

На правах рукописи

Хашем Али

**Создание и биофармацевтические исследования липосомальной
лекарственной формы производного индолокарбазола**

14.04.01 – Технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

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

Москва – 2020

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

Научный руководитель:

Кандидат фармацевтических наук, доцент

Король Людмила Анатольевна

Официальные оппоненты:

Гузев Константин Сергеевич – доктор фармацевтических наук, ЗАО Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды» г. Москва, уполномоченное лицо

Сливкин Алексей Иванович – доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета, заведующий кафедрой

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2020 г. в 14:00 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, 13.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.040.09

доктор фармацевтических наук,
профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Несмотря на открытия в области молекулярной биологии опухолевых клеток, многообразии схем хирургического, радиационного и фармакологического воздействий на различные этапы и звенья опухолевого роста, проблема создания эффективных методов лечения до сих пор в основном не решена.

Повышение эффективности лекарственной терапии злокачественных новообразований продолжается по разным направлениям, среди которых главным остается поиск новых избирательно действующих на опухоли лекарственных веществ (ЛВ) и их рациональных лекарственных форм (ЛФ), позволяющих в дальнейшем оптимизировать методики применения ЛВ, создавать схемы и режимы полихимиотерапии, совершенствовать методы комплексного и комбинированного лечения злокачественных новообразований.

Среди химических соединений природного и синтетического происхождения можно выделить класс производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов, которые проявляют различные виды биологической активности, в том числе противоопухолевую. Известно, что производные индолокарбазола обладают сильным ингибирующим действием в отношении циклинзависимых киназ, протеинкиназы C и тирозинкиназы, а также способны эффективно подавлять топоизомеразу I, которая принимает участие в процессах транскрипции, репликации и репарации ДНК.

Одним из перспективных представителей класса производных индолокарбазола является соединение ЛХС-1208, синтезированное в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Исследования *in vivo* показали высокую противоопухолевую активность ЛХС-1208 в отношении лимфоцитарной лейкемии Р-388, лимфоидной лейкемии L-1210, асцитной опухоли Эрлиха, эпидермоидной карциномы легкого Льюис, меланомы В-16, рака шейки матки РШМ-5 и аденокарциномы толстого кишечника АКАТОЛ.

В связи с этим соединение ЛХС-1208 было отобрано для проведения дальнейших исследований по созданию потенциального противоопухолевого препарата.

Поскольку ЛХС-1208 не растворим в воде, в качестве способа солюбилизации данного соединения предложено его включение в липосомы и разработка стерически стабилизированной липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ) для внутривенного введения.

Степень разработанности темы исследования

В НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в соответствии с планом научно-исследовательских работ по теме «Разработка лекарственных форм противоопухолевых препаратов с организацией лабораторного производства» (2014–2018 гг., Гос. рег. 012013713444) и в рамках Государственного контракта №13411.1008799.13.20 от 24.06.13 г. «Доклинические исследования инновационного лекарственного средства на основе производного индолокарбазола для лечения онкологических заболеваний» проводились исследования по созданию лиофилизированной инъекционной лекарственной формы (ИЛФ-лио) ЛХС-1208 и ее доклиническому изучению (патент РФ №2572691 «Противоопухолевое средство»). В качестве солюбилизаторов (соразтворителей) гидрофобной субстанции ЛХС-1208 в состав ИЛФ-лио включены такие вспомогательные вещества как органический растворитель диметилсульфоксид и низкомолекулярный поливинилпирролидон Коллидон 17PF. В связи с этим актуальным является разработка альтернативной ЛФ на основе биосовместимых наноструктурированных систем доставки ЛВ – липосом.

Цель исследования

Создание лиофилизированной стерически стабилизированной ЛЛФ производного индолокарбазола ЛХС-1208.

Задачи исследования:

1. Разработать оптимальный состав стерически стабилизированной ЛЛФ ЛХС-1208.
2. Разработать технологию получения стабильной при хранении лиофилизированной липосомальной лекарственной формы (ЛЛЛФ) ЛХС-1208.
3. Разработать методики качественного и количественного анализа ЛЛЛФ ЛХС-1208.
4. Провести стандартизацию ЛЛЛФ ЛХС-1208 и изучить ее стабильность в процессе хранения.
5. Изучить цитотоксическую активность ЛЛЛФ ЛХС-1208 в опытах *in vitro*.

Научная новизна работы

В результате проведенных исследований впервые создана стабильная при хранении ЛЛЛФ оригинального отечественного производного индолокарбазола ЛХС-1208. Разработан оптимальный состав и технология получения ЛЛЛФ ЛХС-1208, имеющие ряд особенностей, связанных с наличием у субстанции гидрофобных свойств. Предложены методики качественного и количественного анализа разработанной липосомальной формы ЛХС-1208. Определены показатели качества и проведена стандартизация ЛЛЛФ ЛХС-1208. В опытах *in vitro* установлено преимущество противоопухолевого действия ЛЛЛФ по сравнению с ИЛФ-лио ЛХС-1208.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в обосновании выбора оптимального состава и способа получения стерически стабилизированной стабильной ЛЛФ ЛХС-1208, являющегося гидрофобным соединением. Доказано и экспериментально обосновано использование технологии лиофилизации для повышения стабильности при хранении ЛЛФ ЛХС-1208. Представленный в работе экспериментально-практический материал может служить теоретической базой для создания новых ЛЛФ гидрофобных субстанций.

Практическая значимость исследования

Выполнение настоящего исследования позволило создать стабильную ЛЛЛФ ЛХС-1208 для проведения дальнейших доклинических исследований. На основании выбранных показателей качества проведена стандартизация препарата «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг». Технология получения и методики анализа ЛЛЛФ ЛХС-1208 внедрены в работу лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследований по разработке состава ЛЛФ и технологии получения стабильной при хранении ЛЛЛФ ЛХС-1208.
2. Методики качественного и количественного анализа ЛЛФ и ЛЛЛФ ЛХС-1208.
3. Показатели качества для стандартизации ЛЛЛФ ЛХС-1208 и результаты изучения ее стабильности в процессе хранения.
4. Результаты изучения цитотоксической активности ЛЛЛФ ЛХС-1208 в опытах *in vitro*.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили результаты анализа научных данных по разработке липосомальных форм лекарственных препаратов (ЛП), представленных в публикациях отечественных и зарубежных авторов. В работе использованы методы фармакопейного анализа, включенные в ГФ РФ XIII издания.

При проведении исследования использованы технологические методы (метод получения липидной пленки, экструзия, обработка ультразвуком, гомогенизация, лиофилизация), химико-фармацевтические методы (тонкослойная хроматография, спектрофотометрия, лазерная спектроскопия рассеяния, потенциометрия) и математические методы анализа и обработки результатов, полученных в ходе экспериментальной работы.

Достоверность научных положений и выводов

Для проведения экспериментальных работ использовано современное сертифицированное оборудование. Методами статистической обработки установлена прецизионность и правильность полученных результатов исследований, что позволяет считать их достоверными.

