствора можно привнести бактериальные агенты. Чтобы снизить этот риск буферный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,3 мкм.

Растворение ВВ в буферном растворе влияет на показатели описание и рН, для снижения риска на внутрипроизводственном контроле определяют внешний вид основы и рН после стерилизации.

Стерилизация гелевой основы влияет на показатели стерильность и бактериальные эндотоксины, по этим параметрам следует проводить обязательный контроль на этапе валидации технологического процесса. Введение АФС способно влиять почти на все критические показатели. Риски необходимо снизить в процессе валидации технологического процесса.

Масштабирование технологии предполагается на промышленное производство для которого необходимо стандартное технологическое оборудование и обеспечение классов чистоты С, В и А. Риски масштабирования технологии оцениваются как низкие и средние. И разработанная технология может быть перенесена из лаборатории в производство.

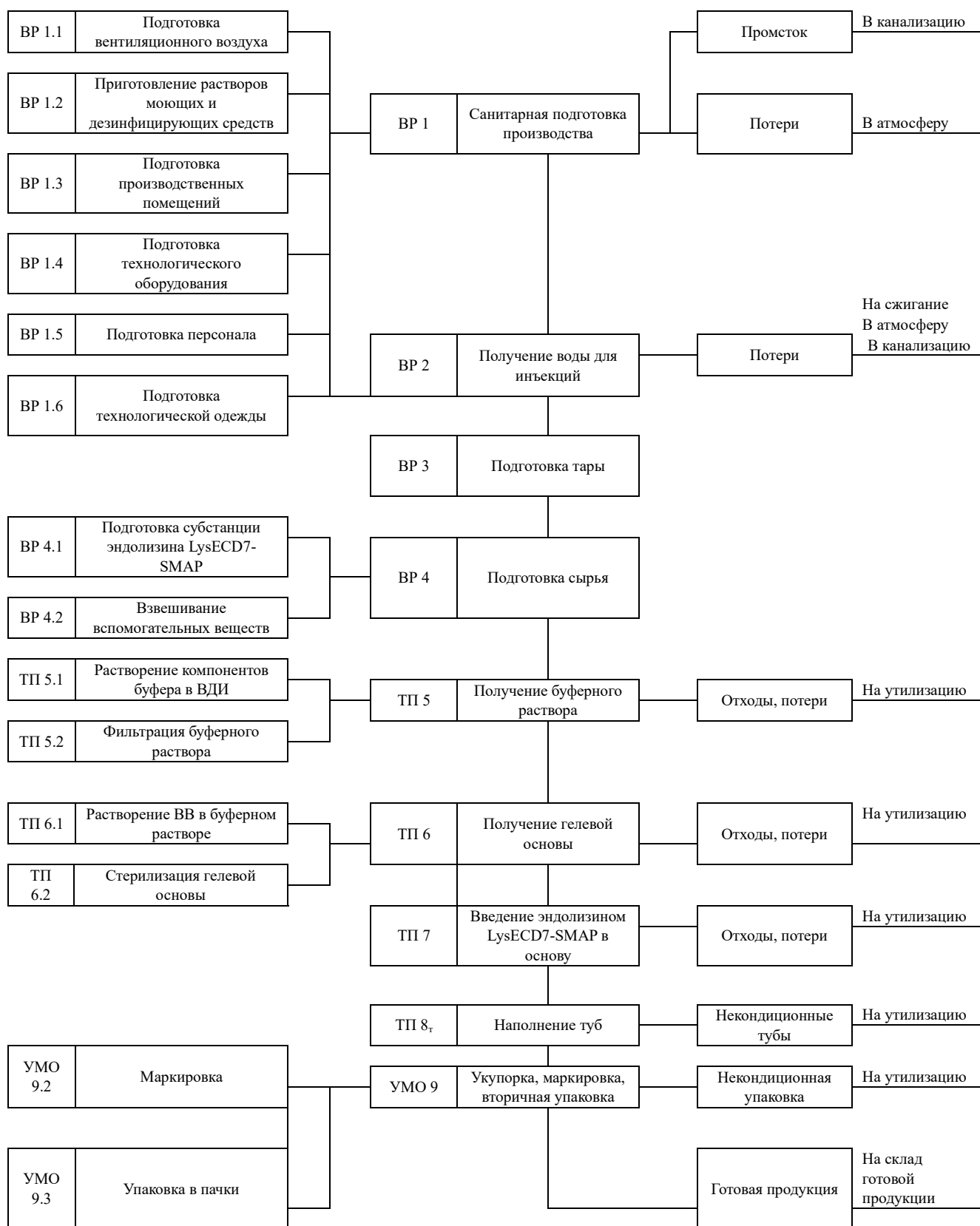


Рисунок 5.2 – Технологическая схема получения геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

Таблица 5.9 – Контрольные точки при производстве лабораторных серий геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

	Промежуточный/готовый продукт	Наименование показателя	Норма
ВР 3. Подготовка тары	Алюминиевые трубы	Внешний вид, целостность	Визуально оценивают отсутствие повреждений упаковки
ВР 4 Подготовка сырья			
ВР 4.1. Подготовка субстанции эндолизина LysECD7-SMAP	Субстанция эндолизина LysECD7-SMAP	Температура размораживания Время разморозки	2-8°C 12-24 ч
ВР 4.2. Взвешивание вспомогательных веществ	Гидроксиэтилцеллюлоза Natrosol® 250 NHX PHARM, полиэтиленгликоль 1500, полисорбат 20, фосфатный буферный раствор pH=7,5, PBS, сух.	Масса	Контроль массы на соответствие расчетам
ТП 5. Получение буферного раствора			
ТП 5.1. Растворение компонентов буфера в ВДИ	Буферный раствор не отфильтрованный	Время растворения Скорость вращения мешалки	10-15 мин 100-150 об/мин
ТП 5.2. Фильтрация буферного раствора	Отфильтрованный буферный раствор	pH	7,0-8,0
ТП 6.Получение гелевой основы			
ТП 6.1.Растворение ВВ в буферном растворе	Гелевая основа	Внешний вид	Визуально оценивается отсутствие неоднородности и включений
ТП 6.2. Стерилизация гелевой основы	Стерильная гелевая основа	pH Температура Давление Время	7,0-8,0 120-125°C 120-125 кПа 30-35 мин
ТП 7. Введение эндолизина LysECD7-SMAP в основу	Гель эндолизина не расфасованный	Температура Внешний вид	Не выше 25°C Визуально оценивается отсутствие неоднородности и включений

Продолжение Таблицы 5.9

	Промежуточный/готовый продукт	Наименование показателя	Норма
ТП 8. Наполнение туб	Гель с эндолизинном LysECD7-SMAP расфасованный	Внешний вид Герметичность	Оценка отсутствия повреждений В соотв. ГФ РФ
УМО.9. Укупорка, маркировка, вторичная упаковка			
УМО 9.2. Маркировка	Тубы наполненные маркированные	Внешний вид	Оценка отсутствия повреждений и наличия маркировки
УМО 9.3. Упаковка в пачки	Тубы в картонных пачках	Внешний вид	Оценка отсутствия повреждений и наличия маркировки

Таблица 5.10 – Оценка уровня риска технологического процесса

[illegible]

5.1.4. Изучение стабильности и определение срока годности геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

Субстанция эндолизина LysECD7-SMAP поставляется в виде лиофилизата и хранится при температуре не выше -40°C . В растворе крайне нестабильна и задачей разработки являлось создание ЛФ со сроком годности более 6 месяцев.

Изучение стабильности проводили в рамках долгосрочных испытаний в естественных условиях при двух температурных режимах: 2 и 8°C и относительной влажности 60%. Результаты, полученные при исследовании ЛФ (таблицы 13 и 14 Приложение Б), продемонстрировали стабильность препарата в течение 12 месяцев.

В программу изучения стабильности ЛФ согласно действующим документам ЕАЭС должны еще входить испытания ускоренного хранения, стрессовые испытания по изучению влияния на стабильность УФ-света, температуры, причем, как низкой, так и повышенной. Но в рамках данного исследования, так как доклинические испытания на ЛФ продолжаются, посчитали достаточными только долгосрочные испытания, по которым можно достоверно прогнозировать срок годности ЛФ.

Таким образом, разработанный гель бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP имеет срок годности 18 месяцев.

5.1.5. Изучение безопасности геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP

Исследование на *острую токсичность* показало, что у всех испытуемых животных двигательная активность соответствовала стандартам. Не было

зафиксировано дефектов в ходьбе, как у одной, так и у другой группы подопытных. Не было зафиксировано никаких отклонений в поведении. Все выделения были в норме. Проявление вокализации у некоторых животных при перемещении и во время взятия в руки, интерпретируется как индивидуальные особенности этих особей. Можно считать, что испытуемая ЛФ эндолизина в двух концентрациях (терапевтическая доза (далее – ТД) и 10хТД (далее – МДК)), не влияет на организм мышей и кроликов при однократном накожном нанесении. Все манипуляции животные перенесли хорошо. Местных и/или системных реакций от применения ЛФ в различных концентрациях и препарата плацебо выявлено не было, что в свою очередь говорит о его безопасности. Отличий в поведенческих реакциях у животных контрольных и опытных групп выявлено не было. Данные, полученные в результате взвешивания массы тела самцов и самок мышей при однократном введении исследуемой ЛФ, показали отсутствие статистически достоверных различий в динамике массы тела мышей. При взвешивании кроликов было установлено, что прирост массы тела не замедлялся и был аналогичен приросту во всех группах. Согласно данным, полученным в ходе исследования, все животные, используемые в опыте, имели положительную динамику в наборе массы. Статистически достоверной разницы в наборе массы животных получавших ТД и ЛФ в сравнении с плацебо не было зафиксировано. Динамика потребления кормов у мышей и кроликов была в пределах нормы. В исследовании не было умерших животных, плановая эвтаназия выполнялась на 15-й день.

При вскрытии мышей, получавших исследуемые препараты и препарат плацебо, патологий в строении, расположении, размерах и внешнем виде внутренних органов не обнаружено. При вскрытии кроликов, получавших исследуемые препараты и препарат плацебо, патологий в строении, расположении, размерах и внешнем виде внутренних органов не обнаружено.

Масса паренхиматозных органов и тканей, а также массовые коэффициенты органов самцов и самок мышей были идентичны вне зависимости от используемого препарата, что в полной мере свидетельствует о его безвредности. В ходе определения массы паренхиматозных органов и тканей кроликов, не было

зафиксировано статистически достоверной разницы в весе органов и тканей животных, что в свою очередь говорит об отсутствии у испытуемого препарата каких-либо негативных реакций на организм.

Результаты гистологического анализа кожного лоскута мышей и кроликов показали, что образцы, полученные от животных (мышей и кроликов), подверженных обработкам испытуемой ЛФ на основе эндолизинов в двух концентрациях, не отличаются между собой, а также от образцов, полученных от контрольных животных. Это подтверждает, что исследуемая ЛФ не проявляет признаков острой токсичности и не вызывает местно-раздражающие эффекты.

Субхроническая токсичность. Исследование клинического состояния животных не выявило негативных эффектов от ЛФ, случаев гибели не было. Мыши хорошо переносили ЛФ, и в конце исследования не обнаружено признаков интоксикации или отсроченного воздействия. При курсовом применении ЛФ эндолизинов на кожу функционально-морфологических нарушений не выявлено, что свидетельствует об отсутствии местно-раздражающего эффекта. Поведенческие тесты показали, что двигательная активность животных в контрольной и опытной группах была одинаковой, без изменений в походке и поведении. Оценка клинического состояния животных во время реализации исследования свидетельствовала об отсутствии каких-либо негативных последствий на организм мышей. Гибели животных зафиксировано не было. Лабораторные животные после нанесения ЛФ демонстрировали уравновешенный тип поведения с умеренной локомоторной и поисковой активностью без проявления признаков тревожности.

Исследование подтвердило, что испытуемое ЛС не оказывает отрицательного воздействия на скорость набора веса лабораторных животных. Потребление корма у животных, которые находились в испытательной и контрольной группах, не отличалось статистически значимо от групп, которые получали плацебо. Следовательно, бактерицидный гель с эндолизином в дозе 20 мг/г не оказывает влияния на работу внутренних органов и жизненно важных систем мышей. Это лекарственное средство не вызывает отсроченные реакции организма и

токсические побочные эффекты, которые могут проявиться при клиническом применении высоких доз препарата.

Хроническая токсичность. В ходе проведения исследования не было зафиксировано признаков неблагоприятного воздействия на здоровье крыс и кроликов, что подтверждает отсутствие негативных эффектов на их организмы. Не было зафиксировано и случаев смерти животных. Все они успешно пережили процедуру нанесения ЛФ в течение 30 дней. По завершении эксперимента не было обнаружено никаких симптомов токсического воздействия или задержанных отрицательных реакций.

При многократном применении испытуемой ЛФ эндолизинов на кожу животных было установлено полное отсутствие морфологических и функциональных изменений кожных покровов, что указывает на отсутствие у данного препарата выраженных раздражающих свойств. В ходе анализа поведенческих реакций было выявлено, что уровень двигательной активности у всех животных остается неизменным, не проявляя разницы между контрольной и исследуемой группами.

Не было замечено никаких отклонений в движениях животных. Поведение животных не показало каких-либо аномалий. Животные, которым был введен исследуемый препарат, проявляли преимущественно уравновешенный тип поведения, с умеренной локомоторной и поисковой активностью без проявления признаков тревожности. Исследование выявило, что экспериментальная ЛФ не оказывает неблагоприятного воздействия на темпы набора веса лабораторных животных. В некоторых испытуемых группах наблюдалось статистически значимое увеличение веса у животных, которым давали минимально токсические и токсические дозы, в отличие от контрольной группы с плацебо. При этом стоит обратить внимание на то, что препарат также не способствует увеличению массы тела животных, так как это не подтверждается во всех остальных группах самцов и самок. Данное явление возможно было бы исключить за счет снижения диапазона начальных масс животных, используемых в эксперименте с 10 до 5%. Данные по динамике потребления кормов опытными и контрольными группами крыс

свидетельствуют о том, что среднесуточное потребление кормов группами, получавшими минимально токсические и токсические дозы ЛФ имело статистически достоверные различия в сравнении с группами плацебо. Несмотря на эти данные, привес животных всех обозначенных групп животных не отличался, что свидетельствует о том, что конверсия кормов у крыс получавших ЛФ увеличилась (при потреблении меньшего объема кормов, мышечный привес остается на стандартном уровне). Здесь же стоит отметить, что несмотря на статистическую разницу в среднесуточном потреблении кормов крысами, получавших испытуемый препарат в различных концентрациях, разница в суммарном потреблении кормов не свидетельствует о том, что препарат негативно влияет на животных. Статистически достоверной разницы в объеме потребляемых кормов кроликами не было зафиксировано. Установлено, что преимущественно у всех животных, используемых в эксперименте, на протяжении всего периода его реализации температура тела, показатели биохимического анализа мочи, частота дыхательных движений, частота сердечных сокращений, артериальное давление находились в пределах физиологической нормы. Зафиксированные отклонения от нормативных значений носят индивидуальный характер и не является следствием воздействия испытуемого препарата. Несмотря на некоторые зафиксированные статистически достоверные различия в результатах оценки данных показателей, мы их не можем оценивать как негативные, так как все они остались в пределах физиологических норм для используемого вида животных (как у крыс, так и у кроликов).

В ходе исследования токсичность при многократном введении оценивали его влияние на гемопоэтическую функцию, т.е. функцию воспроизведения и поддержания физиологических констант клеточного состава крови, при длительном (курсовом) введении. После 30 дней введения не выявлено изменений клеточного состава крови у животных в группах, получавших минимально токсические и токсические дозы по сравнению с контролем. Все измерения соответствовали стандартам для этой категории животных и не отличались от результатов контрольной группы. Несмотря на некоторые зафиксированные

статистически достоверные различия в результатах оценки данного показателя, мы их не можем оценивать как негативные, так как все они остались в пределах физиологических норм для используемого вида животных.

Результаты биохимического анализа крови свидетельствуют о том, что у большинства животных, используемых в эксперименте, биохимические показатели находились в пределах физиологической нормы. Зафиксированные отклонения от нормативных значений носят индивидуальный характер и не является следствием воздействия испытуемого препарата. Несмотря на некоторые зафиксированные статистически достоверные различия в результатах оценки данного показателя, мы их не можем оценивать как негативные, так как все они остались в пределах физиологических норм для используемого вида животных.

В результате проведения кардиологического исследования крыс было установлено, что животные всех опытных и контрольных групп нарушений ритма и проводимости выявлено не было. Все данные кардиографического исследования такие, как частота сокращений, интервала P-Q, зубец P, вольтаж, интервал QRS, вольтаж QRS, продолжительность систолы QRST были идентичны и находились на уровне нормального значений. Деформация QRS выявлено не было. Интервал S-T – изоэлектричен. Электрическая ось сердца находился в диапазоне от -15 до $+60^{\circ}\text{C}$. Здесь стоит отметить, что диапазон от 0 до $+90^{\circ}\text{C}$ является нормальным. При этом стоит отметить, что смещение электрической оси сердца влево не свидетельствует о наличии у животных каких-либо патологических отклонений, так как значения электрической оси сердца от 0 до -30°C может возникать на фоне индивидуальных особенностей организма и/или при глубоком дыхании. Таким образом можно считать, что испытуемое средство не несет негативное влияние на сердечно-сосудистую систему.

В ходе патоморфологического исследования было установлено, что при изучении токсичности при многократном введении в органах крыс и кроликов не выявлено патологических изменений. Все органы и ткани соответствуют нормальному строению. При сравнении результатов гистологического анализа органов контрольных и экспериментальных групп также не было обнаружено

никаких отличий. Выявлены статистически достоверные отличия в массовых коэффициентах органов и тканей кроликов 3 подгруппы, получавших минимальные токсические дозы ЛФ, в сравнении с группой, получавшей плацебо. Несмотря на это данные коэффициенты находились в пределах нормативных значений, ввиду чего они не могут рассматриваться как следствие негативного влияния на организм животных, что в свою очередь подтверждается результатами гистологических исследований. Каких-либо статистически значимых отличий в группах с крысами выявлено не было. Таким образом, исследуемая ЛФ не обладает хроническим токсическим эффектом на внутренние органы животных в эксперименте.

Реактогенность и аллергенность. В ходе оценки клинического состояния животных было установлено, что здоровье животных не пострадало от процедур. Не было зафиксировано смертей крыс. Все они без осложнений пережили 20-дневный период, во время которого им была нанесена ЛФ. К моменту завершения эксперимента не было обнаружено никаких признаков токсического воздействия или задержанных эффектов. Поведенческий анализ показал, что крысы обеих групп продолжали быть активными в движении и не было замечено никаких отклонений в их походке. Не было обнаружено и каких-либо аномалий в поведении. Животные, которым вводили исследуемый препарат, показывали уравновешенный тип поведения, с умеренной локомоторной и поисковой активностью без проявления признаков тревожности.

Визуально установлено, что 20-ти кратное накожное нанесение испытуемого ЛФ в минимально токсических и токсических дозах не вызывало у животных каких-либо видимых реакций. Эритема кожи, инфильтрация и отек кожи, очаговые изъязвления, геморрагии, корочки отсутствовали. Ввиду чего реакция на нанесение препарата была учтена как нулевая во всех испытуемых группах. Исследование, проведенное с использованием 10 и 20-кратного нанесения пробы на кожу лабораторных животных, не выявило никаких признаков функциональных или морфологических изменений, указывающих на местно-раздражающее воздействие исследуемого ЛС.

Иммунотоксичность. Оценка клинического состояния животных во время исследования показала отсутствие негативных последствий для мышей. Животные хорошо перенесли нанесение ЛФ без признаков интоксикации или отсроченного влияния. При курсовой аппликации ЛФ эндолизинов не было выявлено функционально-морфологических нарушений кожи, что указывает на отсутствие местно-раздражающего эффекта. Поведенческие реакции показали сохранение двигательной активности у всех животных без отклонений в походке и аномалий поведения. После введения средства животные демонстрировали уравновешенное поведение с умеренной активностью и без тревожности. Исследование показало, что испытуемая ЛФ не оказывала негативного влияния на набор массы лабораторных животных. Среднесуточное потребление кормов опытными и контрольными группами мышей не отличалось статистически от групп плацебо. Биохимический анализ крови большинства животных подтвердил, что показатели находились в пределах физиологической нормы.

Таким образом, данная ЛФ, представляющая собой бактерицидный гель, содержащий в своем составе активное вещество эндолизин в концентрации 20 мг/г является безопасным для организма. Исследования, проведенные на лабораторных животных показали, что применение данного геля не оказывает негативного воздействия на работу внутренних органов и систем, в ходе испытаний не было зафиксировано отсроченных реакций, что говорит об отсутствии риска возникновения побочных токсических эффектов.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработан и экспериментально обоснован состав геля бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP на основе гелеобразователя гидроксиэтилцеллюлозы марки Natrosol® 250 ННХ 250 1,0%, в качестве загустителя, структурообразователя и осмотически активного компонента использован полиэтиленгликоль 1500 1,5%. Экспериментально обосновано введение в состав ЛФ стабилизатора белковых молекул полисорбата 20 в концентрации 0,06 мг/г.

2. Разработанный состав геля обладает требуемым значением pH $7,3 \pm 0,1$, удовлетворительными значениями осмотической ($121 \pm 2,1\%$ через 244 часа) и адсорбционной активности ($0,058 \pm 0,009$ мг), значением вязкости ($0,168$ Па·с) удобным как для нанесения на раны ЛФ, так и возможным для введения через катетеры.

3. Отработана технология получения ЛФ в лабораторных условиях состоящая из стадий: подготовки ЛВ и ВВ, получения буферного раствора и его стерилизации, введения субстанции эндолизина LysECD7-SMAP в основу, упаковки и маркировки в первичную и вторичную тару. Проведена оценка рисков масштабирования технологии, которая показала низкие и средние значения рисков, следовательно, возможность трансфера технологии из лаборатории на производственную площадку.

4. Показана стабильность разработанной ЛФ в течение 18 месяцев, что увеличило срок годности препарата в три раза по сравнению с ранее полученным гелем с комбинацией эндолизинов.

5. В ходе проведения доклинических исследований, направленных на оценку безопасности геля, содержащего в своем составе рекомбинантный белок LysECD7-SMAP, было установлено, что эндолизин в дозировке 20 мг/г не оказывает негативного воздействия на функционирование внутренних органов и жизненно важных систем организма животных, участвовавших в эксперименте. Кроме того

что в процессе исследований не было зафиксировано никаких отсроченных реакций, а также отсутствовали побочные токсические эффекты, которые могли бы возникнуть в результате применения этого препарата в клинических условиях. Эти данные открывают новые перспективы для дальнейших исследований и возможного клинического применения геля на основе LysECD7-SMAP.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА КОМБИНИРОВАННЫХ ГИДРОФИЛЬНЫХ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С ИНТЕРФЕРОНОМ АЛЬФА-2В

Разработку комбинированных ЛФ с интерфероном альфа-2b осуществляли в соответствии с рекомендациями Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза", конкретно главе 5.1 «Производство и контроль качества биотехнологических лекарственных препаратов, полученных методом рекомбинантной ДНК» и главе 6 «Спецификации. Методы испытания и критерии приемлемости биотехнологических (биологических) препаратов».

6.1. Фармацевтическая разработка комбинированного офтальмологического геля с интерфероном альфа-2b и даларгином

На основе литературных данных о терапевтическом применении ЛВ в офтальмологии для дальнейшего исследования предлагается следующий состав действующих веществ офтальмологического геля, не менее 50 тыс. МЕ интерферона альфа-2b и 0,5 мг даларгина в одном мл [19, 28, 26, 29, 314].

Разработку ЛФ проводили на основании методологии, представленной в Главе 3. Также оценивали возможность как масштабирования, так и трансфера ЛФ на производственную площадку АО «Биннофарм».

Для разработки данного ЛС предварительные исследования не проводили, так как физико-химические свойства данных субстанций хорошо известны, и в процессе производства использована субстанция, синтезированная АО «Биннофарм», для которой изучены факторы влияющие на ее стабильность.

Субстанция интерферона альфа 2b наиболее устойчива при pH в диапазоне от 5,5 до 7, температура хранения 2-8°C 1 год, при комнатной температуре стабильна в течение 24 часов. Субстанция даларгина термостабильна, оптимальные значения pH от 5,5- 7,5.

6.1.1. Определение профиля качества комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

Разрабатываемый офтальмологический гель должен соответствовать требованиям действующей документации, то есть ГФ РФ и рекомендациям ЕАЭС. Целевой профиль качества и критические параметры качества офтальмологического геля интерферона определяли по фармакопейным требованиям (таблица 6.1), на этапе разработки в соответствии с профилем качества МГЛФ офтальмологического применения дополнительно оценивали у экспериментальных образцов стабильность реологических показателей, биоадгезивные свойства и осмотическую активность [26, 314].

Определение критических параметров качества ЛП для разрабатываемого лекарственного препарата из целевого профиля качества продукта основано на рисках нанесения вреда пациенту, если разрабатываемый ЛП выходит за пределы приемлемого диапазона для определенных параметров.

Критические параметры качества офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина 500 тыс. МЕ +0,5 мг, 10 г и их обоснование представлены в таблице 6.2.

Таблица 6.1 – Целевой профиль качества продукта офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина 500 тыс. МЕ +0,5 мг, 10 г

Элемент целевого профиля качества продукта		Цель	Обоснование
Лекарственная форма		Глазной гель	Удобная для применения ЛФ с потребительской точки зрения, обеспечивающая однородность доставляемых доз, точность попадания и распределения ЛФ по слизистой оболочке глаза
Путь введения		Офтальмологический/местный	Сооотв. ГФ РФ
Дозировка		Не менее 50000 МЕ/г интерферона альфа-2b + 0,5 мг/г даларгина	Для обеспечения фармакологического эффекта.
Объем упаковки		10 г для лабораторной разработки	Алюминиевые тубы
Фармакокинетика		Препарат местного действия, нет требований по всасыванию	По литературным данным белки и пептиды могут проникать в ткани глаза, но достаточно незначительно, основной фармакологический эффект будет проявляться на слизистой оболочке
Стабильность		2 года. При температуре 2-8°C.	Минимальный по ЕАЭС срок годности для первой регистрации препарата
Качественные параметры ЛП	Описание	Необходимо для терапевтической эффективности и для безопасности	Требование ГФ РФ
	Прозрачность		
	Идентификация		
	Содержание интерферона альфа-2b - специфическая противовирусная активность		
	Содержание даларгина		
	Масса содержимого упаковки		
	Видимые механические включения		

Продолжение Таблицы 6.1

Элемент целевого профиля качества продукта		Цель	Обоснование
Качественные параметры ЛП	Металлические частицы	Необходимо для терапевтической эффективности и для безопасности	Требование ГФ РФ
	pH		
	Стерильность		
	Вязкость		
	Осмолярность		
Герметичность упаковки			
Упаковка		Материал упаковки должен обеспечить соответствующее качество ЛП и не оказывать отрицательного воздействия на ЛФ, обеспечить удобство в применении	Выбор разработчика и соответствие потребительским характеристикам. Необходимо для клинической эффективности, безопасности. Обеспечение стабильности ЛП на протяжении заявленного срока годности
Способ применения		Согласно инструкции по применению	Необходимо для клинической эффективности и безопасности

Таблица 6.2 – Критические параметры качества офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина 500 тыс. МЕ +4,0 мкг, 10 г

Параметр качества лекарственного препарата	Цель	Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
Описание	Вид ЛФ должен удовлетворять потребительским характеристикам	Нет	Физические свойства содержимого напрямую не связаны с безопасностью и эффективностью препарата. Следовательно, внешний вид не является критическим параметром
pH	6,0-7,0	Да	Обеспечивает стабильность АФС
Прозрачность	Препарат должен быть прозрачным	Нет	Параметр не связан с безопасностью и эффективностью препарата. Следовательно, этот параметр не является критическим
Осмолярность	239–376 мОсм/л.	Да	На параметр влияет состав ЛФ, поэтому параметр является критическим
Механические включения -видимые невооружённым глазом	В соответствии с требованиями. Частиц размером 10 мкм и более – не более 6000 в тубе	Да	Несоблюдение требований GMP может повлиять на безопасность пациентов. Является критическим показателем для всех офтальмологических препаратов в соответствии с требованиями ГФ РФ
Масса содержимого упаковки	Не менее 9,5 г	Нет	Масса не связана с безопасностью и эффективностью препарата. Следовательно, этот параметр не является критическим
Идентификация	Реакция нейтрализации противовирусной активности интерферона	Нет	Идентификация оказывает большое влияние на безопасность и эффективность лекарственного препарата, но этот критический параметр качества (CQA) должен эффективно контролироваться системой управления качеством. Различие составов и переменные процесса производства не влияют на подлинность. Следовательно, этот параметр не будет обсуждаться во время разработки состава и технологии производства

Продолжение Таблицы 6.2

Параметр качества лекарственного препарата	Цель	Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
	УФ-спектрофотометрия в среде искусственной слезной жидкости от 250 до 300 нм максимум при 275±2 нм ВЭЖХ пик соответствующий стандарту даларгина	Нет	Идентификация оказывает большое влияние на безопасность и эффективность лекарственного препарата, но этот критический параметр качества (CQA) должен эффективно контролироваться системой управления качеством. Различие составов и переменные процесса производства не влияют на подлинность. Следовательно, этот параметр не будет обсуждаться во время разработки состава и технологии производства.
Содержание интерферона альфа-2b - специфическая противовирусная активность	Не менее 50000 МЕ/г	Да	Содержание действующего вещества будет влиять на безопасность и эффективность препарата. Переменные процесса могут влиять на количественное содержание действующего вещества. Следовательно, данный параметр будет оцениваться в процессе разработки состава и технологии производства.
Содержание даларгина	0,475 – 0,525 мг/г	Да	Содержание действующего вещества будет влиять на безопасность и эффективность препарата. Переменные процесса могут влиять на количественное содержание действующего вещества. Следовательно, данный параметр будет оцениваться в процессе разработки состава и технологии производства
Вязкость	0,120-0,145 Па·с	Да	Является критическим показателем, так от данного параметра зависит терапевтический эффект и потребительские свойства ЛФ

Продолжение Таблицы 6.2

Параметр качества лекарственного препарата	Цель	Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
Вязкость	0,120-0,145 Па·с	Да	Является критическим показателем, так от данного параметра зависит терапевтический эффект и потребительские свойства ЛФ
Металлические частицы	Общее число металлических частиц, размер которых составляет от 50 до 90 мкм во всех 30 тубах не должно превышать 150 частиц, и если не более чем в 3 тубах содержится 9 или более частиц указанной величины (в каждой из туб). Не допускается наличие частиц с максимальным размером более 90 мкм.	Нет	Не является критическим показателем на этапе разработки, так как данный параметр зависит от качества упаковки, а не от состава ЛФ или технологии получения
Стерильность	Должен быть стерилен	Да	Несоблюдение требований GMP может повлиять на безопасность пациентов. Является критическим показателем для всех офтальмологических препаратов в соответствии с требованиями ГФ РФ
Герметичность упаковки	Должна быть герметична	Да	При отсутствии герметичности может произойти обсеменение посторонней микрофлорой и будет потеря стерильности, что скажется на качестве и безопасности препарата

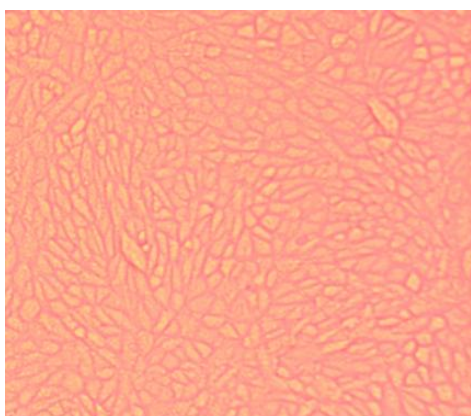
6.1.2. Изучение совместимости интерферона альфа-2b и даларгина

На первом этапе исследования необходимо оценить совместимость действующих веществ.

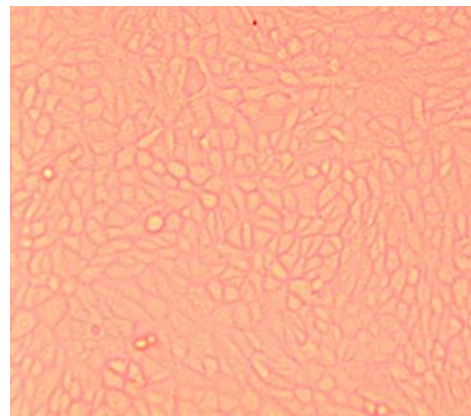
Субстанция интерферона крайне нестабильна и чувствительна к изменению pH, она находится в растворе ацетатного буферного раствора, состоящего из натрия хлорида и натрия триацетата тригидрата, ЭДТА.

Для оценки специфической активности интерферона в лекарственной форме необходимо убедиться в отсутствие цитотоксического действия даларгина на линию клеток Vero, для этого в лунки планшета с приготовленным слоем клеток, вносят раствор даларгина и инкубируют, а затем под микроскопом оценивают цитотоксический эффект в сравнении с контролем.

На рисунке 6.1 представлены результаты оценки цитотоксического действия даларгина в сравнении с контролем.



А



Б

Рисунок 6.1 – Лунки с монослоем клеток линии Vero при увеличении в 100 раз: А- контроль, Б- раствор даларгина 0,5 мг/мл

Разницы в количестве и плотности клеток в лунках с контролем и испытуемым раствором не наблюдалось, таким образом, даларгин не обладает цитотоксичностью и не препятствует оценке специфической активности интерферона.

Затем изучали стабильность раствора, содержащего интерферон и даларгин в ацетатном буферном растворе, для предварительных результатов при хранении в течение 30 суток, температура 5°C. Результаты, приведенные в таблице 6.3, демонстрируют отсутствие влияния компонентов на их стабильность.

Таблица 6.3 – Изучение перекрёстного влияния интерферона и даларгина на стабильность в растворе

Показатель \ Время, сут.	0	7	15	30
Специфическая активность интерферона альфа-2b МЕ в 1 г	65358	62856	68128	60088
Количественное содержание даларгина мг в 1 г	0,51	0,51	0,51	0,51
рН раствора	5,8	5,8	5,8	5,8

6.1.3. Разработка состава и технологии комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

На следующем этапе необходимо выбрать гелеобразователь, он должен быть устойчив в присутствии электролитов и выдерживать термическую стерилизацию. Из всех доступных на российском рынке гелеобразователей такими свойствами обладают только некоторые производные целлюлозы, а именно МЦ, ГЭЦ и ГМПЦ. Выбор стабилизаторов не проводили, были использованы те, что подобраны АО «Биннофарм» для субстанции интерферона, а именно: ЭДТА и ацетатный буферный раствор. Для лабораторной разработки использовали многодозовую упаковку, однако, для промышленного производства предлагаем использовать однодозовые буфусы или флаконы-капельницы с помпой, поэтому в состав лекарственной формы консерванты не вводили.

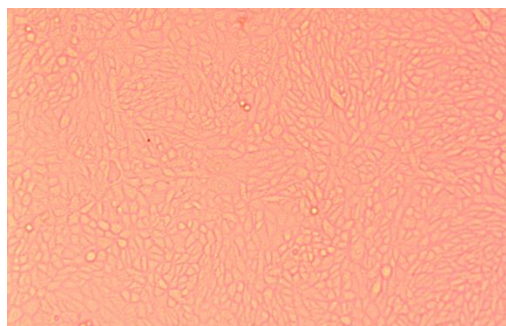
Для выбора гелеобразователя необходимо подтвердить отсутствие у них цитотоксического действия, для этого изучали влияние на клетки МЦ, ГЭЦ и ГМПЦ различных концентраций, результаты представлены в таблице 6.4.

У всех марок гелеобразователей: МЦ марки Metolose™ SM-100 в концентрациях 0,5-1,0%, ГЭЦ марок Natrosol® 250ННХ, Natrosol® 250G и Natrosol® 250Н в концентрациях 0,5-1,5 % и ГМПЦ марки Benecel™ K100M в концентрации 0,5-1,5% цитотоксическое действие на линию клеток Vero отсутствует.

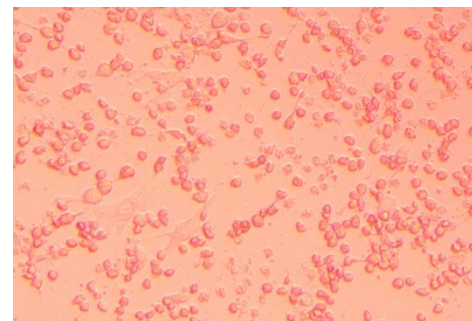
На следующем этапе получали экспериментальные образцы гелей с этими гелеобразователями, составы приведены в таблице 6.5, по следующей технологии: сначала получали буферный ацетатный раствор, в нем растворяли ЭДТА, растворяли гелеобразователи при постоянном перемешивании с использованием верхнеприводной лопастной мешалки IKA Eurostar 20 digital (Германия) до полного растворения. Гели на основе МЦ и ГЭЦ не требовали нагревания, ГМПЦ растворяли при нагревании до 40-45°C на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 Package (IKA Werke, Германия) со скоростью 50 об/мин. Затем полученные гелевые основы помещали в стеклянные флаконы и укупоривали, стерилизовали при температуре 120°C в течение 30 минут в лабораторном стерилизаторе Thermo Scientific (Thermo Fisher, США). Готовили раствор даларгина в ацетатном бурном растворе, объем которого вычитали предварительно из объема основы, на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 Package (IKA Werke, Германия), раствор фильтровали через шприцевой стерилизующий фильтр с диаметром пор 0,22 мкм из полиэфирсульфона с модифицированной поверхностью Merck (Millipore) (Германия). Предварительно оценивали отсутствие сорбции даларгина на мембране фильтра. Для этого в пяти повторностях фильтровали раствор даларгина 0,5мг/мл объемом 10 мл и количественно методом УФ-спектроскопии измеряли содержание ЛВ до фильтрования и после в пяти повторностях.

