

На правах рукописи

Чжан Си

**РАЗРАБОТКА ИНЪЕКЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ
ЦИФЕТРИЛИНА**

14.04.01 – технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

Москва – 2018

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет))

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Краснюк Иван Иванович

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук, профессор

Оборотова Наталия Александровна

Официальные оппоненты:

Молохова Елена Игоревна – доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии, профессор кафедры

Котова Елена Александровна – кандидат фармацевтических наук, ООО «СОЛЮР-ФАРМА», ведущий менеджер по регистрации лекарственных средств

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации (ФГАОУ ВО «РУДН» Минобрнауки России)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский б-р, д. 37/1 и на сайте организации – www.sechenov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д208.040.09

доктор фармацевтических наук,
профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 рецептор опосредованного 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, 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 пентапептидцифетрилин. В исследованиях *in vivo* цифетрилин подавляет секрецию соматотропного гормона, 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.

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-лиоцифетрилина.
4. Разработать методику количественного анализа для контроля качества ЛЛФ и ЛЛФ-лиоцифетрилина.
5. Выбрать показатели качества для стандартизации ЛЛФ-лиоцифетрилина 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 «Цифетрилинлипосомальный, 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-лиоцифетрилина 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 «Цифетрилинлипосомальный, 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-лиоцифетрилина.
- Показатели качества ЛЛФ-лиоцифетрилина 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 научных работ, 3 из которых являются статьями в журналах, включенных в перечень ведущих периодических изданий ВАК РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

В исследованиях использована стандартизованная субстанция цифетрилина синтезированная в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Структурная формула цифетрилина представлена на рис. 1. при проведении исследований ЛЛФ и ЛЛФ-лиоцифетрилина использовали вспомогательные вещества и реактивы, которые соответствовали требованиям НД (ГОСТ, ТУ, фармакопейных статей ГФ XIII, PhEur 8.0, USP30-NF25).

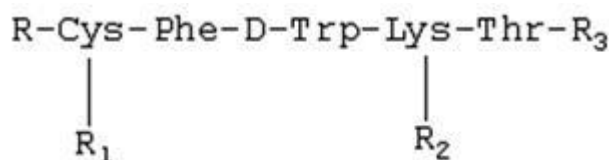


Рисунок 1. Структурная формула цифетрилина: R – трет-бутилоксикарбонил, R₁ – тетрагидропиранил, R₂ – N – бензилоксикарбонил, R₃ – метил

1. Получение многослойных липосом (МСЛ) цифетрилина. Навески цифетрилина и ингредиентов липосомальногобислая – яичного фосфатидилхолина (ЯФХ, *E PC S Lipoid, Германия*), холестерина (Хол, *Sigma-Aldrich, Co., Япония*) и полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламина (ПЭГ-ДГФА, *Lipoid, Германия*) растворяли в хлороформе. Полученный раствор фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр «Pall» (*ООО Палл Евразия, Россия*) с размером пор 0,22 мкм, переносили в круглодонную колбу и упаривали на роторном испарителе (*HeidolphHei-VAP Advantage, Германия*) при температуре водяной бани 37 ± 1 °C в условиях низкого давления до образования полупрозрачной липидной пленки. Для удаления остаточного растворителя пленку досушивали под вакуумом (120–150 мбар) в течение 50 мин, затем гидратировали раствором криопротектора с образованием дисперсии МСЛ цифетрилина, которую фильтровали под давлением через нейлоновые мембранные фильтры «Pall» с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм.

2. Получение однослойных липосом (ОСЛ) цифетрилина. Для получения ОСЛ профильтрованную дисперсию МСЛ цифетрилина:

- экстрадировалина приборе *LipexTM (NorthernLipidsInc., LipexBiomembranes, Inc., Канада)*, пропуская через фильтры – нейлоновые «Pall», поликарбонатные «Nuclepore» (*Whatman, Великобритания*) или фильтр из сложных эфиров целлюлозы (*MerckMillipore, Ирландия*) с диаметром пор 0,22, 0,2 и 0,22 мкм соответственно.
- гомогенизировалина *Microfluidizer M-110S (Microfluidics, США)*,
- обрабатывали в УЗ-ванне *Transsonic T310 (Elma, Германия)* с частотой 20 кГц.

3. Дозирование и лиофилизация ЛЛФ цифетрилина. Стерильную дисперсию ОСЛ цифетрилина разливали во флаконы по 6 мл и лиофилизировали в камере сублимационной сушки «EdwardsMinifastDO.2» (EroElectronicS.p. A., Италия).