Апробация работы

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

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выполнении технологических и химико-фармацевтических экспериментальных исследований по разработке состава, технологии получения и методик анализа для контроля качества, обобщении полученных результатов и их аналитической и статистической обработки. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от выбора направления исследований и постановки задач, их экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и их внедрения в практику.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований по разработке технологии получения и методик анализа ЛЛЛФ ЛХС-1208 внедрены в работу лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Акт внедрения №б/н от 2017г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом научных исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), комплексная тема: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (Гос. Рег. №01.2.011.68237).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 139 листах машинописного текста и содержит 26 таблиц, 17 рисунков. Структура диссертации включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, три главы собственных экспериментальных исследований, общее заключение, общие выводы, список литературы и приложение. Список литературы состоит из 127 источников, в том числе 57 – на иностранном языке.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ, из которых 2 являются статьями в журналах, включенных в перечень ведущих периодических изданий ВАК РФ и 1 статья в зарубежном издании, индексируемом в международной базе данных Scopus.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Объектом исследований являлась субстанция оригинального производного индоло[2,3-а]карбазола – ЛХС-1208, структурная формула которого представлена на рис. 1.

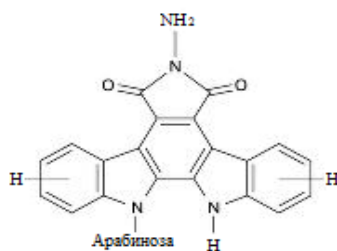


Рис. 1. Структурная формула ЛХС-1208

При проведении исследований по созданию и биофармацевтическому изучению ЛЛЛФ ЛХС-1208 использовали субстанции, вспомогательные вещества и реактивы, соответствующие требованиям нормативной документации (фармакопейные статьи ГФ XIII издания, Ph Eur 7.0, USP33-NF28, ГОСТы, ТУ).

Получение дисперсии многослойных липосом (МСЛ) ЛХС-1208

МСЛ ЛХС-1208 получали методом гидратации липидной пленки. Навески яичного фосфатидилхолина (лецитин, Лец; E PC S, Lipoid, Германия), холестерина (Хол; Sigma-Aldrich, Co., Япония) и полиэтиленгликоль-2000-дистеароифосфатидилэтаноламин (ПЭГ-2000-ДФФА; Lipoid, Германия) растворяли в хлороформе, ЛХС-1208 – в ацетоне. Полученные растворы компонентов ЛЛФ смешивали и фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр «Pall» (ООО Палл Евразия, Россия) с размером пор 0,22 мкм. Профильтрованную смесь растворов

переносили в круглодонную колбу вместимостью 2 л и упаривали на роторном испарителе *Heidolph Hei-VAP Advantage* (Heidolph, Германия) при температуре водяной бани 37 ± 1 °С под вакуумом (200 мбар) при скорости вращения ротора 90–110 оборотов в минуту (об/мин) до образования полупрозрачной липидной пленки, которую досушивали под вакуумом (120 мбар) до постоянной массы. Затем пленку гидратировали водой для инъекций при скорости вращения ротора 30–35 об/мин с получением дисперсии МСЛ.

Получение дисперсии однослойных липосом (ОСЛ) ЛХС-1208

Для получения ОСЛ ЛХС-1208 использовали 3 метода: обработку ультразвуком (УЗ), экструзию и гомогенизацию. Дисперсию МСЛ перед измельчением для освобождения от механических включений фильтровали под давлением через фильтры с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм.

Озвучивание. Липосомальную дисперсию объемом 30 мл обрабатывали в УЗ-ванне *Transsonic T310* (Elma, Германия) с частотой 20 кГц в течение 10, 20 и 30 мин.

Экструзия. Липосомальную дисперсию пропускали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2–0,22 мкм: поликарбонатные «*Nuclepore*» (Whatman, Великобритания), нейлоновые «*Pall*» (ООО Палл Евразия, Россия) и полиэфирсульфоновые «*Express Plus*[®]» (Merck Millipore Ltd., Ирландия), на экструдере *Lipex*TM (Northern Lipids Inc., Lipex Biomembranes, Inc., Канада) под давлением 0,9–1,0 МПа.

Гомогенизация. Липосомальную дисперсию ЛХС-1208 рециркулировали в гомогенизаторе высокого давления *Microfluidiser M-110S* (Microfluidics, США) в течение 1–5 мин под давлением 40 psig (280 кПа) с отбором проб через каждую минуту от начала циркуляции.

Стерилизация и лиофилизация липосом ЛХС-1208

Для стерилизации липосомальной дисперсии ЛХС-1208 проводили фильтрацию под давлением на экструдере через стерильные нейлоновые мембранные фильтры «*Pall*» с размером пор 0,22 мкм в асептических условиях. Профильтрованную дисперсию собирали в стерильный стеклянный сборник, дозировали во флаконы по 6 мл и лиофилизировали в камере сублимационной сушки «*Edwards Minifast DO.2*» (Ergo Electronic S.p. A., Италия).

Методы анализа ЛЛФ и ЛЛЛФ ЛХС-1208

Качественный анализ компонентов ЛЛФ и ЛЛЛФ ЛХС-1208. Для установления подлинности компонентов препарата использовали метод ТСХ с использованием хроматографических пластинок «*Sorbfil*» ПТСХ-АФ-А размером 10×15 см.

Количественное определение ЛХС-1208 в ЛФ. Количественное содержание ЛХС-1208 определяли методом спектрофотометрии в УФ- и видимой области (ГФ XIII

ОФС.1.2.1.1.0003.15) с использованием рабочего стандартного образца (СО) при длине волны (319 ± 2 нм) на спектрофотометре *Cary 100* (Agilent Technologies, Австралия). Оптическую плотность анализируемого образца измеряли с использованием в качестве раствора сравнения спирта 95%.

Определение эффективности включения ЛХС-1208 в липосомы. В связи с тем, что ЛХС-1208 является гидрофобным веществом и при формировании липосом включается непосредственно в липосомальную мембрану, эффективность включения (В) рассчитывали по отношению концентрации ЛВ в дисперсии после фильтрации через нейлоновые мембранные фильтры с порами диаметром 0,22 мкм (1 раз) к концентрации ЛХС-1208 в дисперсии до фильтрации. Показатель выражали в %.

Анализ размера липосом ЛХС-1208. Определение распределения липосом по размеру проводили методом лазерной дифракции света с использованием фотонного корреляционного анализатора *Nicompr 380 Submicron Particle Sizer* (Particle Sizing Systems, США). Для этого 0,1 мл исследуемого образца липосомальной дисперсии (лиофилизат предварительно регидратировали водой) 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 размера везикул не менее 3-х раз.

Определение значения рН липосомального ЛХС-1208. Определение рН препарата проводили методом потенциометрии с использованием рН-метра *HANNA HI 2211* (Hanna Instruments, Румыния). Предварительно измеряли значение рН воды. В липосомальной дисперсии значение рН измеряли, не разбавляя образец. Для определения значения рН лиофилизата к содержимому флакона добавляли 6 мл воды, перемешивали до получения однородной липосомальной дисперсии.

