

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
МОСКОВСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ  
ИМЕНИ И.М.СЕЧЕНОВА РОСЗДРАВА

*На правах рукописи*

РАЙКОВ АЛЕКСАНДР ОЛЕГОВИЧ  
**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СОСТАВА  
ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ МИТОКСАНТРОНА С  
ГУМАНИЗИРОВАННЫМИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ  
АНТИТЕЛАМИ К HER-2 АНТИГЕНУ**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
доктор фармацевтических наук, профессор И.И. Краснюк

Москва – 2016

## Оглавление

Оглавление .....	2
Введение .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
1.1 Митоксантрон .....	10
1.1.1 Химические свойства митоксантрона .....	10
1.1.2 Механизм действия .....	13
1.2 Лекарственная форма митоксантрона и особенности ее применения .....	14
1.3 Методы анализа митоксантрона гидрохлорида .....	16
1.3.1 Спектрофотометрия в УФ и видимой области спектра .....	17
1.4 Липосомальные лекарственные формы в настоящее время .....	18
1.4.1 Строение липосом .....	23
1.4.2 Номенклатура липосом .....	24
1.4.3 Методы получения липосомальных наночастиц .....	26
1.4.4 Характеристики липосомальных частиц .....	36
1.4.5 Методы активной загрузки .....	39
1.5 Модификации липосом .....	42
1.5.1 Пролонгирование циркуляции липосом (ССЛ) .....	42
1.5.2 Присоединение антител (иммунолипосомы) .....	43
1.6 Липосомальные лекарственные формы веществ антрациклинового ряда .....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	49
2.1 Материалы .....	49
2.2 Оборудование .....	52
2.3 Методы .....	55
2.3.1 Метод получения больших многослойных липосом .....	55
2.3.2 Метод получения малых однослойных липосом .....	55
2.3.3 Метод получения липосом с инкапсулированным митоксантроном .....	56
2.3.4 Метод получения иммунолипосомальной конструкции митоксантрона .....	56
2.3.5 Измерение диаметра везикул .....	57
2.3.6 Получение чистой фракции дисперсии с митоксантроном методом гель- фильтрации .....	57
2.3.7 Метод стерилизующей фильтрации везикул с митоксантроном .....	58
2.3.8 Количественное определение инкапсулированного митоксантрона .....	58

2.3.9	Определение белка, связанного с поверхностью липосом с использованием медного комплекса бицинхониновой кислоты .....	60
2.3.10	Расчет количества молекул на одну липосому. ....	61
2.3.11	Метод измерения $\zeta$ (дзета) – потенциала липосомальной дисперсии .....	62
2.3.12	Метод оценки специфического связывания иммунолипосомальной конструкции митоксантрона с клетками–мишенями методом непрямой реакции поверхностной иммунофлуоресценции (РИФ).....	63
2.3.13	Проточно–цитофлуориметрический анализ.....	63
2.3.14	Оценка цитотоксической активности липосомальной формы и иммунолипосомальной конструкции митоксантрона МТТ–тестом <i>in vitro</i> .....	64
ГЛАВА 3. Разработка состава и технологии получения липосомальной формы митоксантрона		66
3.1	Технология получения липосомальных дисперсий митоксантрона.....	66
3.1.1	Выбор липидных композиций .....	67
3.1.2	Получение больших многослойных липосом (МЛВ).....	69
3.1.3	Получение малых однослойных липосом (МОЛ).....	72
3.1.4	Загрузка препарата.....	76
3.2	Количественное определение митоксантрона включенного в липосомы.....	81
3.3	Получение иммунолипосомальной конструкции митоксантрона .....	83
3.3.1	Очистка иммунолипосомального митоксантрона .....	85
3.4	Спектрофотометрическое определение содержания митоксантрона в иммунолипосомальной конструкции .....	87
3.4.1	Определение влияния антител на спектрофотометрические характеристики иммунолипосомального митоксантрона. ....	87
3.5	Определение количества моноклональных антител, связанных с поверхностью липосом.....	90
3.6	Лиофилизация липосомального митоксантрона. ....	91
3.6.1	Подбор криопротекторов для липосомальной формы митоксантрона. ....	93
3.6.2	Изучение влияния способов замораживания. ....	95
3.6.3	Изучение влияния процесса сублимации на размер частиц. ....	97
3.6.4	Влияние продолжительности хранения на характеристики липосомального митоксантрона.....	98
3.7	Заключение.....	100

ГЛАВА 4. Исследование липосомальной и иммунолипосомальной лекарственной формы препарата <i>in vitro</i> .....	103
4.1 Исследование цитотоксической активности липосомальной формы митоксантрона на клетках мишенях.....	103
4.2 Оценка влияния пустых иммунолипосомальных и липосомальных конструкций на цитотоксичность.....	105
4.3 Исследование цитотоксической активности иммунолипосомальной формы митоксантрона на клетках мишенях.....	107
4.4 Заключение.....	111
Выводы.....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	114
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА.....	117
Список литературы.....	121
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	135

## Введение

### Актуальность темы исследования

Согласно данным всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) онкологические заболевания являются одной из основных причин заболеваемости и смертности во всем мире. По прогнозам, число случаев заболевания от рака будет продолжать расти от 14 миллионов в 2012 году до 22 миллионов в следующие десятилетия [133]. В свою очередь, одним из основных методов лечения онкологических заболеваний является цитостатическая и цитотоксическая химиотерапия, связанная с сильным токсическим воздействием на различные системы организма пациента и ограниченная дозопределенными побочными эффектами. Необходимость увеличения терапевтического эффекта применяемых препаратов и снижения побочных эффектов привела к развитию различных подходов к применению цитотоксических и цитостатических лекарственных веществ и достижения избирательности их действия. Одним из активно развивающихся направлений стало совершенствование лекарственных форм с целью обеспечения направленного транспорта биологически активных веществ. В результате, было создано множество различных типов наноносителей, одним из которых стали липосомальные и иммунолипосомальные конструкции. В настоящее время известно, что инкапсулирование цитостатиков в липосомы уменьшает его общетоксическое действие и увеличивает его биодоступность за счет особенностей кровоснабжения опухоли. [4,12,10,33,220,246-247] Пассивная доставка противоопухолевых препаратов за счет липосомальных конструкций реализована в лекарственных препаратах, одобренных для медицинского применения, таких как (Doxil, Myocet, Lipo-dox, DaunoXome) [43,48,49,102,113, 116,157,233].

Совершенствование механизмов направленного транспорта привело к модификации липосомальных лекарственных форм с использованием иммунохимических векторов и созданию иммунолипосомальных конструкций. Иммунолипосомы – липосомальные конструкции, имеющие на своей поверхности

векторные лиганды, в качестве которых могут выступать факторы роста, пептиды и моноклональные антитела (МКА). В настоящее время изучение иммунолипосомальных конструкций является одним из наиболее перспективных направлений развития технологии направленной доставки препаратов.

HER-2 положительный рак молочной железы – одно из наиболее распространенных новообразований и вторая по распространенности причина смерти у женщин с раком молочной железы [93]. Данная работа посвящена разработке ИЛЛФ Митоксантрона с гуманизированными моноклональными антителами к HER-2 антигену.

### **Цель исследования**

Разработка состава и технологии получения иммунолипосомальной лекарственной формы митоксантрона с гуманизированными моноклональными антителами к HER-2.

### **Задачи исследования**

1. На основе химико-фармацевтических исследований выбрать состав липосомальной и иммунолипосомальной формы митоксантрона;
2. Разработать технологию получения липосомальной и иммунолипосомальной формы митоксантрона, устойчивой при хранении;
3. Выбрать критерии и параметры качества разработанных форм;
4. Оценить цитотоксическую активность липосомальной и иммунолипосомальной формы митоксантрона *in vitro*;

### **Методы исследования**

1. Технологические методы: экструзия, гомогенизация, лиофилизация
2. Методы фармацевтического анализа липосомальных форм.
3. *Физические*: спектрофотометрия (определение включения и количественного содержания митоксантрона, количественное определение белка), динамическая спектроскопия светорассеяния (определение геометрических характеристик везикул).

4. *Физико-химические*: гель – фильтрация (отделение невключившегося препарата с целью дальнейшего определения включения).
5. Биологические методы оценки цитотоксичности и специфичности полученных ЛЛФ и ИЛЛФ *in vitro* (МТТ-тест и проточная цитофлюориметрия).

#### **Научная новизна исследования**

Разработан оптимальный состав и технология изготовления ИЛЛФ митоксантрона в виде лиофилизата для приготовления инъекционного раствора. В опытах *in vitro* установлено цитотоксическое действие ИЛЛФ митоксантрона в сравнении с субстанцией митоксантрона и аналогичными липосомальными формами.

#### **Теоретическая значимость**

Разработан состав и методика получения липосомальной и иммунолипосомальной формы митоксантрона на основе соевого фосфатидилхолина. Разработана методика очистки везикул от не загруженного препарата и неприсоединенных антител методом гельфильтрации.

Изучено влияние криопротекторов на стабильность липосом и иммунолипосом с митоксантроном до и после лиофилизации, а также в процессе замораживания до температуры  $-18^{\circ}\text{C}$ . Обосновано использование в качестве криопротектора 10% раствора сахарозы. Произведено исследование цитотоксической активности липосомальных и иммунолипосомальных форм митоксантрона и субстанции на клетках-мишенях.

#### **Практическая значимость исследования**

Разработана новая липосомальная и иммунолипосомальная форма высокоактивного противоопухолевого антибиотика митоксантрона для таргетной противоопухолевой терапии HER-2 позитивного рака молочной железы. Показана его стабильность при хранении в течение 6 месяцев при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Разработан проект ФСП на «Митоксантрон липосомальный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2 мг» и «Митоксантрон

иммунолипосомальный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2 мг».

### **Положения, выносимые на защиту**

- Результаты исследований по разработке состава и технологии изготовления ИЛЛФ Митоксантрона.
- Методики качественного и количественного анализа и показатели качества ИЛЛФ Митоксантрона.
- Результаты изучения цитотоксического действия ИЛЛФ Митоксантрона в опытах *in vitro*.

### **Апробация работы**

Материалы проведенных исследований представлены на конференциях: XII Всероссийской научно–практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, 31 марта – 1 апреля 2015 года.

Апробация диссертационной работы проходила на кафедре фармацевтической технологии 5 ноября 2015, Москва, Никитский бульвар, д. 13..

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 4 печатных работы, из них 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 доклад и 2 тезисов на русском языке.

### **Связь задач исследований с проблемным планом фармацевтической науки.**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом научных исследований ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, комплексная тема: «Совершенствование образовательных технологий до дипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования». Номер государственной регистрации 01.2.011.68237.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, глав обсуждения результатов собственных исследований,

общего заключения, общих выводов, списка литературы и 6 приложений. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 41 рисунок и 18 таблиц. Библиографический список включает 266 наименований, из которых 227 на иностранном языке.

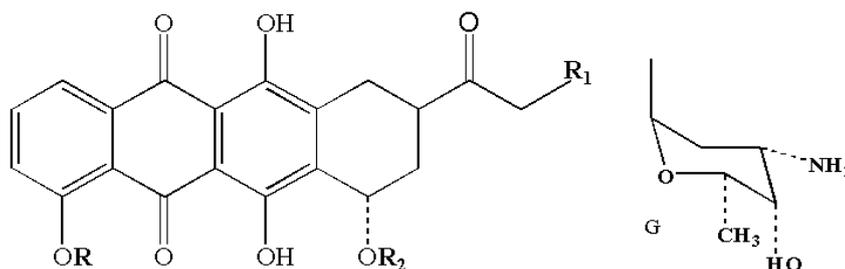
## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Митоксантрон

#### 1.1.1 Химические свойства митоксантрона

По химической структуре митоксантрона гидрохлорид относится к группе дисперсных антрахиноновых красителей, физико–химические свойства которых достаточно хорошо изучены [25]. Антрациклиновые антибиотики имеют углеродный скелет, в котором ядро антрахинона линейно аннелировано с шестичленным насыщенным карбоциклом и содержит α–гидроксигруппы, обуславливающие красную или оранжевую окраску препаратов (Рисунок 1) [29].

Рисунок 1 – Химическое строение представителей группы антрациклиновых антибиотиков.



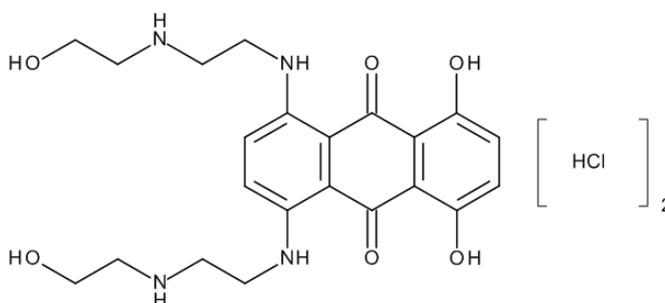
	<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
Дауномицин (рубомицин)	CH <sub>3</sub>	H	H
Доксорубицин (адриамицин)	CH <sub>3</sub>	OH	G,H
Карминомицин	H	H	G,H

Из множества производных антрахинона, обладающих противоопухолевой активностью, Митоксантрон нашел наиболее широкое применение. Митоксантрон, чаще всего, присутствует в лекарственных формах в виде митоксантрона гидрохлорида (Рисунок 2). Физико–химические свойства митоксантрона представлены в Таблица 1.

Таблица 1 – Физико–химические свойства митоксантрона и митоксантрона дигидрохлорида.