4. Методы анализа ЛЛФ и ЛЛФ-лиоцифетрилина

- *Качественный анализ компонентов ЛЛФ и ЛЛФ-лиоцифетрилина.* Для установления подлинности компонентов разработанной ЛЛФ-лиоцифетрилина применяли метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием пластинок «Sorbfil» (Россия) размером 150 × 100 мм.
- *Количественный анализ цифетрилина.* Количественное содержание цифетрилина определяли методом спектрофотометрии с использованием стандартного образца (СО) при длине волны (282 ± 2) нм на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Inc., Австралия). Оптическую плотность спиртовых растворов липосомального цифетрилина измеряли относительно спиртового раствора «пустых» липосом.
- *Определение количества препарата включенного (КВП) в липосомальный бислой.* Отделение не включенного в липосомы цифетрилина проводили путем фильтрации через нейлоновый мембранный фильтр «Pall» с диаметром пор 0,22 мкм. КВП определяли как отношение концентрации цифетрилина в липосомальной дисперсии после фильтрации ($C_{\text{ф}}$) к его концентрации в липосомальной дисперсии после гидратации липидной плёнки ($C_{\text{л}}$), выраженное в процентах: $\text{КВП} = C_{\text{ф}} / C_{\text{л}} \times 100 \%$.
- *Определение размера липосом цифетрилина.* Анализ среднего диаметра липосом проводили методом динамического светорассеяния с применением наносайзера Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США). Для этого отмеривали 100 мкл исследуемого образца свежеприготовленных липосом или регидратированной ЛЛФ-лио цифетрилина 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 pH липосомальной дисперсии цифетрилина.* Измерение pH проводили с использованием pH-метра HANNA HI 2211 (Hanna Instruments, Румыния). Значение pH в липосомальной дисперсии измеряли, не разбавляя. С целью определения pH лиофилизата к нему добавляли 10 мл воды и проводили измерение.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка 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 свойств как приемлемая температура фазового перехода 37 °С,

хорошая растворимость в органических растворителях, биосовместимость и природное происхождение. Хол вводили в состав ЛФ для придания бислою необходимого уровня жёсткости и повышения стабильности получаемых везикул в кровотоке. Для создания stealth-липосом цифетрилина в состав вводили 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. Качество липосомальных дисперсий цифетрилина, приготовленных по модельным составам, оценивали по следующим основным показателям – средний размер везикул после экструзии и КВП (табл. 1).

Таблица 1

Модели составов ЛЛФ 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 ± 2,0
3		1 : 0,2 : 0,014	150 ± 10	79 ± 1,0
4		1 : 0,14 : 0,009	157 ± 10	65 ± 3,0
5	1:66	1 : 0,3 : 0,019	192 ± 6	78 ± 1,0
6		1 : 0,2 : 0,014	191 ± 6	88 ± 1,0
7		1 : 0,14 : 0,009	192 ± 6	82 ± 1,0
8	1:70	1 : 0,2 : 0,014	180 ± 6	97 ± 1,0
9		1 : 0,14 : 0,014	190 ± 6	89 ± 1,0
10		1 : 0,1 : 0,014	196 ± 6	82 ± 1,0
11	1:75	1 : 0,2 : 0,014	192 ± 6	80 ± 2,0

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. В результате анализа полученных данных установлено, что наиболее оптимальным по указанным выше параметрам является состав с молярными соотношениями цифетрилин/ЯФХ 1:70 и ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДГФА 1:0,2:0,014, который обеспечивает максимальный уровень включения цифетрилина – 97±1% и размер липосом после экструзии – 180±6 нм.

Разработка технологии получения ЛЛФ-лио цифетрилина

1. Выбор дисперсионной среды для гидратации липидной пленки

В качестве растворителей для гидратации липидной пленки с цифетрилином исследовали воду для инъекций и раствор криопротектора – 12 % раствор сахарозы. Согласно данным, представленным в табл. 2, оптимальным растворителем для получения дисперсии МСЛ является раствор сахарозы –КВП цифетрилина достигало уровня 97±1 % и средний размер везикул после экструзии составил 155±6 нм.

Таблица 2

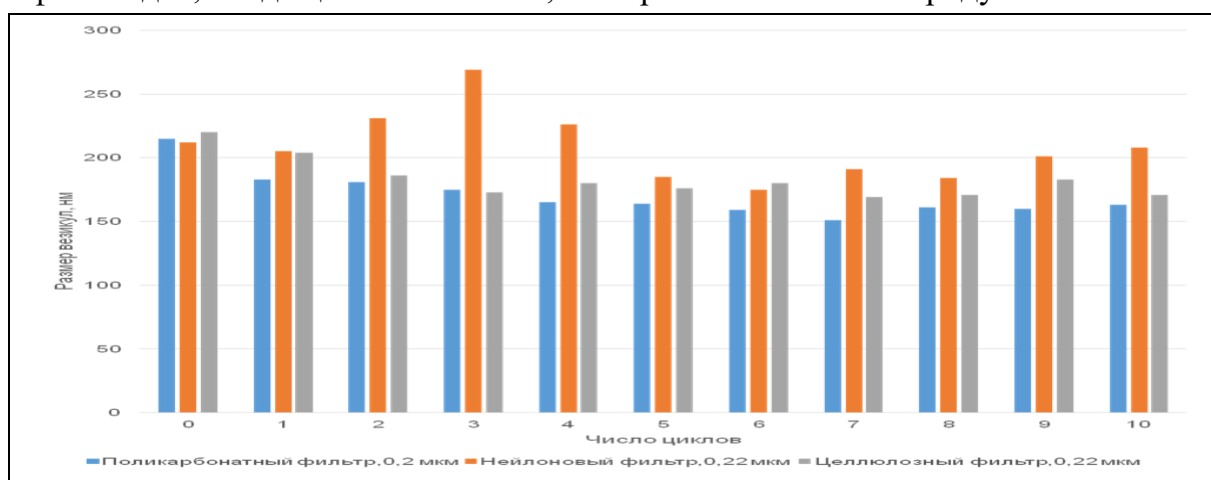
Выбор растворителя для гидратации липидной пленки