Изучение цитотоксической активности ЛЛЛФ ЛХС-1208

Исследование проводили на клеточных линиях метастатической меланомы человека *mel Ibr* и *mel Kor*, полученных из Банка клеточных линий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, глутамина и антибиотиков. С культуральных флаконов клетки снимали раствором Версена. Для постановки МТТ-теста клетки рассаживали в 96-луночные планшеты в количестве 7 тыс. клеток на лунку. Через сутки, после того как клетки прикреплялись к пластику, в лунки добавляли предварительно регидратированные ЛЛЛФ и ИЛФ-лио в концентрациях ЛХС-1208 от 1,875 до 120 мкг/мл и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °С и 5% CO₂. Через 48 ч в лунки добавляли раствор МТТ, инкубировали еще 4 ч, после чего в лунки добавляли ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана и осуществляли подсчет оптической

плотности на фотометрическом анализаторе при длине волны 540 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток. Цитотоксичность (Ц, %) рассчитывали по формуле:

$$Ц = (1 - (O_o / O_k)) \times 100\%,$$

где: O_o – оптическая плотность в опытных лунках, O_k – оптическая плотность в контрольных лунках. Для характеристики цитотоксического эффекта определяли ИК₅₀ – концентрацию вещества, вызывающую гибель 50% клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка состава ЛЛФ ЛХС-1208

Важно, чтобы липосомальная форма ЛХС-1208 содержала максимально возможное количество действующего вещества (ДВ) и обладала оптимальными для терапии размерами везикул (не более 200–220 нм). Для решения этих задач были получены и проанализированы экспериментальные модели составов ЛЛФ ЛХС-1208 с различными молярными соотношениями компонентов с учетом гидрофобных свойств ЛВ (табл. 1). Качество модельных ЛЛФ оценивали по основным показателям – включение ДВ в липосомы и размеры везикул, а также учитывали такие технологические параметры как продолжительность гидратации пленки и способность к экструзии.

Таблица 1

Модельные составы ЛЛФ ЛХС-1208

№	Молярные соотношения		В, %	Размеры везикул, нм	Концентрация ЛХС-1208, мг/мл
	ЛХС-1208:Лец	Лец:Хол:ПЭГ-2000-ДФФА			
1	1:50	1:0,25:0,003	59±2	215±10	0,6
2	1:100		75±2	195±8	0,4
3	1:125		85±1	200±10	0,3
4	1:150	1:0,33:0,003	92±1	185±12	0,3
5		1:0,25:0,003	91±1	205±10	0,2
6		1:0,20:0,003	94±1	185±10	0,3
7		1:0,14:0,003	80±2	185±9	0,3
8		1:0,10:0,003	75±1	185±10	0,3
9		1:175	1:0,25:0,003	65±2	190±10

В результате анализа полученных данных установлено, что наиболее приемлемым по указанным выше показателям является состав 6 (табл. 1) с молярными соотношениями ЛХС-1208:Лец=1:150 и Лец:Хол:ПЭГ-2000-ДФФА=1:0,20:0,003, который использовался для дальнейших исследований.

Особенности получения МСЛ ЛХС-1208

Первоначальная стадия данного технологического этапа получения ЛЛФ ЛХС-1208 включает операции по взятию навесок ДВ и липидных компонентов ЛФ и их растворение в соответствующем органическом растворителе. Исходя из растворимости ЛХС-1208 и используемых липидов (табл. 2), а также свойств самих растворителей, необходимо было подобрать оптимальные условия для получения

раствора компонентов ЛФ и последующей отгонки органического растворителя с получением тонкой липидной пленки на стенках колбы.

Таблица 2

Растворимость* компонентов ЛЛФ ЛХС-1208 в органических растворителях

Компонент ЛЛФ	Органический растворитель			
	Хлороформ	Метанол	Этанол	Ацетон
ЛХС-1208	Практически нерастворим	-	Мало растворим	
Лец	Растворим			Практически нерастворим
Хол	Легко растворим	Практически нерастворим	Умеренно растворим	
ПЭГ-2000-ДГФА	Растворим			Практически нерастворим
Примечание: * – обозначение растворимости согласно ОФС 1.2.1.0005.15 ГФ XIII				

Из представленных данных о растворимости Лец, Хол и ПЭГ-2000-ДГФА следует, что для получения раствора данных компонентов оптимальным органическим растворителем является хлороформ. Для растворения ЛХС-1208 можно использовать как спирт, так и ацетон. Согласно ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» данные растворители являются низкотоксичными и относятся к одному классу токсичности – 3. Но поскольку спирт менее летуч и имеет более высокую $T_{кип}$ в сравнении с ацетоном – 78,4 и 56,1 °С, соответственно, для получения раствора ДВ выбран ацетон.

Липидную пленку гидратировали водой для инъекций на роторном испарителе для получения дисперсии МСЛ с концентрацией ЛХС-1208 0,35 мг/мл. В ходе исследования было отмечено, что большое значение при гидратации имеет скорость вращения ротора, которая обуславливает качество получаемой липосомальной дисперсии. При скорости вращения ротора не более 30–35 об/мин формируется гомогенная дисперсия со средним размером везикул 310 ± 25 нм. При увеличении скорости вращения ротора более 35 об/мин отмечается образование пенистой дисперсии МСЛ более крупного размера – от 500 до 900 нм в зависимости от скорости вращения (табл. 3).

Таблица 3

Влияние скорости вращения ротора при гидратации липидной пленки на качество дисперсии МСЛ ЛХС-1208

Показатели качества	Скорость вращения, об/мин		
	30–35	45–50	60 и более
Внешний вид дисперсии	однородная масса	однородная масса с небольшим объемом (1/4) пены	масса с большим объемом (1/2) пены
Размер везикул преобладающей фракции (более 90 %), нм	310 ± 25	525 ± 28	905 ± 25
рН	$7,0 \pm 0,5$		$6,8 \pm 0,4$

Оценка методов получения ОСЛ ЛХС-1208

Для уменьшения размеров МСЛ, полученных в процессе гидратации липидной пленки, применяют различные методы их «измельчения», которые имеют свои достоинства и недостатки. В данном исследовании сравнивали эффективность 3-х способов получения ОСЛ ЛХС-1208 – УЗ обработку дисперсии, экструзию и гомогенизацию. Как видно из табл. 4, *воздействие УЗ* на дисперсию привело к уменьшению размера липосом: спустя 20 мин обработки размер везикул составил минимальное значение 190 нм. Однако увеличение времени озвучивания дисперсии до 30 мин способствовало укрупнению липосом – до 210 нм. При хранении полученных дисперсий спустя сутки наблюдали увеличение размеров везикул до 245–320 нм. Кроме того, обработка УЗ способствовала значительным потерям ДВ – после проведения фильтрации на фильтре отмечали наличие осадка, при этом уровень включения снизился до 90–85% в зависимости от времени воздействия.