Таблица 6.4 – Результаты изучения цитотоксичности гелеобразователей

Гелеобразователь	Концентрация в растворе ,%	Разведения испытуемого раствора геля средой ИГЛА						
		1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
Контроль/среда ИГЛА	-	-*	-	-	-	-	-	-
Benecel™ K100M	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-	-	-	-
Natrosol® 250HHX,	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-	-	-	-
	1,5	-	-	-	-	-	-	-
Natrosol® 250G	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-	-	-	-
	1,5	-	-	-	-	-	-	-
Natrosol® 250H	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-	-	-	-
	1,5	-	-	-	-	-	-	-
Metolose™ SM-100	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-	-	-	-
	1,5	-	-	-	-	-	-	-



А



Б

Рисунок 6.2 - Лунки с монослоем клеток линии Vero при увеличении в 100 раз:

А - Изменений нет, по сравнению с контрольными лунками; Б - Повреждение во всех лунках повтора. Монослой клеток уничтожен

Таблица 6.5 – Составы экспериментальных образцов комбинированного геля интерферона альфа-2b и даларгина

Компонент	Составы																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Интерферон альфа-2b, МЕ	6500000																			
Даларгин, мг	0,5																			
Натрия хлорид, г	0,58																			
Натрия ацетат тригидрат, г	0,2																			
ЭДТА, г	0,0058																			
Benecel™ К100М, г	0,5	0,75	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Natrosol® 250ННХ, г	-	-	-	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5												
Natrosol® 250Н, г									0,5	0,75	1,0									
Natrosol® 250G, г												0,5	0,75	1,0	1,25	1,5				
Metolose™ SM-100, г																	0,5	0,75	1,0	1,25
Вода очищенная	До 100 г																			

Таблица 6.6 – Результаты определения ряда технологических показателей качества экспериментальных образцов комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

показатель № образца	Описание	Цветность	Прозрачность	до	после	до	после	Коэффициент агрегативной устойчивости		
				рН стерилизации	рН стерилизации	Вязкость стерилизации, Па·с	Вязкость стерилизации, Па·с	После получения ЛФ	После хранения 48 часов при 20°C	После хранения 7 суток при 20°C
1	однородные прозрачные гели без запаха и механических включений	Бесцветный	Прозрачный соотв. Эталону I	6,41±0,12	6,55±0,12	0,146	0,021	0	0	0
2				6,44±0,11	6,64±0,12	0,177	0,038	0	0	0,02
3				6,47±0,11	6,51±0,10	0,191	0,052	0	0	0,01
4				6,31±0,11	6,79±0,11	0,054	0,053	0	0	0
5				6,32±0,11	6,64±0,11	0,060	0,061	0	0	0
6				6,36±0,12	6,89±0,12	0,079	0,083	0	0	0
7				6,33±0,12	6,59±0,12	0,136	0,134	0	0	0
8				6,32±0,11	6,67±0,11	0,192	0,190	0	0	0
9				6,45±0,13	6,59±0,13	0,050	0,051	0	0	0,02
10				6,47±0,12	6,74±0,12	0,055	0,053	0	0	0
11				6,49±0,14	6,79±0,14	0,087	0,090	0	0	0,04
12				6,38±0,13	6,82±0,13	0,078	0,081	0	0	0,05
13				6,44±0,14	6,85±0,14	0,086	0,085	0	0	0
14				6,50±0,14	6,91±0,14	0,111	0,099	0	0	0
15				6,59±0,14	6,90±0,14	0,123	0,124	0	0	0
16				6,90±0,17	7,50±0,17	0,136	0,138	0	0	0
17				6,32±0,11	6,58±0,11	0,065	0,009	0	0,01	0,3
18				6,34±0,12	6,65±0,12	0,095	0,012	0	0	0,5
19				6,37±0,12	6,49±0,12	0,110	0,020	0	0	0,3
20				6,39±0,12	6,61±0,12	0,129	0,022	0	0,07	0,4

Фильтрацию осуществляли в ламинарном боксе «Ламинар-С» (Россия). В стерильную основу вводили раствор даларгина и субстанцию интерферона в ламинарном боксе, перемешивали на магнитной мешалке ИКА С-MAG HS 7 Package со скоростью 150 об/мин в течение 15 минут.

Полученные составы экспериментальных образцов комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина анализировали по следующим показателям: внешний вид/описание, цветность, прозрачность, pH до и после стерилизации, вязкость до и после стерилизации и коэффициент агрегативной стабильности. Результаты определения данных параметров приведены в таблице 6.6.

Все полученные образцы гелей представляют собой однородные бесцветные прозрачные гели без запаха и механических включений, достаточно агрегативно стабильны, кроме гелей на основе МЦ, у которых коэффициент агрегативной стабильности вырастает через неделю хранения. Важным параметром качества является pH, белки и пептиды чувствительны к этому параметру и недопустимо, чтобы он значительно возрастал после стерилизации или в процессе хранения, эти ЛВ наиболее стабильны при pH 5,5 – 7,0. У образца 16 с содержанием ГЭЦ марки Natrosol® 250G этот показатель после стерилизации вырос на 0,6 и достиг в среднем 7,5, что не допустимо. Вязкость гелей еще один важный параметр, который должен быть стабилен после стерилизации, однако у образцов на основе ГМПЦ № 1-3 и МЦ с 17-20, вязкость резко упала после стерилизации, что так же не приемлемо. Составы образцов, выделенных в таблице цветом, по вышеуказанным причинам были исключены из дальнейших исследований.

Для оставшихся образцов № 4-15 изучали осмотическую активность, стабильность вязкости в процессе ускоренного хранения в течение 3 месяцев при 20°C, предел текучести по Кессону и соотносили эти данные с приведенными в главе 3 реологическими оптимумами для офтальмологических гелей: оптимум пластической вязкости (по Кэссону) от 0,121 до 0,188 Па·с и предела текучести – от 9,3 до 23,7 Па (таблица 6.9).

У всех изучаемых образцов вязкость была стабильна в течение 3 месяцев

наблюдения, однако, под заданные оптимумы подходят только два образца № 7 и № 15. Осмотическая активность гелей влияет на их переносимость и ощущения при применении, если она высокая, то пациент может испытывать чувство жжения на слизистой оболочке глаза или ощущение стянутости. Как видно из данных таблицы 6.7 образцы с 4-8 на основе Natrosol® 250ННХ имеют меньшую осмотическую активность, чем образцы на основе Natrosol® 250Н и Natrosol® 250G. Максимальную активность проявляет образец №15, в связи с чем, его исключили из дальнейшей разработки.

Данные по результатам осмотической активности экспериментальных образцов сравнивали с определением этого показателя у зарегистрированных на российском фармацевтическом рынке офтальмологических гелей, измеренных при тех же условиях. Результаты опубликованы [25] и представлены в таблице 6.8.

Таблица 6.7 – Пластическая вязкость и предел текучести образцов гелей далааргина и интерферона

показатель образец №	Пластическая вязкость по Кэссону, Па·с			Предел текучести по Кэссону, Па	Осмотическая активность, %	
	0 месяцев при 25°C	1 месяц при 25°C	3 месяца при 25°C		1 час	24 часа
4	0,054	0,055	0,054	4,82	31,7±3,0	69,3±3,0
5	0,060	0,060	0,061	4,85	28,2±3,0	75,0±3,0
6	0,079	0,079	0,079	8,13	30,4±3,0	78,5±3,0
7	0,136	0,135	0,135	9,64	33,7±3,0	83,34±3,0
8	0,192	0,191	0,192	11,83	53,5±3,0	102,4±3,0
9	0,050	0,051	0,051	3,44	98,8±3,0	183,3±3,0
10	0,055	0,055	0,055	4,21	125,7±3,0	253,0±3,0
11	0,087	0,087	0,087	4,32	144,1±3,0	258,1±3,0
12	0,078	0,080	0,080	7,65	154,1±3,0	284,6±5,0
13	0,086	0,088	0,088	8,34	185,7±3,0	300,98±5,0
14	0,011	0,010	0,011	8,55	198,4±3,0	310,0±5,0
15	0,123	0,123	0,123	9,52	265,5±3,0	347,7±5,0

Таблица 6.8 – Осмотическая активность офтальмологических коммерческих гелей в сравнении с изотоническим раствором натрия хлорида

Название ЛП	Состав	Осмотическая активность, %	
		1 час	24 часа
Эталон/раствор сравнения	0,9% раствор натрия	62,58±3,0	456,22±5,0
Солкосерил®	Солкосерил, 8,3 мг; Бензалкония хлорид 0,06 мг; Кармеллоза натрия, 13 мг; Динатрия эдетата дигидрат, 1,0 мг; Сорбитол 70%, 50 мг; Вода для инъекций, до 1,0 г	60,3±3,0	137,2±5,0
Офтагель®	Карбомер 974Р 2,5 мг; Бензалкония хлорид — 0,06 мг; Сорбитол — 45 мг; Лизина моногидрат — 4,7 мг; Натрия ацетат — 0,7 мг; Поливиниловый спирт — 5 мг; Вода для инъекций — 942,04 мг	35,3±3,0	117,5±5,0
Видисик®	Карбомер 2 мг; Цетримид – 0.1 мг; Сорбитол – 40 мг, Натрия гидроксид – 0.84 мг, Вода для инъекций – 957.06 мг.	165,6±3,0	298,5±5,0
Лакропос®	Карбомер 980 2 мг; Сорбитол — 40 мг; Цетримид — 0,1 мг; Натрия гидроксид — 0,83 мг; Динатрия эдетат — 0,0375 мг; Вода для инъекций — 957,0325 мг	189,6±3,0%	312,1±5,0
Корнерегель®	Дексапантенол 50 мг; Цетримид; Динатрия эдетат; Карбомер; Натрия гидроксид; Вода для инъекций	76,7±3,0%	319,4±5,0%
Декспантель®	Дексапантенол 50 мг; Цетримид; Динатрия эдетат; Карбомер; Натрия гидроксид; Вода очищенная	83,2±3,0%	311,1±5,0%

Для грамотной оценки осмотических характеристик гелей необходимым критерием является проведение контрольного опыта с изотоническим раствором (0,9% раствором натрия хлорида), для достоверной оценки данного показателя,

соответственно образцы имеющую более высокую чем у натрия хлорида осмотическую активность можно отнести к гиперосмолярным. Выбранный по реологическим параметрам образец №7 является гипотоническим, значит не будет оттягивать на себя влагу, а наоборот будет увлажнять слизистую оболочку.

Для образца №7 получали реологические кривые, показанные на рисунке 6.3, демонстрирующие наличие тиксотропных свойств у обоих образцов геля как в условиях производства и применения, так и при высокой скорости сдвига, соответствующей процессу моргания. Это говорит о том, что образцы после нанесения не будут «разжижаться» и будут равномерно распределяться по слизистой оболочке глаза.

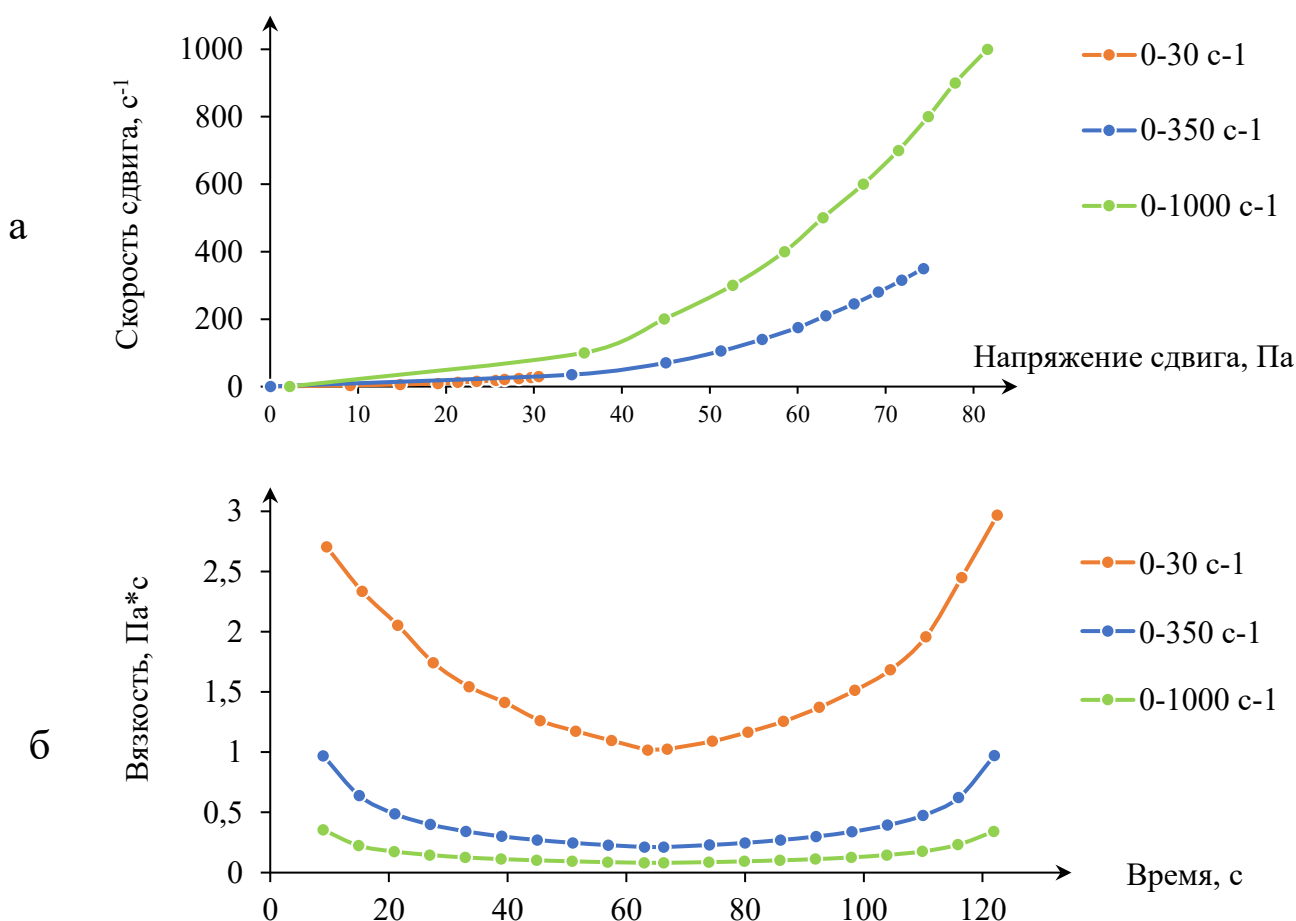


Рисунок 6.3 – Кривые течения (а) и крива вязкости (б) образца №7 комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

Для выбранного состава №7 изучали биоадгезивные свойства по методам 1-3, описанным в главе 2, в сравнении с коммерческими ЛП в виде офтальмологических гелей [3, 169]. Результаты представлены в таблице 6.9.

Таблица 6.9 – Биоадгезия офтальмологических гелей интерферона и даларгина

Образец	Скорость потока 20°C Метод 1, мм/с	Скорость потока 37°C Метод 1, мм/с	Скорость потока Метод 2, мм/с	Сила отрыва, Н Метод 3
№ 7 геля интерферона альфа-2b и даларгина	0,031 ±0,004	0,025 ±0,003	0,023 ±0,003	118,6 ±2,9
Солкосерил®	0,421 ±0,013	0,301 ±0,012	0,361 ±0,011	25,8 ±0,9
Офтагель®	0,038 ±0,006	0,028 ±0,007	0,044 ±0,005	97,5 ±1,5
Видисик®	0,981 ±0,025	1,012 ±0,023	1,522 ±0,121	10,2 ±0,8
Лакропос®	1,121 ±0,091	1,221 ±0,085	1,453 ±0,099	12,4 ±0,6
Корнерегель®	0,359 ±0,025	0,389 ±0,022	0,325 ±0,019	32,5 ±1,1
Декспантель®	0,281 ±0,018	0,329 ±0,017	0,126 ±0,009	44,2 ±0,5

Чем меньше скорость потока, тем выше биоадгезивные свойства. Как видно из представленных данных самой низкой скоростью потока обладает разработанный экспериментальный образец геля интерферона альфа-2b и даларгина, близкой к офтагелю, и гораздо лучшими биоадгезивными свойствами по сравнению с другими образцами. При этом скорость потока у разработанного геля уменьшается при повышении температуры с 0,031 ±0,004 мм/с до 0,025 ±0,003 мм/с, что возможно позволит ЛФ более длительно находиться на слизистой оболочке. Данные, полученные методом 1 и 2 соотносятся. По силе отрыва разработанный состав также является лучшим (118,6 ±2,9 Н), так как требуется большее усилие для его отрыва от геля муцина.

На следующем этапе исследования проводили тест «Растворение» для образца № 7 комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина по методике, описанной в главе II. На рисунке 6.4 приведены результаты кривые высвобождения интерферона и даларгина из ЛФ. Для данного теста лимитирующим показателем является диаметр пор. В работе использовали диализную пленку с диаметром пор, через которые проходят молекулы белка и пептида, однако она крупнее, чем поры кожи и слизистой оболочки. По

результатам теста, можно сказать, что высвобождение из ЛФ замедленно и достаточное полное.

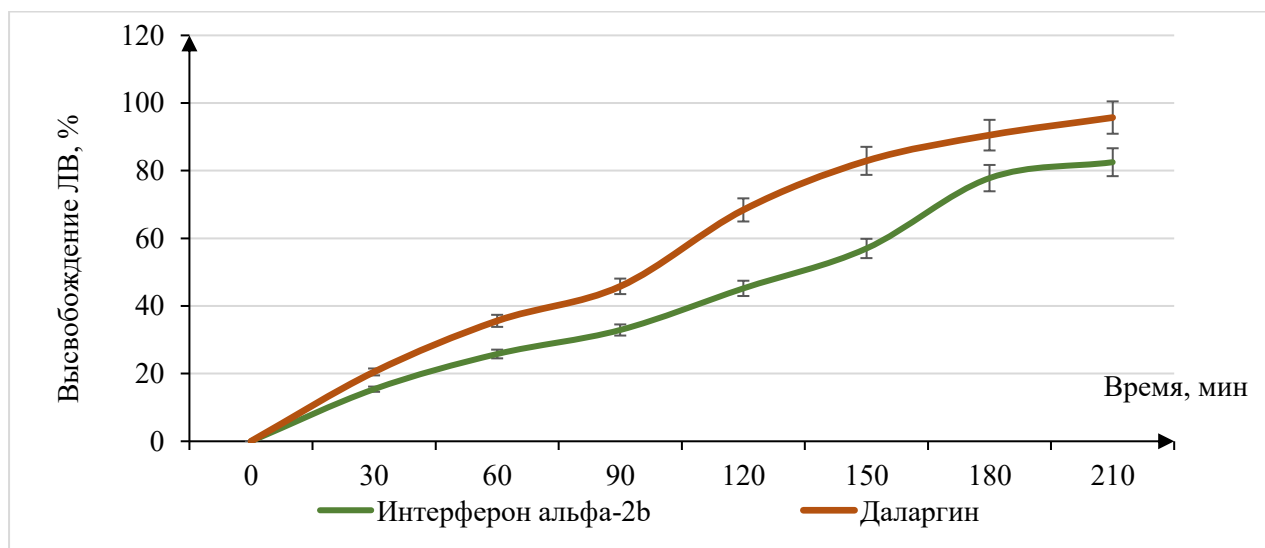


Рисунок 6.4 – Зависимость концентрации ЛВ (интерферона и даларгина) в среде искусственной слезной жидкости от времени

На основании проведенных исследований выбран состав комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина, указанный в таблице 6.10.

Таблица 6.10 – Состав комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

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

6.1.4. Технология получения комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

Были разработаны методы анализа комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2 и даларгина, описанные в Главе 2, и получена спецификация на готовую ЛФ, приведенная в Приложении А. Субстанция интерферона контролируется по показателям специфических белковых примесей, остаточных белков штамма продуцента, остаточной ДНК клеток продуцента и остаточного ацетонитрила, так как ВВ и технология получения ЛФ не могут быть источниками данных примесей, то в ЛФ не определяют. Кроме того, за счет разведения субстанции более чем на четыре порядка аналитическими методами определить эти показатели не представляется возможным. Так же, как отсутствует показатель количественное содержание интерферона альфа-2b и общего белка, вследствие нечувствительности методов. Разработанная технология приведена ниже.

Описание производственного процесса

Технологический процесс получения комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина в лабораторных условиях с размером серии 10-100 туб состоит из следующих стадий и операций:

ВР 4. Подготовка сырья.

ВР 4.1. Подготовка субстанции интерферона альфа-2b. Субстанцию интерферона, которая поставляется в замороженном виде и хранится при температуре не выше минус 40°C, перед началом технологического процесса необходимо разморозить. Размораживание проводят в холодильнике в течение 24 часов при температуре 2-8°C

ВР 4.2. Взвешивание даларгина и ВВ. Взвешивание сырья производится на лабораторных весах A&D GX-600 (Япония), воду очищенную отмеряют цилиндром.

ТП 5. Получение гелевой основы.

ТП 5.1. Получение буферного раствора. Натрия хлорид, натрия ацетат тригидрат и дигидрат динатриевой соли этилендиамин тетрауксусной кислоты растворяют в рассчитанном объеме воды очищенной в подходящей емкости на верхнеприводной мешалке ИКА Eurostar 20 digital (Германия) (скорость вращения 100-150 об/мин) до полного растворения в течение 10-20 минут при визуальном контроле, температура комнатная. Фильтрацию буферного раствора осуществляют через шприцевой фильтр или фильтровальную установку, выбор которой зависит от размера получаемой серии. Мембрана фильтра - полиэфирсульфон от компании Merck (Millipore) (Германия) с диаметром пор 0,3 мкм. Часть раствора в объеме (зависит от объема серии) достаточном для растворения субстанции даларгина отливают в стеклянный флакон с крышкой и помещают в ламинарный бокс при комнатной температуре. Выбор материала фильтра осуществлялся на основе отсутствия сорбции ЛВ на мембране фильтра. Так как буферный раствор входит в состав основы или раствора даларгина, которые будут подвергаться термической стерилизации или стерилизующей фильтрации, соответственно, то на данном этапе проводили фильтрацию от механических включений и размер фильтра выбрали 0,3.

ТП 5.2. Растворение гелеобразователя в буферном растворе. Не выключая мешалку, в полученную воронку медленно вводят ГЭЦ марки Natrosol® 250 ННХ и уменьшив скорость вращения мешалки до 75-100 об/мин растворяют полимер до получения прозрачного геля в течение 15-60 мин в зависимости от объема серии. Температура растворения комнатная.

ТП 5.3. Стерилизация гелевой основы. Основу переливают в стеклянные флаконы укупоривают резиновой крышкой вручную и вальцуют алюминиевым колпачком с помощью ручной машины для вальцовки флаконов (Россия). Затем стерилизуют при температуре $120 \pm 5^\circ\text{C}$ и давлении 120 ± 5 кПа в течение $30 \pm 2,5$ минут в лабораторном стерилизаторе Thermo Scientific (Thermo Fisher, США), время стерилизации подбирали эмпирически, основываясь на режимы работы автоклава и ОФС 1.1.0016.18 «Стерилизация».

ТП 6. Получение раствора даларгина.

ТП 6.1. Растворение даларгина в буферном растворе. Рассчитанное на серию количество порошка субстанции даларгина растворяют в буферном растворе на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 Package (IKA Werke, Германия) со скоростью 75-150 об/мин в течение 15-25 минут при температуре 20-25°C.

ТП 6.2. Фильтрация раствора даларгина через фильтр 0,22 мкм. Раствор даларгина фильтруют через шприцевой стерилизующий фильтр с диаметром пор 0,22 мкм из полиэфирсульфона с модифицированной поверхностью Merck (Millipore) (Германия) в предварительно простерилизованный стеклянный флакон в ламинарном боксе «Ламинар-С» (Россия), укупоривают стерильной резиновой крышкой.

ТП 7. Введение в основу раствора даларгина и интерферона. В основу вводят раствор даларгина и субстанцию интерферона в ламинарном боксе, перемешивают на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 Package со скоростью 100-150 об/мин в течение 15-30 минут в зависимости от объема серии.

ТП 8. Наполнение туб. Алюминиевые тубы с мембраной и пластиковыми колпачками, производства Россия объемом 10 мл заполняют гелем на ручном дозаторе кремов и мазей Smartcream, производства FARMALABOR, с контролем массы по 10 г в ламинарном боксе. Затем тубы закрывают ручным станком для укупорки (закрытия) тубиков Flash Z-01 (Россия).

УМО 9. Маркировка и вторичная упаковка.

УМО 9.1. Маркировка. На тубы вручную наклеивают этикетки.

УМО 9.2. Вторичная упаковка. Вручную упаковывают в белые картонные коробки, на которые также вручную наклеивают этикетки.

В таблице 6.11 указаны параметры контроля промежуточных продуктов и готовой ЛФ при лабораторном производстве ЛФ.

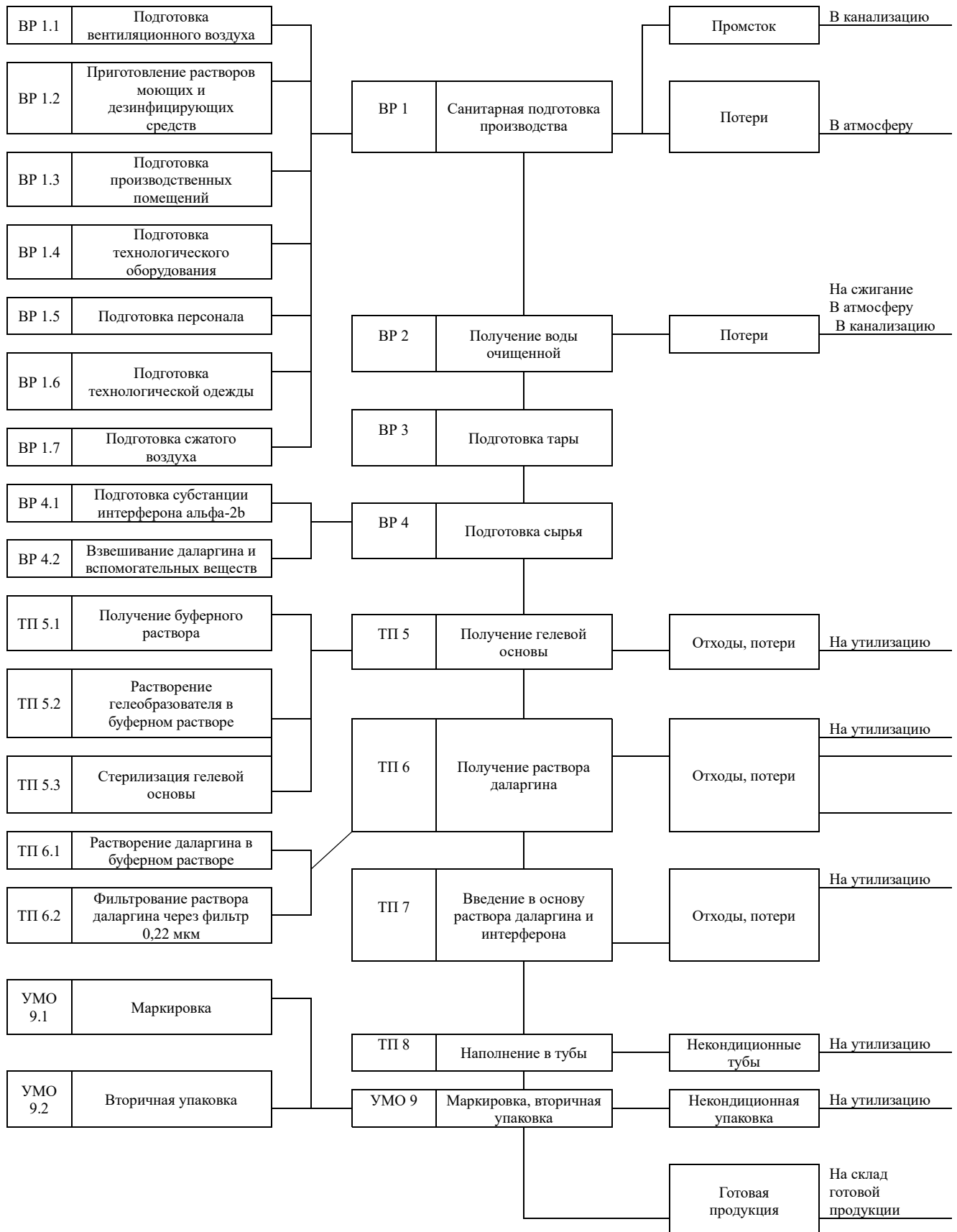


Рисунок 6.5 – Технологическая схема получения комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

Таблица 6.11 – Показатели для лабораторного контроля промежуточных продуктов и готовой лекарственной формы

Промежуточный/готовый продукт	Наименование показателя	Норма
Буферный раствор	pH	6,0- 7,0
Гелевая основа простерилизованная	Внешний вид	Прозрачный текучий гель, однородный, без механических включений
	pH	6,0- 7,0
	Осмолярность	239–376 мОсм/л
Раствор даларгина	pH	6,0- 7,0
Тубы наполненные	Масса наполнения	Не менее 10,5 г
	Качество укупорки	Визуально отсутствие повреждений упаковки
Готовый продукт	Описание	Прозрачный бесцветный гель, не содержащий видимых частиц
	Идентификация: Интерферона альфа -2b Даларгина	Реакция нейтрализации. Соответствует интерферону человеческого альфа-типа Подлинность даларгина определяли методом спектрофотометрии в среде искусственной слезной жидкости в диапазоне от 250 до 300 нм при длине волны 275 ± 2 нм должен наблюдаться максимум ВЭЖХ должен наблюдаться пик соответствующий стандарту даларгина
	Прозрачность	Препарат должен быть прозрачным
	Осмолярность	239–376 мОсм/л.
	pH	От 6,0 до 7,0.
	Механические включения -видимые невооружённым глазом	В соответствии с требованиями. Частиц размером 10 мкм и более – не более 6000 в тубе
	Стерильность	Препарат должен быть стерильным
	Вязкость	0,120-0,145 Па·с
	Специфическая активность	Не менее 50000 МЕ в 1 г

Продолжение Таблицы 6.11

Промежуточный/готовый продукт	Наименование показателя	Норма
Готовый продукт	Количественное определение даларгина	0,475 – 0,525 мг в 1 г
	Металлические частицы	Общее число металлических частиц, размер которых составляет от 50 до 90 мкм во всех 30 тубах не должно превышать 150 частиц, и если не более чем в 3 тубах содержится 9 или более частиц указанной величины (в каждой из туб). Не допускается наличие частиц с максимальным размером более 90 мкм.
	Масса содержимого упаковки	Не менее 9,5 г
	Герметичность упаковки	Должна быть герметична

6.1.5. Изучение возможности трансфера и масштабирования технологии производства комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

Для офтальмологического геля оценивали возможность трансфера разработанной технологии в другую лабораторию для наработки серий для доклинических исследований и на производство для получения опытно-промышленных серий. Для этого изучили параметры процесса производства и предложили параметры для трансфера и масштабирования (таблица 6.14). При разработке лабораторной технологии в состав вводили воду очищенную, а для масштабирования для снижения рисков контаминации предлагаем использовать ВДИ. Как видно из таблицы 6.12 для производства препарата требуется стандартное промышленное оборудование, подобраны технологические параметры производства.

Таблица 6.12 – Рекомендуемые параметры процесса производства комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

Этап/наименование	Параметр	Фактическое значение при лабораторной разработки	Предлагаемый диапазон для трансфера и масштабирования
Параметры процесса получения гелевой основы			
Растворение компонентов буферного раствора и фильтрование раствора	Оборудование	Стекланный стакан с верхнеприводной мешалкой IKA Eurostar 20 digital	Промышленный реактор с лопастной или якорной мешалкой с паровой рубашкой, с охлаждением
	Последовательность загрузки	ЭДТА Натрия хлорид Натрия ацетат тригидрат	ЭДТА Натрия хлорид Натрия ацетат тригидрат
	Время растворения	10-20	20-30
	Температура воды, °С	Комнатная	50-85 (в зависимости от температуры воды для инъекций, поступающей по системе водоподачи)

Продолжение Таблицы 6.12

Этап/наименование	Параметр	Фактическое значение при лабораторной разработки	Предлагаемый диапазон для трансфера и масштабирования
Параметры процесса получение гелевой основы			
Растворение компонентов буферного раствора и фильтрование раствора	Скорость мешалки, об/мин	100-150	Зависит от типа мешалки Лопастная 100-150 Якорная 30-50
	Материал фильтра	Полиэфирсульфон	Полиэфирсульфон
Введение гелеобразователя ГЭЦ	Скорость мешалки, об/мин	75-100	Зависит от типа мешалки Лопастная 75-100 Якорная 15-35
	Время перемешивания, мин	15-60	60-210
Стерилизация	Оборудование	Автоклав лабораторный	Реактор с возможностью автоклавирования или промышленный автоклав
	Время, мин	30	Если реактор с возможностью стерилизации, то зависит от объема серии. Если в промышленном автоклаве, то зависит от объема емкостей 45-120 мин
	Температура, °	120	120-125
	Давление, кПа	120	120-125
Охлаждение	Температура, °C	до комнатной температуры	20-25
Параметры процесса получения раствора даларгина			
Растворение	Оборудование	Стекланный флакон, магнитная мешалка IKA C-MAG HS 7 Package	Реактор с лопастной или якорной мешалкой
	Время растворения	15-25	20-45
	Скорость мешалки, об/мин	75-150	Зависит от типа мешалки Лопастная 75-150 Якорная 25-50
Фильтрование	Материал фильтра	Полиэфирсульфон	Полиэфирсульфон

Продолжение Таблицы 6.12

Этап/наименование	Параметр	Фактическое значение при лабораторной разработки	Предлагаемый диапазон для трансфера и масштабирования
Параметры процесса получения гелевой основы			
Параметры процесса введения в гелевую основу интерферона альфа-2b и раствора даларгина			
Растворение	Оборудование	Стеклоанный флакон, магнитная лабораторная мешалка IKA C-MAG HS 7 Package	Реактор с лопастной или якорной мешалкой
	Время растворения	15-30	30-60
	Скорость мешалки, об/мин	100-150	Зависит от типа мешалки Лопастная 100-150 Якорная 30-50
Параметры процесса фасовки			
Фасовочно—упаковочная линия	Оборудование	Ручной дозатор кремов и мазей Smartcream, FARMALABOR	Автоматическая тубонаполняющая машина
	Масса наполнения, г	9,5-11,0	10,2-11,0

В таблице 6.13 указаны контрольные точки производства для процесса масштабирования производства ЛФ.

Таблица 6.13 – Стратегия внутрипроизводственного контроля комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина/ перечень контрольных точек для масштабирования процесса производства

<i>Наименование стадии</i>	<i>Наименование объекта контроля</i>	<i>Наименование контролируемого параметра, единицы измерений</i>	<i>Регламентированный Норматив (значение параметра)</i>
ВР 4. Подготовка сырья.			
ВР 4.1. Подготовка субстанции интерферона альфа-2b	Субстанция интерферона альфа-2b	Температура, °С Время, ч	2-8 24 часа
ВР 4.2. Взвешивание даларгина и вспомогательных веществ	Субстанции даларгина Гидроксиэтилцеллюлозы марки Natrosol® 250 ННХ Натрия хлорида Натрия ацетата тригидрата ЭДТА	Масса, г	в зависимости от объёма серии в соответствии с технологическими инструкциями
ТП 5. Получение гелевой основы.			
ТП 5.1. Получение буферного раствора	Буферный раствор	Время перемешивания, мин Скорость перемешивания, об/мин Температура воды, °С рН Скорость фильтрования Размер пор, мкм Целостность фильтра	20-30 100-150 55-85 6,0-7,0 По факту 0,35 Должен быть целым
ТП 5.2. Растворение гелеобразователя в буферном растворе	Основа не простерилизованная	Время перемешивания, мин Скорость перемешивания, об/мин	60-210 75-100
ТП 5.3. Стерилизация гелевой основы	Стерильная гелевая основа	Температура, °С Давление, Па Время, мин Осмолярность Стерильность	120-125 120-125 45-120 239–376 мОсм/л Должна быть стерильна

Продолжение Таблицы 6.13

<i>Наименование стадии</i>	<i>Наименование объекта контроля</i>	<i>Наименование контролируемого параметра, единицы измерений</i>	<i>Регламентированный Норматив (значение параметра)</i>
ВР 4. Подготовка сырья.			
ТП 6. Получение раствора даларгина			
ТП 6.1. Растворение даларгина в буферном растворе	Раствор даларгина	Время перемешивания, мин Скорость перемешивания, об/мин	20-45 75-150
ТП 6.2. Фильтрация раствора даларгина через фильтр 0,22 мкм	Раствор даларгина стерильный	Скорость фильтрации Размер пор, мкм Целостность фильтра Стерильность	По факту 0,22 Должен быть целым Должен быть стерильным
ТП 7. Введение в основу раствора даларгина и интерферона	Комбинированный офтальмологический гель интерферона альфа-2b и даларгина нерасфасованный	Время перемешивания, мин Скорость перемешивания, об/мин	30-40 100-150
ТП 8. Наполнение туб	Комбинированный офтальмологический гель интерферона альфа-2b и даларгина расфасованный	Масса, г Контроль качества укупорки Герметичность упаковки	9,5 – 11,0 Визуально отсутствие повреждений Должна быть герметична
УМО 9. Маркировка и вторичная упаковка.			
УМО 9.1. Маркировка	Комбинированный офтальмологический гель интерферона альфа-2b и даларгина в первичной упаковке	Контроль качества маркировки	Визуально отсутствие повреждений
УМО 9.2. Вторичная упаковка	Комбинированный офтальмологический гель интерферона альфа-2b и даларгина	Контроль качества упаковки	Визуально отсутствие повреждений

Для процесса масштабирования производства является крайне значимым анализ рисков параметров технологического процесса, который проводили в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической N 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

В таблице 6.14 приведена оценка уровня риска технологического процесса, а в таблице 6.15 дано обоснование этого риска и мероприятия для снижения риска на этапе масштабирования и валидации технологического процесса. Был проведён трансфер технологии в лабораторию R&D центра ПФК «АЛИУМ» и на производственную площадку АО «Биннофарм» (Акты о внедрении Приложение Г).