<b>Митоксантрон</b>		
Описание	Кристаллический порошок	[66]
Точка плавления	160–162 °С	[66]
Растворимость	умеренно растворим в воде малорастворим в метаноле практически нерастворим в ацетоне, ацетонитриле и хлороформе.	[66]
<b>Митоксантрона дигидрохлорид</b>		
Описание	Гигроскопичный сине–черный порошок	[66]
Температура плавления	203–205 °С	[66]
Данные спектроскопии	Были получены данные по ультрафиолетовому, инфракрасному, ЯМР (протонный и <sup>13</sup> С), масс спектру	[56]
Растворимость	Умеренно растворим в воде Малорастворим в метаноле Практически нерастворим в ацетоне, ацетонитриле и хлороформе	[66]
Константы диссоциации	pKa , 5.99, 8.13	[56]

Рисунок 2 – Митоксантрон гидрохлорид



CAS 70476–82–3

$C_{22}H_{28}O_6N_4 \cdot 2HCl$

Молекулярная масса 517,41 г/моль

Первые публикации, посвященные данному соединению появились в 1978 г. и содержали только физико–химические свойства. [186,264] Способ получения митоксантрона гидрохлорида впервые был описан и запатентован позже, в 1979г. сотрудниками фирмы Суанамид (США) К. Murdock и С. Zee–Cheng. [187,264]

Митоксантрона гидрохлорид – общее название для дигидрохлоридной соли. В настоящее время он присутствует на рынке как 5–, 10–, 12.5– и 15мл раствор для внутривенного введения содержащий 2.33 мг/мл митоксантрона гидрохлорида, что эквивалентно 2 мг/мл раствору митоксантрона. Инъекционный раствор может также содержать уксусную кислоту, ацетат натрия, хлорид натрия, натрия метабисульфит и натрия сульфат как вспомогательные вещества[63,261].

Митоксантрон получают конденсацией лейкотетраоксиантрахинона с  $\beta$  – оксиэтилэтилендиамином в среде N,N,N,N–тетраметиленамина, с последующим окислением хлоранилом. Последующие опубликованные способы получения митоксантрона гидрохлорида являются модификациями данного способа и отличаются условиями проведения реакции. Особого внимания в процессе синтеза заслуживает стадия окисления в связи с возможным образованием трудноудаляемых побочных продуктов реакции. Митоксантрон при нагревании свыше 100°C или в щелочной среде подвергается внутримолекулярной циклизации с образованием тетрациклического соединения[229,230].

Европейской фармакопеей для митоксантрона гидрохлорида нормированы следующие примеси:

1. 1–амино–5,8–дигидрокси–4–[[2–[(2–гидроксиэтил)амино]этил]амино] антрацен–9,10–дион;
2. 5–гидрокси–1,4–бис[ {2–[(2–гидрокси–этил)амино]этил} амино]антрацен–9,10–дион;
3. 2–хлоро–1,4–дигидрокси–5,8–бис[[2–[(2–гидроксиэтил)амино]этил]амино] антрацен–9,10–дион;

4. 8,11-дигидрокси-4-(2-гидроксиэтил)-6-[[2-[(2-гидроксиэтил)амино]этил]амино]-1,2,3,4-тетрагидронафто-[2,3-f]хиноксалин-7,12-дион[80].

### 1.1.2 Механизм действия

Митоксантрона гидрохлорид – противоопухолевый препарат из группы синтетических антрациклинов, широко применяемый в онкологической практике. По своей химической структуре митоксантрон сходен с доксорубицином и даунорубицином [177,129].

Был синтезирован с целью снизить побочные эффекты антрациклинов – одной из наиболее эффективных групп препаратов – интерколяторов, в частности их кардиотоксичность[107,42]. Механизм противоопухолевого действия митоксантрона изучается уже более 20 лет. Согласно данным этих исследований основным механизмом цитостатического действия митоксантрона, также как и других антрациклинов является встраивание молекулы в ДНК[162,188]. Митоксантрон интеркалирует в ДНК с помощью электростатического взаимодействия нарушая процессы транскрипции и трансляции ДНК раковой клетки, что приводит к ее гибели[129,146,164,162,163]. Последние исследования также показали что митоксантрон влияет на репарацию ДНК посредством ингибирования топоизомеразы II, что ведет к фрагментации ДНК и индуцирует процесс апоптоза[57,90].

Также митоксантрон способен ингибировать протеинкиназу С, вызывать электростатическое поперечное связывание цепей ДНК [139,163]. Митоксантрон обладает максимальной цитотоксичностью в S-фазе клеточного цикла, однако не является специфичным к фазам клеточного цикла. Была показана также перекрестная резистентность с антрациклинами[177,191].

Кардиотоксическое действие антрациклиновых антибиотиков, согласно опубликованным данным, связано с биохимическими превращениями антрахинона в организме. Прежде всего, в результате ферментативного восстановления антрахинона образуются кардиотоксичные семихиноловые

радикалы, которые вступая в реакцию с кислородом образуют гидроксил-радикалы и его аналоги [28, 89, 207]. Вторым путем проявления кардиотоксического действия антрахинонов связан с окислительными свойствами, благодаря которым происходит активация свободного перекисного окисления липидов (СПОЛ) [71, 98]. Как известно, кардиомиоциты не содержат ферментов типа каталазы и супероксиддисмутазы, что делает их уязвимыми к повреждающему действию кислородных радикалов [164]. Большинство исследователей метаболизма митоксантрона сходятся во мнении, что свободные радикалы митоксантрона образуются в результате ферментативного окисления препарата [2]. Сам же митоксантрон, исходя из его химической структуры, является антиоксидантом и ингибирует СПОЛ клеточных мембран, в частности при введении со многими препаратами, провоцирующими СПОЛ, в отличие от прооксидантных антрациклиновых антибиотиков [135, 141]. Незначительные же проявления кардиотоксического действия митоксантрона, по сравнению с терапией другими антрациклиновыми антибиотиками, вероятно связаны именно с ингибированием процесса СПОЛ в кардиомиоцитах [252].

В случае митоксантрона основным побочным действием митоксантрона является подавление иммунной системы. В исследованиях *in vitro* было показано влияние митоксантрона на клетки иммунной системы, препарат ингибирует пролиферацию и нарушает презентацию антигенов В-клеток, Т-клеток и макрофагов, также оказывает негативное влияние на секрецию интерферона гамма, TNF $\alpha$  и IL-2. Однако именно иммуносупрессивное действие препарата используется в терапии тяжелых форм рассеянного склероза [85, 86, 179].

## **1.2 Лекарственная форма митоксантрона и особенности ее применения**

**Лекарственные формы митоксантрона.** Митоксантрона гидрохлорид, как и большинство антрациклиновых антибиотиков наиболее часто применяется в инъекционной форме. Существует множество торговых наименований препаратов митоксантрона (Митоксантрон, Митоксантрон AWD, Митоксантрон-ЛЭНС,

Милотек, Новатрон, Онкотрон). Препараты митоксантрона по форме выпуска представляют собой концентраты для приготовления растворов внутривенного и внутривлепвального введения с концентрацией 2 мг/мл. В растворенном виде являются стерильными, апиrogenными растворами темно – синего цвета в виде лиофилизатов. В качестве вспомогательных веществ, при производстве концентратов митоксантрона используются: кислота уксусная, натрия ацетат, натрия хлорид, натрия пиросульфат. Растворы концентратов имеют рН от 3,0 до 4,5. Фасовка производится во флаконы темного стекла объемом 10 мл, реже 12,5 мл. Препараты митоксантрона широко применяют при онкологических заболеваниях (метастазирующем раке молочной железы, злокачественных новообразованиях яичника, предстательной железы, бронхов и легкого, лимфомах, острых лейкозах) а так же при лечении рассеянного склероза.

**Фармакокинетика.** Фармакокинетика митоксантрона у пациентов после одиночного внутривенного введения характеризуется трехкамерной моделью. Средний альфа период полувыведения митоксантрона от 6 до 12 минут, бета период поувыведения 1,1 – 1,3 часа, средний гамма период полувыведения от 23 до 215 часов (в среднем 75 часов). Доставка митоксантрона к тканям обширная : стационарный объем распределения составляет 1000 Л/м<sup>2</sup>. Особенностью элиминации митоксантрона является большая концентрация в тканях, а не в крови в этот период. При исследовании на обезьянах наблюдалось низкое распределение препарата в мозг, спинной мозг и глаза. При внутривенном введении 15 – 90 мг/м<sup>2</sup> митоксантрона у пациентов наблюдалась линейная зависимость между дозой и площадью под кривой (AUC). Митоксантрон имеет 78% связывание с белками плазмы крови в наблюдаемом диапазоне концентраций от 26 до 455 нг/мл. Данное связывание не зависит от концентрации и наличия фенитоина, доксорубицина, метотрексата, преднизона, преднизолона, гепарина или аспирина.

Основной путь выведения митоксантрона – с калом и мочой в виде неизмененного лекарства или неактивного метаболита. В исследованиях на людях 11 и 25 % дозы обнаруживаются в моче и кале, соответственно, преимущественно как исходный препарат или метаболит в течение 5-дневного периода после

введения. При выведении с мочей 65% представляет собой исходный препарат. Оставшиеся 35% состоят из производных монокарбоновых и карбоновых кислот и их глюкоронид конъюгатов. Пути метаболизма митоксантрона подробно не изучены.

**Взаимодействие с другими препаратами.** Исследования препаратов *in vitro* показали, что митоксантрон не ингибирует CYP 450 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 в широком диапазоне концентраций, результаты исследований не являются окончательными и предполагают что митоксантрон может быть слабым индуктором деятельности CYP 450 2E1. Фармакокинетические исследования препарата с параллельно назначаемыми препаратами не производились. Постмаркетинговые исследования не выявили, каких либо значимых взаимодействий препарата у онкологических больных. Однако токсичность митоксантрона могут увеличивать другие противоопухолевые препараты, кроме того при использовании урикозурческих противоподагрических препаратов, НПВС увеличивается риск побочных явлений и необходима корректировка доз. В виду своего иммуносупрессивного действия препараты митоксантрона ослабляют эффективность использования вакцин, и повышают побочные эффекты вакцинации. Фармацевтически несовместим с тиамином (вызывает его разрушение), гепарином и с др. медикаментами в инфузионном растворе или в одном шприце [9,103,108,195,217].

### **1.3 Методы анализа митоксантрона гидрохлорида**

Несколько фармакопей в частности, Европейская фармакопея и фармакопея США, определяют инфракрасную адсорбционную спектрофотометрию как метод для качественного определения митоксантрона гидрохлорида, а жидкостная хроматография используется для измерения его чистоты. На фармацевтическом производстве митоксантрона гидрохлорид качественно определяют методом адсорбционной спектроскопии в УФ области, для анализа примесей также используют жидкостную хроматографию [80,261]. ВЭЖХ – наиболее распространенный метод анализа митоксантрона и его метаболитов в

биологических объектах[106]. Количественный анализ и анализ чистоты препарата согласно Европейской (Eur Ph 6<sup>th</sup> edn.), Британской (BP 2009), фармакопеям и фармакопее США (USP 33-NF28) проводят исключительно методом ВЭЖХ, с применением стандартных образцов митоксантрона гидрохлорида и двух его примесей. Основным недостатком применения метода ВЭЖХ при количественном определении субстанций, с высоким содержанием действующего вещества, является плохая воспроизводимость методики, связанная главным образом с недостаточной стандартизацией сорбентов, удерживающая способность которых может различаться 2 раза и более [34]. Кроме того, воспроизводимость метода ВЭЖХ в значительной мере определяется надежностью оборудования и тщательным выполнением операций при анализе.

### **1.3.1 Спектрофотометрия в УФ и видимой области спектра**

Применение спектрофотометрии (СФМ) в анализе митоксантрона гидрохлорида описано в Фармакопее США (USP 33-NF28) [261]. Спектрофотометрия широко распространена в фармацевтическом анализе благодаря своим качествам: селективности, экспрессности и высокой чувствительности. Данный метод позволяет с достаточной воспроизводимостью проводить качественное и количественное определение лекарственных препаратов, относящихся к различным классам химических соединений[11]. По количеству предоставляемой информации использование СФМ в УФ и видимой области спектра в 10 раз превосходит методы элементного и функционального анализа, при этом спектрофотометрический метод не требует дорогостоящего оборудования и реактивов[6].

В литературе описаны отдельные данные о характере поглощения видимого и УФ спектра растворами митоксантрона–основания и митоксантрона гидрохлорида в различных растворителях [28]. Данные о максимумах поглощения митоксантрона и его соли представлены в Таблица 2.

Таблица 2 – Описание максимумов поглощения митоксантрона гидрохлорида и митоксантрона основания в некоторых растворителях.

Митоксантрон–основание в этаноле [264,233]					
λ	244нм	279нм	525нм	620нм	660нм
Lg ε	4,64	4,31	3,70	4,37	4,38
A1%1 см	982,06	459,34	112,76	527,40	539,68
Митоксантрона гидрохлорид в воде [246,233]					
λ	241нм	273нм	608нм	658нм	
E	41000	12000	19200	20900	
A1%1 см	792,41	231,92	371,08	403,93	
Митоксантрона гидрохлорид в метаноле [136]					
λ	241нм	277нм	617нм	658нм	
E	40000	13400	19900	25250	
A1%1 см	773,31	259,00	384,61	488,01	

#### 1.4 Липосомальные лекарственные формы в настоящее время

Липосомальные лекарственные формы в рамках лабораторий мира существуют уже более 20 лет, первое лекарственное средство на их основе, одобренное FDA, появилось только в 1995 году, им стал препарат Doxil – пегилированный липосомальный доксорубин, производящийся компанией Jansen. Doxil применяется для лечения рака яичников, множественной миеломы и СПИД ассоциированной Саркомы Капоши. С 1995 по настоящее время было одобрено для медицинского применения еще 8 препаратов, последний из которых, Marqibo был одобрен в 2012 году (Таблица 3). Большинство успешных липосомальных препаратов используются при внутривенном пути введения, что связано с неизбежной деградацией липидов в пищеварительном тракте. В настоящее время на различных фазах клинических исследований находятся еще около 2 десятков препаратов (Таблица 4). Во многих лабораториях по всему миру идут активные исследования по дальнейшему совершенствованию

липосомальной лекарственной формы для расширения спектра ее практического применения. Эти исследования можно в целом разделить на несколько направлений:

1. Модификация мембран липосом с целью получения таргетных препаратов.
2. Модификация мембран липосом с целью модификации высвобождения (термочувствительные, чувствительные к изменению рН или уровню кислорода).
3. Исследования применения комбинаций препаратов с различным механизмом действия и не накладывающимися побочными эффектами.
4. Создание липосомальных вакцин, также известных как виросомы.

