

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

ЧЖАН СИ

**РАЗРАБОТКА ИНЪЕКЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ
ЦИФЕТРИЛИНА**

14.04.01 – технология получения лекарств

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

профессор, доктор фармацевтических наук

Краснюк Иван Иванович

Научный консультант:

профессор, доктор фармацевтических наук

Оборотова Наталия Александровна

Москва – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. СОМАТОСТАТИН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ В ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ	11
1.1.1. Природные соматостатины	11
1.1.2. Синтетические аналоги соматостатина	13
1.1.3. Механизмы противоопухолевого действия соматостатина и его аналогов	14
1.1.4. Противоопухолевая активность соматостатина и его синтетических аналогов	22
1.2. ЦИФЕТРИЛИН – ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ГРУППЫ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ГОРМОНА СОМАТОСТАТИНА.....	27
1.2.1. Общая характеристика и противоопухолевая активность цифетрилина.....	27
1.2.2. Гормональная активность вещества цифетрилина	31
1.2.3. Таблетированная лекарственная форма цифетрилина	32
1.3. ЛИПОСОМЫ	33
1.3.1. Строение и состав липосом	33
1.3.2. Свойства липосом	36
1.3.3. Классификация липосом	37
1.3.4. Методы получения липосом	41
1.3.5. Загрузка лекарственного вещества в липосомы.....	45
1.3.6. Стабилизация липосом лиофилизацией	47
1.3.7. Стерилизация	48
1.3.8. Контроль качества ЛЛФ	49
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	53
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	53
2.1. МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ.....	53
2.2. ОБОРУДОВАНИЕ	55
2.3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	56
2.3.1. Получение липосом	56
2.3.2. Стерилизация липосомальной дисперсии цифетрилина	57
2.3.3. Получение лиофилизированных липосом Цифетрилина	57
2.3.4. Методы анализа ЛЛФ и ЛЛФ-лио цифетрилина	59
2.3.5. Статистическая обработка результатов	62
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЛФ-ЛИО ЦИФЕТРИЛИНА	63
3.1. РАЗРАБОТКА СОСТАВА ЛЛФ ЦИФЕТРИЛИНА	63
3.1.1. Выбор оптимального состава ЛЛФ цифетрилина	63
3.1.2. Введение антиоксиданта в состав ЛЛФ цифетрилина.....	66

3.2. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЛФ-ЛИО ЦИФЕТРИЛИНА	68
3.2.1. Получение липидной пленки	68
3.2.2. Гидратация липидной пленки.....	70
3.2.3. Сравнение методов получения однослойных липосом (ОСЛ) цифетрилина.....	71
3.2.4. Отделение субстанции, не включившейся в липосомы, и стерилизация липосомальной дисперсии цифетрилин	78
3.2.5. Разработка технологии лиофилизации ЛЛФ цифетрилина	79
3.2.6. Обобщенная технология получения и состав ЛЛФ-лио цифетрилина.....	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	89
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЛЛФ И ЛЛФ-ЛИО ЦИФЕТРИЛИНА. СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЛФ-ЛИО ЦИФЕТРИЛИНА.	90
4.1. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЛЛФ И ЛЛФ-ЛИО ЦИФЕТРИЛИНА.....	90
4.1.1. ТСХ-анализ цифетрилина и липидных компонентов ЛФ	91
4.1.2. Хроматографический анализ сахарозы в составе ЛЛФ-лио цифетрилина.....	100
4.2. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЦИФЕТРИЛИНА В СОСТАВЕ ЛЛФ И ЛЛФ-ЛИО	103
4.2.1. Изучение спектральных характеристик действующего вещества и вспомогательных компонентов ЛЛФ цифетрилина.....	103
4.2.2. Оценка соблюдения закона Бугера–Ламберта–Бера	105
4.2.3. Количественное определение цифетрилина в ЛЛФ и ЛЛФ-лио	107
4.2.4. Валидация методики спектрофотометрического анализа цифетрилина.....	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	117
ГЛАВА 5. СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЛФ-ЛИО ЦИФЕТРИЛИНА	118
5.1. Показатели для стандартизации ЛЛФ-лио цифетрилина	118
5.2. Мониторинг стабильности ЛЛФ-лио цифетрилина ПРИ ХРАНЕНИИ	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	127
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА	128
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	134
ПРИЛОЖЕНИЯ	147

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В свете современных представлений о значении гормонов в развитии гормонозависимых опухолей повышенный интерес вызывает поиск принципиально новых противоопухолевых веществ среди пептидных гормонов гипоталамуса, которые способны селективно воздействовать на процессы рецепторопосредованного взаимодействия и участвовать в передаче внутриклеточных сигналов. Особое внимание привлекает гипоталамический гормон соматостатин, одной из основных функций которого в организме является ингибирование секреции гормона роста (соматотропный гормон, СТГ), участвующего в пролиферации клеток. Наряду с этим соматостатин обладает широким спектром биологического действия: угнетает выделение пролактина, гормонов поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта, стимулирующих пролиферативные процессы в клетке. Механизм ингибирования секреторных и пролиферативных процессов соматостатина и его аналогов реализуется через специфические рецепторы, высокая экспрессия которых широко представлена на клетках ряда злокачественных опухолей: гастриноме, глюкагономе, карциноидных опухолях, мелкоклеточном раке легкого и других.

В настоящее время в клинической практике широко применяются аналоги соматостатина – октреотид и лантреотид. Показаниями к их применению в онкологии являются эндокринные опухоли желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы, терапия гормонорезистентного рака предстательной железы. Имеются сообщения об антипролиферативной активности аналогов соматостатина в отношении рака молочной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы. Таким образом, создание новых соединений группы соматостатина, изучение их механизма действия и спектра

антипролиферативной активности, а также разработка их лекарственных форм (ЛФ) является перспективным направлением современной науки.

В лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России синтезирован большой ряд аналогов соматостатина. В результате исследования гормональной и противоопухолевой активности этих соединений для дальнейшего доклинического изучения был отобран пентапептид цифетрилин. В исследованиях *in vivo* цифетрилин подавляет секрецию СТГ, пролактина и инсулина. Показана противоопухолевая активность цифетрилина на перевиваемых моделях опухолей мышей: аденокарциноме молочной железы Ca-755, раке молочной железы человека РМ-1, раке шейки матки РШМ-5, эпидермоидной карциноме легкого Льюис LLC и крыс: аденокарциноме предстательной железы R-3327-H и ДМБА-индуцированных опухолях молочной железы. Поскольку цифетрилин не растворим в воде, в качестве способа солюбилизации данного вещества для создания инъекционной ЛФ предложено его включение в липосомы. Выбор липосом в качестве системы доставки цифетрилина обусловлен такими их положительными свойствами как повышение биодоступности гидрофобных лекарственных веществ (ЛВ), увеличение терапевтической эффективности противоопухолевых субстанций и снижение их токсического действия.

Степень разработанности темы исследования

В связи с гидрофобной природой цифетрилина на его основе в лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России была создана пероральная ЛФ «Цифетрилин, таблетки 6 мг», которая в настоящее время находится на I стадии клинических исследований у пациентов с нейроэндокринными опухолями. В качестве альтернативы таблетированной ЛФ цифетрилина с целью повышения его эффективности и снижения побочных эффектов

перспективна разработка инъекционной липосомальной ЛФ (ЛЛФ) исследуемого ЛВ.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования являлось создание лиофилизированной ЛЛФ (ЛЛФ-лио) цифетрилина для инъекционного введения.

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

1. На основании технологических и химико-фармацевтических исследований установить оптимальный состав ЛЛФ цифетрилина.
2. Разработать технологию получения устойчивой при хранении ЛЛФ-лио цифетрилина для инъекционного введения.
3. Разработать методику качественного анализа для контроля качества ЛЛФ и ЛЛФ-лио цифетрилина.
4. Разработать методику количественного анализа для контроля качества ЛЛФ и ЛЛФ-лио цифетрилина.
5. Выбрать показатели качества для стандартизации ЛЛФ-лио цифетрилина и изучить ее стабильность в процессе хранения.

Научная новизна

Впервые создана стабильная при хранении инъекционная ЛЛФ-лио отечественного аналога соматостатина цифетрилина. Выбран оптимальный состав стерически стабилизированной ЛЛФ и разработана технология получения ЛЛФ-лио цифетрилина для инъекционного введения. Предложены методики качественного и количественного анализа липосомального цифетрилина. Определены показатели оценки качества и проведена стандартизация разработанного препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг».

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость работы заключается в обосновании выбора состава и метода получения ЛЛФ цифетрилина, являющегося гидрофобным соединением. Также доказано и экспериментально обосновано применение лиофилизации в технологии получения ЛЛФ-лио цифетрилина с целью повышения ее стабильности в процессе хранения. Представленный в работе экспериментально-практический материал может служить теоретической базой для создания ЛЛФ-лио гидрофобных субстанций. Практическая значимость работы состоит в разработке инъекционной ЛФ отечественного аналога соматостатина «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг».

Основные положения, выносимые на защиту:

- Состав ЛЛФ цифетрилина.
- Технология получения ЛЛФ-лио цифетрилина.
- Методики качественного хроматографического и количественного спектрофотометрического анализа ЛЛФ и ЛЛФ-лио цифетрилина.
- Показатели качества ЛЛФ-лио цифетрилина и результаты исследования ее стабильности в процессе хранения.

Методология и методы исследования

В основе методологии исследования лежит многофакторный подход к разработке ЛЛФ-лио, включающий анализ литературных данных, оценку степени разработанности и актуальности темы исследования, постановку цели и задач исследования, проведение экспериментально-практических работ для достижения поставленной цели и обработке полученных результатов. В процессе проведения исследования использовались технологические, химико-фармацевтические и математико-статистические методы.

Достоверность научных положений и выводов

При проведении экспериментальной работы использовано сертифицированное современное оборудование. Данные, полученные автором достоверны, обработаны с применением методов современной статистики. Научные положения, выводы и рекомендации, представленные в диссертационной работе, обоснованы, достоверны и корректно вытекают из полученных автором результатов.

Апробация результатов исследования

Материалы проведенных исследований по теме диссертации представлены на XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова (Москва, 17–18 марта 2016 г.) и XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 16–17 марта 2017 г.). Апробация диссертационной работы прошла 24 октября 2017 г. на кафедре фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в постановке цели и задач настоящего исследования, их экспериментальной реализации, анализе и обобщении данных, изложении полученных результатов в виде научных публикаций. В работах, выполненных в соавторстве, автору принадлежит решающая роль в постановке задачи, проведении эксперимента, анализе полученных результатов. Автором лично проанализирована научная литература по данной теме, выбран состав и разработана технология получения ЛЛФ-лио цифетрилина, предложены методики качественного и количественного анализа разработанного препарата.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований используются в работе лаборатории экспериментальной диагностики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также в учебном процессе на кафедре фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Акты внедрения).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 3 и 4 паспорта специальности технология получения лекарств.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертация выполнена в соответствии с комплексной научной темой ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01201261653) и планом научно-исследовательских работ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по теме «Инъекционные лекарственные формы гидрофобных субстанций» (2014–2018 гг.).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 151 листах машинописного текста и содержит 29 таблиц, 25 рисунков. Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, три главы собственных исследований, общие выводы, список литературы и приложения. Список литературы состоит из 143 источников, в том числе 125 – на иностранном языке.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 5 научные работы, 3 из которых являются статьями в журналах, включенных в перечень ведущих периодических изданий ВАК РФ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Соматостатин и его производные в лечении опухолей

Впервые соматостатин был выделен и охарактеризован в США в 1973 г. Вскоре посредством радиоиммунных и иммуноцитохимических методов он был обнаружен в различных отделах нервной системы: коре головного мозга, мозжечке, гипоталамусе, спинном мозге и др. Также соматостатин выявлен во всех отделах желудочно-кишечного тракта и в поджелудочной железе. В D-клетках содержится свыше 90 % кишечного соматостатина [70].

Соматостатин проявляет различные виды активностей: эндокринную, экзокринную, аутокринную и паракринную. Например, он ингибирует высвобождение гормона роста, глюкагона, инсулина, панкреатических гормонов, холецистокининов, желудочного сока и др. Соматостатин помимо торможения секреции гормонов ингибирует клеточную пролиферацию большинства опухолевых и нормальных клеток. Таким образом обладающий широким спектром действия соматостатин является регуляторным ингибитором роста клеток, обнаруживающийся во многих органах тела и системах человека и животных [70].

1.1.1. Природные соматостатины

Природные соматостатины – это семейство полипептидов, содержащие от четырнадцати до тридцати семи аминокислотных остатков. Тканеспецифические различия в биосинтезе из тяжёлых предшественников и кодирование различными генами определяются молекулярной гетерогенностью данного семейства [113]. Обнаруживаемые в тканях млекопитающих различные формы соматостатина представляют собой N-терминальные продолжения соматостатина-14 (Рисунок 1). Соматостатины синтезируются в виде полипептидов со 120-ю или более аминокислотными остатками (препросоматостатин). Предшественник в тканях-мишенях

редуцируется до соматостатина-28 (Рисунок 1), который деградирует в гипоталамусе, кишечнике и поджелудочной железе до соматостатина-14. Однако в некоторых отделах мозга и брюшной полости соматостатин-28 остаётся доминантной формой [126].

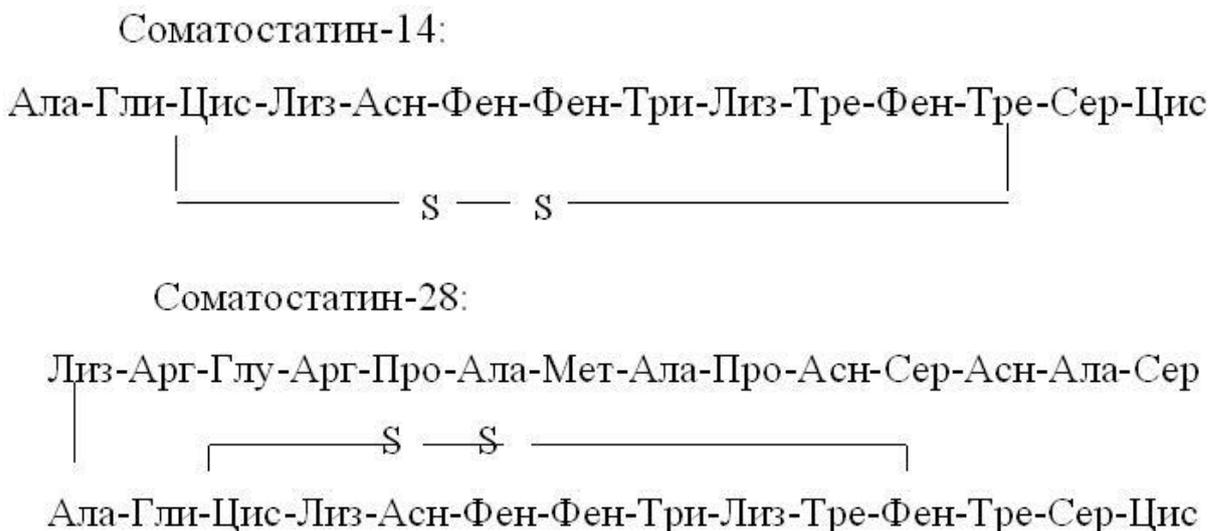


Рисунок 1. Структурные формулы нативных соматостатина-14 и соматостатина-28 [126]

Формы соматостатина-28 и соматостатина-14 присущи млекопитающим. Соматостатин-22, соматостатин-25 и соматостатин-14- (Тир-7, Гли-10) выделяют у животных других классов. Результаты исследований свидетельствуют о наличии тесной связи между структурой и функциональной активностью соматостатина. Например, у млекопитающих соматостатин-28 является более сильным ингибитором секреции СТГ, нежели соматостатин-14. Соматостатин-14 и соматостатин-28 у рыб проявляют эквипотентные свойства относительно СТГ [113].

В 1980 г. Novak и др. впервые выдвинули предположение о наличии группы соматостатиновых генов, обнаружив две разные последовательности ДНК. Одна последовательность кодировала препросоматостатин (ППСС) 1, который содержит нормальный соматостатин-14, а другая последовательность кодировала ППСС 11, содержащий модифицированный соматостатин-14. [69] Sheridan и др. выделили три разные ДНК: одна ДНК кодировала ППСС 1, а две другие ДНК – ППСС 11. [113]

1.1.2. Синтетические аналоги соматостатина

Соматостатины, которые повсеместно распространены в органах и тканях, обладают активностью и влияют также на пролиферацию клеток, естественно, привлекли внимание онкологов. Тем не менее, химиотерапевтическое применение соматостатинов является невозможным ввиду ограниченного периода полужизни – не более 3 мин. Таким образом, перед исследователями стояла задача в получении аналогов соматостатина, которые обладают, как минимум, не худшими свойствами в сравнении с природными соединениями и большей стабильностью. В результате в исследованиях, посвященных поиску новых аналогов соматостатина, был обнаружен ряд весьма значительных особенностей структуры соматостатинов. В первую очередь, было установлено, что N-продолжение соматостатина-14 не играет важной роли в проявлении биологической активности. Во-вторых, дисульфидная связь необходима для сохранения активности, однако для неё размер кольца не является критическим. В-третьих, было выяснено, что важным фрагментом молекулы природных соматостатинов является последовательность Фен-Три-Лиз-Тре (позиции 7–10) [135].

В разной степени многие из синтезированных аналогов соматостатина соответствуют заявленным требованиям, а именно стабильны длительное время и сохраняют природную активность. На сегодняшний момент в клинической практике используются два препарата – аналоги соматостатина – октреотид и лантреотид (Рисунок 2). Данные соединения обладают более длительным периодом полужизни – около 90 мин, что обусловлено отсутствием сайтов энзиматического расщепления [126].

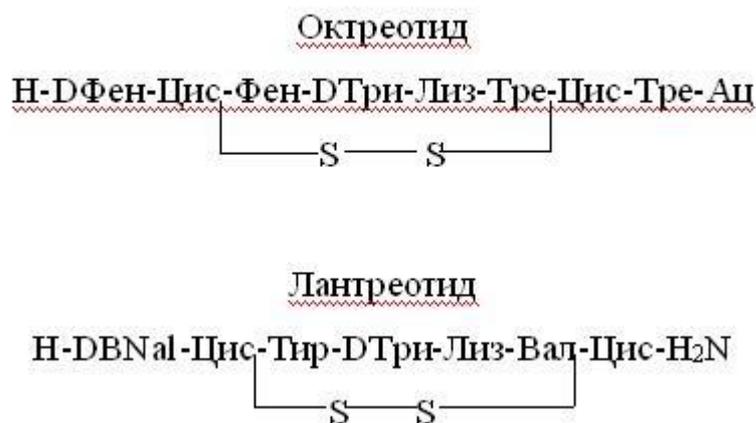


Рисунок 2. Структурные формулы аналогов соматостатина (октреотид и лантреотид), которые используются в клинической практике [126]

1.1.3. Механизмы противоопухолевого действия соматостатина и его аналогов

Замедление цикла роста опухолевых клеток

Регулировка и контроль клеточного цикла осуществляются через ряд основных сигнальных молекул и белков семейства циклина. Эти регулирующие структуры и функциональные изменения приводят к изменениям в регулировании клеточных циклов: усиливают способность клеток к расширенному воспроизводству, ослабляют клеточную дифференциацию, заставляют клетки утрачивать свои первоначальные функции и, в конечном итоге, данные клетки становятся опухолевыми. Поэтому механизм контроля, связанный с клеточным циклом, стал одним из объектов повышенного внимания у исследователей. Соматостатин и его аналоги способны останавливать цикл роста опухолевых клеток несколькими нижеописанными способами передачи сигнала.

Протеин-тирозинфосфатаза (protein tyrosine phosphatase, PTPs) включает в себя белки SHP-1 (SH2-protein phosphotyrosine phosphatase-1), SHP-2 (SH2-protein phosphotyrosine phosphatase-2) и др. и является важным регуляторным фактором для каналов передачи сигналов внутри клеток, играя важную роль в контроле передачи сигналов всех основных функций

клетки. Повышение активности PTPs способно дефосфорилировать и дезактивировать тирозинкиназу, подавлять митоген-активируемую протеинкиназу (mitogen-activated protein kinases, MAPK) и другие виды протеинкиназы, и, тем самым, сдерживать активность раковых генов *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* и др. и синтез ДНК и белков, выполняя антимитотическую функцию [111,122]. Соматостатин с помощью активации SHP-1 подавляет фосфоинозитид-3-киназы (Phosphoinositide 3-kinases, PI3Ks) [130], а стимуляция экспрессии ингибитора циклинзависимой киназы P27 приводит к блокировке цикла G1 деления клетки [95]. Также было подтверждено, что SHP-2 является регуляторным фактором соматостатина, который ингибирует пролиферацию клеток, главным образом через дезактивацию тирозинкиназных рецепторов инсулина и эпидермального фактора роста [64], активированный PTPs также способен понижать Raf-1 и блокировать пути MAPK [52, 99].

MAPK – это вид серин-треониновых протеинкиназ, способный изменять состояние фосфорилирования транскрипционного фактора через активацию сигнальной трансдукции с помощью различных способов стимуляции снаружи клетки или опосредованную стимуляцию ядра клетки через клеточную поверхность. Контролируемая система каскада реакций MAPK участвует в пролиферации и дифференциации клеток, и потеря контроля над ее активностью приводит к образованию опухолей. Подавление и стимуляция MAPK соматостатинами и его аналогами имеет определённую связь с антипролиферативным действием MAPK. При экспрессии рецептора соматостатина 1 (somatostatin receptor 1, SSTR1) в клетках яичников китайского хомяка (Chinese hamster ovary, CHO) соматостатин мощно стимулирует активность MAPK, и с помощью повышения экспрессии ингибитора циклинзависимой протеинкиназы p21 достигается эффект подавления пролиферации клеток [56]. Другие исследования показали, что соматостатин способен сдерживать

пролиферацию клеток, вызываемую фактором роста фибробластов, через активирование MAPK соматостатиновыми рецепторами SSTR2 и рецепторами SSTR4 с поверхности клеток CHO [20].

Кроме того, соматостатин, ингибируя активность аденилатциклазы, снижает содержание циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) внутри клетки, а затем подавляет активность протеинкиназы; сдерживает приток внеклеточного Ca^{2+} и сокращает концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} [97, 143, 179]. Подавление киназы, регулируемой внеклеточными сигналами, 1/2 (Extracellular regulated kinases, ERK1/2), а также ДНК-полимеразы оказывает антипролиферативное действие в отношении раковых клеток [76, 136]. Эксперименты на животных показали, что рост клеток рака поджелудочной железы, трансфицированных рецептором SSTR1, замедлялся на фазе G0/G1, количество клеток в последующей фазе S также соответствующим образом уменьшалось [81].

Стимулирование апоптоза опухолевых клеток

Возникновение опухолей связано не только с аномальным размножением и дифференциацией клеток, но также и с нарушением апоптоза клетки. Апоптоз опухолевых клеток – это самостоятельно программируемая смерть, регулируемая и контролируемая соответствующим геном апоптоза, которая управляется совместно двумя факторами – стимулирующим и сдерживающим, например, это изменение активности p53, Fas/FasL, фактора некроза опухолей- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α), семейства белков Bcl-2. Соматостатин и его аналоги способны через активацию каналов p53, Fas, каспазы сдерживать регулятор Bcl-2 и др. и стимулировать апоптоз опухолевых клеток [27]. Исследования Гильерме и др. [126] показали, что действие пост-рецептора SSTR2 через повышение регуляции экспрессии рецепторного белка TNF- α может усиливать пути активирования содержащей цистеин аспаратной гидролазы-8 (каспазы-8) и ядерного фактора-кВ (NF-кВ), стимулируемых

TNF- α , что делает фибробласты линии NIH3T3 клеток мыши более чувствительными к вызываемому TNF- α апоптозу [96]. Оно также способно, сдерживая метаболические пути фосфопентозы, подавлять пролиферацию клеток и стимулировать их апоптоз [119]. Лю и др. [83] раздельно использовали октреотид с концентрацией препарата в 0,2, 0,4, 0,8 мкг/мл для воздействия на клетки рака поджелудочной железы линии PC-3, трансфицированные SSTR2, и на SSTR2-отрицательные клетки рака поджелудочной железы линии PC-3. Впоследствии было обнаружено, что показатель апоптоза для клеток линии PC-3 с экспрессированными SSTR2 составил $(7,56 \pm 2,06) \%$, $(9,25 \pm 1,73) \%$, $(14,28 \pm 2,72) \%$, соответственно; а для SSTR2-отрицательных клеток рака поджелудочной железы линии PC-3 – $(5,76 \pm 0,75) \%$, $(6,69 \pm 0,80) \%$, $(7,26 \pm 1,28) \%$: между ними присутствовало значительное статистическое различие.

Торможение развития сосудистой сети опухоли

Рост и трансформация опухолей зависят от развития кровеносных сосудов, которое является результатом совместного регулирования факторов, как стимулирующих, так и сдерживающих развитие сосудов. Среди факторов ангиогенеза опухолей основным является фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF), а тромбоспондин-1 (thrombospondin 1, TSP-1) – очень сильным антиангиогенным фактором, который способен, стимулируя апоптоз эндотелиальных клеток, регулировать ангиогенины, тормозить миграцию эндотелиальных клеток, формирование сосудов и другими путями тормозить ангиогенез. SSTR присутствует в равной степени на поверхности васкулярных эндотелиальных клеток, в сосудистом ложе опухоли и на стенках кровеносных сосудов, окружающих опухоль. Лаклай и др. [78] обнаружили, что соматостатин может через его SSTR подавлять путь PI3K и поднимать уровень TSP-1, и, блокируя корцепторы VEGF на поверхности эндотелиальной клетки, сдерживать развитие кровеносных

сосудов. Кроме того, соединение соматостатина и STTR, находящегося на стенках вокруг опухоли, способствует сокращению сосудов, уменьшению кровоснабжения тела опухоли и сдерживанию её роста [129]. В тоже время препятствование синтезу NO также приводит к сдерживанию формирования новых сосудов опухоли [24].

Лю Юйбинь и др. [83] подкожно вводили подопытным мышам в подмышечную впадину клеточный штамм мышинной гепатокарциномы. Спустя 24 ч после прививки опухоли в течение 20 дней экспериментальной группе проводили внутривентральное введение октреотида ацетата, в то время, как контрольная группа получала внутривентральные инъекции стерильного физиологического раствора того же объёма в течение 14 дней. Спустя 20 дней мыши были умерщвлены, а VEGF и размеры опухоли измерены. Результаты показали, что через 7 и 14 дней после подкожного введения опухоли её объём и VEGF у экспериментальной группы оказались значительно меньше, чем у контрольной. Вместе с тем, экспрессия плотности микрососудистой сети экспериментальной группы также была ниже по сравнению с контрольной группой, однако эта разница не была статистически значимой. Таким образом, механизм угнетающего действия октреотида на привитую мышам опухоль печени – это подавление экспрессии VEGF гепатокарциномы, а также сдерживание ангиогенеза тканей опухоли [123]. Аналогичный биологический эффект был обнаружен в процессе использования терапии соматостатином у пациентов с раком ободочной кишки [66].

Подавление гормонов, стимулирующих развитие и образование опухолей, или высвобождение цитокинов и его эффекта

Образование опухоли тесно связано с действием множества гормонов и цитокинов таких, как соматотропин (Growth hormone, GH), эпидермальный фактор роста (Epidermal growth factor, EGF), факторы роста фибробластов (Fibroblast growth factors, FGF), холецистокинин

(Cholecystikinin, ССК), гастрин и др. Существуют доказательства того, что повышение уровня эндогенного GH и уровня инсулиноподобного фактора роста-1 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1) способно увеличивать риск развития некоторых видов солидного рака и опухолей. Соматостатин и его аналоги способны сдерживать выделение гипофизарного гормона роста, а затем косвенно подавлять биологическую активность опухоли, стимулируемую гормонами и цитокинами [113, 189].

Фредлендер и др. [56] вводили пациентам с не метастазирующим кастрационно-резистентным раком предстательной железы в прогрессирующей стадии 30 мг октреотида ацетата однократно с интервалом в 28 дней. Через 3 недели обнаружилось, что октреотида ацетат способен заметно снижать уровень IGF-1 и повышать уровень белка-1, связывающего инсулиноподобный фактор роста (Insulin-like growth factor-binding protein, IGFBP-1). Повышенный уровень IGFBP-1, который образует двойное соединение с IGF-1, в свою очередь, ещё больше снижает концентрацию свободного IGF-1. Таким образом, осуществляется регулировка и контроль биологического действия IGF-1.

Исследования Хе и др. [62] показывают, что клеточная линия аденокарциномы человека MCF-7 экспрессирует низкий уровень SSTR2. После того, как с помощью трансфекции был повышен уровень экспрессии SSTR2 в клеточной линии аденокарциномы человека MCF-7, наблюдались не только антипролиферативное действие и стимулирование апоптоза, но и заметное снижение экспрессии EGFR. Тем самым снижалась пролиферация клеток, создаваемая соединением EGF с его рецепторами. Кроме того, стимулирующее MAPK-действие ССК также может блокироваться соматостатином [86].

Подавление адгезии и инвазии опухолевых клеток

Инвазивность опухолевых клеток – это одна из основных особенностей злокачественного новообразования. Молекулы клеточной

адгезии, которые опосредованно вызывают изменение адгезивного поведения, а также повышение активности протеиназы тесно связаны с инфильтрацией и трансформацией опухолей. Матриксная металлопротеиназа-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) является ключевым ферментом, участвующим в разрушении коллагена типа IV, основного компонента внеклеточного матрикса. Она оказывает разрушительное воздействие на окружение опухолевых клеток, чем стимулирует развитие инфильтрации и трансформации опухолевых клеток. Тканевый ингибитор металлопротеиназ (Tissue inhibitor of metalloproteinases 2, TIMP-2) является специфичным ингибитором MMP-2, который через подавление активности MMP-2 даёт эффект сдерживания инфильтрации и трансформации опухоли. Фэн и др. [54] при трансфекции фрагмента cDNA человеческого SSTR2 в линии клеток рака поджелудочной железы ВХРС-3 обнаружили, что по сравнению с SSTR2-отрицательной клеточной линией стабильно экспрессирующие SSTR2 клетки ВХРС-3 способны, понижая MMP2 и активируя экспрессию TIMP-2, очевидно подавлять свои метастатические способности. Также в исследованиях были сделаны открытия для линии клеток рака поджелудочной железы РС-3 с трансфицированным SSTR2. Е-кадгерин – это один из членов надсемейства кадгерина, а также ингибиторный фактор для трансформации опухолей. Как правило, экспрессия Е-кадгерина в злокачественных опухолях понижена, и потеря им функциональности может приводить к нарушению межклеточных соединений, что часто неразрывно связано с неблагоприятным прогнозом. Соматостатин через реакцию дефосфорилирования тирозина восстанавливает активность Е-кадгерина, сокращая инвазию и трансформацию опухолей [27].

Тан и др. [126] проверили иммуногистохимическим методом экспрессию SSTR2a в ткани опухоли предстательной железы у 95 пациентов и обнаружили положительную экспрессию у 14 пациентов, а

степень гистологической дифференцировки и SSTR2a у пациентов с раком предстательной железы имели очевидную связь. Исследования в лабораторных условиях показали, что соматостатин и его аналог дозозависимым образом подавляют способность к трансформации и инвазии клеток рака поджелудочной железы линий DU145 и PC-3.

Повышение чувствительности опухолей к химиотерапевтическим препаратам

Ключевым фактором неудачи при проведении химиотерапии является устойчивость опухоли к препаратам, которая часто приводит к снижению ее чувствительности к определённым лекарственным средствам (ЛС), а также может вызывать рецидив рака и даже его метастазирование. На сегодняшний день это уже стало объектом пристального внимания исследований. Помимо смены программы лечения одним из эффективных методов также является повышение чувствительности опухолей к лекарственным препаратам (ЛП). Некоторые исследования показали, что соматостатин обладает определённой эффективностью в этом отношении.

Одним из часто используемых противоопухолевых лекарств является рапамицин. Активация протеинкиназы В (Protein kinase B, PKB или Akt) способна снижать эффективность терапии с рапамицином, повышая устойчивость опухоли к данному препарату. Повысить чувствительность к рапамицину позволяет блокировка пути PI3K/Akt. Церовац и др. [33] использовали октреотид совместно с рапамицином для воздействия на экспрессирующие SSTR клетки опухоли гипофиза, и сумели снизить уровень фосфорилирования Akt серином 473 (pAkt473) и повысить противоопухолевую активность рапамицина. Лю Яньго и др. [83] после совместной обработки клеток немелкоклеточного рака лёгких линии A549 октреотидом и паклитакселем обнаружили, что октреотид понижает экспрессию генов *MDR-1* и *MRP-1*, связанных с множественной лекарственной резистентностью, в клетках A549 и повышает

чувствительность клеток к химиотерапии паклитакселом. Кроме того, соматостатин повышает уровень экспрессии Торо $\Pi\alpha$ [96] и останавливает цикл деления клетки в фазе S [10], увеличивая чувствительность клеток GBC-SD рака желчного пузыря к доксорубицину.

1.1.4. Противоопухолевая активность соматостатина и его синтетических аналогов

Экспериментальные исследования синтетических аналогов соматостатина свидетельствуют о перспективности их использования в химиотерапии. Явные преимущества применения соматостатинов связаны с широким спектром антипролиферативного и ингибиторного действия, а также малыми побочными эффектами [65, 66].

Рак молочной железы

Содержание соматостатина-14 в женском молоке в 10 раз выше, чем в плазме. Соматостатин женского молока имеет высокую способность ингибировать простагландин-индуцированную и базальную секрецию гормона роста в культуре железистых клеток человека. Также выявлена биологическая активность соматостатина в отношении РМЖ [26]. В исследованиях *in vitro* Scambia и др. изучали влияние соматостатина-14 и его аналога, октреотида (SMS 201-995), на клеточные линии РМЖ человека – CG5, T47 D и ZR 75-1, при этом концентрации соматостатинов варьировались от 0,01 до 100 нмоль/л. В результате ими было обнаружено дозозависимое ингибирование роста всех указанных клеточных линий под действием как природного, так и синтетического аналога, а наблюдаемое подавление клеточной пролиферации составляло от 10 до 40 % [61]. Setyono-Han и др. также установили, что SMS 201-995, соматостатин-14 и его синтетический аналог CGP15-425 в концентрации 10 нмоль/л ингибируют рост клеток линии MCF-7 примерно на 75 %[67].

О колоколообразной зависимости эффекта соматостатина и его аналогов от используемой концентрации сообщают многие исследователи. Так, например, Klijn и др. в исследованиях *in vitro* (клеточная линия MCF-7) и *in vivo* (крысы с индуцированной опухолью) наблюдали характерную дозовую зависимость антипролиферативного эффекта SMS 201-995. При этом максимальное торможение роста опухоли (ТРО) – 85 % отмечалось при двукратном введении SMS 201-995 в дозе 0,2 мкг/кг в экспериментах *in vivo*[70].