Таблица 6.14 – Оценка уровня риска технологического процесса

Этап процесса	Критический параметр качества (Critical Quality Attribute)							
	Содержание интерферона альфа-2b	pH	Осмолярность	Количественное содержание даларгина	Видимые механические частицы	Вязкость	Стерильность	Герметичность
Взвешивание	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий
Получение гелевой основы	Низкий	Средний	Средний	Низкий	Средний	Средний	Средний	Низкий
Получение раствора даларгина	Низкий	Средний	Низкий	Средний	Средний	Низкий	Средний	Низкий
Введение раствора даларгина и субстанции интерферона альфа-2b в гелевую основу	Средний	Средний	Низкий	Средний	Средний	Низкий	Средний	Низкий
Наполнение туб	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Средний	Низкий	Средний	Средний

Таблица 6.15 – Обоснование уровня риска этапов технологического процесса

Этап	Критический параметр качества ЛП (Critical Quality Attribute)	Оценка риска	Обоснование и мероприятия для снижения риска
Взвешивание	Содержание интерферона альфа-2b	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как взвешивание не оказывает влияния на данный критический параметр
	pH	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как проводится контроль взвешивания

Продолжение Таблицы 6.15

Этап	Критический параметр качества ЛП (Critical Quality Attribute)	Оценка риска	Обоснование и мероприятия для снижения риска
Взвешивание	Осмолярность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как проводится контроль взвешивания
	Количественное содержание даларгина	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как проводится контроль взвешивания
	Видимые механические частицы	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как в дальнейшем проводится фильтрование растворов
	Вязкость	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как проводится контроль взвешивания
	Стерильность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как взвешивание проводится в ламинарном потоке в помещении не ниже класса чистоты С
	Герметичность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как взвешивание не оказывает влияния на данный критический параметр
Получение гелевой основы	Содержание интерферона альфа-2b	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение основы не оказывает влияния на данный критический параметр
	pH	Средний	Если компоненты буферного раствора не до конца растворились, или были не верно отвешены возможно получение неправильного значения Запланированные мероприятия: внутрипроизводственный контроль показателя.
	Осмолярность	Средний	Если компоненты буферного раствора не до конца растворились, или были не верно отвешены возможно получение неправильного значения Запланированные мероприятия: внутрипроизводственный контроль показателя.
	Количественное содержание даларгина	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение основы не оказывает влияния на данный критический параметр
	Видимые механические частицы	Средний	Механические частицы могут попасть в раствор из сухих субстанций компонентов буферного раствора или не полного их растворения Запланированные мероприятия: фильтрование буферного раствора через фильтр с диаметром пор 0,3 мкм и внутрипроизводственный контроль показателя на этапе валидации технологического процесса

Продолжение Таблицы 6.15

Этап	Критический параметр качества ЛП (Critical Quality Attribute)	Оценка риска	Обоснование и мероприятия для снижения риска
Получение гелевой основы	Вязкость	Средний	Если компоненты буферного раствора не до конца растворились, нарушены технологические режимы стерилизации, но может произойти изменение выход значения показателя из проектного поля. Запланированные мероприятия: контроль показателя на этапе валидации технологического процесса
	Стерильность	Средний	После стерилизации основы в зависимости от метода проведения возможно наличие недопустимых микроорганизмов Запланированные мероприятия: внутрипроизводственный контроль показателя
	Герметичность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение гелевой основы не оказывает влияния на данный критический параметр
Получение раствора даларгина	Содержание интерферона альфа-2b	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как растворение даларгина не оказывает влияния на данный критический параметр
	pH	Средний	Риск оценивается как средний так как pH раствора может повлиять количество введенного в раствор даларгина Запланированные мероприятия: внутрипроизводственный контроль показателя
	Осмолярность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение гелевой основы не оказывает влияния на данный критический параметр, поскольку основной вклад в осмолярность вносят компоненты буферного раствора и основы
	Количественное содержание даларгина	Средний	Риск оценивается как средний так как скорость перемешивания и время перемешивания влияют на его полноту Запланированные мероприятия: на этапе валидации технологического процесса подобрать время и скорость перемешивания и проводить внутрипроизводственный контроль показателя
	Видимые механические частицы	Средний	Риск оценивается как средний, так с субстанцией даларгина могут попасть механические частицы Запланированные мероприятия: контроль данного параметра на этапе валидации процесса

Продолжение Таблицы 6.15

Этап	Критический параметр качества ЛП (Critical Quality Attribute)	Оценка риска	Обоснование и мероприятия для снижения риска
Получение раствора даларгина	Вязкость	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение раствора даларгина не оказывает влияния на данный критический параметр ЛП
	Стерильность	Средний	Риск оценивается как средний так как, могут проскакивать примеси при фильтровании Запланированные мероприятия: контроль данного параметра на этапе валидации процесса
	Герметичность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение раствора даларгина не оказывает влияния на данный критический параметр ЛП
Введение раствора даларгина и субстанции интерферона альфа-2b в гелевую основу	Содержание интерферона альфа-2b	Средний	Риск оценивается как средний, так как от времени и скорости перемешивания зависит распределение АФС в смеси. Запланированные мероприятия: контроль содержания и подбор скорости и времени на этапе валидации
	pH	Средний	Риск оценивается как средний, так как распределение ЛВ оказывают влияния pH. Запланированные мероприятия: внутрипроизводственный контроль показателя.
	Осмолярность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение гелевой основы не оказывает влияния на данный критический параметр, поскольку основной вклад в осмолярность вносят компоненты буферного раствора и основы
	Количественное содержание даларгина	Средний	Риск оценивается как средний, так как от времени перемешивания зависит распределение АФС в смеси. Запланированные мероприятия: контроль содержания на этапе валидации
	Видимые механические частицы	Средний	Риск оценивается как средний, так как введение ЛВ в основу осуществляется в помещении класса А. Запланированные мероприятия: контроль параметра на этапе валидации
	Вязкость	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как введение ЛВ в основу не оказывает влияния на данный критический параметр ЛП, и он контролируется у готовой ЛФ

Продолжение Таблицы 6.15

Этап	Критический параметр качества ЛП (Critical Quality Attribute)	Оценка риска	Обоснование и мероприятия для снижения риска
Введение раствора даларгина и субстанции интерферона альфа-2b в гелевую основу	Стерильность	Средний	Риск оценивается как средний, так как введение ЛВ в основу осуществляется в помещении класса А. Запланированные мероприятия: контроль параметра на этапе валидации
	Герметичность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как введение ЛВ в основу не оказывает влияния на данный критический параметр ЛП
Наполнение туб	Содержание интерферона альфа-2b	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как наполнение не оказывает влияния на критические параметры лекарственного препарата
	Осмолярность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как наполнение не оказывает влияния на данный критический параметр лекарственного препарата
	pH	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как наполнение не оказывает влияния на данный критический параметр лекарственного препарата
	Количественное содержание даларгина	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как наполнение не оказывает влияния на данный критический параметр лекарственного препарата
	Вязкость	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как наполнение не оказывает влияния на данный критический параметр лекарственного препарата
	Видимые механические частицы	Средний	Риск оценивается как средний, так как наполнение туб осуществляется в помещении класса А. Запланированные мероприятия: контроль параметра на этапе валидации
	Стерильность	Средний	Риск оценивается как средний, так как наполнение туб осуществляется в помещении класса А. Запланированные мероприятия: контроль параметра на этапе валидации
	Герметичность	Средний	Риск оценивается как средний, так как качество укупорки будет напрямую влиять на герметичность. Запланированные мероприятия: внутрипроизводственный контроль и контроль параметра на этапе валидации

Лабораторные серии упаковывали в алюминиевые тубы в виду их доступности, однако, при масштабировании процесса возможно перейти на однократную первичную упаковку типа «буфус» (рисунок 6.5) или использовать алюминиевые тубы меньшего объема, например 5 мл, для снижения риска контаминации. В качестве первичной упаковки возможно рассмотреть флаконы со специальными дозаторами, обеспечивающими стерильность каждой новой дозы, например представленный на рисунке 6.6 Б офтальмологические дозаторы Aptar Pharma (США, производство Индия), имеющие запатентованный наконечник диспенсера с помощью которого механически «выжимается» доза препарата, кроме того его поверхность содержит в качестве антибактериального покрытия ионы серебра [324].

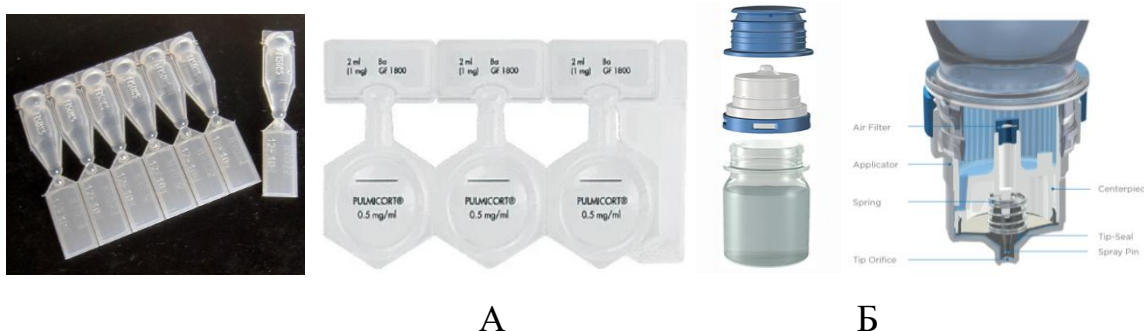


Рисунок 6.6 – Альтернативная первичная упаковка *preservatives-free* для комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина:
А- буфусы полимерные, 1,2 мл; Б – офтальмологические дозаторы Aptar Pharma

6.1.6. Изучение стабильности и определение срока годности комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

Изучение стабильности комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина проводили в соответствии с ОФС.1.1.0009 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» ГФ РФ и решению

Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10.05.2018 N 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций». При лабораторной разработке ЛП на первом этапе важно оценить стабильность ЛФ в условиях хранения, это 2-8°C. Для этого получали 3 серии ЛФ в количестве по 100 туб и оценивали качество препарата по всем параметрам в первичной упаковке спецификации (Приложение А) через временные промежутки, указанные в таблицах 15 и 16 Приложение Б, так как температура хранения препарата указана в интервале 2-8°C, то оценивали стабильность препарата отдельно при температуре 2°C и отдельно 8°C. По результатам изучения стабильности комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина в естественных условиях хранения можно сделать вывод, что разработанная ЛФ стабильна и имеет срок годности 2 года, что соотносится с другими офтальмологическими ЛП интерферона.

Для трансфера технологии в другую лабораторию или на производство необходимо оценить стабильности препарата после хранения при комнатной температуре (20-25°C) в течении 24 часов. Это необходимо, так как технологический процесс производства осуществляется при комнатной температуре и если реакторы, в которых идет получение ЛФ, как правило имеют рубашки для охлаждения, то оборудование для розлива в первичную упаковку, картонажные и экипировочные машины находятся в помещении без возможности охлаждения. Кроме того, серия препарата некоторое время хранится в производственном помещении, прежде чем ее отправят на слад. Для того, чтобы была возможность наладки оборудования, его ремонта, накопления продукции до оправки на слад оценивают влияние данного параметра на стабильность хранения в естественных условиях в течении всего срока годности. Результаты показаны в таблице 17 Приложение Б, отклонений от спецификации в показателях качества исследуемого ЛФ в течении 24 месяцев хранения не обнаружено.

Еще одним важным параметром для стабильности препарата является стресс-устойчивость. Для разрабатываемой ЛФ таким параметром может быть замораживание, которое может произойти при транспортировке препарата,

например, зимой из производства на склад готовой продукции или при доставке в аптеки с дистрибьютерского склада, или при нарушении логистической температурной цепи. По результатам исследования стабильности в стресс-условиях отклонений от спецификации в показателях качества исследуемого ЛС при изучении стабильности в условиях ниже -20°C в заявленном виде упаковки в течение 24 часов не обнаружено (таблица 18 Приложение Б).

Повышенную температуру и УФ-излучение как стресс показатели не изучали, у производителя есть данные по субстанции и раствору для инъекций для интерферона альфа-2b. В дальнейшем данные показатели будут изучены для комбинированной ЛФ, они включены в программу изучения стабильности, но не вошли в данную работу.

6.1.7. Изучение местно-раздражающего действия комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина

Результаты оценки интенсивности местно-раздражающего действия комбинированного офтальмологического геля интерферона и даларгина, представлены в таблице 6.16. Гель практически не вызывает местную реакцию на слизистой оболочке глаза, и его действие соответствует «слабому или отсутствует».

Таким образом, разработанный офтальмологический гель не обладает местно-раздражающим действием.

Таблица. 6.16 – Результаты оценки местно-раздражающего действия комбинированного геля интерферона и даларгина

Кролик № Баллы Признаки местно- раздражающего действия	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	среднее
Покраснение века и бульбарная конъюнктивита не затрагивающая роговицу и радужную оболочку	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0,2
Отек век	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0,3
Выделения	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Помутнение роговицы – степень плотности, участок наибольшей плотности	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Площадь поражения роговицы	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

6.2. Фармацевтическая разработка комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

При разработке комбинированного ЛП выбирали компоненты, которые способны ускорять процесс заживления и уменьшать боль. В качестве ранозаживляющего компонента в состав ЛФ вводили декспантенол, для снятия болезненных ощущений лидокаин, концентрации подобраны на основе литературных данных [63].

6.2.1. Определение профиля качества комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Целевой профиль качества разрабатываемого комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения представлен в таблице 6.17. Целевой профиль качества и критические параметры качества определялись по фармакопейным требованиям, а на этапе разработки в

соответствии с профилем качества ГМЛФ для местного/дерматологического применения и ГМЛФ местного действия/для нанесения на слизистую оболочку ротовой полости оценивали экспериментальные образцы лабиального геля по следующим параметрам: вязкость, стабильность реологических показателей, намазываемость, биоадгезивные свойства, адсорбционная и осмотическая активность, степень увлажнения. Комбинированный гель интерферона альфа-2b для наружного и местного применения предполагается для нанесения на губы и рядом расположенный участок слизистой оболочки рта, или для нанесения на половые губы и рядом расположенный участок слизистой оболочки, поэтому гель должен обладать характеристиками, как для ЛФ для дерматологического применения так и для ЛФ, предназначенных для нанесения на слизистые оболочки. Для удешевления производства и в связи с отсутствием требования по стерильности для дерматологических ЛФ, ЛС решено делать нестерильным.

Таблица 6.17 – Целевой профиль качества продукта комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Элемент целевого профиля качества продукта	Цель	Обоснование
Лекарственная форма	Гель для наружного и местного применения	Удобная для применения ЛФ с потребительской точки зрения, обеспечивающая распределения ЛФ по коже и/или слизистой оболочке рта
Путь введения	Местный	Сооотв. ГФ РФ
Дозировка	Не менее 40000 МЕ/г интерферона альфа-2b + 50 мг/г декспантенола +10 мг/г лидокаина	Для обеспечения фармакологического эффекта.
Объем упаковки (для лабораторной разработки)	10 г	Алюминиевые тубы
Фармакокинетика	Препарат местного действия, нет требований по всасыванию	По литературным данным белки и пептиды могут проникать через повреждённую кожу к очагу инфекции
Стабильность	2 года. При температуре 2-8°C.	Минимальный по ЕАЭС срок годности для первой регистрации препарата.

Продолжение Таблицы 6.17

Элемент целевого профиля качества продукта		Цель	Обоснование
Качественные параметры ЛП	Описание	Необходимо для терапевтической эффективности и для безопасности	Требование ГФ РФ
	Идентификация		
	Содержание интерферона альфа-2b - специфическая противовирусная активность		
	Содержание декспантенола		
	Содержание лидокаина		
	Масса содержимого упаковки		
	рН		
	МБЧ		
	Герметичность упаковки		
Упаковка		Материал упаковки должен обеспечить соответствующее качество ЛП и не оказывать отрицательного воздействия на ЛФ, обеспечить удобство в применении	Выбор разработчика и соответствие потребительским характеристикам. Необходимо для клинической эффективности, безопасности. Обеспечение стабильности ЛП на протяжении заявленного срока годности
Способ применения		Согласно инструкции по применению	Необходимо для клинической эффективности и безопасности

Критические параметры качества комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения и их обоснование представлены в таблице 6.18.

Таблица 6.18 – Критические параметры качества комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Параметр качества ЛП	Цель	Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
Описание	Вид ЛФ должен удовлетворять потребительским характеристикам	Нет	Физические свойства содержимого напрямую не связаны с безопасностью и эффективностью ЛП. Следовательно, внешний вид не является критическим параметром.
pH	3,5-8,5	Да	Обеспечивает стабильность АФС
Масса содержимого упаковки	Не менее 9,5 г	Нет	Масса не связана с безопасностью и эффективностью ЛП. Следовательно, этот параметр не является критическим.
Идентификация	Реакция нейтрализации противовирусной активности интерферона	Нет	Идентификация оказывает большое влияние на безопасность и эффективность ЛП, но этот критический параметр качества должен эффективно контролироваться системой управления качеством. Различие составов и переменные процесса производства не влияют на подлинность. Следовательно, этот параметр не будет обсуждаться во время разработки состава и технологии производства.
	ТСХ на декспантенол Качественная реакция на декспантенол	Нет	Идентификация оказывает большое влияние на безопасность и эффективность ЛП, но этот критический параметр качества должен эффективно контролироваться системой управления качеством. Различие составов и переменные процесса производства не влияют на подлинность.

Продолжение Таблицы 6.18

Параметр качества лекарственного препарата	Цель	Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
Идентификация			Следовательно, этот параметр не будет обсуждаться во время разработки состава и технологии производства.
	Качественные реакции на лидокаин	Нет	Идентификация оказывает большое влияние на безопасность и эффективность ЛП, но этот критический параметр качества должен эффективно контролироваться системой управления качеством. Различие составов и переменные процесса производства не влияют на подлинность. Следовательно, этот параметр не будет обсуждаться во время разработки состава и технологии производства.
Содержание интерферона альфа-2b - специфическая противовирусная активность	Не менее 40000 МЕ/г	Да	Содержание действующего вещества будет влиять на безопасность и эффективность ЛП. Переменные процесса могут влиять на количественное содержание ЛВ. Следовательно, данный параметр будет оцениваться в процессе разработки состава и технологии производства.
Содержание декспантенола	50 мг/г	Да	Содержание ЛВ будет влиять на безопасность и эффективность препарата. Переменные процесса могут влиять на количественное содержание действующего вещества. Следовательно, данный параметр будет оцениваться в процессе разработки состава и технологии производства

Продолжение Таблицы 6.18

Параметр качества лекарственного препарата	Цель	Является ли критическим параметром? (Да / Нет)	Обоснование
Содержание лидокаина	10 мг/г	Да	Содержание действующего вещества будет влиять на безопасность и эффективность препарата. Переменные процесса могут влиять на количественное содержание действующего вещества. Следовательно, данный параметр будет оцениваться в процессе разработки состава и технологии производства
МБЧ	Категория 6.3	Да	Несоблюдение требований GMP может повлиять на безопасность пациентов. Является критическим показателем для всех ЛП
Герметичность упаковки	Должна быть герметична	Да	Может оказывать влияние на МБЧ. Однако в процессе лабораторной разработки упаковка идет вручную и этот параметр не будет критически влиять на качество препарата при контроле МБЧ. Следовательно, этот параметр не будет обсуждаться во время разработки состава и технологии производства

6.2.2. Изучение совместимости интерферона альфа-2b с декспантенолом и лидокаином

Также как и для офтальмологического геля первым этапом исследования стала оценка совместимости интерферона альфа-2b действующих веществ: декспантенола и лидокаина. Для этого изучали наличие цитотоксического действия линии клеток Vero растворов ЛВ.

На рисунке 6.7 представлены результаты оценки цитотоксического действия декспантенола и лидокаина в сравнении с контролем.

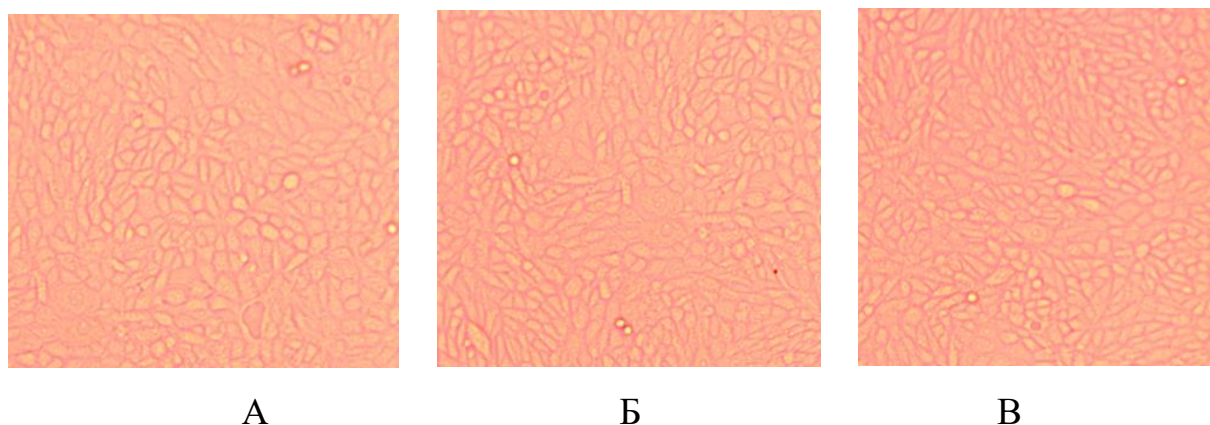


Рисунок 6.7 – Лунки с монослоем клеток линии Vero при увеличении в 100 раз: А- контроль, Б- раствор декспантенола 50мг/мл, В – раствор лидокаина 10 мг/мл

Монослой клеток линии Vero без признаков токсичности и дегенерации и соответствует состоянию контрольного монослоя, таким образом декспантенол и лидокаин в концентрациях, в которой они входят в состав разрабатываемой ЛФ, цитотоксического действия не оказывают.

Следующим этапом стало изучение стабильность раствора, содержащего интерферон и ЛВ в ацетатном буферном растворе, для предварительный оценки влияния ЛВ на специфическую активность интерферона, как самого критического показателя ЛФ. Растворы хранили 30 суток при температуре 5°C. Результаты, приведенные в таблице 6.19, демонстрируют отсутствие влияния компонентов на их стабильность данной смеси ЛВ.

Таблица 6.19 – Изучение перекрёстного влияния интерферона, декспантенола и лидокаина на стабильность в растворе

Показатель \ Время, сут.	0	7	15	30
Специфическая активность интерферона альфа-2b МЕ в 1 г	55028	52128	58269	55816
Количественное содержание декспантенола мг в 1 г	51,5	51,4	51,5	51,5
Количественной содержание лидокаина, мг в 1 г	11,2	11,2	11,2	11,2
pH раствора	5,7	5,7	5,7	5,7

6.2.3. Разработка состава и технологии комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Получали экспериментальные образцы гелей в качестве гелеобразователей использовали ГЭЦ различных марок, которые были выбраны на основе предыдущих исследований по разработке офтальмологического геля. Вводили в состав модификаторы вязкости - ПЭГ различной молекулярной массы. ПЭГ обладают высокой адсорбционной и осмотической активностью, хорошими окклюзионными свойствами, собственным антибактериальным эффектом. Однако ГЭЦ и ПЭГ создают на коже ощущение липкости. Чтобы его снизить в состав вводили изопропилмиристат марок Kollicream® IPM и Kollicream® OD, это эмульгаторы, которые способны увеличивать проницаемость кожи для лучшей доставки ЛВ в очаг поражения [119]. Так как упаковка предполагается многодозовая для лабораторной разработки, то вводили в состав консервант метилпарагидроксибензоат. Этот консервант обладает широким спектром действия, эффективен в концентрации от 0,05 до 0,4 % и стабилен и функционален при pH от 4 до 8,0 [118. 302]. В качестве стабилизаторов pH и стабилизатора для белковой молекулы интерферона, по аналогии с офтальмологическим гелем, использовали ацетатный буферный раствор и ЭДТА. Изучали цитотоксическое действие ВВ в различных концентрациях на линию клеток Vero (таблица 6.20).

Таблица 6.20 – Результаты изучения цитотоксичности гелеобразователей

<i>Гелеобразователь</i>	<i>Концентрация в растворе, %</i>	<i>Разведения раствора геля средой ИГЛА</i>						
		<i>1/10</i>	<i>1/20</i>	<i>1/40</i>	<i>1/80</i>	<i>1/160</i>	<i>1/320</i>	<i>1/640</i>
Контроль/среда ИГЛА	-	_*	-	-	-	-	-	-
Natrosol® 250ННХ,	2,0	-	-	-	-	-	-	-
	3,0	-	-	-	-	-	-	-
	4,0	-	-	-	-	-	-	-
	5,0	-	-	-	-	-	-	-
Natrosol® 250G	2,0	-	-	-	-	-	-	-
	3,0	-	-	-	-	-	-	-
	4,0	-	-	-	-	-	-	-
	5,0	-	-	-	-	-	-	-
Natrosol® 250H	2,0	-	-	-	-	-	-	-
	3,0	-	-	-	-	-	-	-
	4,0	-	-	-	-	-	-	-
	5,0	-	-	-	-	-	-	-
Kollicream® IPM	0,25	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,0	_*	+	-	-	-	-	-
Kollicream® OD	0,25	+	+	-	-	-	-	-
	0,5	+	+	+	+	-	-	-
	1,0	+	+	+	+	+	+	+
ПЭГ 1500	1,0	-	-	-	-	-	-	-
	5,0	-	-	-	-	-	-	-
	10,0	+	+	+-	-	-	-	-
ПЭГ 4000	1,0	-	-	-	-	-	-	-
	5,0	-	-	-	-	-	-	-
	10,0	+	+-	+	-	-	-	-
ПЭГ 6000	1,0	+	+	+	-	-	-	-
	5,0	+	+	+	+	+	+	-
	10,0	+	+	+	+	+	+	+
Метилпарагидроксibenзоат	0,1	-	-	-	-	-	-	-
	0,2	+	+	+-	-	-	-	-
	0,3	+	+	+	+	+-	-	-

* - Изменений нет, по сравнению с контрольными лунками.
+ Повреждение во всех лунках повтора. Монослой клеток уничтожен

Как видно из представленных результатов Kollicream® OD обладает выраженным токсическим действием на клетки, его в исследованиях не использовали, ПЭГ 6000, также проявил цитотоксичность, его тоже из исследований исключили. Остальные результаты учитывали при выборе концентраций.

На основании проведенных исследований получали экспериментальные образцы составов, приведенных в таблице 6.21.

Технология получения образцов была следующая: получали буферный ацетатный раствор, в нем растворяли ЭДТА, вводили ПЭГ и консервант при нагревании до 50-60°C, охлаждали раствор до комнатной температуры, растворяли гелеобразователь и эмомент при постоянном перемешивании с использованием верхнеприводной лопастной мешалки IKA Eurostar 20 digital (Германия) до полного растворения. Нагревали растворы на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 Package (IKA Werke, Германия). Готовили раствор декспантенола и лидокаина в ацетатном бурном растворе, объем которого вычитали предварительно из объема основы, на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 Package (IKA Werke, Германия). Раствор декспантенола и лидокаина вводили в основу. Затем полученный полупродукт помещали в стеклянные флаконы и укупоривали, стерилизовали при температуре 120°C в течение 30 минут в лабораторном стерилизаторе Thermo Scientific (Thermo Fisher, США). Стерилизацию полупродукта проводили для снижения микробной контаминации, для повышения стабильности интерферона, несмотря на то что сама ЛФ не стерильная. Для субстанции интерферона изучено влияние степени микробной контаминации на стабильность субстанции. Экспериментально в предварительных исследованиях показано, что чем ниже микробная обсемененность продукта, содержащего интерферон, тем выше его стабильность. Полупродукт после стерилизации охлаждали до температуры не выше 35°C и вводили в него интерферон в ламинарном боксе Ламинар-С» (Россия), перемешивали на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 Package со скоростью 150 об/мин в течение 15-30 минут.

Таблица 6.21 – Составы экспериментальных образцов комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

[illegible]

Продолжение таблицы 6.21

[illegible]

Полученные составы экспериментальных образцов комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения оценивали по параметрам: внешний вид/описание, pH, вязкость и коэффициент агрегативной стабильности в процессе хранения образцов в течение 1 недели. Полученные результаты представлены в таблице 6.22.

Образцы № 1,5,11,12,16,21,22,27 и 33 не соответствуют требованиям к МЛФ по описанию, имеют неоднородную структуру и консистенцию, образцы 14 и 25 имеют неудовлетворительную агрегативную стабильность. Эти составы были исключены из дальнейших исследований. Остальные образцы представляют собой однородные бесцветные прозрачные вязкие гели без запаха и механических включений. pH всех образцов находится в пределах значений 6,36 – 6,75, то есть около нейтральных значений, это должно обеспечить стабильность белка и соответствовать поверхности, на которую наносится, то есть слизистой оболочке ротовой полости, воспаленной коже.

Следующим этапом исследования стало изучение технологических параметров качества гелей: стабильность вязкости в процессе хранения, вязкость при температуре применения, осмотическая и адсорбционная активность, степень увлажнения, высыхаемость, намазываемость и биоадгезия по силе отрыва (таблица 6.23).

Вязкость должна быть стабильна у МЛФ в процессе хранения. У образцов 4, 9, 10, 17, 26, 30-32, вязкость падала. У остальных образцов вязкость была стабильна в течение 6 месяцев наблюдения. Так как параметр вязкость не входит в спецификацию на готовую ЛФ у экспериментальных образцов её контролировали в течение 6 месяцев.

Разрабатываемый гель планируется в первую очередь для лабиального применения и на слизистую оболочку рта, так же его можно будет наносить на воспаления при генитальном герпесе, но не вагинально, только снаружи на половые органы. Таким образом, ЛФ должна одновременно обладать хорошими окклюзионными свойствами, высокой способностью «намазываться» и при этом иметь биоадгезивные свойства.

Таблица 6.22 – Результаты определения ряда технологических показателей качества экспериментальных образцов комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

показатель № образца	Описание*	рН	Пластическая вязкость, Па·с при 20°C	Коэффициент агрегативной устойчивости		
				После получения ЛФ	После хранения 48 часов при 20°C	После хранения 7 суток при 20°C
1	Не соотв.	-	-	-	-	-
2	Соотв.	6,54±0,12	0,298	0	0	
3	Соотв.	6,57±0,11	0,498	0	0,2	0,4
4	Соотв.	6,42±0,11	0,542	0	0,01	0,05
5	Не соотв.	-	-	-	-	-
6	Соотв.	6,36±0,12	0,484	0	0	0
7	Соотв.	6,38±0,12	0,548	0	0	0
8	Соотв.	6,52±0,11	0,635	0	0	0,02
9	Соотв.	6,55±0,11	0,544	0	0,05	0,06
10	Соотв.	6,35±0,11	0,696	-	0,05	0,08
11	Не соотв.	-	-	-	-	-
12	Не соотв.	-	-	-	-	-
13	Соотв.	6,44±0,14	0,468	0	0	0
14	Соотв.	6,51±0,14	0,588	0,05	0,1	0,2
15	Соотв.	6,59±0,14	0,602	0	0	0
16	Не соотв.	-	-	-	-	-
17	Соотв.	6,32±0,11	0,504	0	0,01	0,03
18	Соотв.	6,45±0,11	0,524	0	-	-
19	Соотв.	6,37±0,12	0,588	0	0	0,03
20	Соотв.	6,39±0,12	0,618	0	0,02	0,04
21	Не соотв.	-	-	-	-	-
22	Не соотв.	-	-	-	-	-
23	Соотв.	6,58±0,11	0,458	0	-	-
24	Соотв.	6,65±0,11	0,545	0		
25	Соотв.	6,75±0,12	0,642	0,5	0,8	2,0
26	Соотв.	6,61±0,11	0,724	0	0,02	0,06
27	Не соотв.	-	-	-	-	-
28	Соотв.	6,47±0,13	0,598	0	0	0,01
29	Соотв.	6,52±0,11	0,654	0	0	0
30	Соотв.	6,55±0,10	0,782	0	0	0
31	Соотв.	6,38±0,11	0,824	0	0	0
32	Соотв.	6,41±0,10	0,946	0	0	0,02
33	Не соотв.	-	-	-	-	-

*Соотв. - описание, соответствующее требованиям – однородный прозрачный без механических включений гель.

Не соотв. - описание, не соответствующее требованиям – неоднородный гель или имеющий труднорастворимые комки или слишком плотный/вязкий по консистенции.

Если гель не соответствовал по описанию, другие показатели качества не определяли

По оптимумам реологии ЛФ должна соответствовать стоматологической и дерматологической ГМЛФ. Для стоматологических гелей пластическая вязкость должна находиться в пределе от 0,170 до 0,400 Па·с, предел текучести от 50,0 до 170,0, для дерматологических гелей значение пластической вязкости должно быть от 0.112 до 0.910 Па·с, значения пределов текучести – от 11.6 до 187.2 (Глава 3). Данным параметрам не соответствуют образцы 2, 13, 23.

В дальнейшем оставшиеся образцы сравнивали: по намазываемости, чем она выше, тем лучше распределяется ЛФ по коже; биоадгезии, чем выше значение силы отрыва, тем лучше прикрепляется гель к слизистой оболочке; степени увлажнения, чем больше, тем приятнее ощущение при нанесении геля; осмотической активности, в данном случае значение должно быть не высоким, чтобы не стягивать кожу, но и не низким, чтобы оттягивать на себя экссудат образующийся в ранке; адсорбционная активность, чем выше значение, тем больше способность ЛФ сорбировать на себе вирусные и бактериальные частицы. По комплексу данных параметров выбрали образец № 29, он обладает лучшими увлажняющими свойствами (степень увлажнения через 30 минут составляла $33,2 \pm 0,6\%$), максимальной адсорбционной активностью – $0,082 \pm 0,06$ мг, высокой силой отрыва – $898,4 \pm 2,8$ Н, средним значением осмотической активности ($144,00 \pm 0,4\%$ за 24 часа) и высыхаемостью (8,1%). У всех образцов высыхаемость относительно невысокая и составляет от 6,1 до 8,1%, что говорит об увлажняющих свойствах гелей, но так они подсыхают, то могут образовывать пленки при нанесении на кожу, ранку или слизистую оболочку.