Таблица 3 – Липосомальные лекарственные формы, в настоящее время одобренные FDA к медицинскому применению.

Лекарство	Название	Тип	Липидная композиция	Путь введения	Применяется для лечения
Amphotericin B	Ambisome	ОЛ	HSPC DSPG Холестерин	в/в	Лечение инфекций грибкового происхождения[178]
Doxorubicin	Myocet	ОЛ	ЕРС Холестерин	в/в	Метастатический Рак молочной железы [157,113]
	Doxil/Caelyx	ССЛ	HSPC Холестерин DSPE-PEG2000	в/в	Саркома Капоши, рак молочной железы, рак яичников[49,43]
	Lipo-dox	ССЛ	DSPC, Холестерин DSPE-PEG2000	в/в	Саркома Капоши, рак молочной железы, рак яичников[75]
Daunorubicin	DaunoXome	ОЛ	DSPC Холестерин	в/в	Рак крови[116,102]
Verteporfin	Visudyne	ОЛ	EPG и DMPC	в/в	Возрастная молекулярная дегенерация [62,199,65]
Cytarabine	Depocyt	ОЛ	DOPC, DPPG, холестерин и триолеин	и/сп	Неопластический менингит и лимфоматозный менингит [204]
Morphine sulfate	DepoDur	ОЛ	DOPC, DPPG, холестерин и триолеин	Эа	Обезболивающее средство [68,125]
Vincristine sulfate	Marqibo	ОЛ	Яичный сфингомиелин и холестерин	в/в	Острая лимфобластная лейкемия [219,210]

Таблица 4 – Липосомальные лекарственные формы, находящиеся на стадии клинических исследований.

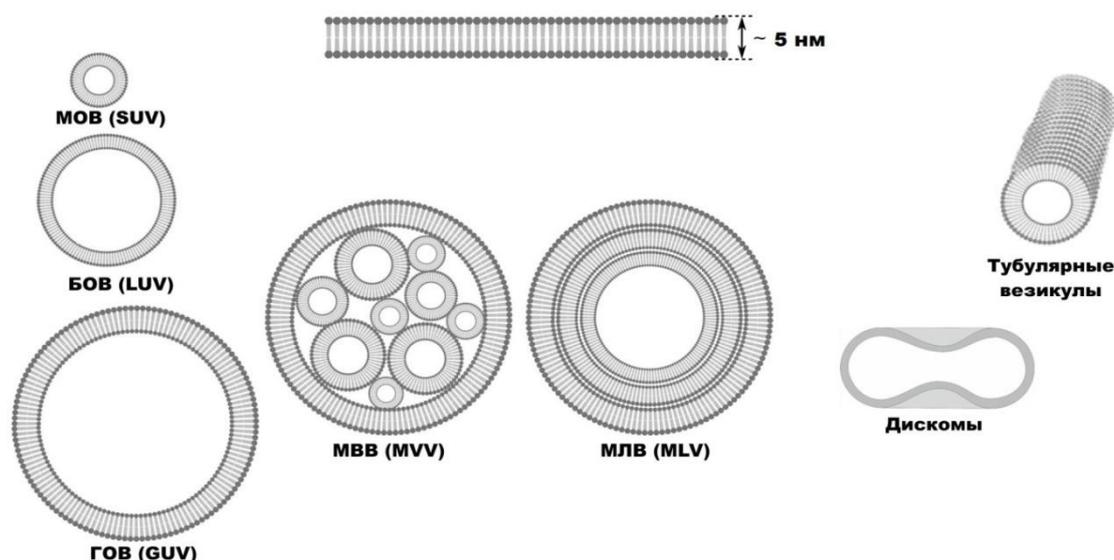
Лекарство	Название	Липидная композиция	Путь введения	Планируется применять для лечения	Фаза
Paclitaxel	LEP-ETU	DOPC Холестерин Кардиолипин	в/в	Рак яичников Рак молочной железы Рак легких [265,105]	I
	EndoTAG-1	DOTAP DOPC	в/в	Анти ангиогенез, Рак молочной железы, Рак поджелудочной железы [101]	II
Doxorubicin	ThermoDox	DPPC MSPC DSPE- PEG2000	в/в	Неоперабельный печеночно-клеточный рак [262,94]	III
Cisplatin и его аналоги	SPI-077	HSPC Холестерин DSPE-mPEG	в/в	Рак легких Опухоли головы и шеи [211,124]	I/II
	Lipoplatin	SPC DPPG Холестерин DSPE-mPEG	в/в	Рак поджелудочной железы Опухоли головы и шеи Мезотелиома Рак молочной железы Рак желудка Немелкоклеточный рак легкого [228,100]	III
	Aroplatin	DMPC DMPG	и/п в/в	Злокачественная плевральная мезотелиома Прогрессирующая карцинома кишечника [165,92]	II
Mitoxantrone	LEM-ETU	DOPC Холестерин Кардиолипин	в/в	Лейкемия Рак молочной железы, желудка, печени и яичников [69,78]	I

Topotecan	INX-0076	Яичный сфингомиелин Холестерин	в/в	Распространенные солидные опухоли [132]	I
Vinorelbine	INX-0125	Яичный сфингомиелин Холестерин	в/в	Рак молочной железы Рак кишечника Рак легких [132,219]	I
Lurtotecan	OSI-211	HSPC Холестерин	в/в	Рак яичников Опухоли головы и шеи [96]	II
Amikacin	Arikace	DPPC Холестерин	Инг.	Легочные инфекции [160,194]	III
BLP25 lipopeptide	Stimuvax	Монофосфори л липид А, Холестерин DMPG DPPC	п/к	Немелкоклеточный рак легкого [260]	III
All-trans retinoic Acid	Atragen	DMPC Соевое масло	в/в	Распространенная почечно- клеточная карцинома[59]	I/II
Annamycin	Liposome- annamycin	DSPC DSPG Твин	в/в	Рак молочной железы [60,61]	I/II
Cytarabine and Daunorubicin	CPX-351	DSPC DSPG Холестерин	в/в	Острый миелолейкоз [104]	II
Irinotecan HCL и floxuridine	CPX-1	DSPC DSPG Холестерин	в/в	Рак кишечника [53,54]	II

### 1.4.1 Строение липосом

Липосомальные лекарственные формы являются весьма простыми структурами. Липосомы представляют собой нано размерные коллоидные сферы, которые состоят из липидного слоя, окружающего активное лекарственное средство. [19, 192, 193] Липосомальные лекарственные формы как правило состоят из фосфолипидов, амфифильных по своей природе, благодаря тому что имеют гидрофильную полярную головку, обладающую сродством к молекулам воды и неполярные углеводородные цепи, имеющие гидрофобный характер, свойства фосфолипидных молекул позволяют им самопроизвольно образовывать в воде бислойные липидные мембраны [5, 30, 31, 32]. Форма и размер образующихся в воде липосом зависит от множества факторов (кислотности среды, присутствия солей и т.д.). Липосомы не всегда принимают глобулярную форму, часто они могут быть представлены в виде длинных и тонких трубок (тубулярные липосомы) или уплощенных дискообразных структур (дискомы) [15, 18, 20, 21]. (Рисунок 3) Тем не менее, липосомы практически всегда содержат внутри себя полость, заполненную водой, так называемое «гидрофильное ядро». Основным преимуществом липосомальных частиц является способность липосом включать в гидрофильное ядро различные вещества, практически без каких либо ограничений в отношении их химической природы, размеров молекул и свойств, что дает уникальный инструмент для решения многих медицинских проблем [74, 119]. Спектр веществ, которые могут быть включены в состав липосомальных форм, весьма широк – от неорганических ионов и низкомолекулярных органических соединений до крупных белков и нуклеиновых кислот, что позволяет включать широкий спектр фармакологически активных соединений [23, 22, 24, 32]. Липосомы могут вмещать в себя различные лекарственные вещества: антибиотики, гормоны, ферменты, иммуномодуляторы, цитостатики, противовирусные и противогрибковые препараты, витамины, вакцины, вещества метаболического действия и даже генетический материал [17, 26, 27, 50].

Рисунок 3 – Различные виды липосом: мультиламеллярные везикулы (МЛВ); мультивезикулярные везикулы (МВВ); большие одно- или моноламеллярные везикулы (БОВ или БМВ); гигантские однослойные везикулы (ГОВ); малые одно- или моноламеллярные везикулы (МОВ или ММВ); тубулярные везикулы; дискомы.



#### 1.4.2 Номенклатура липосом

Липосомальные лекарственные формы имеют широкий спектр параметров, определяющих их поведение в организме. Размеры везикул могут варьироваться от очень малых (0,025 мкм), до весьма крупных (2,5 мкм), кроме того, липосомы могут состоять как из одного, так и из множества слоев липидов. В то же время, размер везикул определяет время их циркуляции в организме, а количество слоев – количество препарата, которое возможно поместить в липосому. В связи с этим, необходима была и классификация липосомальных наночастиц. И в 1989 году, R. Perez-Soler, впервые предложил классификацию липосом в зависимости от количества бислойных мембран и размера везикул. Согласно этой классификации, липосомы подразделяют на: многослойные везикулы (МЛВ), размер частиц 1–10 мкм; малые однослойные везикулы (МОВ), размер частиц 0,02–0,1 мкм и большие однослойные везикулы (БОВ), размер частиц 0,1–1 мкм. [202]. (Таблица 5)

Таблица 5 – Классификация липосом.

Тип липосом	Сокращенное наименование (Рус. / Eng.)	Размер	Число слоёв
Гигантские однослойные везикулы	(ГОВ / GUV)	Более 1мкм	Один
Большие однослойные везикулы	(БОВ / LUV)	0,1 – 1 мкм	Один
Малые однослойные везикулы	(МОВ / SUV)	20 – 100 нм	Один
Мультиламеллярные везикулы	(МЛВ / MLV)	0,2 – 3 мкм	Множество
Мультивезикулярные везикулы	(МВВ / MVV)	0,2 – 3 мкм	Множество

### ***МЛВ – MLV (Multi Lamellar Vesicles)***

Мультиламеллярные липосомы (МЛВ) впервые описал A.D.Bangham, который продемонстрировал что как малые, так и крупные молекулы могут быть включены в состав МЛВ. [46,47] Процесс приготовления МЛВ технологически весьма прост и требует минимального лабораторного оборудования. G.Gregoriadis составил список ферментов, низкомолекулярных компонентов и других веществ которые были включены в липосомы, и состав липосом [109,119,120,121,176]. Данный факт говорит об универсальности приготовления МЛВ, однако основным их минусом является низкая инкапсулирующая способность, выражающаяся в литрах водного пространства на 1 моль липида (1–4 л/моль), которая значительно ниже, чем у БОВ сходного размера. Размеры МЛВ колеблются от 100 нм до 1 мкм, количество слоев при этом составляет в среднем около пяти.

### ***МОВ – SUV (Small Unilamellar Vesicles)***

МОВ по форме являются сферическими структурами с минимальным радиусом около 20 нм. Основным и важнейшим свойством МОВ является их способность к формированию гомогенных популяций везикул, которые в последующем могут быть отделены от загрязняющих МЛВ простыми методами. Использование МОВ как переносчиков лекарств ограничивается: низкой инкапсулирующей эффективностью (0,1–1% в зависимости от концентрации

липидов), низким отношением захваченного объема на моль липида и возможностью неравномерного распределения различных липидов между внутренней и внешней поверхностью монослоя. [206,209,131]

### ***БОВ – LUV (Large Unilamellar Vesicles)***

Большие однослойные липосомы включают больший процент первоначальной водной фазы в свое внутреннее пространство, и в этой связи имеют лучшее отношение водного пространства на 1 моль липидов, используемых при их производстве, что дает им ряд преимуществ, в сравнении с МЛВ. Таких как: высокий процент включения водорастворимых препаратов, экономия липидов, необходимых для изготовления и хорошо воспроизводимый уровень высвобождения лекарств. Однослойные липосомы с размером более 100 нм обычно называют БОВ, однако некоторые авторы считают «большими» везикулы диаметром 50–100 нм, хотя данные размеры более корректно описывать как средние. [209,131]

### **1.4.3 Методы получения липосомальных наночастиц**

Основным способом получения липосомальных частиц является диспергирование липидной композиции различными методами до частиц заданных размеров. Методы диспергирования липосомальных частиц можно в целом разделить на 3 группы.

1. Методы механического диспергирования
2. Методы диспергирования растворителем
3. Метод удаления детергента (удаление не инкапсулированного материала) [208,127]

В свою очередь механические методы диспергирования используемые в производстве липосом разделяются на:

1. Ультразвуковая (УЗ) обработка
2. Экструзия (получение липосом с помощью френч–пресс ячейки)
3. Замораживание–оттаивание

4. Гидратация тонкой липидной пленки ручным перемешиванием, автоматическим перемешиванием или замораживанием–оттаиванием.
5. Микро эмульсификация
6. Мембранная экструзия
7. Сухие ресуспендируемые везикулы[127,208]
- 8.

### **Методы механического диспергирования**

#### ***Приготовление МЛВ (гидратация тонкой липидной пленки)***

Приготовление липосом методом гидратации тонкой липидной пленки – первый метод, которым были получены липосомальные частицы. Метод заключается в растворении липидов в органическом растворителе с последующим его выпариванием и образованием тончайшей липидной пленки на стенках круглодонной колбы, которую затем смывают водой с растворенным в ней препаратом. Описанный метод прост в исполнении, однако количество буфера или раствора лекарственного вещества во внутреннем объеме получаемых липосом сильно зависит от времени и условий гидратации. Например, одно и то же количество липидов может инкапсулировать на 50% больше водного буфера на моль липида, при условии, что гидратация происходит 20 часов с аккуратным помешиванием, в сравнении с 2 часами интенсивного помешивания. Учитывая тот факт, что обе смеси в конце процесса имеют одно и то же распределение по размерам[232]. Таким образом, если время гидратации уменьшается на несколько минут, суспензия имеет меньший внутренний объем и меньший средний диаметр.