Считается, что соматостатины воздействуют на опухолевые клетки, непосредственно связываясь со специфическими SSTR, обнаруженными на всех экспериментальных опухолях. Непрямое действие соматостатина и его синтетических аналогов обуславливают с их связыванием со специфическими рецепторами ростовых факторов – инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) и эпидермального фактора роста (ЭФР), стимулирующих рост экспериментальных опухолей, и подавлением их высвобождения [53].

Рак лёгкого

Мелкоклеточный рак легкого диагностируют в 20–25 % случаях опухолей легкого. Хотя лечение данного метастазирующего и быстрорастущего рака производится, главным образом, хирургическим путём, тем не менее, прогноз бывает благоприятным крайне редко [53]. После обнаружения SSTR на поверхности клеток мелкоклеточного рака лёгкого Taylor и др. [128] предположили, что соматостатин является активным модулятором роста данного вида рака. В экспериментах *in vitro* под действием аналога соматостатина BIM-23014C в концентрации 10 нмоль/л они наблюдали подавление клеточной пролиферации мелкоклеточного рака NCI-H69 на 59 %. Исследования *in vivo* проводили на бестимусных мышах, при этом соматостатин BIM-23014C вводили два раза в день в дозе 500 мкг тремя путями – внутривенно, подкожно

вокруг опухоли и отдалённо от опухоли. При внутрибрюшинном и подкожном отдаленном от опухоли введении наблюдали значительное торможение развития опухоли, а при введении препарата в область образования опухоли – резкое торможение её роста. Вероятно, аналог соматостатина оказывает прямой цитостатический эффект, а не выраженный цитотоксический. Полученные результаты совпадают с данными исследований, проводимых Rose и др. [64] на культуре клеток рака молочной железы.

Многими исследователями на поверхности клеток мелкоклеточного рака лёгкого были обнаружены сайты связывания аутокринного ростового фактора – бомбезина. Кроме того, Evers и др. [53] установили, что бомбезин стимулирует рост клеток мелкоклеточного рака легкого NCI-H69. В экспериментах *in vivo* бомбезин-стимулированный рост NCI-H69 подавлял аналог соматостатина МК-678, что свидетельствует о непрямом воздействии соматостатина на раковые клетки.

Рак прямой кишки

В некоторых опухолях прямой кишки обнаруживают рецепторы гастрина. При этом известна биомодель, использующая стимуляцию опухолевого роста гастрином или его аналогами. Исследователи Singh и др. [115] установили, что SMS 201-995 подавляет рост культуры клеток положительного по гастринным рецепторам рака прямой кишки MC-26, индуцированный пентагастрином. В исследованиях *in vivo*, проводимых на бестимусных мышах, Smith и Solomon [118] изучали влияние соматостатина-14 на 3 клеточные линии рака прямой кишки – X56, CXI и HT29. Соматостатин-14 вводили подкожно два раза в день в дозах 33, 100 и 300 мкг/кг. В результате было обнаружено, что соматостатин-14 не влияет на рост X56, но существенно сокращает объём и вес опухоли CXI спустя двадцать дней введения в дозах 100 и 300 мкг/кг. Однако, пока не установлен точный механизм активности соматостатина и его аналогов на

клетки рака толстого кишечника. Некоторые исследователи предполагают, что соматостатины вполне могут модулировать рецепторы гастрина и/или опосредованно влиять на его секрецию.

Рак (аденокарцинома) поджелудочной железы (РПЖЖ)

При РПЖЖ выживание свыше 5-ти лет составляет 1–2 %, а среднее время жизни – не более 2,5 месяцев. К сожалению, ни химиотерапия, ни радиотерапия не приводят к лечебному успеху. В редких случаях эффективным способом лечения аденокарциномы поджелудочной железы считается лишь резекция.

Антипролиферативный эффект в отношении РПЖЖ в экспериментальных исследованиях демонстрируют соматостатин и его аналоги. Так, Redding и Schally [99] свидетельствуют о существенном снижении веса (на 51 %) и объёма (на 67 %) опухоли поджелудочной железы DNCР-322 спустя 21 день после введения L-5-Вг-Три8, аналога соматостатина-14, в дозе 30 мкг/кг два раза в день. В исследовании Upp и др. [77] показано, что другой аналог соматостатина SMS 201-995 ингибирует рост двух типов опухоли поджелудочной железы человека – Cav и SKI.

Вероятно, ингибирующее действие соматостатина в отношении аденокарциномы поджелудочной железы обусловлено подавлением им выработки гастроинтестинальных гормонов, в частности, секретина. К тому же на данный процесс могут влиять и иные факторы. Так, например, Hierowski и др. [64], Liebow и др. [82] на линии клеток недифференцированного РПЖЖ человека MIA PaCa-2 обнаружили рецепторы ЭФР и соматостатина. В свою очередь, ЭФР стимулирует рост данного рака, а соматостатин подавляет стимуляцию посредством активации дефосфорилирования рецептора ЭФР.

Рак предстательной железы

Гормональная терапия РПЖ базируется на андрогенной зависимости данного типа опухоли. Evers В.М. et al. [53] сообщили о комбинированном лечении агонистом релизинг-фактора лютеинизирующего гормона [D-Триб]-LH-RH и аналогами соматостатина RC-121 и RC-160 гормонзависимого РПЖ Даннинга R33227-Н. При этом комбинация препаратов оказалась более эффективной в ингибировании опухолевого роста, нежели монотерапия каждым из указанных агентов. Данный эффект авторы объясняют тем, что аналоги соматостатина ингибируют секрецию пролактина и гормона роста.

Эндокринные типы опухоли

Lamberts и др. [79] исследовали влияние SMS 201-995 на железистую опухоль крысы 7315а, секретирующую пролактин и АКТГ. SMS 201-995 вводили в дозах 2 или 20 мкг/кг 2 раза в день. В результате отмечалось значительное уменьшение распространенности опухоли, а также снижение её веса. Об эффективности SMS 201-995 в отношении несущей высокоаффинные SSTR инсулиномы хомяка свидетельствуют результаты исследования, проводимые Reubi [100]. При введении указанного агента в дозе 200 мкг/кг в день на протяжении 36 дней наблюдалось снижение объёма опухоли на 50 % и её веса на 40 %. Вероятно, что терапевтический эффект SMS 201-995 обусловлен его связыванием с рецепторами соматостатина.

Экспериментальные исследования по применению комбинаций октреотида и антимитотических лекарств – метотрексата, винкристина, сурамина и фторурацила – демонстрируют слабый аддитивный эффект. В настоящее время рассматривается возможность использования комбинированной терапии с применением аналогов соматостатина у больных с гастроэнтеропанкреатическими нейроэндокринными опухолями.

Также аналоги соматостатина применяются как носители цитотоксических агентов с целью их доставки к опухолевым клеткам [91]. Весьма эффективным в отношении экспериментальных моделей опухолей желудка человека NCI-N87 и Hs746T, характеризующихся большой плотностью SSTR-5 и SSTR-2, является цитотоксический октапептидный конъюгат с аналогом соматостатина – AN-238. Синтезированный Schally и др. AN-238 состоит из RC-121 и производного доксорубина 2-пироллино-DOX. В эксперименте AN-238 подавлял рост исследуемых опухолей желудка и, кроме того, связывался с SSTR близлежащих сосудов [107,108].

Современная предклиническая стратегия применения аналогов соматостатина базируется на трансфекции генов SSTR-2, которые, как выявлено на моделях РПЖЖ, обладают антионкогенными свойствами. При этом противоопухолевый эффект генной трансфекции может быть существенно усилен системной химиотерапией цитостатиками и радионуклеидами.

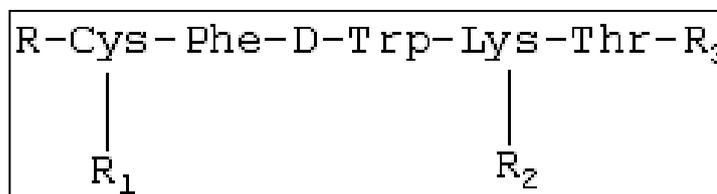
Следовательно, можно сделать вывод о том, что аналоги соматостатина являются перспективными противоопухолевыми агентами, использовать которые можно как в монотерапии, так и в сочетании с иными противоопухолевыми препаратами.

1.2. Цифетрилин – представитель группы синтетических аналогов гипоталамического гормона соматостатина

1.2.1. Общая характеристика и противоопухолевая активность цифетрилина

Цифетрилин – синтетический аналог гипоталамического гормона соматостатина, который был получен в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава

России. В отличие от других аналогов данного гормона цифетрилин представляет собой нециклический пептид, синтезированный с использованием классических методов пептидной химии. Все реакционноспособные боковые группы в его молекуле защищены третбутилоксикарбонильной, бензилоксикарбонильной и тетрагидропиральной группами. По химической структуре цифетрилин является метиловым эфиром N^α-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранилцистеинилфенилаланил-D-триптофил-N^ε-карбобензоксизилтреонина (Рисунок 3) [14].



R – трет-бутилоксикарбонил
R₁ – тетрагидропиранил
R₂ – карбобензилоксикарбонил
R₃ – метил

Рисунок 3. Структурная формула цифетрилина [14]

Противоопухолевое действие цифетрилина изучалось на опухолях крыс – R3327-H (перевиваемой гормонозависимой аденокарциноме предстательной железы) крыс-самцов линии Copenhagen и на ДМБА-индуцированных ОМЖ неинbredных крыс-самок и на перевиваемой РМ-1(рак молочной железы человека) на бестимусных мышях. На клетках РПЖ и ОМЖ экспрессированы мембранные SSTR, что позволяет оценить антипролиферативное действие соединений, опосредованное через эти рецепторы. На ОМЖ противоопухолевое действие аналогов соматостатина проявляется вследствие угнетения выделения пролактина и также опосредованно через SSTR [9].

При изучении противоопухолевого действия на РПЖ цифетрилин в 10 % водно-спиртовом растворе вводили подкожно в дозе 0,1 мг/кг ежедневно в течение 55 дней. В качестве препарата сравнения

использовали структурный аналог соматостатина, применяемый в клинической практике, – сандостатин (октреотид). В результате было показано, что на фоне пролонгированного введения исследуемое соединение тормозило рост опухоли на 45 %, а максимальный терапевтический эффект наблюдался на 10-й неделе опыта (ТРО = 55 %), после чего отмечалось постепенное снижение противоопухолевого эффекта (Рисунок 4) [9].

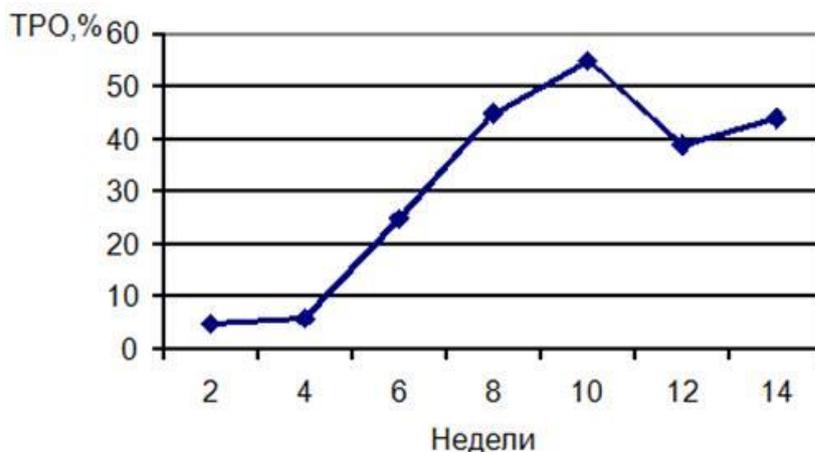


Рисунок 4. Противоопухолевая активность циметрилина в дозе 0,1 мг/кг на R-3327-H Даннинга [9]

Противоопухолевый эффект циметрилина на ДМБА-индуцированных ОМЖ крыс-самок изучали при его внутрибрюшинном введении в дозе 0,1 мкг/кг на протяжении 30 дней. При этом противоопухолевый эффект циметрилина после окончания лечения составлял 49 % ТРО, на 6-й недели – 54 %, на 8-й – 64 % и далее нарастал до 90 % (с 10-й по 13-ю недели) (Рисунок 5) [9].

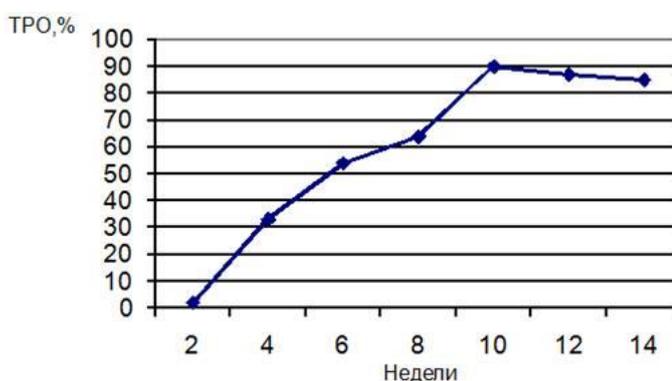


Рисунок 5. Противоопухолевая активность циметрилина в дозе 0,1 мг/кг на ДМБА-индуцированных ОМЖ [9]

Сандостатин по противоопухолевой активности уступал цифетрилину, и максимальный, но кратковременный терапевтический эффект наблюдался на 13-й недели опыта и составлял 74 % ТРО (Рисунок б).

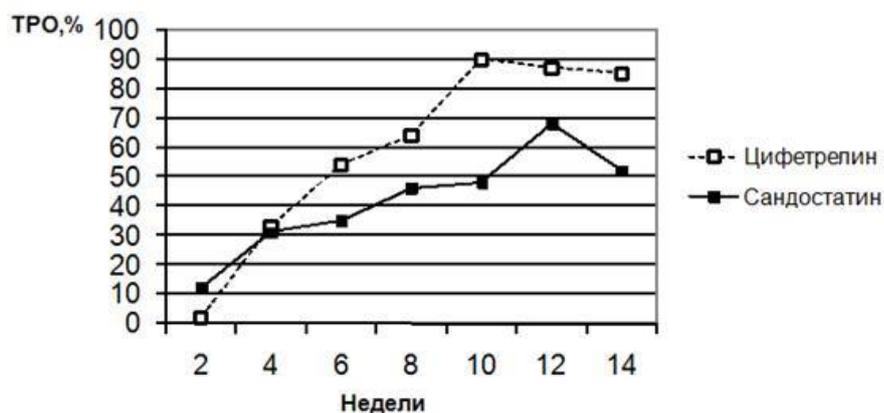


Рисунок 6. Противоопухолевое действие цифетрилина в сравнении с Сандостатином на ДМБА-индуцированных ОМЖ [9]

При изучении зависимости противоопухолевого эффекта цифетрилина от дозы на ДМБА-индуцированных ОМЖ было показано, что в диапазоне доз от 0,1 до 0,2 мг/кг терапевтический эффект прямо пропорционален вводимой дозе до восьмой недели наблюдения. Разница в противоопухолевом действии при снижении эффекта в зависимости от дозы является незначительной ($p > 0,05$) [9].

На РМЖ РМ-1 у бестимусных мышей было выявлено, что на фоне введения цифетрилина ТРО составило 47 %, что превышало действие сандостатина (ТРО = 39 %). Непосредственно после окончания лечения терапевтический эффект сохранялся и ТРО составил для цифетрилина 45 %, для сандостатина – 40 % (Таблица 1) [9].

Таблица 1.

Противоопухолевая активность цифетрилина на РМЖ РМ-1 бестимусных мышей в сравнении с сандостатином

Препарат	Доза (мкг/кг)/интервал (ч) × число введений	ТРО, %			
		Дни			
		13	16	20	23
Цифетрилин	100 / 24 × 21	49*	36	47*	45
Сандостатин		34	38	39	40

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к контролю

Противоопухолевая активность цифетрилина была изучена на солидных опухолях мышей – Ca-755 (аденокарцинома молочной железы), LLC (эпидермоидная карцинома легкого Льюис) и B-16 (меланома) [9, 13, 14, 116]. На исследуемых опухолях показан недозозависимый противоопухолевый эффект цифетрилина равный 83–97 % после ежедневного внутривенного введения терапевтической дозы ЛВ в течение 5 дней (Таблица 2).

Таблица 2.

Противоопухолевая активность цифетрилина на солидные опухоли мышей

Доза	режим введения	Максимальное торможение роста опухоли, %		
		Ca-755	LLC	B-16
60 мг/кг	1 раз в сутки в течение 5 дней	90*	83*	85*
70 мг/кг		85*	97*	-
80 мг/кг		91*	-	-
Примечание: *p <0,05 по отношению к контролю. «-» – нет данных.				

При изучении противоопухолевой активности цифетрилина при его пероральном введении в широком диапазоне доз от 50 до 140 мг/кг на перевиваемых опухолях мышей (Ca-755, РШМ-5, LLC) наблюдалось ТРО 65–86 %. На LLC и РШМ-5 терапевтический эффект сохраняется в течение 30 дней. На Ca-755 кроме высокого противоопухолевого эффекта непосредственно после лечения 86 % ТРО и на 9 день 76 % ТРО, выявлено увеличение продолжительности жизни (УПЖ) равное 53 %. Кроме того, в результате исследования установлена терапевтическая доза цифетрилина при пероральном введении 120 мг/кг [9,13].

1.2.2. Гормональная активность вещества цифетрилина

Исследование гормональной активности цифетрилина проводили в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В опытах *in vitro* применяли 5-дневные клеточные культуры островковых клеток поджелудочной железы

новорожденных крысят и клеточные культуры аденогипофизов взрослых крыс. Активность соединений оценивали по их способности оказывать влияние на секрецию пролактина культивируемыми клетками аденогипофизов крыс. В экспериментах *in vivo* использовали крыс линии Wistar, в плазме крови которых определяли содержание СТГ, пролактина и инсулина. В результате было установлено, что цифетрилин не влияет на секрецию СТГ в культуре аденогипофизарных клеток и на секрецию инсулина в культуре клеток поджелудочной железы. В экспериментах *in vivo* цифетрилин подавлял секрецию СТГ: через 2 ч после его введения в дозе 2,5 мг/кг содержание гормона роста в сыворотке крови крыс уменьшалось в 3,8 раза по сравнению с контролем. Содержание пролактина достоверно снижалось до 8,6 мкЕд/мл после применения соединения в диапазоне доз 0,62–2,5 мг/жив и инсулина – до 3,4 мкЕд/мл. Содержание инсулина в сыворотке крови крыс через 60 мин после внутрибрюшинного введения цифетрилина в дозе 1,25 мг/кг снижалось в 2,4 раза, а в дозе 2,5 мг/кг – в 4,9 раза по сравнению с контролем [9].

1.2.3. Таблетированная лекарственная форма цифетрилина

По результатам исследования противоопухолевой активности цифетрилина *in vivo* на мышах был сделан вывод, что препарат эффективен при пероральном введении [13]. В связи с этим, а также из-за плохой растворимости цифетрилина в воде в лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России создана таблетированная ЛФ цифетрилина. Таблетки цифетрилина получают с применением влажного гранулирования. В качестве вспомогательных веществ таблетки входят лактоза, крахмал, целлюлоза микрокристаллическая, аэросил, поливинилпирролидон. Для обеспечения возможности индивидуального подбора режима дозирования

в зависимости от чувствительности опухоли и восприимчивости пациента к действию препарата в таблетки цифетрилина заложена доза 6 мг [11].

При сравнении противоопухолевого действия цифетрилина в субстанции и таблетках при пероральном введении в изученных режимах в дозе 10 мг/кг и 1 мг/кг установлено, что по показателю ТРО эффективность ЛФ цифетрилина не уступала таковой субстанции (Таблица 3). Во всех группах животные начинали гибнуть позже, чем в контрольной группе, ни в одной из групп животных не наблюдалось изменения микроскопической картины внутренних органов или снижения массы тела более чем на 20 %, что свидетельствует об отсутствии токсичности [11].

Таблица 3.

Противоопухолевое действие субстанции и таблеток цифетрилина на модели опухоли РШМ-5 при пероральном введении в различных режимах

Доза мг/кг	Режим дозирования	Таблетки/ субстанция	% ТРО, дни после перевивки опухоли					
			7	11	14	18	22	25
10	5 дней с интервалом 24 ч, 1 курс	субстанция	90*	80*	76*	75*	67*	54
		таблетки	84*	82*	87*	74*	60*	56
	5 дней с интервалом 24 ч, 2 курса с интервалом 7 дней	субстанция	77*	82*	88*	91*	79*	78*
		таблетки	70*	76*	73*	50	63*	59*
	1 раз в неделю в течение 3 недель	субстанция	79*	74*	56	62*	66*	-
		таблетки	88*	92*	82*	67*	69*	70*
1	5 дней с интервалом 24 ч, 2 курса с интервалом 7 дней	субстанция	70*	61*	69*	79*	68*	53
		таблетки	80*	89*	78*	69*	73*	69*
	10 дней с интервалом 24 ч, 1 курс	субстанция	59*	69*	51	63*	58*	55
		таблетки	67*	85*	70*	57*	57*	64*

Примечание: * – достоверно к контролю при $p < 0,05$; «-» – нет данных.

1.3. Липосомы

1.3.1. Строение и состав липосом

Липосомы – полые частицы, содержимое которых ограничено липидной оболочкой (мембраной). Они относятся к обширному семейству везикулярных (пузырьковых) структур. Липосомальная мембрана, созданная на основе физиологических фосфолипидов (ФЛ) и подлежащая естественному биологическому распаду, является натуральным носителем

без или с минимальным иммуногенным потенциалом. В липидном бислое молекулы ФЛ расположены в виде двух параллельных монослоёв, обращённых друг к другу своими гидрофобными остатками. Полярные головки липидов, образуя две гидрофильные поверхности, находятся в контакте с водной фазой и защищают от воды гидрофобные углеводородные цепи. Внутри липидного образования имеется водное пространство. В избытке воды липидный бислой замыкается с образованием однослойных или многослойных везикулярных структур. Движущей силой этого процесса является стремление устранить энергетически невыгодный контакт воды с гидрофобными областями на краях незамкнутого бислоя (Рисунок 7) [12].

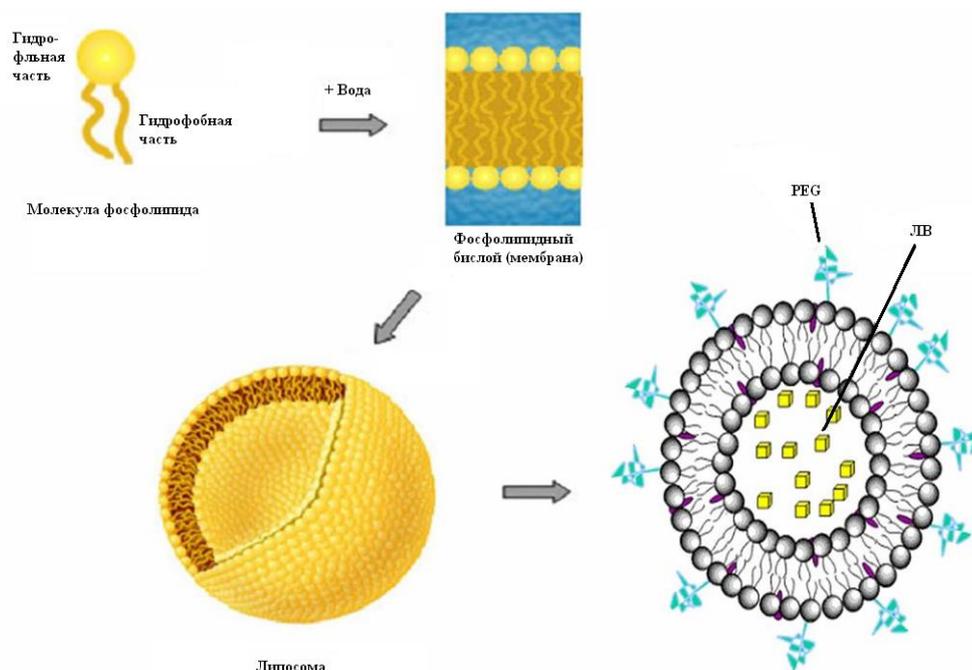


Рисунок 7. Строение липосом [12]

«Строительными» компонентами липосом являются амфифильные липиды, которые представляют собой органические вещества, нерастворимые в воде, но растворимые в бензоле, эфире, ацетоне, хлороформе и этаноле. Общая структура амфифильных липидов «П – Н», где «П» представляет собой полярную группу (PO_3H^{2-} , COOH , SO_4^{2-} , $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, холин и др.), а «Н» – неполярный остаток (углеводородный остаток,

иногда циклоалифатический или ароматический). Поэтому их называют полярными в отличие от триглицеридов, эфиров холестерина и восков, не имеющих выраженной полярной части. Полярные липиды классифицируют по строению гидрофобной части на: глицерофосфолипиды и сфинголипиды, а по строению полярной головки на – ФЛ и гликолипиды (Таблица 4). ФЛ являются одними из основных компонентов клеточных мембран, как у растений, так и у животных. Среди них есть биологически активные вещества, которые довольно широко используются в пищевой и фармацевтической промышленности (например, яичный и соевый лецитин).

Таблица 4.

ФЛ, используемые в получении липосом

Название соединения	Формула
<u>Глицерофосфолипиды:</u>	$ \begin{array}{c} \text{RCO}_2\text{CH}_2 \\ \\ \text{RCO}_2\text{CH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OP}_2\text{O}_2\text{X} \end{array} $
Фосфатидиловая кислота	X = H
Фосфатидилхолин	X = CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₃
Фосфатидилэтаноламин	X = CH ₂ CH ₂ NH ₂
Фосфатидилсерин	X = CH ₂ CH ₂ NH ₂ COOH
Сфинголипиды	K = CP=CP-CP-ЦР
Сфингомиелин	R = CO-NH-CH ₂ -CH ₂ -OX
Цереброзиды	X = CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₃
Ганглиозиды	X = нейтральный сахар
	X = олигосахарид, содержащий сиаловую кислоту

В водных растворах липиды, в силу своей амфифильной природы, формируют многомoleкулярные агрегаты различной структуры. Основной силой с точки зрения термодинамики, которая стабилизирует липидные агрегаты, являются гидрофобные взаимодействия между углеводородными цепями. К другим стабилизирующим факторам относятся водородные связи, возникающие между полярными головками некоторых липидов.

В воде состояние липидных агрегатов зависит от их структуры, а также от их концентрации. При большом избытке воды ФЛ, содержащие 4

и менее углеродных атомов, существуют в виде мономеров, содержащие 6–8 углеродных атомов, образуют преимущественно мицеллы, а липиды с более длинными цепями при осторожном встряхивании с водой образуют многослойные липидные сферические формы (мультиламеллярные везикулы (МЛВ) или многослойные липосомы (МСЛ)) с диаметром 0,1–10 мкм. Расстояние между бимолекулярными слоями (ламеллами) около 25 Å. Но использование МСЛ в качестве переносчиков ЛП ограничено небольшим объемом внутренней водной фазы (0,2–4 мкл на 1 мкмоль ФЛ).

1.3.2. Свойства липосом

Благодаря тому, что слои липосомы сформированы из олеофильных и гидрофильных первичных молекул, жиро- и водорастворимые ЛС «запечатываются» в липосоме и в организме могут проявлять различные свойства [35]. Липосомальные препараты обладают следующими преимуществами:

- *Прицельное действие.* Липосома обладает способностью избирательно распределяться в тканях и органах человеческого тела, например, в печени, селезёнке, лёгких и других органах, богатых клетками ретикуло-эндотелиальной системы. (РЭС) Достигнув своей цели, липосома высвобождает ЛВ и обеспечивает его накопление непосредственно в месте действия. Именно за это липосомы получили название «управляемый медицинский снаряд». В особенности это касается раковых клеток: липосома способна выборочно транспортировать ЛВ, уничтожать или захватывать раковые клетки, не повреждая здоровые.

- *Контролируемость лекарственного вещества внутри тканей.* В процессе приготовления, изменяя свойство поверхности липосом (например, размера частиц, плотности заряда и пр.), можно увеличить избирательную способность и направленность липосомной формулы ЛВ, контролировать его распределение в тканях и таким образом снизить токсичность и уменьшить побочные реакции.

- *Совместимость с клетками.* Благодаря сходству структур липосомы и клеточные мембраны обладают высокой совместимостью друг с другом, что позволяет увеличить проходимость ЛВ через мембрану и усиливает его терапевтические свойства.
- *Пролонгированное высвобождение.* Лекарство, находящееся в липосоме, медленно распределяется в тканях и медленно высвобождается в крови. Таким образом, увеличивается время действия ЛП.
- *Отсутствие токсичности.* Поскольку по составу своей мембраны липосомы похожи на животную клетку млекопитающего, они не являются инородными для организма, не вызывают повреждений отдельных тканей и аллергических реакций, подходят для многократного длительного применения и не являются вредными для организма.
- *Пролонгированное действие.* Защищенное бимолекулярным слоем липосомы ЛВ не повреждается кислотами и энзимами в организме, что гарантирует длительный терапевтический эффект.
- *Разные способы введения препарата.* Липосомы можно вводить не только внутривенно, но и внутримышечно, через кожные покровы, наносить на слизистые оболочки и кожу. Также в будущем липосомы можно будет использовать в качестве пленкообразователей, мазей и жидких ЛС для приёма внутрь и др. Разрабатываются и ещё более доступные способы введения лекарства.

1.3.3. Классификация липосом

Характер липосомы и размер частиц определяются методом ее изготовления, различные материалы создают различные структуры, значительно отличающиеся друг от друга. Как правило, липосомы классифицируются в соответствии со структурой и количеством бислоев липидной мембраны, характером заряда, функцией и областью применения.

Классификация по форме и размеру частиц липосомы

Липосомы можно классифицировать в соответствии с их формой и размером частиц. При разном способе приготовления создаются значительно отличающиеся по форме и размеру частицы липосомы. Возможно создание как липосом очень маленьких размеров (примерно 25 нм, теоретически можно достичь минимального размера частиц), так и очень больших (1–5 мкм, размер равный размеру животной клетки). Они могут состоять из нескольких фосфолипидных бислоев или иметь только один фосфолипидный бислой. Поскольку влияние размера частиц липосомы на характер ЛП и их применение очень велико, классификация по размеру и форме в настоящее время является самой распространенной.

1) *Мультиламеллярные (многослойные) липосомы (МЛЛ)*. Липосомы, состоящие из нескольких фосфолипидных бислоев, называются «мультиламеллярными», размеры их частиц составляют 400–5000 нм. Как правило, МЛЛ имеют более 5 фосфолипидных бислоев. Липосомы, имеющие от 3 до 5 фосфолипидных бислоев, называют «двойными липосомами».

2) *Малые моноламеллярные липосомы (ММЛ)* – это состоящие из одного фосфолипидного бислоя липосомы, размер их частиц – менее 50 нм. По мере уменьшения размера частиц увеличивается количество радиан её сферического тела, что приводит к возникновению асимметрии внешних и внутренних мембран фосфолипидных бислоев. Такого рода асимметрия в МОВ особенно очевидна. Например, у ММЛ размером 25 нм (толщина фосфолипидного бислоя составляет примерно 4–5 нм) внешняя мембрана занимает около 70 % ФЛ. Из-за сильной асимметрии внешней и внутренней мембраны очень велика сила натяжения сферической поверхности ММЛ, поэтому в отличие от больших моноламеллярных липосом (БМЛ) ММЛ являются нестабильными и способны легко смешиваться друг с другом.

3) *Большие моноламеллярные липосомы* – это также состоящие из одного фосфолипидного бислоя липосомы. Размер частиц БМЛ, как правило, составляет около 80–200 нм. Они обладают долговременным действием в крови, более высокими дозировками (ЛВ внутри липосомы) и стабильностью. Считается, что БМЛ являются идеальными транспортными агентами для ЛВ, вводимых внутривенно. Большинство выпускаемых на сегодняшний день липосомальных ЛП относятся именно к этой категории.

Классификация в соответствии с поверхностным зарядом

Нейтральные липосомы – это липосомы, главным образом, состоящие из не имеющих заряда ФЛ или иных липидных соединений.

Липосомы с отрицательным зарядом – это липосомы, обладающие отрицательным зарядом. Часть их составляющих ФЛ имеет отрицательный заряд, например, это фосфатидилсерин (PS), фосфатидилинозитол (PI), а также фосфатидилглицерин (PG).

Липосомы с положительным зарядом – это положительно заряженные липосомы, часть их составляющих ФЛ имеет положительный заряд, например, 2-октадекан – 2-метиламмониум, октадециламин и др. В последние годы липосомы с положительным зарядом вызвали значительный интерес в качестве транспортных агентов невирусных препаратов.

Классификация по функциям

Простые (традиционные) липосомы включают в себя вышеописанные моноламеллярные, мультламеллярные, а также полифазные липосомы и др.

Липосомы пролонгированного действия. При решении проблемы быстрого выведения простых липосом из кровотока макрофагами печени и селезёнки, получены поверхностно модифицированные липосомы, способные достаточно долгое время оставаться в крови. Для модификации поверхности липосом используют полиэтиленгликоль (ПЭГ), метилполиэтилен и полиэтилен.

Интеллектуальные липосомы – это липосомы, созданные с учётом определённых внешних и внутренних особенностей человеческого организма. Такие липосомы способны меняться в соответствии с изменениями условий внешней среды и высвобождать ЛВ в определённое время и место в определённом количестве, а также обладают чувствительностью к температуре, кислотной среде, светочувствительностью, магнитной чувствительностью, регулируя высвобождение и направленность доставки препарата.

Классификация липосом по поколениям

Данная классификация главным образом основана на истории развития липосом в качестве транспортного агента ЛВ и важных, революционных показателей прогресса в функционировании липосом. В данном случае сложно предложить единую общепринятую версию.

Липосомы первого поколения. Самые простые и базовые липосомальные структуры: природного происхождения или созданные человеком и заключённые в состоящую из фосфолипидных и холестериновых бислоев оболочку [23]. Их основные функции – снижение токсичности и увеличение эффективности лекарства. Основная часть выпускаемых на рынок липосом относится к данному типу, например: липосомальные формы амфотерицина, липосомальный доксорубицин и липосомальный даунорубицин.

Липосомы второго поколения – это ПЭГ-липосомы поверхностного применения, модифицированные дериватами ФЛ. После модификации липосом увеличивается время нахождения ЛВ в кровотоке, усиливается функция направленного действия препарата. ПЭГ-липосомальный доксорубицин уже вышел на рынок, а многие виды ПЭГ-липосомальных препаратов уже вступили во II и III фазы клинических испытаний.

Липосомы третьего поколения – это ПЭГ-липосомы поверхностного применения, модифицированные дериватами ФЛ с присутствующей в ПЭГ группой направленного действия [39, 128, 144, 151]. В них усилена

функция направленного действия, тем самым заметно повышена эффективность ЛВ. Группа направленного действия способна переносить моноклональные антитела, полисахариды, полипептиды и витамины. Липосомы данного вида также уже вступили во II и III фазы клинических испытаний.