Таблица 4

Изменение размеров везикул и включения ЛХС-1208 в липосомы при воздействии УЗ

Время воздействия УЗ, мин		10	20	30
Средний размер везикул, нм	сразу после обработки	230±16	190±15	210±15
	спустя сутки	264±15	245±18	320±26
В, %		90±1	88±1	85±1

Благодаря молекулярной структуре ЛХС-1208 является окрашенным (субстанция оранжевого цвета) соединением и подобно красителям обладает сильными сорбционными свойствами, причем степень сорбции определяется материалом окрашиваемой поверхности. В связи с этим важной задачей при определении оптимального режима *экструзии* липосом ЛХС-1208 являлся выбор типа фильтра, использование которого обеспечивало бы получение ОСЛ приемлемого размера с минимальными потерями ДВ. Согласно результатам, представленным в табл. 5, экструзия с использованием ПК-фильтра позволяет получить ОСЛ ЛХС-1208 минимального размера в сравнении с другими фильтрами – 170 нм. Однако с уменьшением размера везикул при экструзии наблюдались значительные потери ДВ на фильтре. При сравнении Н- и ПЭС-фильтров по показателям качества наиболее эффективной является экструзия с использованием Н-фильтров – достигается минимальный размер липосом 176 нм с сохранением высокого уровня включения.

Таблица 5

Эффективность экструзии липосом ЛХС-1208 с использованием различных типов фильтров

Показатели качества		Размер везикул*, нм			В*, %		
Фильтр		ПК	Н	ПЭС	ПК	Н	ПЭС
0	1	190±5	205±10	210±8	90±1	94±1	94±1
	2	182±7	195±10	192±8	87±2		
	3	170±6	185±5	185±6	83±2		

	4	171±5	182±5	185±5	81±2	93±1	92±1
	5	-	176±8	186±6	-		
	6	-	180±8	182±7	-	92±1	91±1

Обозначения: ПК – поликарбонатный, Н – нейлоновый, СЭЦ – сложные эфиры целлюлозы, ПЭС – полиэфирсульфоновый, * – среднее значение из 3-х экспериментов

В отличие от экстракции использование *гомогенизации* позволило получить дисперсию липосом ЛХС-1208 с заметно меньшим размером везикул – через 4 мин диаметр преобладающей фракции везикул составил 60 нм (табл. 6). Однако при гомогенизации наблюдаются большие потери препарата – включение ДВ на каждой минуте снижается в среднем на 4–5%, что вероятно обусловлено разрушением липосомальной мембраны вследствие значительного нагревания дисперсии в процессе рециркуляции и термолабильностью самого ЛХС-1208. В связи с этим данный метод при дальнейших исследованиях не использовали.

Таблица 6

Изменение размера везикул и включения ЛХС-1208 в липосомы при гомогенизации

Показатель качества	Время гомогенизации, мин				
	1	2	3	4	5
Средний размер везикул, нм	185±10	132±12	103±10	60±10	115±13
В, %	90±1	86±1	81±2	75±2	-

Разработка технологии лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208

Для повышения устойчивости и продления срока хранения ЛЛФ ЛХС-1208 целесообразно применение метода лиофилизации. Разработка технологии лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208 включает решение 3 основных задач – выбор эффективного криопротектора, оптимального объема наполнения флакона и определение режима лиофилизации.

Выбор криопротектора для лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208

В качестве криопротекторов исследовали представителей класса «углеводы» – глюкозу, сахарозу и трегалозу, которые вводили в состав ЛФ в молярных соотношениях Лец/криопротектор 1:2, 1:3, 1:5, 1:7,5 и 1:10 путем растворения вещества в воде для инъекций, предназначенной для гидратации липидной пленки. В качестве контроля использовали дисперсию без криопротектора. Эффективность криопротекторов оценивали по следующим показателям качества: внешний вид ЛЛФ после регидратации лиофилизата, размер везикул и включение ЛХС-1208 в липосомы. Как видно из результатов, представленных в табл. 7, криопротектором, обеспечивающим получение продукта с оптимальными показателями качества, является сахароза, вводимая в ЛФ в молярном соотношении Лец/криопротектор 1:3. В данном случае при регидратации лиофилизата отмечалось образование светло-желтой дисперсии без осадка и признаков расслоения со средним размером везикул 175 нм и уровнем включения ЛХС-1208 92%.

Влияние типа криопротектора и его содержания в ЛФ на эффективность лиофилизации липосом ЛХС-1208

Криопротектор		Внешний вид	Средний размер везикул, нм		В, %	
Вещество	Молярное соотношение Лец/КП*		до лиофилизации	после лиофилизации		
Контроль		Вязкая масса желтого цвета	181±7	415±25 (90 %) / 32±11 (10 %)	93±0,5	
Глюкоза	1:2		180±6	256±16 (96%) / 37±10 (4 %)	92±0,5	
	1:3		175±6	230±15 (99 %) / 16±4 (1 %)		
	1:5		Светло-желтая гомогенная дисперсия, без осадка и признаков расслоения	178±5	200±10	90±1
	1:7,5			175±7	185±8	89±1
	1:10	178±8		188±6		
Сахароза	1:2	Вязкая масса желтого цвета	175±8	198±10	93±1	
	1:3	Светло-желтая гомогенная липосомальная дисперсия, без осадка и признаков расслоения	174±7	175±6	92±0,8	
	1:5		178±8	180±5	91±1	
	1:7,5		180±8	188±6 (97 %) / 21±5 (3 %)		
	1:10	Светло-желтая дисперсия с признаками расслоения	180±10	217±12 (92 %) / 28±3 (8 %)	89±1	
Триглицериды	1:2	Вязкая масса желтого цвета	180±6	192±11 (98 %) / 24±5 (2 %)	92±0,6	
	1:3	Светло-желтая гомогенная липосомальная дисперсия, без осадка и признаков расслоения	175±6	190±10	91±0,5	
	1:5					Светло-желтая дисперсия с осадком
	1:7,5	178±8	202±12	90±1		
	1:10	Вязкая масса желтого цвета с признаками расслоения	179±10		197±10 (75 %) / 45±10 (25 %)	

Примечание: * – криопротектор

Выбор режима лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208

При выборе оптимальных условий лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208 исследовали 3 режима – с медленным замораживанием (1), быстрым замораживанием (2) и режим с предварительным замораживанием препарата в течение суток в морозильной камере (3) (рис. 2).