№	Растворитель	Средний диаметр липосом, нм		КВП, %
		после получения	после экструзии	
1	Вода для инъекций	691±25	175±6	97±1,0
2	12% Раствор сахарозы	330±20	155±6	97±1,0

2. Выбор метода получения ОСЛ цифетрилина

На этапе гидратации липидной пленки образуются неоднородные везикулы со средним диаметром преобладающей фракции около 330 нм. Поэтому целью данного этапа исследования являлся выбор способа получения ОСЛ цифетрилина приемлемого размера, обеспечивающего сохранение высокого уровня включения субстанции в везикулы. В ходе работы сравнивали показатели качества дисперсий, полученных после экструзии, обработки УЗ и гомогенизации МСЛ цифетрилина.

Экструзия. При выборе оптимального режима экструзии липосом цифетрилина оценивали эффективность 3-х типов фильтрующих мембран – поликарбонатного с диаметром пор 0,2 мкм, нейлонового с диаметром пор 0,22 мкм и целлюлозного с диаметром пор 0,22 мкм. Процесс экструзии дисперсии МСЛ проводили при давлении 0,8–0,9 бар. Согласно результатам, представленным на рис. 2, наиболее эффективной оказалась экструзия с использованием поликарбонатного фильтра, поскольку позволила получить везикулы диаметром около 151 нм, в то время как минимальное значение диаметра липосом при экструзии с нейлоновым и целлюлозным фильтром составило 175 и 171 нм соответственно. Кроме того, при экструзии МСЛ цифетрилина с использованием 3-х указанных типов мембранных фильтров не отмечались значительные изменения в показателе включения активного вещества в липосомах и значений рН, что свидетельствует о низком уровне окисления фосфолипидов, входящих в состав ЛФ, и сохранении качества продукта.

**Рисунок 2. Размеры липосомцифетрилина при экструзии**

Обработка УЗ. Липосомальную дисперсию цифетрилина объемом 30 мл помещали на УЗ-ванну и обрабатывали в течение 10–50 мин с отбором образцов препарата через каждые 10 мин. Как показали полученные данные (табл. 3), в результате обработки УЗ липосомы цифетрилина оказались неоднородны и достигли среднего размера преобладающей фракции 179 нм лишь спустя 50 мин озвучивания, при этом значение рН за данный период времени снизилось с 6,2 до 4,5, а КВП – с 97 до 94 %. Это говорит о нецелесообразности применения УЗ для получения ОСЛ цифетрилина.

Таблица 3

Показатели качества ЛЛФ цифетрилина при обработке УЗ

Время, мин	Средний размер липосом,	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 ± 0,2
Примечание: * – одна фракция (100%)			

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 дисперсии МСЛ цифетрилина рециркулировали в гомогенизаторе при давлении 2,8 бар в течение 5 мин с отбором образцов через каждую минуту от начала процесса (табл. 4).

Таблица 4

Влияние времени гомогенизации на качество ЛЛФ цифетрилина

Время, мин	Средний размер везикул по фракциям, нм		КВП, %
	После гомогенизации	Через 1 сутки	
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

В результате установлено, что уже спустя 1 мин циркуляции, за которую дисперсия совершает 6 полных циклов гомогенизации, образуются везикулы размером около 100 нм (табл. 4). 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 исследование по подбору «щадящего» режима гомогенизации. Для этого липосомальную дисперсию цифетрилина гомогенизировали по циклам.

Согласно данным табл. 5 для получения относительно стабильных липосом цифетрилина со средним диаметром 150 нм и первоначальным уровнем включения (96 %) достаточно 2-х циклов гомогенизации дисперсии.