Липосомы четвертого поколения. Путем модификации состава липосомы приобретают функцию направленного действия, способность непрерывно и длительно высвобождать ЛВ, чувствительность к кислотной среде, что очевидно повышает эффективность препарата [71, 176, 185]. Такой тип липосом – с обязательной функцией контроля, называют «интеллектуальными липосомами». Липосомы четвертого поколения находятся на стадии лабораторных исследований.

1.3.4. Методы получения липосом

Методы получения липосом обычно классифицируют по двум основным характеристикам – в зависимости от технологических особенностей и типа получаемых везикул.

1). В зависимости от особенностей технологии выделяют следующие методы:

- ✓ Механические: метод гидратации липидной пленки (пленочный метод), обработка УЗ, экструзия, гомогенизация/микрофлюидизация, дегидратация-регидратация, замораживание-оттаивание;
- ✓ Методы, основанные на замене растворителя: инъекция (или впрыскивание) растворителя, обращение фаз.

2). В зависимости от типа образующихся везикул различают методы, обеспечивающие получение:

- МЛЛ: пленочный метод, обращение фаз, дегидратация-регидратация;
- ММЛ: экструзия, обработка УЗ, гомогенизация/микрофлюидизация, замораживание-оттаивание.

Метод гидратации липидной пленки (пленочный метод)

Пленочный метод является наиболее простым и удобным для получения липосом в условиях лаборатории. Данный способ основан на получении тонкой липидной плёнки, которая формируется при выпаривании растворителя под вакуумом из органического раствора липидов (и ЛВ). Затем плёнку до полного удаления остаточного растворителя высушивают и гидратируют при температуре выше температура фазового перехода ($T_{ф.п}$) липидов с получением дисперсии МЛЛ. Важными параметрами, влияющими на эффективность включения ЛВ и размер МЛЛ, являются интенсивность и продолжительность гидратации; присутствие химических агентов в бислое, стимулирующих появление заряда; концентрация липидов и ионная сила водной среды.. Состав липосом, который получают данным методом, может различаться. Однако использование заряженных ФЛ даёт возможность получить липосомы с меньшим количеством слоёв и меньшего размера в сравнении с липосомами, которые получают на основе незаряженных ФЛ [137].

Обращение фаз

Метод заключается в растворении липидной пленки, полученной плёночным методом, в несмешивающемся с водой органическом растворителе и последующем введении водного раствора. Данную двухфазную смесь обрабатывают УЗ с получением эмульсии типа «вода в масле». Частичное удаление органического растворителя на роторном испарителе приводит к обращению фаз. При дальнейшем удалении органического растворителя наблюдается формирование высококонцентрированной гелеподобной липосомальной дисперсии, которую разводят буфером или водным раствором. Эффективность инкапсуляции ЛВ в методе обращения фаз значительно выше, чем при использовании плёночных методами. Недостатком метода является сложность в полном удалении остаточного органического растворителя.

Дегидратация-регидратация

Полученные методом обращения фаз или плёночным методом МЛЛ лиофилизируют, далее продукт лиофилизации регидратируют водным раствором. В данном случае образуются МЛЛ с высоким уровнем включения ЛВ.

Экструзия

Данный метод заключается в измельчении МЛЛ, полученных одним из представленных выше методов, посредством пропускания под давлением липосомальной дисперсии через мембраны с порами варьируемых размеров (от 1,2 до 0,05 мкм). Средний размер получаемых липосом зависит от диаметра пор используемого фильтра, фильтрующего материала, числа циклов экструзии, концентрации липидов в дисперсии и др. Преимуществами экструзии являются: получение гомогенной дисперсии, незначительное окисление липосомальных ФЛ, возможность регулирования температуры процесса и обеспечение совмещения процесса измельчения липосом и стерилизации дисперсии. Также экструзия благоприятствует более однородному распределению гидрофобного ЛП и холестерина в структуре бислоя [29].

Микрофлюидизация/Гомогенизация

В промышленных масштабах с целью измельчения липосом используют технологии микрофлюидизации и гомогенизации. Если сравнивать с микрофлюидайзером, где поток водной среды выбрасывается и в последующем смешивается в интерактивной камере, гомогенизаторы работают по другому принципу. Жидкий образец в гомогенизаторе под высоким давлением продавливается через отверстие и затем ударяется о стенку, выполненной из нержавеющей стали. Циркулирование дисперсии под влиянием высокого давления по системе гомогенизатора в течение определенного периода времени приводит к постепенному снижению размера липосом [7].

Обработка УЗ

Формирование ММЛ из МЛЛ в процессе обработки УЗ происходит за счет явления кавитации [101]. С помощью УЗ получают небольшие объёмы дисперсий, поскольку данный метод является весьма энергозатратным и требует большого количества времени. Критическими факторами озвучивания липосом являются размер образца и его расположение в УЗ-ванне, что затрудняет получение воспроизводимых результатов. Под влиянием УЗ образуется гетерогенная дисперсия с наличием крупных остаточных везикул. На размер получаемых везикул влияют следующие факторы: концентрация холестерина, фосфолипидный состав, температура процесса, частота УЗ и время обработки [113,122,140]. Липосомы, которые были получены в результате обработки УЗ, обладают диаметром меньше 40 нм и являются нестабильными, вследствие высокой степени кривизны мембраны везикул. Липосомы спонтанно сливаются при температуре хранения ниже $T_{ф.л.}$, тем самым формируя частицы с большим диаметром (от 60 до 80 нм) [131]. Таким образом, полученные в результате УЗ обработки липосомы следует хранить при комнатной температуре в защищённом от света месте.

Инъекция

В качестве альтернативы УЗ с начала 70-х гг. XX-го века для получения дисперсии ММЛ стали применять метод инъекции [25]. Для получения ММЛ в перемешиваемый водный раствор быстро впрыскивают спиртовой раствор ФЛ. В данном случае размер везикул зависит от скорости впрыскивания, а также концентрации ФЛ и спирта. Для формирования везикул с малым диаметром требуется, чтобы концентрация ФЛ не была выше 40 мМ, а конечная концентрация спирта в дисперсии не должна превышать 7,5 %. Недостатком метода является наличие остаточного спирта в дисперсии ММЛ.

Замораживание-оттаивание

Нужное количество раз полученные ранее МЛЛ замораживают в жидком азоте и затем размораживают на водяной бане (при температуре ~ 40 °С). По завершении процедуры получают однородные по размеру ММЛ, обладающие стабильным бислоем при комнатной температуре.

1.3.5 Загрузка лекарственного вещества в липосомы

ЛЛФ используются при лечении онкологических, инфекционных и др. заболеваний, в диагностике для визуализации очагов поражения, сосудистых систем и т.п. В этих случаях очень важно достичь максимальной эффективности загрузки липосом лекарственными или диагностическими субстанциями. Как правило, для введения в организм используют липосомы размером ≤ 100 нм для уменьшения захвата липосом клетками РЭС и увеличения эффекта «пассивного нацеливания». Степень включения полярных веществ в такие липосомы невелика (≤ 20 %). Как следствие, низкой оказывается и удельная загрузка липосом, т.е. соотношение внутрелипосомной субстанции/липиды. Чтобы увеличить удельную загрузку, липосомы получают в более концентрированных растворах субстанции или загружают вещество в липосомы с помощью ионных градиентов (активная загрузка). Увеличение концентрации ограничено растворимостью вещества, кроме того, эффективность включения вещества при этом не изменяется, что приводит к повышению себестоимости препарата. Таким образом, предпочтительнее использовать методики активной загрузки. Часто для активной загрузки липосом слабыми основаниями используют трансмембранный протонный градиент, но, как правило, градиент рН нестабилен во времени, что приводит к высвобождению содержимого везикул в течение нескольких часов и даже минут. Кроме того, градиент рН не может быть использован для концентрирования веществ, нестабильных в кислотных или щелочных средах. [12]

Активную загрузку слабых амфифильных оснований в липосомы можно осуществить с помощью ионных градиентов неорганических солей аммония. Градиент концентраций соли между внутренним и внешним объемами липосомальной дисперсии образуется при удалении соли из внешней среды. Ионный градиент, создаваемый сульфатом аммония, стабилен во времени, не требует изменения pH внешней среды, а также подходит для липосом различного состава и независимо от метода их получения. Действующая сила градиента $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ обусловлена значительной разницей в коэффициентах проницаемости через липидный бислой (P) для различных соединений и ионов: $P(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 < P\text{SO}_4^{2-} < P\text{NH}_4^+ \ll P\text{H}^+ \lll P\text{NH}_3$. Очень высокий коэффициент проницаемости для молекулы аммиака ($P \sim 0.13$ см/с) приводит к быстрой диффузии нейтральных молекул NH_3 , образующихся при диссоциации катионов аммония во внутрилипосомном пространстве. Диффузия аммиака из липосом по градиенту концентраций (в начальный момент концентрация NH_3 вне липосом пренебрежимо мала) приводит к понижению pH во внутреннем объеме липосом. В свою очередь загружаемое основание в нейтральной форме способно проникать через бислой. Однако, приобретая положительный заряд в кислой среде внутреннего объема липосом, оно почти полностью теряет эту способность, т.к. коэффициент проницаемости для заряженной молекулы значительно меньше, чем для незаряженной. Кратко этот процесс можно описать как обмен через мембрану аммиака и загружаемого основания (антипорт). В зависимости от концентрации липидов и активного вещества, а также константа распределения (Kp) загружаемого основания эффективность загрузки меняется от 40 до 99 %.

[12]

Для загрузки слабых кислот можно использовать градиент ацетата кальция; в этом случае движущей силой активной загрузки является антипорт уксусной кислоты и загружаемой слабой кислоты.

1.3.6. Стабилизация липосом лиофилизацией

При хранении стабильность липосом увеличивается благодаря применению лиофилизации (сублимационной сушки), что базируется на удалении воды, которая вызывает гидролиз ФЛ; физическая и химическая деградация липосом невозможна из-за низкой молекулярной подвижности в твёрдой фазе [18,133].

В присутствии особенных защитных веществ проводят процесс лиофилизации – криопротекторов. Без криопротекторов сублимационная сушка липосом ведёт к их слиянию и дальнейшей агрегации [90]. Через следующие механизмы своё защитное действие проявляют криопротекторы[37]:

Взаимодействие с фосфолипидами. Водородные связи с фосфатным фрагментом ФЛ (головные группы) образуют гидроксильные группы молекул сахара (криопротектора) на стадии сушки и соответственно замещают воду [45,46].

Образование матрицы. Аморфная матрица, которая препятствует слиянию и повреждению бислоя при формировании кристаллов, образуется между везикулами. Формирование матрицы связано с тем, что во время замораживания концентрируется раствор сахара, а сахарная матрица, обладающая низкой подвижностью и большой вязкостью, предохраняет везикулы от агрегации, слияния, защищает от повреждения кристаллами льда липидный слой при замораживании, формируется во время сушки. К тому же, наличие матрицы ингибирует конформационные изменения, которые связаны с фазовым переходом липидов, а взаимодействие между матрицей и поверхностью липосом снижает поверхностное натяжение, тем самым стабилизируя высушенные липосомы [94,125].

Криопротекторы эффективны тогда, когда они присутствуют не только снаружи, но и внутри липосом в концентрации больше 2,5%.

Дисахариды (лактоза, трегалоза и сахароза) являются самыми предпочтительными криопротекторами в сравнении с моносахарами (глюкоза). Для того чтобы обеспечить защиту липосом при лиофилизации сахара, подобные сахарозе и трегалозе, должны быть в концентрации 5-20% [132].

1.3.7. Стерилизация

ЛЛФ-лио, как и другие ЛФ, использующиеся для инъекции, должны быть стерильны. Можно в асептических условиях получать ЛЛФ, но это дорогостоящая и сложная процедура. Традиционные методы стерилизации, а именно автоклавирование, являются неэффективными и ведут к значительному нарушению структуры липосом. Для стерилизации липосом также предпринимались попытки. Тем не менее облучение растворов липидов и суспензий липосом гамма-лучами в широком диапазоне доз и электронами приводило к нарушению их структуры, агрегации, изменению формы пиков фазовых переходов и ПОЛ. Следовательно, была рассмотрена возможность криорадиационной стерилизации липосом. Данный метод, который был ранее разработан для широкого класса растворов препаратов, включает в себя облучение стерилизующей дозой в замороженном состоянии, замораживание системы и размораживание. С липосомами препарата связана биологическая активность, которая подвергнута облучению стерилизующей дозой в замороженном состоянии, и является неизменной. Все главные показатели системы представляют собой дисперсный состав, отсутствие продуктов ПОЛ и содержание ЛП, которые связаны с липосомами, при облучении дозами до 30 КГР полностью сохраняются, обеспечивают нужную надёжность стерильности. [17]. Для липосомальных дисперсий в большинстве случаев тем не менее используют через мембраны фильтр с размером пор 0,45 и 0,22 мкм стерилизующую фильтрацию. [3,13]

1.3.8. Контроль качества ЛЛФ

На следующие три группы можно разделить качественные показатели:

I – показатели, которые характеризуют индивидуальные свойства вспомогательных и действующих веществ;

II – показатели качества, которые характеризуют готовую форму препарата (величина рН, стерильность, пирогенность, токсичность);

III – показатели, которые характеризуют свойства липосом (размер везикул, включение ЛВ, дзета-потенциал и пр.) [8].

Испытания должны касаться таких свойств продукта, которые подвергаются изменениям при хранении и могут вполне влиять на качество готового препарата. К тому же, стабильность должны характеризовать методы количественного определения.

Необходимо уделять особое внимание свойствам и структуре новых продуктов, которые образуются при разложении компонентов препарата. Новые продукты разложения в таком случае нужно квалифицировать. Так, к примеру, должны быть указаны и идентифицированы граничные количества примесей, которые образуются, например, для фосфатидилхолина (свободные жирные кислоты и лизопродукты) [7].

Испытания должны указать на те свойства, которые при технологии получения препаратов или при их хранении подвержены изменению, и могут влиять на качество липосомальных препаратов, их безопасность применения и эффективность. Разработка метода определения количества, включённого в липосомы ЛВ, является важным вопросом, к тому же данные определения должны проводиться не только в процессе изготовления липосом и их лиофилизации, но и при хранении препарата на

протяжении срока его годности. Данный вопрос должен для каждого вида липосом решаться непосредственно разработчиком препарата. В таком случае валидация аналитических методов считается обязательным условием его применения.

Испытание на механические включения можно отнести к одному из проблемных вопросов (посторонние частицы). Их определение весьма затруднительно. Это связано с тем, что, во-первых, препарат представляет собой окрашенную эмульсионную жидкость. Во-вторых, препарат лиофилизирован, требует высокого качества укупочных материалов и стекла, класса чистоты при производстве препарата и его розливе (класс А) [8].

Одним из главных требований к препаратам парентерального введения считается отсутствие пирогенности. Если принимать во внимание пирогенные вещества, то в большинстве случаев, они являются бактериальными липополисахаридами и также обладают сильной устойчивостью к нагреванию (лишь при длительной обработке разрушаются, а именно при температуре более 200°C), получение липосомальных препаратов, от липидной субстанции до готового препарата, требуется выполнять в условиях асептики, что предотвращает загрязнение материалов не только микроорганизмами, но и продуктами их жизнедеятельности. При учёте данных факторов из-за невозможности применения термической обработки отдельных компонентов формируемых липосом. Стоит использовать при изготовлении липосомных препаратов апиригенные и стерильные составляющие: воду для инъекций, липидные субстанции, стабилизаторы [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные представления о значении гормонов гипоталамуса в развитии гормонозависимых опухолей послужили основанием для поиска принципиально новых противоопухолевых веществ среди аналогов соматостатина. Механизм их противоопухолевого действия основан на ингибировании секреции ряда белковых и стероидных гормонов, участвующих в пролиферации опухолевых клеток. Этот механизм реализуется через специфические рецепторы, высокая экспрессия которых широко представлена на клетках ряда злокачественных опухолей.

Цифетрилин – один из аналогов соматостатина, синтезированный в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В исследованиях *in vivo* цифетрилин подавляет секрецию СТГ, пролактина и инсулина. Показана противоопухолевая активность цифетрилина на перевиваемых моделях опухолей мышей: Са-755 (аденокарциноме молочной железы), РМ-1 (раке молочной железы человека), РШМ-5 (раке шейки матки), LLC (эпидермоидной карциноме легкого Льюис) и крыс: R-3327-Н (аденокарциноме предстательной железы) и ДМБА-индуцированных опухолях молочной железы.

В связи с доказанной эффективностью цифетрилина при его пероральном применении, а также из-за его плохой растворимости в воде в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России создана таблетированная ЛФ цифетрилина «Цифетрилин, таблетки 6 мг».

Поскольку цифетрилин не растворим в воде, для создания инъекционной ЛФ в качестве способа солюбилизации данного вещества предложено его включение в липосомы. Преимуществами ЛЛФ заключаются в защите здоровых клеток от токсического действия ЛВ, а включенной субстанции от деградации в условиях организма, пролонгировании действия ЛВ; селективном накоплении в области

поражения; возможности создания водорастворимой ЛФ для ряда гидрофобных препаратов и увеличении тем самым их биодоступности. При разработке ЛЛФ требуется детальное научное теоретическое и практическое обоснование всех технологических параметров: выбор оптимального состава и метода получения липосом, способа стерилизации и стабилизации липосомальной дисперсии и т.п.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Материалы и реактивы

При проведении технологических и химико-фармацевтических исследований ЛЛФ-лио цифетрилина использовали химические субстанции и реактивы, которые соответствовали требованиям нормативной документации (ГОСТов, ТУ, фармакопейных статей ГФ XIII, Ph Eur 8.0, USP30-NF25).

Действующее вещество:

Цифетрилин – белый или белый со слабым желтоватым оттенком кристаллический порошок без запаха с температурой плавления в пределах 121–125 °С; практически нерастворим в воде, очень мало растворим в разбавленных минеральных кислотах и щелочах, мало растворим в спирте этиловом 95 % и ацетоне, растворим в хлороформе. Молекулярная масса (М) = 1016,2 г/моль.

Компоненты липосомальной мембраны:

Яичный фосфатидилхолин Е РС S (Lipoid, Германия) (ЯФХ) – порошок белого цвета с желтоватым оттенком; растворим в хлороформе, метаноле, этаноле, толуоле, эфире; не растворим в воде и ацетоне. М = 751 г/моль.

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

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

Криопротекторы:

Сахароза, ГОСТ 5833-75 (Химмед, Россия);

Трегалоza-D дигидрат ОСЧ (Химмед, Россия);

Лактоза безводная Ph Eur (Sigma-Aldrich GmbH, Германия);

Глюкоза моногидрат, ГОСТ 975-88 (Химмед, Россия);

Растворители:

Аммиак водный 25 % ОСЧ, ГОСТ 24147-80 (Химмед, Россия);

Ацетон ЧДА, ГОСТ 2603-79 изм. 1, 2 (Химмед, Россия);

Вода очищенная, ФС.2.2.0019.15;

Вода для инъекций, ФС.2.2.0020.15;

n-Бутанол ЧДА, ГОСТ 6006-78 (ЗАО ЭКОС-1, Россия);

Ледяная уксусная кислота ХЧ, ГОСТ 61-75, изм. 1-3 (ЗАО «Мосреактив», Россия);

Метанол ХЧ, ГОСТ 6995-77 (Химмед, Россия);

Пропанол-2 (изопропиловый спирт) ОСЧ, ТУ-6-09-07-1718-91 (Химмед, Россия);

Спирт этиловый 95 %, ФС.2.1.0036.15 (ЗАО «Брынцалов-А» Ферейн, Россия);

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

Этилацетат (этиловый эфир уксусной кислоты) ХЧ, ГОСТ 22300-76 (Химмед, Россия).

Иные реактивы:

α -Токоферола ацетат, раствор масляный 30 % (Марбиофарм, Россия);

Калия перманганат ЧДА, ГОСТ 20490-75 (изм. 1, 2, 3) (Химмед, Россия)

Йод кристаллический Ч, ГОСТ 4159-79 (Химмед, Россия);

Кислота серная «ОСЧ 11-5», ГОСТ 14262-78 (ООО «Сигма Тек», Россия);

Соляная кислота концентрированная ОС.Ч. «20-4», ГОСТ 14261-77 (ООО «Сигма Тек», Россия);

Тиобарбитуровая кислота, ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, Co., Германия);

Трихлоруксусная кислота Ph. Eur. (AppliChem Panreas, Германия).

Вспомогательные материалы для фильтрации и экструзии:

Нейлоновые мембранные фильтры «Pall» N66 диаметром 25, 47 и 90 мм и размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (ООО Палл Евразия, Россия);

Поликарбонатные мембранные фильтры «Nuclepore» диаметром 25, 47 и 90 мм и размером пор 0,2 мкм (Whatman, Великобритания);

Фильтр из сложных эфиров целлюлозы диаметром 25 и 47 мм и размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore, Ирландия).

Вспомогательные материалы для проведения ТСХ:

Пластинки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (Россия). Тип сорбента – силикагель СТХ-1ВЭ. Зернение – 8–12 мкм. Толщина слоя – 100 мкм. Связующее вещество – силиказоль. Тип подложки – алюминий. Размер пластин – 10 × 15 см.

Стеклянная камера с крышкой для ТСХ-анализа размером 17,5 × 6,5 × 18,5 см (Россия).

Вспомогательные материалы для спектрофотометрии:

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

2.2. Оборудование

Весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия);

Весы лабораторные DL-120 (AND, Япония);

Весы лабораторные GF-600 (AND, Япония);

Испаритель роторный Heidolph Hei-VAP Advantage (Heidolph, Германия);

Ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия);

Экструдеры Lipex™ Thermobarrel Extruder 10, 100 и 800 мл (Northern Lipids Inc., Lipex Biomembranes, Inc., Канада);

Гомогенизатор Microfluidizer M-110S (Microfluidics, США);

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

Наносайзер Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США);

Электронный микроскоп марки JEM-100CX (JEOL, Япония)

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

Сублимационная сушка «Edwards Minifast DO.2» (Ero Electronic S.p. A., Италия);

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

Стерилизатор сухожаровой Binder ED (Binder, Германия);

Полуавтомат ПЗР-34-ВИПС-МЕД для укупорки флаконов колпачками К-2-20 и К-3-34 (ООО «Фирма «ВИПС-МЕД», Россия);

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

2.3. Методы исследований

2.3.1. Получение липосом

А. Получение липосом с цифетрилином

Навески цифетрилина и ингредиентов липосомального бислюя – ЯФХ, холестерин и ПЭГ-ДГФА растворяли в хлороформе. Полученный раствор фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр «Pall» с размером пор 0,22 мкм, переносили в круглодонную колбу и упаривали на роторном испарителе при температуре водяной бани 37 ± 1 °С в условиях низкого давления до образования полупрозрачной липидной пленки. Для удаления остаточного растворителя пленку досушивали под вакуумом (120–150 мбар) до постоянной массы и гидратировали с получением дисперсии МСЛ цифетрилина, которую фильтровали под давлением через фильтры с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм. Для получения ОСЛ профильтрованную дисперсию экструдировали, многократно пропуская через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2–0,22 мкм (нейлоновые, поликарбонатные и фильтры из сложных эфиров целлюлозы), гомогенизировали на микрофлюидайзере или обрабатывали в УЗ-ванне.

Б. Получение «пустых» липосом

«Пустые» липосомы получали аналогично липосомам с цифетрилином, но без добавления в хлороформный раствор ЛВ.

2.3.2. Стерилизация липосомальной дисперсии цифетрилина

Так как ЛЛФ цифетрилина предназначена для инъекции, к ней предъявляется требование стерильности. Для стерилизации липосомальной дисперсии цифетрилина применяли метод фильтрации под давлением с использованием стерилизующих мембранных фильтров с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм (пред- и стерилизующая фильтрация).

2.3.3. Получение лиофилизированных липосом Цифетрилина

Для повышения стабильности и увеличения срока хранения ЛЛФ цифетрилина предложен метод сублимационной сушки.

Основной задачей этапа лиофилизации ЛЛФ цифетрилина являлись выбор режима лиофилизации и криопротектора, которые бы обеспечивали получение лиофилизата надлежащего качества, стабильного в течение длительного срока хранения. Криопротектор вводили в липосомальную дисперсию цифетрилина в этапе гидратации пленки.

Для определения эвтектической температуры цифетрилина использовали термический способ, в основе которого лежит фиксирование температуры образца, замороженного ниже эвтектической точки, в процессе медленного оттаивания.

Выбор оптимального режима сублимационной сушки липосомального цифетрилина проводили на основании сравнительного анализа двух способов лиофилизации – с «медленным» (1) и «быстрым» замораживаем (2) [3, 13].

При комнатной температуре (+20~+25 °С) липосомальную дисперсию цифетрилина дозировали в стерильные флаконы по 6,0 мл и помещали в камеру сублимационной сушки.

1 – Режим лиофилизации с «медленным» замораживаем. На первоначальном этапе охлаждали полки до $-15\sim-17$ °С. После достижения заданной температуры препаратом выдерживали его при таких условиях в течение 50 мин. Весь этап длится 2,5~3 ч. Второй этап состоял в доведении значений температуры полок и препарата до $-25\sim-27$ °С и также выдерживанием на протяжении 50 мин. Этап длился 1,5~1,8 ч. Третий этап состоял из понижения температуры полок и препарата до $-35\sim-37$ °С и такую температуру поддерживали 40 минут. Общее время этапа составило 1,3~1,6 ч. На четвёртом этапе температуру полок доводили до $-45\sim-47$ °С. После достижения ($1,3\sim1,6$ ч) и уравнивания минимальной температуры продукта флаконы с препаратом выдерживали в течение 3 ч, далее начинали откачку воздуха из камеры сублимационной установки. После включения вакуумного насоса и выравнивания вакуума осуществляли: нагрев полок до температуры -20 °С со скоростью $+5$ °С/ч; выдерживание полок на температуре -20 °С в течение 2 ч; нагрев полок до температуры -10 °С со скоростью $+3$ °С/ч; нагрев полок до комнатной температуры $+20\sim+22$ °С со скоростью $+5$ °С/ч. Далее препарат досушивали для удаления остаточной влаги около 3 ч по критерию неизменности остаточного давления паров в сублимационной камере при перекрывании вакуумной магистрали. Общее время лиофилизации препарата составило приблизительно 32 ч.

2 – Режим лиофилизации с «быстрым» замораживанием. На первоначальном этапе охлаждали полки и препарат сублимационной сушки до -45 °С в течение 2 ч. После достижения заданной температуры на препарате выдерживали в течение 3 ч (стадия замораживания). Затем включали вакуум в камере. После выравнивания температуры и вакуума (около 3 ч) начинали сублимационную сушку, поднимали температуру от -45 до $+20$ °С со скоростью 5 °С/ч (сублимационная сушка). После

достижения на препарате температуры +20 °С выдерживали при этой температуре в течение 3 ч (досушивание). Общее время сублимационной сушки составило 24 ч.

2.3.4. Методы анализа ЛЛФ и ЛЛФ-лио цифетрилина

– Количественное определение цифетрилина в липосомах до и после лиофилизации

Содержание цифетрилина в липосомах определяли методом спектрофотометрии в УФ- и видимой областях с применением рабочего стандартного образца (СО) цифетрилина при длине волны (282 ± 2) нм. При разработке методики количественного спектрофотометрического анализа ЛФ цифетрилина руководствовались ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях» [2]. Методика количественного анализа липосомального цифетрилина представлена в разделе собственных исследований 4.2.3.

– Методика определения «количества включенного препарата» (КВП)

Цифетрилин – гидрофобное вещество, поэтому количество препарата определяли посредством фильтрования стерильной липосомальной дисперсии через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм. КВП рассчитывали, как отношение концентрации цифетрилина в липосомальной дисперсии после фильтрации ($C_{\text{ф}}$) к его содержанию в дисперсии, полученной после гидратации липидной плёнки ($C_{\text{п}}$). Показатель выражался в процентах:

$$\text{КВП} = C_{\text{ф}} / C_{\text{п}} \times 100 \%$$

– Качественный анализ ЛЛФ-лио цифетрилина

Идентификацию компонентов ЛЛФ-лио проводили с использованием метода тонкослойной хроматографии. При разработке методики хроматографического анализа ЛФ цифетрилина

руководствовались ОФС.1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография» и ГОСТ 28366-89 «Реактивы. Метод тонкослойной хроматографии». Методика качественного хроматографического анализа ЛЛФ-лиоцифетрилина представлена в разделе собственных исследований 4.2.1.

– ***Определение размера липосом цифетрилина***

Автоматической пипеткой отмеривали 100 мкл исследуемого образца свежеприготовленных липосом или ЛЛФ-лиоцифетрилина после регидратации (спустя 10 мин после регидратации), помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили водой до метки. Разведенный образец переносили в стеклянную кювету, которую помещали в ячейку анализатора и проводили измерение.

– ***Определение формы липосом с использованием электронной микроскопии***

Образец наносили на коллодиево-угольную плёнку-подложку, затем контрастировали 1 % с помощью раствора уранил ацетата и далее просматривали на электронном микроскопе марки с разрешением во время сканирования 1200 dpi, увеличивая в 20000 раз. Для точного подсчета увеличения использовали фото частиц латекса, имеющих средний диаметр 109 ± 3 нм.

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

Значение pH в липосомальной дисперсии измеряли, не разбавляя. С целью определения pH лиофилизата к нему добавляли 10 мл воды и проводили измерение, предварительно измерив значение pH воды. Все измерения осуществлялись в интервале температур от 20 до 25 °С.

– ***Определения концентрации малонового диальдегида по реакции с тиобарбитуровой кислотой***

Определяли концентрации малонового диальдегида (МДА, конечного продукта перекисного окисления ФЛ) по реакции с 2-тиобарбитуровой

кислотой (ТБК). С целью анализа применяли деионизированную воду ввиду того, что данный метод весьма чувствителен к наличию в образце ионов двухвалентных металлов. Анализ проводили по методике, представленный в разделе 3.1.2.

Приготовление реагента

Отмерили 0,67 г ТБК и 15,00 г трихлоруксусной кислоты (ТХУК), затем растворяли в 100 мл деионизированной воды, затем раствор, который получали, нагревали на водяной бане с целью растворения твердых веществ.

Проведение анализа

0,5 мл образца, подвергшийся анализу, помещали в чистую пробирку (а именно, лиофилизат или липосомальную дисперсию, который растворяли в 5,3 мл воды) и 3,0 мл смеси ТБК и ТХУК, перемешивали и в дальнейшем нагревали на водяной бане на протяжении 30 мин. Оптическую плотность раствора, который получали, измеряли относительно смеси ТБК и ТХУК при 532 и 580 нм и далее производили расчёт содержания в пробе МДА (нмоль/мл) согласно формуле:

$$C = (A_{532} - A_{580}) \times 6 \times 1000 / 155,$$

здесь A_{532} – оптическая плотность образца при длине волны 532 нм; A_{580} – оптическая плотность образца при длине волны 580 нм; **6** – коэффициент разведения образца; **155** – коэффициент молярной экстинкции МДА-ТБК₂, мл/(мкмоль·см).

– Определение потери в массе при высушивании

Потерю в массе при высушивании (влажность) определяли, руководствуясь ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» [2]. Результат выражали в виде массовой доли в процентах.

Для анализа точную навеску препарата (0,5 г) помещали в предварительно высушенный и взвешенный бюкс и сушили до постоянной массы в вакуумном сушильном шкафу над пятиокисью фосфора при комнатной температуре и остаточном давлении 5 мм рт.ст.

2.3.5. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных в ходе эксперимента данных проводили в программах Excel, Origin 6.1, руководствуясь ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 3. Разработка состава и технологии получения ЛЛФ-лиоцифетрилина

3.1. Разработка состава ЛЛФ цифетрилина

3.1.1. Выбор оптимального состава ЛЛФ цифетрилина

Выбор компонентов для создания ЛЛФ цифетрилина основывался на их функциональном назначении. В качестве основного компонента, формирующего мембрану липосом, использовали ЯФХ, что объясняется наличием у него таких положительных с технологической и биологической точек зрения свойств как приемлемая $T_{ф.л.}$ (+37 °С), хорошая растворимость в органических растворителях, биосовместимость и природное происхождение. Холестерин вводили в состав липосом для придания бислою необходимого уровня жёсткости и повышения стабильности получаемых фосфолипидных везикул в кровотоке. Для создания stealth-липосом цифетрилина в его состав вводили фосфатидилэтаноламин, конъюгированный с гидрофильным полимером, – ПЭГ-ДГФА.

На основании указанных липидов, получали и исследовали модельные составы ЛЛФ цифетрилина с различными молярными соотношениями компонентов прописи с учетом наличия у него гидрофобных свойств. Для приготовления липосом цифетрилина по каждому исследуемому составу применяли «пленочный» метод. Липидную пленку гидратировали водой для инъекций с образованием липосомальной дисперсии с концентрацией цифетрилина 1,0 мг/мл, которую затем экструдировали с использованием нейлоновых и поликарбонатных фильтров.

Качество липосомальных дисперсий цифетрилина, приготовленных по модельным составам, оценивали по следующим основным показателям – средний размер везикул после экструзии и уровень включения активного вещества в липосомы (КВП, %) (Таблица 5). В связи с тем, что за счет особенностей строения стенки опухолевых сосудов в ней преимущественно накапливаются частицы, имеющие диаметр порядка 100–200 нм, данные размеры приняты в качестве оптимальных.

Таблица 5.

Модели составов липосомальной лекарственной формы цифетрилина

№ состава	Молярные соотношения		Размер после экструзии, нм	КВП, %
	цифетрилин/ЯФХ	ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДГФА		
1	1 : 33	1 : 0,4 : 0,028	осадок	-
2	1 : 44		155 ± 8	72 ± 2
3		1 : 0,2 : 0,014	150 ± 10	79 ± 1
4		1 : 0,14 : 0,009	157 ± 10	65 ± 3
5	1:66	1 : 0,3 : 0,019	192 ± 6	78 ± 1
6		1 : 0,2 : 0,014	191 ± 6	88 ± 1
7		1 : 0,14 : 0,009	192 ± 6	82 ± 1
8	1:70	1 : 0,2 : 0,014	180 ± 6	97 ± 1
9		1 : 0,14 : 0,014	190 ± 6	89 ± 1
10		1 : 0,1 : 0,014	196 ± 6	82 ± 1
11	1:75	1 : 0,2 : 0,014	192 ± 6	80 ± 2

Примечания: ЯФХ – яичный фосфатидилхолин, Хол – холестерин, ПЭГ-ДГФА – полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин, КВП – количество включенного препарата

Первоначально исследовали модельный состав с молярными соотношениями цифетрилин/ЯФХ = 1 : 33 и ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДГФА = 1 : 0,4 : 0,028. В результате после отстаивания липосомальной дисперсии наблюдали образование осадка, что свидетельствует о низком уровне включения цифетрилина. Поскольку цифетрилин связывается непосредственно с главным формирующим компонентом бислоя – ЯФХ,

далее увеличили содержание данного компонента в ЛФ до соотношения цифетрилин/ЯФХ = 1 : 44 (составы 2–4). После экструзии дисперсии МСЛ, приготовленной с использованием состава 2, получены везикулы со средним размером 155 нм, а включение цифетрилина оказалось недостаточно высоким – 72 %. При снижении доли Хол и ПЭГ-ДГФА относительно фосфотидидхолина до соотношения ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДГФА = 1 : 0,2 : 0,014 (состав 3) позволило увеличить инкапсулирование цифетрилина до 79 %, однако дальнейшее уменьшение содержания Хол и ПЭГ-ДГФА в составе 4 способствовало ухудшению качества липосом – наблюдалось образование более крупных везикул при экструзии и значительному снижению включения в среднем до 65 %.