Процесс гидратации и захвата буфера наиболее эффективен, когда пленка высушенного липида наиболее тонкая[46]. Это означает, что для различных количеств липидов должны использоваться круглодонные колбы различного размера. Кроме того, из всего вышесказанного необходимо тщательно контролировать время гидратации липидной пленки, метод суспендирования, температуру и толщину пленки.

### ***Замораживание–оттаивание***

Метод замораживания–оттаивания заключается в быстрой заморозке и медленном оттаивании. Коротко живущие озвученные дисперсии агрегируют до БОЛ, в связи с этим создание МОЛ – результат проведения процедуры замораживания–оттаивания. Данный метод сильно ингибируется повышением концентрации фосфолипидов и увеличением ионной силы раствора. Инкапсулирующая эффективность получаемая данным методом составляет от 20 до 30%. [205,193,161]

### ***Ультразвуковая обработка (МОЛ)***

Ультразвуковая (УЗ) обработка – это простой метод уменьшения размера липосом и производства малых однослойных липосом. [137,152] Общепринятый лабораторный метод, включающий в себя обработку предварительно гидратированных везикул (МЛВ) с помощью ультразвука. Как правило, для производства липосом данным методом используется либо ультразвуковая баня, либо погружной УЗ излучатель. Основными недостатками данной технологии изготовления можно назвать: очень маленький внутренний объем и соответственно низкую эффективность включения, возможный распад фосфолипидов и инкапсулируемых компонентов, элиминацию крупных молекул, загрязнение пробы металлом с колпачка УЗ излучателя, одновременное присутствие малых МЛВ одновременно с МОЛ. [208]

Существует одновременно две техники УЗ обработки:

А) Прямая УЗ обработка.

В данном методе УЗ излучатель погружается прямо в дисперсию липидов. Энергия, принимаемая липидной дисперсией в данном методе очень высока, что приводит к локальному нагреву излучающей головки, поэтому сосуд с излучаемой дисперсией помещают в водяную или ледяную баню. При озвучивании в течение 1 часа, может распадаться более чем 5% липидов, также проба загрязняется титаном с головки ультразвукового излучателя.

Б) Обработка в УЗ бане.

В данном методе липосомальная дисперсия в цилиндре помещается в УЗ баню. Плюсом этого метода можно считать более простой по сравнению с предыдущим контроль температуры озвучиваемой липосомальной дисперсии, кроме того озвучиваемый материал может быть защищен стерильным сосудом.[142]

### *Экструзионный метод*

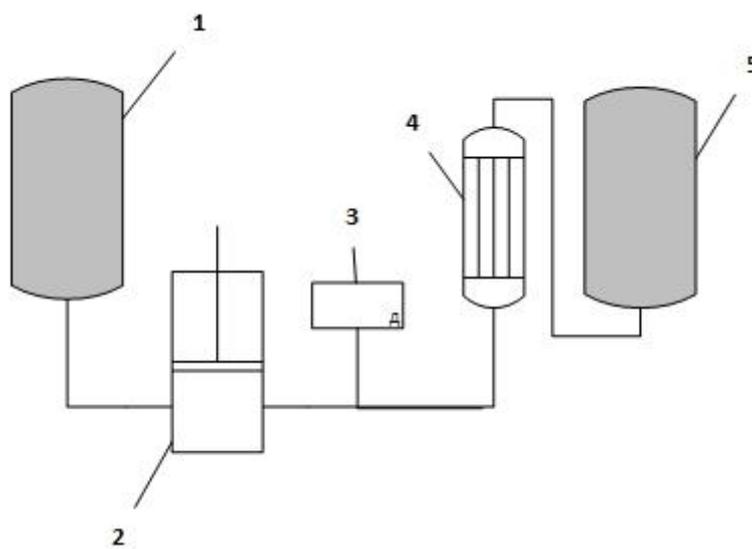
Экструзия это процесс, в результате которого микрометровые липосомальные частицы (например, МЛВ) проходят структурную модификацию в большие однослойные везикулы (БОВ) или малые однослойные везикулы (МОВ) в зависимости от размера пор используемого фильтра. Для реализации данного метода существует множество различных аппаратов: френч–пресс ячейки, лабораторные и промышленные экструдеры. Везикулы физически экструдированы под давлением через поликарбонатные фильтры с определенным размером пор. Данный метод получения везикул позволяет получать их без значительных воздействий на нестабильные материалы, кроме того имеет ряд преимуществ по отношению к методу озвучивания. Получаемые везикулы значительно больше, чем МОВ приготовленные озвучиванием. Недостатками же можно назвать невысокий диапазон нагревания в ходе экструзии и низкие в сравнении с другими методами рабочие объемы, получаемые данным методом. Метод экструзии широко применяется в лабораторных целях. [184,185]

### *Микрофлюидизация*

Микрофлюидизационная техника с использованием микрофлюидайзера – метод производства нанолипосом без использования потенциально токсичных растворителей (Рисунок 4). Микрофлюидайзер – это аппарат, традиционно использующийся в фармацевтической индустрии для производства липосомальных продуктов и фармацевтических эмульсий.[250,234,169,227] По своей сути микрофлюидизация является гомогенизацией при высоком давлении. В ходе данного метода поток жидкости под высоким давлением делится на две части, каждая из которых проходит сквозь отверстия малого размера, после чего

потоки направляют друг на друга в реакционной камере микрофлюидайзера.[169,114] Внутри реакционной камеры кавитация, давление и нагрузка уменьшает размер липосом. Давление, используемое в данном процессе, составляет свыше 69 МПа. [143,227]

Рисунок 4– Схема устройства микрофлюидайзера: 1–Резервуар для образца, 2– Насос высокого давления,3 – Датчик давления, 4– Реакционная камера,5– резервуар для готового продукта.



К преимуществу данного метода можно отнести большой объем рабочей смеси, которую можно пропускать через данный аппарат, большую эффективность включения, которую можно достичь (>75%). Однако этот метод нельзя использовать с чувствительными инкапсулируемыми материалами, например высокомолекулярными полимерами, которые подвергаются распаду в ходе микрофлюидизации. [223,70,151,166,140]

### **Методы диспергирования растворителем**

#### ***Инжекция не смешивающегося с водой растворителя (эфира, фторуглеводородов)***

Метод был разработан Deamer и Vangham в 1976 г. [91]. Данный способ заключается в растворении липидов в диэтиловом эфире или смеси эфира и метанола с последующим постепенным введением в водный раствор инкапсулируемого материала при 55–65°C или при пониженном давлении,

вследствие чего удаление эфира под вакуумом приводит к образованию однослойных липосом. К преимуществам данного метода можно отнести относительную простоту и применимость к широкому спектру липидных смесей и водных растворов, также простоту масштабирования процесса для производства больших партий липосом. Основным недостатком данного метода является то, что популяция липосом гетерогенна (50–200 нм) и применение органических растворителей в совокупности с высокой температурой сильно сокращает список соединений, которые можно инкапсулировать данным способом [91,216]. В частности, данным способом невозможно инкапсулировать в липосомы белковые структуры.

Одной из модификаций метода выпаривания растворителя считается введение фторуглеводородов, которые были использованы как растворитель Cafiso и др. [67] в качестве замены ядовитого диэтилового эфира. Было обнаружено, что Фреон 21 ( $\text{CHFCl}_2$ ) отлично растворяет фосфолипиды, несмешивается с водой и кипит при температуре + 9°C при атмосферном давлении. БОВ формируются при введении смеси липидов с Фреоном 21 в водный раствор при температуре 37°C. Фторуглеводороды начинают испаряться практически с той же скоростью, с которой они вводятся в водный раствор, оставляя липиды, которые гидрируясь формируют липосомы.

### ***Инъекция смешивающегося с водой растворителя (этанола и альтернативных растворителей)***

Метод инъекции этанола, сообразно предыдущему методу получения, состоит в постепенном введении смеси липидов в этаноле в избыток буфера. В данном случае происходит моментальное формирование МЛВ, однако их популяция, также как и в предыдущем методе, гетерогенна (30–110 нм). К недостаткам использования метода инъекции этанола можно также отнести сильное разбавление липосом и невозможность полного удаления этанола из-за образования с раствором азеотропной смеси липосомы очень разбавлены и из смеси тяжело удалить весь этанол, так как он образует азеотропную смесь с

водой. Кроме того, даже малое присутствие этанола в смеси увеличивает возможность инактивации биологически активных макромолекул[55].

Кроме этанола в приготовлении липосом подобным методом могут использоваться другие растворители, такие как: глицерол, пропиленгликоль, полиглицерол и этиленгликоль, эфиры глицерина. Их использование обусловлено достаточной растворимостью липидов и формированием воспроизводимых суспензий липосом при смешивании с водой.[143] Также данные органические растворители являются относительно безопасными и могут присутствовать в некоторых составах. Присутствие подобных растворителей также может защищать продукт при заморозке (в роли криопротектора), может повышать седиментационную устойчивость некоторых липосомальных суспензий и служить изотонизирующим агентом.[173,176]

### ***Методы удаления детергента (удаление не инкапсулированного материала)***

Удаление молекул детергента из водной дисперсии смешанных мицелл фосфолипида и детергента представляет из себя радикально отличающийся от других подход к производству липосом. По мере удаления детергента фосфолипиды сближаются и образуют закрытые однослойные везикулы. Изъян данного подхода заключается в утечке и разбавлении лекарственного вещества в процессе образования липосом, высокой стоимости, и сложности удаления следовых количеств детергента после формирования липосом. В данном методе используется несколько способов удаления детергента, описанных в литературе. В частности: диализ, колоночную хроматографию, центрифугирование, использование сорбента типа Bio-Beads.

### ***Диализ***

Первыми кто предложил метод удаления детергента посредством диализа для производства липосом были Kagawa и Racker [138]. Детергент, использующийся для этой цели показывал относительно высокую критическую

концентрацию мицеллообразования (ККМ), данное свойство облегчало его удаление, в его состав входили соли желчных кислот и октилглюкозид. В ходе диализа липосомы с диаметром около 100 нм формировались в течение нескольких часов. Контроль условий удаления детергента был улучшен Milsman, использованием проточной диализной ячейки, в результате была получена гомогенная популяция однослойных везикул со средним диаметром от 50 до 100 нм [184].

### ***Колоночная хроматография***

Формирование 100 нм однослойных фосфолипидных везикул с помощью удаления деоксихолата колоночной хроматографией было впервые показано Enoch и Strittmater [99]. Данный метод предусматривает смешивание фосфолипидов в форме малых, обработанных ультразвуком везикул состоящих из эфира или тонкой липидной пленки с деоксихолатом в молярном соотношении 1:2 соответственно. Затем, последовательное удаление детергента при пропускании через колонку с Sephadex G-25, в результате чего формируются 100 нм везикулы, которые легко отделяются от малых везикул, полученных в ходе УЗ обработки.

### ***Центрифугирование***

В данном методе раствор фосфолипидов наслаивают на раствор с высоким градиентом плотности сахарозы, после чего центрифугируют. МОВ формируются при осаждении через слой с высоким градиентом сахарозы, детергент при этом остается в слое супернатанта и диффундирует из осаждаемых липосом. Данный метод впервые был применен в работе Warren и др. [253].

### ***Приготовление липосом с использованием сорбента типа Bio-Beads***

Метод приготовления представляет собой удаление неионогенного поверхностно активного вещества (ПАВ), Triton X-100 из смеси ПАВ с мицеллами фосфолипида с помощью сорбента Bio-Beads SM-2, обладающего способностью быстро и селективно абсорбировать Triton X-100 [115]. После

абсорбции детергента, сорбент восстанавливают посредством фильтрации. Конечный размер частиц зависит от условий приготовления: смеси липидов, состава буфера, температуры и более всего от количества и детергент-связывающей активности сорбента.

### ***Изменение pH***

Альтернативным методом для производства малых однослойных липосом является метод изменения pH описанный Hauser и Gains [126]. МОВ могут быть получены смешиванием дисперсий PC (фосфатидилхолина) и PA (фосфатидной кислоты) в том случае, если молярное соотношение PC в смеси PC и PA 70% или менее. Липосомы в данном случае формируются, когда фосфолипидные смеси диспергируют либо прямо в NaOH при pH 10, либо в воде pH которой быстро (около 1 сек.) повышается. Воздействие на фосфолипиды высоких значений pH очень короткое, менее 2 мин. в течение этого времени посредством тонкослойной хроматографии не фиксировалось никакой деградации. Малые липосомы отделяются от больших по размеру с помощью центрифугирования, гельфильтрации и фильтрации. Размер липосом зависит: от кислотности фосфолипидов, молярного соотношения PA к PC, отношения в органической фазе пропаноиона к PA и степени изменения pH. Кроме того, технология ограничена пропорциями, с которыми могут смешиваться PA и натуральные фосфолипиды. Липосомы, изготовленные данным способом немного крупнее липосом из кислотных фосфолипидов, которые имеют единичный отрицательный заряд. Механизм молекулярной перестановки до конца не ясен, но надо полагать, что размер конечных липосом зависит как от степени так и от уровня поверхностного заряда, индуцируемого повышением pH.

### ***Выпаривание органического растворителя***

БОВ могут быть получены посредством формирования эмульсий типа «вода в масле» в смеси фосфолипидов и буферов с избытком органической фазы и последующим удалением органической фазы при низком давлении. Две фазы

обычно эмульгируют спомощью УЗ обработки, однако могут быть успешно применены другие механические методы. Удаление органического растворителя под вакуумом вызывает коалесценцию и формирование вязкого геля из покрытых фосфолипидами капель воды. Удаление остаточного органического растворителя при глубоком вакууме или механической деструкцией (на пример перемешиванием) приводит к разрушению геля на однородную суспензию БОВ. С некоторыми липидными композициями переход из эмульсии к БОВ настолько быстрый, что промежуточная фаза геля практически не формируется. Метод был впервые освоен Szoka и Parahadjopoulos в 1978 г. и широко распространен благодаря тому, что позволяет достичь высокой загрузки водорастворимых препаратов [196,231,232]. Эффективность загрузки, которая может быть получена данным методом, составляет до 65%.