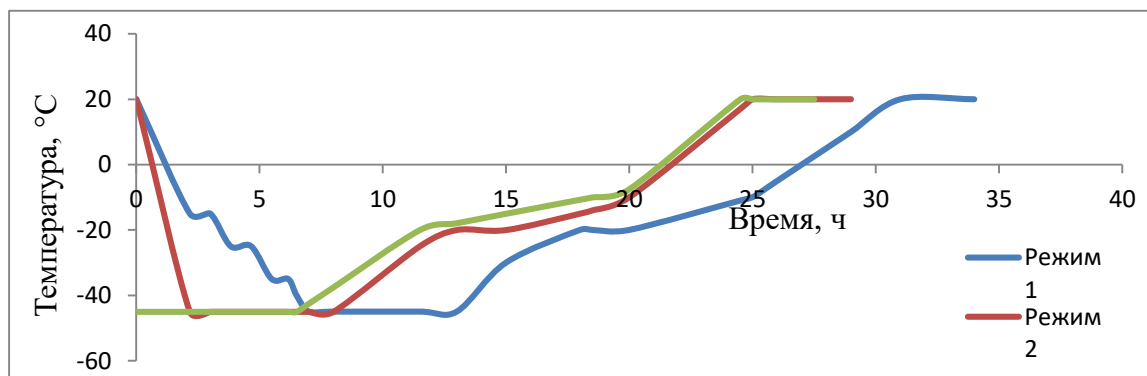


Рис. 2. Графики сублимационной сушки ЛЛФ ЛХС-1208 по Режимам 1–3

В результате проведения серии сублимационных высушиваний ЛЛФ ЛХС-1208 с использованием 3 исследуемых режимов лиофилизации установлено, что скорость и время замораживания влияет на качество конечного продукта. Согласно данным, представленным в табл. 8, полученные лиофилизаты представляли собой сухую пористую массу светло-желтого цвета, легко регидратируемую при добавлении воды. Режимы 1 и 2 не оказывали влияния на размер липосом, который до и после лиофилизации составил в среднем 180 нм, а включение ДВ сохранялось на уровне 92%. Однако предварительное замораживание и длительное выдерживание препарата при температуре $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ухудшает качество лиофилизата и после регидратации отмечается образование липосом размером 195 нм. Поскольку режим с быстрым замораживанием требует меньших затрат времени и электроэнергии и обеспечивает получение качественного лиофилизата, данный режим выбран для получения ЛЛЛФ ЛХС-1208.

Таблица 8

Качество лиофилизатов ЛЛФ ЛХС-1208, полученных при использовании различных режимов сублимационной сушки

Показатель качества	Режим		
	с медленным замораживанием	с быстрым замораживанием	с предварительным замораживанием препарата в течение 24 ч в низкотемпературной камере
Внешний вид	Сухая пористая масса светло-желтого цвета, после регидратации однородная дисперсия		
Размер везикул до/после лиофилизации, нм	179±10/178±6	178±8/180±7	180±8/195±6
В, %	92±1		

Выбор объема наполнения флакона липосомальной дисперсией ЛХС-1208

Для установления максимально возможного объема наполнения флакона липосомальной дисперсией проводили серию сублимационных высушиваний ЛЛФ ЛХС-1208 с учетом выбранного криопротектора и режима лиофилизации, дозируя дисперсию по 4, 5, 6 и 7 мл. Эффективность лиофилизации липосомального ЛХС-1208 в различных объемах загрузки флакона оценивали по уровню бракованной продукции, который определяли визуально (по внешнему виду лиофилизата).

В результате установлено, что при объемах наполнения флакона от 4 до 6 мл бракованная продукция полностью отсутствовала. При увеличении объема наполнения флакона липосомальной дисперсией до 7 мл после лиофилизации фиксировали наличие флаконов с расслоившимся лиофилизатом – до 10% от всего количества флаконов. Таким образом, максимально возможный объем наполнения флакона липосомальной дисперсией ЛХС-1208 при лиофилизации составляет 6 мл, что соответствует содержанию ДВ 1,8 мг/флакон.

Таким образом, в результате проведенного комплекса технологических исследований разработан препарат «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» следующего состава (на 1 флакон):

ЛХС-1208	1,8 мг
Яичный фосфатидилхолин	432,0 мг
Холестерин	45,0 мг
ПЭГ-2000-ДФА	5,0 мг
Сахароза	602,0 мг
Общая масса во флаконе	1086,0 мг

Обобщенная схема технологии получения ЛЛЛФ ЛХС-1208 представлена на рис. 3.

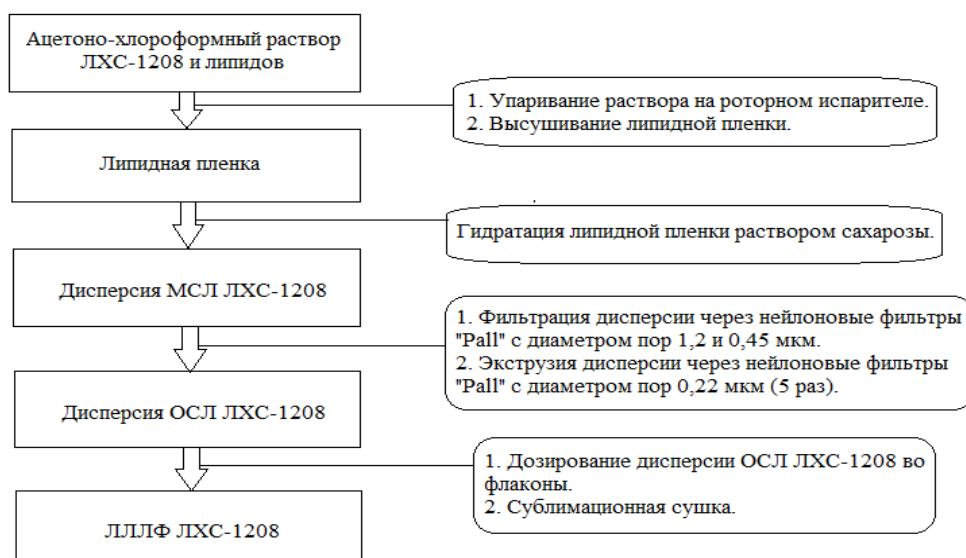


Рис. 3. Стадии технологии получения ЛЛЛФ ЛХС-1208

Разработка и валидация методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 в составе ЛФ

В электронном спектре поглощения (ЭСП) спиртового раствора субстанции ЛХС-1208 в области от 200 до 800 нм имеются максимумы при (319 ± 2) нм, (286 ± 2) нм, (238 ± 2) нм и (203 ± 2) нм (рис. 4А). По представленным на рис. 4Б кривым видно, что спектр спиртового раствора липосомального ЛХС-1208 в диапазоне от 230 до 500 нм идентичен спектру поглощения спиртового раствора его субстанции по форме кривой и положению максимумов. Таким образом, ЭСП липосомального ЛХС-1208 может использоваться для определения подлинности ДВ в ЛФ. Для количественного определения ЛХС-1208 в липосомальной форме выбрана наиболее интенсивная полоса поглощения с максимумом 319 ± 2 нм.