Далее постепенно повышали общее содержание липидов в ЛФ относительно цифетрилина, при этом изменяя как молярные соотношения цифетрилин/ЯФХ, так и ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДГФА. С ростом концентрации липидных компонентов, главным образом фосфотидилхолина, наблюдали образование везикул диаметром 180 нм и более, что обусловлено повышением вязкости липосомальной дисперсии и тем самым затрудненным процессом фильтрации и экструзии. Однако повышение концентрации липидов в прописи позволило значительно сократить потери ЛВ при фильтрации, увеличив инкорпорирование цифетрилина в липосомы с 79 (состав 3) до 97 % (состав 8). При этом отмечалось, что изменение доли холестерина и ПЭГ-ДГФА относительно фосфотидилхолина в соотношении ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДГФА = 1 : 0,2 : 0,014 как в сторону увеличения (состав 5), так и в сторону уменьшения (составы 7, 9 и 10), способствовало снижению уровня включения цифетрилина и укрупнению везикул.

В результате из всех исследуемых моделей с приемлемым размером везикул (180 ± 6 нм) и минимальными потерями цифетрилина в результате фильтрации и экструзии, а соответственно с самым высоким количеством включенного ЛВ в липосомы (97 ± 1), для получения ЛЛФ был выбран

состав 8 с молярными соотношениями компонентов цифетрилин/ЯФХ = 1 : 70 и ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДФФА = 1 : 0,2 : 0,014.

3.1.2. Введение антиоксиданта в состав ЛЛФ цифетрилина

ФЛ, содержащие ненасыщенные связи, в частности фосфотидилхолин, в процессе хранения и при приготовлении ЛФ с их использованием подвергаются перекисному окислению. Изменение структуры и свойств природных липидов вследствие естественного окисления приводит к дестабилизации структуры формируемых из них липосом и к затруднению включения активной субстанции в липидный бислой или во внутреннее пространство липидной везикулы. При окислении ненасыщенных липидов происходит перегруппировка двойных связей в диеновую конъюгированную систему; конечным продуктом перекисного окисления является малоновый диальдегид. Для предотвращения и замедления ПОЛ в состав ЛЛФ вводят специальные вещества – антиоксиданты (АО), например, витамин Е (α -токоферол, V_E), С (аскорбиновая кислота) [8].

Для оценки влияния АО на качество ЛЛФ цифетрилина проводили исследование по сравнению содержания МДА в липосомальных дисперсиях, приготовленных с введением в состав ЛФ α -токоферола ацетата и без него. Масляный раствор α -токоферола добавляли к хлороформному раствору компонентов ЛФ до его упаривания на роторном испарителе в молярных соотношениях V_E /ЯФХ 1:60, 1:30 и 1:20.

Содержание МДА в пробах определяли по методике, представленной в разделе 2.3.4. Результаты исследования приведены в таблице 6.

Согласно полученным данным добавление АО не оказало должного влияния на ПОЛ липидов в ЛЛФ цифетрилина: разница концентраций МДА в образцах ЛЛФ с использованием АО и без него незначительна. При приготовлении липосомальной дисперсии без добавления α -токоферола концентрация МДА составила значение 15,20 нмоль/мл. При введении в

состав ЛФ АО в молярном соотношении $V_E/YФХ$ 1 : 60 отмечалось увеличение концентрации МДА до 19,46 нмоль/мл, а 1 : 30 – до 15,61 нмоль/мл. Вероятно, АО в данных случаях не способствует снижению окислительного процесса липидов, а наоборот приводит к повышению скорости ПОЛ. Антиоксидантное действие α -токоферола наблюдалось при добавлении в ЛФ в соотношении $V_E/YФХ$ 1 : 20, поскольку определяемая концентрация МДА оказалась наименьшей – 13,24 нмоль/мл. Однако было замечено, что с ростом содержания масляного раствора α -токоферола в ЛФ затрудняется технологический процесс получения липосомальной дисперсии цифетрилина – значительно снижается скорость гидратации липидной пленки и последующей экструзии.

Таблица 6.

Концентрация МДА в образцах ЛЛФ цифетрилина

Состав		№ образца	D ₅₃₂	D ₅₈₀	ΔD	С	Метрологические характеристики (P = 95%, $t_{p,f} = 2.78$)
№	Молярное соотношение $V_E/YФХ$						
1	Без витамина Е	1	0,545	0,150	0,395	15,29	n = 5, f = 4, $x_{cp.} = 15,20$, $S^2 = 0,061$, S = 0,0779, $Sx_{cp} = 0,0349$, $S_n = 0,0051$, $\Delta x = 0,0968$, $\varepsilon = 0,64$ %
		2	0,430	0,040	0,390	15,10	
		3	0,436	0,042	0,394	15,25	
		4	0,433	0,040	0,393	15,21	
		5	0,437	0,046	0,391	15,14	
2	1:60	1	0,610	0,083	0,527	20,40	n = 5, f = 4, $x_{cp.} = 19,46$, $S^2 = 0,667$, S = 0,8164, $Sx_{cp} = 0,3651$, $S_n = 0,042$, $\Delta x = 1,015$, $\varepsilon = 5,22$ %
		2	0,481	0,002	0,479	18,54	
		3	0,593	0,071	0,522	20,21	
		4	0,599	0,102	0,497	19,24	
		5	0,576	0,088	0,488	18,89	
3	1:30	1	0,518	0,116	0,402	15,56	n = 5, f = 4, $x_{cp.} = 15,61$, $S^2 = 0,678$, S = 0,8234, $Sx_{cp} = 0,3682$, $S_n = 0,053$, $\Delta x = 1,024$, $\varepsilon = 6,56$ %
		2	0,476	0,078	0,398	14,41	
		3	0,489	0,063	0,426	16,49	
		4	0,539	0,135	0,405	15,68	
		5	0,492	0,081	0,411	15,91	
4	1:20	1	0,617	0,282	0,335	12,97	n = 5, f = 4, $x_{cp.} = 13,24$, $S^2 = 0,1816$, S = 0,4261, $Sx_{cp} = 0,1906$, $S_n = 0,032$, $\Delta x = 0,53$, $\varepsilon = 4,00$ %
		2	0,500	0,159	0,341	13,20	
		3	0,468	0,120	0,348	13,47	
		4	0,629	0,276	0,353	13,66	
		5	0,606	0,268	0,333	12,89	

Таким образом, поскольку исследованный АО практически не оказывает протекторного действия в отношении липосомальных липидов, а также отрицательно влияет на технологический процесс получения препарата, сделан вывод о нецелесообразности включения α -токоферола в состав ЛЛФ цифетрилина.

3.2. Разработка технологии получения ЛЛФ-лио цифетрилина

Технология получения липосомального цифетрилина включает следующие основные критические стадии, особенности разработки которых рассмотрены в данной работе:

1. Получение липидной пленки из органического раствора компонентов ЛФ.
2. Гидратация липидной пленки с формированием дисперсии МСЛ.
3. Фильтрация дисперсии МСЛ и получение ОСЛ приемлемого размера.
4. Стерилизующая фильтрация и дозирование липосомальной дисперсии.
5. Лиофилизация липосомальной дисперсии.

3.2.1. Получение липидной пленки

Первоначальным этапом технологического процесса приготовления ЛЛФ является получение липидной пленки. Данный этап для цифетрилина, который является гидрофобным веществом, включает операции по растворению навесок субстанции цифетрилина и липидных компонентов в органическом растворителе, смешиванию полученных растворов и их упаривание до образования на стенках круглодонной колбы однородной пленки.

Критическими факторами в процессе получения липидной пленки являются температура и уровень вакуума, обеспечивающие быстрое концентрирование раствора липидов и образование пленки. Оптимальная температура данного процесса должна находиться в пределах 37–42 °С, при которой не происходит увеличения индекса окисления, т.е. ПОЛ [8]. Кроме

того, необходимо учитывать, что температура формирования пленки должна выше $T_{ф.п.}$ используемого липида. Указанным требованиям отвечает ЯФХ, выбранный в качестве основного липида ЛЛФ цифетрилина. Этот природный ФЛ имеет приемлемую $T_{ф.п.} +37$ °С.

Уровень вакуума при получении липидной пленки должен быть в свою очередь подобран, исходя из скорости концентрирования липидов из органического раствора [15]. Формирование на стенках колбы равномерно распределенной полупрозрачной липидной пленки с цифетрилином при отгонке органического растворителя обеспечивается при значении вакуума 150–200 мбар и скорости вращения ротора 75–110 об/мин. При более низкой скорости вращения раствор компонентов ЛФ «сползает» со стенок колбы и концентрируется в области дна с образованием толстой липидной пленки. Повышение скорости вращения ротора более 110 об/мин, хотя и способствует увеличению скорости удаления органического растворителя, приводит к получению неравномерной пленки по боковой части колбы в форме «ободка».

В технологии ЛЛФ на стадии получения липидной пленки чаще всего применяют легколетучие органические растворители, способные растворять как липиды, так и большинство гидрофобных лекарственных субстанций. При приготовлении липосом цифетрилина используется хлороформ. Хлороформ относится к растворителям 2-го класса токсичности (ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» [2]), поэтому необходимо добиться полного удаления его из липидной пленки. Это достигается путем длительного досушивания сформированной пленки под вакуумом до постоянной массы. В ходе эксперимента установлено, что оптимальный период времени для сушки липидной пленки с цифетрилином при значении вакуума 120–150 мбар составляет не менее 50 мин (Таблица 7).

Таблица 7.

Потеря в массе липидной пленки с цифетрилином в процессе сушки

Время сушки плёнки, мин	Масса содержимого колбы, г			Потеря в массе, %
	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3	
0	2,508 ± 0,007	2,751 ± 0,006	2,393 ± 0,006	-
10	1,866 ± 0,004	2,086 ± 0,003	1,790 ± 0,005	25,0 ± 1,0
20	1,798 ± 0,004	1,826 ± 0,002	1,781 ± 0,002	0,5–12,5
30	1,784 ± 0,002	1,799 ± 0,002	1,777 ± 0,003	0,2–1,5
40	1,780 ± 0,002	1,799 ± 0,002	1,771 ± 0,002	0,2–0,3
50	1,783 ± 0,003	1,806 ± 0,002	1,780 ± 0,002	0,0
60	1,787 ± 0,002	1,806 ± 0,002	1,777 ± 0,003	0,0

3.2.2. Гидратация липидной пленки

После досушивания проводят диспергирование (гидратирование) полученной липидной пленки. Именно на данном этапе происходит образование МСЛ и «включение» гидрофобного цифетрилина в липосомальный носитель путем встраивания его в липидный бислой. Эффективность включения во многом зависит от химических свойств ЛВ. Учитывая коэффициент распределения цифетрилин в липосомальном бислое, можно добиться высокой степени его включения и стабильного удерживания в двойном слое липидов путем подбора оптимального соотношения препарат/липид [8].

В качестве растворителей для гидратации липидной пленки с цифетрилином исследовали воду для инъекций и раствор криопротектора (сахарозы). Согласно результатам, представленным в таблице 8, установлено, что оптимальным растворителем для получения дисперсии МСЛ цифетрилина является 12 % раствор сахарозы.

Таблица 8.

Выбор растворителя для получения дисперсии МСЛ цифетрилина

№	Растворитель	Размер липосом, нм		рН дисперсии	КВП, %
		после гидратации	после экструзии		
1	Вода для инъекций	691 ± 25	175 ± 6	6,3 ± 0,2	97 ± 1
2	Раствор сахарозы 12 %	330 ± 20	155 ± 6	6,2 ± 0,2	97 ± 1

3.2.3. Сравнение методов получения однослойных липосом (ОСЛ) цифетрилина

Для измельчения липосомальных дисперсий (более 10–30 мл), содержащих МСЛ, чаще всего применяют методы экструзии и гомогенизации/микрофлюидизации; гораздо реже используют методы обработки УЗ, замораживания-оттаивания и дегидратации-регидратации. Каждый из используемых методов имеет как свои достоинства, так и недостатки.

При проведении исследования по оценке методов измельчения липосом в каждом случае предварительно дисперсию МСЛ цифетрилина, полученную при гидратации липидной пленки, фильтровали через нейлоновые мембранные фильтры с размером пор 1,2 и 0,45 мкм.

Экструзия

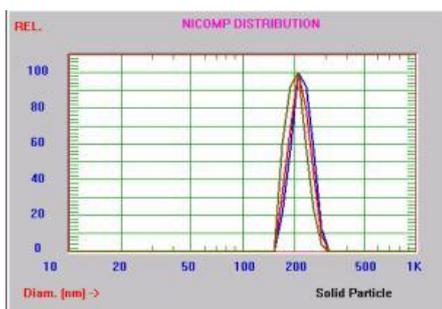
Для оценки эффективности экструзии при измельчении МСЛ цифетрилина сравнивали три типа фильтрующих мембран – поликарбонатных с диаметром пор 0,2 мкм, нейлоновых с диаметром пор 0,22 мкм и целлюлозных с диаметром пор 0,22 мкм (Таблица 9). Предварительно липосомальную дисперсию цифетрилина для удаления возможных механических включений фильтровали через мембраны с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм. Процесс экструзии дисперсии МСЛ проводили при уровне давления 0,8–0,9 бар.

Таблица 9.

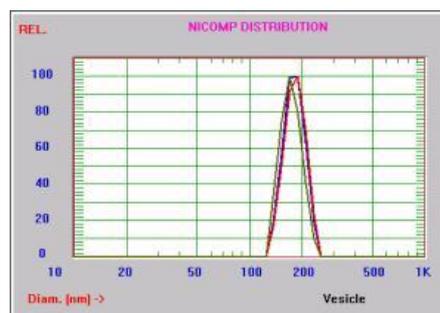
Размеры липосом цифетрилина при экструзии

Число циклов	Размер липосом*, нм		
	Поликарбонатный фильтр, 0,2 мкм	Нейлоновый фильтр, 0,22 мкм	Целлюлозный фильтр, 0,22 мкм
0	215 ± 15		
1	183±9	205±10	204±12
2	181±14	231±26	186±11
3	175±6	269±15	169±10
4	171±10	226±18	180±10
5	164±12	185±15	176±6
6	159±10	175±10	180±14
7	151±10	191±10	169±8
8	161±14	184±12	171±12
9	160±10	201±11	183±10
10	163±10	208±10	171±10

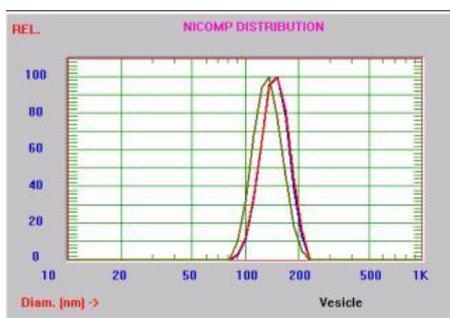
Согласно представленным результатам экструзия с применением поликарбонатного фильтра даёт возможность «быстрее» получить липосомальную дисперсию с подходящим размером везикул. Уже при 1-кратном пропускании дисперсии МСЛ цифетрилина через поликарбонатный фильтр размер липосом снижается с 215 до 183 нм, а при 7-кратном – до 151 нм (Рисунок 8 А–В). Последующее измельчение способствовало незначительному увеличению диаметра липосом цифетрилина.



А



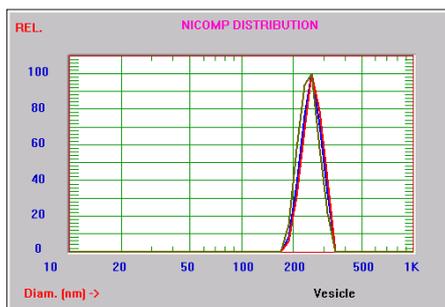
Б



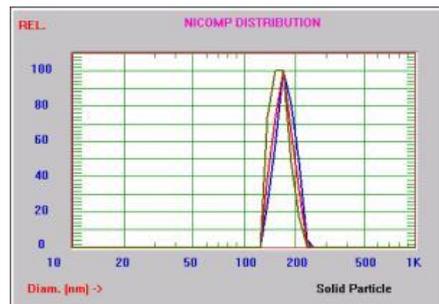
В

Рисунок 8. Размер везикул после экструзии с поликарбонатным фильтром: А – после фильтрации до экструзии (215 нм); Б – после 1-кратного пропускания (183 нм); В – после 7-кратного пропускания (151 нм)

В отличие от экструзии с поликарбонатным фильтром при пропускании дисперсии через нейлоновый фильтр первоначально отмечали укрупнение липосом до 269 нм, а затем постепенное уменьшение их размера, и спустя 6 циклов были получены везикулы с минимальным средним диаметром 175 нм (Рисунок 9). Тем не менее, последующая экструзия опять способствовала росту размеру липосом.



А



Б

Рисунок 9. Размер везикул после экстразии с нейлоновым фильтром: А – после 3-кратного пропускания (269 нм); Б – после 6-кратного пропускания (175 нм)

При экстразии липосомальной дисперсии цифетрилина с использованием целлюлозного фильтра наблюдали волнообразный характер изменения размера везикул – чередование процессов их снижения и укрупнения (диаграмма). Минимальный диаметр липосом (169 нм) был достигнут на 3 и 7 циклах экстразии (Рисунок 10)

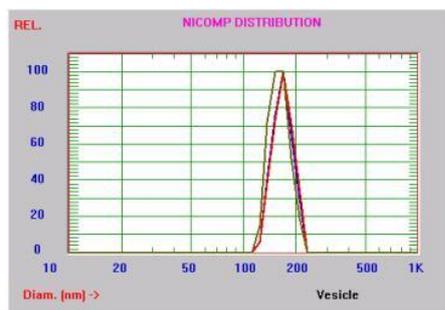


Рисунок 10. Размер везикул после 3- и 7-кратной экстразии с целлюлозным фильтром (169 нм)

Таким образом, для получения ОСЛ цифетрилина можно использовать два типа фильтров – поликарбонатных и целлюлозных. Но наиболее эффективна экстразия с использованием поликарбонатных мембран, поскольку позволяет сократить время стадии измельчения МСЛ цифетрилина.

Кроме того, следует отметить, что при экстразии МСЛ цифетрилина с использованием мембранных фильтров не отмечались значительные изменения в показателе включения активного вещества в липосомах и

значений рН, что свидетельствует о низком уровне окисления ФЛ, входящих в состав ЛФ, и сохранении качества продукта.

Гомогенизация

Для уменьшения размера липосом в промышленных масштабах применяют технологию гомогенизации, поскольку в отличие от экструзии измельчение в гомогенизаторах под высоким давлением характеризуется более высокой производительностью, достигая для некоторых моделей 15 л/ч, что позволяет получать за короткий промежуток времени большие объемы стабильных липосомальных дисперсий.

В настоящем исследовании 150 мл профильтрованной дисперсии МСЛ цифетрилина рециркулировали в гомогенизаторе/микрофлюидайзере при величине давления 280 кПа (2,8 бар) в течение 5 мин с отбором образцов через каждую минуту от начала процесса (Таблица 10).

Таблица 10.

Влияние гомогенизации на качество ЛЛФ цифетрилина

Время, мин	Средний размер везикул по фракциям, нм		КВП, %
	После гомогенизации	Через 1 день	
0	326 ± 20	286 ± 30	96 ± 1,0
1	102 ± 2(98 %) / 11 ± 2 (2 %)	101 ± 22 (93 %) / 24 ± 2 (7 %)	91 ± 1,0
2	134 ± 12 (86 %) / 34 ± 11(14 %)	137 ± 22 (88 %) / 31 ± 4 (12 %)	92 ± 2,2
3	123 ± 13 (71 %) / 35 ± 12 (29 %)	124 ± 21 (75 %) / 25 ± 5 (25 %)	86 ± 1,8
4	76 ± 13 (75 %) / 19 ± 5 (25 %)	120 ± 55 (68 %) / 26 ± 5 (32 %)	81 ± 3,0
5	62 ± 7 (71 %) / 15 ± 4 (29 %)	151 ± 35 (74 %) / 35 ± 4 (26 %)	75 ± 3,0

Как показали результаты, средний размер везикул преобладающей фракции через 1 мин измельчения сократился с 326 до 102 нм, (Рисунок 11А) а через 2–3 мин липосомы укрупнялись и обладали диаметром преобладающей фракции около 123–134 нм (Рисунок 11Б). При этом полученные дисперсии оставались стабильными в течение суток. Тем не менее, гомогенизация на протяжении 4–5 мин способствовала образованию хотя и более мелких везикул, но неустойчивых, склонных к слиянию липосом. Также во время оценки уровня включения цифетрилина было установлено, что количество препарата в липосомах значительно

снижалось с каждой минутой гомогенизации, что вероятно обусловлено частичным разрушением мембраны липосом в результате нагревания дисперсии (рН снижается со скоростью 0,3 ед./мин).

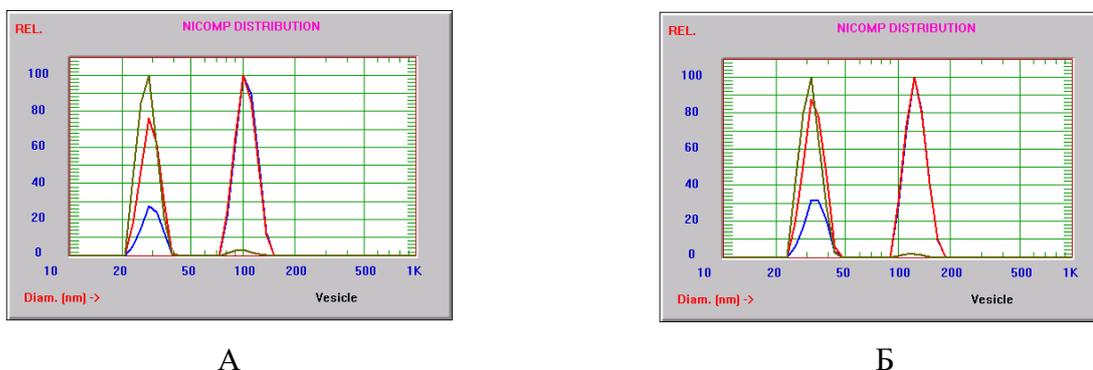


Рисунок 11. Размер везикул после гомогенизации. А – после 1 мин, Б – после 2 мин.

Таким образом, в результате установлено, что уже спустя 1 мин циркуляции, за которую дисперсия совершает 6 полных циклов гомогенизации, образуются везикулы размером около 100 нм. Однако за этот период уровень включения цифетрилина снижается от первоначального 96 до 91 %. Поэтому для получения липосом цифетрилина приемлемого диаметра с сохранением высокого уровня включения проводили исследования по подбору «щадящего» режима гомогенизации. Для этого липосомальную дисперсию цифетрилина гомогенизировали по циклам (Таблица 11).

Таблица 11.

Размеры липосом цифетрилина при гомогенизации по циклам

Число циклов	Размер липосом, нм (распределение по фракциям)		КВП, %
	сразу после гомогенизации	спустя сутки после гомогенизации	
0	326 ± 20	286 ± 30	96 ± 1
1	179 ± 14*	164 ± 9 / 11 ± 2	
2	144 ± 9*	151 ± 4 / 11 ± 2	
3	153 ± 3*	166 ± 26 / 27 ± 10	95 ± 1,5
4	128 ± 1*	125 ± 2*	
5	170 ± 17 / 11 ± 3	130 ± 7 / 15 ± 7	
6	135 ± 29 / 28 ± 8	176 ± 2 / 29 ± 16	92 ± 2,0
7	214 ± 58 / 43 ± 6	152 ± 32*	
8	168 ± 53 / 40 ± 3	114 ± 9 / 11 ± 2	91 ± 1,0
9	121 ± 7 / 13 ± 2	102 ± 3 / 11 ± 3	
10	115 ± 7 / 18 ± 3	111 ± 6 / 19 ± 1	90 ± 1,0
11	116 ± 6 / 11 ± 2	120 ± 27 / 26 ± 15	

Примечание: * – одна фракция (100%)

Согласно данным, представленным в таблице 11, для получения относительно стабильных липосом цифетрилина со средним диаметром 150 нм (Рисунок 12) и первоначальным уровнем включения (96 %) достаточно 2-х циклов гомогенизации дисперсии (20 сек).

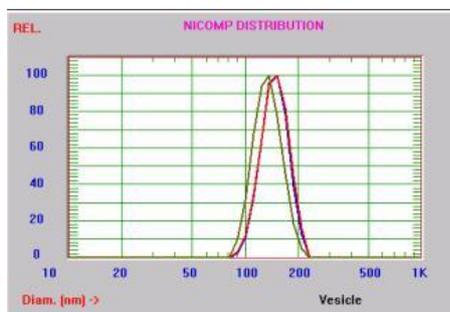


Рисунок 12. Размер везикул после гомогенизации 2 циклов
Обработка УЗ

Липосомальную дисперсию цифетрилина объемом 30 мл помещали на УЗ-баню и озвучивали в течение 10–50 мин с отбором образцов препарата через каждые 10 мин. (Таблица 12).

Как показали полученные данные, в результате обработки УЗ липосомы цифетрилина оказались неоднородны и достигли среднего размера преобладающей фракции 179 нм лишь спустя 50 мин озвучивания (Рисунок 13), при этом показатель рН за данный период времени снизился с 6,2 до 4,5, а КВП – с 97 до 94 %. Это говорит о нецелесообразности применения УЗ в процессе получения ЛЛФ цифетрилина.

Таблица 12.

Средний размер липосом цифетрилина при обработке УЗ

Время, мин	Средний размер липосом, нм	КВП, %	рН
0	330 ± 32*	97 ± 1,0	6,3 ± 0,1
10	324 ± 30*		6,2 ± 0,1
20	442 ± 27 / 79 ± 21	96 ± 1,2	5,9 ± 0,2
30	365 ± 25 / 71 ± 24	96 ± 1,0	5,2 ± 0,1
40	421 ± 27 / 66 ± 18	96 ± 1,5	4,7 ± 0,2
50	179 ± 10 / 20 ± 9	94 ± 1,2	4,5 ± 0,3

Примечание: * – одна фракция (100 %)

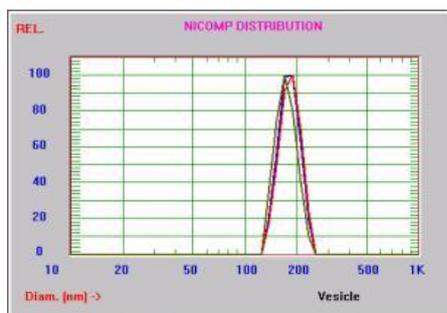


Рисунок 13. Размер везикул после спустя 50 мин озвучивания (179 нм)

Исходя из изложенных выше данных для наработки липосом цифетрилина в условиях лаборатории целесообразно применять метод экструзии, а для масштабирования технологии получения ЛЛФ – метод гомогенизации.

Уменьшение размеров липосом цифетрилина за счет экструзии обладает много преимуществ, таких как получение однородных по размеру везикул; незначительное окисление липосомальных ФЛ по сравнению с УЗ и гомогенизацией; возможность измельчения небольших объемов дисперсии и др. Кроме того, процесс экструзии способствует более однородному распределению гидрофобного ЛВ в структуре бислоя, что делает данный метод целесообразным для получения липосом цифетрилина.

Неоспоримыми преимуществами применения гомогенизации в ходе масштабирования технологического процесса получения ЛЛФ цифетрилина являются высокая производительность, незначительный уровень окисления ФЛ (при соблюдении режима), стабильность получаемых липосом. Существенное значение имеет использование серийного промышленного оборудования и получение препарата в стерильных условиях в закрытом режиме, при этом в ходе технологического процесса существует возможность осуществления контроля температуры и давления.

3.2.4. Отделение субстанции, не включившейся в липосомы, и стерилизация липосомальной дисперсии цифетрилин

По завершении процесса формирования липосом с включенным в них цифетрилином необходимо провести отделение свободного («не включенного») вещества. При создании ЛЛФ гидрофобной субстанции для отделения «не включенного» вещества достаточно провести фильтрацию через каскад фильтров с различным диаметром пор. При этом, как правило, отделение «не включенной» активной субстанции сочетается со следующей технологической стадией – стерилизующей фильтрацией. Инъекционные ЛЛФ, как и любые ЛФ, используемые для парентерального применения, должны выдерживать испытание на стерильность, согласно требованиям ОФС.1.4.1.00007.15 «Лекарственные формы для парентерального применения» [2]. Можно получать ЛЛФ в асептических условиях, но это сложная и дорогостоящая процедура. В большинстве случаев для липосомальных дисперсий применяют стерилизующую фильтрацию через фильтры с размером пор 0,45 и 0,22 мкм.

С целью подбора оптимального фильтрующего материала должны производиться исследования, приводящие к минимальной сорбции активной субстанции и липосом; режим и способ фильтрации должны минимально влиять на стабильность липосом и не приводить к снижению фармакологического действия получаемого препарата. [7]. Как показали результаты исследований, экструзия дисперсии МСЛ цифетрилина с нейлоновыми фильтрами с размером пор 0,45 и 0,22 мкм и поликарбонатными фильтрами с размером пор 0,2 мкм включает в себя, во-первых, метод уменьшения диаметра везикул до получения ОСЛ оптимального размера, во-вторых, отделение не включенной субстанции и, в-третьих, стерилизующую фильтрацию, обеспечивающую сохранение высокого уровня инкапсулирования ЛВ в липидном бислое.

3.2.5. Разработка технологии лиофилизации ЛЛФ цифетрилина

Хранение ЛЛФ в жидком виде сопряжено с рядом проблем наиболее существенными из которых является: окисление и гидролиз липосомальных ФЛ, а также ряд физических изменений (агрегация, слияние и др.) в липосомальной дисперсии. В связи с этим существует множество способов предотвращения данных явлений [1].

Поэтому следующим этапом технологии получения липосомального препарата является лиофилизация липосомальной дисперсии. Лиофилизация или сублимационное высушивание является наиболее распространенным направлением стабилизации липосомальной дисперсии фармакологически активных субстанций.

Основными задачи разработки технологии лиофилизации ЛЛФ цифетрилина являлись выбор криопротектора и режима сублимационной сушки, которые бы обеспечивали получение лиофилизата надлежащего качества, стабильного в течение длительного срока хранения.

– Выбор криопротектора для лиофилизации ЛЛФ цифетрилина

Одним из наиболее важных факторов при лиофилизации является рациональный выбор криопротектора, который не должен иметь эвтектические свойства, т.е. не быть способным к кристаллизации при замерзании. Также существенное значение имеет правильное определение этапа для введения криопротектора (углеводов) в липосомы. Необходимо учитывать, что должны быть обеспечены условия создания защитной среды как внутренней, так и наружной поверхности липосом. Применение криопротектора с более высокой температурой изменения матрицы имеет преимущество, в том числе за счет ускорения первичной сушки [7]. Кроме того, необходимо учитывать концентрацию криопротектора и липидов.

В качестве криопротекторов исследовали вещества из класса «углеводы»: моносахарид – глюкозу и дисахариды – лактозу, сахарозу и трегалозу. Криопротектор вводили в липосомальную дисперсию после

стадии измельчения липосом цифетрилина в различных молярных соотношениях ЯФХ/криопротектор (Таблица 13). В качестве контроля использовали образец липосомальной дисперсии без добавления криопротектора.

Таблица 13.

Выбор криопротектора для лиофилизации ЛЛФ цифетрилина

№ образца	КП	Молярное соотношение ЯФХ/КП	С _{кп} в дисперсии, %	Средний размер липосом, нм		КВП, %	Регидратируемость (+/-)
				до лиофилизации	после лиофилизации		
1	Контроль	–	–	143±6	525±26	98	-
2	Глюкоза	1:3	4	131±7	203±22	92	-
3		1:4	5	136±13	157±12	92	+
4		1:5	6	131±5	174±21	94	+
5		1:6	7	130±4	150±22	91	+
6		1:8	10	133±4	130±7	96	+
7		1:10	13	139±6	120±6	96	+
8		Лактоза	1:2	5	122±2	142±10	92
9	1:3		7	126±3	131±5	осадок	+
10	1:4		9	136±7	126±2	осадок	+
11	1:5		12	151±2	130±10	осадок	+
12	Сахароза	1:2	5	121±6	163±20	96	+
13		1:3	7	124±3	141±5	97	+
14		1:4	9	123±2	139±10	98	+
15		1:5	12	124±2	123±3	98	+
16	Трегалоза	1:2	5	124±2	165±20	95	+
17		1:3	7	120±5	151±20	95	+
18		1:4	9	126±3	137±4	96	+
19		1:5	12	120±4	122±6	96	+

Примечания: ЯФХ – яичный фосфатидилхолин, КП – криопротектор, С_{кп} – концентрация криопротектора

В ходе работы было получено и проанализировано 19 образцов лиофилизата по показателям «Внешний вид», «Регидратируемость», «Размер липосом», «КВП». Все образцы, за исключением контрольного, представляли собой сухую массу белого цвета. Было показано, что при регидратации контрольного лиофилизата образуется густая комковатая дисперсия и отмечается значительное увеличение среднего размера везикул преобладающей фракции после сублимационной сушки от 143 до 525 нм. Также нарушение процесса регидратации отмечалось в образце с глюкозой в соотношении ЯФХ/криопротектор 1 : 3.

Увеличение размеров липосом в процессе лиофилизации наблюдалось в образцах лиофилизатов с глюкозой, вводимой в ЛЛФ в соотношении ЯФХ/криопротектор 1 : 4, 1 : 5 и 1 : 6, лактозой, вводимой в соотношении ЯФХ/криопротектор 1 : 2, сахарозой, вводимой в соотношении ЯФХ/криопротектор 1 : 2, 1 : 3 и 1 : 4, и трегалозой, вводимой в соотношении ЯФХ/криопротектор 1 : 2, 1 : 3 и 1 : 4. Вероятно, что рост размера везикул в данных образцах обусловлен низкой концентрацией используемых криопротекторов, обеспечивающих недостаточный протективный эффект на стадии замораживания липосомальной дисперсии цифетрилина.

При использовании лактозы в качестве криопротектора ЛЛФ цифетрилина в концентрациях 7, 9 и 12 % обеспечивало сохранение размеров везикул, однако при регидратации лиофилизата и его разведении по методике количественного анализа наблюдалось выпадение белого осадка. Наличие осадка обусловлено медленным растворением указанного вещества в воде и его нерастворимостью в спирте 95 %, что затрудняет проведение количественного спектрофотометрического определения цифетрилина в ЛФ.

Таким образом, по показателям качества «Регидратируемость» и «Размер липосом» были отобраны образцы лиофилизатов с криопротекторами глюкозой 10 и 13 %, сахарозой 12 % и трегалозой 12 %.