Для изготовления липосом методом выпаривания органического растворителя фосфолипиды сначала растворяют в органическом растворителе таком как диэтиловый эфир, изопропиловый эфир или смеси двух растворителей, таких как изопропиловый эфир и хлороформ. Эмульсификация наиболее проста и завершается когда плотность органической фазы уравнивается с плотностью буфера (т.е. около 1). По этой причине эфир (плотность около 0,7) обычно смешивают с растворителем большей плотности, например трихлорфторметаном (плотность 1,4) для производства системы растворителей с плотностью, близкой к плотности воды. Водная фаза, содержащая загружаемый материал добавляется сразу в смесь фосфолипидов с растворителем, формируя двухфазную систему. Соотношение водной фазы и органической обычно составляет 1:3 для эфира и 1:6 для смеси изопропилового эфира и хлороформа.

Составы, использующие равные пропорции, липидов и органической фазы также были опубликованы [232]. Две фазы несколько минут обрабатывают УЗ, формируя эмульсию типа «вода в масле», затем органическую фазу аккуратно удаляют под частичным вакуумом, на роторном испарителе при температуре 20–30°C. Давление обычно поддерживается на уровне 0,5 мБар для удаления

большой части органической фазы (используя впрыск азота для регулирования вакуума) и затем понижая осторожно до полного вытеснения растворителя.

Удаление последних следов растворителя трансформирует гель в БОВ, которые могут быть использованы для инкапсуляции как малых так и больших молекул. Принципиальным недостатком данного метода является длительное взаимодействие инкапсулируемого материала с органическими растворителями и механическое встряхивание, условия которые могут стать причиной денатурации некоторых белков. Однако более активное включение, чем в методе гидратации тонкой липидной пленки, является большим преимуществом, которое может только увеличиться с развитием более безопасных систем растворителей [196,173].

#### **1.4.4 Характеристики липосомальных частиц**

При производстве липосомальных наночастиц большое значение имеют следующие показатели качества:

##### **Размеры везикул**

Для определения размера липосом используется множество различных методов: спектроскопия статического и динамического светорассеяния, микроскопия, эксклюзионная хроматография, фракционирование в потоке при наличии поля, центрифугирование.

Микроскопия. Одним из наиболее распространенных методов изучения размеров и морфологии липосомальных частиц является микроскопия. В частности используется трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) с негативным окрашиванием, методом замораживания-скалывания и крио ТЭМ. Электронная микроскопия позволяет получать значительную информацию о внешнем виде везикул, однако требует затрат значительных усилий и времени на пробоподготовку и получение полной картины размеров популяции. Распространенным методом является атомно-силовая микроскопия. Ее преимуществом по отношению к ТЭМ является способность изучения стабильности липосом наряду с их морфологией и размерами.

Для разделения липосомальных частиц с целью последующего анализа используют два метода: эксклюзионную хроматографию и метод фракционирования в потоке при наличии поля.

Эксклюзионная хроматография (ЭХ). Гель-хроматография является одним из простых способов разделения липосомальных частиц по размерам. Фракционированию могут подвергаться частицы диаметром до 0,8 мкм (в зависимости от сорбента). Недостатком данного метода является высокий риск адсорбции липосомальных частиц на сорбенте.

Фракционирование в потоке при наличии поля (Field Flow Fractionation; FFF). Представляет собой метод разделения основанный на приложении поля к суспензии или раствору, проходящему по длинному узкому каналу. При этом поле направлено перпендикулярно потоку жидкости и приводит к разделению частиц по их мобильности. Метод FFF может разделять коллоидные частицы с высоким разрешением от 1 нм до 1 мкм. Поле в данном методе может быть представлено в виде ассиметричного потока жидкости через полупроницаемую мембрану, гравитации, температурного градиента, электрического или магнитного поля. При исследовании размеров липосомальных частиц наиболее применим вариант метода с использованием потока жидкости через полупроницаемую мембрану.

Для анализа разделенных частиц могут использоваться методы динамической спектроскопии светорассеяния и многоугольного рассеяния света.

Динамическая спектроскопия светорассеяния (ДСР). Наиболее распространенный метод анализа распределения размеров липосомальных частиц. Данный метод основан на измерении флуктуаций интенсивности рассеиваемого от частиц света. Исследование методом ДСР проводится в исходной жидкой среде, что является существенным преимуществом при исследовании липосомальных везикул. Также к плюсам методики можно отнести малое воздействие на пробу в ходе измерения, высокую чувствительность метода и малый расход образца при измерении.

Многоугловое рассеяние света (МРС) является развитием метода ДСР с использованием большего количества углов рассеяния света, чем в ДСР, где используется угол в  $90^\circ$ . Таким образом МРС позволяет наиболее точно определять размер частиц, молекулярную массу, а также в некоторых случаях получить представление о форме частиц [97,242].

#### Ламеллярность липосом

Ламеллярность липосом созданных из различных компонентов или с использованием различных техник изготовления различается в широких пределах. Так, часть фосфолипидов, соприкасающихся с наружной средой может варьироваться от 5% у больших МЛВ до 70% у МОВ [97]. В большинстве случаев число бислоевых мембран может быть обнаружено с использованием электронной микроскопии методом замораживания – скалывания и  $^{31}\text{P}$  ЯМР. При использовании метода ЯМР к липосомальной дисперсии добавляют ионы  $\text{Mn}^{2+}$ . Ионы марганца взаимодействуют с наружной частью везикул уменьшая сигнал, что позволяет судить о количестве бислоев, составляющих липосомы. Так, 50% уменьшение сигнала соответствует однослойным липосомам, а 25% – двухслойным [58]. Для анализа ламеллярности могут использовать также малоугловое рассеивание рентгеновских лучей и методы, основанные на добавлении в мембрану липосом флуоресцирующих агентов.

#### Эффективность включения

Эффективность включения препарата в липосомальную дисперсию является важным параметром определяющим эффективность действия ЛЛФ. В зависимости от физико-химических свойств ЛВ количественное определение может производиться с использованием спектрофотометрии, ферментного анализа, флуоресцентной спектроскопии и электрохимических методов [97,137,72]. При использовании различных методов разделения, таких как ВЭЖХ или FFF процент включения может как отношение пика невключенного вещества к пику стандарта ЛВ в исходной концентрации. Данный метод используется в том случае, когда липосомы не подвергаются очистке. Для более точного анализа дисперсию липосом могут предварительно отделять от невключившегося

препарата с помощью методов FFF, ЭХ, центрифугирования и диализа. Данный метод широко применяется при анализе утечки ЛВ липосомальных дисперсий при хранении и воздействии различных разрушающих факторов. Так как методы разделения могут потенциально вызывать утечку препарата, исследователи часто используют методы не связанные с разделением. В литературе описаны методы использования  $^1\text{H}$  ЯМР, диффузной 2D ЯМР, электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) а также различные флуоресцентные методы [97].

Для анализа эффективности включения в липосомах с антрациклиновыми антибиотиками наиболее простым и распространенным методом является разделение ЛЛФ методом ЭХ или FFF, с последующим анализом пиков в сравнении со стандартным образцом ЛЛФ в исходной концентрации.

#### **1.4.5 Методы активной загрузки**

Одним из основных преимуществ липосом при медицинском применении является их способность к загрузке значительных объемов лекарств, необходимых для обеспечения терапевтической эффективности. Липидный бислой с толщиной 8-10 нм является естественным барьером для многих субстанций включая ионы, заряженные молекулы и большие не заряженные водорастворимые молекулы, например сахара и белки. Такие вещества как вода, газы, аммиак и глицерол могут проникать через мембрану свободно [79,84,44] . Таким образом, многие гидрофильные вещества, среди которых аминокислоты, соли, антибиотики, белки и сахара, могут быть инкапсулированы в гидрофильном ядре липосом и сохраняться там продолжительное время с незначительными утечками в течение длительного периода времени. Водорастворимые вещества могут быть инкапсулированы в липосомы посредством множества методов. Среди которых, можно выделить 2 вида:

1. Методы пассивной загрузки
2. Методы активной загрузки.

Методы пассивной загрузки являются наиболее простыми, так как загружаемое вещество добавляют в липосомы непосредственно ввремя их

изготовления, однако эффективность этих методов при загрузке водорастворимых препаратов относительно низкая ~ 50-60%. В свою очередь, методы активной загрузки позволяют перераспределить вещество таким образом, чтобы большая его часть оказалась внутри липосом. Однако данный подход имеет ряд ограничений по отношению к инкапсулируемому веществу. Лекарство должно быть способно, переходить из незаряженного состояния, при котором возможна диффузия через мембраны, в заряженное. Способность агента к ионизации, в свою очередь зависит от его  $pK_a$  и от локального значения pH [76]. Кроме того инкапсулируемый агент должен быть также хорошо растворимым. Только амфипатические слабые кислоты или основания подходят под все эти требования. Еще одним требованием для активной загрузки является наличие трансмембранного градиента. Nichols и Deamer [190] были первыми, кто продемонстрировал данный метод загрузки амфипатических аминов в липосомы с помощью градиента pH. Впоследствии градиент создавались с помощью солей других оснований (например, аммония) [50,154,254] или слабых кислот, например (ацетат) [77,44]. В настоящее время множество лекарственных веществ инкапсулированы в липосомы с использованием различных градиентов [156,251,257,266]. Для создания pH градиента, как правило, используются следующие методы:

1. Получение липосом в кислом буфере с последующей заменой его внешним буфером с более высоким значением pH;
2. Загрузка с помощью градиента сульфата аммония;
3. Создание градиента pH за счет ионофоров.

При загрузке в липосомы антрахиноновых антибиотиков чаще всего используются два метода: метод создания градиента pH с помощью цитратного буфера и метод с использованием сульфата аммония.

*Использование pH градиента цитратного буфера.* В основу данного метода положена проницаемость мембраны липосом для нейтральных форм слабых оснований. Липосомы создаются с использованием 300 мМ цитратного буфера для создания кислого значения pH во внутреннем гидрофильном ядре ( $pH \approx 4,0$ ).

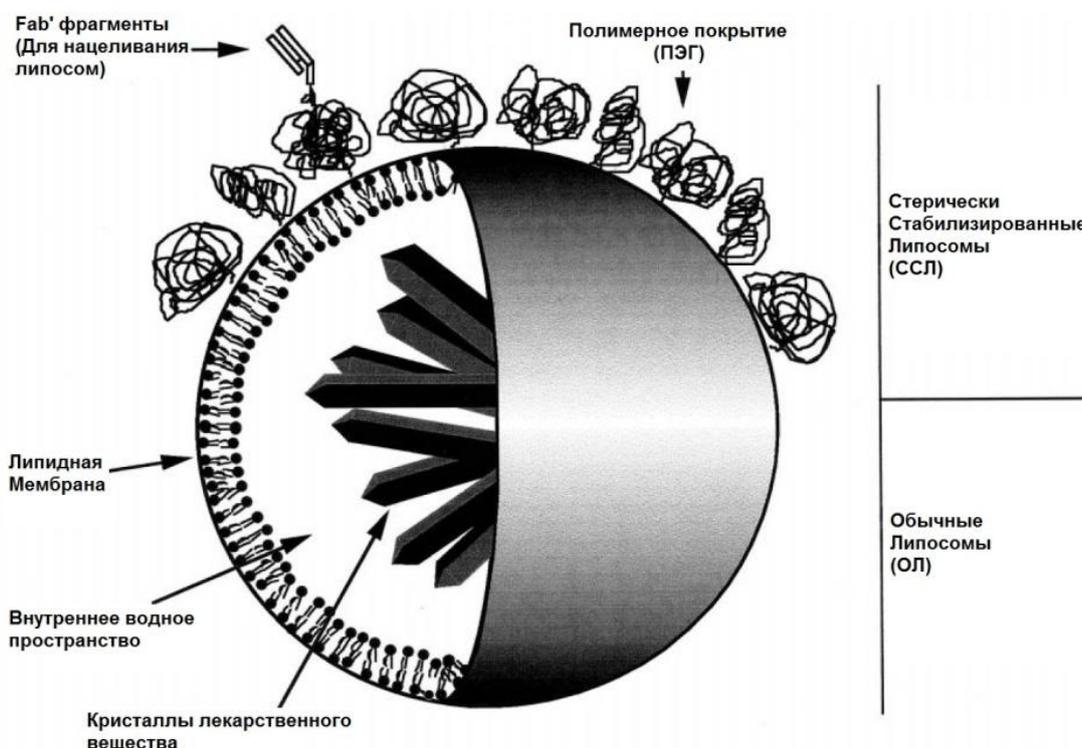


## **1.5 Модификации липосом.**

### **1.5.1 Пролонгирование циркуляции липосом (ССЛ).**

После введения липосом *in vivo* обычные липосомы (ОЛ) адсорбируют на своей поверхности молекулы опсонинов, в ходе процесса, который называется опсонизацией, вызывающий распознавание и захват липосом системой мононуклеарных макрофагов, в результате этого процесса, липосомы быстро удаляются из кровеносного русла[134,200]. Модификация поверхности липосом гидрофильными полимерами, например ПЭГ (полиэтиленгликоль), снижает взаимодействие с опсонинами сыворотки крови и последующее распознавание и фагоцитоз клетками системы мононуклеарных макрофагов, что увеличивает время циркуляции липосом в кровеносном русле[257]. Разработка таких, покрытых ПЭГ липосом, также известных как стерически стабилизированные липосомы (ССЛ) показала, что они имеют серьезный потенциал для дальнейшего использования и клинического применения[172]. ПЭГ оказался наиболее удобным полимером для защиты липосомальных частиц, благодаря своим качествам: простому изготовлению, относительно низкой цене, возможности контроля молекулярной массы и способности связывания с липидами или белками, включая антитела, множеством методов[174]. Принципиальная схема устройства обычных (ОЛ) и стерически - стабилизированных (ССЛ) липосом представлена на Рисунке 6.