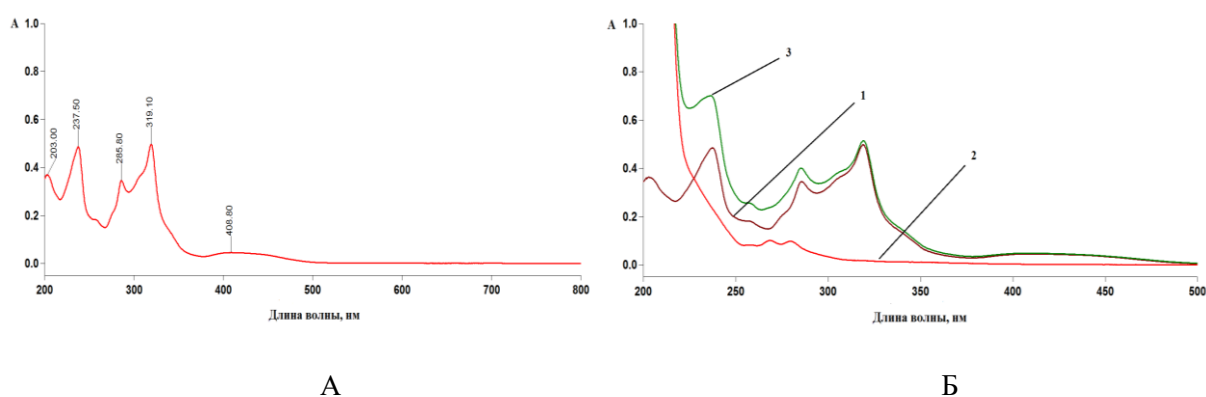


Рис. 4. А. Электронный спектр поглощения спиртового разведения субстанции ЛХС-1208, Б. Электронные спектры поглощения спиртовых разведений субстанции ЛХС-1208 (1), вспомогательных веществ (2) и ЛЛЛФ ЛХС-1208 (3)

При изучении ЭСП спиртового разведения «пустых» липосом установлено, что вспомогательные компоненты имеют максимумы поглощения при (203 ± 1) , (269 ± 1) и (280 ± 1) нм (рис. 4Б). При длине волны (319 ± 2) нм значение оптической плотности для спиртового разведения вспомогательных компонентов близко к нулю (не более 0,007 нм) и, таким образом, не влияет на идентификацию и количественное определение ЛХС-1208 в составе ЛФ, а методику можно считать *специфичной*.

По результатам валидационной оценки по характеристикам «линейность», «правильность», «прецизионность» установлено, что разработанная методика применима для количественного определения ЛЛС-1208 в диапазоне концентраций ДВ 80–120%.

Методика количественного анализа ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии. 2 мл липосомальной дисперсии ЛХС-1208 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют небольшое количество спирта 95%, перемешивают, доводят спиртом до метки и вновь перемешивают (раствор А). 5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом до метки (раствор Б). Измеряют величину оптической плотности раствора Б в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм в максимуме поглощения (319 ± 2)

нм относительно раствора сравнения. Параллельно проводят измерение оптической плотности спиртового раствора СО субстанции ЛХС-1208 относительно раствора сравнения (спирт 95%). Концентрацию ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии (С, мг/мл) рассчитывают по формуле:

$$C = A \times a_0 \times V / A_0 \times V_0,$$

где: А и А₀ – оптические плотности растворов образца липосомальной дисперсии и СО ЛХС-1208, соответственно; а₀ – навеска СО ЛХС-1208, в мг; V и V₀ – разведения образца липосомальной дисперсии и СО ЛХС-1208, соответственно.

Методика количественного анализа ЛХС-1208 в лиофилизате. К содержимому флакона ЛЛЛФ ЛХС-1208 добавляют 5,6 мл воды и перемешивают до получения гомогенной липосомальной дисперсии. Дисперсию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют небольшое количество спирта 95% и перемешивают, доводят спиртом до метки (раствор А). Отбирают 3 мл раствора А в колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом до метки (раствор Б). Измеряют величину оптической плотности раствора Б в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм в максимуме поглощения 319±2 нм относительно раствора сравнения. Параллельно проводят измерение оптической плотности спиртового раствора СО субстанции ЛХС-1208 относительно раствора сравнения (спирт 95%). Содержание ЛХС-1208 во флаконе (Х, мг) рассчитывают по формуле:

$$X = A \times a_0 \times V / A_0 \times V_0,$$

где: А и А₀ – оптические плотности растворов образца ЛЛЛФ и СО ЛХС-1208, соответственно; а₀ – навеска СО ЛХС-1208, в мг; V и V₀ – разведения образца ЛЛЛФ и СО ЛХС-1208, соответственно. Относительная погрешность количественного определения ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии до и после лиофилизации составляет не более 0,6%.

Разработка методики качественного ТСХ-анализа ЛЛЛФ ЛХС-1208

Цель данной работы – установление оптимальных условий хроматографического разделения компонентов ЛЛЛФ ЛХС-1208. Основу исследований составили литературные данные о качественном ТСХ-анализе липосомальных препаратов и объекта исследования – ЛХС-1208. Поскольку сахароза присутствует в ЛФ в значительно большем количестве, чем остальные компоненты, хроматографический анализ данного вещества проводили отдельно.

Выбор подвижной фазы для хроматографического анализа

Для приготовления элюента использовали растворители, широко применяемые в химико-фармацевтическом анализе: хлороформ, спирт 95%, пропанол-2, н-бутанол, метанол, бензол, ацетон, аммиак водный 25%, ледяную уксусную кислоту, гексан и воду. Эффективность системы растворителей оценивали по величине удерживания R_f и количеству обнаруживаемых пятен на пластинке. При этом систему растворителей считали приемлемой, если значения величины удерживания для пятен определяемых веществ находились в диапазоне 0,3–0,7.

Было изучено 14 элюирующих систем различного качественного и количественного состава. Как видно из табл. 9, ни одна из предложенных систем не позволяет провести одновременный анализ всех определяемых компонентов ЛФ. В результате для совместной идентификации ЛХС-1208 и Хол в ЛФ выбрана система 8 – хлороформ–этанол–гексан (5:3:3), при которых R_f составили значения 0,54 и 0,68, соответственно. Система 10 – хлороформ–этанол–вода (16:6:1) позволяет проводить одновременно в одной хроматографической камере, но на разных пластинках, ТСХ-анализ Лец и сахарозы.

Оценку пригодности выбранных хроматографических систем проводили путем установления предела обнаружения анализируемых веществ. Результаты исследования показали, что предел обнаружения ЛХС-1208 в системе хлороформ–этанол–гексан (5:3:3) составил 0,1 мкг, холестерина – 1,0 мкг. Пределы обнаружения лецитина и сахарозы в системе хлороформ–этанол–вода (16:6:1) составили соответственно 1,0 и 0,1 мкг.