Данные образцы лиофилизатов далее сравнивали, исходя из физико-химических свойств веществ-криопротекторов, которые могут влиять на технологический процесс получения и качество ЛЛФ-лио цифетрилина, а также данные по уровню включения. Глюкоза является бесцветным кристаллическим веществом, хорошо растворимым в воде. Однако, в отличие от сахарозы и трегалозы, глюкоза обладает высокой гигроскопичностью, что неприемлемо при длительном хранении лиофилизата. Трегалоза имеет более низкую растворимость в воде, чем сахароза – 68,9 г/100 г воды против 200,0 г/100 г воды, соответственно. Кроме того, при использовании в качестве криопротектора 12 % раствора сахарозы сохраняется исходный уровень включения цифетрилина в липосомах.

На основании вышеизложенного, в качестве криопротектора для лиофилизации ЛЛФ цифетрилина выбрана сахароза, вводимая в липосомальную дисперсию в соотношении ФХ/криопротектор 1 : 5.

– Выбор режима лиофилизации ЛЛФ цифетрилина

От обоснованного режима сублимации зависит стабильность липосом, количество включенного в ЛЛФ и, наконец, размер липосом. Это требует тщательного управления процессом дегидратации, так как процесс лиофилизации включает замораживание препарата с последующим удалением воды, и возникает проблема, связанная с тем, что на стадии замораживания и обезвоживания возможно физическое повреждение структуры липосомы. [7]

Процесс лиофилизации липосом обычно включает 3 этапа: замораживание дисперсии липосом, первичную сушку (сублимацию) и вторичную сушку (десорбцию). Замораживание является ключевой стадией этого процесса, определяющей формирование кристаллов льда и морфологию замороженного материала. На основании этого, мы исследовали 2 режима лиофилизации ЛЛФ цифетрилина – со стадиями «быстрого» и «медленного» замораживания, различающихся по скорости

процесса охлаждения продукта. При «медленном» замораживании использовали постепенное (ступенчатое) понижение температуры полок в камере сублимационной сушки, при «быстром» – липосомальный препарат подвергали стремительному (быстрому) замораживанию (Таблица 14).

Таблица 14.

Характеристика стадий «медленного» и «быстрого» замораживания при лиофилизации ЛЛФ цифетрилина

Операция	«Медленное» замораживание		«Быстрое» замораживание	
	Температура, °С	Время	Температура, °С	Время
Установка флаконов с препаратом на полки сублимационной сушки	+ (20–22)	-	+ (20–22)	-
Охлаждение полок и препарата	+ (20–22) → -17	1 ч 20 мин	+ (20–22) → -45	2 ч
	-17 → -25	1 ч 15 мин		
	-25 → -35	1 ч 20 мин		
	-35 → -45	1 ч 20 мин		
Выдерживание препарата при минимальной температуре	-45	3 ч	-45	3 ч

Данные режимы лиофилизации ЛЛФ цифетрилина сравнивали путем оценки качества полученных лиофилизатов по следующим показателям: внешний вид, регидратируемость, размер везикул и КВП цифетрилина (Таблица 15).

Таблица 15.

Результаты анализа лиофилизатов, полученных при лиофилизации ЛЛФ цифетрилина с использованием различных режимов замораживания

Режим лиофилизации	Внешний вид лиофилизата	Регидратируемость + / -	Размер везикул, нм		КВП, %
			до лиофилизации	после лиофилизации	
с «медленным» замораживанием	Сухая пористая масса белого цвета	+	164 ± 12	170 ± 7	97,0 ± 1,0
с «быстрым» замораживанием		+	171 ± 10	172 ± 8	97,0 ± 1,0

Способ замораживания не влияет на показатели качества конечного продукта, что было выяснено в ходе анализа полученных данных и оба режима дают возможность получить равноценные образцы ЛЛФ-лиоцифетрилина. По внешнему виду полученные лиофилизаты представляли собой сухую пористую массу белого цвета, которая легко регидратировалась с образованием липосомальной дисперсии белого цвета. Режим замораживания не влиял на включение цифетрилина и размер везикул после лиофилизации – в обоих случаях КВП находилась на уровне 97 %, а средний диаметр липосом составил около 170 нм.

С учетом полученных результатов, а также на основании того, что режим с «быстрым» замораживанием требует меньших затрат времени и соответственно электрической энергии, целесообразно использование данного режима для получения стабильной ЛФ цифетрилина.

На микрофотографии, представленной на рисунке 14, видно, что липосомы, полученные с использованием разработанной технологии лиофилизации после регидратации имеют такую же округлую форму как и до сублимации.

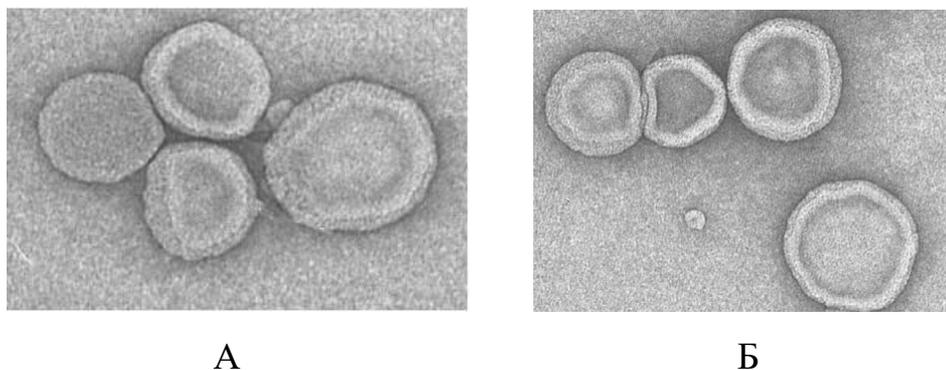


Рисунок 14. Электронная микроскопия липосом цифетрилина до (А) и после (Б) лиофилизации.

3.2.6. Обобщенная технология получения и состав ЛЛФ-лиоцифетрилина

В результате проведенных исследований разработана технология получения ЛЛФ-лиоцифетрилина, которая включает следующие технологические стадии:

1. Получение липидной пленки.

Берут навески липидных компонентов ЛФ – ЯФХ, холестерина и ПЭГ-ДГФА и растворяют в хлороформе. В отдельной емкости готовят хлороформный раствор активной субстанции цифетрилина. Полученные растворы компонентов ЛФ смешивают, фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм и переносят в круглодонную колбу. В таблице 16 приведены массы навесок компонентов ЛЛФцифетрилина и объем хлороформа, необходимые для приготовления хлороформного раствора при использовании в технологическом процессе круглодонной колбы вместимостью 2 л.

Таблица 16.

Состав хлороформного раствора компонентов ЛЛФцифетрилина для получения липидной пленки в круглодонной колбе вместимостью 2 л

Компонент ЛФ	Масса/объем компонента
ЯФХ	1591 мг
Холестерин	160 мг
ПЭГ-ДГФА	20 мг
Цифетрилин	29 мг
Хлороформ	30–35 мл

Хлороформный раствор на роторном испарителе отгоняют в условиях низкого давления (150–200 мбар) при температуре выше $T_{ф.п.}$ ЯФХ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и скорости вращения ротора 75–110 об/мин до получения однородной полупрозрачной липидной плёнки. Для удаления остаточного растворителя пленку досушивают под вакуумом (120–150 мбар) не менее 50 мин.

2. Гидратация липидной пленки.

Для получения 12 % раствора криопротектора к навеске сахарозы добавляют воду для инъекций, перемешивают и фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Профильтрованным раствором сахарозы гидратируют липидную пленку с получением дисперсии МСЛ цифетрилина с концентрацией ЛВ 1 мг/мл.

3. Фильтрация/экструзия дисперсии МСЛ цифетрилина.

Полученную дисперсию МСЛ цифетрилина фильтруют под давлением (0,5–0,8 бар) последовательно через нейлоновые мембранные фильтры с диаметром пор 1,2, 0,45 и 0,22 мкм. Затем дисперсию экструдировать через поликарбонатные фильтры с размером пор 0,2 мкм 5 раз.

4. Дозирование и лиофилизация липосомальной дисперсии.

Дисперсию ОСЛ цифетрилина дозируют во флаконы по 6 мл и помещают в камеру сублимационной сушки для получения лиофилизата ЛЛФ.

Технологическая схема получения липосомального цифетрилина представлена на рисунке 16.

Для отработки технологической схемы получения липосомального цифетрилина и выполнения комплекса химико-фармацевтических и биологических исследований были наработаны экспериментальные серии препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» (Рисунок 15), для которого установлен следующий состав:

Состав (на 1 флакон)

Цифетрилин	6,0 мг
ЯФХ	318,0 мг
Холестерин	32,0 мг
ПЭГ-ДГФА	4,0 мг
Сахароза	707,0 мг
Итого	1067 мг



Рисунок 15. Внешний вид флакона с препаратом «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг»

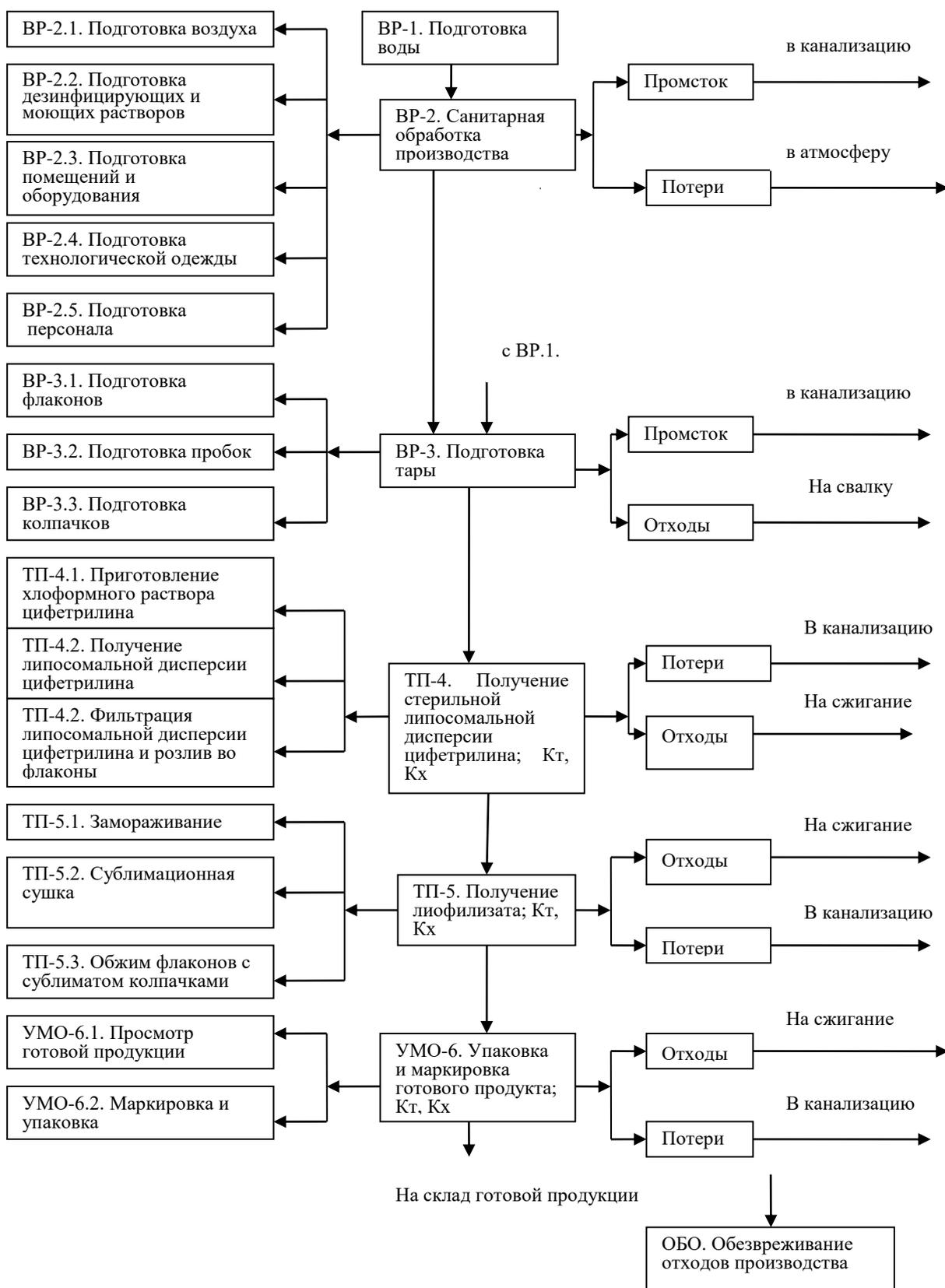


Рисунок 16. Технологическая схема получения ЛЛФ-лио цифетрилина

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлен оптимальный состав ЛЛФ цифетрилина. Из исследуемых моделей с приемлемым размером везикул (180 ± 6 нм) и высоким количеством включенного ЛВ в липосомы (97 ± 1) для получения ЛЛФ был выбран состав 8 с молярными соотношениями компонентов цифетрилин/ЯФХ = 1 : 70 и ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДГФА = 1 : 0,2 : 0,014.

Разработана технология получения инъекционной ЛЛФ-лио цифетрилина. Гидрофобная природа субстанции цифетрилина обуславливает технологические особенности получения его ЛЛФ. Так на стадии формирования липидной пленки субстанция растворяется в органическом растворителе вместе с липидами, а полученную липидную пленку гидратируют раствором криопротектора – 12 % раствор сахарозы. Измельчение липосом цифетрилина целесообразнее проводить с применением методов экструзии с использованием поликарбонатных фильтров с размером пор 0,2 мкм или гомогенизации, что обусловлено высокой производительностью указанных методов, сохранением стабильности липосом и высокого процента включения активного вещества в липосомальный бислой. На этапе отделения не включенного в липосомы цифетрилина, учитывая нерастворимость данного вещества в воде, применяется метод фильтрации, который сочетается со стерилизацией липосомальной дисперсии с использованием нейлоновых мембранных фильтров с размером пор 0,45 и 0,22 мкм. Для стабилизации и повышения срока хранения ЛЛФ цифетрилина предложены условия ее сублимационного высушивания. В качестве криопротектора выбрана сахароза, вводимая в липосомальную дисперсию на стадии гидратации липидной пленки в молярном соотношении сахароза/ЯФХ = 1 : 5 (12 % раствор сахарозы). Для лиофилизации липосомального цифетрилина целесообразно использование режима со стадией «быстрого» замораживания. Представлены состав и технологическая схема получения ЛЛФ-лио цифетрилина.

Глава 4. Разработка методик качественного и количественного анализа ЛЛФ и ЛЛФ-лио цифетрилина. Стандартизация ЛЛФ-лио цифетрилина.

4.1. Разработка методики тонкослойной хроматографии для качественного анализа ЛЛФ и ЛЛФ-лио цифетрилина

Для качественного анализа цифетрилина и вспомогательных компонентов, входящих в состав полученной ЛЛФ и ее лиофилизата, применяли метод хроматографии в тонком слое сорбента или тонкослойной хроматографии (ТСХ). Целью исследования по разработке методики ТСХ-анализа ЛФ цифетрилина являлся подбор условий хроматографирования, обеспечивающих эффективное разделение компонентов смеси (цифетрилина, липидных компонентов и сахарозы). Для решения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- обобщить полученные результаты исследования и представить их в виде методики ТСХ-анализа ЛЛФ и ЛЛФ-лио цифетрилина;
- выбрать подвижную фазу (элюент) для хроматографического разделения анализируемых веществ;
- определить предел обнаружения анализируемых веществ и провести оценку пригодности выбранных хроматографических систем.

Поскольку сахароза в отличие от цифетрилина и липидных компонентов присутствует в ЛЛФ в значительно большем количестве и является водорастворимым соединением, хроматографический анализ данного вспомогательного вещества проводили отдельно.

Для разработки методики ТСХ-анализа исследуемой ЛФ использованы хроматографические пластинки с силикагелем «Sorbfil» марки ПТСХ-АФ-А.

4.1.1. ТСХ-анализ цифетрилина и липидных компонентов ЛФ

Методика ТСХ-анализа цифетрилина и липидных компонентов ЛФ

Приготовление исследуемого образца ЛФ цифетрилина. К 6 мл свежеприготовленной липосомальной дисперсии или регидратированной ЛЛФ-лио цифетрилина (содержимое флакона в 5,3 мл воды) добавляют 6 мл спирта 95 % и перемешивают. В полученном образце концентрация цифетрилина составляет 0,5 мг/мл.

Приготовление стандартных образцов веществ-свидетелей (СОВС):

СОВС-1 – спиртовой раствор цифетрилина 0,5 мг/мл. 1,0 мг цифетрилина растворяют в 20 мл спирта 95 %.

СОВС-2 – спиртовой раствор ЯФХ 26,5 мг/мл. 133,0 мг ЯФХ растворяют в 5 мл спирта 95 %.

СОВС-3 – спиртовой раствор холестерина 2,7 мг/мл. 27,0 мг холестерина растворяют в 10 мл спирта 95 %.

Подготовка хроматографической камеры. В отдельной ёмкости смешивают растворители, входящие в состав подвижной фазы, и полученную смесь переливают в хроматографическую камеру. Для насыщения камеры парами смеси растворителей внутренние стенки обкладывают фильтровальной бумагой, смоченной подвижной фазой. Камеру плотно закрывают крышкой и оставляют на 25–30 мин.

Подготовка йодной камеры. В тигель отвешивают 1,0 г кристаллов йода, помещают на дно эксикатора и оставляют на 10–15 мин для возгонки йода.

Подготовка камеры, насыщенной парами хлора. В стакан отвешивают 2,0 г калия перманганата, помещают на дно эксикатора и медленно приливают 6 мл концентрированной соляной кислоты. Оставляют на 4–5 мин для образования паров хлора.

Приготовление 0,05 % водного раствора калия иодида. 25 мг калия иодида растворяют в 50 мл воды.

Приготовление 20 % серной кислоты. К 100 мл воды при помешивании наливают 25 мл концентрированной серной кислоты.

Нанесение проб. На линию старта хроматографической пластинки наносят автоматической пипеткой по 10 мкл исследуемого образца ЛФ цифетрилина (содержание цифетрилина в наносимой пробе 5 мкг, ЯФХ – 265 мкг, холестерин – 27 мкг), СОВС-1 (содержание цифетрилина 5 мкг), СОВС-2 (содержание ЯФХ 265 мкг) и СОВС-3 (содержание холестерина 27 мкг). Нанесенные пробы подсушивают в токе воздуха.

Хроматографирование. Пластинку с нанесенными пробами помещают вертикально в хроматографическую камеру с подвижной фазой, закрывают плотно крышкой и хроматографируют восходящим способом при 20–25 °С в защищенном от света месте. После прохождения фронтом подвижной фазы расстояния пробега (12 см) пластинку вынимают из камеры и в потоке тёплого воздуха высушивают до полного удаления запаха растворителей.

Детектирование зон адсорбции и идентификация. Для обнаружения цифетрилина пластинку помещают в камеру, насыщенную парами хлора и выдерживают на протяжении 5–10 мин. После опрыскивания 0,05 % водным раствором калия иодида появляются жёлтые пятна цифетрилина. Для идентификации ЯФХ пластинку помещают в камеру, насыщенную парами йода, и затем выдерживают 1–2 мин до образования ярко-жёлтых пятен ФЛ. Совместно с ЯФХ проявляются светло-желтые быстро исчезающие пятна холестерина. Опрыскиванием пластинки 20 % серной кислотой с последующим нагреванием в сушильном шкафу до образования розово-фиолетовых пятен проводят обнаружение холестерина. В связи с низкой концентрацией в анализируемых пробах (0,3 мг/мл) ПЭГ-ДГФА не определялся.

Проявившиеся пятна липосомальной пробы идентифицируют относительно пятен СОВС и характеризуют по фактору удерживания R_f , который рассчитывают по формуле:

$$R_f = a / b,$$

где: a – расстояние от точки нанесения пробы (линия старта) до центра пятна, характеризующего зону адсорбции, мм;

b – расстояние от линии старта до линии финиша элюента, мм [2].

Выбор подвижной фазы

Подбор подвижной фазы для разделения цифетрилина и липидных компонентов смеси осуществляли на основе сравнения эффективности девяти систем-элюентов, которые включают разные по сродству и полярности к неподвижной фазе растворители: аммиак водный, ацетон, бутанол, вода, ледяная уксусная кислота (ЛУК), метанол, пропанол, хлороформ, этанол и этилацетат (Таблица 17). Оценку эффективности системы растворителей проводили по следующим параметрам:

- количество зон адсорбции (пятен) веществ, образующихся при разделении смеси компонентов;
- значение фактора удерживания R_f анализируемых веществ;
- время пробега подвижной фазы.

Таблица 17.

Выбор подвижной фазы для ТСХ-анализа ЛЛФ цифетрилина

№	Подвижная фаза	Значение R _f								Время
		Цифетрилин		ЯФХ		Холестерин		Сахароза		
		ЛФ	СОВС-1	ЛФ	СОВС-2	ЛФ	СОВС-3	ЛФ	СОВС-4	
1	хлороформ–метанол (9 : 1)	0,17	0,18	0,08	0,08	0,63	0,64	-	-	1 ч 10 мин
2	этанол–аммиак водный (7 : 3)	0,73	0,73	0,45	0,47	1,00	1,00	-	-	2 ч 35 мин
3	пропанол–ЛУК–вода (12 : 3 : 1)	0,68	0,68	0,06	0,06	0,71	0,73	-	-	3 ч 5 мин
4	пропанол–ЛУК–вода (22 : 12 : 3)	0,58	0,66	0,05	0,06	1,00	1,00	-	-	4 ч 10 мин
5	бутанол–ЛУК–вода (6 : 3 : 2)	Хвост	Хвост	0,08	0,11	0,77	0,77	-	-	4 ч 20 мин
6	хлороформ–ацетон–этанол–ЛУК–вода (6 : 5 : 2 : 2 : 1)	0,85	0,83	0,04	0,04	0,86	0,88	-	-	1 ч 10 мин
7	ацетон–этилацетат–ЛУК (3 : 2 : 1)	1,00	1,00	Хвост	Хвост	1,00	1,00	-	-	2 ч 15 мин
8	ацетон–ЛУК–вода (15 : 3 : 2)	0,93	0,93	0,03	0,04	0,98	0,97	-	-	1 ч 30 мин
9	ацетон–этилацетат–ЛУК–вода (15 : 10 : 3 : 5)	1,00	1,00	Старт	Старт	1,00	1,00	-	-	2 ч 10 мин
10	ацетон–ЛУК–вода (15 : 3 : 2)	-	-	-	-	-	-	0,72	0,72	1 ч 20 мин
11	хлороформ–н-бутанол–ацетон–ЛУК–вода (25 : 25 : 15 : 5 : 4)	-	-	-	-	-	-	старт	старт	1 ч 35 мин

Примечание: СОВС – стандартный образец вещества-свидетеля

Включение в состав элюента таких высокополярных компонентов как метанол, ацетон, этанол и аммиак (системы 1, 2, 6–9) значительно сокращалось время пробега элюента. Однако при использовании данных систем растворителей наблюдались различные хроматографические картины, характеризующиеся различным количеством зон адсорбции и значениями R_f анализируемых веществ.

Так при использовании системы 1 (хлороформ : метанол = 9 : 1) в отличие от 6 (хлороформ : ацетон : этанол : ЛУК: вода = 6 : 5 : 2 : 2 : 1) значения R_f цифетрилина исследуемой пробы и СОВС были меньше в 5 раз, холестерина – в 1,3 раза. В тоже время значение R_f для ЯФХ при хроматографировании в системе 1 оказался в 2 раза больше чем в системе 2.

При наличии в подвижной фазе ацетона (системы 6–9) наблюдалась значительная подвижность цифетрилина и холестерина и соответствующие им пятна перемещались по пластинке практически с фронтом элюента – значения R_f составили значения $\geq 0,83$. Пятна ЯФХ при хроматографировании в данных системах детектировались вблизи линии старта, а в случае подвижной фазы ацетон: этилацетат : ЛУК = 3 : 2 : 1 не определялись.

Включение в состав системы растворителей пропанола и бутанола способствовало увеличению продолжительности времени анализа и снижению подвижности цифетрилина и холестерина. Однако в случаях использования систем 3 и 5 отмечалось ухудшение разделения веществ: в системе пропанол : ЛУК : вода = 12 : 3 : 1 наблюдалось наложение пятен холестерина на пятна цифетрилина, в системе бутанол : ЛУК: вода = 6 : 3 : 2 – размытие зоны адсорбции цифетрилина в виде «хвоста», что мешало идентификации анализируемых веществ. Изменение объемного соотношения растворителей в смеси пропанол: ЛУК: вода до 22 : 12 : 3 способствовало значительному увеличению подвижности холестерина (R_f

= 1,00), а пятна цифетрилина исследуемой пробы и СОВС-1 имели различные значения R_f – 0,58 и 0,66, соответственно.

В результате исследования для идентификации цифетрилина и ЯФХ была выбрана система растворителей этанол: аммиак водный 7 : 3, при которой достигалось увеличение подвижности ФЛ и обеспечивалось эффективное разделение данных веществ (Рисунок 17А). Поскольку в данной системе пятна холестерина анализируемой пробы и СОВС-3 поднимаются с фронтом растворителей до линии финиша, для ТСХ-анализа этого компонента в составе ЛФ выбрана подвижная фаза хлороформ : метанол = 9 : 1 (Рисунок 17Б).

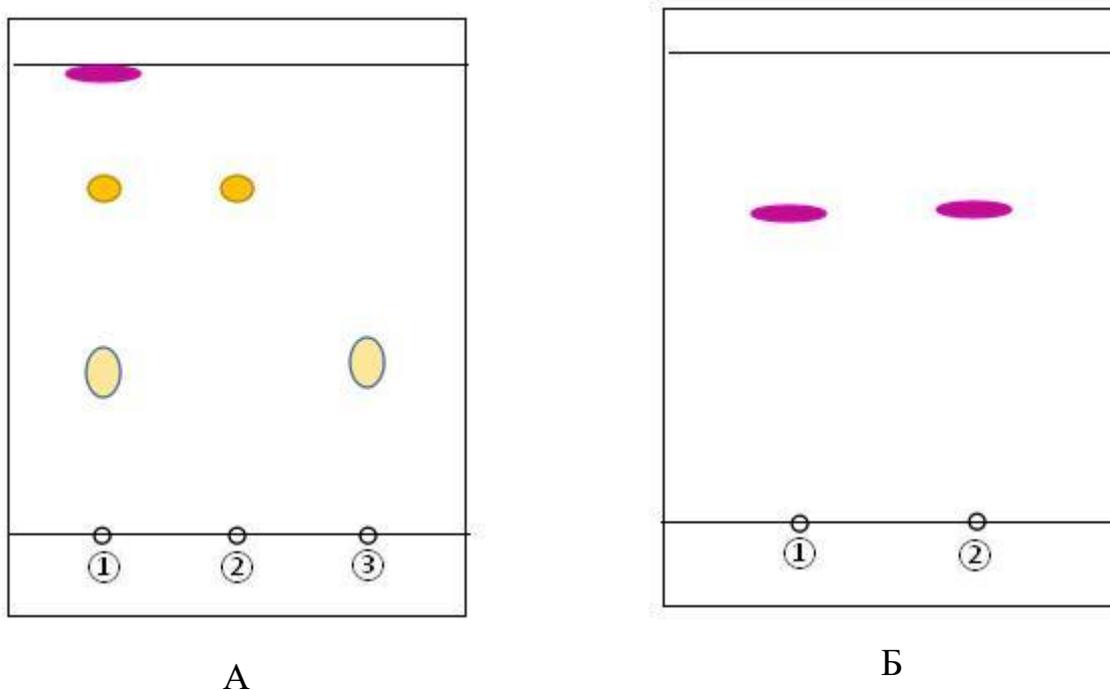


Рисунок 17. Вид хроматограммы: А – система 2 (Этанол/аммиак водный (7 : 3)):

1 – исследуемый образец ЛФ, 2 – СОВС-1, 3 – СОВС-2, 4 – СОВС-3;

Б – система 7 (хлороформ /метанол (9 : 1)): 1 – исследуемый образец ЛФ, 2 – СОВС-3

Предел обнаружения и оценка пригодности хроматографической системы

Предел обнаружения – это наименьшее количество (концентрация) определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено (или приближенно оценено) с использованием валидированной методики [2].

Для определения предела обнаружения компонентов ЛЛФ цифетрилина проводили испытания образцов с различными известными

количествами анализируемого вещества – цифетрилина, ЯФХ, холестерина) и устанавливали минимальное значение, при котором возможно идентифицировать компонент ЛФ на хроматограмме. В результате обнаружено, что предел обнаружения цифетрилина в системе этанол: аммиак водный = 7 : 3 составил 0,1 мкг, ЯФХ – 1,0 мкг. Предел обнаружения холестерина в системе хлороформ : метанол = 9 : 1 составил 0,5 мкг.

Установление предела обнаружения анализируемых веществ позволило провести оценку пригодности выбранных хроматографических систем.

Приготовление исследуемого образца ЛФ цифетрилина. см. методику выше.

Приготовление стандартных образцов веществ-свидетелей (СОВС):

СОВС-1 – спиртовой раствор цифетрилина 0,5 мг/мл. см. методику выше.

СОВС-1А – спиртовой раствор цифетрилина 0,1 мг/мл. 1,0 мг цифетрилина растворяют в 10 мл спирта 95%.

СОВС-2 – спиртовой раствор ЯФХ 26,5 мг/мл. см. методику выше

СОВС-2А – спиртовой раствор ЯФХ 1 мг/мл. 10,0 мг ЯФХ растворяют в 10 мл спирта 95 %.

СОВС-3 – спиртовой раствор холестерина 2,7 мг/мл. см. методику выше.

СОВС-3А – спиртовой раствор холестерина 0,5 мг/мл. 5,0 мг холестерина растворяют в 10 мл спирта 95 %.

Подготовка хроматографической камеры, йодной камеры и камеры, насыщенной парами хлора. см. методику выше.

Приготовление 0,05 % водного раствора калия иодида и 20 % серной кислоты. см. методику выше.

❖ Оценка пригодности системы этанол: аммиак водный 7 : 3

На линию старта хроматографической пластинки наносили автоматической пипеткой по 10 мкл исследуемого образца ЛФ (содержание цифетрилина в наносимой пробе 5 мкг, ЯФХ – 265 мкг),

СОВС-1 (содержание цифетрилина 5 мкг), СОВС-2 (содержание ЯФХ 265 мкг), по 1 мкл СОВС-1А (содержание цифетрилина 0,1 мкг) и СОВС-2А (содержание ЯФХ 1 мкг) и подсушивали в токе воздуха. Пластинку с нанесенными пробами помещали вертикально в камеру с подвижной фазой, закрывали плотно крышкой и хроматографировали восходящим способом при 20–25 °С в защищенном от света месте. После достижения фронтом подвижной фазы линии финиша (пробег 12 см) пластинку вынимали из камеры и высушивали до полного удаления запаха растворителей. Для обнаружения цифетрилина пластинку помещали в камеру, насыщенную парами хлора и выдерживали на протяжении 5–10 мин. После опрыскивали 0,05 % водным раствором калия иодида до появления жёлтых пятен цифетрилина. Для идентификации ЯФХ пластинку помещали в камеру, насыщенную парами йода, и затем выдерживали 1–2 мин до образования ярко-жёлтых пятен ФЛ. Опрыскиванием пластинки 20 % серной кислотой с последующим нагреванием в сушильном шкафу до образования розово-фиолетовых пятен проводили обнаружение холестерина.

Значения R_f при проверке пригодности системы растворителей этанол: аммиак водный 7 : 3 составили:

1 – исследуемый образец ЛФ: цифетрилин (5 мкг) – 0,73, ЯФХ (265 мкг) – 0,45;

2 – СОВС-1 (цифетрилин 5 мкг) – 0,73;

3 – СОВС-2 (ЯФХ 265 мкг) – 0,46;

4 – СОВС-1А (цифетрилин 0,1 мкг) – 0,74;

5 – СОВС-2А (ЯФХ 1,0 мкг) – 0,46.

Таким образом, хроматографическую систему этанол: аммиак водный 7 : 3 можно считать пригодной, если на пластинке напротив СОВС-1 (цифетрилин 0,1 мкг) видно округлое пятно светло-желтого цвета, а после выдерживания пластинки в камере, насыщенной парами йода, напротив СОВС-2А (ЯФХ 1,0 мкг) обнаруживается пятно желтого цвета.

❖ *Оценка пригодности хроматографической системы хлороформ : метанол = 9 : 1*

На линию старта хроматографической пластинки наносили автоматической пипеткой по 10 мкл исследуемого образца ЛФ (содержание холестерина в наносимой пробе 27 мкг), СОВС-3 (содержание холестерина 27 мкг) и 1 мкл СОВС-3А (содержание холестерина 0,5 мкг) и подсушивали в токе воздуха. Пластинку с нанесенными пробами помещали вертикально в камеру с подвижной фазой, закрывали плотно крышкой и хроматографировали восходящим способом при 20–25 °С в защищенном от света месте. После достижения фронтом подвижной фазы линии финиша (пробег 12 см) пластинку вынимали из камеры и высушивали до полного удаления запаха растворителей. Для обнаружения холестерина пластинку опрыскивали 20 % серной кислотой с последующим нагреванием в сушильном шкафу до образования розово-фиолетовых пятен.

Значения R_f при проверке пригодности системы растворителей хлороформ : метанол = 9 : 1 составили:

1 – исследуемый образец ЛФ: холестерин (27 мкг) – 0,63;

2 – СОВС-3 (холестерин 27 мкг) – 0,64;

3 – СОВС-3А (холестерин 0,5 мкг) – 0,64.

Таким образом, хроматографическую систему хлороформ : метанол 9 : 1 можно считать пригодной, если на пластинке напротив СОВС-3А (холестерин 0,5 мкг) видно округлое пятно розового цвета.

4.1.2. Хроматографический анализ сахарозы в составе ЛЛФ-лиоцифетрилина

Выбор подвижной фазы

Для выбора подвижной фазы ТСХ-анализа сахарозы сравнивали системы растворителей ацетон/ЛУК/вода (15 : 3 : 2) и хлороформ/н-бутанол/ацетон/ЛУК/вода (25 : 25 : 15 : 5 : 4), применяемые для анализа данного вспомогательного вещества в липосомальных препаратах [3, 13].

При использовании системы ацетон/ЛУК/вода (15 : 3 : 2) значение R_f пятен сахарозы, соответствующим пробе ЛФ и СОВС-4, составило 0,72 (Таблица 17). Тогда как в системе хлороформ/н-бутанол/ацетон/ЛУК/вода (25 : 25 : 15 : 5 : 4) пятна анализируемого вещества для исследуемого образца ЛФ и стандарта оставались на линии старта. В связи с этим подвижная фаза состава ацетон/ЛУК/вода (15 : 3 : 2) выбрана для ТСХ-анализа сахарозы в составе ЛЛФ-лиоцифетрилина (Рисунок 18).