Рисунок 6 –Принципиальная схема строения ОЛ и ССЛ.



### 1.5.2 Присоединение антител (иммунолипосомы).

Одной из эффективных стратегий для повышения терапевтической эффективности противоопухолевых препаратов, является «активный» или т.н. лиганд–опосредованный транспорт липосомальных препаратов [152,214,259]. Существует множество различных методов, позволяющих использовать антитела, их фрагменты, гликопротеины, карбогидраты и факторы роста для таргетной доставки липосом к опухолевым клеткам [36,214]. Широкие возможности для развития лекарств с направленной доставкой открыла гибридная технология, предложенная Келлером и Мильштейном в 1975 г.[147]. В настоящее время разработано и производится множество антител к различным мишеням, представленным на поверхности опухолевых клеток [73,81,148,197,198]. Разработанные ранее ИК, можно классифицировать на три типа:

Тип А. МКА ковалентно связаны с поверхностью ОЛ.

Тип В. МКА ковалентно связаны с поверхностью ССЛ.

Тип С. МКА связаны с цепями ПЭГ на поверхности ССЛ[149].

Самым эффективным и распространенным в настоящее время стал третий тип (Тип С), в виду того что он сочетает в себе сохранение эффективности закрепленных МКА и максимальную защиту от захвата РЭС [198, 235–242].

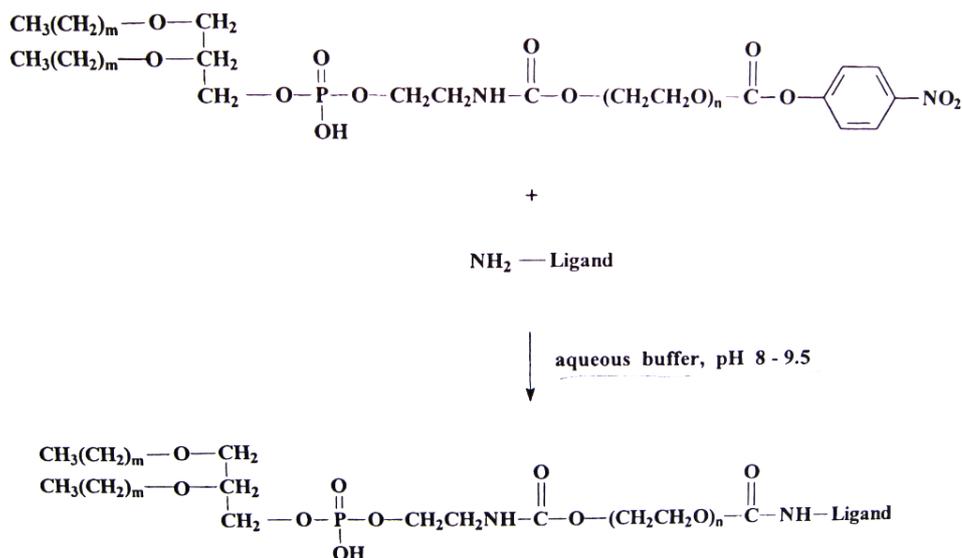
В настоящее время существует множество методов присоединения МКА и Fab' фрагментов к дистальному концу ПЭГ – липидных конъюгатов. Наибольшее распространение получили методы, основанные на ковалентном связывании антител с использованием трех химических реакций:

1. Реакции между активированными карбоксильными группами, приводящей к образованию амидной связи;
2. Реакции между пиридилдитиолами и тиолами, результатом которой является образование дисульфидных связей;
3. Реакции между малеимидными производными и тиолами, с образованием тиоэфирных связей [36,122].

Широкое распространение получил постинсерционный метод, суть которого состоит в конъюгации векторных лигандов к пегилированным мицеллам, которые затем встраивают в предварительно полученные липосомы путем простой инкубации [41]. Плюсом данного подхода является возможность изменять условия изготовления липосом и загрузки ЛВ независимо от условий присоединения лигандов. Однако, большинство методов, приведенных выше, требуют предварительной модификации антител и предполагают использование токсичных промежуточных продуктов. В связи с этим для упрощения процедуры присоединения лигандов, содержащих аминокислоты (МКА) и минимизации использования токсичных соединений было предложено использование амфифильного производного п-нитрофенилкарбонил-ПЭГ-ФЭА (pNP-PEG-PE) [237]. Особенностью применения данного соединения является то, что реакция между pNP-группой и лигандом протекает легко и количественно в растворе с pH 8,0, при этом свободные pNP- группы элиминируются посредством гидролиза.

Рисунок 7.

Рисунок 7- Схема реакции присоединения лиганда к pNP-PEG-lipid.



### 1.6 Липосомальные лекарственные формы веществ антрациклинового ряда

Одной из задач при химиотерапии злокачественных новообразований является изменение характера распределения ЛВ в организме с целью максимизировать его воздействие на опухоль и минимизировать его влияние на здоровые ткани и органы. Среди огромного количества наноразмерных лекарственных форм особое место принадлежит липосомальным средствам доставки. С биомедицинской точки зрения они обладают рядом полезных свойств: биосовместимость, малая активность в отношении антигенных, пирогенных, аллергических и токсических реакций, простая биodeградация, защита внутреннего содержимого от инактивирующих воздействий физиологических жидкостей и способность доставки лекарственных веществ внутрь клеток. Было показано, что включение противоопухолевых препаратов в ССЛ увеличивает их накопление в тканях с повышенной сосудистой проницаемостью сосудов [14,95,110]. В то же время, капиллярные аномалии и наличие прерывистого эндотелия в опухолевой ткани способствует накоплению липосом во внутритканевом пространстве солидных опухолей. Попадая в эту зону, липосомальные структуры имеют возможность непрерывно высвобождать ЛВ. [40,263] Данное явление описано в зарубежной литературе как «эффект

повышенной проницаемости сосудов» (EPR - эффект)[168,182]. Вышеперечисленные свойства липосомальных частиц обуславливают их применение в качестве носителей химиопрепаратов в терапии злокачественных новообразований.

Для доставки препаратов антрациклинового ряда был разработан ряд липосомальных форм. Первым липосомальным препаратом, разрешенным к медицинскому применению, стал препарат на основе доксорубицина гидрохлорида Doxil (Janssen Products, LP, США). В настоящее время он присутствует на рынке под марками Doxil и Caelyx, препарат представляет собой стерически - стабилизированные с использованием ПЭГ-2000 дистеароилфосфатидилэтаноламина липосомы, основу липидного бислоя которых составляет дистеароилфосфатидилхолин и холестерин. Средний диаметр липосом в препарате составляет 100 нм. Включение в липосомы производится с использованием сульфата аммония, что позволяет производить наиболее полную инкапсуляцию препарата. Препарат одобрен в США и ЕС при терапии Саркомы Капоши, рака молочной железы и рака яичников. Аналогом препарата Doxil/Caelyx, распространенным на рынках юго-восточной Азии, является препарат Lipo-dox (SUN Pharmaceutical Ltd., Индия). По форме Doxil и его аналоги являются концентратами для приготовления растворов для инъекций, в дозировке 2 мг/мл. Липосомальная доставка доксорубицина была реализована также в препарате Myocet (Teva Pharmaceutical Industries Ltd.). Данный препарат представляет собой не пегилированную форму липосомального доксорубицина. Основу липидной стенки липосом, составляют яичный фосфатидилхолин и холестерин. Препарат одобрен для медицинского применения в Европе и Канаде для лечения метастатического рака молочной железы в комбинации с циклофосфамидом. Данный препарат находится в фазе клинических исследований в комбинации с герцептином и таксолом для лечения HER-2 положительного рака молочной железы. Лекарственная форма Myocet – лиофилизат для приготовления раствора для инъекций. Среди препаратов липосомального доксорубицина следует отметить, ThermoDox (Celsion

Corporation, США), находящийся в стадии клинических исследований. ThermoDox, также как и Doxil, является ССЛ с использованием ДСФЭ-ПЭГ2000, однако основу липосомальной конструкции данного препарата составляет дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) в комбинации с моностеароилфосфатидилхолином (MSPC), свойства которых обеспечивают контролируемую температурой (42 °С) утечку препарата из везикул. На базе доксорубина в настоящее время разрабатываются препараты направленной доставки MCC-465 (Mitsubishi Pharma, США) с антителами GAN для лечения метастатического рака желудка и Anti-EGFR ILs-dox (Университет Базеля, Швейцария) с антителами к EGFR для лечения солидных опухолей. В настоящее время оба препарата находятся в фазе клинических исследований[181].

В состав липосомальных конструкций были успешно включены и другие антибиотики антрациклинового ряда: даунорубин (DaunoXome) и митоксантрон (LEM-ETU). По своей структуре DaunoXome (NeXStar Pharmaceuticals, США) представляет собой липосомы, загруженные даунорубином. В состав липидной композиции данных липосом входит дистеароилфосфатидилхолин и холестерин. Препарат одобрен в США и успешно применяется в лечении Саркомы Капоши и рака крови. Митоксантрон в липосомальной форме LEM-ETU (NeoPharm Inc., США) находится в фазе клинических исследований, планируется его применение при лейкемии, раке молочной железы, желудка, печени и яичников. Липосомальный митоксантрон LEM-ETU представляет собой ОЛ на основе диолеоилфосфатидилолина (DOPC) холестерина и кардиолипина со средним диаметром 150 нм, получаемые методом инъекции этанола с последующей экструзией и лиофилизацией получаемой дисперсии.

### **Заключение**

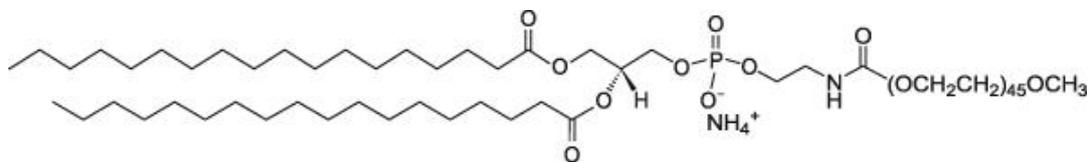
Таким образом, приведенные в данной главе материалы убедительно показывают перспективность дальнейшего исследования иммунолипосомальных лекарственных форм препаратов антрациклинового ряда. Иммунолипосомальные лекарственные формы сохраняют в себе положительные качества липосомальных

лекарственных форм: снижение токсичности препаратов, повышение биодоступности, биосовместимость, легкую биodeградацию и транспорт препарата в клетки. В то же время, модификация липосомальных конструкций посредством антител позволяет повысить их эффективность и селективность по отношению к клеткам злокачественных новообразований.



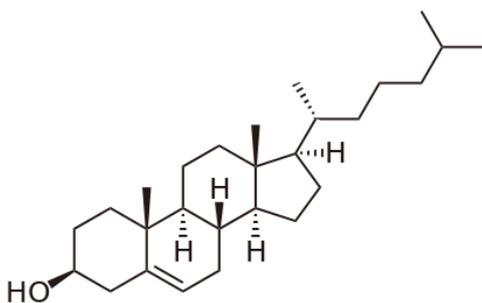
белого цвета. Растворим в хлороформе, толуоле, метаноле и этаноле, не растворим в воде и ацетоне.

Рисунок 9 – Структурная формула ДСФЭ-ПЭГ-2000



**Холестерин** (AvantiPolarLipids, Inc., США),  $M_r = 386,66$  (Рисунок 10) – кристаллический порошок от белого до бледно-желтого цвета без запаха или со слабым запахом, чувствителен к действию света. Легко растворим в хлороформе и диэтиловом эфире, растворим в 1,4-диоксане, умеренно растворим в ацетоне и этаноле, практически не растворим в воде и метаноле.

Рисунок 10 – Структурная формула холестерина



### *Вспомогательные вещества*

**Аммоний сернокислый** (х.ч.), ЗАО Мосреактив (Россия),  $M_r = 132,14$  – бесцветный кристаллический порошок. Растворим в воде (76,4 г в 100 мл при 25 °С). Практически не растворим в спирте.

**HEPES** (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота), AppliChem GmbH (Германия),  $M_r = 238,31$  – цвиттер-ионный буфер с  $pK_a = 7,55$  (20 °С). Представляет собой белый кристаллический порошок без запаха. Растворимость в воде – 40 г/100 мл (20°С), pH 1 % водного раствора 4,7–6,0.

**Натрия хлорид** (х.ч.), Химмед (Россия),  $M_r = 58,44$ ;

### *Криопротекторы*

**Сахароза** (имп.), Химмед (Россия),  $M_r = 342,30$  – бесцветные кристаллы или белый мелкокристаллический порошок без запаха, со сладким вкусом.

Сахароза растворима в воде, мало растворима в этаноле и метаноле, практически не растворима в диэтиловом эфире, бензоле, ацетоне и хлороформе.

**Лактоза безводная** (Sigma–Aldrich GmbH, Германия), Mr = 342,30 – белые кристаллы или белый кристаллический порошок без запаха, слабого сладкого вкуса. Легко растворима в воде, практически не растворима в этаноле, метаноле, диэтиловом эфире и хлороформе.

### *Растворители*

**Хлороформ** (трихлорметан) стабилизированный (х.ч.), Химмед (Россия).

Спирт этиловый 95 %, ФС 42–3072–94.

Вода очищенная деионизированная, ФС 42–2619–98.

Материалы для хроматографии

**Сефадекс (Sephadex) G–50 Superfine** (AmershamBiosciences, Швеция) – гель на основе декстрана для колоночной хроматографии. Рабочий диапазон рН 2–10. Сферические гранулы сефадекса G–50 Superfine являются мелкозернистыми (20–50 мкм). Область фракционирования для глобулярных белков составляет 1,5–30 тыс. Дальтон, для декстранов – 0,5–10 тыс. Дальтон (меньшая цифра соответствует молекулам, для которых доступен весь объем внутри гранул, большая – молекулам, практически не проникающим в гранулы).