Методика ТСХ-анализа ЛХС-1208 и липидных компонентов ЛФ. К лиофилизату добавляют 5,6 мл воды и перемешивают. Прибавляют 12 мл спирта 95% и перемешивают (концентрация ЛХС-1208 в полученном образце 0,1 мг/мл). На линию старта хроматографической пластинки наносят по 5 мкл исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1208 (ЛХС-1208 – 0,5 мкг) и спиртовых растворов СОВС: ЛХС-1208 с концентрацией 0,1 мг/мл (СОВС-1 – 0,5 мкг), Лец с концентрацией 24 мг/мл (СОВС-2 – 120 мкг) и Хол с концентрацией 2,5 мг/мл (СОВС-3 – 12,5 мкг). После подсушивания на воздухе пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру с элюентом, плотно закрывают 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. ЛХС-1208 идентифицируют на пластинке визуально по характерным светло-желтым пятнам без использования специфических реактивов. Для обнаружения Лец пластинку помещают в камеру, насыщенную парами йода, и выдерживают около 1 мин до появления желтых пятен данного вещества. Обнаружение Хол проводят, опрыскивая пластинку 20% серной кислотой с последующим ее нагреванием до появления характерных розово-фиолетовых пятен. Проявившиеся пятна в липосомальных образцах идентифицируют относительно пятен СОВС и характеризуют по величине удерживания R_f .

Методика ТСХ-анализа сахарозы в ЛЛЛФ ЛХС-1208. К лиофилизату добавляют 5,6 мл воды и перемешивают. 1 мл полученной дисперсии переносят в колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Концентрация сахарозы в полученном образце 1 мг/мл. На хроматографическую пластинку наносят по 2 мкл исследуемого образца ЛЛЛФ (сахароза – 2 мкг) и водного раствора СОВС-4 сахарозы с концентрацией 1 мг/мл (сахароза – 2 мкг). Пластинку помещают в камеру с элюентом, плотно закрывают крышкой и хроматографируют восходящим способом.

Оценка эффективности различных систем растворителей при ТСХ-анализе ЛЛФ ЛХС-1208

№	Система растворителей	Значение R _f							
		ЛХС-1208		Лец		Хол		Сахароза	
		ЛФ	СОВС-1	ЛФ	СОВС-2	ЛФ	СОВС-3	ЛФ	СОВС-4
1	бензол–спирт этиловый (1:1)	0,36	0,37	старт	0,02	0,80	0,82	0,24	0,24
2	бутанол–ледяная уксусная кислота–вода (6:3:2)	0,25	0,26	0,03	0,03	0,86	0,86	0,08	0,09
3	хлороформ–этанол–ледяная уксусная кислота–вода (40:7:7:5)	0,63	0,63	0,31	0,30	1,00	1,00	0,12	0,13
4	хлороформ–этанол–ледяная уксусная кислота–ацетон–вода (6:2:2:1:1)	0,32	0,32	0,35	0,35	1,00	1,00	0,18	0,20
5	хлороформ–этанол (7:4)	0,72	0,72	старт	старт	1,00	1,00	0,29	0,29
6	хлороформ–аммиак (4:1)	0,23	0,26	старт	старт	0,68	0,67	0,88	0,89
7	хлороформ–метанол–аммиак–вода (18:1:1:1)	0,12	0,12	старт	старт	0,79	0,80	-	-
8	хлороформ–этанол–гексан (5:3:3)	0,54	0,54	0,11	0,11	0,68	0,69	старт	старт
9	хлороформ–метанол–аммиак (88:1:1)	старт	старт	старт	старт	0,64	0,65	-	-
10	хлороформ–этанол–вода (16:6:1)	0,85	0,86	0,37	0,37	0,91	0,91	0,47	0,48
11	хлороформ–ледяная уксусная кислота–этанол–аммиак (12:6:1:1)	0,27	0,29	0,23	0,24	0,84	0,84	0,25	0,25
12	хлороформ–ледяная уксусная кислота–бутанол–аммиак (12:6:1:1)	0,54	0,53	0,38	0,38	0,91	0,92	0,08	0,10
13	гексан–ледяная уксусная кислота (1:1)	0,72	0,73	старт	старт	0,95	0,95	0,43	0,4
14	ацетон–ледяная уксусная кислота (15:3:2)	0,22	0,23	0,02	0,02	0,82	0,83	0,35	0,35

После достижения фронтом элюента линии финиша (пробег 12 см) пластинку вынимают из камеры и высушивают на воздухе до полного удаления запаха растворителей. Пластинку обрабатывают раствором α -нафтола и нагревают до появления темно-фиолетовых пятен сахарозы. Рассчитывают R_f пятен сахарозы для ЛФ и СОВС-4.

Стандартизация и изучение стабильности ЛЛЛФ ЛХС-1208

Для стандартизации ЛЛЛФ ЛХС-1208 были выбраны показатели, по которым следует контролировать качество препарата после получения и в процессе хранения: «Описание», «Регидратируемость», «Подлинность», «Количественное определение», «Однородность дозирования», «Однородность массы дозированных лекарственных форм», «Размер везикул», «рН», «Потеря в массе при высушивании».

Для изучения стабильности препарата «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» 3 стандартные серии были заложены на хранение в морозильную камеру с температурой $-(18-20)^\circ\text{C}$. Из результатов оценки основных показателей качества серий препарата, представленных в табл. 10, видно, что разработанная ЛЛЛФ ЛХС-1208 сохраняет стабильность в течение 6 мес хранения. Исследование по установлению срока годности продолжается.

Таблица 10

Изучение стабильности ЛФ «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг»

Показатель	Норма	Срок хранения, мес.	Серия		
			030516	040516	050616
Описание	Сухая пористая масса светло-желтого цвета	0	Сухая пористая масса светло-желтого цвета		
		3			
		6			
Количественное содержание, мг	1,5–2,1	0	1,81	1,83	1,78
		3	1,80	1,83	1,79
		6	1,81	1,82	1,78
Однородность массы дозированных лекарственных форм	0,977–1,195	0	1,091	1,113	1,064
		3	1,096	1,114	1,070
		6	1,098	1,110	1,061
Средний размер везикул	не более 210	0	179	179	187
		3	180	176	185
		6	183	180	185
Значение рН	6,0–7,1	0	6,6	7,0	6,1
		3	6,5	6,9	6,5
		6	6,5	6,4	6,4
Потеря в массе при высушивании, %	не более 3%	0	0,3	0,5	0,2
		3	0,4	0,4	0,2
		6	0,4	0,5	0,3

Изучение цитотоксической активности ЛЛЛФ ЛХС-1208

В МТТ-тесте сравнили цитотоксическую активность ЛЛЛФ ЛХС-1208 и ИЛФ-лио соединения ЛХС-1208. Кроме того, оценили цитотоксичность «пустых» липосом, не содержащих ЛХС-1208, но содержащих все вспомогательные вещества. «Пустые»

липосомы оказывали цитотоксическое действие не более чем на 10 % клеток в обеих клеточных линиях. В результате на клеточной линии *mel Ibr* ИК₅₀ для обеих ЛФ составила 7,5 мкг/мл (рис. 5). Клетки линии *mel Kor* оказались более чувствительны к ЛХС-1208: ИК₅₀ для ЛЛЛФ составила менее 1,875 мкг/мл, а для ИЛФ-лио – 3,75 мкг/мл. Таким образом, на клеточной линии *mel Kor* ЛЛЛФ ЛХС-1208 проявил большую цитотоксичность по сравнению с ИЛФ-лио (рис. 5).