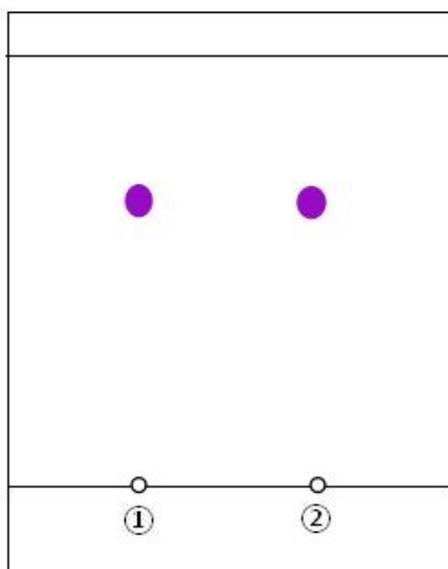


Рисунок 18. Вид хроматограммы: ацетон/ЛУК/вода (15 : 3 : 2)
1-исследуемый образец ЛФ, 2-СОВС-4

Методика ТСХ-анализа сахарозы в составе ЛЛФ-лиоцифетрилина

Приготовление исследуемого образца ЛЛФ-лиоцифетрилина. Лиофилизат регидратируют путем добавления 10 мл воды, количественно переносят в

мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят водой до метки. В колбу вместимостью 25 мл переносят 0,85 мл полученного разведения дисперсии и доводят водой до метки. Концентрация сахарозы в образце – 1 мг/мл.

Приготовление СОВС-4 – водный раствор сахарозы 1 мг/мл. 25 мг сахарозы помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят водой до метки.

Приготовление раствора 1-нафтола. Точную навеску 0,5 г 1-нафтола растворяют в 50 мл смесь этилового спирта 95% и концентрированной серной кислоты (19 : 1), полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят той же смесью до метки.

Подготовка хроматографической камеры. В отдельной ёмкости смешивают растворители, входящие в состав подвижной фазы, и полученную смесь переливают в хроматографическую камеру. Для насыщения камеры парами смеси растворителей внутренние стенки обкладывают фильтровальной бумагой, смоченной подвижной фазой. Камеру плотно закрывают крышкой и оставляют на 25–30 мин.

Нанесение проб. На линию старта хроматографической пластинки наносят автоматической пипеткой по 5 мкл исследуемого образца ЛФ цифетрилина (содержание сахарозы в наносимой пробе 5 мкг) и СОВС-4 (сахароза 5 мкг). Нанесенные пробы подсушивают в токе воздуха.

Хроматографирование. Пластинку с нанесенными пробами помещают вертикально в хроматографическую камеру с подвижной фазой, закрывают плотно крышкой и хроматографируют восходящим способом при 20–25 °С. Пластинку опрыскивают 0,5 % раствором 1-нафтола и нагревают до появления темно-фиолетовых пятен сахарозы.

Оценка пригодности хроматографической системы ацетон/ЛУК/вода (15 : 3 : 2)

Предел обнаружения сахарозы в системе ацетон/ЛУК/вода (15 : 3 : 2) составляет 0,1 мкг.

Приготовление исследуемого образца ЛЛФ-лио цифетрилина. см. методику выше.

Приготовление СОВС:

СОВС-4 – водный раствор сахарозы 1 мг/мл. см. методику выше.

СОВС-4А – водный раствор сахарозы 0,1 мг/мл. 5 мг сахарозы помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят водой до метки.

Приготовление раствора 1-нафтола. см. методику выше.

Подготовка хроматографической камеры. см. методику выше.

Проведение анализа. На линию старта хроматографической пластинки наносили автоматической пипеткой по 5 мкл исследуемого образца ЛФ (содержание сахарозы в наносимой пробе 5 мкг) и СОВС-4 (содержание сахарозы 5 мкг) и 1 мкл СОВС-4А (содержание сахарозы 0,1 мкг), подсушивали в токе воздуха. Пластинку с нанесенными пробами помещали вертикально в камеру с подвижной фазой, закрывали плотно крышкой и хроматографировали восходящим способом при 20–25 °С в защищенном от света месте. После достижения фронтом подвижной фазы линии финиша (пробег 12 см) пластинку вынимали из камеры и высушивали до полного удаления запаха растворителей. Для обнаружения сахарозы пластинку опрыскивали 0,5 % раствором 1-нафтола и нагревали до появления фиолетовых пятен.

Значения R_f при проверке пригодности системы растворителей ацетон/ЛУК/вода (15 : 3 : 2) составили:

1 – исследуемый образец ЛФ: сахароза (5 мкг) – 0,72;

2 – СОВС-4 (сахароза 5 мкг) – 0,72;

3 – СОВС-4А (сахароза 0,1 мкг) – 0,73.

Таким образом, хроматографическую систему ацетон/ЛУК/вода (15 : 3 : 2) можно считать пригодной, если на пластинке напротив СОВС-4А (сахароза 0,1 мкг) видно округлое пятно светло-фиолетового цвета.

4.2. Разработка методики спектрофотометрического анализа цифетрилина в составе ЛЛФ и ЛЛФ-лио

4.2.1. Изучение спектральных характеристик действующего вещества и вспомогательных компонентов ЛЛФ цифетрилина

На первоначальном этапе разработки методики количественного спектрофотометрического определения цифетрилина в ЛЛФ изучали спектральные характеристики ЛВ и вспомогательных веществ.

В электронном спектре поглощения спиртового раствора субстанции цифетрилина в анализируемом диапазоне 250–800 нм обнаружено два максимума – при длинах волн (282 ± 2) и (290 ± 2) нм (Рисунок 19). Для количественного анализа липосомального цифетрилина выбран наиболее интенсивный пик при (282 ± 2) нм.

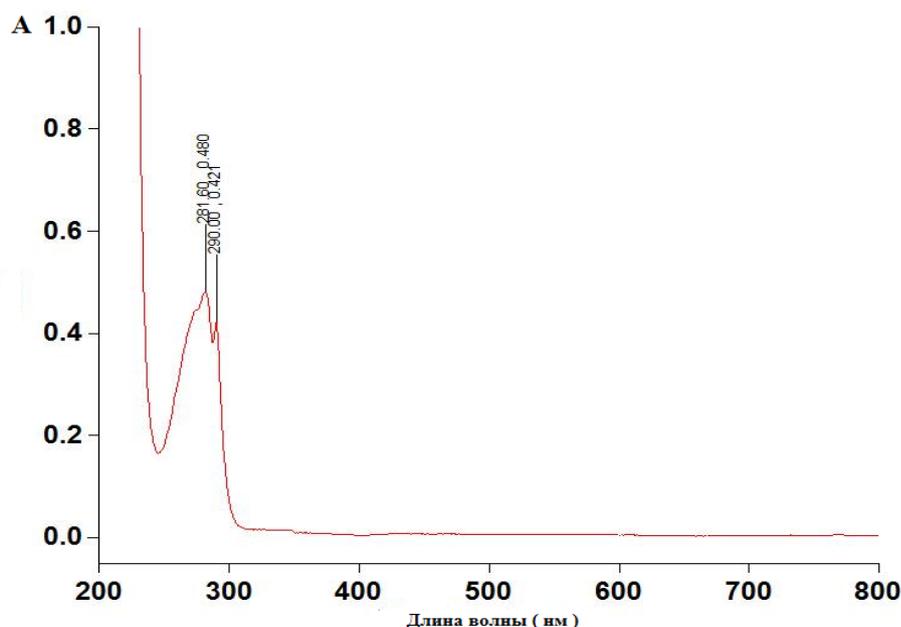


Рисунок 19. Электронный спектр поглощения спиртового раствора субстанции цифетрилина (концентрация цифетрилина в растворе 0,08 мкг/мл)

Для того чтобы изучить влияние вспомогательных веществ на абсорбционные характеристики цифетрилина в ЛЛФ и ЛЛФ-лио проводили исследование спектра поглощения «пустых» липосом с добавлением сахарозы. В результате в диапазоне от 200 до 300 нм

обнаружены два пика при (268 ± 2) и (279 ± 2) нм, которые соответствуют максимумам поглощения вспомогательных компонентов ЛФ (Рисунок 20).

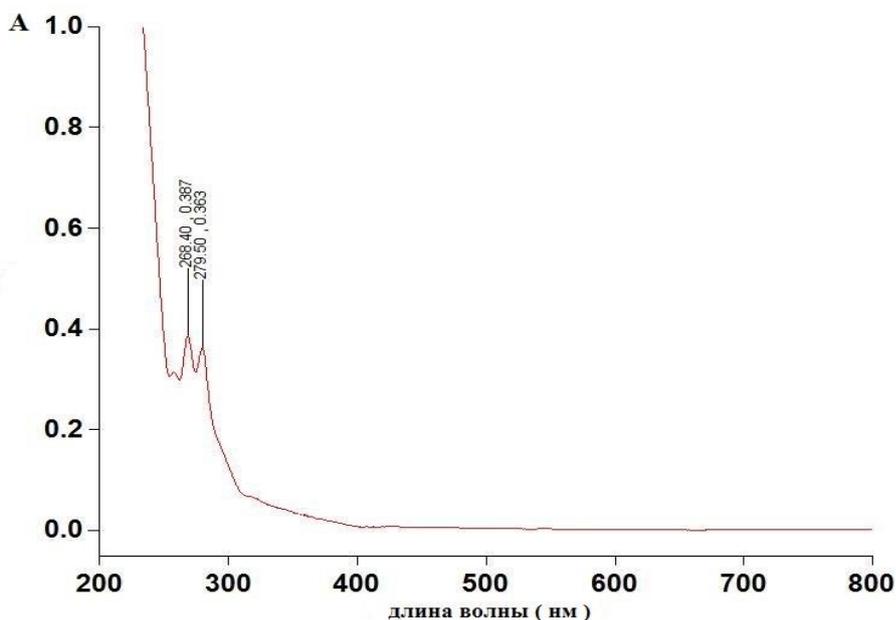


Рисунок 20. Электронный спектр поглощения спиртового раствора «пустых» липосом с сахарозой

Установлено, что сахароза (Рисунок 21А) практически не поглощает излучение в диапазоне от 200 до 300 нм ($A = 0,003$), холестерин (Рисунок 21В) и ПЭГ-ДГФА (Рисунок 21Г) имеют небольшое поглощение – суммарное значение оптической плотности (A) = 0,043. В то же время в электронном спектре поглощения спиртового раствора ЯФХ обнаружено четыре максимума при (203 ± 2) , (258 ± 2) , (268 ± 2) и (279 ± 2) нм (Рисунок 21Б), а значение A в аналитическом максимуме поглощения цифетрилина (282 нм) составляет 0,352. Таким образом, липидные компоненты могут влиять на значение оптической плотности анализируемого раствора ЛФ, что следует учитывать при расчете количественного содержания цифетрилина в липосомах. Исходя из этого, в качестве раствора сравнения для спектрофотометрического анализа ЛЛФ цифетрилина предложено использование спиртового раствора «пустых» липосом.

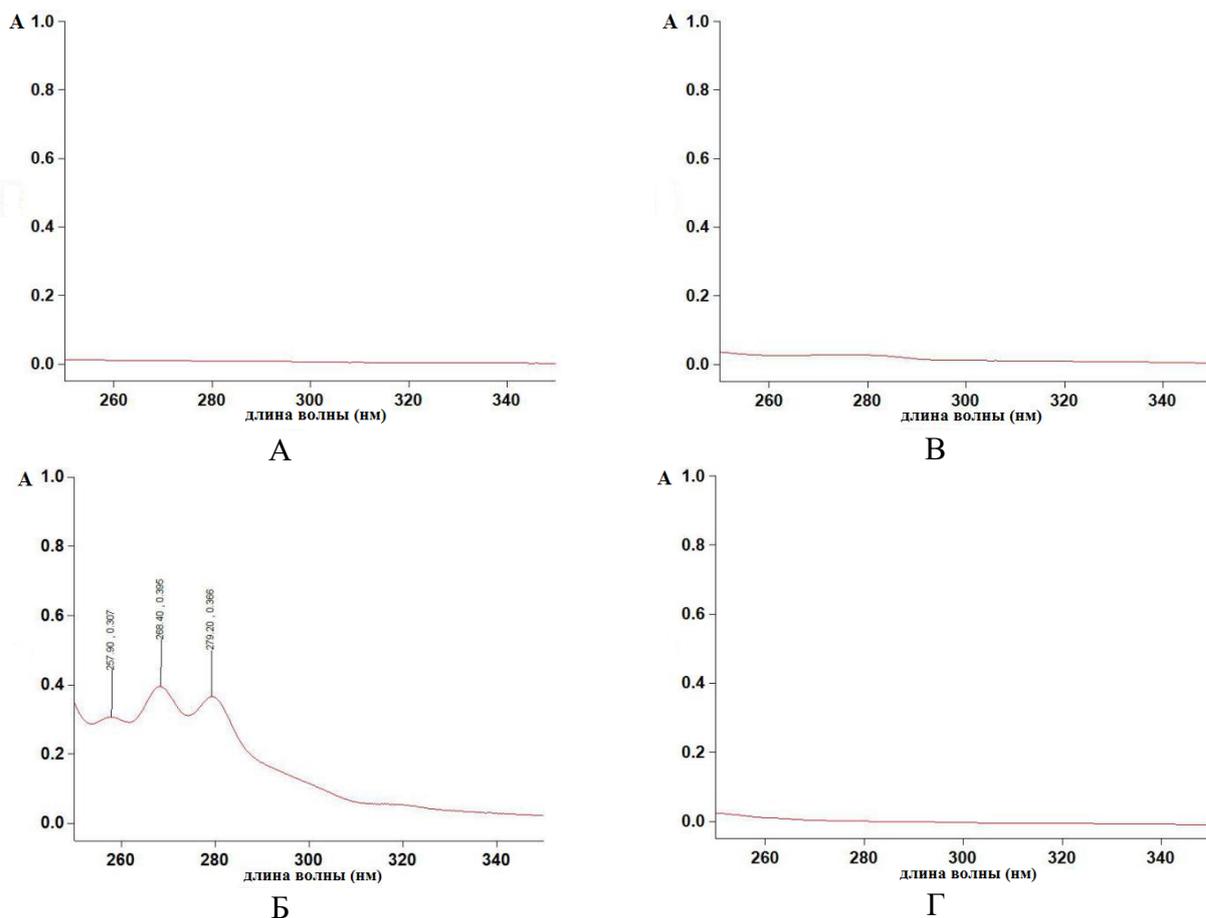


Рисунок 21. Спектры поглощения: А. Раствор сахарозы (концентрация 9 мг/мл), Б. Раствор ЯФХ (концентрация 4мг/мл), В. Раствор холестерина (концентрация 0,4мг/мл), Г. Раствор ПЭГ-ДГФА (концентрация 0,05 мг/мл)

4.2.2. Оценка соблюдения закона Бугера–Ламберта–Бера

Для установления линейной зависимости оптической плотности от концентрации ЛВ и подбора разведения липосомальной дисперсии для анализа готовили 10 образцов спиртовых разведений цифетрилина в диапазоне концентраций от 0,02 до 0,2 мг/мл.

Установлено, что при длине волны 282 нм поглощение спиртового раствора цифетрилина во всём исследуемом интервале концентраций подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера (Рисунок 22, Таблица 18). Оптимальными для проведения количественного определения являлись образцы с концентрацией цифетрилина 0,04–0,12 мкг/мл, оптическая плотность которых находилась в пределах 0,2–0,8.

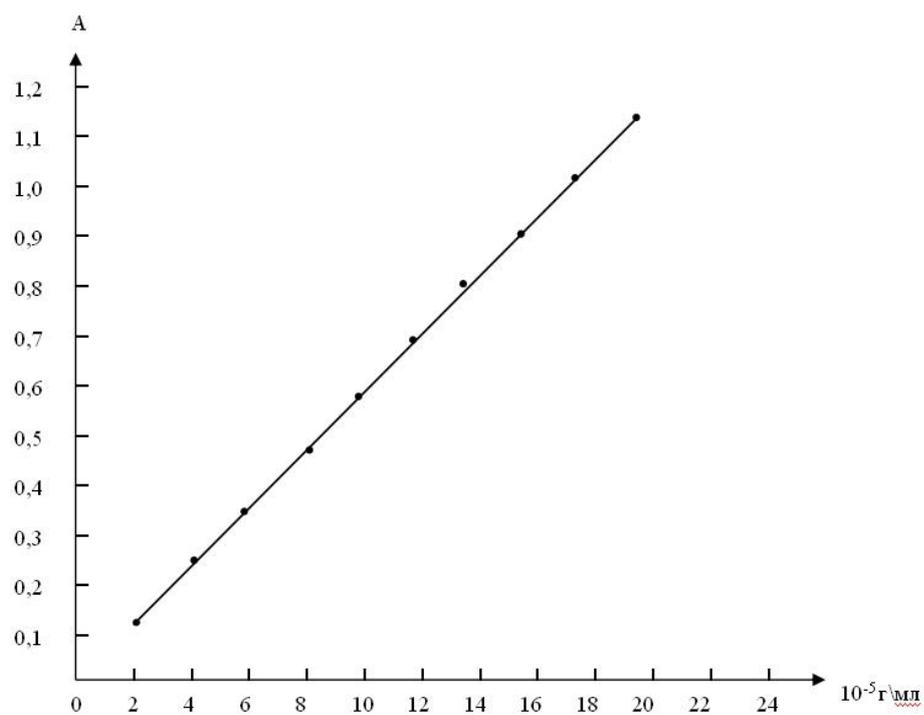


Рисунок 22. Оценка соблюдения закона Бугера–Ламберта–Бера при длине волны 282 нм спиртового раствора цифетрилина

Таблица 18.

Оптическая плотность спиртовых растворов цифетрилина при длине волны 282 нм

№	Концентрация, 10^{-5} г\мл	Оптимальная плотность, при длине волны 282 ± 2 нм
1	20	1,163
2	18	1,042
3	16	0,928
4	14	0,811
5	12	0,699
6	10	0,582
7	8	0,471
8	6	0,345
9	4	0,251
10	2	0,123

4.2.3. Количественное определение цифетрилина в ЛЛФ и ЛЛФ-лио

А. Методика спектрофотометрического определения цифетрилина в ЛЛФ

Приготовление СО цифетрилина. К точной навеске субстанции цифетрилина 4,0 мг добавляют 20 мл спирта 95 %. Полученный спиртовой раствор переносят в мерную колбу объемом 50 мл и доводят спиртом до метки. Раствор применяют свежеприготовленным.

Приготовление раствора сравнения. 4 мл липосомальной дисперсии «пустых» липосом (см. 2.4.1.Б) помещают в мерную колбу объемом 50 мл и доводят спиртом до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора исследуемого образца. В мерную колбу объемом в 50 мл помещают 4 мл липосомальной дисперсии цифетрилина, добавляют небольшое количество спирта 95 %, перемешивают и доводят спиртом до метки.

Измеряют величину оптической плотности исследуемого раствора в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм в максимуме поглощения (282 ± 2) нм относительно раствора сравнения. Параллельно проводят измерение оптической плотности раствора СО субстанции цифетрилина относительно раствора сравнения.

По формуле рассчитывали (разведения одинаковы) концентрацию цифетрилина в ЛЛФ (X, мг/мл):

$$X = A \times a_0 / A_0 \times 4,$$

где: A и A₀ – соответственно оптические плотности растворов образца ЛЛФ и СО цифетрилина; a₀ – навеска СО цифетрилина, в мг; 4 – 4 мл образца ЛЛФ цифетрилина.

Относительная ошибка определения цифетрилина в ЛЛФ по данной методике составляет 0,71% (Таблица 19).

Результаты количественного определения цифетрилина в ЛЛФ

№ образца ЛЛФ цифетрилина	Оптическая плотность, А	Концентрация цифетрилина в образце ЛЛФ, мг/мл
1	0,448	0,99
2	0,458	1,01
3	0,453	1,00
4	0,470	1,04
5	0,452	1,00
6	0,465	1,03
Статистические характеристики	n=6, f=5, $\bar{x}_{\text{ср}}=1,01$, $S^2=3,8 \times 10^{-4}$, $S=1,9 \times 10^{-2}$, $S_{\bar{x}_{\text{ср}}}=8,0 \times 10^{-3}$, $t(P, f)=2,57$ (P=95%), $\Delta x=0,02$, $\epsilon=1,97\%$	

Б. Методика спектрофотометрического определения цифетрилина в ЛЛФ-лио

Приготовление СО цифетрилина. Точную навеску 6,0 мг субстанции цифетрилина растворяют в 30 мл этилового спирта 95 %. В мерную колбу объемом 100 мл количественно переносят полученный спиртовой раствор и доводят спиртом до метки. Раствор применяют свежеприготовленным.

Приготовление раствора сравнения

В мерную колбу объемом 100 мл помещают 6 мл липосомальной дисперсии «пустых» липосом (см. 2.4.1.Б), добавляют небольшое количество этилового спирта 95%, перемешивают и доводят спиртом до метки. Раствор применяют свежеприготовленным.

Приготовление раствора исследуемого образца. К содержимому флакона ЛЛФ-лио цифетрилина добавляют 5,3 мл воды и перемешивают до получения однородной липосомальной дисперсии. В мерную колбу объемом 100 мл количественно переносят полученную дисперсию, доводят спиртом 95 % до метки.

Измеряют величину оптической плотности исследуемого раствора в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм в максимуме поглощения (282 ± 2) нм относительно раствора сравнения. Параллельно проводят

измерение оптической плотности раствора СО субстанции цифетрилина относительно раствора сравнения.

Содержание цифетрилина во флаконе (X, мг) рассчитывают по формуле (разведения образца СО цифетрилина и ЛЛФ-лио одинаковы):

$$X = A \times a_0 / A_0,$$

где: A и A₀ – соответственно оптические плотности растворов образца ЛЛФ-лио и СО цифетрилина; a₀ – навеска СО цифетрилина, в мг.

По данной методике относительная погрешность определения цифетрилина в ЛЛФ-лио составляет не более 1,5 % (Таблица 20).

Таблица 20.

Результаты количественного определения цифетрилина в ЛЛФ-лио

№ образца ЛЛФ-лио цифетрилина	Оптическая плотность, A	Содержание цифетрилина в образце ЛЛФ-лио, мг/флакон
1	0,348	5,93
2	0,355	6,05
3	0,353	6,02
4	0,345	5,88
5	0,357	6,09
6	0,347	5,91
Статистические характеристики	n=6, f=5, x _{ср} =5,98, S ² =7,2×10 ⁻³ , S=8,49×10 ⁻² , Sx _{ср.} =3,46×10 ⁻² , t (P, f)=2,57 (P=95%), Δx=0,09, e=1,51%	

4.2.4. Валидация методики спектрофотометрического анализа цифетрилина

Специфичность

Специфичность – это способность аналитической методики давать правильный результат определения вещества в присутствии сопутствующих компонентов. Для подтверждения специфичности аналитической методики сравнивали электронные спектры поглощения спиртовых растворов субстанции цифетрилина, вспомогательных веществ и ЛЛФ-лио цифетрилина. Как видно на рисунке 23 в области 250–350 нм кривые спиртовых растворов субстанции и ЛЛФ-лио цифетрилина схожи по форме и положению пиков, однако оптическая плотность спиртового раствора вспомогательных веществ в области аналитического максимума цифетрилина – (282 ± 2) нм – составляет значение 0,352, что значительно

влияет на расчеты концентрации ЛВ в ЛЛФ-лио. Таким образом, в ходе количественного анализа цифетрилина измерение оптической плотности необходимо проводить относительно раствора вспомогательных веществ или «пустых» липосом.

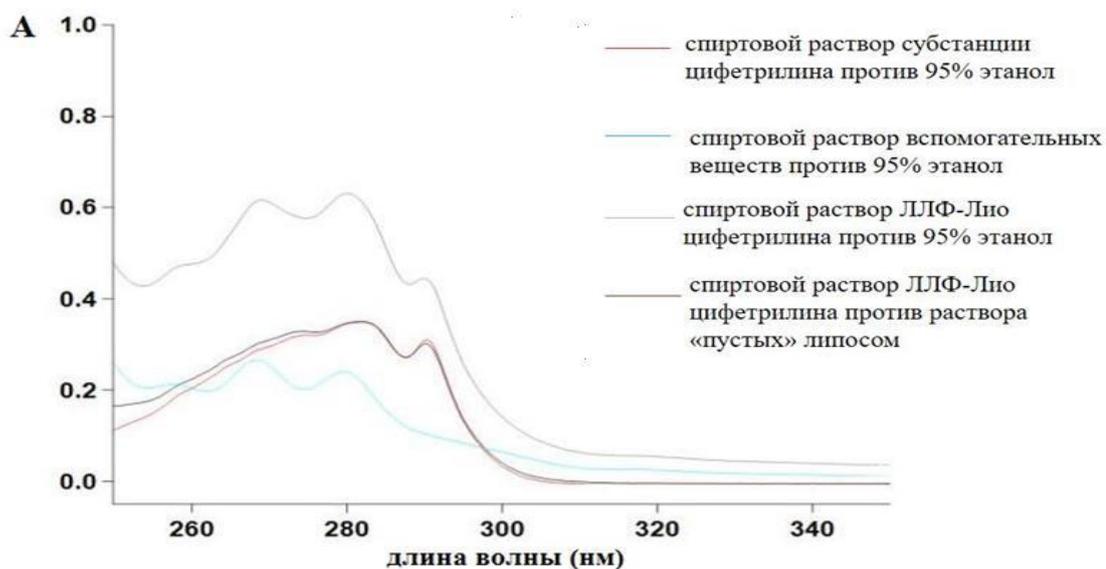


Рисунок 23. Оценка специфичности методики спектрофотометрического анализа цифетрилина

Диапазон применения

Методика количественного определения липосомального цифетрилина должна быть применима в интервале 70–130 % от номинального значения определяемой концентрации ЛВ. Получаемые результаты с применением валидируемой методики в пределах указанного диапазона должны обладать приемлемым уровнем линейности, точности и прецизионности.

Линейность

Линейность аналитической методики считается доказанной, если в выбранном диапазоне применения можно показать прямо пропорциональное соотношение между концентрацией исследуемого вещества в растворе и сигналом детектора.

Линейность разработанной методики спектрофотометрического анализа проверяли измерением аналитических сигналов 7 проб с различными концентрациями цифетрилина в диапазоне от 70 до 130 % от

номинального значения. Для каждой пробы значение оптической плотности получали с помощью расчёта среднего значения из нескольких измерений. Для проведения исследования готовили спиртовые растворы цифетрилина и вспомогательных веществ (модельные смеси ЛЛФ-лио) с концентрациями действующего вещества от 0,7 до 1,3 мг/мл (Таблица 21). Модельную смесь для измерения оптической плотности разводили аналогично липосомальной дисперсии по методике, которая представлена в разделе 4.2.3.А.

Таблица 21.

Составы модельных смесей для оценки методики спектрофотометрического анализа ЛЛФ-лио цифетрилина по показателям «правильность» и «линейность»

Состав		Модельная смесь						
		1	2	3	4	5	6	7
цифетрилин	%	70	80	90	100	110	120	130
	мг/мл (спиртовой раствор компонентов ЛФ)	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3
	мг	4,2	4,8	5,4	6,0	6,6	7,2	7,8
ФХ, мг		318	318	318	318	318	318	318
холестерин, мг		32	32	32	32	32	32	32
ПЭГ-ДФФА, мг		4	4	4	4	4	4	4
<p><i>Примечание.</i> В состав модельных смесей сахарозу не вводили, поскольку она практически не растворима в 95 % этаноле и установлено в предварительном исследовании, что этот вспомогательный компонент не поглощает при (282 ± 2) нм.</p>								

Значение коэффициента корреляции составило более 0,999%, что свидетельствует о наличии линейной зависимости между концентрацией оптической плотности и цифетрилина в диапазоне концентраций от 70 до 130 % (Таблица 22). Для подобной линейной зависимости уравнение регрессии имеет вид $y=0,37x-0,014$ (Рисунок 24).

Таблица 22.

**Оценка линейности методики спектрофотометрического количественного анализа
цифетрилина**

№ образца	Концентрация цифетрилина, %	Концентрация цифетрилина, мг/мл	Оптическая плотность		Регрессия
			Значение	Среднее значение по 3-м образцам	
1	70	0,7	0,246	0,245	0,246
2			0,245		
3			0,244		
4	80	0,8	0,282	0,282	0,281
5			0,280		
6			0,283		
7	90	0,9	0,315	0,315	0,316
8			0,315		
9			0,314		
10	100	1,0	0,355	0,352	0,351
11			0,348		
12			0,353		
13	110	1,1	0,383	0,385	0,386
14			0,385		
15			0,387		
16	120	1,2	0,422	0,422	0,421
17			0,422		
18			0,421		
19	130	1,3	0,457	0,456	0,456
20			0,455		
21			0,456		
Статистические характеристики			Результаты		
Наклон прямой (a)			-0,0026		
Отрезок на оси ординат (b)			0,353		
Доверительный интервал (95%)			0,353±0.007		
Коэффициент корреляции (R)			0,999		

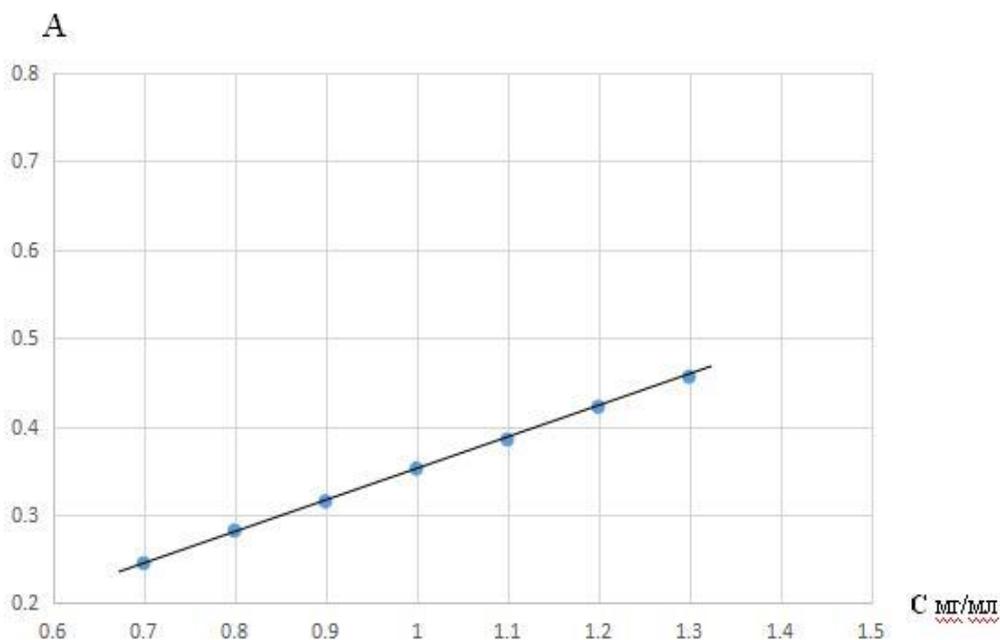


Рисунок 24. Графическое изображение регрессионной прямой линейности методики количественного анализа цифетрилина в ЛФ при 282 нм.

Правильность (точность)

Правильность аналитического метода определяется как близость результатов испытаний к истинному значению, которые получены данным методом.

Правильность методики оценивали путем анализа модельной смеси, которая включает все компоненты ЛЛФ цифетрилина и известное количество определяемого вещества в пределах диапазона применения. Изготавливали модельные смеси вспомогательных веществ с добавлением навески цифетрилина, соответствующей 70, 80, 90, 100, 110, 120 и 130 % от номинальной концентрации (Таблица 23). На каждом уровне проводили по 3 определения.

В ходе исследования установлено, что получаемые экспериментальные значения близки к истинным, а относительная погрешность среднего результата не превышает 0,5 % (Таблица 23). Таким образом, методику спектрофотометрического анализа липосомального цифетрилина можно считать правильной.

Оценка правильности методики спектрофотометрического количественного анализа липосомального цифетрилина

Концентрация, %	№ образца	Цифетрилин, мг		Отклик, %
		Истинное значение	Найденное значение	
70	1	4,24	4,21	99,29
	2	4,20	4,19	99,76
	3	4,20	4,17	99,29
80	4	4,81	4,82	100,21
	5	4,82	4,79	99,38
	6	4,82	4,84	100,41
90	7	5,40	5,38	99,63
	8	5,40	5,38	99,63
	9	5,40	5,37	99,44
100	10	6,01	6,07	101,00
	11	6,00	5,95	99,17
	12	6,03	6,03	100
110	13	6,63	6,55	98,79
	14	6,60	6,58	99,70
	15	6,60	6,62	100,3
120	16	7,20	7,21	100,14
	17	7,21	7,21	100,00
	18	7,21	7,20	99,86
130	19	7,82	7,81	99,87
	20	7,80	7,78	99,74
	21	7,80	7,79	99,87
Статистические характеристики,				Результаты
Наименьшее значение				98,79%
Среднее значение				99,78%
Наибольшее значение				101,00%
Стандартное отклонение				1,031
Доверительный интервал				99,78 ± 0,47
Коэффициент вариации				1,033
Относительная погрешность				0,47

Прецизионность

Прецизионность методики характеризуется рассеянием получаемых с ее использованием результатов относительно значения среднего результата. Прецизионность валидируемой методики спектрофотометрического анализа липосомального цифетрилина проводили путем оценки повторяемости результатов и внутрилабораторной прецизионности.

А. Повторяемость (сходимость)

При установлении сходимости проводили испытание 6 образцов ЛЛФ-лио цифетрилина одной серии в условиях в одной лаборатории одним и тем же исполнителем. Сходимость результатов оценивали путем вычисления значения коэффициента вариации.

Согласно данным, представленным в таблице 24, коэффициент вариации составил менее 10 % (0,98 %), что подтверждает прецизионность методики и свидетельствует малой изменчивости вариационного ряда в условиях повторяемости.

Таблица 24.

Оценка повторяемости методики спектрофотометрического количественного анализа цифетрилина

серия – № образца	цифетрилин, мг/флакон
041016-1	6,07
041016-2	5,98
041016-3	5,95
041016-4	6,00
041016-5	6,11
041016-6	6,02
Статистические характеристики	Полученные результаты
Наибольшее значение,	6,11
Наименьшее значение,	5,95
Стандартное отклонение,	0,0592
Среднее значение,	6,02
Доверительный интервал (P=95 %),	6,02 ± 0,0621
Коэффициент вариации,	0,98 %
Относительная погрешность,	1,03%

Б. Внутрिलाбораторная (промежуточная) прецизионность

Для оценки промежуточной прецизионности методики определяли содержание цифетрилина в 6 пробах ЛЛФ-лио цифетрилина одной серии в условиях одной лаборатории разными аналитиками в разные дни.