Таблица 6.23 – Показатели качества экспериментальных образцов комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Показатель №	Пластическая вязкость при 25°C, Па·с			Пластическая вязкость при 32°C, Па·с	Предел текучести, Па	Осмотическая активность, %		Адсорбционная активность, мг	Высыхаемость за 24 часа, %	Намазываемость, мм ²	Степень увлажнения, %				Биодогезия по силе отрыва, Н
	0 мес.	3 мес.	6 мес.			1 час	24 часа				Через 0 мин	Через 5 мин	Через 15 мин	Через 30 мин	
2	0,298	0,301	0,299	0,251	32,5	108,50 ±0,8	298,21 ±0,8	0,033 ±0,03	6,1±0,1	180,6±2,0	10,2±0,4	15,4±0,5	18,6±0,5	20,2±0,5	765,8 ±2,6
3	0,498	0,486	0,489	0,398	36,2	112,50 ±0,5	272,54 ±1,5	0,033 ±0,02	6,8±0,1	158,4±1,8	12,5±0,5	15,0±0,5	22,2±0,6	24,7±0,6	801,2 ±2,4
4	0,542	0,458	0,426	0,298	65,4	115,50 ±0,7	299,50 ±0,7	0,038 ±0,01	7,1±0,1	134,2±2,5	11,2±0,4	18,7±0,5	20,5±0,5	20,8±0,7	825,5 ±3,0
6	0,484	0,480	0,485	0,369	80,5	119,50 ±0,4	249,52 ±1,4	0,034 ±0,03	7,3±0,1	129,5±2,1	13,5±0,5	15,1±0,7	17,8±0,3	20,2±0,4	925,9 ±2,3
7	0,548	0,540	0,555	0,370	82,5	131,00 ±0,4	251,05 ±0,7	0,048 ±0,04	6,8±0,1	134,9±2,4	15,0±0,4	15,4±0,5	18,2±0,6	21,6±0,6	768,2 ±2,4
8	0,635	0,635	0,630	0,504	102,5	147,00 ±1,6	249,00 ±1,6	0,044 ±0,03	7,1±0,2	141,6±2,0	15,8±0,6	21,2±0,4	23,4±0,5	20,5±0,4	698,6 ±2,7
9	0,544	0,456	0,429	0,342	112,5	132,00 ±1,0	301,08 ±1,0	0,051 ±0,05	6,1±0,1	128,9±2,6	16,9±0,4	19,4±0,5	21,2±0,5	26,2±0,6	1024,52 ±3,2
10	0,696	0,602	0,590	0,544	110,5	145,00 ±1,2	325,11 ±1,3	0,039 ±0,02	6,9±0,1	105,4±3,1	12, ±0,5	15,8±0,6	24,5±0,4	26,2±0,7	821,5 ±3,2
13	0,468	0,460	0,465	0,305	37,8	121,50 ±0,8	223,50 ±1,4	0,056 ±0,03	6,5±0,2	151,2±2,5	10,1±0,4	12,4±0,5	18,3±0,5	21,5±0,6	721,9 ±2,9

Продолжение таблицы 6.23

Показатель №	Пластическая вязкость при 25°C, Па·с			Пластическая вязкость при 32°C, Па·с	Предел текучести, Па	Осмогическая активность, %		Адсорбционная активность, мг	Высыхаемость за 24 часа, %	Намазываемость, мм ²	Степень увлажнения, %				Биоадгезия по силе отрыва, Н
	0 мес.	3 мес.	6 мес.			1 час	24 часа				Через 0 мин	Через 5 мин	Через 15 мин	Через 30 мин	
15	0,602	0,586	0,589	0,368	42,1	125,50 ±0,5	278,50 ±0,8	0,061 ±0,06	7,7±0,1	113,5±1,6	13,5±0,4	15,6±0,5	18,6±0,5	22,5±0,7	654,8 ±2,1
17	0,504	0,489	0,356	0,269	110,4	109,50 ±0,7	222,50 ±1,5	0,067 ±0,04	7,8±0,1	159,6±2,3	15,2±0,6	20,1±0,5	22,2±0,6	19,4±0,6	698,2 ±2,4
18	0,524	0,520	0,526	0,305	102,5	119,50 ±0,4	229,50 ±0,7	0,059 ±0,03	6,8±0,1	144,2±2,6	12,7±0,4	13,3±0,5	15,9±0,3	18,4±0,4	712,6 ±3,5
19	0,588	0,578	0,580	0,385	58,7	145,00 ±0,4	309,50 ±0,4	0,066 ±0,05	7,2±0,1	124,9±1,8	11,3±0,5	14,4±0,5	18,2±0,5	15,2±0,5	769,1 ±5,6
20	0,618	0,600	0,610	0,432	59,4	128,00 ±1,6	301,00 ±1,4	0,070 ±0,07	7,6±0,1	132,6±2,5	10,6±0,4	20,4±0,5	18,7±0,4	19,8±0,6	637,7 ±4,5
23	0,458	0,459	0,450	0,269	48,2	112,00 ±1,0	248,00 ±1,2	0,072 ±0,03	7,1±0,1	155,6±2,6	9,8±0,4	12,8±0,5	15,9±0,5	18,9±0,5	725,8 ±2,5
24	0,545	0,542	0,548	0,356	67,6	128,50 ±0,8	152,00 ±1,1	0,069 ±0,04	6,9±0,1	119,5±1,8	11,2±0,5	17,4±0,5	25,2±0,6	24,2±0,6	709,9 ±3,1
26	0,724	0,625	0,600	0,523	89,5	142,50 ±0,5	286,00 ±1,2	0,073 ±0,05	8,1±0,1	106,5±2,3	12,7±0,4	23,6±0,5	25,4±0,5	22,0±0,7	806,5 ±2,7
28	0,598	0,590	0,589	0,402	106,8	149,50 ±0,7	301,50 ±1,3	0,075 ±0,03	7,8±0,1	129,3±2,1	14,8±0,6	22,9±0,5	21,2±0,7	24,5±0,6	836,4 ±2,2

Продолжение таблицы 6.23

Показатель №	Пластическая вязкость при 25°C, Па·с			Пластическая вязкость при 32°C, Па·с	Предел текучести, Па	Осмотическая активность, %		Адсорбционная активность, мг	Высыхаемость за 24 часа, %	Намазываемость, мм²	Степень увлажнения, %				Биоадгезия по силе отрыва, Н
	0 мес.	3 мес.	6 мес.			1 час	24 часа				Через 0 мин	Через 5 мин	Через 15 мин	Через 30 мин	
29	0,654	0,647	0,654	0,554	122,3	144,00 ±0,4	288,50 ±0,8	0,082 ±0,06	8,1±0,1	142,5±1,5	18,2±0,4	25,4±0,5	30,2±0,5	33,2±0,6	898,4 ±2,8
30	0,782	0,658	0,659	0,588	117,4	148,00 ±0,4	322,50 ±0,5	0,080 ±0,05	8,0±0,2	138,6±1,6	15,5±0,7	22,9±0,5	25,2±0,6	24,8±0,5	856,0 ±3,5
31	0,824	0,725	0,712	0,625	98,5	155,00 ±1,6	319,50 ±0,7	0,079 ±0,04	7,9±0,1	98,5±2,1	16,7±0,4	20,0±0,5	21,8±0,5	19,5±0,6	725,4 ±2,6
32	0,946	0,865	0,821	0,685	96,4	152,00 ±1,0	349,50 ±0,9	0,069 ±0,05	8,0±0,3	78,6±2,0	9,2±0,4	11,7±0,6	15,4±0,5	21,2±0,4	768,6 ±2,9
29.1	0,644	0,645	0,650	0,528	120,3	134,00 ±0,5	301,59 ±0,7	0,078 ±0,06	8,0±0,1	138,5±1,5	17,2±0,4	22,5±0,5	31,2±0,5	32,9±0,6	875,7 ±2,9
29.2	0,654	0,647	0,648	0,554	122,8	141,00 ±0,4	289,56 ±0,8	0,071 ±0,06	7,9±0,1	143,2±1,7	16,2±0,5	23,3±0,7	26,4±0,4	34,7±0,8	885,3 ±2,5
29.3	0,639	0,635	0,649	0,535	123,1	135,12 ±0,8	305,59 ±0,6	0,075 ±0,06	7,2±0,2	140,5±2,5	18,8±0,4	23,1±0,5	26,9±0,7	33,9±0,7	890,0 ±2,8
29.4	0,650	0,659	0,665	0,540	118,4	140,00 ±0,4	295,10 ±0,8	0,080 ±0,06	7,8±0,3	141,9±1,4	17,7±0,4	25,7±0,8	27,4±0,5	30,9±0,6	875,9 ±2,6

Для состава № 29 изучали возможность изменения количества Kollicream® IPM, который определяет степень липкости ЛФ. Получали образцы гелей аналогичные по составу №29, с концентрацией Kollicream® IPM 0,25(состав 29.1), 0,75 (состав 29.2) и 1,0% (состав 29.3). Гели оценивали аналогично образцам составов №1-33 (Таблица 6.23). При оценке внешнего вида и «липкости» образец 29.1 имеет более липкую консистенцию чем образец 29, Образцы 29.2 и 29.3 по внешнему виду и консистенции не отличаются. Существенных изменений в параметры качества увеличение Kollicream® IPM не внесло, поэтому самым перспективным для дальнейшей разработки посчитали образец №29.

Для образца № 29 строили реологические кривые (рисунок 6.8) при температуре 20°C. Образец обладает высокой степенью тиксотропии, при приложении усилия значительно уменьшается вязкость, гель будет легко распределяться по поверхности на которую наносится, а потом значение вязкости восстанавливается, то есть гель не будет растекаться после нанесения на кожу или слизистую оболочку.

Необходимо оценить эффективность антимикробного консерванта метилпарагидроксибензоата, включенного в состав ЛФ. Комбинированный гель интерферона альфа-2b для наружного и местного применения относится к категории 2 в соответствии с ОФС.1.2.4.0011.15 ГФ РФ и 6.3 А в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.18. Общее число аэробных микроорганизмов в ЛФ должно быть не более 10^2 КОЕ в 1 г (Колониеобразующие единицы, далее – КОЕ), общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10 КОЕ в 1 г, не должно быть энтеробактерий, устойчивых к желчи, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Поэтому для оценки эффективности метилпарагидроксибензоата в геле контаминировали образцы ЛФ суспензиями следующий тест-микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Методика проведения теста описана в ОФС.1.2.4.0011.15 ГФ РФ. Результаты исследований приведены в таблице 6.24.

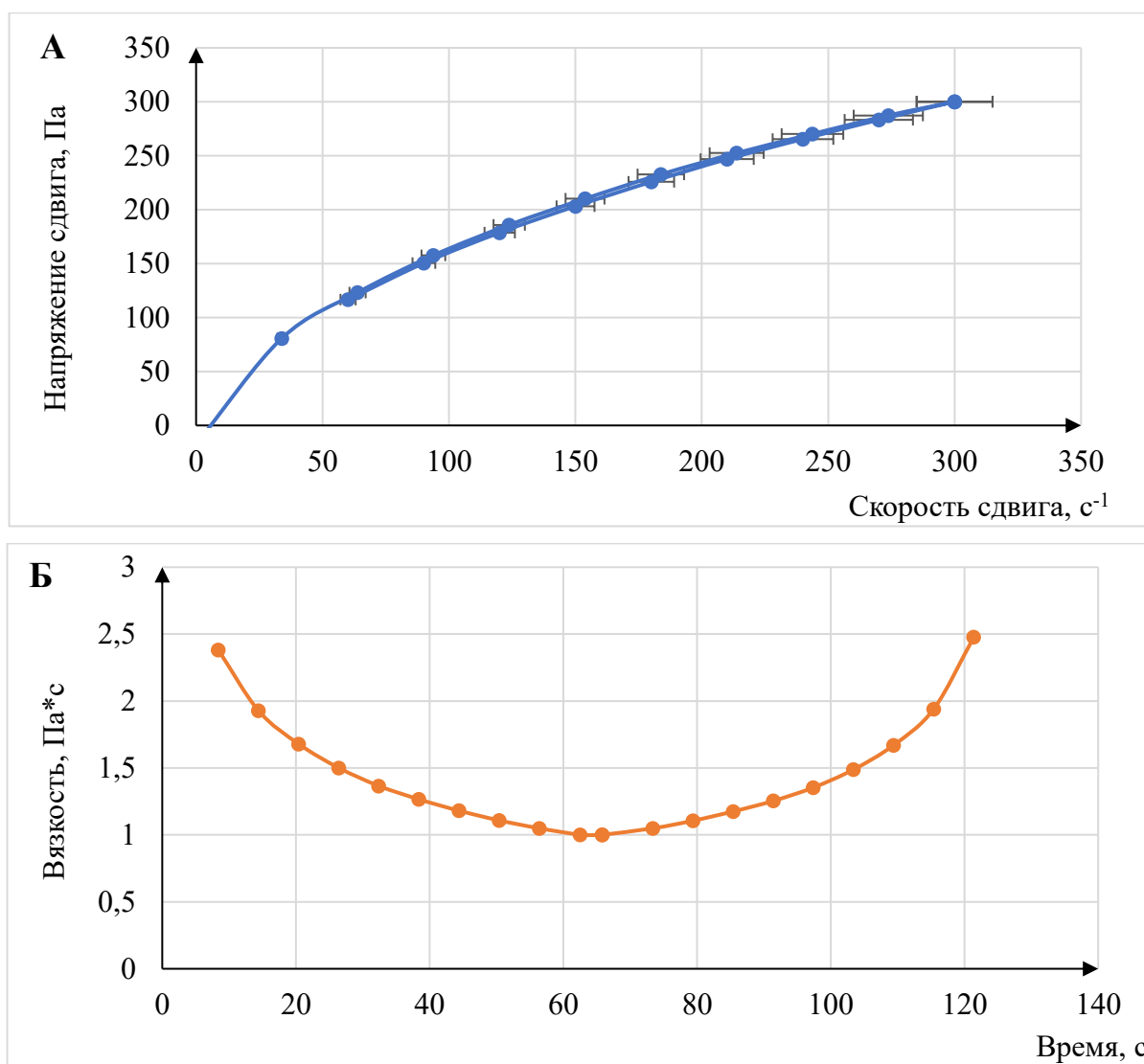


Рисунок 6.8 – Реологические кривые образца № 29 комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения А – кривая течения; Б – кривая вязкости

В ходе проведенных исследований, направленных на изучение эффективности антимикробного консервирующего действия метилпарагидроксибензоата в концентрации 0,075%, который был включен в состав ЛФ, были получены следующие результаты: после инокуляции, т.е. искусственного заражения микроорганизмами, происходила быстрая и эффективная гибель как бактерий, так и дрожжеподобных грибов. Это наблюдение подтверждает высокую эффективность использования данного консервирующего агента, обеспечивающего надежную защиту ЛС от микробного загрязнения, что важно для обеспечения безопасности и качества фармацевтической продукции.

Таблица 6.24 – Эффективность антимикробного действия препарата комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения при концентрации метилпарагидроксибензоата 0,075%

Экспозиция	Требования ГФ РФ (категория 6.3А)		Число микроорганизмов, КОЕ/г (log снижения)		
	Число бактерий КОЕ/г, log снижения	Число грибов КОЕ/г, log снижения	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Исходная нагрузка	25-50	0-2	$1,20 \times 10^5$	$9,10 \times 10^5$	$8,60 \times 10^5$
Исходный высев	—	—	$9,55 \times 10^5$ (0,08)	$8,45 \times 10^5$ (0,03)	$9,25 \times 10^4$ (0,97)
2 сут	—	—	НО	НО	НО
7 сут	—	—	НО	НО	НО
14 сут	НУ	НУ	НО	НО	НО
28 сут	НУ	НУ	НО	НО	НО
НО – жизнеспособные клетки тест-микроорганизмов не обнаружены НУ – число жизнеспособных клеток тест-микроорганизмов не увеличивается.					

По результатам исследований выбран состав комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения, описанный в таблице 6.25.

Таблица 6.25 – Состав комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

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

6.2.4. Технология получения комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Разработанные методики на ЛФ, описаны в Главе 2, спецификация на комбинированный гель интерферона для наружного и местного применения приведена в Приложении А. Количество интерферона альфа-2b в ЛФ оценивают по специфической активности, показатель примеси в спецификацию не включен, аналогично комбинированному офтальмологическому гелю интерферона.

Описание производственного процесса изложено ниже.

Технологический процесс получения комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения в лабораторных условиях с размером серии 10-100 туб состоит из следующих стадий и операций:

ВР 4. Подготовка сырья.

ВР 4.1. Подготовка субстанции интерферона альфа-2b. Субстанцию интерферона, которая поставляется в замороженном виде и хранится при температуре не выше минус 40°C, перед началом технологического процесса необходимо разморозить. Размораживание проводят в холодильнике в течение 24 часов при температуре 2-8°C

ВР 4.2. Взвешивание декспантенола, лидокаина и вспомогательных веществ. Взвешивание сырья производится на лабораторных весах A&D GX-600 (Япония), воду очищенную отмеряют цилиндром.

ТП 5. Получение буферного раствора.

ТП 5.1. В процессе приготовления буферного раствора необходимо растворить его компоненты в воде очищенной. К этим компонентам относятся: натрия хлорид, натрия ацетат тригидрат и дигидрат динатриевой соли этилендиамина тетрауксусной кислоты. Растворение осуществляют в рассчитанном объеме воды очищенной в подходящей ёмкости на верхнеприводной мешалке ИКА Eurostar 20 digital (Германия). Вращение мешалки поддерживается на уровне от 100 до 150 оборотов в минуту, чтобы обеспечить полное растворение всех

ингредиентов в течение 10-20 минут. Процесс осуществляется при комнатной температуре, при этом контроль за растворением осуществляется визуально.

ТП 5.2. Фильтрация буферного раствора. Процесс фильтрации буферного раствора осуществляется через шприцевой фильтр, либо через фильтровальную установку, в зависимости от объема производимой серии. Для этой цели используется мембрана из полиэфирсульфона Merck (Millipore) (Германия), диаметр пор 0,3 мкм. Часть раствора в объеме (зависит от объема серии), достаточном для растворения субстанции декспантенола и лидокаина, отливают в стеклянный флакон с крышкой. Выбор материала фильтра осуществляли аналогично технологии разработанного офтальмологического геля с интерфероном и даларгином.

ТП 6. Получение раствора декспантенола и лидокаина. Рассчитанное на серию количество декспантенола и лидокаина растворяют в буферном растворе на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 Package (IKA Werke, Германия) со скоростью 75-150 об/мин в течение 15-25 минут при комнатной температуре.

ТП 7. Получение гелевой основы.

ТП 7.1. Растворение ПЭГ и метилпарагидроксибензоата в буферном растворе. В емкости нагревают буферный раствор до температуры 50-65°C на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 Package и растворяют ПЭГ 4000 и метилпарагидроксибензоат с помощью верхнеприводной мешалки IKA Eurostar 20 digital в течение 25-40 мин при скорости вращения мешалки 100-150 об/мин.

ТП 7.2. Ведение гелеобразователя и эмульгента. После охлаждения раствора ПЭГ 4000 и метилпарагидроксибензоата в буфере до комнатной температуры, не выключая мешалку, в полученную воронку медленно вводят ГЭЦ марки Natrosol® 250 G, затем Kollicream® IPM и уменьшив скорость вращения мешалки до 75-100 об/мин растворяют полимер до получения прозрачного геля в течение 15-60 мин в зависимости от объема серии. Температура растворения комнатная.

ТП 8. Ведение в основу раствора декспантенола и лидокаина. В полученный гель, так же не выключая мешалку, при комнатной температуре вводят раствор декспантенола и лидокаина, перемешивают скорости мешалки еще 15-30 мин.

ТП 9. Стерилизация полупродукта. Для снижения микробной нагрузки, которая отрицательно влияет на стабильность интерферона альфа-2b, полученный на стадии ТП 8 полупродукт переливают в стеклянные флаконы укупоривают резиновой крышкой вручную и вальцуют алюминиевым колпачком с помощью ручной машины для вальцовки флаконов (Россия). Затем стерилизуют при температуре 120°C и давлении 120 кПа в течение 30 минут в лабораторном стерилизаторе Thermo Scientific (Thermo Fisher, США), режим стерилизации выбран аналогично технологии разработанного офтальмологического геля с интерфероном и даларгином.

ТП 10. Введение в полупродукт субстанции интерферона альфа-2b. В стерильный полупродукт вводят стерильную субстанцию интерферона альфа-2b (она поставляется стерильной) в ламинарном боксе «Ламинар-С» (Россия), перемешивают на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 Package со скоростью 100-150 об/мин в течение 15-30 минут в зависимости от объема серии.

ТП 11. Наполнение туб. Алюминиевые тубы с мембраной и пластиковыми колпачками, производства Россия, объемом 10 мл, заполняют гелем на ручном дозаторе кремов и мазей Smartcream, производства FARMALABOR, с контролем массы по 10 г, так же в ламинарном боксе. Затем тубы закрывают ручным станком для укупорки (закрытия) тюбиков Flash Z-01 (Россия).

УМО 9. Маркировка и вторичная упаковка.

УМО 9.1. Маркировка. На тубы вручную наклеивают этикетки.

УМО 9.2. Вторичная упаковка. Вручную упаковывают в белые картонные коробки, на которые также вручную наклеивают этикетки.

В условиях производства ЛФ возможно производить в классе помещения С или D (ламинарные зоны не требуются). Так как, помещения классифицированы, оборудование герметично, то микробная контаминация ЛФ минимальна и незначительно скажется на стабильности интерферона альфа-2b. В таблице 6.26 указаны параметры контроля промежуточных продуктов и готовой ЛФ при лабораторном производстве ЛФ.

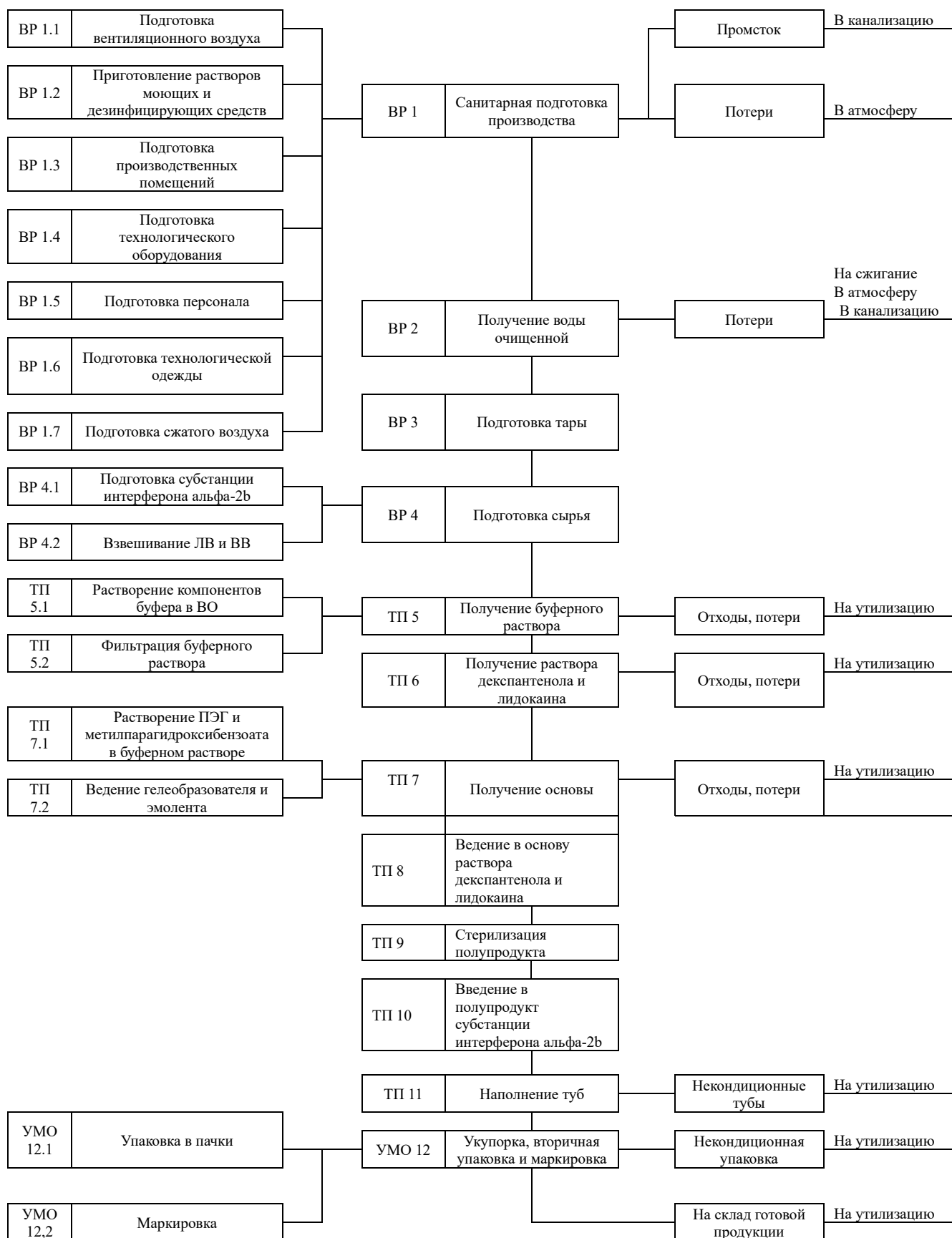


Рисунок 6.9 – Технологическая схема получения комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Таблица 6.26 – Показатели для лабораторного контроля промежуточных продуктов и готовой ЛФ

Промежуточный/готовый продукт	Наименование показателя	Норма
Буферный раствор	pH	6,0- 7,0
Раствор декспантенола и лидокаина	Внешний вид	Прозрачный текучий гель, однородный, без механических включений
	pH	6,0- 7,0
Полупродукт простерилизованный	pH	6,0- 7,0
Тубы наполненные	Масса наполнения	Не менее 10,5 г
	Качество укупорки	Визуально отсутствие повреждений упаковки
Готовый продукт	Описание	Прозрачный бесцветный гель, не содержащий видимых частиц
	Идентификация: Интерферона альфа -2b Декспантенола	Реакция нейтрализации. Соответствует интерферону человеческому альфа-типа ТСХ. Основная зона адсорбции на хроматограмме раствора геля по положению, величине и окраске должна соответствовать основной зоне адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца декспантенола. Качественная реакция с 8,5 % раствором натрия гидроксида и 12,5% раствором меди с(II) сульфата должно образоваться синее окрашивание.
	Лидокаина	Качественная реакция на хлориды: С азотной кислотой 16 % и серебра нитрата раствора 2 % образуется белый творожистый осадок С калия дихроматом и серной кислотой концентрированной. Над пробиркой помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную дифенилкарбазида раствора. Бумага должна окраситься в фиолетово-красный цвет. УФ-спектрофотометрия, раствор ЛФ должен иметь характерный максимум при 201 ± 2 нм и минимум при 261 ± 2 нм
	pH	От 6,0 до 7,0.

Продолжение Таблицы 6.26

Промежуточный/готовый продукт	Наименование показателя	Норма
Готовый продукт	Микробиологическая чистота	Категория 6.3А - Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^2 КОЕ в 1 г - Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10 КОЕ в 1 г - Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г - Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) - Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл)
	Специфическая активность	Не менее 40000 МЕ в 1 г
	Количественное определение декспантенола	47,5 – 52,5 мг в 1 г
	Количественное определение лидокаина	9,5 – 10,5 мг в 1 г
	Масса содержимого упаковки	Не менее 9,5 г
	Герметичность упаковки	На фильтровальной бумаге и ни на одной из 10 туб не должно быть подтеков содержимого. Если наблюдаются подтеки хотя бы на одной из 10 первоначально отобранных туб, то дополнительно проводят испытание еще с 20 тубами. Результаты испытания считаются удовлетворительными, если не наблюдается подтеков ни на одной из 20 дополнительно отобранных туб.

6.2.5. Изучение возможности трансфера и масштабирования технологии производства комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Для разработанной ЛФ оценивали возможность трансфера технологии, для этого изучили параметры процесса производства и предложили параметры для трансфера и масштабирования (таблица 6.29). При разработке лабораторной технологии часть стадий проводили под ламинаром. Производство рекомендуется проводить в классе помещений С и /или D. Для снижения микробной нагрузки полупродукт, представляющий собой гелевую основу с введенными в неё декспантенолом и лидокаином, стерилизуют (оба ЛВ устойчивы к термической стерилизации). Таким образом, в стерильный полупродукт вводится стерильная субстанция интерферона, что сводит к минимуму микробную контаминацию, но не требует асептических условий при производстве и повышает стабильность ЛП. Полупродукты контролируются по уровню МБЧ, нормы выставляются для препаратов класса 6.3А. Производство ЛП может осуществляться на стандартном промышленном оборудовании, подобраны технологические параметры производства (таблица 6.27.). В таблице 6.28 указаны контрольные точки производства для процесса масштабирования производства ЛФ.

Таблица 6.27 – Рекомендуемые параметры процесса производства комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Этап/наименование	Параметр	Фактическое значение при лабораторной разработке	Предлагаемый диапазон для трансфера и масштабирования
Параметры процесса получения буферного раствора			
Растворение компонентов буфера в ВО	Оборудование	Стекланный стакан с верхнеприводной мешалкой ИКА Eurostar 20 digital	Промышленный реактор с лопастной или якорной мешалкой с паровой рубашкой

Продолжение Таблицы 6.27

Этап/наименование	Параметр	Фактическое значение при лабораторной разработке	Предлагаемый диапазон для трансфера и масштабирования
Параметры процесса получения буферного раствора			
Растворение компонентов буфера в ВО	Последовательность загрузки	Динатрия эдетата дигидрат (ЭДТА) Натрия хлорид Натрия ацетат тригидрат	Динатрия эдетата дигидрат (ЭДТА) Натрия хлорид Натрия ацетат тригидрат
	Время растворения	10-20	20-30
	Температура воды, °С	Комнатная	50-85 (в зависимости от температуры воды для инъекций, поступающей по системе водоподачи)
	Скорость мешалки, об/мин	100-150	Зависит от типа мешалки Лопастная 100-150 Якорная 30-50
Фильтрация буферного раствора	Размер пор, мкм	0,35	0,35
	Скорость фильтрации	По факту	По факту
	Материал фильтра	Полиэфирсульфон	Полиэфирсульфон
Параметры процесса получения раствора декспантенола и лидокаина			
Растворение декспантенола и лидокаина	Оборудование	Стеклоанный стакан с верхнеприводной мешалкой IKA Eurostar 20 digital	Промышленный реактор с лопастной или якорной мешалкой
	Время, мин	15-25	15-30
	Скорость вращения мешалки, об/мин	75-150	Зависит от типа мешалки Лопастная 75-150 Якорная 25-55
	Температура, °	Комнатная	Комнатная
Параметры процесса получения основы			
Растворение ПЭГ и метилпарагидроксибензоата в буферном растворе	Оборудование	Стеклоанный стакан или бутылка магнитная мешалка IKA C-MAG HS 7 Package для нагрева и верхнеприводной мешалки IKA Eurostar 20 digital	Промышленный реактор с лопастной или якорной мешалкой с паровой рубашкой, с возможностью нагрева и охлаждения
	Время, мин	25-40	25-45
	Скорость вращения мешалки, об/мин	100-150	Зависит от типа мешалки Лопастная 100-150 Якорная 30-50
	Температура, °	50-65	50-65

Продолжение Таблицы 6.27

Этап/наименование	Параметр	Фактическое значение при лабораторной разработке	Предлагаемый диапазон для трансфера и масштабирования
Параметры процесса получения буферного раствора			
Растворение гелеобразователя и эмульгента	Оборудование	То же	То же
	Время, мин	15-60	30-90
	Скорость вращения мешалки, об/мин	75-100	Зависит от типа мешалки Лопастная 75-150 Якорная 25-55
	Температура, °	Комнатная	20-25
Параметры процесса ведения в основу раствора декспантенола и лидокаина			
Перемешивание раствора декспантенола и лидокаина с гелевой основой	Оборудование	То же	То же
	Время, мин	15-30	15-30
	Скорость вращения мешалки, об/мин	75-100	Зависит от типа мешалки Лопастная 75-150 Якорная 25-55
	Температура, °	Комнатная	Комнатная
Параметры процесса стерилизации полупродукта			
Стерилизация	Время	30 мин	Если реактор с возможностью стерилизации, то зависит от объема серии Если в промышленном автоклаве, то зависит от объема емкостей 45-120 мин
	Температура, °	120	120-125
	Давление, кПа	120	120-125
Охлаждение	Температура, °C	до 20-25	20-25
Параметры процесса введения в полупродукт субстанции интерферона альфа-2b			
Растворение	Оборудование	Стекланный флакон, магнитная лабораторная мешалка IKA C-MAG HS 7 Package	Реактор с лопастной или якорной мешалкой
	Время растворения	15-30	30-60
	Скорость мешалки, об/мин	100-150	Зависит от типа мешалки Лопастная 100-150 Якорная 30-50
Параметры процесса фасовки			
Фасовочно—упаковочная линия	Оборудование	Ручной дозатор кремов и мазей Smartcream, FARMALABOR	Автоматическая тубонаполняющая машина
	Масса наполнения, г	9,5-11,0	10,2-11,0

Таблица 6.28 – Стратегия внутрипроизводственного контроля комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения / перечень контрольных точек для масштабирования процесса производства

<i>Наименование стадии</i>	<i>Наименование объекта контроля</i>	<i>Наименование контролируемого параметра, единицы измерений</i>	<i>Регламентированный Норматив (значение параметра)</i>
ВР 4. Подготовка сырья.			
ВР 4.1. Подготовка субстанции интерферона альфа-2b	Субстанция интерферона альфа-2b	Температура, °С Время, ч	2-8 24 часа
ВР 4.2. Взвешивание лекарственных и вспомогательных веществ	Субстанции декпантенола, лидокаина Гидроксиэтилцеллюлозы марки Natrosol® 250 ННХ Натрия хлорида Натрия ацетата тригидрата ЭДТА	Масса, г	в зависимости от объёма серии в соответствии с технологическими инструкциями
ТП 5. Получение буферного раствора			
ТП 5.1. Растворение компонентов буфера в воде очищенной	Буферный раствор неотфильтрованный	Время перемешивания, мин Скорость перемешивания, об/мин Температура воды, °С	20-30 100-150 55-85
ТП 5.2. Фильтрация буферного раствора	Буферный раствор отфильтрованный	рН Скорость фильтрации Размер пор, мкм Целостность фильтра	6,0-7,0 По факту 0,35 Должен быть целым
ТП 6. Получение раствора декспантенола и лидокаина			
ТП 6. Получение раствора декспантенола и лидокаина	Раствор декпантегола и лидокаина	Время перемешивания, мин Скорость перемешивания, об/мин	15-25 75-150
ТП 7. Получение гелевой основы			
ТП 7.1. Растворение ПЭГ и метилпарагидроксибензоата в буферном растворе.	Раствор ПЭГ и консерванта	Время перемешивания, мин Скорость перемешивания, об/мин Температура, °С	25-40 100-150 50-65

Продолжение таблицы 6.28

<i>Наименование стадии</i>	<i>Наименование объекта контроля</i>	<i>Наименование контролируемого параметра, единицы измерений</i>	<i>Регламентированный Норматив (значение параметра)</i>
ТП 7.2. Ведение гелеобразователя и эмульгента	Гелевая основа	Время перемешивания, мин Скорость перемешивания, об/мин Температура, °C Внешний вид	15-60 75-100 Комнатная/25-25 Однородная без комков
ТП 8. Ведение в основу раствора декспантенола и лидокаина			
ТП 8. Ведение в основу раствора декспантенола и лидокаина	Полупродукт простерилизованный	Время перемешивания, мин Скорость перемешивания, об/мин Температура, °C	15-30 75-100 Комнатная/25-25
ТП 9. Стерилизация полупродукта			
ТП 9. Стерилизация полупродукта	Полупродукт простерилизованный	pH Температура, °C Давление, Па Время, мин МБЧ	6,0-7,0 120 120 45-120 Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10 ² КОЕ в 1 г; общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10 КОЕ в 1; должны отсутствовать энтеробактерии, устойчивые к желчи, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
ТП 10. Введение в полупродукт субстанции интерферона альфа-2b.			
ТП 10. Введение в полупродукт субстанции интерферона альфа-2b.	Комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения нерасфасованный	Время перемешивания, мин Скорость перемешивания, об/мин	30-40 100-150

Продолжение таблицы 6.28

<i>Наименование стадии</i>	<i>Наименование объекта контроля</i>	<i>Наименование контролируемого параметра, единицы измерений</i>	<i>Регламентированный Норматив (значение параметра)</i>
ТП 11. Наполнение туб			
ТП 11. Наполнение туб	комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения расфасованный	Масса, г Контроль качества укупорки Герметичность упаковки	9,5 – 11,0 Визуально отсутствие повреждений Должна быть герметична
УМО 12. Маркировка и вторичная упаковка.			
УМО 12.1. Маркировка	Комбинированный офтальмологический гель интерферона альфа-2b и даларгина в первичной упаковке	Контроль качества маркировки	Визуально отсутствие повреждений
УМО 12.2. Вторичная упаковка	Комбинированный офтальмологический гель интерферона альфа-2b и даларгина	Контроль качества упаковки	Визуально отсутствие повреждений

Таблица 6.29 – Оценка уровня риска технологического процесса

Этап процесса	Критический параметр качества (Critical Quality Attribute)					
	рН	Содержание интерферона альфа-2b	Содержание декспантенола	Содержание лидокаина	МБЧ	Герметичность
Взвешивание	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий
Получение буферного раствора	Средний	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий
Получение раствора декспантенола и лидокаина	Низкий	Низкий	Средний	Средний	Низкий	Низкий
Получение гелевой основы	Средний	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий
Ведение в основу раствора декспантенола и лидокаина	Средний	Низкий	Средний	Средний	Низкий	Низкий
Стерилизация полупродукта	Средний	Низкий	Средний	Средний	Средний	Низкий
Введение субстанции интерферона альфа-2b в полупродукт	Низкий	Средний	Низкий	Низкий	Средний	Низкий
Наполнение туб	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Средний	Средний

Таблица 6.30 – Обоснование уровня риска этапов технологического процесса

Этап	Критический параметр качества ЛП (Critical Quality Attribute)	Оценка риска	Обоснование и мероприятия для снижения риска
Взвешивание	pH	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как взвешивание не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание интерферона альфа-2b	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как проводится контроль взвешивания
	Содержание декспантенола	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как проводится контроль взвешивания
	Содержание лидокаина	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как проводится контроль взвешивания
	МБЧ	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как взвешивание проводится в ламинарном потоке в помещении класса чистоты D или C, и полупродукт перед введением интерферона стерилизуется
	Герметичность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как взвешивание не оказывает влияния на данный критический параметр
Получение буферного раствора	pH	Средний	Если компоненты буферного раствора не до конца растворились, или были не верно отвешены, возможно получение неправильного значения Запланированные мероприятия: внутрипроизводственный контроль показателя.
	Содержание интерферона альфа-2b	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение буферного раствора не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание декспантенола	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение буферного раствора не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание лидокаина	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение буферного раствора не оказывает влияния на данный критический параметр
	МБЧ	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как в последующем полупродукт, в состав которого входит буферный раствор, подвергается стерилизации
	Герметичность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение буферного раствора не оказывает влияния на данный критический параметр

Продолжение таблицы 6.30

Этап	Критический параметр качества ЛП (Critical Quality Attribute)	Оценка риска	Обоснование и мероприятия для снижения риска
Получение раствора декспантенола и лидокаина	pH	Средний	Риск оценивается как средний, так введение ЛВ теоретически может изменить значение pH. Запланированные мероприятия: контроль данного параметра при валидации технологического процесса
	Содержание интерферона альфа-2b	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как растворение декспантенола и лидокаина не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание декспантенола	Средний	Риск оценивается как средний, так технологические параметры процесса активно влияют на количественное содержание ЛВ в растворе. Запланированные мероприятия: контроль данного параметра при валидации технологического процесса
	Содержание лидокаина	Средний	Риск оценивается как средний, так технологические параметры процесса активно влияют на количественное содержание ЛВ в растворе. Запланированные мероприятия: контроль данного параметра при валидации технологического процесса
	МБЧ	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как в последующем полупродукт, в состав которого входит раствор декспантенола и лидокаина, подвергается стерилизации
	Герметичность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение раствора ЛВ не оказывает влияния на данный критический параметр
Получение гелевой основы	pH	Средний	Риск оценивается как средний, так как входящий в состав буферный раствор может влиять на данный критический параметр. Запланированные мероприятия: контроль данного параметра при валидации технологического процесса
	Содержание интерферона альфа-2b	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение основы не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание декспантенола	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение основы не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание лидокаина	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение основы не оказывает влияния на данный критический параметр

Продолжение таблицы 6.30

Этап	Критический параметр качества ЛП (Critical Quality Attribute)	Оценка риска	Обоснование и мероприятия для снижения риска
Получение гелевой основы	МБЧ	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как в последующем полупродукт, в состав которого входит гелевая основа, подвергается стерилизации
	Герметичность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как получение основы не оказывает влияния на данный критический параметр
Ведение в основу раствора декспантенола и лидокаина	рН	Средний	Риск оценивается как средний так на рН раствора может повлиять количество введенного в раствор ЛВ Запланированные мероприятия: контроль показателя на этапе валидации технологического процесса
	Содержание интерферона альфа-2b	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как введение в основу декспантенола и лидокаина не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание декспантенола	Средний	Риск оценивается как средний, так как от времени перемешивания зависит распределение АФС в смеси. Запланированные мероприятия: контроль содержания на этапе валидации Запланированные мероприятия: на этапе валидации технологического процесса подобрать время и скорость перемешивания и проводить внутрипроизводственный контроль показателя
	Содержание лидокаина	Средний	Риск оценивается как средний, так как от времени перемешивания зависит распределение АФС в смеси. Запланированные мероприятия: контроль содержания на этапе валидации Запланированные мероприятия: на этапе валидации технологического процесса подобрать время и скорость перемешивания и проводить внутрипроизводственный контроль показателя
	МБЧ	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как в последующем полупродукт подвергается стерилизации
	Герметичность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как введение ЛВ в основу не оказывает влияния на данный критический параметр

Продолжение таблицы 6.30

Этап	Критический параметр качества ЛП (Critical Quality Attribute)	Оценка риска	Обоснование и мероприятия для снижения риска
Стерилизация полупродукта	pH	Средний	Риск оценивается как средний, после стерилизации параметр может измениться. Запланированные мероприятия: внутрипроизводственный контроль параметра
	Содержание интерферона альфа-2b	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как стерилизация полупродукта не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание декспантенола	Средний	Риск оценивается как средний, так как при термическом воздействии теоретически может измениться количество АФС из-за деградации Запланированные мероприятия: контроль содержания на этапе валидации
	Содержание лидокаина	Средний	Риск оценивается как средний, так как при термическом воздействии теоретически может измениться количество АФС из-за деградации Запланированные мероприятия: контроль содержания на этапе валидации
	МБЧ	Средний	Риск оценивается как средний. Запланированные мероприятия: контроль параметра на этапе валидации и введение определения параметра во внутрипроизводственный контроль
	Герметичность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как стерилизация не оказывает влияния на данный критический параметр
Введение субстанции интерферона альфа-2b в полупродукт	pH	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как введение субстанции интерферона альфа-2b не оказывает влияния на данный критический параметр, в связи с малым объемом
	Содержание интерферона альфа-2b	Средний	Риск оценивается как средний, так как технологические параметры активно влияют на распределение ЛВ в объеме полупродукта. Запланированные мероприятия: контроль данного показателя на этапе валидации технологического процесса
	Содержание декспантенола	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как введение субстанции интерферона альфа-2b не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание лидокаина	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как введение субстанции интерферона альфа-2b не оказывает влияния на данный критический параметр

Продолжение таблицы 6.30

Этап	Критический параметр качества ЛП (Critical Quality Attribute)	Оценка риска	Обоснование и мероприятия для снижения риска
Введение субстанции интерферона альфа-2b в полупродукт	МБЧ	Средний	Риск оценивается как средний, так введение ЛВ осуществляется в классе чистоты D или C. Запланированные мероприятия: контроль данного показателя на этапе валидации технологического процесса. Кроме того, при трансфере технологии можно обеспечить передачу субстанции в реактор герметично
	Герметичность	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как введение интерферона не оказывает влияния на данный критический параметр
Наполнение туб	pH	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как наполнение туб не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание интерферона альфа-2b	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как наполнение туб не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание декспантенола	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как наполнение туб не оказывает влияния на данный критический параметр
	Содержание лидокаина	Низкий	Риск оценивается как низкий, так как наполнение туб не оказывает влияния на данный критический параметр
	МБЧ	Средний	Риск оценивается как средний, так как наполнение туб осуществляется в помещении класса D и C. Запланированные мероприятия: контроль параметра на этапе валидации
	Герметичность	Средний	Риск оценивается как средний, так как качество укупорки будет напрямую влиять на герметичность. Запланированные мероприятия: внутрипроизводственный контроль и контроль параметра на этапе валидации

Для процесса масштабирования производства является крайне значимым анализ рисков параметров технологического процесса, который проводили в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической N 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

В таблице 6.27 приведена оценка уровня риска технологического процесса, а в таблице 6.28 дано обоснование этого риска и мероприятия для снижения риска на этапе масштабирования и валидации технологического процесса

Лабораторные серии упаковывали в алюминиевые тубы в виду их доступности и универсальности, способности обеспечивать стабильность ЛП, однако при масштабировании процесса возможно перейти на другую первичную упаковку, например, системы безвоздушной доставки лекарств Aptar Pharma (США) [104] или пакеты саше однодозовые (рисунок 6.10).