### *Материалы для фильтрации*

**Поликарбонатные мембранные фильтры Nuclepore** (Whatman, Великобритания) диаметром 19 мм и 25 мм, с размером пор 100, 200 и 400 нм.

**Целлюлозные мембранные фильтры Millipore** (США) диаметром 25 мм с размером пор 0,22 мкм.

### *Упаковочные материалы*

Для упаковки липосомальной дисперсии использовали флаконы из трубки стеклянной для лекарственных средств из нейтрального стекла ФО–1–20–НС–1 по ТУ 64–2–10–87, вместимостью 20 мл, закупоренные пробками из резины 52–599/3, 52–599/1 или 52–599/2 по ТУ 38.006108–95 под обкатку алюминиевыми колпачками по ОСТ 64–009–86.

### ***Материалы для биологических исследований***

Исследование *in vitro* проводилось на клеточной линии рака молочной железы SKBR-3. Морфология: эпителиальноподобная. Способ культивирования: монослойный. Культура опухолевых клеток получена из банка клеточных культур ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Для проведения исследований применялись:

**Раствор трипанового синего** (“Flow Lab.”, UK). Для работы использовали 0,5% раствор красителя в PBS, содержащий 3мМ NaN<sub>3</sub>. Перед использованием раствор центрифугировали для удаления агломератов красителя. Подсчет клеток проводили в течение не более 5 мин после добавления красителя в камере Горяева общепринятым методом;

Питательная культуральная среда RPMI–1640 (ПанЭко, Россия);

**Телячья эмбриональная сыворотка** (Gibco BRL, Life Technologies, США);

**L–глутамин** (Sigma, Германия);

**Гентамицин** (ICN Biomedicals, Inc., США);

Раствор витаминов, ПанЭко (Россия);

Раствор аминокислот, ПанЭко (Россия);

**Фосфатно–солевой буфер (PBS)** готовили по прописи: для приготовления 0,5 литра 10–кратного концентрата делали навески солей NaCl– 40 г., KCl –1г., Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O – 9 г., KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1 г., азид натрия –0,5 г., pH 7,2–7,4;

96-луночные плоскодонные планшеты, Costar (США).

## **2.2 Оборудование**

**Роторный испаритель** BÜCHI Rotavapor R–200 и водяная баня BÜCHI Heating Bath B–490 (BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария).

**Экструдер** Avanti® Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., США).

**Наносайзер Nicomp 380 Submicron Particle Sizer** (Particle Sizing Systems, США). Принцип работы прибора: в качестве источника света использован лазер с длиной волны  $\lambda = 632,8$  нм. Под фиксированным углом определяется отраженный свет от ансамбля частиц, суспензированных в растворителе (в

данном случае деионизированная вода). Интенсивность этого света колеблется во времени благодаря диффузии частиц. Существует четко определяемое характеристическое время жизни этих колебаний, которое обратно пропорционально диффузии частиц. Далее просчитывается автокорреляционная функция флуктуирующей интенсивности и строится убывающая экспоненциальная кривая зависимости от времени. Оценивают результат с помощью Гауссовского анализа (Gaussian) (обработка полученных данным методом наименьших квадратов – анализ по двум параметрам). Гауссовы популяции имеют четко определяемый средний диаметр частиц. Однако этот подход может быть использован только для простых распределений: симметричных унимодальных популяций. Ассиметричные унимодальные и бимодальные распределения не возможно интерпретировать с помощью данного анализа. Единственным признаком наличия более сложного распределения является высокое и растущее значение квадратичного отклонения. Эти распределения оценивают с помощью Никомповского анализа (Nicomp). Данный анализ дает в результате 3 или 4 параметра, по которым можно судить о распределении липосом в образце (в %).

**NanoBrook Zeta Plus Zeta Potential Analyzer** (Brookhaven Instruments Corporation, США) Предназначен для измерения Zeta – потенциала в слабосоленых водных растворах / суспензиях.

**Спектрофотометр DU 800** (Beckman Coulter Inc, США) Предназначен для количественного и качественного анализа, спектрофотометрических измерений в UV и видимой областях электромагнитного спектра. Работает в диапазоне длин волн от 190 до 1100 нм и имеет спектральную ширину щели  $\leq 1.8$  нм.

**Твердотельный термостат ТТ1** (ДНК – Технология, Россия)

**Анализатор Униплан** (ЗАО Пикон, Россия) предназначен для измерения оптической плотности проб в стандартном планшете из 96 лунок в автоматическом режиме (принцип действия – вертикальная фотометрия). Диапазон длин волн прибора – 405–650 нм.

**Система очистки воды Elix 5** (Millipore S.A.S., Франция). Производительность – 5 л/час ( $\pm 15\%$  при  $7\text{ }^\circ\text{C} < T < 30\text{ }^\circ\text{C}$ ). Объединяет несколько технологий очистки воды. По международной классификации (стандарты CAP, CLSI и ISO 3696/BS 3997) вода, произведенная системой, относится к типу II (вода аналитической степени чистоты).

### *Хроматографические колонки*

**С 10/20** (Amersham Biosciences, Швеция). Диаметр колонки – 10 мм, высота колонки – 20 см, объем колонки – 14 мл, высота геля в колонке – 18 см.

### *Хроматографическая система*

**Насос PD 5201** (Heidolph Instruments, Германия)

Детектор ABI 757 Absorbance Detector (Applied Biosystems, США), диапазон длин волн от 190 нм до 800 нм, чувствительность 0,005 – 2 AUFS, период обновления от 0,1 до 2 сек.

**Самописец BD 41 – Recorder** (Kipp & Zonen, Голландия) Двухканальный аналоговый самописец.

**Хроматографическая система АКТА prime plus** (General Electric, США) – представляет собой автоматизированную систему для жидкостной хроматографии. Система включает запрограммированные методы для всех распространенных хроматографических технологий.

Проточный цитофлуориметр FACS Canto II (Becton Dickinson, США).

**Сублимационная сушка GAMMA 1–16 LSC** (Martin Christ, Германия) Пригодна для лиофильной сушки в круглодонных колбах и/или на полках.

**Вакуумный насос** (Millipore S.A.S., Франция).

### *Весы*

**Весы Sartorius Cubis** (Sartorius AG, Германия).

### *pH - метры*

**pH – метр Sartorius PP–20** (Sartorius AG, Германия).

**pH – метр Sartorius PT–10** (Sartorius AG, Германия).

## 2.3 Методы

### *Методы технологических исследований*

#### **2.3.1 Метод получения больших многослойных липосом**

Для приготовления липосом использовали метод обращения фаз. Точные навески яичного и соевого фосфатидилхолина, холестерина, DSPE-PEG<sub>2000</sub> и pNp-PEG<sub>3000</sub>-lipid (для иммунолипосом) растворяли в 7 мл хлороформа. Затем полученный раствор липидов переносили в круглодонную колбу вместимостью 150 мл и упаривали органический растворитель на роторном испарителе под вакуумом (0,7 мбар) и температуре не выше  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  (для липосом состоящих из яичного фосфатидилхолина) или не выше  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  (для липосом из насыщенного соевого фосфатидилхолина) до образования тонкой липидной пленки. Пленку сушили под вакуумом (0,9 – 1 мбар) в течение 50–60 минут, для удаления остаточного органического растворителя. Далее липидную пленку гидратировали 3 мл 125 мМ раствора сульфата аммония (для липосом состоящих из яичного фосфатидилхолина) или 3 мл 300 мМ раствора сульфата аммония (для липосом состоящих из насыщенного соевого фосфатидилхолина) при постоянном перемешивании до полного исчезновения пленки со стенок колбы и образования белой эмульсии (дисперсия больших многослойных липосом).

#### **2.3.2 Метод получения малых однослойных липосом**

Для получения малых однослойных липосом использовали экструзионный метод. Дисперсию больших многослойных липосом состоящих из яичного фосфатидилхолина последовательно продавливали через поликарбонатные мембранные фильтры «Nuclepore» с диаметром пор 400, 200 и 100 нм с применением ручного мини экструдера, производилось не менее 15 циклов экструзии через каждый мембранный фильтр. Дисперсия больших многослойных липосом состоящих из насыщенного соевого фосфатидилхолина также продавливалась через поликарбонатный мембранный фильтр «Nuclepore»

диаметром 100 нм при температуре 55 °С, дисперсию помещали в шприцы мини-экструдера, которые затем устанавливали на нагреваемый блок, затем шприцы оставляли на 10 минут – для выравнивания температуры, после чего начинали экструзию. Производилось 15 циклов экструзии. Температура фиксировалась с помощью термометра на блоке мини-экструдера.

### **2.3.3 Метод получения липосом с инкапсулированным митоксантроном.**

Инкапсулирование препарата в иммунолипосомы осуществляли по принципу активной загрузки с помощью ионного градиента сульфата аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 5,5 [52]. Для загрузки точную навеску митоксантрона помещали во флакон вместимостью 10 мл, растворяли 4 мл буфера 10мМ HEPES и 145 мМ NaCl (pH 8,2–8,4). Количество необходимого митоксантрона для точной навески рассчитывалось согласно коэффициенту загрузки препарат : суммарные липиды, равному 0,12 : 1. Далее к полученному раствору митоксантрона в буфере добавлялся 1 мл пустых липосом. Суммарный объем смеси, таким образом, составлял 5 мл. Далее pH дисперсии доводили до значения 8,5–8,6 и инкубировали 1,5 ч на водяной бане при температуре 45°C (Только для липосом, состоящих из насыщенного соевого фосфатидилхолина), затем 12 ч при 4°C и постоянном перемешивании.

### **2.3.4 Метод получения иммунолипосомальной конструкции митоксантрона**

Процесс получения иммунолипосомальной конструкции митоксантрона незначительно отличался от процесса получения липосомальных частиц. В состав липосомальной композиции вводился pNp-PEG<sub>3000</sub>-lipid. Далее на этапе загрузки точную навеску митоксантрона помещали во флакон вместимостью 10 мл, растворяли рассчитанным объемом буфера 10мМ HEPES и 145 мМ NaCl (pH 8,2–8,4), добавлялся 1 мл пустых липосом, далее pH дисперсии доводили до значения 8,5–8,6 и инкубировали 1,5 ч на водяной бане при температуре 45°C (Только для

липосом, состоящих из насыщенного соевого фосфатидилхолина), затем 12 ч при 4°C и постоянном перемешивании. Раствор антител добавлялся к дисперсии перед инкубацией в холодильнике. Суммарный объем дисперсии не превышал 5 мл, расчет необходимого количества антител велся исходя из мольного соотношения белок/pNP-PEG<sub>3000</sub>-lipid 1:40.

### **2.3.5 Измерение диаметра везикул**

Анализ среднего диаметра полученных везикул и оценку их распределения по размерам проводили с использованием метода динамического лазерного светорассеяния (DLS) с помощью прибора Nicomp 380 Submicron Particle Sizer. Образцы готовились непосредственно перед проведением измерений. Концентрация везикул подбиралась таким образом, чтобы частота импульсов на фотоэлектронном умножителе составляла от 200 до 600 кГц. В качестве дисперсионной среды использовалась деионизированная вода, прошедшая процедуру дегазирования под вакуумом (75 кПа). В стеклянную кювету размером 6x50мм вносили 20 мкл исследуемого образца (свежеприготовленных везикул) и добавляли деионизированную воду до 1мл. Затем кювету помещали в прибор и начинали процесс измерения. Свет от источника (лазера) в наносайзере фокусируется внутри стеклянной пробирки или кюветы с разбавленной суспензией частиц. Каждая частица рассеивает свет из падающего пучка. Интенсивность рассеянной волны регистрируется детектором. Продолжительность измерений составляла 10мин и более. На экране монитора наблюдали кривую распределения липосом по размерам. Все математические операции производились компьютерной программой.

### **2.3.6 Получение чистой фракции дисперсии с митоксантроном методом гель-фильтрации**

Очистку липосомальной дисперсии от незагруженного препарата и МКА (в случае иммунолипосом) для последующего анализа производилась методом гель-фильтрации.

Гель-фильтрация представляет собой хроматографический метод, основанный на различной скорости диффузии молекул с различной молекулярной массой. Используемые в данном методе сорбенты задерживают в своих порах молекулы с малой молекулярной массой, снижая, таким образом, скорость их прохождения, молекулы с крупной молекулярной массой, в свою очередь, быстро просачиваются между гранул сорбента и раньше выходят из колонки.

На хроматографическую колонку C10/20, заполненную сефадексом G-50 и предварительно уравновешенную 0,15М раствором натрия хлорида в течение 1 ч (при скорости 0,3–0,4 мл/мин), наносили 1 мл липосомальной или иммунолипосомальной дисперсии с митоксантроном. В качестве элюирующего раствора использовался 0,15 М раствор хлорида натрия, скорость элюции составляла 0,3 мл/мин и регулировалась перистальтическим насосом. Контроль процесса очистки производился с помощью детектора ABI 757 Absorbance Detector, настроенного на длину волны 215 нм и самописца BD 41, фиксировавшего разделение в виде пиков.

### **2.3.7 Метод стерилизующей фильтрации везикул с митоксантроном**

Для постановки тестов *in vitro* свежеприготовленную дисперсию липосом или иммунолипосом с митоксантроном пропускали через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм в стерильных условиях. Фильтрат собирали в стерильный флакон.

### **2.3.8 Количественное определение инкапсулированного митоксантрона**

Для определения митоксантрона в липосомальной или иммунолипосомальной дисперсии применяли стандартную спектрофотометрическую методику количественного определения вещества с использованием рабочего стандартного образца (PCO) митоксантрона при длине волны  $242 \pm 2$  нм. Исследование влияния вспомогательных веществ на

спектральные характеристики митоксантрона показало, что присутствие фосфатидилхолина, холестерина, PEG<sub>2000</sub>DSPE, pNp-PEG<sub>3000</sub>-lipid и криопротекторов (сахарозы, глюкозы) не изменяет положения характеристического максимума. Измерение оптической плотности спиртовых растворов проводили относительно 95% этилового спирта в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм.