При сравнении полученных результатов спектрофотометрического анализа цифетрилина (Таблица 25) обнаружено, что рассчитанное значение критерия Фишера ($F_{\text{рас}} = 1,05$) не превышало его табличного значения ($F_{\text{таб}} = 5,05$) и, соответственно, различие дисперсий $S^2(1)$ и $S^2(2)$ статистически незначимо. Также выполнялось неравенство $t_{\text{рас}} < t_{\text{табл}}$, что говорит об отсутствии систематической ошибки измерений, а расхождения

результатов анализа, которые были получены двумя исследователями, случайны. Таким образом, установлена промежуточная прецизионность методики количественного определения цифетрилина в разработанной ЛЛФ.

Таблица 25.

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики спектрофотометрического количественного анализа цифетрилина

серия - № образца	цифетрилин, мг/флакон	цифетрилин, мг/флакон
	Исследователь 1	Исследователь 2
041016-1	6,07	6,05
041016-2	5,98	5,95
041016-3	5,95	5,93
041016-4	6,00	5,97
041016-5	6,11	6,07
041016-6	6,02	6,03
Статистические характеристики	Полученные результаты	Полученные результаты
Наименьшее значение, мг/флакон	5,95	5,93
Наибольшее значение, мг/флакон	6,11	6,07
Стандартное отклонение, мг/флакон	0,0592	0,0560
Среднее значение, мг/флакон	6,02	5,99
Доверительный интервал (P = 95 %), мг/флакон	6,02 ± 0,0621	5,99 ± 0,0588
Коэффициент вариации, %	0,98	0,94
Относительная погрешность, %	1,03	0,98
$F_{таб} (5 \% ; 5;5) = 5,05$	$F_{рас} = 1,05$	
$t_{таб} (95 \% ; 10) = 2,23$	$t_{рас} = 1,01$	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для контроля качества ЛЛФ цифетрилина и ее лиофилизата разработаны методики качественного ТСХ-анализа компонентов препарата и количественного спектрофотометрического определения содержания ЛВ.

Определены и предложены оптимальные условия хроматографирования, которые обеспечивают наилучшее разделение компонентов ЛФ. Для идентификации цифетрилина и ЯФХ выбрана система растворителей этанол/аммиак водный (7 : 3) (R_f (цифетрилин) = 0,73 и R_f (ЯФХ) = 0,45), холестерин – хлороформ/метанол (9 : 1) (R_f = 0,63), сахарозы – ацетон/ледяная уксусная кислота/вода (15 : 3 : 2) (R_f = 0,72). Проведена оценка пригодности указанных хроматографических систем.

Для определения содержания цифетрилина в ЛЛФ и ее лиофилизате выбрана максимум поглощения при длине волны 282 ± 2 нм. Установлено, что интенсивность поглощения спиртовых растворов ЛЛФ препарата в данном максимуме подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера в диапазоне концентраций от 0,02 до 0,2 мг/мл в пересчете на цифетрилин. Максимумы поглощения в растворах субстанции и ЛФ совпадают. При оценке влияния вспомогательных веществ ЛЛФ на спектральные характеристики действующего вещества обнаружено, что сахароза не поглощает в области 250–350 нм, в то время как компоненты липосомального бислоя (лецитин, холестерин, ПЭГ-ДГФА) в данной области имеют собственное поглощение. Это обстоятельство следует учитывать при анализе, используя в качестве раствора сравнения спиртовой раствор «пустых липосом» с соответствующей концентрацией. Относительная ошибка определения цифетрилина в ЛЛФ и ее лиофилизате не превышает 2,0 %. В результате валидационной оценки установлено, что методика количественного анализа цифетрилина в интервале 70–130 % от номинального значения определяемой концентрации ЛВ является специфичной, линейной, правильной, и прецизионной.

Глава 5. Стандартизация ЛЛФ-лио цифетрилина

5.1. Показатели для стандартизации ЛЛФ-лио цифетрилина

Основной задачей стандартизации ЛФ является установление единой системы показателей качества готовой продукции, методов и средств ее испытания и контроля, а также необходимого уровня надежности продукции в течение длительного времени с учетом ее назначения и применения.

Оценку качества ЛП в различных ЛФ проводят, как правило, по показателям качества, характеризующим конкретную ЛФ, также по показателям качества действующего вещества/веществ и, при необходимости, вспомогательного вещества/веществ данного ЛП [2].

Выбор методов контроля качества проводится на стадии фармацевтической разработки и диктуется задачами контроля производственных стадий, контроля качества готовой продукции, входного контроля субстанции, и вспомогательных веществ и материалов, и закладывается на стадии фармацевтической разработки [1].

Для контроля качества ЛЛФ как после изготовления, так и в процессе хранения с целью изучения их стабильности, используют следующие основные показатели: описание, регидратируемость (растворимость лиофилизата), подлинность, количественное определение, однородность дозирования, однородность массы дозированных ЛФ, размер липосом, значение рН, потеря в массе при высушивании.

1. Описание (внешний вид)

Наработанные опытные серии препарата представляли собой лиофилизированную сухую пористую массу белого цвета.

2. Регидратируемость (растворимость)

При добавлении к содержимому флакона 5,3 мл воды и перемешивании в течение 10 мин должна образовываться однородная дисперсия белого цвета.

3. Подлинность (качественный анализ).

ТСХ-анализ (методика представлена в разделе 4.1.)

При обработке хроматографической пластинки парами хлора и опрыскивания 0,05 % водным раствором калия иодида обнаруживали жёлтые пятна цифетрилина. После помещения хроматограммы в иодную камеру наблюдали пятно ЯФХ желтого цвета и светло-желтые быстро исчезающие пятна холестерина. Опрыскиванием пластинки 20 % серной кислотой с последующим нагреванием в сушильном шкафу до образования розово-фиолетовых пятен идентифицировали холестерин. Образование темно-фиолетовых пятен сахарозы наблюдали при опрыскивании пластинки 0,5 % раствором 1-нафтола и нагревания.

Спектрофотометрический анализ (методика в разделе 4.2.)

Подлинность препарата подтверждается электронным спектром поглощения спиртового раствора, приготовленного по методике количественного определения цифетрилина в ЛЛФ-лио, который обнаруживает в анализируемом диапазоне 250–350 нм два максимума – при длинах волн (282 ± 2) и (290 ± 2) нм (Рисунок 25).

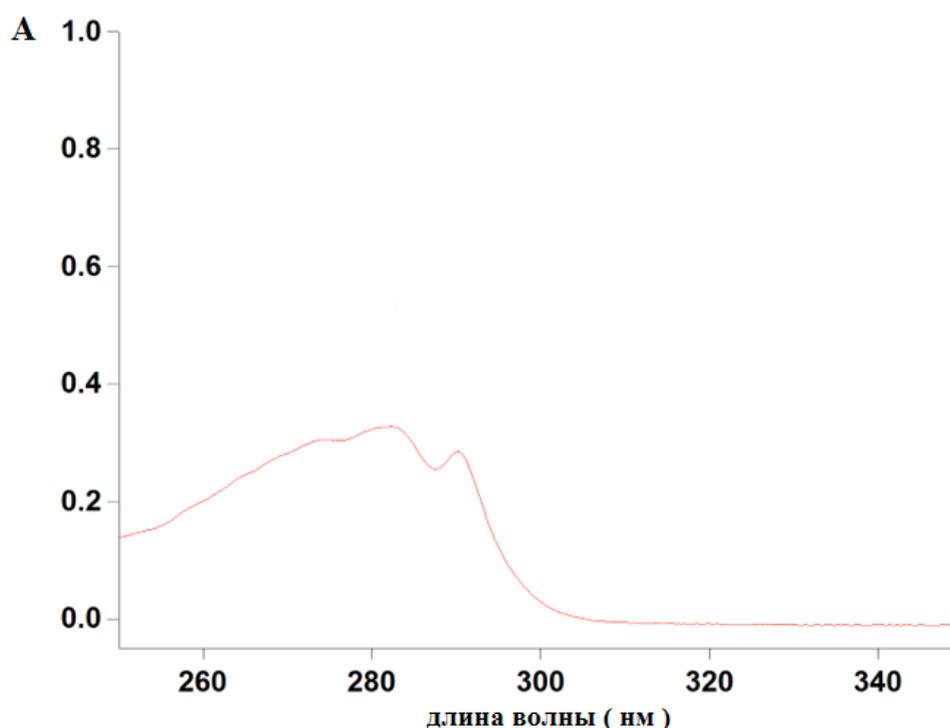


Рисунок 25. Спектр поглощения спиртового раствора ЛЛФ-лио цифетрилина.

4. Количественное определение и однородность дозирования

Количественное содержание цифетрилина в лиофилизате определяли методом прямой спектрофотометрии с использованием раствора рабочего СО при длине волны (282 ± 2) нм по методике, представленной в разделе 4.2.

Испытание по показателю «Однородность дозирования» проводили способом количественного определения содержания цифетрилина порознь в каждом из 10 отобранных флаконах препарата от стандартизируемой серии. Номинальное содержание цифетрилина во флаконе принимали равным 6,00 мг (100 %).

В результате во всех исследованных образцах опытных серий препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» содержание действующего вещества находилось в интервале 5,88–6,35 (соответственно 98–106 %), что укладывается в допустимую норму отклонения ± 15 % от номинала (ОФС.1.4.2.0008.15 «Однородность дозирования») (Таблица 26)

Таблица 26.

Результаты оценки серий ЛЛФ-лио цифетрилина по показателям «Количественное определение» и «Однородность дозирования»

Серия	№ флакона	A	Содержание ЛВ мг/флакон	Содержание ЛВ в % от номинала	Отклонение в % от номинала	Метрологические характеристики
010216	1	0,345	5,88	98,00	-2,00	n=10; f=9; x _{cp} =5.96; S ² =1.96×10 ⁻³ ; S=4,42×10 ⁻² ; Sx _{cp.} =7.42×10 ⁻³ ; t (95%,9) =2,26; Δx=0,03/; ε=0,53%
	2	0,349	5,95	99,17	-0,83	
	3	0,349	5,95	99,17	-0,83	
	4	0,353	6,02	100,33	0,33	
	5	0,352	6,00	100,00	0	
	6	0,354	6,03	100,50	0,50	
	7	0,348	5,94	99,00	-1,00	
	8	0,350	5,96	99,33	-0,67	
	9	0,349	5,95	99,17	-0,83	
	10	0,348	5,94	99,00	-1,00	
020516	1	0,346	5,90	98,33	-1,67	n=10; f=9; x _{cp} =5.98; S ² =1.87×10 ⁻³ ; S=4,32×10 ⁻² ; Sx _{cp.} =7.22×10 ⁻³ ; t (95%,9) =2,26; Δx=0,03; ε=0,52%
	2	0,355	6,05	100,83	0,83	
	3	0,351	5,99	99,83	-0,17	
	4	0,349	5,95	99,16	-0,84	
	5	0,352	6,00	100,00	0	
	6	0,353	6,02	100,33	0,33	
	7	0,350	5,96	99,33	-0,67	
	8	0,351	5,99	99,83	-0,17	
	9	0,348	5,94	99,00	-1,00	
	10	0,352	6,00	100,00	0	

Продолжение таблицы

Серия	№ флакона	A	Содержание ЛВ мг/флакон	Содержание ЛВ в % от номинала	Отклонение в % от номинала	Метрологические характеристики
041016	1	0,356	6,07	101,17	1,17	n=10; f=9; x _{cp} =6,04; S ² =3,1×10 ⁻³ ; S=5,57×10 ⁻² ; Sx _{cp.} =9,22×10 ⁻³ ; t (95%,9) =2,26; Δx=0,04; ε=0,66%
	2	0,351	5,98	99,67	-0,33	
	3	0,349	5,95	99,17	-0,83	
	4	0,352	6,00	100,00	0	
	5	0,359	6,11	101,83	1,83	
	6	0,353	6,02	100,33	0,33	
	7	0,352	6,00	100,00	0	
	8	0,358	6,10	101,67	1,67	
	9	0,357	6,08	101,33	1,33	
	10	0,357	6,08	101,33	1,33	
010317	1	0,372	6,34	105,67	5,67	n=10; f=9; x _{cp} =6,29; S ² =1,61×10 ⁻³ ; S=4,01×10 ⁻² ; Sx _{cp.} =6,38×10 ⁻³ ; t (95%,9) =2,26; Δx=0,03; ε=0,46%
	2	0,371	6,32	105,33	5,33	
	3	0,369	6,29	104,83	4,83	
	4	0,372	6,34	105,67	5,67	
	5	0,366	6,24	104,00	4,00	
	6	0,366	6,24	104,00	4,00	
	7	0,368	6,28	104,67	4,67	
	8	0,371	6,32	105,33	5,33	
	9	0,370	6,30	105,00	5,00	
	10	0,366	6,24	104,00	4,00	
020317	1	0,371	6,32	105,33	5,33	n=10; f=9; x _{cp} =6,29; S ² =1,17×10 ⁻³ ; S=3,43×10 ⁻² ; Sx _{cp.} =5,46×10 ⁻³ ; t (95%,9) =2,26; Δx=0,02; ε=0,39%
	2	0,372	6,34	105,67	5,67	
	3	0,366	6,24	104,00	4,00	
	4	0,366	6,24	104,00	4,00	
	5	0,370	6,30	105,00	5,00	
	6	0,368	6,28	104,67	4,67	
	7	0,367	6,26	104,33	4,33	
	8	0,368	6,28	104,67	4,67	
	9	0,371	6,32	105,33	5,33	
	10	0,370	6,30	105,00	5,00	
030417	1	0,364	6,20	103,33	3,33	n=10; f=9; x _{cp} =6,21; S ² =1,19×10 ⁻³ ; S=3,45×10 ⁻² ; Sx _{cp.} =5,55×10 ⁻³ ; t (95%,9) =2,26; Δx=0,02; ε=0,40%
	2	0,365	6,22	103,67	3,67	
	3	0,363	6,19	103,17	3,17	
	4	0,366	6,24	104,00	4,00	
	5	0,364	6,20	103,33	3,33	
	6	0,365	6,22	103,67	3,67	
	7	0,364	6,20	103,33	3,33	
	8	0,360	6,14	102,33	2,33	
	9	0,364	6,20	103,33	3,33	
	10	0,366	6,24	104,00	4,00	

5. Однородность массы.

К однодозовым ЛФ в индивидуальных упаковках, в частности лиофилизатам, применяют испытание на «однородность массы дозированных лекарственных форм». Испытание проводили на 20 флаконах препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для

приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» каждой испытуемой серии – 010216, 020516, 041016, 010317, 020317 и 030417, отобранных случайным образом. Номинальная масса содержимого флакона составляет 1,107 г.

В результате анализа данных, представленных в таблице 27, во всех исследованных образцах экспериментальных серий препарата масса содержимого флакона находилась в интервале 1,003–1,135 г, средняя масса составила 1,063 г (Таблица №27)

Таблица 27.

Масса содержимого флакона экспериментальных серий препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг»

№ флакона	Серия					
	010216	020516	041016	010317	020317	030417
	М _ф					
1	1,023	1,051	1,025	1,128	1,120	1,055
2	1,005	1,039	1,023	1,130	1,122	1,057
3	1,012	1,045	1,020	1,125	1,115	1,041
4	1,006	1,049	1,022	1,120	1,106	1,052
5	1,022	1,052	1,003	1,131	1,121	1,047
6	1,023	1,052	1,012	1,122	1,110	1,062
7	1,005	1,051	1,010	1,125	1,113	1,048
8	1,011	1,046	1,029	1,120	1,117	1,041
9	1,017	1,048	1,022	1,134	1,120	1,056
10	1,007	1,053	1,003	1,130	1,125	1,057
11	1,018	1,040	1,012	1,126	1,122	1,064
12	1,023	1,042	1,015	1,126	1,121	1,058
13	1,016	1,050	1,016	1,129	1,117	1,054
14	1,024	1,049	1,008	1,132	1,118	1,059
15	1,008	1,048	1,009	1,121	1,110	1,067
16	1,006	1,039	1,013	1,135	1,119	1,043
17	1,029	1,040	1,023	1,134	1,118	1,054
18	1,028	1,045	1,015	1,124	1,124	1,042
19	1,022	1,052	1,024	1,125	1,124	1,063
20	1,023	1,050	1,019	1,135	1,115	1,064
М _{ср}	1,016	1,047	1,016	1,128	1,118	1,054

Примечание: М_ф – масса содержимого флакона, М_{ср} – средняя масса содержимого флакона.

6. Размер липосом

Определения размера липосом в дисперсии проводили методом лазерной дифракции, согласно ОФС.1.2.1.0008.15 «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света», на наносайзере Nicomp 380 Submicron Particle Sizer. Пробоподготовка

представлена в главе 2 «Материалы и методы», в разделе 2.3.4. Из таблицы 28 видно, что размер липосом, получаемых после регидратации ЛЛФ-лио испытываемых серий не превышал 200 нм.

Таблица 28.

Оценка качества серий препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» по показателям «Размер липосом» и «рН»

Показатель	№ флакона	серия					
		010216	020516	041016	010317	020317	030417
размер везикул, нм	1	154 ± 8	144 ± 6	184 ± 8	150 ± 5	162 ± 8	169 ± 4
	2	158 ± 7	142 ± 4	176 ± 5	148 ± 7	158 ± 6	158 ± 7
	3	164 ± 8	155 ± 6	174 ± 6	154 ± 5	163 ± 7	163 ± 5
	4	161 ± 6	154 ± 5	181 ± 7	157 ± 6	165 ± 5	161 ± 5
	5	154 ± 6	137 ± 5	179 ± 6	148 ± 5	157 ± 6	165 ± 7
	Среднее значение	158 ± 6	146 ± 9	179 ± 8	151 ± 6	161 ± 4	163 ± 6
рН	1	6,2	5,5	6,3	6,8	6,4	6,7
	2	6,1	5,6	6,4	6,8	6,5	6,8
	3	6,1	5,6	6,3	6,8	6,4	6,7
	4	6,2	5,5	6,4	6,7	6,5	6,7
	5	6,1	5,7	6,4	6,8	6,5	6,7
	Среднее значение	6,1	5,6	6,4	6,8	6,5	6,7

7. Значение рН

Потенциометрический анализ проводили по методу, представленном в разделе 2.3.4. Значения рН препарата находились в диапазоне 5,5–6,8 (Таблица 28).

8. Потеря в массе при высушивании (остаточная влажность)

Определение влажности препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» проводили с применением метода высушивания в соответствии с ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании». В результате установлено, что потеря в массе не превышала 3 %.

Исследования по стандартизации препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» по показателям качества «Пирогенность», «Аномальная

токсичность», «Стерильность» и «Остаточные органические растворители» продолжают.

5.2. Мониторинг стабильности ЛЛФ-лио цифетрилина при хранении

С целью определения срока годности препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» исследовали стабильность 3 серий (010216, 020516 и 041016), заложенных на хранение после получения в морозильную камеру с температурой -18...-20 °С.

Согласно требованиям ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» [2] оценку качества образцов препарата проводили через каждые 3 месяца в течение первого года хранения и через каждые 6 месяцев – на второй год хранения после получения. Контроль качества экспериментальных серий ЛЛФ-лио цифетрилина в установленные сроки проводили по показателям качества, предложенным для стандартизации разработанного препарата:

- описание
- регидратируемость
- подлинность
- количественное содержание цифетрилина во флаконе
- однородность массы содержимого флакона
- размер липосом
- рН
- потеря в массе при высушивании.

Результаты контроля качества заложенных на хранение серий препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» представлены в таблице 29.

Таблица 29.

Мониторинг стабильности «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» при хранении

Наименование показателя	Норма	Срок хранения, мес.	Результаты контроля качества		
			Серии		
			010216	020516	041016
Описание	Сухая пористая масса белого цвета	0	Соответствует норме	Соответствует норме	Соответствует норме
		3			
		6			
		9			
		12			
		18			
Регидратируемость	При добавлении к содержимому флакона 5,3 мл воды и перемешивании в течение 10 мин должна образовываться однородная дисперсия.	0	Соответствует норме	Соответствует норме	Соответствует норме
		3			
		6			
		9			
		12			
		18			
Подлинность	1. ЭСП 2. ТСХ	0	Соответствуют норме	Соответствуют норме	Соответствуют норме
		3			
		6			
		9			
		12			
		18			
Содержание цифетрилина во флаконе, мг	5,1–6,9	0	5,88	6,10	5,90
		3	5,90	6,07	5,92
		6	5,85	6,11	6,02
		9	5,80	6,10	6,01
		12	5,86	6,10	5,98
		18	5,87	-	-
Однородность массы содержимого флакона, г	0,957–1,169	0	1,011	1,051	1,020
		3	1,020	1,045	1,020
		6	1,008	1,049	1,024
		9	1,014	1,060	1,026
		12	1,017	1,055	1,025
		18	1,016	-	-
Размер липосом, нм	не более 200	0	154 ± 8	145 ± 5	183 ± 6
		3	157 ± 6	137 ± 6	184 ± 8
		6	158 ± 4	154 ± 8	184 ± 3
		9	164 ± 8	149 ± 5	179 ± 4
		12	162 ± 7	152 ± 7	182 ± 5
		18	163 ± 5	-	-
Значение pH	5,4–6,9	0	6,1	5,6	6,4
		3	6,5	5,8	6,5
		6	6,3	5,7	6,3
		9	6,4	6,0	6,1
		12	6,4	5,7	6,2
		18	6,3	-	-
Потеря в массе при высушивании, %	не более 3,00	0	п.о.	0,70	0,19
		3		0,64	0,21
		6	0,20	0,86	0,15
		9	0,18	0,68	0,22
		12	0,15	0,79	0,19
		18	0,16	-	-

Примечание: п.о. – практически отсутствует

Полученные данные анализа экспериментальных серий ЛЛФ-лиоцифетрилина, заложенных на хранение, свидетельствуют об отсутствии

значимых изменений в качестве препарата. Таким образом, на основании вышеизложенного установлен срок годности препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» 6 месяцев. Изучение стабильности и срока годности препарата продолжаются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для стандартизации ЛЛФ-лио цифетрилина после получения и в процессе хранения выбраны показатели качества: описание, регидратируемость (растворимость лиофилизата), подлинность, количественное определение, однородность дозирования, однородность массы дозированных лекарственных форм, размер липосом, значение рН, потеря в массе при высушивании.

Согласно требованиям ОФС.1.1.0010.15 «Хранение лекарственных средств» по выбранным показателям качества исследовали стабильность при хранении трех серий препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг». На основании полученных результатов установлен срок хранения препарата 6 месяцев. Изучение стабильности и срока годности препарата продолжаются.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. По результатам исследований предложен оптимальный состав стерически стабилизированной ЛЛФ цифетрилина для инъекционного введения с молярными соотношениями компонентов цифетрилин/ЯФХ = 1 : 70 и ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДГФА = 1 : 0,2 : 0,014.
2. Разработана технология получения устойчивой при хранении ЛЛФ-лио цифетрилина для инъекционного введения. Для достижения максимальной защиты липосом с цифетрилином при лиофилизации подобран эффективный криопротектор – сахароза, вводимая в липосомальную дисперсию в молярном соотношении ЯФХ/криопротектор 1 : 5.
3. Разработана методика качественного ТСХ-анализа компонентов ЛФ цифетрилина. Для идентификации цифетрилина и ЯФХ предложена система этанол/аммиак водный (7 : 3), холестерин – хлороформ / метанол (9 : 1), сахарозы – ацетон/ледяная уксусная кислота/вода (15 : 3 : 2).
4. Разработана и валидирована методика количественного спектрофотометрического анализа цифетрилина в составе ЛФ при длине волны (282 ± 2) нм с использованием стандартного образца.
5. Выбраны показатели качества для стандартизации ЛФ «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг». По результатам изучения стабильности ЛЛФ-лио цифетрилина определен срок хранения препарата – 6 месяцев.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

Список рисунков

Рисунок 1. СТРУКТУРНЫЕ ФОРМУЛЫ НАТИВНЫХ СОМАТОСТАТИНА-14 И СОМАТОСТАТИНА-28.	12
Рисунок 2. СТРУКТУРНЫЕ ФОРМУЛЫ АНАЛОГОВ СОМАТОСТАТИНА (ОКТРЕОТИД И ЛАНТРЕОТИД), КОТОРЫЕ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ. ...	14
Рисунок 3. СТРУКТУРНАЯ ФОРМУЛА ЦИФЕТРИЛИНА.	28
Рисунок 4. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИФЕТРИЛИНА В ДОЗЕ 0,1 МГ/КГ НА R-3327-Н ДАННИНГА.	29
Рисунок 5. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИФЕТРИЛИНА В ДОЗЕ 0,1 МГ/КГ НА ДМБА-ИНДУЦИРОВАННЫХ ОМЖ.	29
Рисунок 6. ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИФЕТРИЛИНА В СРАВНЕНИИ С САНДОСТАТИНОМ НА ДМБА-ИНДУЦИРОВАННЫХ ОМЖ.	30
Рисунок 7. СТРОЕНИЕ ЛИПОСОМ.	34
Рисунок 8. РАЗМЕР ВЕЗИКУЛ ПОСЛЕ ЭКСТРУЗИИ С ПОЛИКАРБОНАТНЫМ ФИЛЬТРОМ: А – ПОСЛЕ ФИЛЬТРАЦИИ ДО ЭКСТРУЗИИ (215 НМ); Б – ПОСЛЕ 1-КРАТНОГО ПРОПУСКАНИЯ (183 НМ); В – ПОСЛЕ 7-КРАТНОГО ПРОПУСКАНИЯ (151 НМ).....	72
Рисунок 9. РАЗМЕР ВЕЗИКУЛ ПОСЛЕ ЭКСТРУЗИИ С НЕЙЛОНОВЫМ ФИЛЬТРОМ: А – ПОСЛЕ 3-КРАТНОГО ПРОПУСКАНИЯ (269 НМ); Б – ПОСЛЕ 6-КРАТНОГО ПРОПУСКАНИЯ (175 НМ).....	73
Рисунок 10. РАЗМЕР ВЕЗИКУЛ ПОСЛЕ 3- И 7-КРАТНОЙ ЭКСТРУЗИИ С ЦЕЛЛЮЛОЗНЫМ ФИЛЬТРОМ (169 НМ).....	73
Рисунок 11. РАЗМЕР ВЕЗИКУЛ ПОСЛЕ ГОМОГЕНИЗАЦИИ. А – ПОСЛЕ 1 МИН, Б – ПОСЛЕ 2 МИН.	75
Рисунок 12. РАЗМЕР ВЕЗИКУЛ ПОСЛЕ ГОМОГЕНИЗАЦИИ 2 ЦИКЛОВ.....	76
Рисунок 13. РАЗМЕР ВЕЗИКУЛ ПОСЛЕ СПУСТЯ 50 МИН ОЗВУЧИВАНИЯ (179 НМ)	77
Рисунок 14. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ЛИПОСОМ ЦИФЕТРИЛИНА ДО (А) И ПОСЛЕ (Б) ЛИОФИЛИЗАЦИИ.	85
Рисунок 15. ВНЕШНИЙ ВИД ФЛАКОНА С ПРЕПАРАТОМ «ЦИФЕТРИЛИН ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ, ЛИОФИЛИЗАТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИСПЕРСИИ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ 6,0 МГ»	87
Рисунок 16. ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ЛЛФ-ЛИО ЦИФЕТРИЛИНА	88
Рисунок 17. ВИД ХРОМАТОГРАММЫ: А – СИСТЕМА 2 (ЭТАНОЛ/АММИАК ВОДНЫЙ (7 : 3)):.....	96
Рисунок 18. ВИД ХРОМАТОГРАММЫ: АЦЕТОН/ЛУК/ВОДА (15 : 3 : 2).....	100
Рисунок 19. ЭЛЕКТРОННЫЙ СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ СПИРТОВОГО РАСТВОРА СУБСТАНЦИИ ЦИФЕТРИЛИНА (КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИФЕТРИЛИНА В РАСТВОРЕ 0,08 МКГ/МЛ)	103
Рисунок 20. ЭЛЕКТРОННЫЙ СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ СПИРТОВОГО РАСТВОРА «ПУСТЫХ» ЛИПОСОМ С САХАРОЗОЙ.....	104

Рисунок 21. СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ: А. РАСТВОР САХАРОЗЫ (КОНЦЕНТРАЦИЯ 9 МГ/МЛ), Б. РАСТВОР ЯФХ (КОНЦЕНТРАЦИЯ 4МГ/МЛ), В. РАСТВОР ХОЛЕСТЕРИНА (КОНЦЕНТРАЦИЯ 0,4МГ/МЛ), Г. РАСТВОР ПЭГ-ДФА (КОНЦЕНТРАЦИЯ 0,05 МГ/МЛ)	105
Рисунок 22. ОЦЕНКА СОБЛЮДЕНИЯ ЗАКОНА БУГЕРА–ЛАМБЕРТА–БЕРА ПРИ ДЛИНЕ ВОЛНЫ 282 НМ СПИРТОВОГО РАСТВОРА ЦИФЕТРИЛИНА	106
Рисунок 23. ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЦИФЕТРИЛИНА	110
Рисунок 24. ГРАФИЧЕСКОЕ ИЗОБРАЖЕНИЕ РЕГРЕССИОННОЙ ПРЯМОЙ ЛИНЕЙНОСТИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЦИФЕТРИЛИНА В ЛФ ПРИ 282 НМ.	113
Рисунок 25. СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ СПИРТОВОГО РАСТВОРА ЛЛФ-ЛИО ЦИФЕТРИЛИНА.	119

Список таблиц

ТАБЛИЦА 1. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИФЕТРИЛИНА НА РМЖ РМ-1 БЕСТИМУСНЫХ МЫШЕЙ В СРАВНЕНИИ С САНДОСТАТИНОМ	30
ТАБЛИЦА 2. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИФЕТРИЛИНА НА СОЛИДНЫЕ ОПУХОЛИ МЫШЕЙ.....	31
ТАБЛИЦА 3. ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ СУБСТАНЦИИ И ТАБЛЕТОК ЦИФЕТРИЛИНА НА МОДЕЛИ ОПУХОЛИ РШМ-5 ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ В РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ.....	33
ТАБЛИЦА 4. ФЛ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПОЛУЧЕНИИ ЛИПОСОМ.....	35
ТАБЛИЦА 5. МОДЕЛИ СОСТАВОВ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЦИФЕТРИЛИНА	64
ТАБЛИЦА 6. КОНЦЕНТРАЦИЯ МДА В ОБРАЗЦАХ ЛЛФ ЦИФЕТРИЛИНА	67
ТАБЛИЦА 7. ПОТЕРЯ В МАССЕ ЛИПИДНОЙ ПЛЕНКИ С ЦИФЕТРИЛИНОМ В ПРОЦЕССЕ СУШКИ.....	70
ТАБЛИЦА 8. ВЫБОР РАСТВОРИТЕЛЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДИСПЕРСИИ МСЛ ЦИФЕТРИЛИНА	70
ТАБЛИЦА 9. РАЗМЕРЫ ЛИПОСОМ ЦИФЕТРИЛИНА ПРИ ЭКСТРУЗИИ.....	71
ТАБЛИЦА 10. ВЛИЯНИЕ ГОМОГЕНИЗАЦИИ НА КАЧЕСТВО ЛЛФ ЦИФЕТРИЛИНА .	74
ТАБЛИЦА 11. РАЗМЕРЫ ЛИПОСОМ ЦИФЕТРИЛИНА ПРИ ГОМОГЕНИЗАЦИИ ПО ЦИКЛАМ	75
ТАБЛИЦА 12. СРЕДНИЙ РАЗМЕР ЛИПОСОМ ЦИФЕТРИЛИНА ПРИ ОБРАБОТКЕ УЗ .	76
ТАБЛИЦА 13. ВЫБОР КРИОПРОТЕКТОРА ДЛЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ ЛЛФ ЦИФЕТРИЛИНА	81
ТАБЛИЦА 14. ХАРАКТЕРИСТИКА СТАДИЙ «МЕДЛЕННОГО» И «БЫСТРОГО» ЗАМОРАЖИВАНИЯ ПРИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ ЛЛФ ЦИФЕТРИЛИНА	84
ТАБЛИЦА 15. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ЛИОФИЛИЗАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ ЛЛФ ЦИФЕТРИЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ	84
ТАБЛИЦА 16. СОСТАВ ХЛОРОФОРМНОГО РАСТВОРА КОМПОНЕНТОВ ЛЛФ ЦИФЕТРИЛИНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПИДНОЙ ПЛЕНКИ В КРУГЛОДОННОЙ КОЛБЕ ВМЕСТИМОСТЬЮ 2 л.....	86
ТАБЛИЦА 17. ВЫБОР ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ ДЛЯ ТСХ-АНАЛИЗА ЛЛФ ЦИФЕТРИЛИНА	94
ТАБЛИЦА 18. ОПТИЧЕСКАЯ ПЛОТНОСТЬ СПИРТОВЫХ РАСТВОРОВ ЦИФЕТРИЛИНА ПРИ ДЛИНЕ ВОЛНЫ 282 НМ	106
ТАБЛИЦА 19. РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИФЕТРИЛИНА В ЛЛФ.....	108
ТАБЛИЦА 20. РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИФЕТРИЛИНА В ЛЛФ-ЛИО	109
ТАБЛИЦА 21. СОСТАВЫ МОДЕЛЬНЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЛЛФ-ЛИО ЦИФЕТРИЛИНА ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ «ПРАВИЛЬНОСТЬ» И «ЛИНЕЙНОСТЬ»	111
ТАБЛИЦА 22. ОЦЕНКА ЛИНЕЙНОСТИ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЦИФЕТРИЛИНА.....	112

ТАБЛИЦА 23. ОЦЕНКА ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЛИПОСОМАЛЬНОГО ЦИФЕТРИЛИНА	114
ТАБЛИЦА 24. ОЦЕНКА ПОВТОРЯЕМОСТИ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЦИФЕТРИЛИНА	115
ТАБЛИЦА 25. ОЦЕНКА ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ ПРЕЦИЗИОННОСТИ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЦИФЕТРИЛИНА	116
ТАБЛИЦА 26. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ СЕРИЙ ЛЛФ-лио цифетрилина по показателям «Количественное определение» и «Однородность дозирования»	120
ТАБЛИЦА 27. МАССА СОДЕРЖИМОГО ФЛАКОНА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ ПРЕПАРАТА «ЦИФЕТРИЛИН ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ, ЛИОФИЛИЗАТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИСПЕРСИИ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ 6,0 МГ».....	122
ТАБЛИЦА 28. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СЕРИЙ ПРЕПАРАТА «ЦИФЕТРИЛИН ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ, ЛИОФИЛИЗАТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИСПЕРСИИ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ 6,0 МГ» ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ «РАЗМЕР ЛИПОСОМ» И «РН»	123
ТАБЛИЦА 29. МОНИТОРИНГ СТАБИЛЬНОСТИ «ЦИФЕТРИЛИН ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ, ЛИОФИЛИЗАТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИСПЕРСИИ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ 6,0 МГ» ПРИ ХРАНЕНИИ.....	125

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- БМЛ – большие моноламеллярные липосомы
- ИФР-1 – инсулиноподобный фактор роста 1
- ЛВ – лекарственное вещество
- ЛУК – ледяная уксусная кислота
- ЛЛФ – липосомальная лекарственная форма
- ЛЛФ-лио – лиофилизированная липосомальная лекарственная форма
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛС – лекарственное средство
- ЛФ – лекарственная форма
- МЛВ – мультиламеллярные везикулы
- МЛЛ – мультиламеллярные (многослойные) липосомы
- ММЛ – малые моноламеллярные липосомы
- МСЛ – многослойные (мультиламеллярные) липосомы
- ОМЖ – опухоль молочной железы
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- ППСС – препросоматостатин
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- РМЖ – рак молочной железы
- РПЖ – рак предстательной железы
- РПЖЖ – Рак (аденокарцинома) поджелудочной железы
- РЭС – ретикуло-эндотелиальная система
- СТГ – гормона роста (соматотропный гормон)
- ТРО – торможение роста опухоли
- $T_{ф.п.}$ – температура фазового перехода
- УПЖ – увеличение продолжительности жизни
- ФЛ – фосфолипид
- ЭФР – эпидермальный фактор роста
- Akt – protein kinase B
- ССК – cholecystokinin

CHO – chinese hamster ovary
EGF – epidermal growth factor
ERK1/2 – extracellular regulated kinases
FGF – fibroblast growth factors
GH – growth hormone
IGF-1 – insulin-like growth factor 1
IGFBP-1 – insulin-like growth factor-binding protein
MAPK – mitogen-activated protein kinases
MMP-2 – matrix metalloproteinase-2
PI3Ks – phosphoinositide 3-kinases
PKB – protein kinase B
PTPs – protein tyrosine phosphatase
SCLC – Small cell lung cancer
SHP-1 – SH2-protein phosphotyrosine phosphatase-1
SHP-2 – SH2-protein phosphotyrosine phosphatase-2
SSTR1 – somatostatin receptor 1
TIMP-2 – tissue inhibitor of metalloproteinases 2
TNF- α – tumor necrosis factor- α
TSP-1 – thrombospondin 1
VEGF – vascular endothelial growth factor

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Быковского С.Н., Василенко И.А. Деминой Н.Б. и др. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. – 2015. – С. 70-183
2. Государственная фармакопея РФ. 13-ое. // Федеральная электронная медицинская библиотека. – 2015. URL: <http://193.232.7.120/feml>
3. Дмитриева М.В. Автореферат «Создание липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора на основе борированного хлорина E₆» – 2015
4. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В., Бунатян Н.Д. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т.11, №4. – С. 21–27.
5. Каплун А.П., Ле Банг Шон, Краснопольский Ю.М., Швец В.И. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т. 45, № 1. С.3-12
6. Красильников М.А., Лузай Е.В., Щербаков А.М. и др. Участие фосфатидилинозит-3-киназы в регуляции дифференциальной чувствительности клеток меланомы к противоопухолевым агентам. Модель развития гормональной резистентности опухолевых клеток // Биохимия. 2004. – Т.69, №3. – С.399–409
7. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И. Липидная технологическая платформа для создания новых лекарственных форм и транспорта активных фармацевтических субстанций // Биофармацевтический журнал. – 2011. – Т. 3, № 2. – С. 10–18.
8. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов в условиях GMP// Биофармацевтический журнал. – 2009. – Т.1, №3. – С. 18-29.
9. Кубасова И.Ю., Борисова Л.М., Киселева М.Н. и др. Поиск потенциальных противоопухолевых препаратов среди аналогов гипоталамического гормона соматостатина // Российский биотерапевтический журнал. 2006. – Т.5, №3. – С. 128–133.
10. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 2. Липосомальные формы для создания фотоактивируемых липосомальных препаратов в фотобиологических исследованиях // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т.3, №1. – С. 6–12.