Таблица 5

Размеры липосом цифетрилина при гомогенизации по циклам

Число циклов	Размер липосом, нм (распределение по фракциям)		КВП, %
	сразу после гомогенизации	спустя сутки после	
0	326 ± 20*	286 ± 30*	96 ± 1,0
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	90 ± 1,0
10	115 ± 7 / 18 ± 3	111 ± 6 / 19 ± 1	
11	116 ± 6 / 11 ± 2	120 ± 27 / 26 ± 15	
Примечание: * – одна фракция (100%)			

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

3. 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. Поэтому для повышения устойчивости липосом цифетрилина в процессе хранения предложена стабилизация ЛФ посредством сублимационной сушки.

Выбор криопротектора для лиофилизации ЛЛФ цифетрилина. Основной задачей этапа разработки технологии лиофилизации ЛЛФ цифетрилина являлся выбор типа криопротектора и его количества, обеспечивающего получение лиофилизата надлежащего качества. В качестве криопротекторов исследовали вещества из класса «углеводы»: моносахарид – глюкозу и дисахариды – лактозу, сахарозу и трегалозу. Криопротектор вводили в дисперсию в различных молярных соотношениях ЯФХ/криопротектор (табл.6). В качестве контроля использовали липосомальную дисперсию без добавления криопротектора.

Из результатов данного исследования следует, что по таким показателям качества лиофилизата как размер везикул после лиофилизации, КВП и регидратируемость оптимальным криопротектором для получения ЛЛФ-лиоцифетрилина является сахароза, вводимая в липосомальную дисперсию в молярном соотношении ЯФХ/сахароза 1:5.

Таблица 6

Выбор криопротектора для лиофилизации ЛЛФ цифетрилина

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

Примечание: КП – криопротектор

Выбор режима лиофилизации ЛЛФ цифетрилина. Выбор оптимального режима сублимационной сушки ЛЛФ цифетрилина проводили на основании сравнительного анализа двух способов лиофилизации – с «медленным» и «быстрым» замораживанием (табл. 7).

Таблица 7

Характеристика стадий замораживания при лиофилизации ЛЛФ цифетрилина

Операция	«Медленное» замораживание		«Быстрое» замораживание	
	Температура, °С	Время	Температура, °С	Время
Установка флаконов с препаратом на полки	+(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 сравнивали путем оценки качества полученных лиофилизатов по следующим показателям: внешний вид, регидратируемость, размер везикул и КВП. В ходе анализа полученных данных табл. 8 установлено, что способ замораживания не влияет на показатели качества конечного продукта и оба режима позволяют получить равноценные образцы ЛЛФ-лиоцифетрилина. Но поскольку режим с «быстрой» стадией замораживания требует меньших затрат времени и электрической энергии, данный режим предложен для получения ЛФ цифетрилина.

Таблица 8

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	+	164±12	170±7	97 ±1,0
с «быстрым» замораживанием	масса белого цвета	+	171±10	172±8	97 ±1,0

В результате проведенных технологических исследований разработан препарат «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг».

Состав ЛЛФ-лио цифетрилина на 1 флакон:

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



Разработка методики ТСХ для качественного анализа ЛЛФ и ЛЛФ-лиоцифетрилина

1. ТСХ-анализ цифетрилина и липидных компонентов ЛФ

Методика. 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. На линию старта хроматографической пластинки наносят по 10 мкл исследуемого образца ЛФ (содержание цифетрилина в наносимой пробе 5 мкг, ЯФХ – 265 мкг, Хол – 27 мкг) и спиртовых растворов стандартных образцов веществ-свидетелей (СОВС): цифетрилина с концентрацией 0,5 мг/мл (СОВС-1, 5 мкг), ЯФХ с концентрацией 26,5 мг/мл (СОВС-2, 265 мкг) и Хол с концентрацией 2,7 мг/мл (СОВС-3, 27 мкг). После подсушивания пластинку с

нанесенными пробами помещают в хроматографическую камеру с элюэтом, плотно закрывают крышкой и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом элюента линии финиша (пробег 12 см), пластинку вынимают из камеры и высушивают в потоке теплого воздуха до полного удаления запаха растворителя. Для обнаружения цифетрилина пластинку помещают в камеру, насыщенную парами хлора и выдерживают в течение 5–10 мин, после опрыскивания пластинки 0,05 % водным раствором калия иодида появляются жёлтые пятна цифетрилина. Для идентификации ЯФХ пластинку помещают в камеру, насыщенную парами йода, и выдерживают 1–2 мин до образования ярко-жёлтых пятен фосфолипида. Совместно с ЯФХ проявляются светло-желтые быстро исчезающие пятна Хол. Опрыскиванием пластинки 20 % серной кислотой с последующим нагреванием в сушильном шкафу до образования розово-фиолетовых пятен проводят обнаружение Хол. ПЭГ-ДГФА в связи с низкой концентрацией в анализируемых пробах (0,3 мг/мл) не определялся.