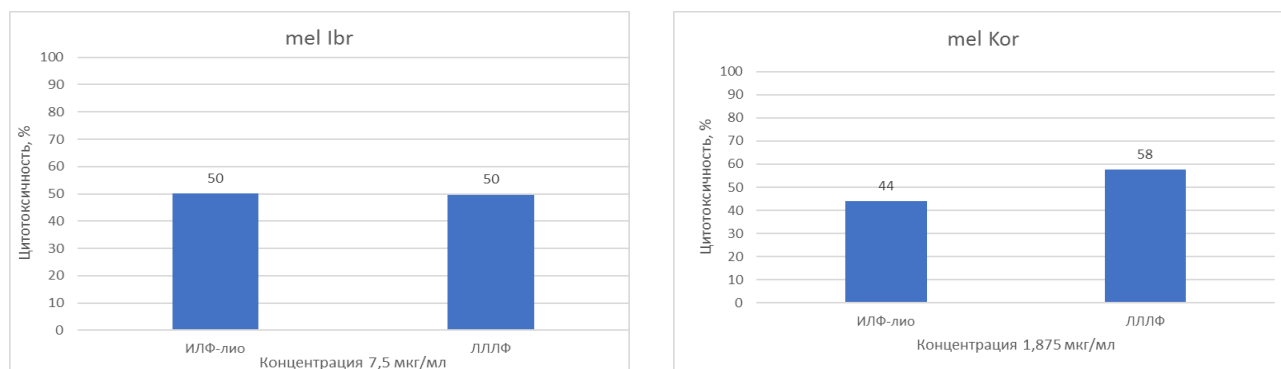


Рис. 5. Сравнение цитотоксической активности ЛЛЛФ ЛХС-1208 и ИЛФ-лио ЛХС-1208: А – *mel Ibr* в концентрации 7,5 мкг/мл; Б – *mel Kor* в концентрации 1,875 мкг/мл.

Полученные результаты показывают, что ЛЛЛФ ЛХС-1208 обладает противоопухолевым действием *in vitro*.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований установлен оптимальный состав стерически стабилизированной липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208 для внутривенного введения с молярными соотношениями компонентов ЛХС-1208/Лец 1:150 и Лец/Хол/ПЭГ-2000-ДФФА=1:0,20:0,003.
2. Разработана технология получения стабильной при хранении лиофилизированной липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208 для внутривенного введения. Для обеспечения максимальной стабилизации липосом в процессе лиофилизации подобран эффективный криопротектор – сахароза, вводимая в лекарственную форму в молярном соотношении Лец/сахароза 1:3.
3. Разработана методика качественного хроматографического анализа компонентов лекарственной формы ЛХС-1208 с использованием хроматографических пластинок «Sorbfil» и выбраны системы растворителей – хлороформ–этанол–гексан (5:3:3) для обнаружения ЛХС-1208 и холестерина, хлороформ–этанол–вода (16:6:1) для определения лецитина и сахарозы. Разработана и валидирована методика количественного спектрофотометрического анализа липосомального ЛХС-1208 при длине волны 319±2 нм с использованием стандартного образца.

4. Проведена стандартизация лиофилизированной липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208 и изучена ее стабильность в процессе хранения. Установлено, что препарат сохраняет устойчивость в течение 6 мес хранения.
5. Изучена цитотоксическая активность лиофилизированной липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208 в опытах *in vitro*. На клеточной линии mel Ibr ИК₅₀ для лиофилизированной липосомальной лекарственной формы составила 7,5 мкг/мл, mel Kog – менее 1,875 мкг/мл.

Практические рекомендации

1. Целесообразна разработка и внедрение в практику лабораторного регламента и проекта НД на препарат «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг»
2. Актуальным является масштабирование технологии получения препарата «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» с целью его дальнейшего внедрения в производственную практику.
3. Рекомендовано проведение биологических исследований *in vivo* липосомального ЛХС-1208 для оценки его противоопухолевой активности.

Перспективы дальнейшей разработки темы

1. Дальнейшие фармацевтические исследования могут быть направлены на модификацию предложенной рецептуры с применением альтернативного липидного состава ЛФ с целью возможного увеличения загрузки ЛХС-1208 в липосомы и повышения стабильности препарата.
2. Перспективно проведение комплекса доклинических исследований ЛЛЛФ ЛХС-1208 с целью углубленного изучения ее противоопухолевой эффективности, фармакокинетики и токсичности для организма.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гулякин, И.Д. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолокарбазола ЛХС-1208 / И.Д. Гулякин, А. Хашем, Л.Л. Николаева, М.В. Дмитриева, Д.А. Афанасьева, М.А. Барышникова, Н.А. Оборотова, А.В. Ланцова // **Российский биотерапевтический журнал.** – 2016. – Т. 15. – №2. – С. 55–60.
2. Райков, А.О. Липосомы для направленной доставки противоопухолевых препаратов / А.О. Райков, А. Хашем, М.А. Барышникова // **Российский биотерапевтический журнал.** – 2016. – Т. 15. – №2. – С. 90–96.
3. Хашем, А. Определение оптимального содержания криопротектора при лиофилизации липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола – ЛХС-1208 / А. Хашем, И.Д. Гулякин, Л.Л. Николаева, М.В. Дмитриева,

Л.А. Король, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты». – Москва, 2017. – С. 4–5.

4. Гулякин, И.Д. Оценка качества лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола – ЛХС-1208 / И.Д. Гулякин, А. Хашем, М.В. Дмитриева, Л.Л. Николаева, Е.В. Игнатьева, Н.А. Дмитричева, И.В. Ярцева, Л.А. Король // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты». – Москва, 2017. – С. 27.

5. Dmitrieva, M.V. Development and validation of the procedure for the quantification of the lyophilized liposomal dosage form of the LHS-1208 indolocarbazole derivative / Maria Vyacheslavovna Dmitrieva, **Ali Hashem**, Elena Vladimirovna Ignatyeva, Lyudmila Anatolievna Korol, Ivan Ivanovich Krasnyuk, Victoriya Andreevna Dezhurko-Korol // **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (JPSR)** Vol. 10(6), 2018. Pages:1400-1405. [Http://www.pharmainfo.in/jpsr/issue.php?page=106](http://www.pharmainfo.in/jpsr/issue.php?page=106).

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДВ – действующее вещество

ИЛФ-лио – лиофилизированная инъекционная лекарственная форма

ЛВ – лекарственное вещество

Лец – лецитин

ЛЛЛФ – лиофилизированная липосомальная лекарственная форма

ЛЛФ – липосомальная лекарственная форма

МСЛ – многослойные липосомы

ОСЛ – однослойные липосомы

ПЭГ-2000-ДГФА – полиэтиленгликоль-2000-дистеароифосфатидилэтаноламин

СО – стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография

УЗ – ультразвук

Хол – холестерин

ЭВ – эффективность включения

ЭСП – электронный спектр поглощения