11. Михаевич Е.И., Яворская Н.П., Голубева И.С. и др. Исследование возможности создания лекарственной формы цифетрилина для перорального применения // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т.11, №1. – С. 3–8
12. Оборотова Н.А., Ланцова А.В., Полозкова А.П. и др. методические рекомендации технологические методы получения липосом.
13. Санорова Е.В. Автореферат «создание и биофармацевтическое изучение новой липосомальной лекарственной формы тиосенса для фотодинамической терапии» – 2013
14. Смирнова А.П., Сушинина Л.П., Устикина С.В. и др. Синтез и противоопхолевая активность цифетрилина при пероральном введении // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 2. – С.18
15. Смирнова Л.И., Смирнова З.С., Смирнова А.П. и др. Доклиническое и клиническое изучение аналогов соматостатина // Симпозиум «Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств». Москва. 9 – 10 июня. 2008. Тезисы докладов. С.190.
16. Тазина Е.В., Костин К.В., Оборотова Н.А. Особенности инкапсулирования лекарственных препаратов в липосомы. // Химико-фармацевтический журнал 2011; С.30–40
17. Трофимов В.И., Нисневич М.М. Вопросы получения и контроля свойств стерильных липосом с лекарственными препаратами // Вестн. АМН СССР. – 1990. – № 6. – С. 28–32.
18. Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2006. – Vol. 58. – P. 1688–1713.
19. Aillon K.L., Xie Y., El-Gendy N. et. al. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2009. – Vol. 61. – P. 457–466.
20. Alderton F., Humphrey P.P., Sellers L.A. et al. High-intensity p38 kinase activity is critical for p21(cip1) induction and the antiproliferative function of G(i) protein-coupled receptors // Mol. Pharmacol. – 2001. – Vol. 59(5) – P. 1119–1128.
21. Allen TM, Daniel BE, Mendez CJ, Newman MS, Zhu GZ. Insertion of poly (ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. // FEBS Lett. 1996 May 20;386(2-3):243-6.

22. Allen TM1, Sapro P, Moase E, Moreira J, Iden D. Adventures in targeting. // *J Liposome Res.* 2002 Feb-May;12(1-2);P.5-12.
23. Andersson M.M., Breccia J.D., Hatti-Kaul R. Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. // *Biotechnol Appl Biochem.* 2000. Vol. 32. P.145-153.
24. Arcadio Chonn and Pieter R Cullis. Recent advances in liposomal drug-delivery systems. // *Current Opinion in Biotechnology* 1995, 6: P.698-708
25. Arena S, Pattarozzi A, Corsaro A, et al. Somatostatin receptor subtype-dependent regulation of nitric oxide release: involvement of different intracellular pathways//[J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19(1): p.255-267.
26. Batzri S., Korn E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* – 1973. – Vol. 298, № 4. – P. 1015-1019.
27. Behrens I., Pena A.T., Alonso M.J. et al. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: The effect of mucus on particle adsorption and transport. // *Pharm Res.* 2002. Vol.19. P.1185-1193.
28. Benali N, Cordelier P, Calise D, et al. Inhibition of growth and metastatic progression of pancreatic carcinoma in hamster after somatostatin receptor subtype 2 (sst2) gene expression and administration of cytotoxic somatostatin analog AN-238//*J. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(16): P. 9180-9185.
29. Bhardwaj U., Burgess D.J. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone // *International J. of Pharmaceutics.* – 2010. – Vol. 388, № 1-2. – P. 181-189.
30. Bhasin D K, Siyad I. Variceal bleeding and portalhypertension: new lights on old horizon. // *Endoscopy*, 2004, 36:P.120-129.
31. Bhattacharya S, Vijayasekar C, Worliding J, et al. Octreotide in chemotherapy induced diarrhoea in colorectal cancer: a review article. // *Acta Gastroenterol Belg.* 2009 Jul-Sep;72(3):P.289-95.
32. Boros LG, Brandes JL, Yusut FI, et al. Inhibition of the oxidative and nonoxidative pentose phosphate pathways by somatostatin : possible mechanism of antitumor action//*J. Med Hypotheses*, 1998, 50(6): P.501-506.
33. Buscail L, Vernejoul F, Faure P, et al. Regulation of cell proliferation by somatostatin//*J. Ann Endocrinol*, 2002, 63(2): P.13-18.

34. Cerovac V, Monteserin-Garcia J, Rubinfeld HT, et al. The somatostatin analogue octreotide confers sensitivity to rapamycin treatment on pituitary tumor cells//J. Cancer Res, 2010, 70(2): P.666-674.
35. Chelvi TP, Ralhan R.Hyperthermia potentiates antitumor effect of thermosensitive-liposome-encapsulated melphalan and radiation in murine melanoma. //Tumour Biol. 1997;18(4):P.250-60.
36. Chen T. Wang J. Fu J. Wang Z./Status and prospects of research liposomal formulation// digest of the world latest medical information 2003.vol 2. No.4 p721-728
37. Chen C., Han D., Cai C. et al. An overview of liposome lyophilization and its future potential // Journal of Controlled Release. 2010. Vol. 142, № 3. P. 299-231.
38. Chen Z. Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy // Trends in Molecular Medicine, Vol.16 No.12, 2010, P.594-602.
39. Cho K., Wang X., Nie S. et al. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer // Clin Cancer Res 2008;14(5), P. 1310-1316.
40. Cho SJ, Maysinger D, Jain M, Roder B, Hackbarth S, Winnik FM. Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. //Langmuir 2007;23:P.1974-80.
41. Choi A O, Cho S J, Desbarats J, et al. Quantum dot-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells.// Journal of Nanobiotechnology, 2007, 5(1):1.
42. Conradi R.A., Hilgers A.R., Ho N.F. et al. The influence of peptide structure on transport across caco-2 cells.// Pharm Res. 1992. Vol.8. P.1453-1460.
43. Corbo D.C., Huang Y.C., Chein Y.W. Nasal delivery of progestational steroid in ovariectomized rabbits, II: Effect of penetrant hydrophilicity.// Int J Pharm. 1989. Vol.50. P.253-260.
44. Cozzi R, Montini M, Atanasio Retal. Primary treatment of acromegaly with octreotide LAR: alongterm(up to nine years) prospective study of its efficacy in the control of disease activity and tumor shrinkage. //J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91:P.1397-1403.
45. Crowe J.H., Crowe L.M. Factors affecting the stability of dry liposomes // Biochim. Biophys. Acta. – 1988. – Vol. 939, № 2. – P. 327-334.
46. Crowe J.H., Hoekstra F.A., Nguyen K.H. et al. Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids? // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – Vol. 1280, № 2. – P. 187-196.
47. D'Amico G, Pagliaro L, Pietrosi G, et al. Emergency sclerotherapy versus vasoactive drugs for bleeding oesophageal varices in cirrhotic

- patients[M]// The Cochrane Library. John Wiley & Sons, Ltd, 2010:CD002233.
48. Danesi R., Agen C., Benelli U. et al. Inhibition of experimental angiogenesis by somatostatin analog octreotide acetate.//Clin. Cancer Res. 1997. Vol.3. P. 265-272.
 49. David Needham, ,Dennis H. Kim. PEG-covered lipid surfaces: bilayers and monolayers .// Colloids & Surfaces B Biointerfaces , 2000 , 18 (3–4) :P.183-195
 50. De Martino M.C., Hofland L.J., Lamberts S.W. Somatostatin and somatostatin receptors: from basic concepts to clinical applications. //Prog Brain Res, 2010, 182:P.255-280.
 51. Debono M, Newel-Price J. New formulations and approaches in the medical treatment of acromegaly. //Cur Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010, 17:P.350-355.
 52. Dent P, Wang Y, Gu YZ, et al. S49 cells endogenously express subtype 2 somatostatin receptors which couple to increase protein tyrosine phosphatase activity in membranes and down-regulate Raf-1 activity in situ//J. Cell Signal, 1997, 9(7): P.539-549.
 53. Düzgüneş N., Simões S., Lopez-Mesas M., Pedroso de Lima M.C. Intracellular Delivery of Therapeutic Oligonucleotides in pH-Sensitive and Cationic Liposomes. //In: Gregoriadis G., eds. Liposome Technology. 3rd edn. Vol. III. Interactions of Liposomes with the Biological Milieu. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007. – P. 253-275.
 54. Evers B.M., Dilipkumar P., Townsend C.M. et al. Somatostatin and analogs in the treatment of cancer.// What's new in general surgery. 1989. Vol. 213(3). P.190-198.
 55. Feng Y, Huang T, Gao J, et al. Inhibition of metastatic progression of SSTR2 gene transfection mediated by adenovirus in human pancreatic carcinoma cells//J. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2006, 26(1): P.68-71.
 56. Florio T, Yao H, Carey KD, et al. Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1)//J. Mol Endocrinol, 1999, 13(1): P.24-37.
 57. Friedlander TW, Weinberg VK, Small EJ, et al. Effect of the somatostatin analog octreotide acetate on circulating insulin-like growth factor-1 and related peptides in patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer: Results of a phase II study//J. Urol Oncol, 2010, P.1873-2496.

58. Georgiadou M, Notas G, Xidakis C, et al. TNF receptors in Kupffer cells// *J Recept Signal Transduct Res*, 2011, 4(31): P.291-298.
59. Gu J.M., Robinson J.R., Leung S.H. Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surface: Structure-property relationships.// *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1988. Vol.5. P.21-67.
60. Guillermet GJ, Saint LN, Davenne L, et al. Novel synergistic mechanism for sst2 somatostatin and TNFalpha receptors to induce apoptosis: crosstalk between NF-kappaB and JNK pathways// *J. Cell Death Differ*, 2007, 14(2): P.197-208.
61. Hashimoto M., Takada K., Kiso Y. et al. Synthesis of palmitoyl derivatives of insulin and their biological activities.// *Pharm Res*. 1989. Vol.6. P.171-176.
62. Hayry P., Raisanen A., Ustinov J. et al. Somatostatin analog lanreotide inhibits myocyte replication and several growth factors in allograft arteriosclerosis.// *Faseb J*. 1993. Vol. 7. P.1055–1060.
63. He Y, Yuan XM, Lei P, et al. The antiproliferative effects of somatostatin receptor subtype 2 in breast cancer cells.// *J. Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(7): P.1053-1059.
64. Held-Feindt J, Forstreuter F, Pufe T, et al. Influence of the somatostatin receptor sst2 on growth factor signal cascades in human glioma cells.// *J. Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 87(1): P.12-21.
65. Hierowski M.T., Liebow C., du Sapin K. et al. Stimulation by somatostatin of dephosphorylation of membrane proteins in pancreatic cancer MIA PaCa-2 cell line.// *FEBS Lett*. 1985. Vol.179. P.252-256 .
66. Hillgren A., Lindgren J., Alden M. Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH.// *Int J Pharm*. 2002. Vol.237. P.57-69.
67. Hirai S., Yashiki T., Matsuzawa T. et al. Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat.// *Int J Pharm*. 1981. Vol.7. P.317-325 .
68. Ho N.F.H., Day J.S., Barsuhn C.L. et al. Biophysical model approaches to mechanistic transepithelial studies of peptides.// *J Control Release*. 1990. Vol.11. P.3-2.
69. Hobart P., Crawford R., Shen L. et al. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding two disting somatostatin precursor found in the endocrine pancreas of angleship.// *Nature*. 1980. Vol.288. P.137-141.
70. Hotz M.A., Gong J., Traganos F. et al. Flow cytometric detection of apoptosis: comparison of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes.// *Cytometry*. 1994. V. 15. № 3. P.237 – 244.

71. Hutton D.A., Pearson J.P., Allen A. et al. Mucolysis of the colonic mucus barrier by faecal proteinases: Inhibition by interacting polyacrylate.//Clin Sci. 1990. Vol.78. P.265- 27.
72. Ishii A, Imanishi Y, Kobayashi K, et al. The levels of somatostatin receptors in causative tumors of oncogenic osteomalacia are insufficient for their agonist to normalize serum phosphate levels.//J. Calcif Tissue Int, 2010, 86(6): P.455-462.
73. Jia W D, Zhang C H, Xu G L, et al. Octreotide therapy for hepatocellular carcinoma: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. //Hepatogastroenterology, 2010, 57: P.292-299.
74. Kenworthy A.K., Hristova K., Needham D., McIntosh T.J. Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol) // Biophys J. – 1995.– Vol.68, №5. – P. 1921–1936.
75. Keri G., Erchegy J., Horvath A. et al. A tumor-selective somatostatin analog (TT-232) with strong in vitro and in vivo antitumor activity.//Proc Natl Acad Sci USA. 1996. Vol. 93. P.12513–12518.
76. Kidd M, Drozdov I, Joseph R, et al. Diferential cytotoxicity of novel somatostatin and dopamine chimeric compounds on bronchopulmonary and small intestinal neuroendocrine tumor cell lines.// Cancer, 2008, 113:P.690-700.
77. Kuriyama I, Miyazaki A, Tsuda Y. Inhibitory effect of somatostatin Peptide analogues on DNA polymerase activity and human cancer cell proliferation// J. Anticancer Res, 2010, 30(12):P. 4841-4849.
78. Lai H S, Chen Y. Effect of octritide on post operative intraperitoneal adhesion in rats.// Scand J Gastroenterol, 1996;31:P.678-681.
79. Laklai H, Laval S, Dumartin L, et al. Thrombospondin-1 is a critical effector of oncosuppressive activity of sst2 somatostatin receptor on pancreatic cancer.// J. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 10(42): P.17769-17774.
80. Lamberts S.W.J., Reubi J.C., Uiterlinden P. et al. Studies on the mechanism of action of the inhibitory effect of somatostatin analog SMS 201-995 on the growth of the prolactin/adrenocorticotropin –secreting pituitary tumour 7315a.// Endocrinology. 1986. Vol.118. P.2188-2194.
81. Laukkanen ML1, Alfthan K, Keinänen K. Functional immunoliposomes harboring a biosynthetically lipid-tagged single-chain antibody. // Biochemistry. 1994 Sep 27;33(38):P.11664-70.

82. Lee R.J, Low P.S.Li M, Wang XC, Li W, et al. Somatostatin receptor-1 induces cell cycle arrest and inhibits tumor growth in pancreatic cancer// J. Cancer Sci, 2008, 99(11): P.2218-2223.
83. Liebow C., Hierowski M.T., du Sapin K. Hormonal control of pancreatic cancer growth.//Pancreas. 1986. Vol. 1. P.44-48.
84. Liu Y. , Wang X. , Wei J. , et al . The synergistic effect of octreotide on non-small eell lung eaneer inhibited by paclitaxel.// Chin J Cancer Biother , 2008, 15(3): P.210-216.
85. Liu Y. , Kuang S. , Huang X. , et al . The study on expression of growth factor of vascular endothelial cells in hepatocellular carcinoma was inhibited by somatostatin analogue.// J South Med Univ. 2008, 28(9): P.1677-1678.
86. Liu ZR, Qin RY, Wu GS. Effect of octreotide on human pancreatic cancer cells after transfected with somatostatin receptor type 2 gene.// J. World J Gastroenterol, 2004, 10(1-5): P.2292-2294.
87. Ludvigsen E, Stridsberg M, Taylor JE, et al. Subtype selective interactions of somatostatin and somatostatin analogs with SST1, SST2, and SST5 in BON-1 cells. // J. Med Oncol, 2004, 21(3):P. 285-295.
88. Manoj K, Liu Z. , Tian R. , et al. Growth inhibition receptor 2 gene transfection inhibited the growth mechanism of pancreatic tumor cells // Chinese Medical Journal , 2004, 84(9): P.760-765.
89. Massa A, Barbieri F, Aiello C, et al. The phosphotyrosine phosphatase eta mediates somatostatin inhibition of glioma proliferation via the dephosphorylation of ERK1/2[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1030: P.264-274.
90. Mazziotti G., Floriani I., Bonadonna S.,etal.Efects of Somatostatin Analogson Glucose Homeostasis: A Metaanalysis of Acromegaly Studies.// J.Clin.Endocrinol.Metab, 2009, 94:P.1500-1508.
91. Miyajima K. Role of saccharides for the freeze–thawing and freeze drying of liposome // Adv. Drug Deliv. Rev. – 1997. – Vol. 24, № 2-3. – P. 151–159.
92. Nikolopoulou V N, Thomopoulos K C, Katsakoulis E C, etal. The efect of octreotide as an adjunct treatment in active non variceal upper gastrointestinal bleeding. //J Clin Gastroenterol, 2004, 38: P.243-247.
93. Oberg K. State of the art and future prospects in the management of neuroendocrine tumors.// J. The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN)

- [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), 2000, 44(1):P.3-12.
94. Ohtake S., Schebor C., Palecek S.P. et al. Phase behavior of freeze-dried phospholipid–cholesterol mixtures stabilized with trehalose // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. –Vol. 1713, № 1. – P. 57-64.
 95. Pagès P, Benali N, Saint-Laurent N, et al. Sst2 somatostatin receptor mediates cell cycle arrest and induction of p27(Kip1) Evidence for the role of SHP-1// *J Biol Chem*, 1999, 274(21): P.15186-15193.
 96. Park J W, Hong K, Carter P, et al. Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy.//*J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(5):P.1327-31.
 97. Qin Y. , Li J. , Li S. , et al . Study on the effect of somatostatin in reversing the drug resistance of cystis cell line.// *Chinese Journal of Surgery* , 2008, 46(5): P.381-383.
 98. Ram I.M., Ajit S.N., Laura T. et al. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs.// *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2003. Vol.20. P.153-214.
 99. Reardon DB, Dent P, Wood SL, et al. Activation in vitro of somatostatin receptor subtypes 2, 3, or 4 stimulates protein tyrosine phosphatase activity in membranes from transfected Ras-transfected NIH3T3 cells: coexpression with catalytically inactive SHP-2 blocks responsiveness.// *J. Mol Endocrinol*, 1997, 11(8): P.1062-1069.
 100. Redding T.W., Schally A.V. Inhibition of growth of pancreatic carcinomas in animal models by analogs of hypothalamic hormones.//*Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* 1984. Vol. 81. P.248-252 .
 101. Reubi J.C. A somatostatin analog inhibits hondrosarcoma and insulinoma tumour growth.// *Acta Endocrinologica.* 1985. Vol. 109. P.108-114.
 102. Richardson E.S., Pitt W.G., Woodbury D.J. The role of Cavitation in Liposome Formation // *Biophysical J.* – December 2007. Vol.93, № 12 P. 4100-4107.
 103. RJ Lee , PS Low . Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis.// *J Biol Chem.* 1994 Feb 4;269(5):P.3198.
 104. Roskopf D., Schurks M., Manthey I. et al. Signal transduction of somatostatin in human B lymphoblasts.// *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003. Vol. 284. P.179–190.

105. Sakurabayashi S, Koh K C, Chen L, Groszmann R J. Octreotide ameliorates the increase in colateral blood flow during post prandial hyperemia in portal hypertensive rats.// *J Hepatol*, 2002, 36:P.507-512.
106. Sas D A, Chopra K B. Portal hypertension and variceal hemorrhage.// *Med Clin North Am*, 2009, 93:P.837-853.
107. Scambia G., Panici P.B., Baijocchi G. et al. Antiproliferative effects of somatostatin and of the somatostatin analog SMS 201-995 on three human breast cancer cell lines.//*J. Cancer Res. Clin. Oncology*. 1988. Vol. 106. P.416-422.
108. Schally A.V. Oncological applications of somatostatin analogs.// *Cancer Research*. 1988. Vol. 48, P.6977-6985.
109. Schally A.V., Comary-Schally A.M., Nagy A. et. al. Hypothalamic hormones and cancer.// *Front. Neuroendocrinol*. 2001. Vol. 22. P.248-291.
110. Sereemasun A, Rojanathanes R, Wiwanitkit V. Effect of Gold Nanoparticle on Renal Cell: An Implication for Exposure Risk// *J. Renal Failure*, 2008, 30(3):P.323-325.
111. Sharma K, Patel YC, Srikant CB. C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest.// *J. Mol Endocrinol*, 1999, 13(1): P.82-90.
112. Setyono-Han B., Henkelman M.S., Foekens J.A. et al. Direct inhibitory effects of somatostatin (analogues) on the growth of human breast cancer cells./*Cancer Res*. 1987. Vol. 47. P.1566-1570.
113. Sheridan M.A., Kittilson J.D., Ehrman M.M. et al. "Polygenic expression of somatostatin in rainbow trout" in Kawashima S, Kikuyama S (eds.) *Advances in comparative endocrinology*. 1997. P.291-294
114. Silva R., Ferreira H., Little C. et al. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2010. – Vol. 17, № 3. – P. 628-632.
115. Singh P., Townsend C.M. A long action somatostatin analog (SRIF) (201-995) and proglumide (PGL) inhibit the trophic and gastrin receptor (GR) regulatory effects of pentagastrin (PG) on mouse colon cancer (MC-26) cells in vivo./*Gastroenterology*. 1986. Vol. 90. P.1636.
116. Singh P., Townsend C.M. A long action somatostatin analog (SRIF) (201-995) and proglumide (PGL) inhibit the trophic and gastrin receptor (GR) regulatory effects of pentagastrin (PG) on mouse colon cancer (MC-26) cells in vivo./*Gastroenterology*. 1986. Vol. 90. P.1636
117. Smirnova L.I., Smirnova A.P., Ustinkina S.V. et al. Synthesis and antitumor activity of modified somatostatin analogues./ *Journal of Peptide*

- Science 3rd International and 28th European Peptide Symposium, September 5-10, 2004, Prague, Czech Republic, p.261
118. Smirnova L.I., Smirnova A.P., Ustinkina S.V. et al. Synthesis and antitumour activity of modified somatostatin analogues. //Peptides 2004 Proceeding of the Third International and Twenty-Eighth European Peptide Symposium, September 5-10, 2004. – Prague, Crech Republic, P.946-947.
 119. Smith J.P., Solomon T.E. Effects of gastrin, proglumide and somatostatin on growth of human colon cancer. /Gastroenterology. 1988. Vol. 95.:P. 1541-1548.
 120. Songgang L, Jiyu L, Gongwei, et al. Somatostatin enhances the chemosensitivity of GBC-SD cell line to doxorubicin through arresting the cell cycle to Sphase rather than through the P53/ Bax-depended apoptosis way in vitro.// J. Hepatogastroenterology, 2009, 56(95): P.1253-1260.
 121. Strosberg J, Kvols L. Antiproliferative effect of somatostatin analogs in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.// World J Gastroenterol, 2010:28, 16(24):P.2963-2970.
 122. Srikant CB, Shen SH. Octapeptide somatostatin analog SMS 201-995 induces translocation of intracellular PTP1C to membranes in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells.//J. Endocrinology, 1996, 137(8): P.3461-3468.
 123. Sułkowski W.W., Pentak D., Nowak K. et al. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability // J. Mol. Struct. 2005. Vol. 744–747. – P. 737-747.
 124. Sun P. , Hu J. , Lin W. , et al . The effects of preoperative regional arterial perfusion growth inhibition and chemotherapy drugs on proliferating apoptosis and vascular formation in colon cancer cells.// Journal of Modern Oncology , 2007, 15(2):P. 222-224.
 125. Sun W.Q., Leopold A.C., Crowe L.M. et al. Stability of dry liposomes in sugar glasses // Biophys. J. – 1996. – Vol. 70, № 4. – P. 1769-1776.
 126. Susini C., Buscail L. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumour agents.//Annals of Oncology. 2006. Vol. 17/12.P. 1733-1742.
 127. Tang X, Takekoshi S, Itoh J, et al. Somatostatin analogue inhibits the mobility of prostate carcinoma cells: a new therapeutic method for advanced prostate carcinoma.//J. Int J Oncol, 2010, 37(5):P. 1077-1083.
 128. Tao Chen -A Lewis S. Choi,B Susan Einstein,B Matthew A. Klippenstein, Peter Scherrer And Pieter R. Cuisqb. Proton-induced permeability and

- fusion of large unilamellar vesicles by covalently conjugated poly(2-ethylacrylic acid). // Journal of liposome research, 1999,9(3), P.387-405
129. Thangaraju M , Shanua K, Liu D, et al. In terdependent regulation of intracellular acidification and SHP-1 in apoptosis[J]. Cancer Res, 1999, 59(7): P.1649-1654.
 130. Theodoropoulou M, Zhang J, Laupheimer S, et al. Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing zac1 expression// J. Cancer Res, 2006, 66(3): P.1576-1582.
 131. Tom assetti P, Migliori M, Caleti G C, etal. Treatment of type II gastric carcinoid tumors with somatostatin analogues. // N Engl J Med, 2000.343:P.551-554.
 132. Torchilin V. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers // Nat. Rev. Drug Discov. – 2005. – Vol. 4, № 2. – P. 145-160.
 133. Tsinontides S.C., Rajniak P., Hunke W.A. et al. Freeze drying principles and practice for successful scale-up to manufacturing // International Journal of Pharmaceutics. – 2004. – Vol. 280, № 1-2. – P. 1-16.
 134. Upp J.R., Olson D., Poston G.J. et al. Inhibition of growth of two human pancreatic adenocarcinomas by somatostatin and analog SMS 201-995./ Am. J. Surgery. 1988. Vol. 155. P.29-35 .
 135. Vale W., Brazeau P., Rivier C. et al. Somatostatin.//Rec. Prog. Hormone Res. 1975. Vol. 31.P. 365-397.
 136. Voinea M, Simionescu M. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs.// J Cell Mol Med. 2002 Oct-Dec;6(4):P.465-74.
 137. Wagner A., Vorauer-Uhl K. Liposome technology for Industrial Purposes // Journal of Drug Delivery. – 2011. – Vol. 2011, № 2011[Электронный пeчeпc]. – URL:<http://www.hindawi.com/archive/2011/591325>.
 138. Woeste G, Wullstein C, Meyer S, et al. Octreotide attenuates impaired microcirculation in postischemic pancreatitis when administered before induction of ischemia.//J. Transplantation, 2008, 86(7):P.961-967.
 139. Xiping Z , Jie Z, Qin X, et al. In fluence of baicalin and octreotide on NF-kappa Band p-select in expression in liver and kidney of rats with severe acute pancreatitis.// Inflammation, 2009, 32:P.1-11.
 140. Yamaguchi M, Yamada Y, Hosokawa Y, et al. Long-term suppressive effect of octreotide on pro gression of metastatic gastrinoma with multiple endocrine neoplasia type 1: seven-year follow up.//J. Intern Med, 2010, 49(15): P.1557-1563.

141. Yamaguchi T., Nomura M., Matsuoka T. et al. Effect of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2009. –Vol. 160, № 1. – P. 58-62.
142. Yao Liu, Li Jiang, Yi Mu. Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 are associated with better survival in operable hepatitis B-related hepatocellular carcinoma following octreotide long-acting release treatment. // *Oncol Lett*. 2013 Sep;6(3):P.821-828.
143. Zhou T, Xiao X, Xu B, et al. Overexpression of SSTR2 inhibited the growth of SSTR2-positive tumors via multiple signaling pathways[J]. *Acta Oncologica*, 2009, 48(3):P.401-10.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

УТВЕРЖДАЮ
Директор НИИ ЭДиТО
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России,
к.фарм.н. Шпрах З.С.



« » 2017 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных достижений

Мы, члены комиссии в составе: и.о. зав. лабораторией разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, к.фарм.н. О.Л. Орлова; ст.н.с. лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, А.П. Полозкова; н.с. лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, к.фарм.н. М.В. Дмитриева, составили настоящий акт, о том что

наше подразделение лаборатория разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России использует в повседневной работе

следующее предложение: использование результатов диссертационной работы Си Чжан «Разработка инъекционных лекарственных форм цифетрилина», в том числе технологию изготовления лекарственного препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг».

Авторы предложения: в.н.с. лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, доктор фармацевтических наук, профессор Н.А. Оборотова и соискатель ученой степени кандидата фармацевтических наук Си Чжан.

И.о. зав. лабораторией разработки лекарственных форм
НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, к.фарм.н.

 О.Л. Орлова

Ст.н.с. лаборатории разработки лекарственных форм
НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

 А.П. Полозкова

Н.с. лаборатории разработки лекарственных форм
НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, к.фарм.н.

 М.В. Дмитриева

Приложение 2

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной и
инновационной деятельности
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
д. м. н., профессор Шевченко С.Б.

№ _____

« _____ » _____ 20 ____ г.

« _____ » _____ 20 ____ г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных достижений

Мы, ниже подписавшиеся, комиссия в составе: профессор, д.ф.н. Краснюк И.И., доцент, к.ф.н. Бардаков А.И., доцент к.ф.н. Козлова Ж.М., доцент к.ф.н. Соловьёва. Н.Л.

Составили настоящий акт о том, что наше подразделение кафедра фармацевтической технологии Института фармации и трансляционной медицины Научно-технологического парка биомедицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

используют в повседневной работе с «1» сентября 2017г.

следующее предложение: результаты научно-исследовательской работы «Разработка инъекционных лекарственных форм цифетрилина» в лабораторном практикуме студентов по темам: «Инъекционные лекарственные формы» и «Биофармация». По теме НИР совершенствование образовательной технологии додипломного и последипломного фармацевтического образования

авторы предложения: заведующий кафедрой, профессор, д.ф.н. Краснюк И.И., аспирант Чжан Си.

кафедра фармацевтической технологии, ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Профессор, д.ф.н.

 Краснюк И.И.

Доцент, д.ф.н.

 Соловьёва. Н.Л.

Доцент, к.ф.н.

 Бардаков А.И.

Доцент, к.ф.н.

 Козлова Ж.М.

Аспирант

 Чжан Си

Приложение 3

Изучение противоопухолевой активности ЛЛФ цифетрилина

Место проведения исследования. Лаборатория экспериментальной химиотерапии НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Целью настоящего исследования являлось изучение противоопухолевой активности ЛЛФ цифетрилина на мышах.

Результаты исследования

Противоопухолевая активность липосомального цифетрилина была изучена на солидных опухолях мышей – аденокарциноме молочной железы Ca-755, эпидермоидной карциноме легкого Льюис LLC и РШМ–5. На исследуемых опухолях показан недозозависимый противоопухолевый эффект цифетрилина в составе ЛЛФ равный 53–91 % после ежедневного подкожного или внутривенного введения ЛВ в течение 5 дней в различных дозах (Таблица 1). Кроме того, установлено, что цифетрилин в составе ЛЛФ оказывал более высокий терапевтический эффект по сравнению его таблетированной лекарственной формой (Таблица 1).

Таблица 1. Противоопухолевая активность липосомальной и таблетированной ЛФ цифетрилина на солидные опухоли мышей

ЛФ	Путь введения	Доза/режим введения	режим введения	Максимальное ТРО%		
				Ca-755	LLC	РШМ – 5
ЛЛФ	внутривенный	5 мг/кг	1 раз в сутки в течение 5 дней	-	87	-
		10 мг/кг		80	76	77
		20 мг/кг		72	91	74
		30 мг/кг		-	-	-
	подкожный	5 мг/кг		-	53	-
		10 мг/кг		63	53	85
		20 мг/кг		89	76	80
		30 мг/кг		62	-	-
Таблетки	пероральный	10 мг/кг	44	27	46	

Выводы

Исследование противоопухолевой активности ЛЛФ цифетрилина показало, что препарат эффективен при терапии солидных опухолей мышей – аденокарциноме молочной железы Ca-755, эпидермоидной

карциноме легкого Льюис LLC и РШМ-5. При сравнении противоопухолевого действия цифетрилина в ЛЛФ и таблетках в изученных режимах установлено, что по показателю ТРО эффективность липосомального цифетрилина превышает таковую таблеток.