Выбор подвижной фазы. Подбор подвижной фазы для разделения цифетрилина и липидных компонентов смеси осуществляли на основе сравнения эффективности 9 систем-элюентов, которые включают разные по сродству и полярности к неподвижной фазе растворители (табл. 9). 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 9

Выбор элюента для ТСХ-анализа цифетрилина и липидных компонентов ЛФ

№	Подвижной фазы	Значение R _f						Время
		Цифетрилин		ЯФХ		Хол		
		ЛФ	СОВС-1	ЛФ	СОВС-2	ЛФ	СОВС-3	
1	Хлороформ: метанол (9 : 1)	0,17	0.18	0.08	0.08	0.63	0.64	1ч 10 мин
2	Этанол: аммиак водный (7 : 3)	0,73	0,73	0,45	0,47	1,00	1,00	2ч 35 мин
3	Пропанол: ЛУК: вода (12 : 3 : 1)	0,68	0,68	0,06	0,06	0,7	0,73	3 ч 5 мин
4	Пропанол-2: ЛУК: вода (22 : 12 :3)	0,58	0,66	0,05	0,06	1,00	1,00	4ч10 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	0,8	0,88	1 ч 10 мин
7	Ацетон: этилацетат: ЛУК (6 : 4 : 2)	1	1	хвост	хвост	1,00	1,00	2ч15 мин
8	Ацетон: ЛУК: вода (15 : 3 : 2)	0,93	0,93	0,03	0,04	0,98	0,97	1ч30 мин
9	Ацетон: этилацетат: ЛУК: вода (15 : 10 : 3 : 5)	1	1	старт	старт	1	1	2ч10 мин

В результате исследования для идентификации цифетрилина и ЯФХ была выбрана система растворителей этанол: аммиак водный (7 : 3), при которой достигалось увеличение подвижности фосфолипида и обеспечивалось эффективное

разделение данных веществ. 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).

2. Хроматографический анализ сахарозы в составе ЛЛФ-лиоцифетрилина

Методика. 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. На хроматографическую пластинку наносят по 5 мкл исследуемого образца ЛФ (содержание сахарозы 5 мкг) и СОВС-4 (содержание сахарозы 5 мкг). Пластинку подсушивают в токе воздуха, помещают в хроматографическую камеру с подвижной фазой, закрывают плотно крышкой и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом элюента линии финиша (пробег 12 см) пластинку вынимают из камеры и высушивают до полного удаления запаха растворителей. Для обнаружения сахарозы пластинку опрыскивают 0,5 % раствором 1-нафтола и нагревают до появления фиолетовых пятен.

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 (табл. 10).

Таблица 10

Выбор элюента для ТСХ-анализа сахарозы в составе ЛЛФ-лиоцифетрилина

№	Подвижная фаза	Значение R_f		Время
		ЛФ	СОВС-4	
1	ацетон–ЛУК–вода (15 : 3 : 2)	0,72	0,72	1 ч 20 мин
2	хлороформ–н-бутанол–ацетон–ЛУК–вода (25 : 25 : 15 : 5 : 4)	старт	старт	1 ч 35 мин

В качестве элюента для ТСХ-анализа сахарозы в составе ЛЛФ-лио выбрана система растворителей ацетон/ледяная уксусная кислота/вода (15:3:2), которая обеспечивала хорошее разделение пятен сахарозы со значением $R_f = 0,72$, тогда как в системе хлороформ/н-бутанол/ацетон/ЛУК/вода (25 : 25 : 15 : 5 : 4) пятна анализируемого вещества для образца ЛФ и стандарта оставались на линии старта .

Проведена оценка пригодности выбранных хроматографических систем для ТСХ-анализа компонентов ЛЛФ цифетрилина путем определения предела обнаружения вещества. Пределы обнаружения компонентов ЛФ цифетрилина и оценка пригодности систем приведены в диссертации.

Разработка и валидация методики спектрофотометрического анализа цифетрилина в составе ЛЛФ и ЛЛФ-лио

На первоначальном этапе работы изучали спектральные характеристики ЛВ и вспомогательных веществ. В электронном спектре поглощения спиртового раствора субстанции цифетрилина в анализируемом диапазоне 250–800 нм обнаружено два максимума – (282 ± 2) и (290 ± 2) нм (рис.3А).