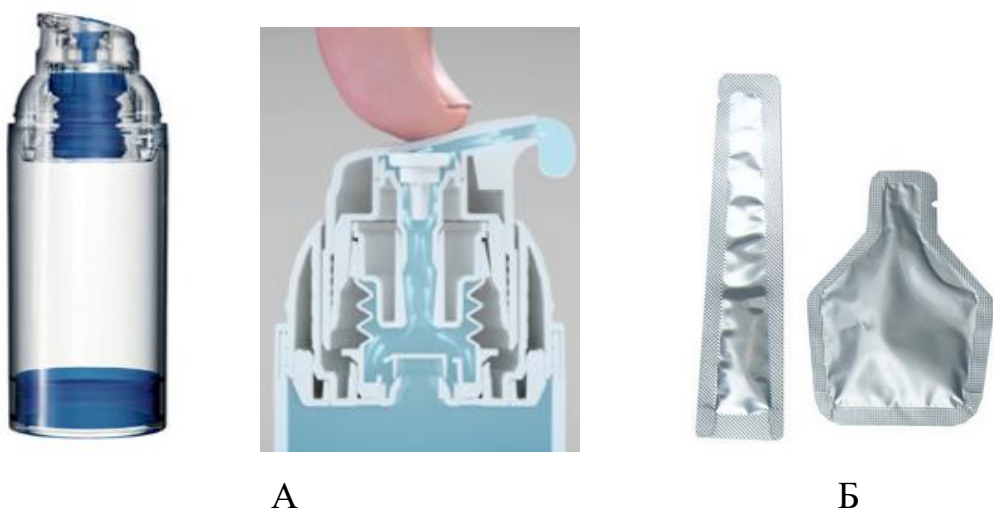


Рисунок 6.10 – Альтернативная первичная упаковка *preservatives-free* для комбинированного лабиального геля интерферона альфа-2b: А- система безвоздушной дермальной доставки лекарств Aptar Pharma; Б – пакеты саше однодозовые

6.2.6. Изучение стабильности и определение срока годности комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Изучение стабильности геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения проводили аналогично комбинированному офтальмологическому гелю интерферона и даларгина, так препараты имеют схожие условия производства и одинаковые условия хранения. Результаты представлены в таблицах 19-22 Приложение Б. Срок годности составил 2 года.

6.2.7. Изучение местно-раздражающего действия комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения

Результаты оценки интенсивности местно-раздражающего действия комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения представлены в таблице 6.31. Гель практически не вызывает местную реакцию на коже, и его действие соответствует «слабому или отсутствует».

Таблица 6.31 – Результаты оценки интенсивности местно-раздражающего действия комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения на кожу с 1-го по 14-ый день

Кролик № Баллы	1	2	3	4	5	6	сред- нее
Признаки местно- раздражающего действия							
Отек	0	1	0	0	0	0	0,2
Гипертермия и эритема	0	1	0	0	0	0	0,2
Боль	0	0	0	0	0	0	0
Утолщение кожной складки	0	0	0	0	0	0	0

Таким образом, разработанный гель не обладает местно-раздражающим действием на кожу.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Апробирована методология по фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями на примере цитокина-интерферона альфа-2b. Теоретически и экспериментально обоснованы в соответствии с концепцией Quality-by-Design составы двух комбинированных лекарственных форм данного белка. В качестве гелеобразователя в комбинированном офтальмологическом геле интерферона альфа-2b и даларгина использовали гидроксиэтилцеллюлозу марки Natrosol® 250 HNX PHARM концентрации 1,25%, в качестве стабилизаторов натрия хлорид 5,8%, натрия ацетат тригидрат 2,0% и ЭДТА в количестве 0,058%. Для получения комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения гелеобразователем являлась гидроксиэтилцеллюлоза марки Natrosol® 250 HNX PHARM в концентрации 4,0%, загустителем и структурообразователем является ПЭГ 4000 4,0%, эмолиентом Kollicream® IPM 0,5%, консервантом метилпарагидроксибензоат в концентрации 0,75%, состав стабилизаторов тот же, что и в офтальмологическом геле.

2. Полученный комбинированный офтальмологический гель интерферона альфа-2b и даларгина имеет низкое значение осмотической активности ($83,34 \pm 3,0$ за 24 часа), вязкость, входящую в реологический оптимум для офтальмологических гелей (пластическая вязкость при 0,135 Па·с), высокие биоадгезивные свойства ($118,6 \pm 2,9$ Н) и удовлетворительные технологические, биофармацевтические и потребительские характеристики.

Разработанный состав комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения обладает оптимальными увлажняющими свойствами (степень увлажнения через 30 минут составляла $33,2 \pm 0,6\%$), адсорбционной активностью – $0,082 \pm 0,06$ мг, биоадгезией $898,4 \pm 2,8$ Н, осмотической активностью ($144,00 \pm 0,4\%$ за 24 часа), вязкостью (пластическая вязкость 0,644 Па·с), высокой тиксотропией и окклюзионными свойствами.

3. Разработаны технологические схемы получения данных лекарственных форм, показана возможность трансфера разработанных технологий и их масштабирования, подобраны параметры процессов производства, определены стратегии внутрипроизводственного контроля и параметры качества готовых лекарственных форм.

4. Изучена стабильность разработанных ЛФ в естественных условиях хранения, оценено влияние хранения ЛФ при комнатной температуре в течение 24 часов на стабильность ЛФ (что важно для оценки возможностей промышленной площадки) и влияние стресс-фактора на стабильность ЛФ. Срок годности гелей составил 2 года, что соответствует срокам годности препаратов интерферона альфа-2b для аналогичных способов применения.

5. Проведена оценка уровня риска технологических процессов производства комбинированных гелей интерферона альфа-2b для офтальмологического применения, требующего асептического производства, и для наружного и местного применения, который можно производить в классе помещения С и/или D. Дано обоснование этих рисков и предложены мероприятия для снижения рисков на этапе масштабирования и валидации технологического процесса. Подтверждена возможность трансфера и масштабирования актами о внедрении (Приложение Г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методология фармацевтической разработки ГМЛФ с биотехнологическими субстанциями с учетом целевого профиля качества ЛП апробирована на пяти препаратах с различными биотехнологическими субстанциями. Первая группа субстанций представляет собой вирусные частицы – бактериофаги, различного штаммового состава. Разработанные составы и технологии получения ГМЛФ для перорального и вагинального применения могут быть использованы как для промышленного производства препаратов с фиксированным штаммовым составом, так и для персонализированной фаговой терапии и производства в аптечных условиях. Место персонализированной фаготерапии инфекционных заболеваний обсуждено и подтверждено клиническим использованием в публикациях, где автор данной работы является соавтором [56, 60].

Вторая группа субстанций представляет собой рекомбинантные белки: оригинальная АФС эндолизин LysECD7-SMAP, разработанная ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава РФ, и интерферон альфа-2b, производства АО «Биннофарм». Работа по разработке дерматологического геля с эндолизином LysECD7-SMAP для лечения раневых и ожоговых инфекций выполнена при поддержке Министерства здравоохранения РФ в рамках государственного контракта №0373100122119000013 от 15 мая 2019 года с ФГБУ «ЦСП» Минздрава России. Доказана эффективность и безопасность ЛФ в рамках исследований на животных, результаты опубликованы в Journal of Pharmaceutical Sciences Q2 с H-индексом 206 [335].

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

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

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

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

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

с^{-1} в диапазоне от 1,0 до 11 Па·с, а при скорости сдвига 300с^{-1} – от 0,3 до 1,7 Па·с; для стоматологических ГМЛФ оптимум значений динамической вязкости при температуре 20°C при скорости сдвига 30с^{-1} лежит в диапазоне от 4,0 до 12 Па·с, при скорости сдвига 300с^{-1} – от 2,0 до 3,0 Па·с; при температуре 37°C – при скорости сдвига 30с^{-1} в диапазоне от 2,0 до 7,8 Па·с, а при скорости сдвига 300с^{-1} – от 1,1 до 2,3 Па·с.

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

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

6. Предложены составы комбинированных лекарственных форм интерферона альфа-2 b в виде офтальмологического геля с даларгином и геля для наружного и местного применения с декспантенолом и лидокаином. Гелеобразователем для обеих лекарственных форм служит гидроксиэтилцеллюлоза разных марок, в виду отсутствия у нее цитотоксического действия на линию клеток Vero, использующуюся для оценки специфической активности лекарственного вещества. Экспериментально доказана необходимость

введения в состав ЛФ стабилизаторов рН, антиоксидантов для дерматологического геля, также эмолиента, пластификатора и консерванта. Проведен трансфер технологии ЛФ на производственную площадку АО «Биннофарм».

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

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

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

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

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФС – активная фармацевтическая субстанция

БОЕ – бляшкообразующая единица

ВВ – вспомогательное вещество

ВДИ – вода для инъекций

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ – высокожидкостная хроматография

ГМЛФ – гидрофильные мягкие лекарственные формы

ГПМЦ – гидроксиметилпропилцеллюлоза (гипромелоза)

ГПЦ – гидроксипропилцеллюлоза

ГФ ЕАЭС - Фармакопея Евразийского экономического союза

ГФ РФ - Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания

ГЭЦ – гидрокиэтилцеллюлоза

КОЕ – колониеобразующая единица

КПК/ CQAs – критические параметры качества/ Critical quality attributes

КПП/ CPP – критических параметров процесса/ Critical process parameters

ЛВ – лекарственное вещество

ЛП – лекарственный препарат

ЛС – лекарственное средство

ЛФ – лекарственная форма

МБЧ- микробиологическая чистота

МЛФ – мягкие лекарственные формы

МСО – международный стандартный образец

МЦ – метилцеллюлоза

НД – нормативная документация

НПО – научно-производственное объединение

НПЦ – научно-производственный центр

ОКИ – острые кишечные инфекции

ОФС – общая фармакопейная статья

ПВС – поливиниловый спирт

ПВП – поливинилпирролидон

ПВС – поливиниловый спирт

ПО – пропиленоксид

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

СО – стандартный образец

ТД – терапевтическая доза

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

ФЗ - Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств"

ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН - Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской Академии Наук

ФГБУ «ЦСП» Минздрава России - Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства Минздрава России

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭО – этиленоксид

BFS - технология выдув-наполнение запайка (Blow-Fill-Seal)

QbD- Quality by Design

ICH Q8 - International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use ich harmonised tripartite guideline. Pharmaceutical development Q8(R2)

NaКМЦ – натрий карбоксиметилцеллюлоза

MRSA - Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритм рационального подбора бактериофагов для новой лекарственной формы / И.А.Киселева, А.В. Алешкин, С.С. Бочкарева [и др.] // Инфекционные болезни. – 2019. – Т. 14. – № S1. – С. 134-135.
2. Анурова, М.Н., Проблемы коррекции органолептических свойств лекарственных препаратов / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – №. 4. – С. 64-73.
3. Анурова, М.Н. Вопросы моделирования слизистой оболочки влагалища для определения биоадгезии вагинальных гелей методом потока *in vitro* / М.Н. Анурова, А.С. Кашперко, Е.О. Бахрушина // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – Т. 20. – № 5. – С. 99-102.
4. Анурова, М.Н. Изучение влияния состава комбинированной матрицы на реологические характеристики экспериментальных образцов пероральных гелей нимесулида / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, С.П. Кречетов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №4. – С. 98-104.
5. Анурова, М.Н. Изучение современных требований к разработке и стандартизации вагинальных гелей / М.Н. Анурова, А.А. Дрыгина, Е.О. Бахрушина // Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – V. 19. – № 10. – С. 334-336.
6. Анурова, М.Н. Обзор современных гелеобразователей в технологии лекарственных форм / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – №9. – С. 39-46.
7. Анурова, М.Н. Мягкие лекарственные формы С.236-274/ Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Под. ред. Быковского С.Н.– Москва: Издательство Перо, 2015. – 472 с.
8. Аркуша, А.А. Исследование структурно-механических свойств мазей с целью определения оптимума консистенции: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / А.А. Аркуша. –

Харьков, 1982. – 192 с.

9. Бочкарева, С.С. Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: специальность 1.5.6.

«Биотехнология»: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Бочкарева Светлана Сергеевна; Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва. 2022. – 351 с.

10. Викулов, Г.Х. Герпесвирусные инфекции человека в новом тысячелетии: классификация, эпидемиология и медико-социальное значение / Г.Х. Викулов // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – № 3. – С. 35-40.

11. Вирус простого герпеса. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus> (дата обращения 12.08.2024).

12. Власов, В.В. Бактериофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине / В.В. Власов, Н.В. Тикунова, В.В. Морозова // Биохимия. – 2020. – Т. 85. – № 11. – С. 1587-1600.

13. Возможности корнеометрии в оценке эффективности увлажняющего действия топических препаратов / Н.В. Деева, Н.С. Михно, Ю.М. Криницына [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – 2019. – Т. 18. – № 2. – С. 167-170.

14. Воробьев, А.М. Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизиннов для профилактики и лечения раневой инфекции: специальность 1.5.6. «Биотехнология», 1.5.11. «Микробиология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Воробьев Алексей Максимович; Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва. 2023. – 193 с.

15. Врынчану, Н. А. Осмотическая активность мази на основе производного аминадамантана / Н.А. Врынчану, А.С. Шаламай // Проблемы экологии и медицины. – 2007. – Т.11. – №5-6. – С. 3-4.
16. Выделение и характеристика бактериофагов *Salmonella* как потенциальных агентов для фаговой терапии антибиотикорезистентных кишечных инфекций / М.А. Пасивкина, М.Н. Анурова, И.А. Киселева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 177. – № 4. – С. 471–475.
17. Государственный реестр лекарственных средств: [сайт]. URL: grls.minzdrav.gov.ru (дата обращения: 17.06.2024).
18. Грих, В.В. Разработка лекарственных форм нифедипина с применением твердых дисперсий: специальность 3.4.1. «Промышленная фармация и технология получения лекарств»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Грих Виктория Владимировна; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М. Сеченова министерства здравоохранения российской федерации (Сеченовский университет). – Москва. 2018. –24 с.
19. Денисов, Л.А. Открытие интерферона и его клиническое применение / Л.А. Денисов, И.В. Шолохов // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. – 2017. – № 1 (18). – С. 23-31.
20. Загорулько, Е. Ю. Выбор вспомогательных веществ и определение характеристик геля для приёма внутрь «Ралитин» / Е.Ю. Загорулько, А.А. Теслев // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – №3. – С. 20-28.
21. Загорулько, Е. Ю. Гели для приема внутрь. Часть 1 Лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище (обзор) / Е.Ю. Загорулько // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 3. – С. 42–48.
22. Загорулько, Е. Ю. Гели для приема внутрь. Часть 2 Вспомогательные вещества (обзор) / Е. Ю. Загорулько, А. А. Теслев // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 4. – С. 34–43.
23. Значение осмотических свойств мазей при их использовании в медицинской

- практике / И.М. Перцев, Н.Н. Беркало, С.А. Гуторов [и др.] // Вестник фармации. – 2002. – №2. – С. 7-10.
24. Иванкова, Ю.О. Исследования по выбору основы для наружной лекарственной формы коллагеназы / Ю.О. Иванкова, В.В. Верниковский, Э.Ф. Степанова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2-2. – С.478.
25. Изучение осмотической активности офтальмологических гелей / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, И.В. Лапик, А.С. Шитова, И.И. Краснюк // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – Т. 3. – № 24. – С. 30-34.
26. Изучение биофармацевтических свойств новой мукоадгезивной лекарственной формы для терапии дегенеративных заболеваний глаз / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, И.В. Лапик [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12. – № 3. – С. 41-48.
27. Исследование реологических характеристик оригинальной основы тизоль-гель и лекарственных композиций на его основе по мануальным прописям / М.В. Махотина, Б.Б. Сысуев, А.Ю. Петров [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №3. – С. 44-47.
28. Каленикова, Е.И. Фармакокинетика даларгина / Е.И. Каленикова, О.Ф. Дмитриева, Н.В. Коробов [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1988. – Т. 34. – № 1. – С. 75-83.
29. Кардиоваскулярные эффекты D-Ala², Leu⁵, Arg⁶-энкефалина (даларгин) связаны с активацией периферических опиоидных μ -рецепторов / Л.Н. Маслов, Ю.Б. Лишманов, Е.И. Барзах [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 71. – № 2. – С. 21-28.
30. Каштанова, Е.В. Антимикробная активность некоторых комплексов цинка и кобальта, содержащих метронидазол и фурацилин, и их влияние на течение инфекционного процесса: специальность 1.5.11. «Микробиология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Каштанова Елена Валерьевна; Санкт-Петербургская Государственная Химико-фармацевтическая Академия. – Курск. 2006. –22 с.
31. Кирсанов, Е.А. Место обобщённого уравнения течения среди других

реологических уравнений / Е.А. Кирсанов, Ю.Н. Тимошин // Жидкие кристаллы и их практическое использование. – 2010. – №4. – С. 38-47.

32. Киселева, И.А. Специализированный продукт диетического профилактического питания на основе коктейля бактериофагов: конструирование, технология производства, оценка безопасности и эффективности применения: специальность 1.5.6. «Биотехнология», 1.5.11. «Микробиология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Ирина Анатольевна Киселева; Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва. 2015. – 26 с.

33. Кислотность поверхности глаза и буферная система (путем изучения конъюнктивального мешка) / С.Е. Аветисов, Т.Н. Сафонова, И.А. Новиков [и др.] // Вестник Офтальмологии. – 2014. – Т. 130. – № 5. – С. 5-10.

34. Клинико-диагностическая оценка эффективности лечения оптической нейропатии у пациентов с отёчной формой эндокринной офтальмопатии / Г.В. Братко, Д.Д. Дмитриев, В.И. Братко [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. – 2022. – Т. 7. – № 1. – С. 67-73. DOI: 10.29413/ABS.2022-7.1.8.

35. Кобелева, Т.А. Анализ местных анестетиков и натрия диклофенака в мягких лекарственных формах на титансодержащей основе: Монография / Т.А. Кобелева, А.И. Сичко, К.И. Илиев // Минздрав России, Тюменский ГМУ. Тамбов: ООО «Консалтинговая компания Юком». 2017. – 88 с.

36. Ковальская, Г. Н. Гели как лекарственная форма в государственной Фармакопее XIV издания, нормативно-правовых Актах минздрава России и государственном реестре Лекарственных средств / Г. Н. Ковальская, Е. Н. Михалевич, Е. С. Колмакова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2020. – Т. 1. – № 27. – С. 76-85.

37. Майорова, А.В. Разработка состава и технологические исследования геля эктоина противорубцового действия / А.В. Майорова, Б.Б. Сысуев, Ю.В. Сысуева // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2021. – Т. 23. – №5. – С. 216-221.

38. Макиева, М.С. Определение осмотической и адсорбционной активности *in vitro* мазевых композиций на основе СО₂-экстракта Лимонника китайского семян / М.С. Макиева, Ю.А. Морозов // Фармация и фармакология. – 2014. – Т. 6. – № 7. – С. 42-47.
39. Максакова, Е.В. Даларгин в лечении травматических повреждений роговицы / Е.В. Максакова // Офтальмологический журнал. – 2000. – № 6. – С. 95-98.
40. Малкин, А.Я. Реология: концепции, методы, приложения / А.Я. Малкин, А.И. Исаев. – СПб.: Профессия. – 2007. – 557 с.
41. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм / Е.А. Киржанова, В.В. Хуторянский, Н.Г. Балабушевич [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – Т. 3. – № 8. – С. 66-80.
42. Нестерова, И.В. Препараты интерферона альфа в клинической практике: когда и как / И.В. Нестерова // Лечащий врач. – 2017. – № 9. – С. 66-66.
43. Обзор законодательства в области обращения персонализированных препаратов бактериофагов / Н.Н. Ландышев, Я.Г. Воронько, О.Ю. Тимошина [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2020. – Т. 65. – № 5. – С. 259-266.
44. Обоснование реологических оптимумов при разработке мягких лекарственных форм на гидрофильной основе. стоматологические гели / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Г.Г. Барнолицкий [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 2 (19). – С. 124-128.
45. Определение реологических оптимумов вагинальных гелей / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, А.М. Подколзин [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – № 2 (23). – С. 46-51.
46. Определение реологических оптимумов гелей для приема внутрь / Е.О. Бахрушина, М.Н. Анурова, М.Б. Корнеев [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2019. – Т. 22. – № 6. – С. 18-23.
47. Орлова, Т.В. Современные ректальные, вагинальные и уретральные лекарственные формы / Т.В. Орлова // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2014. – № 1. – С. 126-133.

48. Осмотическая активность готовых растворов лекарственных средств как показатель их качества / М.В. Корепанова, А.П. Коровяков, Н.А. Уракова, А.Л. Ураков // Успехи современного естествознания. – 2002. – № 2. – С. 95-95.
49. Оценка высвобождения лекарственных веществ из мягких лекарственных форм и прогнозирование проницаемости через кожный барьер (обзор) / Н.Б. Мельникова, И.А. Шеферов, А.А. Емашева [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13. – № 3. – С.52-65.
50. Пантюхин, А.В. Реологические модели в упруго-вязких лекарственных формах / А.В. Пантюхин, И.И. Краснюк // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 1. – С. 381.
51. Папков, С.П. Студнеобразное состояние полимеров. – М.: Химия, 1974. – 255 с.
52. Патент № 2002120894 Российская Федерация. Способ лечения поствоспалительной буллезной кератопатии: № 2002120894; заяв. 07.08.2002; опубл. 27.02.2004 / Братко В.И.; заявитель и патентообладатель: Государственное учреждение Межотраслевой научно-технический комплекс "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова. – 5 с.
53. Патент № 2185176 Российская Федерация, МПК [МПК класс]. Способ лечения дистрофических заболеваний роговицы и болезни трансплантата роговицы: № 2185176; заяв. 26.07.2000; опубл. 20.07.2002 / Моисеенко О.М.; заявитель и патентообладатель: Государственное учреждение Межотраслевой научно-технический комплекс "Микрохирургия глаза". – Бюл. 20. – 5 с.
54. Патент № 2198641 Российская Федерация, МПК [МПК класс]. Способ лечения глазных болезней: № 2198641; заяв. [дата заявки]; опубл. 20.02.2003 / Шелковникова Т.В., Кашников В.В.; заявитель и патентообладатель: Шелковникова Т.В. – Бюл. 5. – 5 с.
55. Патент № 2284192 Российская Федерация, МПК [МПК класс]. Способ лечения глаукомной оптической нейропатии: № 2284192; заяв. 01.04.2005; опубл. 27.09.2006 / Братко В.И., Черных В.В., Лукашина Н.С., Трунов А.Н.; заявитель и патентообладатель: Государственное учреждение Межотраслевой научно-

технический комплекс "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова Министерства здравоохранения РФ. – Бюл. 27. – 5 с. Russo, E. Poloxamer hydrogels for biomedical applications / E. Russo, C. Villa // *Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 11. – № 12. – 671 p.

56. Персонализированная фаготерапия в лечении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванных возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью / А.В. Алёшкин, С.С. Бочкарева, Л.И. Новикова [и др.] // *Инфекционные болезни*. – 2024. – Т. 22. – № 4. – С. 76–85. DOI: 10.20953/1729-9225-2024-4-76-85.

57. Подходы к разработке готовой лекарственной формы - стоматологического геля для лечения заболеваний полости рта (обзор) / А.А. Новотоцких, Д.О. Шаталов, С.А. Кедик [и др.] // *Биофармацевтический журнал*. – 2016. – Т. 8. – № 5. – С. 3-8.

58. Подорожная, М.Г. Разработка состава и технологии геля ранозаживляющего действия / М.Г. Подорожная, Е.В. Гладух // *Norwegian Journal of Development of the International Science*. – 2018. – Т. 7-1. – № 20. – С. 54-58.

59. Принципы коррекции вкуса пероральных гелей с синтетическими лекарственными веществами / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.В. Пятигорская, О.М. Ямбикова // *Фармация и фармакология*. – 2015. – Т. 3. – № 4. – С. 15–20.

60. Проблемы антибактериальной терапии госпитальных инфекций в пост-пандемическом периоде COVID-19 и пути их решения / А.А. Галицкий, С.Д. Митрохин, А.С. Шкода [и др.] // *Астраханский медицинский журнал*. – 2023. – Т. 18. – № 4. – С. 25-34.

61. Промышленная фармация. Путь создания продукта: монография / Ж.И. Аладышева, В.В. Береговых, Н.Б. Демина [и др.]; под ред. А.Л. Хохлова и Н.В. Пятигорской. — М.: 2019. – 394 с.

62. Разработка пептидных биофармацевтических препаратов в России / В.И. Дейгин, Е.А. Полуэктова, А.Г. Бениашвили [и др.] // *Фармацевтика*. – 2022. – Т. 14. – № 4. – С. 716. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040716.

63. Разработка состава комбинированного лабиального геля с

- иммунобиологической субстанцией/ М.Н. Анурова, А.С. Коваленко, Е.О. Бахрушина, И.И. Краснюк// Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2017. – Т. 20. – № 9. – С. 3-7.
64. Разработка термореверсивного вагинального геля с бактериофагами /М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина [и др.] // Биофармацевтический журнал. – 2019. – № 2. – С. 30-33.
65. Ретроспективный анализ производства и промышленного применения блок-сополимеров полиэтиленоксида и полипропиленоксида (обзор) / Е.О. Бахрушина, В.С. Пыжов, П.С. Сахарова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13. – № 1. – С. 52-68.
66. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
67. Рынок биотехнологий / Глобальный рынок Global Market Insights Inc. – 2021. – Текст: электронный. – URL: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/biotechnology-market> (дата обращения: 03.08.2024).
68. Рынок рекомбинантных белков по продуктам, услугам, конечным пользователям, функциям — глобальный прогноз на 2025–2030 годы. URL: <https://www.researchandmarkets.com/> (дата обращения: 08.02.2025).
69. Современные аспекты создания глазных лекарственных форм: определение реологических оптимумов офтальмологических гелей / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, И.В. Лапик [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 4 (21). – С. 64-70.
70. Современные тенденции применения и создания лекарственных препаратов бактериофагов / Е.О. Бахрушина, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2021. – Т. 76. – № 4. – С. 351-360.
71. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин» / М.Г. Шульженко, И.А. Василенко, Б.И. Уграк [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9. – № 3. – С. 111-117. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.
72. Сравнительный анализ карбомерных полимеров для фармацевтической и

косметической практики / Г.П. Кухтенко, Т.В. Попова, Е.В. Гладух [и др.] // Запорожский медицинский журнал. – 2020. – Vol. 22. – № 3. – Р. 431-436.

73. Сравнительное изучение реологических свойств гелей и кремов на различных основах-носителях / У.В. Ногаева, А.А. Наумова, А.Г. Новиньков [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Vol. 11. – № 3. – Р. 121–129.

74. Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года, утвержденная распоряжением Правительства РФ от 7 июня 2023 г № 1495-р / Правительство Российской Федерации официальный сайт. – Текст: электронный. – URL: <http://static.government.ru> (дата обращения: 02.05.2024).

75. Сысуев, Б.Б. Обоснование возможности использования офтальмологического спрея бишофита и кислоты глицирризиновой при гнойных инфекциях глаз / Б.Б. Сысуев, А.А. Спасов, И.Ю. Митрофанова // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – №1 (37). – С. 62-64.

76. Сысуев, Е.Б. Создание и технологические исследования защитных мазей на гидрофильных основах для использования в качестве профессиональных дерматопротекторов: специальность 3.4.1. «Промышленная фармация и технология получения лекарств»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Сысуев Евгений Борисович; Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – Пятигорск. 2005. –23 с.

77. Улизко, И.В. Реологические характеристики гелей на основе гидроксиэтилцеллюлозы / И.В. Улизко, В.В. Трохимчук, В.И. Чуешов// ScienceRise. Pharmaceutical Science. – 2016. – Т. 3. – № 3. – С. 44-48.

78. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: [сайт]. – URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php (дата обращения: 25.08.2024).

79. Федотова, А.А. Разработка и исследование вагинальных гелей с сорбентами

и с оксиметилурацилом: специальность 3.4.1. «Промышленная фармация и технология получения лекарств»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Федотова Анастасия Анатольевна; Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР). – М. 2011. – 22 с.

80. Феофилова, А. Е. Современные концепции фармацевтической разработки в условиях перехода к единому регулированию сферы обращения лекарственных средств / А. Е. Феофилова, А. В. Фотеева, Н. Б. Ростова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – № 9 (4). – С. 15–20.

81. Хаджиева, З.Д. Изучение биодоступности гелей фексофенадина в опытах *in vitro* / З.Д. Хаджиева, В.А. Чумакова, Л.Б. Губанова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1-2. – С. 236-236.

82. Хаджиева, З.Д. Исследования по выбору оптимальной мазевой основы наружной лекарственной формы для лечения атопического дерматита / З.Д. Хаджиева, З.Б. Тигиева // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 11. – С. 155-158.

83. Что происходит на российском рынке биотехнологий [Электронный ресурс]: Новая жизнь биотехнологий. – 2023. . – URL: [https:// www.rbc.ru/ industries/news /651fc16d9a7947638644564a](https://www.rbc.ru/industries/news/651fc16d9a7947638644564a) (дата обращения: 04.05.2024).

84. Шаколо, Т.В. Некоторые аспекты фармацевтической разработки дерматологических гелей / Т.В. Шаколо, О.М. Хишова // Вестник фармации. – 2018. – Т. 4. – № 82. – С. 99-104.

85. Шикова, Ю.В. Биофармацевтическое обоснование составов и разработка технологии производства мягких лекарственных форм: специальность 3.4.1. «Промышленная фармация и технология получения лекарств»: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Шикова Юлия Витальевна; Пермская государственная фармацевтическая академия. – М. 2005. – 22 с.

86. Эндолизины и перспективы их применения для лечения инфекций, вызванных полирезистентными бактериями / А.М. Воробьев, М.Н. Анурова, А.В.

Алешкин [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24 – №10. – С. 13-22.

87. Эпидемиология и эпидемиологический мониторинг инфекций, вызванных метициллинрезистентными штаммами золотистого стафилококка: Федеральные клинические рекомендации / Е.Б. Брусина, О.А. Дмитренко, Л.С. Глазовская, Т.В. Ефимова. – М., 2014. – 50 с.

88. A comprehensive review on hydrogels / H. Chopra, I. Singh, S. Kumar [et al.] // Current drug delivery – 2022. – Vol. 19. – № 6. – P. 658-675.

89. A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems / J. Bassi da Silva, S.B.S. de Ferreira, O. de Freitas, M.L. Bruschi // Drug development and industrial pharmacy. – 2017. – Vol. 43. – P. 1053–1070.

90. A mucoadhesive, thermoreversible in situ nasal gel of geniposide for neurodegenerative diseases / Y. Wang, S. Jiang, H. Wang [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12. – № 12. – e0189478. DOI: 10.1371/journal.pone.0189478.

91. A novel pH-induced thermosensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan and poloxamer cross-linked by glutaraldehyde for ophthalmic drug delivery / S. Yu, X. Zhang, G. Tan [et al.] // Carbohydrate polymers. – 2017. – Vol. 155. – P. 208-217.

92. A rational approach to form disulfide linked mucin hydrogels / K. Joyner, D. Song, R.F. Hawkins [et al.] // Soft Matter. – 2019. – Vol. 15. – P. 9632-9639.

93. A review of extractions of seaweed hydrocolloids: properties and applications / H.P.S. Abdul Khalil, T.K. Lai, Y.Y. Tye, S. Rizal [et al.] // Express polymer letters. – 2018 – Vol. 12. – P. 296–317.

94. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications / M.I. Baker, S.P. Walsh, Z. Schwartz, B.D. Boyan // Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials. – 2012. – 100. – № 5. – P. 1451-7.

95. A robust mucin-containing poly (vinyl alcohol) hydrogel model for the *in vitro* characterization of mucoadhesion of solid dosage forms / B. Gyarmati, G. Stankovits, B.Á. Szilágyi [et al.] // Colloids and surfaces. B, Biointerfaces – 2022 – Vol. 213 – 112406 p.

96. Abdeltawab, H. Formulation strategies to modulate drug release from poloxamer

based *in situ* gelling systems/ H. Abdeltawab, D. Svirskis, M. Sharma // Expert opinion on drug delivery. – 2020. – Vol. 17. – № 4. – P. 495-509.

97. Abdl Aali, R.A.K. Gellan gum as a unique microbial polysaccharide: its characteristics, synthesis, and current application trends / R.A.K. Abdl Aali, S.T.G. Al-Sahlany // Gels. – 2024. – Vol. 10. – № 3. – 183 p.

98. Abune, L. Affinity hydrogels for protein delivery / L. Abune, Y. Wang // Trends in Pharmacological Sciences. – 2021. – Vol. 42. – № 4. – P. 300-312. DOI: 10.1016/j.tips.2021.01.005.

99. Acute and chronic wound infections: microbiological, immunological, clinical and therapeutic distinctions / J. Hurlow, P.G. Bowler, S. Cawley [et al.] // Journal of Wound Care. – 2022. – Vol. 31. – № 5. – P. 436-445. DOI: 10.12968/jowc.2022.31.5.436.