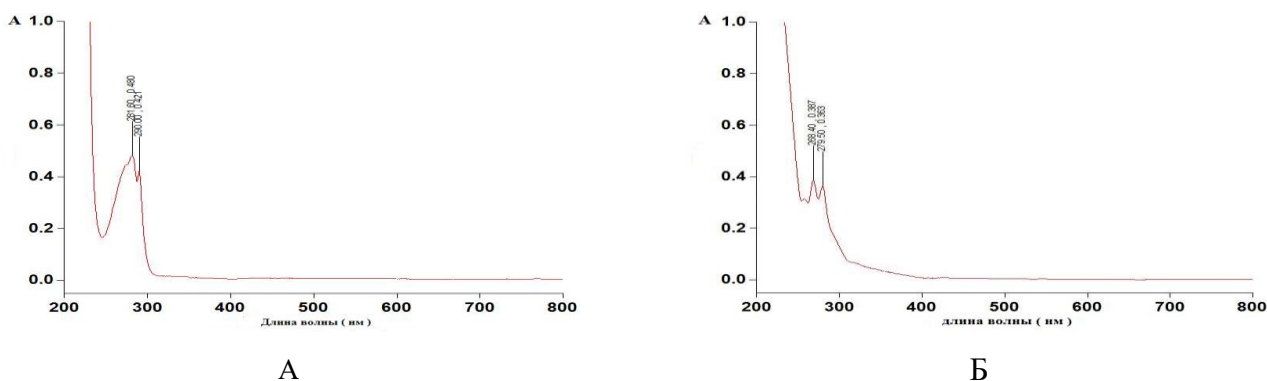


Рисунок 3. Электронные спектры поглощения спиртового раствора: А – субстанции цифетрилина (концентрация 0,08 мкг/мл) и Б – «пустых» липосом

Для количественного анализа липосомального цифетрилина выбран наиболее интенсивный пик при (282 ± 2) нм. 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 250 до 300 нм обнаружены 2 пика – (268 ± 2) и (279 ± 2) нм, которые соответствуют максимумам поглощения вспомогательных компонентов ЛФ (рис. 3Б). Установлено, что сахароза (рис. 4А) практически не поглощает излучение в указанном диапазоне (оптическая плотность $(A) = 0,003$), холестерин (рис. 4В) и ПЭГ-ДГФА (рис. 4Г) имеют небольшое поглощение – суммарное значение $A = 0,043$. В то же время в электронном спектре поглощения спиртового раствора ЯФХ обнаружены максимумы при (258 ± 2) , (268 ± 2) и (279 ± 2) нм со значением A при 279 нм 0,328 (рис. 4Б).

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 и ЛЛФ-лио цифетрилина предложено использование спиртового раствора «пустых» липосом.

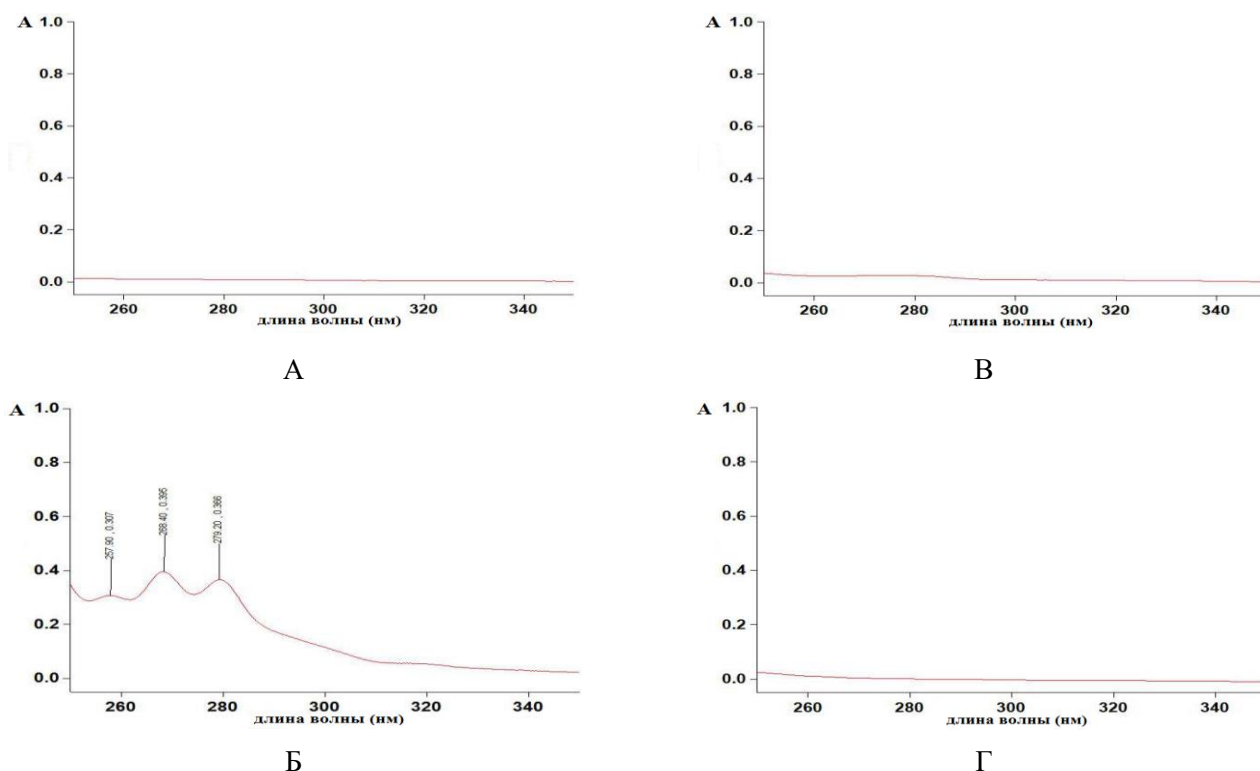


Рисунок 4. Спектры поглощения спиртовых растворов: А. Сахарозы (концентрация 9 мг/мл), Б. ЯФХ (концентрация 4 мг/мл), В. Хол (концентрация 0,4 мг/мл), Г. ПЭГ-ДГФА (концентрация 0,05 мг/мл)

1. Методика спектрофотометрического определения цифетрилина в липосомальной дисперсии

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

Приготовление раствора сравнения. 4 мл липосомальной дисперсии «пустых» липосом помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят спиртом 95 % до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Проведение анализа. В мерную колбу вместимостью 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 цифетрилина относительно раствора сравнения. По формуле рассчитывают (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%.

2. Методика спектрофотометрического определения цифетрилина в лиофилизате

Приготовление СО цифетрилина. 6,0 мг субстанции цифетрилина растворяют в 30 мл спирта 95 %, полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят спиртом до метки. Раствор применяют свежеприготовленным.

Приготовление раствора сравнения. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 6 мл липосомальной дисперсии «пустых» липосом и доводят спиртом 95 % до метки. Раствор применяют свежеприготовленным.

Проведение анализа. К содержимому флакона ЛЛФ-лио цифетрилина добавляют 5,3 мл воды и перемешивают до получения однородной липосомальной дисперсии. В мерную колбу объёмом 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 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 %.

Для подтверждения **специфичности** аналитической методики сравнивали электронные спектры поглощения спиртовых растворов субстанции цифетрилина, вспомогательных веществ и ЛЛФ-лио цифетрилина. Как видно на рис. 5 в области 250–350 нм кривые спиртовых растворов субстанции и ЛЛФ-лио цифетрилина схожи по форме и положению пиков. Однако вспомогательные компоненты исследуемой ЛФ поглощают излучение в области аналитического максимума цифетрилина – (282 ± 2) нм, что следует учитывать при количественном анализе цифетрилина.

Линейность методики подтверждали измерением аналитических сигналов для 7 проб с различными концентрациями цифетрилина в модельной смеси компонентов ЛФ в пределах диапазона от 70 до 130% от заявленного содержания в препарате (6,0 мг/флакон). Значение коэффициента корреляции составило более 0,999%, что свидетельствует о наличии линейной зависимости между концентрацией

цифетрилина и оптической плотностью в заданном диапазоне концентраций. Для подобной линейной зависимости уравнение регрессии имеет вид $y=0,37x-0,014$.

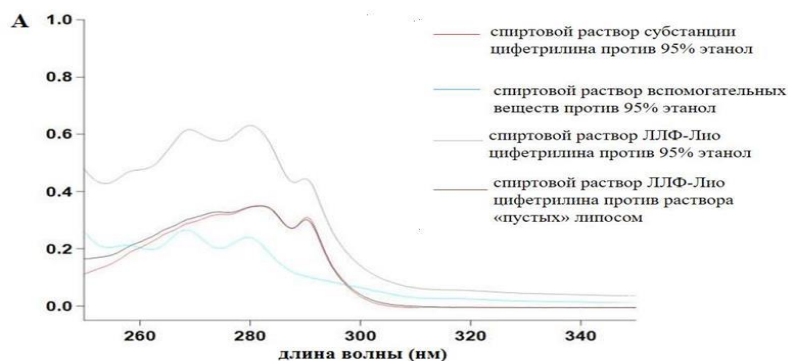


Рисунок 5. Оценка специфичности методики спектрофотометрического анализа липосомального цифетрилина

Правильность методики оценивали методом добавок на модельных смесях компонентов ЛФ цифетрилина, вносимого в концентрациях от 70, 80, 90, 100, 110, 120 и 130% от заявленного содержания в препарате. Установлено, что получаемые экспериментальные значения близки к истинным, а относительная ошибка среднего результата не превышает 0,5 %. Таким образом, методику спектрофотометрического анализа липосомального цифетрилина можно считать правильной.

При установлении **сходимости** методики проводили испытание 6 образцов ЛЛФ-лио цифетрилина одной серии в условиях одной лаборатории одним и тем же исполнителем. Коэффициент вариации составил значение 0,98 %, что свидетельствует о незначительной изменчивости вариационного ряда и прецизионности методики в условиях повторяемости.

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 анализе результатов обнаружено, что рассчитанное значение критерия Фишера ($F_{\text{рас}}=1,05$) не превышало его табличного значения ($F_{\text{таб}}=5,05$). При сравнении расчетного и табличного значения критерия Стьюдента также выполнялось неравенство $t_{\text{рас}}=1,01 < t_{\text{таб}}=2,23$, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки измерений. Таким образом, можно сделать вывод о том, что расхождения результатов анализа, полученных двумя исследователями, случайны.