100. Advances in the research and application of smart-responsive hydrogels in disease treatment / J. Cao, P. Yuan, B. Wu [et al.] // Gels. – 2023. – Vol. 9. – № 8. – 662 p.

101. Advances in xanthan gum-based systems for the delivery of therapeutic agents / M. Jadav, D. Pooja, D.J. Adams, H. Kulhari // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – 402 p.

102. Afarid, M. Evaluation of the effect of topical interferon $\alpha 2b$ as a complementary treatment of macular edema of patients with diabetic retinopathy: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial study / M. Afarid, A. Meshksar, A. Salehi // Retina. – 2020. – Vol. 40. – № 5. – P. 936-942.

103. Ahmed, EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review / EM. Ahmed // Journal of Advanced Research. – 2015. – Vol. 6. – № 2. – P. 105-21.

104. Airless semi-solid dispensing systems. URL: <https://aptar.com/pharmaceutical/technologies/airless/> (дата обращения: 11.08.2024).

105. Alawami, A.Z. Late onset hypersensitivity reaction to hyaluronic acid dermal fillers manifesting as cutaneous and visceral angioedema / A.Z. Alawami, Z. Tannous // Journal of cosmetic dermatology. – 2021. – Vol. 20. – P. 1483–1485.

106. Alginate microbeads and hydrogels delivering meropenem and bacteriophages to treat *Pseudomonas aeruginosa* fracture-related infections / B. Chen, L.P. Benavente, M. Chittò [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2023. – Vol. 364. – P. 159-173. DOI:

10.1016/j.jconrel.2023.10.029.

107. Alginate: current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications / M. Szekalska, A. Puciłowska, E. Szymańska [et al.] // International journal of polymer science. – 2016. – Vol. 2016. – 7697031 p.

108. Alginate-based composite materials for wound dressing application: a mini review / K. Varaprasad, T. Jayaramudu, V. Kanikireddy [et al.] // Carbohydrate polymers. – 2020 – Vol. 236. – 116025 p.

109. Alginate-based hydrogel systems for drug releasing in wound healing / M. Kurakula, G.S.N.K. Rao, V. Kiran [et al.] // Alginates in Drug Delivery. – Academic Press, 2020. – P. 323-358.

110. Ali, M. Controlled release of high molecular weight hyaluronic acid from molecularly imprinted hydrogel contacts lenses / M. Ali, M.E. Byrne // Journal of Pharmacy Research. – 2009. – Vol. 26. – P. 714–726.

111. Alternative excipients for protein stabilization in protein therapeutics: overcoming the limitations of polysorbates / A.J. Castañeda Ruiz, M.A. Shetab Boushehri [et al.] // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14. – № 12. – P. 2575. DOI: 10.3390/pharmaceutics14122575.

112. Amphipathic chitosan's improve the physicochemical properties of siRNA-chitosan nanoparticles at physiological conditions / G.O. Martins, M.S. Petrônio, A.M.F. Lima [et al.] // Carbohydrate polymers. – 2019. – Vol. 216. – P. 332–342.

113. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis / B. Aslam, W. Wang, M.I. Arshad [et al.] // Infection and Drug Resistance. – 2018. – Vol. 11. – P. 1645-1658. DOI: 10.2147/IDR.S173867.

114. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds / M.C. Rocha De Souza, C.T. Marques, C.M. Guerra Dore [et al.] // Journal of applied phycology. – 2007. – Vol. 19. – P. 153–160.

115. Antitumour potential of gigartina pistillata carrageenans against colorectal cancer stem cell-enriched tumourspheres // J. Cotas, V. Marques, M.B. Afonso[et al.] // Marine Drugs. – 2020. – Vol. 18. – 50 p.

116. Antiviral activity of lambda-carrageenan against influenza viruses and severe acute

respiratory syndrome coronavirus 2 / Y. Jang, H. Shin, M.K. Lee [et al.] // Scientific reports. – 2021. – Vol. 11. – 821 p.

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

118. Anurova, M.N. Modern preservatives of microbiological stability (review) / M.N. Anurova, E.O. Bakhrushina, N.B. Demina // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2019. – T. 53. – № 61. – С. 564-571.

119. Anurova, M.N. Permeability enhancers in transdermal delivery system technologic (review) / M.N. Anurova, E.O. Bakhrushina, N.B. Demina // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2021. – T. 54. – № 11. – С. 1162-1168.

120. Arshinoff, S. Role of rheology in tears and artificial tears / S. Arshinoff, N. Hofmann, N. Hemi // Journal of Cataract & Refractive Surgery. – 2021. – Vol. 47, № 5. – P. 655-661. DOI: 10.1097/j.jcrs.0000000000000508.

121. Ashland Global Holdings Inc. / Ashland: [сайт]. – 2024. – URL: <https://www.ashland.com> (дата обращения 22.08.2024).

122. Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview / C. Woertz, M. Preis, J. Breitkreutz, P. Kleinebudde // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2013. – Vol. 85. – P. 843-853.

123. Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview / C. Woertz, M. Preis, J. Breitkreutz, P. Kleinebudde // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2013. – Vol. 85. – P. 843-853.

124. Baby, D.K. Chapter 9—Rheology of hydrogels. In micro and nano technologies, rheology of polymer blends and nanocomposites / D.K. Baby // Elsevier. – 2020. – P. 193–204.

125. Bacteriophage application on red meats and poultry: Effects on Salmonella population in final ground products / Y. Yeh, P. Puruschothaman, N. Gupta [et al.] // Meat Science. – 2017. – Vol. 127. – P. 30-34. DOI: 10.1016/j.meatsci.2017.01.001.

126. Bacteriophage-delivering hydrogels: current progress in combating Antibiotic resistant bacterial infection / H.Y. Kim, R.Y.K. Chang, S. Morales [et al.] // Antibiotics

(Basel). – 2021. – Vol. 10. – № 2. – P. 130. doi: 10.3390/antibiotics10020130.

127. Bacteriophage-encoded enzymes destroying bacterial cell membranes and walls, and their potential use as antimicrobial agents / Ł. Grabowski, K. Łeppek, M. Stasiłojć [et al.] // *Microbiological Research*. – 2021. – Vol. 248. – P. 126746. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126746.

128. Bae, K.H. Emerging hydrogel designs for controlled protein delivery / K.H. Bae, M. Kurisawa // *Biomaterials Science*. – 2016. – Vol. 4. – № 8. – P. 1184-1192. DOI: 10.1039/c6bm00330c.

129. Bajwa, G.S. Molecular and mechanical properties of hydroxypropyl methylcellulose solutions during the sol: gel transition / G.S. Bajwa, C. Sammon, P. Timmins // *Polymer*. – 2009. – Vol. 50. – № 19. – P. 4571-4576.

130. Balcão, V.M. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art / V.M. Balcão, M.M.D.C. Vila // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2015. – Vol. 93. – P. 25-41.

131. Barnes, H.A. The yield stress myth? / H.A. Barnes; K. Walters // *Rheologica acta*. – 1985. – Vol. 24. – P. 323–326.

132. Barnes, H.A. The yield stress myth? Paper—25 years on / H.A. Barnes // *Applied rheology*. – 2007. – Vol. 17. – P. 43110-1–43110-5.

133. Bayer, I.S. Hyaluronic acid and controlled release: a review / I.S. Bayer // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 11. – 2649 p.

134. Benny, I.S. Review on application of xanthan gum in drug delivery / I.S. Benny, V. Gunasekar, V. Ponnusami // *International journal of pharmtech research*. – 2014. – Vol. 6. – P. 1322–1326.

135. Bercea, M. Viscosity of hydroxypropyl cellulose solutions in non-entangled and entangled states / M. Bercea, P. Navard // *Cellulose Chemistry and Technology*. – 2019. – hal-02439814.

136. Berger, J.R. Neurological complications of herpes simplex virus type 2 infection / J.R. Berger, S. Houff // *Archives of Neurology*. – 2008. – Vol. 65. – № 5. – P. 596-600.

137. Bianco, S. Using rheology to understand transient and dynamic gels / S. Bianco, S. Panja, D.J. Adams // *Gels*. – 2022. – Vol. 8. – № 2. – 132 p.

138. Bigels as drug delivery systems: From their components to their applications/ A. Martín-Illana, F. Notario-Pérez, R. Cazorla-Luna [et al.] // *Drug discovery today. Biosilico*. – 2022. – Vol. 27. – № 4. – P. 1008-1026.
139. Bioadhesive polymers: novel tool for drug delivery / K. Kumar, N. Dhawan, H. Sharma [et al.] // *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. – 2014. – Vol. 42. – P. 274–283.
140. Bodratti, A.M. Formulation of poloxamers for drug delivery / A.M. Bodratti, P. Alexandridis // *Journal of functional biomaterials*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – 11 p.
141. Bottom-up design of hydrogels for programmable drug release / C. Owh, V. Ow, Q. Lin [et al.] // *Biomaterials advances*. – 2022. – Vol. 141. – 213100 p.
142. Brenntag United Kingdom: official site. / Brenntag: [сайт]. – 2024. – URL: <https://www.brenntag.com> (дата обращения 25.08.2024).
143. Broad bactericidal activity of the Myoviridae bacteriophage lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against Gram-negative ESKAPE pathogens / N.P. Antonova, D.V. Vasina, A.M. Lendel [et al.] // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11, № 3. – P. 284. DOI: 10.3390/v11030284.
144. Bromberg, L. Polyether-modified poly (acrylic acid): synthesis and applications / L. Bromberg // *Industrial and engineering chemistry research*. – 1998. – Vol. 37. – P. 4267–4274.
145. Brown, Z.A. Genital herpes complicating pregnancy / Z.A. Brown // *Obstetrics & Gynecology*. – 2015. – Vol. 106. – № 4. – P. 845-856.
146. Buti, M. 1990-2010: two decades of interferon-based therapy / M. Buti, R. Esteban // *Clinical Liver Disease*. – 2011. – Vol. 15. – № 3. – P. 473-482. DOI: 10.1016/j.cld.2011.05.007.
147. Carbomer microgels as model yield-stress fluids / Z. Jaworski, T. Spychaj, A. Story, G. Story // *Reviews in chemical engineering*. – 2022. – Vol. 38. – № 7. – P. 881–919.
148. Carbopol based hydrogels for itopride hydrochloride delivery; synthesis, characterization and comparative assessment with various monomers / M. Sarfraz, R. Iqbal, K.U. Khan, M.U. Minhas // *Journal of Functional Biomaterials*. – 2022. – Vol. 13. – № 4. – 295 p.

149. Carbopol® polymer products. Lubrizol. URL: <https://www.lubrizol.com/Life-Sciences/Products/Carbopol-Polymer-Products> (дата обращения 20.04.23).
150. Cardoso, M.J. Marine origin polysaccharides in drug delivery systems / MJ. Cardoso, RR. Costa, JF. Mano // *Marine Drugs*. – 2016 – Vol. 14, № 2. – 34 p.
151. Carrageenan based hydrogels for drug delivery, tissue engineering and wound healing / R. Yegappan, V. Selvaprithiviraj, S. Amirthalingam, R. Jayakumar // *Carbohydrate polymers*. – 2018. – Vol. 198. – P. 385-400.
152. Carrageenan-based compounds as wound healing materials / B. Neamtu, A. Barbu, MO. Negrea, CŞ. Berghea-Neamtu [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 16. – 9117 p.
153. Carter, P.J. Designing antibodies as therapeutics / P.J. Carter, A. Rajpal // *Cell*. – 2022. – Vol. 185. – № 15. – P. 2789-2805. DOI: 10.1016/j.cell.2022.05.029.
154. Casalini, T. From microscale to macroscale: nine orders of magnitude for a comprehensive modeling of hydrogels for controlled drug delivery / T. Casalini, G. Perale // *Gels*. – 2019. – Vol. 5. – № 2. – 28 p.
155. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications / A.M. Vasi, M.I. Popa, M. Butnaru [et al.] // *Materials science and engineering*. – 2014. – Vol. 38. – P. 177–185.
156. Ching, S.H. Alginate gel particles—a review of production techniques and physical properties / S.H. Ching, N. Bansal, B. Bhandari // *Critical reviews in food science and nutrition*. – 2017. – Vol. 57. – P. 1133–1152.
157. Chitosan 3D cell culture system promotes naïve-like features of human induced pluripotent stem cells: A novel tool to sustain pluripotency and facilitate differentiation / P.-H. Chang, H.-M. Chao, E. Chern, S.-H. Hsu // *Biomaterials*. – 2021. – Vol. 268. – 120575 p.
158. Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems / T.M.M. Ways, W.M. Lau, V.V. Khutoryanskiy // *Polymers*. – 2018. – 10. – 267 p.
159. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications / F. Ahmadi, Z. Oveisi, S.M. Samani, Z. Amoozgar // *Research in pharmaceutical sciences*. – 2015. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-16.

160. Chitosan: an overview of its properties and applications / Aranaz, A.R. Alcántara, M.C. Civera [et al.] – № Acosta // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13. – 3256 p.
161. Chlebicz, A. *Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review* / A. Chlebicz, K. Śliżewska // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2018. – Vol. 15. – № 5. – P. 863. DOI: 10.3390/ijerph15050863.
162. Chopra, S. Potential of combination therapy of endolysin MR-10 and minocycline in treating MRSA induced systemic and localized burn wound infections in mice / S. Chopra, K. Harjai, S. Chhibber // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2016. – Vol. 306. – № 8. – P. 707-716. DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.08.003.
163. Clarifying the confusion between poligeenan, degraded carrageenan, and carrageenan: a review of the chemistry, nomenclature, and in vivo toxicology by the oral route / J.M. McKim, J.A. Willoughby, W.R. Blakemore [et al.] // *Critical reviews in food science and nutrition*. – 2019. – Vol. 59. – P. 3054–3073.
164. Clinical study on the effectiveness of three products in the treatment of herpes simplex labialis / H. Boes, V. Goulioumis, A. Wechsler [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 6465. DOI: 10.1038/s41598-020-63530-6.
165. Colonic drug delivery: Formulating the next generation of colon-targeted therapeutics / L.E. McCoubrey, A. Favaron, A. Awad, M [et al.] // *Journal of controlled release*. – 2023. – Vol. 353. – P. 1107-1126.
166. Combinatorial polyacrylamide hydrogels for preventing biofouling on implantable biosensors / D. Chan, J.C. Chien, E. Axpe [et al.] // *Advanced Materials*. – 2022. – Vol. 34. – № 24. – 2109764 p.
167. Comparative irritancy study among retinoid creams and gels / J.W. Toole, L. Lockhart, J. Potrebka [et al.] // *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*. – 1999. – Vol. 3, № 6. – P. 298-301. DOI: 10.1177/120347549900300604.
168. Comparative study of polycomplex oral drug delivery systems based on Carbopol® and oppositely charged polyelectrolytes as a new oral drug delivery system / R.I. Mustafin, I.I. Semina, V.R. Garipova [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2015. – Vol. 49. – № 1. – P. 1-6. DOI: 10.1007/s11094-015-1211-2.

169. Comparative study of the mucoadhesive properties of polymers for pharmaceutical use / E. Bakhrushina, M. Anurova, N. Demina [et al.] // Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. – 2020. – T. 8. – C. 639-645.
170. Controlled release of ofloxacin from chitosan–montmorillonite hydrogel / S. Hua, H. Yang, W. Wang, A. Wang // Applied Clay Science. – 2010. – Vol. 50. – № 1. – P. 112-117.
171. Cook, M.T. Mucoadhesion and mucosa-mimetic materials—A mini-review / M.T. Cook, V.V. Khutoryanskiy // International Journal of Pharmaceutics. – 2015. – Vol. 495. – P. 991–998.
172. Cook, M.T. Polymeric gels for intravaginal drug delivery / M.T. Cook, M.B. Brown // Journal of controlled release. – 2018. – Vol. 270. – P. 145-157.
173. CRISPR-Cas9 modified bacteriophage for treatment of Staphylococcus aureus induced osteomyelitis and soft tissue infection / L.H. Cobb, J. Park, E.A. Swanson [et al.] // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14. – P. e0220421. DOI: 10.1371/journal.pone.0220421.
174. Cultivating a three-dimensional reconstructed human epidermis at a large scale / I.M. Dijkhoff, B. Petracca, R. Prioux [et al.] // Journal of visualized experiments. – 2021. – Vol. 171. – e61802 p.
175. Das Neves, J. Gels as vaginal drug delivery systems / J. das Neves, M.F. Bahia // International journal of drug discovery and pharmacology. – 2006. – Vol. 318. – № 1-2. – P. 1-14.
176. Datta, A. Characterization of polyethylene glycol hydrogels for biomedical applications. LSU Master's Theses: 3502. – 2007. – 107 p.
177. Davis, B.K. Control of diabetes with polyacrylamide implants containing insulin / B.K. Davis // Experientia. – 1972. – Vol. 28. – № 3. – P. 348. DOI: 10.1007/BF01928732.
178. Dermatologic gels spreadability measuring methods comparative study / E.O. Bakhrushina, M.N. Anurova. M.S. Zavalniy [et al.] // International Journal of Applied Pharmaceutics – 2022. – T. 14. – №1 – P. 164-168.
179. Determination of bactericidal activity spectrum of recombinant endolysins of ecd7, am24, ap22, si3, and st11 bacteriophages/ A.M. Vorob'ev, A.V. Aleshkin, I.A. Kiseleva [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2021. – T. 170. – № 5. – C. 636-

639.

180. Development and anti-*Candida* evaluation of the vaginal delivery system of amphotericin B nanosuspension-loaded thermogel / T. Ci, L. Yuan, X. Bao [et al.] // *Journal of Drug Targeting*. – 2018. – Vol. 26. – № 9. – P. 829-839.

181. Development and comparative evaluation of ciprofloxacin nanoemulsion-loaded bigels prepared using different ratios of oleogel to hydrogels / R. Hamed, W. Abu Alata, M. Abu-Sini [et al.] // *Gels*. – 2023. – Vol. 9. – № 7. – 592 p.

182. Development and evaluation of sodium alginate/carbopol 934P-Co-poly (methacrylate) hydrogels for localized drug delivery / A. Mahmood, M.A. Ibrahim, Z. Hussain [et al.] // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – 311 p.

183. Development of a standardized method for measuring bioadhesion and mucoadhesion that is applicable to various pharmaceutical dosage forms / L. Amorós-Galicia, A. Nardi-Ricart, C. Verdugo-González [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 10. – 1995 p.

184. Development of a thermo-reversible insulin liquid suppository with bioavailability enhancement / M.-O. Yun, H.-G. Choi, J.-H. Jung [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1999. – Vol. 189. – P. 137-145.

185. Development of novel antimicrobials with engineered endolysin LysECD7-SMAP to combat Gram-negative bacterial infections / D.V. Vasina, N.P. Antonova, V.A. Gushchin [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. – 2024. – Vol.31. – №1. – P. 75. DOI: 10.1186/s12929-024-01065-y.

186. Development of transferosomal gel for transdermal delivery of insulin using iodine complex / H. Marwah, T. Garg, G. Rath [et al.] // *Drug Delivery*. – 2016. – Vol. 23. – №5. – P. 1636-1644. DOI: 10.3109/10717544.2016.1155243.

187. Devi, D.R. Poloxamer: A novel functional molecule for drug delivery and gene therapy / D.R. Devi, P. Sandhya, B.V. Hari // *J. Pharm. Sci. Res.* – 2013. – Vol. 5. – P. 159–165.

188. Dexpanthenol in wound healing after medical and cosmetic interventions (postprocedure wound healing) / J. Gorski, E. Proksch, J.M. Baron [et al.] // *Pharmaceutics (Basel)*. – 2020. – Vol. 13. – № 7. – P. 138. DOI: 10.3390/ph13070138.

189. Di, L. Drug-like property concepts in pharmaceutical design / L. Di, E.H. Kerns, G.T. Carter // Current pharmaceutical design. – 2009. – Vol. 15. – № 19. – P. 2184-2194.
190. Dragan, E.S. Polysaccharides constructed hydrogels as vehicles for proteins and peptides. A review / E.S. Dragan, M.V. Dinu // Carbohydrate Polymers. – 2019. – Vol. 225. – P. 115210. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115210.
191. Drug delivery from hydrogels: a general framework for the release modeling /D. Caccavo, S. Cascone, G. Lamberti [et al.] // Current drug delivery. – 2017. Vol. 14. – № 2. – P. 179-189.
192. Effect of alginate molecular weight and m/g ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics / P.E. Ramos, P. Silva, M.M. Alario [et al.] // Food hydrocolloids. – 2018. – Vol. 77. – P. 8–16.
193. Effect of intermittent shear stress on corneal epithelial cells using an in vitro flow culture model / U. Hampel, F. Garreis, F. Burgemeister [et al.] // The ocular surface. – 2018. – Vol.16. – №3. – C. 341-351. DOI: 10.1016/j.jtos.2018.04.005.
194. Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium / C.S. Yong, J.S. Choi, Q.-Z. Quan [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2001. – Vol. 226. – P. 195-205.
195. Effects of amphiphilic chitosan on stereocomplexation and properties of poly (lactic acid) nano-biocomposite / A. Gupta, A.K. Pal, E.M. Woo [et al.] // Scientific reports. – 2018. – Vol. 8. – 4351 p.
196. Effects of carbomer 940 hydrogel on burn wounds: an *in vitro* and *in vivo* study / F. Hayati, S.M. Ghamsari, M.M. Dehghan, A. Oryan // Journal of Dermatological Treatment. – 2018. – Vol. 29. – № 6. – P. 593-599.
197. Efficacy of the endolysin-based antibacterial gel for treatment of anaerobic infection caused by *Fusobacterium necrophorum* / D.V. Vasina, N.P. Antonova, A.M. Vorobev [et al.] // Antibiotics. – 2021. – Vol. 10. – № 10. – e1260.
198. Electroconductive natural polymer-based hydrogels / Z. Shi, X. Gao, M.W. Ullah [et al.] // Biomaterials. – 2016. – Vol. 111. – P. 40-54.
199. Electrospun fibers based on carbohydrate gum polymers and their multifaceted applications / V.V. Padil, J.Y. Cheong, K.P. Akshay Kumar [et al.] // Carbohydrate

polymers. – 2020. – Vol. 247. – 116705 p.

200. Emulgel: an effective drug delivery system / M. Talat, M. Zaman, R. Khan [et al.] // Drug development and industrial pharmacy. – 2021. – Vol. 47. – № 8. – P. 1193-1199.

201. Encapsulated bacteriophages in alginate-nanohydroxyapatite hydrogel as a novel delivery system to prevent orthopedic implant-associated infections / J.A.R. Barros, L.D. Melo, R.A. Silva [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2020. – Vol. 24. – P. 102145. DOI: 10.1016/j.nano.2019.102145.

202. Enhanced alignment and mechanical properties through the use of hydroxyethyl cellulose in solvent-free native cellulose spun filaments / S. Hooshmand, Y. Aitomäki, L. Berglund [et al.] // Composites Science and Technology. – 2017. – Vol. 150. – P. 79-86. DOI: 10.1016/j.compscitech.2017.07.011.

203. Enhanced topical delivery of tacrolimus by a carbomer hydrogel formulation with transcutol P / S.G. Lee, J.B. Kang, S.R. Kim [et al.] // Drug Development and Industrial Pharmacy. – 2016. – Vol. 42. – № 10. – P. 1636-1642.

204. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children / T.J. Ochoa, C.A. Contreras, W.W. Gaastra [et al.] // Current Opinion in Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 24. – № 5. – P. 478-483. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b.

205. Environmental stability and curcumin release properties of pickering emulsion stabilized by chitosan/gum arabic nanoparticles / J. Han, F. Chen, C. Gao [et al.] // International journal of biological macromolecules. – 2020. – Vol. 157. – P. 202–211.

206. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104 outbreak in Germany / C. Frank, D. Werber, J.P. Cramer [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2011. – Vol. 365. – P. 1771-1780.

207. Epidemiologic and economic effect of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in obstetrics / R.H. Beigi, K. Bunge, Y. Song [et al.] // Obstetrics & Gynecology. – 2009. – Vol. 113. – P. 983-991.

208. Eshel-Green, T. PEGDA hydrogels as a replacement for animal tissues in mucoadhesion testing / T. Eshel-Green, S. Eliyahu, S. Avidan-Shlomovich // International Journal of Pharmaceutics. – 2016. – Vol. 506. – № 1-2. – P. 25-34.

209. Esposito, C.L. Organogels, promising drug delivery systems: an update of state-of-

- the-art and recent applications / C.L. Esposito, P. Kirilov, V.G. Roullin // Journal of controlled release. – 2018. – Vol. 271. – P. 1-20.
210. Evaluation of microneedles-assisted *in situ* depot forming poloxamer gels for sustained transdermal drug delivery / S. Khan, M.U. Minhas, I.A. Tekko [et al.] // Drug delivery and translational research. – 2019. – Vol. 9. – P. 764-782.
211. Exploring the antioxidant potential of gellan and guar gums in wound healing / G. Dodi, R.E. Sabau, B.E. Crețu, I. Gardikiotis // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – № 8. – 2152 p.
212. Fabrication and *in vitro* evaluation of Carbopol/Polyvinyl alcohol-based pH-sensitive hydrogels for controlled drug delivery / M. Suhail, I.H. Chiu, J.Y. Liu [et al.] // Current Pharmaceutical Design. – 2023. – Vol. 29. – № 31. – P. 2489-2500.
213. Factors affecting nasal drug delivery and design strategies for intranasal drug delivery / X. Hu, X. Yue, C. Wu, X. Zhang // Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2023. – Vol. 52. – № 3. – P. 328-337.
214. Feketshane, Z. Gellan gum in wound dressing scaffolds / Z. Feketshane, S. Alven, B.A. Aderibigbe // Polymers (Basel). – 2022. – Vol. 14. – № 19. – 4098 p.
215. Ferreira, L. Design of a drug-delivery system based on polyacrylamide hydrogels. Evaluation of structural properties / L. Ferreira, M.M. Vidal, M.H. Gil // The Chemical Educator. – 2001. – Vol. 6. – P. 100-103.
216. Formulation and evaluation of in situ gelling system of dimenhydrinate for nasal administration / V.S. Belgamwar, D.S. Chauk, H.S. Mahajan [et al.] // Pharmaceutical Development and Technology. – 2009. – Vol. 14. – №. 3. – P. 240-248. DOI: 10.1080/10837450802498910.
217. Functional stimuli-responsive gels: Hydrogels and microgels / C. Echeverria, S.N. Fernandes, M.H. Godinho [et al.] // Gels. – 2018. – Vol. 4. – № 2. – P. 54.
218. Fundamental concepts of hydrogels: synthesis, properties, and their applications / S. Bashir, M. Hina, J. Iqbal [et al.] // Polymers. – 2020. – Vol. 12. – 2702 p.
219. Gel-forming mucins structure governs mucus gels viscoelasticity / B. Demouveau, V. Gouyer, M. Magnien [et al.] // Medecine Sciences. – 2018. – Vol. 34. – № 10. – P. 806-812. DOI: 10.1051/medsci/2018206.

220. Gels from modified hydroxyethyl cellulose and ionic surfactants / H. Hoffmann, U. Kästner, R. Dönges, R. Ehrler // *Polymer Gels and Networks*. – 1996. – Vol. 4. – № 5-6. – P. 509-526.
221. Ghose, C. Gram-negative bacterial lysins / C. Ghose, C.W. Euler // *Antibiotics* (Basel). – 2020. – Vol. 9. – № 2. – P. 74. DOI: 10.3390/antibiotics9020074.
222. Giddings, S.L. Traveler's Diarrhea / S.L. Giddings, A.M. Stevens, D.T. Leung // *Medical Clinics of North America*. – 2016. – Vol. 100. – № 2. – P. 317-330. DOI: 10.1016/j.mcna.2015.08.017.
223. Godin, B. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models / B. Godin, E. Touitou // *Advanced drug delivery reviews*. – 2007. – Vol. 59. – P. 1152–61.
224. Grzybek, P. Neat chitosan porous materials: a review of preparation, structure characterization and application / P. Grzybek, Ł. Jakubski, G. Dudek // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 17. – 9932 p.
225. Hacker, M.C. Synthetic polymers. Principles of regenerative medicine / M.C. Hacker, A.G. Mikos // *Biomaterials for Regenerative Medicine*, 2nd ed., 2011. – P. 587–622.
226. Hair-bearing human skin generated entirely from pluripotent stem cells / J. Lee, C.C. Rabbani, H. Gao [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 582. – № 7812. – P. 399-404.
227. Halasa, A. The chemical modification of polymers. / A. Halasa, J.M. Massie, R. Ceresa // *Science and Technology of Rubber*. – 2005. – Vol. 2005. – P. 497–528.
228. Hamed, R. Synthetic tracheal mucus with native rheological and surface tension properties / R. Hamed, J. Fiegel // *Journal of biomedical materials research Part A*. – 2014. – Vol. 102. – № 6. – P. 1788-1798.
229. Hamed, Z.O. Novel recombinant endolysin ointment with broad antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from wounds and burns / Z.O. Hamed, A.A. Awni, A.S. Abdulamir // *Archives of Microbiology*. – 2023. – Vol. 205. – № 4. – P. 104. DOI: 10.1007/s00203-023-03434-x.
230. Huq, T. Sources, production and commercial applications of fungal chitosan: A review / T. Huq, A. Khan, D. Brown. – № Dhayagude, Z. He, Y. Ni // *Journal of*

Bioresources and Bioproducts. – 2022. – Vol. 7. – P. 85–98.

231. Hurtado, A. Salmonella spp. And Listeria monocytogenes shedding in domestic ruminants and characterization of potentially pathogenic strains / A. Hurtado, M. Ocejó, B. Oporto // Veterinary Microbiology. – 2017. – Vol. 210. – P. 71-76. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.09.003.

232. Hydrogels as drug delivery systems: a review of current characterization and evaluation techniques / M. Vigata, C. Meinert, D.W. Hutmacher, N. Bock // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 12. – № 12. – 1188 p.

233. Hydrogels: Properties and applications in biomedicine / T.C. Ho, C.C. Chang, H.P. Chan [et al.] // Molecules. – 2022. – Vol. 27. – № 9. – 2902 p.

234. Hydroxyethyl cellulose hydrogel for wound dressing: Fabrication, characterization and *in vitro* evaluation / G.F. El Fawal, M.M. Abu-Serie, M.A. Hassan, M.S. Elnouby // International journal of biological macromolecules. – 2018. – Vol. 111. – P. 649-659.

235. Hydroxypropyl methylcellulose: Physicochemical properties and ocular drug delivery formulations / L.L. Tundisi, G.B. Mostaço, P.C. Carricondo, D.F.S. Petri // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2021. – Vol. 159. – P. 105736.

236. ICH. The International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: quality guideline Q8 (R2). – Текст: электронный. – Pharmaceutical Development, 2009. – URL: [http://www.ich.org/fileadmin/Public Web Site/ ICH Products/ Guidelines/ Quality/ Q8 R1/Step4/ Q8 R2 Guideline](http://www.ich.org/fileadmin/Public%20Web%20Site/ICH%20Products/Guidelines/Quality/Q8%20R1/Step4/Q8%20R2%20Guideline) (дата обращения: 30.08.2009).

237. Identification of key determinants of Staphylococcus aureus vaginal colonization / L. Deng, K. Schilcher, L.R. Burcham [et al.] // mBio. – 2019. – Vol. 10. – № 6. – e02321-19. DOI: 10.1128/mBio.02321-19.

238. Ilias, M.A. Analysis of carrageenan yield and gel strength of kappaphycus species in semporna sabah / M.A. Ilias, A. Ismail, R.J. Othman // Journal of tropical plant physiology. – 2017. – Vol. 9. – P. 14-23.

239. *In situ* forming polymeric drug delivery systems / M. Madan, A. Bajaj, S. Lewis [et al.] // Indian journal of pharmaceutical sciences. – 2009. – Vol. 71. – P. 242–251.

240. *In situ* gelling ophthalmic drug delivery system: an overview and its applications /

- R. Sheshala, Y.Y. Kok, J.M. Ng [et al.] // Recent patents on drug delivery and formulation. – 2015. – Vol. 9. – № 3. – P. 237-48.
241. *In situ* gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery / K. Al Khateb, E.K. Ozhmukhametova, M.N. Mussin [et al.] // International journal of pharmaceutics. – 2016. – Vol. 502. – № 1-2. – P. 70-79.
242. *In vitro* and *ex vivo* intestinal tissue models to measure mucoadhesion of poly (methacrylate) and N-trimethylated chitosan polymers / S. Keely, A. Rullay, C. Wilson [et al.] // Pharmaceutical Research. – 2005. – Vol. 22. – № 1. – P. 38-49.
243. *In vitro* cytotoxicity and transfection efficiency of pDNA encoded p53 gene-loaded chitosan-sodium deoxycholate nanoparticles / F.M. Hashem, M. Nasr, A. Khairy, A. Alqurshi // International journal of nanomedicine. – 2019. – Vol. 14. – P. 4123–4131.
244. *In vitro/ex Vivo* methods for the evaluation / L. Maggi, E. Carena, M.L. Torre [et al.] // STP pharma sciences. – 1994. – Vol. 4. – № 5. – P. 343-348.
245. *In vivo* and *in vitro* antidiabetic and anti-inflammatory properties of flax (*linum usitatissimum* l.) seed polyphenols / H. Mechchate, I. Es-safi, R. Conte [et al.] // Nutrients. – 2021. – Vol. 13. – 2759 p.
246. Influence of excipients on the structural and mechanical properties of semisolid dosage forms / H. Kukhtenko, I. Gladukh, O. Kukhtenko [et al.] // Asian Journal of Pharmaceutics. – 2017. – Vol. 11. – P. 575-578.
247. Injectable *in situ*-forming hydrogels for protein and peptide delivery / S.H. Park, Y.B. Ji, J.Y. Park [et al.] // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2020. – Vol. 1250. – P. 35-48. DOI: 10.1007/978-981-15-3262-7_3.
248. Innovative methods and applications in mucoadhesion research / A.R. Mackie, F.M. Goycoolea, B. Menchicchi [et al.] // Macromolecular bioscience. – 2017. – Vol. 17. – № 8. – 1600534 p.
249. Interferon-alpha for maintenance of follicular lymphoma / P. Baldo, M. Rupolo, A. Compagnoni [et al.] // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2010. – № 1. – CD004629. DOI: 10.1002/14651858.CD004629.pub2.
250. Interplay between *Staphylococcus aureus* and the vaginal microbiota / C.S. Maduta, S.W. Tuffs, J.K. McCormick [et al.] // Trends in Microbiology. – 2024. – Vol.

32. – № 3. – P. 228-230. DOI: 10.1016/j.tim.2023.12.005.
251. Interpolymer complexation between copovidone and carbopol and its effect on drug release from matrix tablets / F. Zhang, F. Meng, Z.Y. Wang, W. Na // Drug development and industrial pharmacy. – 2017. – Vol. 43. – № 2. – P. 190-203.
252. Intraocular injection of HyStem hydrogel is tolerated well in the rabbit eye / R.D. Glickman, M. Onorato, M.M. Campos [et al.] // Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. – 2021. – Vol. 37. – № 1. – P. 60-71. DOI: 10.1089/jop.2020.0042.
253. Intraoperative anaphylaxis to the bovine flowable gelatin matrix: a report of 2 cases / J.R. Coury, K.F. Skaggs, G.F. Marciano [et al.] // Journal of bone and joint surgery case connector. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – e21 p.
254. Intravitreal hydrogels for sustained release of therapeutic proteins / B.C. Ilochonwu, A. Urtti, W.E. Hennink, T. Vermonden // Journal of Controlled Release. – 2020. – Vol. 326. – P. 419-441. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.031.
255. Ivarsson, D. Comparison of *in vitro* methods of measuring mucoadhesion: ellipsometry, tensile strength and rheological measurements / D. Ivarsson, M. Wahlgren // Colloids and surfaces. B, Biointerfaces. – 2012. – Vol. 92. – P. 353-9.
256. Janas-Naze, A. Perioperative anaphylaxis to fibrin sealants in children with Noonan Syndrome—A retrospective study / A. Janas-Naze, W. Zhang // Annals of Allergy, Asthma & Immunology. – 2022. – Vol. 129. – № 1. – P. 95-100.
257. Jarzabek-Perz, S. Corneometric evaluation of skin moisture after application of 10% and 30% gluconolactone / S. Jarzabek-Perz, P. Mucha, H. Rotsztejn // Skin Research and Technology. – 2021. – Vol. 27. – № 5. – P. 925-930. DOI: 10.1111/srt.13044.
258. Jeong, B. Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels / B. Jeong, S.W. Kim, Y.H. Bae // Advanced drug delivery reviews. – 2012. – Vol. 64. – P. 154-162.
259. Joshi, S.C. Sol-gel behavior of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) in ionic media including drug release / S.C. Joshi // Materials. – 2011. – Vol. 4. – № 10. – P. 1861-1905.
260. Kalia, Y.N. Modeling transdermal drug release / Y.N. Kalia, R.H. Guy // Advanced drug delivery reviews. – 2001. – Vol. 48. – № 2-3. – P. 159-72.
261. Kappa-carrageenan-based dual crosslinkable bioink for extrusion type bioprinting

- / W. Lim, G.J. Kim, H.W. Kim [et al.] // Polymers. – 2020. – Vol. 12. – 2377 p.
262. Karmakar, S. Oleogel-based drug delivery for the treatment of periodontitis: current strategies and future perspectives / S. Karmakar, S. Shanmugasundaram, B. Modak // F1000Research. – 2023. – Vol. 12. – 1228 p.
263. Katz, D.F. Vaginal drug distribution modeling / D.F. Katz, A. Yuan, Y. Gao // Advanced drug delivery reviews. – 2015. – Vol. 92. – P. 2-13.
264. Kaur, P. A novel wound dressing consisting of PVA-SA hybrid hydrogel membrane for topical delivery of bacteriophages and antibiotics / P. Kaur, V.S. Gondil, S. Chhibber // International Journal of Pharmaceutics. – 2019. – Vol. 572. – P. 118779. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118779.
265. Kempwade, A. Formulation and evaluation of thermoreversible, mucoadhesive in situ intranasal gel of rizatriptan benzoate / A. Kempwade, A. Taranalli // Journal of sol-gel science and technology. – 2014. – Vol. 72. – P. 43-48. DOI: 10.1007/s10971-014-3422-5.
266. Khan, F. Designing smart biomaterials for tissue engineering / F. Khan, M. Tanaka // International journal of molecular sciences. – 2017. – Vol. 19. – № 1. – P. 17.
267. Khutoryanskaya, O. V. Multilayered hydrogel coatings covalently-linked to glass surfaces showing a potential to mimic mucosal tissues / O.V. Khutoryanskaya, M. Potgieter, V.V. Khutoryanskiy // Soft Matter. – 2010. – Vol. 6. – № 3. – P. 551-557.
268. Kokorovic, A. UGN-101 (mitomycin gel): a novel treatment for low-grade upper tract urothelial carcinoma / A. Kokorovic, S.F. Matin // Therapeutic Advances in Medical Oncology. – 2020. – Vol. 12. – 1758835920937950 p.
269. Kolawole, O.M. *In situ* gelling drug delivery systems for topical drug delivery / O.M. Kolawole, M.T. Cook // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2023. – Vol. 184. – P. 36-49.
270. Kollicream® OD. URL: <https://pharma.basf.com/products/kollicream-od> (дата обращения 22.08.2024).
271. Kolliphor® P 188 Bio. URL: <https://pharma.basf.com/products/kolliphor-p-188-bio> (дата обращения 22.08.2024).
272. Kolliphor® P 407 Geismar. URL: <https://pharma.basf.com/products/kolliphor-p-407> (дата обращения 22.08.2024).