Стандартизация и мониторинг стабильности в процессе хранения ЛЛФ-лио цифетрилина

Для стандартизации ЛЛФ-лио цифетрилина выбраны показатели, по которым следует контролировать качество препарата после получения и в процессе хранения. К данным показателям относятся: описание, регидратируемость (растворимость

лиофилизата), подлинность, количественное определение, однородность дозирования (содержание цифетрилина во флаконе), однородность массы, размер везикул, pH, потеря в массе при высушивании.

Для изучения стабильности и установления срока годности 3 серии ЛЛФ-лио цифетрилина (01216, 020516, 041016) были заложены на хранение в морозильную камеру с температурой -18 °С, поскольку такая температура установлена для хранения липидов. Из данных табл. 12 видно, что при анализе качества ЛЛФ-лио цифетрилина в процессе хранения не наблюдались значимые изменения в показателях качества, заложенных в проекте НД. Проведенные исследования позволили установить срок годности для препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» 6 месяцев. Изучение стабильности и срока годности препарата продолжаются.

Таблица 12

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	Соотв. норме	Соотв. норме	Соотв. 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	Соотв. норме	Соотв. норме	Соотв. норме
		3			
		6			
		9			
		12			
		18		-	-
Подлинность	1. ЭСП 2. ТСХ	0			
		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	-	-

Продолжение таблицы 12

Наименование показателя	Норма	Срок хранения, мес.	Результаты контроля качества		
			Серии		
			010216	020516	041016
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					

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-ДФА =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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Целесообразна разработка и внедрение в практику лабораторного регламента и проекта НД на препарат «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг».

Актуальным является масштабирование технологии получения препарата «Цифетрилин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 6,0 мг» с целью ее дальнейшего внедрения в производственную практику.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие фармацевтические исследования могут быть направлены на модификацию предложенной рецептуры с применением альтернативного липидного состава ЛФ с целью возможного увеличения загрузки цифетрилина в липосомы и повышения стабильности препарата.

Перспективно проведение комплекса доклинических исследований ЛЛФ-лио цифетрилина с целью углубленного изучения ее противоопухолевой эффективности, фармакокинетики и токсичности для организма.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Санарова, Е.В. Разработка модели липосомальной лекарственной формы нового отечественного аналога гипоталамического гормона соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью / Е.В.Санарова, А.В.Ланцова, **Си Чжан**, М.В. Дмитриева, А.П. Полозкова, О.Л.Орлова, З.С.Шпрах, М.П.Киселева, Л.М. Борисова, З.С.Смирнова, Н.А.Оборотова // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2015. – Т.14, №4 – С.73–78.
2. **Чжан, Си**. Разработка методики количественного анализ липосомальной лекарственной формы нового аналога гипоталамического гормонасоматостатина, обладающего противоопухолевой активностью / **Си Чжан**, Е.В.Санарова, М.В. Дмитриева, А.П.Полозкова, Н.А.Оборотова, А.В.Ланцова, О.Л.Орлова,

З.С. Шпрах//Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова. – Москва, 2016. – С.100.

3. Санарова, Е.В. Особенности технологии получения липосомальной лекарственной формы аналога гипоталамического гормона соматостатина / Е.В.Санарова, **Си Чжан**, М.В.Дмитриева, А.В.Ланцова, О.Л.Орлова, А.П.Полозкова, Н.А. Оборотова, И.И. Краснюк // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2016 – Т.15, №4. – С. 78–84.
4. Санарова, Е.В. Выбор критериев для оценки качества липосомальной лекарственной формы отечественного аналога гипоталамического гормона соматостатина / Е.В. Санарова, **Си Чжан**, А.В. Ланцова, О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, З.С. Шпрах // Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты».– Москва, 2017. – С. 70.
5. Санарова, Е.В. Влияние холестерина на химико-фармацевтические показатели и противоопухолевую активность липосомального аналога гипоталамического гормона соматостатина / Е.В.Санарова, А.В.Ланцова, М.В.Дмитриева, **Си Чжан**, М.П. Киселева, Л.М. Борисова, О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, И.И. Краснюк, Н.А. Оборотова // **Биофармацевтический журнал**. – 2017 – Т.9, №5 – С. 22–26.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

КВП – количество включенного препарата

ЛВ – лекарственное вещество

ЛЛФ – липосомальная лекарственная форма

ЛЛФ-лио – лиофилизированная липосомальная лекарственная форма

ЛФ – лекарственная форма

МСЛ – многослойные липосомы

ОСЛ – однослойные липосомы

ПЭГ-ДГФА – полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин

СО – стандартный образец

СОВС – стандартный образец вещества-свидетеля

ТСХ – тонкослойная хроматография

Хол – холестерин

ЯФХ – яичный фосфатидилхолин