273. Komorowska, P. Applications and properties of physical gels obtained on the basis of cellulose derivatives / P. Komorowska, J. Róžański // *Practical Aspects of Chemical Engineering: Selected Contributions from PAIC 2017*. Springer International Publishing. – 2018. – P. 185-200.
274. Kou, S. Chitosan: A review of sources and preparation methods / S. Kou, L.M. Peters, M.R. Mucalo // *International journal of biological macromolecules*. – 2021. – Vol. 169. – P. 85–94.
275. Kumar, S. In situ-forming gels for ophthalmic drug delivery / S. Kumar, B.O. Haglund, K.J. Himmelstein // *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*. – 1994. – Vol. 10. – № 1. – P. 47-56.
276. Kumari, S. Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055 / S. Kumari, K. Harjai, S. Chhibber // *Journal of Medical Microbiology*. – 2011. – Vol. 60. – P. 205–210. DOI: 10.1099/jmm.0.018580-0.
277. Kumari, S. Topical treatment of *Klebsiella pneumoniae* B5055 induced burn wound infection in mice using natural products / S. Kumari, K. Harjai, S. Chhibber // *Journal of Infection and Drug Resistance*. – 2010. – Vol. 4. – P. 367–377.
278. Laffleur, F. Progress in nasal drug delivery systems / F. Laffleur, B. Bauer // *International journal of drug discovery and pharmacology*. – 2021. – Vol. 607. – 120994 p.
279. Le Basle, Y. Physicochemical stability of monoclonal antibodies: a review / Y. Le Basle, P. Chennell, N. Tokhadze // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – Vol. 109. – № 1. – P. 169-190. doi: 10.1016/j.xphs.2019.08.009.
280. Lee, J. Peptide washout and permeability from glyceryl monooleate buccal delivery systems / J. Lee, I.W. Kellaway // *Drug development and industrial pharmacy*. – 2002. – Vol. 28. – № 9. – P. 1155-62.
281. Lehman, P.A. Percutaneous absorption in man: *In vitro-in vivo* correlation / P.A. Lehman, S.G. Raney, T.J. Franz // *Skin pharmacology and physiology*. – 2011. – Vol. 24. – P. 224–30.
282. Lewczuk, N. Interferon alpha 2a and 2b in ophthalmology: a review / N. Lewczuk,

- A. Zdebik, J. Bogusławska // Journal of Interferon & Cytokine Research. – 2019. – Vol. 39. – № 5. – P. 259-272. DOI: 10.1089/jir.2018.0125.
283. Li, L. Design and applications of photoresponsive hydrogels / L. Li, J.M. Scheiger, P.A. Levkin // Advanced Materials. – 2019. – Vol. 31. – № 26. – 1807333 p.
284. Lidocaine: the origin of a modern local anesthetic / T. Gordh, T.E. Gordh, K. Lindqvist, D.S. Warner // Anesthesiology. – 2010. – Vol. 113. – № 6. – P. 1433-1437. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181fcef48.
285. Lim, J.Y. A brief overview of Escherichia coli O157 and its plasmid O157 / J.Y. Lim, J. Yoon, C.J. Hovde // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2010. – Vol. 20. – № 1. – P. 5-14.
286. Liu, B. Research progress of polyvinyl alcohol water-resistant film materials / B. Liu, J. Zhang, H. Guo // Membranes (Basel). – 2022. – Vol. 12. – № 3. – 347 p.
287. Liu, F. A non-ionic thermophilic hydrogel with positive thermosensitivity in water and electrolyte solution / F. Liu, J. Seuring, S. Agarwal // Macromolecular Chemistry and Physics. – 2014. – Vol. 215. – № 15. – P. 1466-1472.
288. Llewelyn, V.K. Can models of percutaneous absorption based on *in vitro* data in frogs predict *in vivo* absorption? / V.K. Llewelyn, L. Berger, B.D. Glass // PLoS One. – 2020. – Vol. 15. – № 7. – e0235737 p.
289. Lomartire, S. Algal phycocolloids: bioactivities and pharmaceutical applications / S. Lomartire, A.M. Gonçalves // Marine Drugs. – 2023. – Vol. 21, № 7. – 384 p.
290. Loza-Rodríguez. – № A biocompatible lipid-based bigel for topical applications / N. Loza-Rodríguez, A. Millán-Sánchez, O. López // European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics – 2023. – Vol. 190. – P. 24-34.
291. Lubrisol / Официальный сайт. – URL: www.lubrisol.com (дата обращения 28.08.2024).
292. Main aspects of pharmaceutical gel development for peroral administration / E.O. Bakhrushina. M.N. Anurova. N.B. Demina // Pharmaceutical Chemistry Journal– 2019. – T. 53. – № 9. – P. 838-844.
293. Malkin, A.Y. Rheology of gels and yielding liquids / A.Y. Malkin, S.R. Derkach, V.G. Kulichikhin // Gels. – 2023. – Vol. 9. – № 9. – 715 p.

294. Malkin, Y. A modern look on yield stress fluids / Y. Malkin, V. Kulichikhin, S. Ilyin // *Rheologica acta*. – 2017. – Vol. 56. – P. 177–188.
295. Markus, T. Monitoring polysorbate 80 degradations in protein solutions using. Total Holographic Characterization / T. Markus, J. Lumer, R. Stasavage // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 652. – P. 123843. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2024.123843.
296. Mastropietro, D. Rheology in pharmaceutical formulations—A Perspective / D. Mastropietro // *Journal of developing drugs*. – 2013. – Vol 2. – P. 1–6.
297. McInnes, F. The use of simple dynamic mucosal models and confocal microscopy for the evaluation of lyophilised nasal formulations / F. McInnes, A.J. Baillie, H.N.E. Stevens // *Journal of pharmacy and pharmacology*. – 2007. – Vol. 59. – № 6. – P. 759-767.
298. Mechanically resilient, injectable, and bioadhesive supramolecular gelatin hydrogels crosslinked by weak host-guest interactions assist cell infiltration and in situ tissue regeneration / Q. Feng, K. Wei, S. Lin [et al.] // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 101. – P. 217-228. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.05.043.
299. Methylcellulose, a cellulose derivative with original physical properties and extended applications / P.L. Nasatto, F. Pignon, J.L. Silveira[et al.] // *Polymers*. – 2015. – Vol. 7. – № 5. – P. 777-803.
300. Metolose®. URL: <https://www.metolose.jp/en/pharmaceutical/metolose.html> (дата обращения 22.08.2024).
301. Mfoafo, K. Thermoresponsive mucoadhesive hybrid gels in advanced drug delivery systems / K. Mfoafo, Y. Omid, H. Omidian // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 636. – P. 122799. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.122799.
302. Modern preservatives of microbiological stability (review) / M.N. Anurova, E.O. Bakhrushina, N.B. Demina, E.S. Panteleeva // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2019. – T. 53. – № 6. – С. 564-571.
303. Modulation of endolysin LysECD7 bactericidal activity by different peptide tag fusion / N.P. Antonova, D.V. Vasina, E.O. Rubalsky [et al.] // *Biomolecules*. – 2020. – Vol.10. – №3. – P. 440. DOI: 10.3390/biom10030440.

304. Montmorillonite as a drug delivery system: intercalation and *in vitro* release of timolol maleate / G.V. Joshi, B.D. Kevadiya, H.A. Patel [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2009. – Vol. 374. – № 1-2. – P. 53-57.
305. Montmorillonite–alginate nanocomposite as a drug delivery system–incorporation and *in vitro* release of irinotecan / R.I. Iliescu, E. Andronescu, C.D. Ghitulica [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2014. – Vol. 463. – № 2. – P. 184-192.
306. Mucin immobilization in calcium alginate: A possible mucus mimetic tool for evaluating mucoadhesion and retention of flavour / V. Dinu, G.E. Yakubov, M. Lim [et al.] // International journal of biological macromolecules. – 2019. – Vol. 138. – P. 831-836.
307. Mucoadhesion: mucin-polymer molecular interactions / Q.D. Pham, S. Nöjd, M. Edman [et al.] // International journal of pharmaceutics. – 2021. – Vol. 610. – 121245 p.
308. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery / C.M. Caramella, S. Rossi, F. Ferrari [et al.] // Advanced drug delivery reviews. – 2015. – Vol. 92. – P. 39-52.
309. Multicellular bioprinted skin facilitates human-like skin architecture *in vivo* / A.M. Jorgensen, A. Gorkun, K. Willson [et al.] // Science translational medicine. – 2023. – Vol. 15. – № 716. – eadf 7547 p.
310. Multicomponent hydrogels smart materials for biomedical applications / J. M. Dodda, K. Deshmukh, D. Bezuidenhout, Y. Yeh // The Royal Society of Chemistry. – 2023. – P. 1-25.
311. Nanostructured polyacrylamide hydrogels with improved mechanical properties and antimicrobial behavior / E. Olăreț, Ș.I. Voicu, R. Oprea [et al.] // Polymers. – 2022. – Vol. 14. – № 12. – 2320 p.
312. Natural gums in drug-loaded micro- and nanogels / A. Froelich, E. Jakubowska, B. Jadach [et al.] // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – № 3. – 759 p.
313. Natural polysaccharides in drug delivery and biomedical applications / G. Singhvi, N. Hans, N. Shiva, S.K. Dubey // Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands. – 2019. – P. 121–124.

314. New combined eye gel with alpha-2-beta interferon / M.N. Anurova, E.O. Bakhrushina, I.V. Lapik [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2020. – T. 168. – № 3. – C. 349-351.
315. Nicolau syndrome, a rare though important complication of hyaluronic acid injection / B. Eshraghi, P. Shaygan, N. Lajevardi, M. Fazel // *International journal of dermatology*. – 2021. – Vol. 60. – P. e285–e286.
316. Nicoud, L. Kinetics of monoclonal antibody aggregation from dilute toward concentrated conditions / L. Nicoud, J. Jagielski, D. Pfister // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – Vol. 120. – P. 3267-3280.
317. Nomula, V. Synthesis of dalargin, the synthetic Leu-enkephalin analogue in solid phase peptide synthesis / V. Nomula, P.S. Mainkar, K. Nayani // *Tetrahedron Letters*. – 2024. – Vol. 137. – P. 154932. DOI: 10.1016/j.tetlet.2024.154932.
318. Nwoko, V.E. Semisolid dosage forms manufacturing: tools, critical process parameters, strategies, optimization and validation / V.E. Nwoko // *Scholars Academic Journal of Pharmacy*. – 2014. – Vol. 3. – P. 153–161.
319. Olejnik, A. Active compounds release from semisolid dosage forms / A. Olejnik, J. Goscianska, I. Nowak // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – Vol. 101. – № 11. – P. 4032-45.
320. Oleogel-structured emulsions: a review of formation, physicochemical properties and applications / Z. Huang, B. Guo, D. Gong, G. Zhang // *Food Chemistry*. – 2023. – Vol. 404 (Pt A). – 134553 p.
321. Olsson, C. The role of disaccharides for protein–protein interactions—A SANS Study / C. Olsson, J. Swenson // *Molecular Physics*. – 2019. – Vol. 117. – P. 3408-3416. DOI: 10.1080/00268976.2019.1640400.
322. On the nature of flow curve and categorization of thixotropic yield stress materials / T. Bhattacharyya, A.R. Jacob, G. Petekidis, Y.M. Joshi // *Journal of rheology*. – 2023. – Vol. 67. – P. 461–477.
323. Ophthalmic gels: Past, present and future / A.A. Al-Kinani, G. Zidan. Elsaid, A. [et al.] // *Advanced drug delivery reviews*. – 2018. – Vol. 126. – P. 113-126.

324. Ophthalmic squeeze dispenser (OSD) technology platform. URL: <https://aptar.com/products/pharmaceutical/ophthalmic-squeeze-dispenser-technology-platform> (дата обращения: 11.08.2024).
325. Oral infections of herpes simplex virus: symptoms, diagnosis, treatment and pathophysiology in periodontal disease / S. Basavarajappa, R. Ramakrishnaiah, B. Durgesh [et al.] // *Reviews and Research in Medical Microbiology*. – 2015. – Vol. 26. – № 4. – P. 138-142.
326. Ophthalmic Drug Delivery Systems (Review)/ E.O. Bakhrushina, M.N. Anurova, N.B. Demina [et al.] // *Drug development & registration*– 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 57-66.
327. Oster, C. Governing the contagious body: genital herpes, contagion and technologies of the self / C. Oster, J. Cheek // *Health*. – 2008. – Vol. 12. – № 2. – P. 215-232.
328. Patent US11534401B2. Thermo-responsive hydrogel for intratumoral administration as a treatment in solid tumor cancers / Google Patents: [документ] – 2022. – URL: (дата обращения 22.08.2024).
329. Pathophysiology of enteropathogenic Escherichia coli-induced diarrhea / P. Kaur, P.K. Dudeja, S.K. Sarna [et al.] // *Newborn (Clarksville)*. – 2023. – Vol. 2. – № 1. – P. 102-113. DOI: 10.5005/jp-journals-11002-0056.
330. Pflugfelder, S.C. Biological functions of tear film / S.C. Pflugfelder, M.E. Stern // *Experimental eye research*. – 2020. – Vol. 197. – 108115 p.
331. pH and its applications in targeted drug delivery / S. Abdella, F. Abid, S.H. Youssef [et al.] // *Drug discovery today. Biosilico*. – 2023. – Vol. 28. – № 1. – 103414 p.
332. Phage-based antibacterial hydrogels for bacterial targeting and Ablation: Progress and perspective / H. Bai, Q. Borjihan, Z. Li [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2024. – Vol. 198. – P. 114258. DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114258.
333. Pharmaceutical experimental design. / Lewis G. A., Mathieu D., Phan-Tan-Luu R.– CRC press: 1998.

334. Pharmaceutical properties of a low-substituted hydroxypropyl cellulose (L-HPC) hydrogel as a novel external dressing / A. Ogawa, S. Nakayama, M. Uehara [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2014. – Vol. 477. – № 1-2. – P. 546-552.
335. Pharmacokinetics and preclinical safety studies of modified endolysin-based gel for topical application / N.P. Antonova, D.V. Vasina, I.V. Grigoriev [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2022. – Vol. 148. – P. 2093-2100. DOI: 10.1016/j.xphs.2024.04.028.
336. Pharmacokinetics of UGN-101, a mitomycin-containing reverse thermal gel instilled via retrograde catheter for the treatment of low-grade upper tract urothelial carcinoma / A. Shabsigh, N. Kleinmann, A.B. Smith [et al.] // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2021. – Vol. 87. – P. 799-805.
337. Photoresponsive hydrogels with photoswitchable mechanical properties allow time-resolved analysis of cellular responses to matrix stiffening / I.N. Lee, O. Dobre, D. Richards [et al.] // *ACS applied materials & interfaces*. – 2018. – Vol. 10. – № 9. – P. 7765-7776.
338. Physical and chemical properties of recombinant KPP10 phage lysins and their antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* / N.P. Antonova, V.Y. Balabanyan, A.P. Tkachuk [et al.] // *Bulletin of Russian State Medical University*. – 2018. – № 1. – P. 21-27. DOI: 10.24075/brsmu.2018.010.
339. Picout, D.R. Rheology of biopolymer solutions and gels / D.R. Picout, S.B. Ross-Murphy // *The Scientific World Journal*. – 2003. – Vol.3. – №1. – P. 105-121. DOI: 10.1100/tsw.2003.
340. Pinzi, L. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery / L. Pinzi, G. Rastelli // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 18. – P. 4331. DOI: 10.3390/ijms20184331.
341. Poloxamer 188 as surfactant in biological formulations—An alternative for polysorbate 20/80? / L. Bollenbach, J. Buske, K. Mäder, P. Garidel // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 620. – 121706 p.
342. Poloxamer-based scaffolds for tissue engineering applications: a review / N. Cui, C.Y. Dai, X. Mao [et al.] // *Gels*. – 2022. – Vol. 8. – № 6. – 360 p.

343. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer / M. Almeida, M. Magalhães, F. Veiga, A. Figueiras // *Journal of Polymer Research*. – 2018. – Vol. 25. – P. 1-14.
344. Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives / K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U.S. Schubert // *Angewandte Chemie*. – 2010. – Vol. 49. – P. 6288–6308.
345. Poly (vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications / G. Paradossi, F. Cavalieri, E. Chiessi [et al.] // *Journal of materials science. Materials in medicine*. – 2003. – Vol. 14. – P. 687–691.
346. Poly(N-isopropylacrylamide-co-allylamine) (PNIPAM-co-ALA) nanospheres for the thermally triggered release of bacteriophage K / H. Hathaway, D.R. Alves, J. Bean [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2015. – Vol. 96. – P. 437–441. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.09.013.
347. Polymeric micelles for oral drug administration enabling locoregional and systemic treatments / S.M.N Simões, A.R. Figueiras, F. Veiga [et al.] // *Expert opinion on drug delivery*. – 2015. – Vol. 12. – № 2. – P. 297-318.
348. Polyvinyl alcohol hydrogel implant for the treatment of hallux rigidus is associated with a high complication rate and moderate failure rate at short-term follow-up: a systematic review / J.J. Butler, R. Dhillon, T. Wingo [et al.] // *European journal of orthopaedic surgery and traumatology*. – 2024. – Vol. 34. – № 4. – P. 1765-1778.
349. Pottage Jr., J.C. Herpes simplex virus resistance to acyclovir: clinical relevance / J.C. Pottage Jr, H.A. Kessler // *Infection Agents and Disease*. – 1995. – Vol. 4. – № 3. – P. 115-124.
350. Prabaharan, M. Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems / M. Prabaharan // *International journal of biological macromolecules*. – 2011. – Vol. 49. – P. 117–124.
351. Preclinical evaluation of thermoreversible triamcinolone acetonide hydrogels for drug delivery to the inner ear / E. Engleder, C. Honeder, J. Klobasa [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2014. – Vol. 471. – №. 1-2. – P. 297-302. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.057.

352. Preparation and characterization of novel drug-inserted-montmorillonite chitosan carriers for ocular drug delivery / D. Hou, R. Gui, S. Hu[et al.] //Advances in nanoparticles. – 2015. – Vol. 4. – № 03. – P. 70-84.
353. Preparation and evaluation of alginate-chitosan-bentonite based beads for the delivery of pesticides in controlled-release formulation / H. Yan, Y. Feng, W. Hu [et al.] //Asian Journal of Chemistry. – 2013. – Vol. 25. – № 17. – 9936 p.
354. Prestwich, G.D. Therapeutic applications of hyaluronic acid and hyaluronan derivatives / G.D. Prestwich, K.P. Vercruysse // Pharmaceutical science and technology today. – 1998. – Vol. 1. – P. 42–43.
355. Prevention of encrustation and blockage of urinary catheters by *Proteus mirabilis* via pH-triggered release of bacteriophage / S. Milo, H. Hathaway, J. Nzakizwanayo [et al.] // Journal of Materials Chemistry B. – 2017. – Vol. 5. – P. 5403–5411. DOI: 10.1039/C7TB01302G.
356. Progression of wound pH during the course of healing in burns / J.R. Sharpe, S. Booth, K. Jubin [et al.] // Journal of burn care and research. – 2013. – Vol. 34. – № 3. – P. 201-8.
357. Proksch, E. pH in nature, humans and skin / E. Proksch // Dermatology journal. – 2018. – Vol. 45. – № 9. – P. 1044-1052.
358. Purohit, T.J. Advances in rectal drug delivery systems/ S.M. Hanning, Z. Wu // Pharmaceutical development and technology. – 2018. – Vol. 23. – № 10. – P. 942-952.
359. Quality by design approach of a pharmaceutical gel manufacturing process, part 2: near infrared monitoring of composition and physical parameters / J.G. Rosas, M. Blanco, J.M. González, M. Alcalá // Journal of pharmaceutical sciences. – 2011. – Vol. 100. – № 10. – P. 4442-4451.
360. Quality by design approach of a pharmaceutical gel manufacturing process, part 1: determination of the design space / Rosas J.G., M. Blanco, J.M. González, M. Alcalá // Journal of pharmaceutical sciences. – 2011. – Vol. 100. – № 10. – P. 4432-4441.
361. Quality-by-design in pharmaceutical development: From current perspectives to practical applications / B. Kovács, O. Péterfi, B. Kovács-Deák [et al.] // Acta Pharmaceutica. – 2021. – Vol. 71. – № 4. – P. 497-526.

362. Quaternized chitosan-Matrigel-polyacrylamide hydrogels as wound dressing for wound repair and regeneration / H. Xue, L. Hu, Y. Xiong, X. Zhu [et al.] // Carbohydrate polymers. – 2019. – Vol. 226. – 115302 p.
363. Raghav, S. Alginates: properties and applications / S. Raghav, P. Jain, D. Kumar // Polysaccharides. – 2021. – P. 399–422.
364. Rahmanian-Devin, P. Thermosensitive chitosan- β -glycerophosphate hydrogels as targeted drug delivery systems: an overview on preparation and their applications / P. Rahmanian-Devin, V. Baradaran Rahimi, V.R. Askari // Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. – 2021. – Vol. 2021. – 6640893 p.
365. Ramachandran, S. Rheological characterization of hydroxypropylcellulose gels / S. Ramachandran, S. Chen, F. Etzler // Drug development and industrial pharmacy. – 1999. – Vol. 25. – № 2. – P. 153-161.
366. Recent advances in chitosan-based carriers for gene delivery / Y. Cao, Y.F. Tan, Y.S. Wong [et al.] // Marine Drugs. – 2019. – Vol. 17. – 381 p.
367. Recent advances in the development of *in situ* gelling drug delivery systems for non-parenteral administration routes / B. Vigani, S. Rossi, G. Sandri [et al.] // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 12. – № 9. – 859 p.
368. Recent advances of chitosan-based hydrogels for skin-wound dressings / W. Guo, X. Ding, H. Zhang [et al.] // Gels. – 2024. – Vol. 10. – № 3. – 175 p.
369. Recent advances of chitosan-based injectable hydrogels for bone and dental tissue regeneration / G. Tang, Z. Tan, W. Zeng [et al.] // Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2020. – Vol. 8. – 587658 p.
370. Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel / Ajazuddin, A. Alexander, A. Khichariya [et al.] // Journal of controlled release. – 2013. – Vol. 171. – № 2. – P. 122-32.
371. Recent progress in emulsion gels: from fundamentals to applications / C. Wan, Q. Cheng, M. Zeng, C. Huang // Soft Matter. – 2023. – Vol. 19. – № 7. – P. 1282-1292.
372. Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review / K.M. Zia, S. Tabasum, M.F. Khan. [et al.] // International journal of biological macromolecules. – 2019. – Vol. – 109. – P. 1068–1087.

373. Re-evaluation of carrageenan (e 407) and processed eucheuma seaweed (e 407a) as food additives / M. Younes, P. Aggett, F. Aguilar [et al.] // EFSA journal – 2018. – Vol. 16. – e05238 p.
374. Relationship between maternal and neonatal *Staphylococcus aureus* colonization / N. Jimenez-Truque, S. Tedeschi, E.J. Saye [et al.] // Pediatrics. – 2012. – Vol. 129. – P. 0-9.
375. Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications / G. Stojkov, Z. Niyazov, F. Picchioni [et al.] // Gels. – 2021. – Vol. 7, № 4. – P. 255. DOI: 10.3390/gels7040255.
376. Rheological analysis and mucoadhesion: A 30-year-old and still active combination / S. Rossi, B. Vigani, M.C. Bonferoni [et al.] // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2018. – Vol. 156. – P. 232-238.
377. Rheological and mechanical properties of pharmaceutical gels. Part I: Non-medicated systems / F. Ferrari, S. Rossi, M.C. Bonferoni, C. Caramella // Bollettino chimico farmaceutico. – 2001. – Vol. 140. – № 5. – P. 329-36.
378. Rheological considerations of pharmaceutical formulations: focus on viscoelasticity / L. Budai, M. Budai, Z.E. Fülöpné Pápay [et al.] // Gels. – 2023. – Vol. 9. – № 6. – 469 p.
379. Riley, L.W. Distinguishing pathovars from nonpathovars: *Escherichia coli* / L.W. Riley // Microbiology Spectrum. – 2020. – Vol. 8. – № 4. – DOI: 10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020.
380. Robert, L. Hyaluronan, a truly “youthful” polysaccharide. Its medical applications / L. Robert // Pathologie et biologie. – 2015. – Vol. 63. – P. 32–34.
381. Robinson, M.K. A strategy for skin irritation testing / M.K. Robinson, M.A. Perkins // American Journal of Contact Dermatitis. – 2002. – Vol. 13. – № 1. – P. 21-29.
382. Russo, E. Poloxamer hydrogels for biomedical applications / E. Russo, C. Villa // Pharmaceutics. – 2019. – Vol. 11. – № 12. – P. 671. DOI: 10.3390/pharmaceutics11120671.
383. Safety and efficacy of topical interferon alpha 2B and mitomycin C for localized conjunctival intraepithelial neoplasia: long-term report of their pharmacological safety

- and efficacy / B. Alvarado-Castillo, F.J. Santa Cruz-Pavlovich, C. Gonzalez-Castillo [et al.] // BMC Ophthalmology. – 2023. – Vol. 23. – № 1. – P. 335. DOI: 10.1186/s12886-023-03092-z.
384. Saluri, K. Anticoagulant and antioxidant activity of lambda- and theta-carrageenans of different molecular weights / K. Saluri, R. Tuvikene // Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. – 2020. – Vol. 24. – 100243 p.
385. Sangroniz, L. Polymers and rheology: A tale of give and take / L. Sangroniz, M. Fernández, A. Santamaria // Polymer. – 2023. – Vol. 271. – 125811 p.
386. Sasse, M. Travellers' diarrhoea / M. Sasse, F. Reinhardt, C. Lübbert // Gastroenterology up2date. – 2021. – Vol. 17. – № 03. – P. 289-302.
387. Schalkwijk, H.H. Acyclovir resistance in herpes simplex viruses: prevalence and therapeutic alternatives / H.H. Schalkwijk, R. Snoeck, G. Andrei // Biochemical Pharmacology. – 2022. – Vol. 206. – P. 115322. DOI: 10.1016/j.bcp.2022.115322.
388. Shin, J. Fast response photonic crystal pH sensor based on templated photopolymerized hydrogel inverse opal / J. Shin, V. Braun Paul, W. Lee // Sensors and actuators. B, Chemical. – 2010. – Vol. 150, № 1. – P. 183–190.
389. Simpson, R.J. Stabilization of proteins for storage / R.J. Simpson // Cold Spring Harbor Protocols. – 2010. – Vol. 2010. – № 5. – P. Pdb. Top79. DOI: 10.1101/pdb.top79.
390. Singh, N.K. *In situ* gelling pH- and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery / N.K. Singh, D.S. Lee // Journal of controlled release. – 2014. – Vol. 193. – P. 214-27.
391. Smart polymers and their applications as biomaterials / M.R. Aguilar, C. Elvira, A. Gallardo [et al.] // Topics in tissue engineering. – 2007. – Vol. 3. – № 6. – P. 1-27.
392. Sovilj, V.J. Rheological properties of sodium carboxymethylcellulose in the presence of electrolyte and mixed micelle of surfactants / V.J. Sovilj, P.P. Dokić, L.B. Petrović // Acta periodica technologica. – 2003. – №. 34. – P. 71-82.
393. Stability of protein pharmaceuticals: an update / M.C. Manning, D.K. Chou, B.M. Murphy [et al.] // Pharmaceutical Research. – 2010. – Vol. 27. – P. 544–575. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0045-6>.

394. Stabilizing two IgG1 monoclonal antibodies by surfactants: balance between aggregation prevention and structure perturbation / S. Wang, G. Wu, X. Zhang [et al.] // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2017. – Vol. 114. – P. 263-277. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.01.025.
395. Stamatialis, D.F. Transdermal timolol delivery from a pluronic gel / D.F. Stamatialis, H.H.M. Rolevink, G.H Koops // Journal of Controlled Release. – 2006. – Vol. 116. – № 2. – P. 53-55.
396. Stimuli-responsive hydrogels for protein delivery / R. Malta, A.C. Marques, P.C.D. Costa, M.H. Amaral // Gels. – 2023. – Vol. 9. – № 10. – P. 802. DOI: 10.3390/gels9100802.
397. Stimuli-responsive materials for tissue engineering and drug delivery / S. Municoy, M.I. Álvarez Echazú, P.E. Antezana [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – № 13. – 4724 p.
398. Strickley, R.G. A Review of formulations of commercially available antibodies / R.G. Strickley, W.J. Lambert // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2021. – Vol. 110. – P. 2590-2608.e56. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.03.017.
399. Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a tunisian brown seaweed / S. Sellimi, I. Younes, H.B. Ayed [et al.] // International journal of biological macromolecules. – 2015. – Vol. 72. – P. 1358–1367.
400. Structures, properties and applications of alginates / R. Abka-Khajouei, L. Tounsi, N. Shahabi [et al.] // Marine Drugs. – 2022. – Vol. 20, № 6. – 364 p.
401. Study of the effect of active pharmaceutical ingredients of various classes of bcs on the parameters of thermosensitive systems based on poloxamers / E.O. Bakhrushina, A.I. Khodenok, V.S. Pyzhov [et al.] // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2023. – T. 31. – № 10. – 101780 c.
402. Study of the influence of the penetration enhancer isopropyl myristate on the nanostructure of stratum corneum lipid model membranes using neutron diffraction and deuterium labelling / T.N. Engelbrecht, B. Demé, B. Dobner [et al.] // Skin pharmacology and physiology. – 2012. – Vol.25. – №4. – P. 200-207. DOI: 10.1159/000338538.

403. Suhail, M. Using carbomer-based hydrogels for control the release rate of diclofenac sodium: preparation and *in vitro* evaluation / M. Suhail, P.C. Wu, M.U. Minhas // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2020. – Vol. 13. – № 11. – 399 p.
404. Synthesis, characterization and modification of gum arabic microgels for hemocompatibility and antimicrobial studies / M. Farooq, S. Sagbas, M. Sahiner [et al.] // *Carbohydrate polymers*. – 2017. – Vol. 156. – P. 380–389.
405. Tachaprutinun, A. Mucosa-plate for direct evaluation of mucoadhesion of drug carriers / A. Tachaprutinun, P. Pan-In, S. Wanichwecharungruang // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 441. – № 1-2. – P. 801-808.
406. Taokaew, S. Recent development of functional chitosan-based hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications / S. Taokaew, W. Kaewkong, W. Kriangkrai // *Gels*. – 2023. – Vol. 9. – № 4. – 277 p.
407. The addition of high doses of hyaluronic acid to a biphasic bone substitute decreases the proinflammatory tissue response / D. Sieger, T. Korzinskas, O. Jung [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol. 20. – 1969 p.
408. The commercial impact of pig *Salmonella* spp. Infections in border-free markets during an economic recession / G. Evangelopoulou, S. Kritas, G. Christodouloupoulos [et al.] // *Veterinary World*. – 2015. – Vol. 8. – P. 257-272. DOI: 10.14202/vetworld.2015.257-272.
409. The Potential threat of vertical transmission in methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* infection: a systematic review / A. Allakky, A.A. Ferguson, A.I. Khan [et al.] // *Cureus*. – 2022. – Vol. 14. – № 12. – e32366. DOI: 10.7759/cureus.32366.
410. Thermosensitive hydrogels a versatile concept adapted to vaginal drug delivery / S. Taurin, A.A. Almomen, T. Pollak [et al.] // *Journal of Drug Targeting*. – 2018. – Vol. 26. – № 7. – P. 533-550. DOI: 10.1080/1061186X.2017.1400551.
411. Thermosensitive *in situ* gels for joint disorders: pharmaceutical considerations in intra-articular delivery / M. Koland, A. Narayanan Vadakkepushpakath [et al.] // *Gels*. – 2022. – Vol. 8. – № 11. – 723 p.

412. Theuretzbacher, U. Non-traditional antibacterial therapeutic options and challenges / U. Theuretzbacher, L.J.V. Piddock // *Cell Host Microbe*. – 2019. – Vol. 26. – P. 61-72. DOI: 10.1016/j.chom.2019.06.004.
413. Topical use of dexpanthenol: a 70th anniversary article / E. Proksch, R. de Bony, S. Trapp, S. Boudon // *Journal of Dermatological Treatment*. – 2017. – Vol. 28. – P. 766-773. DOI: 10.1080/09546634.2017.1325310.
414. Towards bioinspired: *In vitro* models of intestinal mucus / L. Sardelli, D.P. Pacheco, A. Zicarelli, M. Tunesi [et al.] // *RSC advances*. – 2019. – Vol. 9. – P. 15887-15899.
415. Triggered release of bacteriophage K from Sagarose/hyaluronan hydrogel matrixes by *Staphylococcus aureus* virulence factors / J.E. Bean, D.R. Alves, M. Laabei [et al.] // *Chemistry of Materials*. – 2014. – Vol. 26. – P. 7201–7208. DOI: 10.1021/cm503974g.
416. Tripathi, R. A novel topical ophthalmic formulation to mitigate acute mustard gas keratopathy in vivo: a pilot study / R. Tripathi, P.K. Balne, N.R. Sinha // *Translational vision science and technology*. – 2020. – Vol.9. – №12. – P. 6. DOI: 10.1167/tvst.9.12.6.
417. Türker, S. Nasal route and drug delivery systems / S. Türker, E. Onur, Y. Ozer // *Pharmacy world and science*. – 2004. – Vol. 26. – № 3. – P. 137-42.
418. Understanding pharmaceutical quality by design / L.X. Yu, G. Amidon, M.A. Khan [et al.] // *The AAPS journal*. – 2014. – Vol. 16. – P. 771-783.
419. Update on chitosan-based hydrogels: preparation, characterization, and its antimicrobial and antibiofilm applications / K. Thirupathi, C.J. Raorane, V. Ramkumar [et al.] // *Gels*. – 2022. – Vol. 9. – № 1. – 35 p.
420. Ur-Rehman, T. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels / T. Ur-Rehman, S. Tavelin, G. Gröbner // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2011. – Vol. 409. – № 1-2. – P. 19-29. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.017.
421. Ur-Rehman, T. Effect of DMSO on micellization, gelation and drug release profile of Poloxamer 407 / T. Ur-Rehman, S. Tavelin, G. Gröbner // *International journal of pharmaceutics*. – 2010. – Vol. 394. – № 1-2. – P. 92-98.

422. Utsunomiya, T. Assessing effects of mechanical stimulation of fluid shear stress on inducing matrix Metalloproteinase-9 in cultured corneal epithelial cells / T. Utsunomiya, A. Ishibazawa, T. Yoshioka // *Experimental Eye Research*. – 2023. – Vol. 234. – P. 109571. DOI: 10.1016/j.exer.2023.109571.
423. Vaginal gel drug delivery systems: understanding rheological characteristics and performance / T. Yu, K. Malcolm, D. Woolfson, D.S [et al.] // *Expert opinion on drug delivery*. – 2011. – Vol. 8. – № 10. – P.1309-22.
424. Vaginal gel drug delivery systems: understanding rheological characteristics and performance / T. Yu, K. Malcolm, D. Woolfson [et al.] // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2011. – Vol. 8, № 10. – P. 1309-1322. DOI: 10.1517/17425247.2011.600119.
425. Validation of a static Franz diffusion cell system for *in vitro* permeation studies / S.F. Ng, J.J. Rouse, F.D. Sanderson [et al.] // *AAPS PharmSciTech*. – 2010. – Vol. 11. – № 3. – P. 1432-41.
426. Validation of the method for determining the specific activity of the gel with recombinant endolysin / A. Vorobev, M. Anurova, K. Bagandova [et al.] // *BIO Web of Conferences*. – 2021. – Vol. 40. – P. 01005. DOI: 10.1051/bioconf/20214001005.
427. Vazquez-Perez, F.J. Composite polymer hydrogels with high and reversible elongation under magnetic stimuli / F.J. Vazquez-Perez, C. Gila-Vilchez, J.D.G. Duran // *Polymer*. – 2021. – Vol. 230. – 124093 p.
428. Veeran, G. K. Water soluble polymers for pharmaceutical applications / G.K. Veeran, V.B. Guru // *Polymers*. – 2011. – Vol. 3. – № 4. DOI:10.3390/polym3041972.
429. Velnar, T. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms / T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj // *International journal of medical and pharmaceutical research*. – 2009. – Vol. 37. – № 5. – P. 1528-42.
430. Vertical transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at delivery and its clinical impact: An observational, prospective cohort study / J. Ogura, Y. Inayama, N. Sasamoto [et al.] // *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*. – 2021. – Vol. 100. – P. 1986-1994.

431. Villapiano, F. Thermosensitive *in situ* gelling poloxamers hyaluronic acid gels for hydrocortisone ocular delivery / F. Villapiano, T. Silvestri, C. Lo Gatto [et al.] // Gels. – 2024. – Vol. 10. – № 3. – 193 p.
432. Vinardell M.P. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview / M.P. Vinardell, M. Mitjans // Journal of pharmaceutical sciences. – 2008. – Vol. 97. – № 1. – P. 46-59.
433. Voute, M. Topical lidocaine for chronic pain treatment / M. Voute, V. Morel, G. Pickering // Drug Design, Development and Therapy. – 2021. – Vol. 15. – P. 4091-4103. DOI: 10.2147/DDDT.S328228.
434. Wang, W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics / W. Wang // International Journal of Pharmaceutics. – 2005. – Vol. 289. – № 1-2. – P. 1-30.
435. Wang, W. The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview / W. Wang, S.X. Wang, H.S. Guan // Marine Drugs. – 2012. – Vol. 10. – P. 2795–2816.
436. WHO. List of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. World Health Organization. – 2017. – Текст: электронный. – URL: <https://www.who.int/ru/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (дата обращения: 25.08.2024).
437. Williams, M. Wound infections: an overview / M. Williams // British Journal of Community Nursing. – 2021. – Vol. 26. – Suppl. 6. – P. S22-S25. DOI: 10.12968/bjcn.2021.26.Sup6.S22.
438. Wilson, D.I. What is rheology? / D.I. Wilson // Eye (Lond). – 2018. – Vol. 32, № 2. – P. 179-183. DOI: 10.1038/eye.2017.267.
439. Wroe, J.A. Bacteriophage delivering hydrogels reduce biofilm formation in vitro and infection in vivo / J.A. Wroe, C.T. Johnson, A.J. García // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2020. – Vol. 108. – № 1. – P. 39-49. DOI: 10.1002/jbm.a.36790.
440. Xanthan gum derivatives: review of synthesis, properties and diverse applications / J. Patel, B. Maji, N.S.H.N. Moorthy, S. Maiti // RSC advances. – 2020. – Vol. 10. – № 45. – P. 27103-27136.

441. Yang, T.H. Recent applications of polyacrylamide as biomaterials / T.H. Yang // Recent Patents on Materials Science. – 2008. – Vol. 1. – № 1. – P. 29-40.
442. Yield stress materials in soft condensed matter / D. Bonn, M.M. Denn, L. Berthier [et al.] // Reviews of modern physics. – 2017. – Vol. 89. – 035005 p.
443. Zhang, L. Application of quality by design in the current drug development / L. Zhang, S. Mao // Asian journal of pharmaceutical sciences. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – P. 1-8.
444. Zhang, Y. Rational design of smart hydrogels for biomedical applications / Y. Zhang, Y. Huang // Frontiers in chemistry. – 2021. – Vol. 8. – 615665 p.
445. Zhu, Y. Hyaluronic acid in drug delivery applications. Natural polysaccharides in drug delivery and biomedical applications / Y. Zhu, Z. Pang // Academic Press: London, UK. – 2019. – P. 307–325.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Проекты спецификаций на разработанные лекарственные формы

Таблица А.1 – ПРОЕКТ СПЕЦИФИКАЦИИ «Гель для вагинального применения
коктейлем бактериофагов, 30 г»

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

Таблица А.2 – ПРОЕКТ СПЕЦИФИКАЦИИ «Гель для приема внутрь с коктейлем бактериофагов, 30 г»

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

Таблица А.3 – ПРОЕКТ СПЕЦИФИКАЦИИ «Гель бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизинном LysECD7-SMAP, 30г»

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

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

Показатели качества	Нормы (допустимые пределы)	Ссылки на методы испытаний
Описание	Прозрачный бесцветный гель, не содержащий видимых частиц	Визуальный ГФ РФ ОФС.1.4.1.0008 Мягкие лекарственные формы
Идентификация: Интерферона альфа -2b Даларгина	Реакция нейтрализации. Соответствует интерферону человеческого альфа-типа Подлинность даларгина определяли методом спектрофотометрии в среде искусственной слезной жидкости в диапазоне от 250 до 300 нм при длине волны 275 ± 2 нм должен наблюдаться максимум ВЭЖХ должен наблюдаться пик соответствующий стандарту даларгина	ГФ РФ ОФС.1.7.2.0002.15 Биологический метод. Реакция нейтрализации противовирусной активности ГФ РФ ОФС.1.2.1.1.0003 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0005 Высокоэффективная жидкостная хроматография
Прозрачность	Препарат должен быть прозрачным	Визуальный ГФ РФ ОФС.1.2.1.0007 Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей
Осмолярность	239–376 мОсм/л.	ОФС.1.2.1.0003 Осмолярность
pH	От 6,0 до 7,0.	Потенциометрический ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004 Ионметрия»
Механические включения -видимые невооружённым глазом	В соответствии с требованиями. Частиц размером 10 мкм и более – не более 6000 в тубе,	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0005.18 Визуальный
Стерильность	Препарат должен быть стерильным	Метод прямого посева или мембранной фильтрации ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15
Вязкость	0,120-0,145 Па·с	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0015 Вязкость

Продолжение Таблицы А.4

Показатели качества	Нормы (допустимые пределы)	Ссылки на методы испытаний
Специфическая активность	Не менее 50000 МЕ в 1 г	ГФ РФ ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток.
Количественное определение даларгина	0,475 – 0,525 мг в 1 г	ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0005 Высокоэффективная жидкостная хроматография
Металлические частицы	Общее число металлических частиц, размер которых составляет от 50 до 90 мкм во всех 30 тубах не должно превышать 150 частиц, и если не более чем в 3 тубах содержится 9 или более частиц указанной величины (в каждой из туб). Не допускается наличие частиц с максимальным размером более 90 мкм.	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0023 Металлические частицы в мазах глазных
Масса содержимого упаковки	Не менее 9,5 г	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007 Масса (объём) содержимого упаковки
Герметичность упаковки	На фильтровальной бумаге и ни на одной из 10 туб не должно быть подтеков содержимого. Если наблюдаются подтеки хотя бы на одной из 10 первоначально отобранных туб, то дополнительно проводят испытание еще с 20 тубами. Результаты испытания считаются удовлетворительными, если не наблюдается подтеков ни на одной из 20 дополнительно отобранных туб.	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0025 Определение герметичности упаковки

Таблица А.5 – ПРОЕКТ СПЕЦИФИКАЦИИ «Комбинированный гель наружного и местного применения интерферона альфа-2b, декспантенола и лидокаина 400 тыс. МЕ +500 мкг+ 100 мкг на 10 г»

Показатели качества	Нормы (допустимые пределы)	Ссылки на методы испытаний
Описание	Прозрачный бесцветный гель, не содержащий видимых частиц	Визуальный ГФ РФ ОФС.1.4.1.0008 Мягкие лекарственные формы
Идентификация: Интерферона альфа -2b	Реакция нейтрализации. Соответствует интерферону человеческого альфа-типа	ГФ РФ ОФС.1.7.2.0002.15 Биологический метод. Реакция нейтрализации противовирусной активности
Декспантенола	ТСХ. Основная зона адсорбции на хроматограмме раствора геля по положению, величине и окраске должна соответствовать основной зоне адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца декспантенола.	ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0003 Тонкослойная хроматография
Лидокаина	Качественная реакция с 8,5 % раствором натрия гидроксида и 12,5% раствором меди(II) сульфата должно образоваться синее окрашивание. Качественная реакция на хлориды: С азотной кислотой 16 % и серебра нитрата раствора 2 % образуется белый творожистый осадок С калия дихроматом и серной кислотой концентрированной. Над пробиркой помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную дифенилкарбазида раствора. Бумага должна окраситься в фиолетово-красный цвет. УФ-спектрофотометрия, раствор ЛФ должен иметь характерный максимум при 201 ± 2 нм и минимум при 261 ± 2 нм	ГФ РФ ОФС.1.2.2.0001 Общие реакции на подлинность ГФ РФ ОФС.1.2.1.1.0003 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях
рН	От 6,0 до 7,0.	Потенциометрический ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004 Ионометрия»
Микробиологическая чистота	Категория 6.3А	ГФ РФ ОФС.1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота

Продолжение Таблицы А.5

Показатели качества	Нормы (допустимые пределы)	Ссылки на методы испытаний
Специфическая активность	Не менее 40000 МЕ в 1 г	ГФ РФ ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток.
Количественное определение декспантенола	47,5 – 52,5 мг в 1 г	ГФ РФ ОФС.1.2.3.0029 Титриметрия (титриметрические методы анализа)
Количественное определение лидокаина	9,5 – 10,5 мг в 1 г	ГФ РФ ОФС.1.2.1.1.0003 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях
Масса содержимого упаковки	Не менее 9,5 г	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007 Масса (объём) содержимого упаковки
Герметичность упаковки	На фильтровальной бумаге и ни на одной из 10 туб не должно быть подтеков содержимого. Если наблюдаются подтеки хотя бы на одной из 10 первоначально отобранных туб, то дополнительно проводят испытание еще с 20 тубами. Результаты испытания считаются удовлетворительными, если не наблюдается подтеков ни на одной из 20 дополнительно отобранных туб.	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0025 Определение герметичности упаковки

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Изучение стабильности разработанных лекарственных форм

Таблица Б.1 – Изучение стабильности вагинального геля с коктейлем бактериофагов Sa30, CH11, SCH1, SCH111 в долгосрочных испытаниях

[illegible]

Продолжение таблицы Б.1

<i>Показатель \ Время, мес.</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>24</i>
Бактериальные эндотоксины	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Серия 031022							
Описание	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
рН	6,8	6,8	6,8	6,7	6,7	6,7	6,7
Специфическая активность	Sa30 8,0·10 ⁷	7,2·10 ⁷	7,5·10 ⁷	5,0·10 ⁷	5,0·10 ⁷	6,2·10 ⁷	5,4·10 ⁷
	SCH1 4,0·10 ⁸	4,2·10 ⁸	2,8·10 ⁸	2,8·10 ⁸	4,0·10 ⁸	4,5·10 ⁸	1,5·10 ⁸
	SCH111 4,5·10 ⁸	2,8·10 ⁸	2,0·10 ⁸	3,8·10 ⁸	5,0·10 ⁷	5,5·10 ⁷	5,0·10 ⁷
Стерильность	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Таблица Б.2 – Изучение стабильности вагинального геля с коктейлем бактериофагов Sa30, CH11, SCH1, SCH111 в ускоренных испытаниях

[illegible]

Таблица Б.3 – Изучение стабильности вагинального геля с коктейлем бактериофагов ECD7, V18, Ec13-52 в долгосрочных испытаниях

<i>Показатель \ Время, мес.</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>24</i>
Серия 011222							
Описание	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
pH	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Специфическая активность	ECD7	$5,8 \cdot 10^8$	$5,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^8$
	V18	$3,0 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	Ec13-52	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$9,0 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$
Стерильность	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Серия 021222							
Описание	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
pH	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
Специфическая активность	ECD7	$4,5 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$
	V18	$2,1 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$
	Ec13-52	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$8,8 \cdot 10^7$
Стерильность	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Продолжение Таблицы Б.3

<i>Показатель \ Время, мес.</i>		<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>24</i>
Серия 031222								
Описание		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
рН		6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
Специфическая активность	ECD7	$2,0 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$
	V18	$8,0 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$
	Ec13-52	$4,0 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
Стерильность		стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность		не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Таблица Б.4 – Изучение стабильности вагинального геля с коктейлем бактериофагов Sa30, CH11, SCH1, SCH111 в ускоренных испытаниях

[illegible]

Таблица Б.5 – Изучение стабильности вагинального геля с коктейлем бактериофагов Sa30, CH11, SCH1, SCH111 после вскрытия упаковки

<i>Показатель</i>	<i>Время, суток.</i>					
	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>7</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>7</i>
	Серия 011022			Серия 021022		
Описание	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
<i>pH</i>	6,8	6,8	6,8	6,9	6,9	6,9
Специфическая активность Sa30 SCH1 SCH111	2,2·10 ⁸	2,1·10 ⁸	1,9·10 ⁸	8,0·10 ⁷	7,9·10 ⁷	7,5·10 ⁷
	5,1·10 ⁸	5,0·10 ⁸	4,9·10 ⁸	4,0·10 ⁸	4,0·10 ⁸	3,9·10 ⁸
	2,5·10 ⁸	2,1·10 ⁸	2,1·10 ⁸	4,5·10 ⁸	4,5·10 ⁸	3,9·10 ⁸
МБЧ категория 2: Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10 ² КОЕ в 1 г Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10 ¹ КОЕ в 1 г (- Отсутствие Pseudomonas aeruginosa в 1 г Отсутствие Staphylococcus aureus в 1 г Отсутствие Candida albicans в 1 г	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Аномальная токсичность	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	соотв.
Масса содержимого упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Таблица Б.6 – Изучение стабильности перорального геля с коктейлем бактериофагов FG1m, FM4b, SE40, ST11 в долгосрочных испытаниях

<i>Время, мес.</i>		<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>24</i>
<i>Показатель</i>								
Серия 010822								
Описание		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
рН		6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
Специфическая активность	FG1m	$3,8 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^8$	$7,8 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^7$
	FM4b	$4,5 \cdot 10^8$	$4,7 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$
	SE40	$2,8,0 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	ST11	$8,9 \cdot 10^7$	$8,2 \cdot 10^7$	$8,5 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^7$
Стерильность		стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность		не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Серия 0208222								
Описание		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
рН		6,5	6,5	6,6	6,6	6,5	6,5	6,5
Специфическая активность	FG1m	$8,4 \cdot 10^7$	$8,2 \cdot 10^7$	$7,7 \cdot 10^7$	$6,8 \cdot 10^7$	$6,1 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^7$
	FM4b	$4,5 \cdot 10^8$	$5,2 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$
	SE40	$4,6 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$4,8 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$
	ST11	$8,4 \cdot 10^7$	$7,9 \cdot 10^7$	$7,6 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$
Стерильность		стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность		не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	соотв.	Соотв.

Продолжение таблицы Б.6

<i>Время, мес.</i>		<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>24</i>
<i>Показатель</i>								
Масса содержимого упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Серия 030822								
Описание		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
рН		6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
Специфическая активность	FG1m	$6,9 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$
	FM4b	$5,2 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$
	SE40	$4,2 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$
	ST11	$7,7 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$
Стерильность		стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность		не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Таблица Б.7 – Изучение стабильности перорального геля с коктейлем бактериофагов FG1m, FM4b, SE40, ST11 в ускоренных испытаниях

[illegible]

Таблица Б.8 – Изучение стабильности перорального геля с коктейлем бактериофагов ECD7, V18, Ec13-52, Ec732 в долгосрочных испытаниях

<i>Время, мес.</i>		<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>24</i>
<i>Показатель</i>								
Серия 010922								
Описание		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
рН		6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
Специфическая активность	ECD7	4,8·10 ⁸	4,5·10 ⁸	4,0·10 ⁸	3,5·10 ⁸	2,8·10 ⁸	2,0·10 ⁸	1,6·10 ⁸
	V18	3,0·10 ⁸	2,8·10 ⁸	2,5·10 ⁸	2,5·10 ⁸	1,6·10 ⁸	1,5·10 ⁸	1,0·10 ⁸
	Ec13-52	1,0·10 ⁸	1,0·10 ⁸	1,0·10 ⁸	8,5·10 ⁷	7,0·10 ⁷	6,2·10 ⁷	6,0·10 ⁷
	Ec732	3,0·10 ⁸	2,1·10 ⁸	2,5·10 ⁸	1,5·10 ⁸	1,0·10 ⁸	1,0·10 ⁸	1,0·10 ⁸
Стерильность		стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность		не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Серия 020922								
Описание		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
рН		6,7	6,7	6,7	6,6	6,7	6,7	6,7
Специфическая активность	ECD7	5,5·10 ⁸	4,8·10 ⁸	3,0·10 ⁸	2,8·10 ⁸	3,0·10 ⁷	2,5·10 ⁷	2,0·10 ⁷
	V18	2,1·10 ⁸	1,4·10 ⁸	1,1·10 ⁸	8,6·10 ⁷	7,4·10 ⁷	5,9·10 ⁷	5,5·10 ⁷
	Ec13-52	1,9·10 ⁸	1,6·10 ⁸	1,4·10 ⁸	1,3·10 ⁸	1,3·10 ⁸	1,2·10 ⁸	8,1·10 ⁷
	Ec732	7,5·10 ⁷	7,2·10 ⁷	7,0·10 ⁷	6,4·10 ⁷	5,9·10 ⁷	4,2·10 ⁷	2,4·10 ⁷
Стерильность		стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность		не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	соотв.	Соотв.

Продолжение Таблицы Б.8

<i>Показатель \ Время, мес.</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>24</i>
Масса содержимого упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Серия 030922							
Описание	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
рН	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
Специфическая активность	ECD7	$2,9 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$
	V18	$8,5 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$
	Ec13-52	$4,6 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	Ec732	$8,1 \cdot 10^7$	$7,9 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$
Стерильность	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Таблица Б.9 – Изучение стабильности перорального геля с коктейлем бактериофагов ECD7, V18, Ec13-52, Ec732 в ускоренных испытаниях

[illegible]

Таблица Б.10 – Изучение стабильности перорального геля с коктейлем бактериофагов FG1m, FM4b, ST11, Ec13-52 и Ec732 в долгосрочных испытаниях

<i>Показатель \ Время, мес.</i>		<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>24</i>
Серия 051022								
Описание		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
pH		6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Специфическая активность	FG1m	$5,8 \cdot 10^8$	$5,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^8$
	FM4b	$3,4 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	ST11	$1,9 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$9,2 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^7$	$6,1 \cdot 10^7$
	Ec13-52	$9,2 \cdot 10^8$	$8,1 \cdot 10^8$	$8,9 \cdot 10^8$	$8,5 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$
	Ec732	$5,1 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$
Стерильность		стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность		не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Серия 061022								
Описание		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
pH		6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
Специфическая активность	FG1m	$4,5 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^7$
	FM4b	$2,1 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$
	ST11	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$8,8 \cdot 10^7$
	Ec13-52	$2,2 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^7$	$7,3 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^7$
	Ec732	$5,1 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$

Продолжение таблицы Б.10

<i>Показатель \ Время, мес.</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>24</i>
Серия 061022							
Стерильность	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Серия 071022							
Описание	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
рН	6,6	6,7	6,6	6,6	6,6	6,6	6,7
Специфическая активность	FG1m	$2,0 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$
	FM4b	$8,0 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$
	ST11	$4,0 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	Ec13-52	$5,0 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$
	Ec732	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$
Стерильность	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен	стерилен
Аномальная токсичность	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки	соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Таблица Б.11 – Изучение стабильности перорального геля с коктейлем бактериофагов FG1m, FM4b, ST11, Ec13-52 и Ec732 в ускоренных испытаниях

[illegible]

Таблица Б.12 – Изучение стабильности перорального геля с коктейлем бактериофагов FG1m, FM4b, ST11, Ec13-52 и Ec732 после вскрытия упаковки

<i>Показатель</i>	<i>Время, суток.</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>7</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>7</i>
		Серия 101122			Серия 121122		
Описание		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
pH		6,8	6,8	6,8	6,9	6,9	6,9
Специфическая активность	FG1m	$3,2 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$8,7 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$
	FM4b	$5,1 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$
	ST11	$2,5 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^7$
	Ec13-52	$2,0 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^7$
	Ec732	$8,0 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$
МБЧ категория 5.2 Б: Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^2 КОЕ в 1 г Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^1 КОЕ в 1 г (- Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г Отсутствие бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i> в 1 г		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Аномальная токсичность		не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен	не токсичен
Бактериальные эндотоксины		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Герметичность упаковки		соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Таблица Б.13 – Результаты исследований стабильности бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP в естественных условиях хранения температура хранения 2°C, относительная влажность 60%

[illegible]

Таблица Б.14 – Результаты исследований стабильности бактерицидного действия с рекомбинантным эндолизином LysECD7-SMAP в естественных условиях хранения температура хранения 2°C, относительная влажность 60%

[illegible]

Таблица Б.15 – Результаты исследований стабильности комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и и даларгина в естественных условиях хранения температура хранения 2°С, относительная влажность 60%

[illegible]

Продолжение Таблицы Б.15

[illegible]

Таблица Б.16 – Результаты исследований стабильности комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и и даларгина в естественных условиях хранения температура хранения 8°C, относительная влажность 60%

[illegible]

Продолжение Таблицы Б.16

[illegible]

Таблица Б.17 – Результаты исследований стабильности комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и даларгина при комнатной температуре в течение 24 ч

Показатели	Время/результаты анализа									
	Серия 041022 (8°C)					Серия 041022 (после хранения при комнатной температуре 24 часа)				
	Точка 0 ч	Точка 24 ч	6 мес.	12 мес.	24 мес.	Точка 0ч	Точка 24 часа	6 мес.	12 мес.	24 мес.
Содержание интерферона альфа-2b - специфическая противовирусная активность (ГФ РФ ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур) (Не менее 50000 ME/г)	65032	65870	60128	58966	52864	65029	62751	58698	54124	50986
Количественное определение даларгина (0,475 – 0,525 мг в 1 г)	0,510	0,511	0,510	0,510	0,510	0,511	0,511	0,510	0,510	0,508
Стерильность	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Таблица Б.18 – Результаты исследования комбинированного офтальмологического геля интерферона альфа-2b и и даларгина на стрессоустойчивость (замораживание в течение 24ч)

Показатели	Время/результаты анализа			
	Серия 031022		Серия 0401022	
	Точка 0 ч	Точка 24 ч	Точка 0 ч	Точка 24 ч
Описание	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация: Интерферона альфа -2b	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Даларгина	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Прозрачность	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Осмолярность	298	298	300	300
pH	6,4	6,4	6,4	6,4
Механические включения видимые невооружённым глазом	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Стерильность	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Вязкость	0,132	0,132	0,130	0,130
Специфическая активность	70032	65898	65029	62970
Количественное определение даларгина	0,510	0,510	0,511	0,511
Металлические частицы	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Масса содержимого упаковки	10,6	10,6	10,8	10,8
Герметичность упаковки	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Таблица Б.19 – Результаты исследований стабильности комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения в естественных условиях хранения температура хранения 2°С, относительная влажность 60%

[illegible]

Продолжение Таблицы Б.19

[illegible]

Таблица Б.20 – Результаты исследований стабильности комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения в естественных условиях хранения температура хранения 8°C, относительная влажность 60%

[illegible]

Продолжение Таблицы Б.20

[illegible]

Таблица Б.21 – Результаты исследований стабильности комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения при комнатной температуре в течение 24 ч.

Показатели	Время/результаты анализа									
	Серия 041222 (8°C)					Серия 041222 (после хранения при комнатной температуре 24 часа)				
	Точка 0 ч	Точка 24 ч	6 мес.	12 мес.	24 мес.	Точка 0ч	Точка 24 часа	6 мес.	12 мес.	24 мес.
Содержание интерферона альфа-2b - специфическая противовирусная активность (ГФ РФ ОФС.1.7.2.0002.15) (Не менее 40000 МЕ/г)	55132	52870	50854	45258	44695	55132	55268	53795	50154	45285
Количественное определение декпантенола (47,5 – 52,5 мг в 1 г)	51,2	51,1	51,2	51,2	51,2	51,2	51,1	51,2	51,2	51,2
Количественное определение лидокаина (9,5 – 10,5 мг в 1 г)	10,2	10,2	10,2	10,2	10,2	10,2	10,2	10,2	10,2	10,2
МБЧ	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Таблица Б.22 – Результаты исследования комбинированного геля интерферона альфа-2b для наружного и местного применения на стрессоустойчивость (замораживание в течение 24ч)

Показатели	Время/результаты анализа			
	Серия 031222		Серия 041222	
	Точка 0 ч	Точка 24 ч	Точка 0 ч	Точка 24 ч
Описание	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация: Интерферона альфа -2b Декспантенола Лидокаина	Соотв. Соотв. Соотв.	Соотв. Соотв. Соотв.	Соотв. Соотв. Соотв.	Соотв. Соотв. Соотв.
рН	6,5	6,5	6,4	6,4
МБЧ	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Специфическая активность	55869	55201	55132	51987
Количественное определение декпантенола	50,9	50,9	51,1	51,0
Количественное определение лидокаина	10,3	10,3	10,2	10,2
Масса содержимого упаковки	10,5	10,5	10,3	10,3
Герметичность упаковки	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Патенты



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2790481

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ КОМПОЗИЦИЯ НА
ОСНОВЕ ЭНДОЛИЗИНОВ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ
СРЕДСТВА В ФОРМЕ ГЕЛЯ ИЛИ СПРЕЯ С ЕЕ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Центр стратегического планирования и
управления медико-биологическими рисками здоровью"
Федерального медико-биологического агентства (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2021128275

Приоритет изобретения **28 сентября 2021 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **21 февраля 2023 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **28 сентября 2041 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Ю.С. Зубов



ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Акты о внедрении



АО «Биннофарм»

124460, г Зеленоград, ул. Конструктора Гуськова, д.3, стр.1

Представительство в Москве: РФ, 115114, г. Москва,

Ул. Кожевническая, д. 14, стр.5, 3 этаж

e-mail: info@binnopharmgroup.ru

тел.: +7(495)510-32-88

Утверждаю

Исполнительный директор

АО «Биннофарм»

Безрукова М.С.

2024 г.

06.12

Акт

о внедрении результатов диссертационной работы «Теоретические и экспериментальные основы разработки гидрофильных мягких лекарственных форм с биотехнологическими субстанциями»

Ануровой Марии Николаевны

Комиссия в составе:

Главного технолога ПТС Байкаловой Елены Александровны

Инженера по валидации ДК Завадской Марии Вячеславовны

Старшего биохимика-аналитика ДП Гафитулиной Екатерины Михайловны

Составили акт о том, что материалы докторской диссертационной работы Ануровой Марии Николаевны на тему «Теоретические и экспериментальные основы разработки гидрофильных мягких лекарственных форм с биотехнологическими субстанциями» внедрены в практическую деятельность АО «Биннофарм», в т.ч. на базе производственной площадки отработаны лабораторные регламенты и проекты нормативных документов по качеству на представленные в рамках диссертационного исследования лекарственные формы комбинированных препаратов интерферона альфа-2b.

Председатель комиссии: Байкалова Е.А.

Байкалова Е.А. 06.12.2024

Члены комиссии:

Завадская М.В. *06.12.2024*

Гафитулина Е.М. *06.12.2024*



**ООО «ПФК «АЛИУМ»**

143442, Московская область, городской округ
Красногорск, село Ангелово, Центральная ул., с 1.

Представительство в Москве: РФ, 115114, г. Москва,

Ул. Кожевническая, д. 14, стр.5, 3 этаж

e-mail: info@binnopharmgroup.ru

тел.: +7(495)510-32-88

Утверждаю

Директор центра

исследований и разработок

Жозвик В.Б.

«06» декабря 2024 г.

Акт

**о внедрении результатов диссертационной работы «Теоретические и
экспериментальные основы разработки гидрофильных мягких
лекарственных форм с биотехнологическими субстанциями»
Ануровой Марии Николаевны**

Комиссия в составе:

Руководителя ДФА Агафонов А.А.

Старшего биохимика-аналитика ЦРБП Гафитулиной Екатерины Михайловны

Старшего инженера-технолога ОФ Власюка Василия Васильевича

Составили акт о том, что результаты докторской диссертационной работы Ануровой Марии Николаевны на тему «Теоретические и экспериментальные основы разработки гидрофильных мягких лекарственных форм с биотехнологическими субстанциями» внедрены в практическую деятельность ООО «ПФК «Алиум», в т.ч. в центре фармацевтической разработки отработаны лабораторные регламенты и проекты нормативных документов по качеству на разработанные в рамках диссертационного исследования лекарственные формы комбинированных препаратов интерферона альфа-2b.

Председатель комиссии: Агафонов А.А.

Агафонов

06.12.2024

Члены комиссии:

Гафитулина Е.М.

Гафитулина

06.12.2024

Власюк В.В.

Власюк

06.12.2024



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН МНИИЭМ

им. Габричевского Роспотребнадзора

 д.б.н. Комбарова С.Ю.

«19» _____ 2024 г.

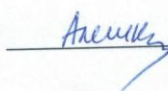
Акт внедрения

об использовании результатов диссертационной работы Ануровой Марии Николаевны на тему «Теоретические и экспериментальные основы разработки гидрофильных мягких лекарственных форм с биотехнологическими субстанциями» по специальностям 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств и 1.5.6 . Биотехнология.

Комиссия в составе зам. директора ФБУН МНИИЭМ им. Габричевского Роспотребнадзора по биотехнологии, руководитель Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов Роспотребнадзора. Член-корр. РАН, профессор РАН, д.б.н. Алешкин А.В., руководитель лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Габричевского, к.б.н. Воробьев А.М., в.н.с. лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Габричевского, к.б.н. Киселева И.А., в.н.с. лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Габричевского, к.б.н. Ефимова О.Г. составили настоящий акт в том, что материалы диссертации Ануровой М.Н., посвященные разработке лекарственных форм бактериофагов внедрены в работу Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов Роспотребнадзора.

Председатель комиссии

Зам. Директора ФБУН МНИИЭМ им. Габричевского Роспотребнадзора по биотехнологии, руководитель Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов Роспотребнадзора.

Член-корр. РАН, профессор РАН, д.б.н.  Алешкин А.В.

Члены комиссии:

Руководитель лаборатории

клинической микробиологии и биотехнологии

бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Габричевского,

к.б.н.  Воробьев А.М.

В.н.с. лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии

бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Габричевского,

к.б.н.  Киселева И.А.

В.н.с. лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии

бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Габричевского,

к.б.н.  Ефимова О.Г.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе ФГАОУ ВО
Первый МГМУ имени И.М. Сеченова
Минздрава России
(Сеченовский Университет)



Т.М. Литвинова

«14» 2024 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Ануровой Марии Николаевны в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации докторской диссертации Ануровой Марии Николаевны на тему «Теоретические и экспериментальные основы разработки гидрофильных мягких лекарственных форм с биотехнологическими субстанциями» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин частная фармацевтическая технология, масштабирование процессов и биофармация, читаемых студентам по направлению подготовки (специальности) 33.05.01 Фармация.

Директор Института Фармации
имени А.П. Нелюбина
д.ф.н., профессор

Г.В. Раменская

Заведующий кафедрой фармацевтической технологии
д.ф.н., профессор

И.И. Краснюк

Начальник учебного управления

Л.Ю. Юдина

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе ФГАОУ ВО
Первый МГМУ имени И.М. Сеченова
Минздрава России
(Сеченовский Университет)



Т.М. Литвинова

2024 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Ануровой Марии Николаевны в учебный процесс кафедры биотехнологии Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации докторской диссертации Ануровой Марии Николаевны на тему «Теоретические и экспериментальные основы разработки гидрофильных мягких лекарственных форм с биотехнологическими субстанциями» внедрены в учебный процесс кафедры биотехнологии Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин основы биотехнологии, методы очистки биологически активных веществ, опытно-промышленная отработка технологий, масштабирование процессов, читаемых студентам по направлению подготовки (специальности) 19.03.01 Биотехнология.

Директор Института Фармации имени А.П. Нелюбина
д.ф.н., профессор

Г.В. Раменская

Заведующий кафедрой биотехнологии
д.б.н., профессор

С.В. Луценко

Начальник учебного управления

Л.Ю. Юдина

**ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Решения этических комитетов по проведению
исследований на животных**

**КОМИТЕТ ПО БИМЕДИЦИНСКОЙ ЭТИКЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ» ИМ. Г.Н.
ГАБРИЧЕВСКОГО РОСПОТРЕБНАДЗОРА**

ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА № 67А

Заседания комитета по биомедицинской этике

от «14» декабря 2023г.

Участвовали: Волчецкий А.Л. – к.м.н., доцент, председатель комиссии;
Зубкин М.Л. – д.м.н., профессор, заместитель председателя комиссии; Гудова
Н.В. - к.б.н., секретарь комиссии.

Присутствовали: Алешкин А.В., Борисова О.Ю., Воропаева Е.А., Гренкова
Т.А., Леонтьева Н.И., Федорова И.М., Пшеничная Н.Ю., Цвиркун О.В.,
Руженцова Т.А., Топтыгина А.П., Кострова О.М., Новикова Е.В., Винокуров
К.Г. - члены комитета.

Слушали: младшего научного сотрудника лаборатории клинической
микробиологии и биотехнологии бактериофагов Пасивкину М.А. по поводу
проведения исследования «Изучение фармакокинетики бактериофагов для
разработки лечебно-профилактического продукта для борьбы с кишечными
инфекциями» под руководством к.б.н., руководителя лаборатории Воробьева
А.М., в рамках кандидатской диссертационной работы «Комбинация про- и
фагобиотиков как основа для многоцелевого профилактического продукта»
(научные руководители к.ф.н. Анурова М.Н., к.б.н. Лаишевцев А.И.).

Цель исследования – Изучение фармакокинетики Salmonella phages FM4b и
FG1m и Escherichia phages Ec732 и Ec13-52 при пероральном пути введения.

Задачи:

- 1) пероральное введение кроликам породы Шиншилла (самцы) коктейлей
бактериофагов;
- 2) забор крови из ушной вены в течение 24 часов, забор мочи и кала в
течение 48 часов;

- 3) подтверждение наличия бактериофагов в биологических материалах;
- 4) определение титра бактериофагов в биологических материалах.

Исследование проводит:

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора

(Исполнители: Воробьев А.М., Пасивкина М.А., Мехтиев Э.Р., Андреева А.А., Киселева И.А., Зубкова Е.С., Морозова Е.В.)

Документы, приложенные к заявлению:

- 1) планируемый стандартный протокол исследования;
- 2) пакет документов на расходный материал, реагенты и пр., которые планируется использовать в исследовании.

Решили: Принять положительное этическое заключение об одобрении исследования «Изучение фармакокинетики бактериофагов для разработки лечебно-профилактического продукта для борьбы с кишечными инфекциями» под руководством к.б.н., руководителя лаборатории Воробьева А.М.

Результаты голосования: за - 15, против - 0.

Председатель Комитета по биомедицинской этике

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского

РОСПОТРЕБНАДЗОРА

А.Л. Волчецкий

**КОМИССИЯ ПО БИОЭТИКЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)**

ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА №541

Заседания локального комитета по
биоэтике

от «9» июля 2019 г.

Участвовали: Капустин А.В. к.в.н., доцент, председатель комиссии, Исаев Ю.Г. - секретарь комиссии.

Присутствовали: Лаишевцев А.И., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М., Забережный А.Д., Искандаров М.И., Ездакова И.Ю., Найманов А.Х., Горбатов А.В.

Слушали: заявление ответственного исполнителя заведующего лабораторией диагностики и контроля антибиотикорезистентности возбудителей наиболее клинически значимых инфекционных болезней животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН Лаишевцева Алексея Ивановича, об одобрении доклинического исследования с использованием лабораторных животных: «Разработка и испытание лекарственных форм на основе эндолизинов и исследование их специфического действия».

Фаза исследования: доклинические исследования

Цель данного исследования – разработка и оценка специфического действия фармацевтической субстанции (ФС) кандидатных лекарственных средств (ЛС) на основе эндолизинов.

Исследование проводит: ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора совместно с ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Документы, приложенные к заявлению:

1. План доклинического исследования;
2. Резюме ответственного исполнителя.

Решили: принять положительное этическое заключение об одобрении доклинического исследования «Разработка и испытание лекарственных форм на основе эндолизинов и исследование их специфического действия»

Результаты голосования: за - 10, против - 0.

Председатель Комиссии по биоэтике
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, кандидат
ветеринарных наук



Капустин А.В.

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
**«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)**

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428
Тел./факс (495) 970-03-69, E-mail: admin@viev.ru

ОКПО 00496165, ОГРН 1037700258870, ИНН/КПП 7721017821/772101001

от 03.07.2019 № 54/223/19

На № _____ от _____

И.о. заведующего лаборатории
диагностики и контроля
антибиотикорезистентности
возбудителей наиболее клинически
значимых инфекционных болезней
животных, к.б.н. А.И. Лаишевцеву

Уважаемый, Алексей Иванович!

Комиссия по биоэтике ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН рассмотрела план и порядок проведения экспериментов с использованием лабораторных животных, представленных к научно-исследовательской работе в рамках научно-исследовательской работы на тему «Разработка и испытание лекарственных форм на основе эндотоксинов и исследование их специфического действия».

Протокол приложения №1 на выполнение исследования, поступивший в Комиссию по Биоэтике 03.07.2019 г., **одобрен** для выполнения на территории ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Комиссия по биоэтике напоминает, что Вы обязаны выполнять работы в соответствии с правилами и положениями, описанными в санитарно-эпидемиологических правилах СП 1.3.3118-13, Санитарно-эпидемиологических правилах СП 2.2.1.3218-14, директиве Совета Европы 2010/63 EU, Руководстве по гуманному уходу и использованию лабораторных животных (NRC, США).

Несоблюдение этих принципов приведет к приостановке или прекращению работ в рамках представленного протокола исследования по инициативе Комиссии по биоэтике ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Кроме того, Вы обязаны информировать Комиссию о ходе выполнения работ и всех отклонениях от протокола исследования.

Председатель Комиссии по биоэтике
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, кандидат
ветеринарных наук



Капустин А.В.