Содержание митоксантрона (X, мг) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \times a \times C}{D_0 \times C_0},$$

где **D** – оптическая плотность раствора образца; **D<sub>0</sub>** – оптическая плотность РСО Мит; **C** – величина разбавления образца; **C<sub>0</sub>** – величина разбавления РСО Мит; **a** – навеска РСО Мит, мг.

Эффективность включения митоксантрона в липосомы (**B**, %) рассчитывали по формуле:

$$B = \frac{D_1 \times C_1 \times V_1}{D \times C \times V} \times 100\%,$$

где **D<sub>1</sub>** – оптическая плотность раствора фракции с очищенными липосомальным Мит; **D** – оптическая плотность раствора исходной липосомальной дисперсии; **C<sub>1</sub>** – величина разбавления фракции с очищенным липосомальным Мит; **C** – величина разбавления исходной липосомальной дисперсии; **V<sub>1</sub>** – объем фракции с очищенным липосомальным Мит, мл; **V** – объем исходной липосомальной дисперсии, нанесенной на колонку, мл.

Все растворы использовали свежеприготовленными.

1. Приготовление РСО митоксантрона: 2,0 мг препарата (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и прибавляли 95% этиловый спирт до метки, перемешивали (раствор А). Затем 2,5мл раствора А переносили в колбу вместимостью 25мл, прибавляли 95% этиловый спирт до метки.

2. Приготовление раствора исходной липосомальной или иммунолипосомальной дисперсии с митоксантроном: 1мл свежеприготовленных липосом/иммунолипосом с митоксантроном переносили в мерную колбу

вместимостью 50 мл и доводили 95% этиловым спиртом до метки, перемешивали (раствор А). Затем 5мл раствора А переносили в колбу вместимостью 25мл, прибавляли 95% этиловый спирт до метки.

3. Приготовление раствора фракции с очищенным липосомальным/иммунолипосомальным митоксантроном: 1мл полученной фракции очищенной дисперсии с митоксантроном переносили в мерную колбу вместимостью 25мл и доводили 95% этиловым спиртом до метки, перемешивали.

### **2.3.9 Определение белка, связанного с поверхностью липосом с использованием медного комплекса бицинхониновой кислоты**

Метод основан реакции восстановления ионов  $\text{Cu}_2^+$  до ионов  $\text{Cu}^+$  под действием белка в щелочной среде (биуретовая реакция) и на высокочувствительной спектрофотометрической регистрации образующихся ионов одновалентной меди (I) после их связывания в хелатные комплексы с бицинхониновой кислотой. Эти комплексы характеризуются высокой экстинкцией около 562 нм, которая линейно зависит от концентрации белка в широком рабочем диапазоне (от 20 до 2000 мкг/мл). Для построения калибровочного графика использовали стандартный раствор белка (бычьего сывороточного альбумина, БСА) в концентрации 0,2 мкг/мкл. Данный метод не допускает использования одного и того же калибровочного графика для одновременных анализов. Для проведения анализа сначала готовили необходимое количество реакционной смеси — смешением бицинхониновой кислоты (200 мкл/ пробу) и 4% раствора  $\text{CuSO}_4$  (II) (4 мкл/пробу). При проведении измерения смешивали 10 мкл анализируемой пробы с 200 мкл реакционной смеси, инкубировали 30 минут при 37°C и фотометрировали при 565 нм. Калибровочный график строили в соответствии со схемой разбавления стандартного раствора БСА, которая представлена в Таблица 6.

Таблица 6 – Схема приготовления серии растворов БСА для построения калибровочного графика.

№ Образца	Объем H <sub>2</sub> O, мкл	Объем реакционной смеси, мкл	Объем стандарта (БСА, k=2мкг/мкл), мкл
1	20	400	–
2	18	400	2
3	16	400	4
4	12	400	8
5	8	400	2
6	4	400	16
7	2	400	18
8	–	400	20

### 2.3.10 Расчет количества молекул на одну липосому.

Количество молекул на одну липосому рассчитывалось исходя из формулы, впервые предложенной Huang и Mason[130].

$$N_{\text{tot}} = \frac{\left[ 4\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 + 4\pi \left(\frac{d}{2} - h\right)^2 \right]}{a},$$

Где:  $N_{\text{tot}}$  – общее количество молекул, Где  $4\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2$  – площадь одного из монослоев липосомы,  $d$  – диаметр липосом,  $h$  – толщина бислоя (около 5 нм),  $a$  – площадь «головки» липида  $0,71 \text{ нм}^2$ .

Таким образом, для однослойных липосом состоящих из фосфатидилхолина вышеописанное уравнение имело вид:

$$N_{\text{tot}} = 17,69 \times \left[ \left(\frac{d}{2}\right)^2 + \left(\frac{d}{2} - 5\right)^2 \right],$$

Где  $d$  – диаметр липосом.

Так для липосомы, диаметром 100 нм число молекул на липосому равнялось приблизительно 80 047. Концентрация липидов в растворе являлась известной величиной. Число липосом в растворе вычислялось исходя из молярного веса липидов, входящих в состав липосомы по формуле:

$$N_{lipo} = \frac{(n_1+n_2+n_3) \times N_A}{N_{tot}},$$

Где  $N_{lipo}$  – число липосом;  $n_1, n_2, n_3$  – количество липидов (моль);  $N_{tot}$  – число молекул в одной липосоме ;  $N_A$  – число Авогадро  $6,02 \times 10^{23}$ .

### **2.3.11 Метод измерения $\zeta$ (дзета) – потенциала липосомальной дисперсии**

$\zeta$  (дзета) – потенциал (показатель электрофоретической подвижности) липосомальной дисперсии определяли методом электрофоретического рассеяния света на приборе NanoBrook Zeta Plus Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, США). Образцы готовились непосредственно перед проведением измерений. В качестве дисперсионной среды использовалась деионизированная вода, прошедшая процедуру дегазирования под вакуумом (75 кПа). В стеклянную кювету помещали 100 мкл исследуемого образца (свежеприготовленных везикул) и добавляли деионизированную воду до 1 мл. Затем кювету помещали в прибор и производили процесс измерения. Зета потенциал дисперсии определяли при угле рассеивания света  $15^\circ$ . Результаты измерения представляют собой значения измерений 5 независимых образцов. Расчеты значений дзета – потенциала и мобильности частиц производились автоматически, с помощью программы Particle Solutions v. 2.5. Время измерения одного образца составляло 10 минут и более.

*Методы биологических исследований***2.3.12 Метод оценки специфического связывания иммунолипосомальной конструкции митоксантрона с клетками–мишенями методом непрямой реакции поверхностной иммунофлуоресценции (РИФ)**

Способность антител, связанных с поверхностью иммунолипосом, специфически связываться с антигеном–мишенью, проверяли на клетках линии SK–BR–3.

Для проведения реакции  $2,5 \times 10^4$  дважды отмытых в PBS клеток инкубировали с 20 мкл немеченых МКА, ИЛКМ, липосомальной формы митоксантрона, а также пустыми иммунолипосомами, в течение 30 мин при комнатной температуре. После чего клетки отмывали PBS центрифугированием в течение 7 мин при 1200 об/мин. Затем клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C с 10 мкл F(ab)<sub>2</sub> фрагментов против иммуноглобулинов человека (рабочее разведение 1:500), меченой FITC. После чего клетки дважды отмывали PBS и ресуспендировали в PBS, содержащем 1% формалин и 0,1% азид натрия. Результаты реакции анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

**2.3.13 Проточно–цитофлуориметрический анализ**

Проточно–цитофлуориметрический анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером (длина волны 488 нм), с использованием встроенного программного обеспечения. Клетки анализировали на основе параметров, измеряемых проточной цитометрией. В момент прохождения через луч лазера клетки рассеивают свет во всех направлениях и испускают небольшое количество света за счет флуоресценции. Прямое рассеивание света (FCS) (количество света в направлении лазерного пучка под углом 0°) определяет размер и форму клеток, тогда как боковое (SSC) (под углом 90° по отношению к лазерному пучку) определяет структурные особенности различных популяций клеток. На

цитограмме устанавливали соответствующее окно дискриминации (гейт), в котором на основании FSC и SSC вырезали основной пул клеток с целью удаления мелких (дебрис) и крупных (агрегаты) частиц. Длина волны для зеленой флуоресценции устанавливали в канале FL1 (515–545 нм). Данные получали в логарифмическом измерении для FL1 канала. В каждой пробе анализировалось 5000 событий.

### **2.3.14 Оценка цитотоксической активности липосомальной формы и иммунолипосомальной конструкции митоксантрона МТТ–тестом *in vitro***

МТТ–тест, был впервые предложен Mosmann T. et al. [183] Данный опыт основан на способности дегидрогеназ живых клеток превращать бледно–желтый водорастворимый 3–(4,5–диметилтиазолин–2)–2,5 дифенилтетразолий бромид (МТТ) в голубые кристаллы формазана, не растворимые в воде. Количество образовавшегося формазана, определяемое колориметрическим методом после его растворения в органических растворителях, характеризует интенсивность окислительно–восстановительных процессов в клетках культуры и является косвенной характеристикой активной биомассы. При исследованиях, проводимых на суспензионных культурах, клетки в концентрации  $5 \times 10^4$  клеток/мл засеивали в 96–луночные круглодонные планшеты.

Для оценки способности иммунолипосом, загруженных митоксантроном, избирательно доставлять лекарственный препарат к клеткам–мишеням, исследуемые образцы инкубировали с клетками в течение 1 часа при 4°C также производилось исследование без проведения инкубации на холоду. После этого клетки отмывали и оставляли в CO<sub>2</sub>–инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> на 47 ч. Контролем служили клетки, которые инкубировали в тех же условиях. Общее время инкубации составило 48 ч. За 6 ч до окончания инкубации в каждую лунку вносили раствор МТТ (концентрация 5 мг/мл). По окончании инкубации планшеты центрифугировали при 1500 об/мин 10 мин, надосадочную жидкость удаляли. Осадок растворяли в 150 мкл ДМСО и помещали планшеты на 5–7

минут в термостат при температуре 37°C. Далее, планшеты встряхивали на шейкере, после чего интенсивность окрашивания измеряли на спектрофотометре «Униплан 2000» при  $\lambda=492$  нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Процент живых клеток вычисляли по формуле:

$$N_0 = \frac{[N_1 - n] \times 100\%}{N_2},$$

где  $N_0$  – процент живых клеток;  $N_1$  – средняя оптическая плотность лунок, содержащих клетки и препарат;  $N_2$  – средняя оптическая плотность контрольных лунок, содержащих только клетки;  $n$  – оптическая плотность лунок, содержащих только митоксантрон.

Для каждого препарата строили график зависимости «доза–эффект».

### **Статистический анализ полученных результатов**

Статистический анализ проводили с использованием программ Microsoft Excel, Statistica v.5.0., IBM SPSS Statistics 21. Различия считали статистически достоверными при  $p \leq 0,02$  и  $p \leq 0,05$ , использовали t–критерий Стьюдента, односторонний и двусторонний точный критерий Фишера.

### **Заключение**

Для проведения лабораторных исследований были подобраны лекарственные вещества, компоненты липидной мембраны, растворители и реагенты, отвечающие требованиям нормативных документов. В исследовании были использованы как методы изготовления ЛЛФ и ИЛЛФ, так и методы анализа полученных конструкций. Представлены методики сравнения цитотоксической активности ЛЛФ и ИЛЛФ митоксантрона в опытах *in vitro*, методы оценки специфичности ИЛЛФ с антителами к HER-2 neu.

### **ГЛАВА 3. Разработка состава и технологии получения липосомальной формы митоксантрона**

#### **3.1 Технология получения липосомальных дисперсий митоксантрона**

Липосомы являются универсальной платформой для доставки лекарственных средств, в качестве которых могут выступать витамины, ферменты, гормоны и различные химиопрепараты. Эффективность включения лекарственного вещества в липосомальную структуру главным образом зависит от физико-химических свойств самого вещества (растворимости в воде, заряда, состава и размеров) и свойств липосомальной структуры (объема внутреннего пространства липосомы, состава мембраны). При использовании липидных субстанций обладающих высокой степенью очистки процесс получения липосом загруженных антрациклиновыми антибиотиками сводится к ряду основных стадий:

1. Получение липидной пленки
2. Эмульгирование липидов в буферном растворе
3. Уменьшение размеров полученных частиц одним из известных методов,
4. Загрузка частиц препаратом,
5. Очистка от незагруженного вещества,
6. Стерилизующая фильтрация
7. Замораживание с последующей лиофилизацией.

Иммунолипосомальные конструкции получают путем не значительной модификации состава полученных пегилированных липосом с помощью синтетических липидов. Как правило, векторные молекулы прикрепляют к синтетическим липидам либо заранее (перед получением липидной пленки) либо на стадии загрузки частиц препаратом. Основными параметрами качества получаемых ЛЛФ должны являться: размер везикул, стерильность, безвредность содержание включенного в липосомы препарата , рН и др. При разработке ИЛЛФ

также необходимо учитывать такие параметры как количество молекул антител на одну липосому и специфичность закрепленных молекул.

Основными технологическими задачами в процессе разработки ИЛЛФ митоксантрона были:

- выбор оптимальной липидной композиции
- отработка методов включения препарата в липосомы
- отработка метода присоединения антител
- исследование биофармацевтических характеристик *in vitro*.

### **3.1.1 Выбор липидных композиций**

Для достижения основной цели исследования – получения иммунолипосомальной конструкции митоксантрона было решено использовать ряд моделей липосомальных конструкций. В первую очередь производился выбор основного липида в липидной смеси. Существующие в настоящее время на фармацевтическом рынке липосомальные конструкции описаны в Главе 1 (пункты 1.4, 1.6). Большинство ЛЛФ существующих на рынке создано на основе яичного (ЕРС) и насыщенного соевого фосфатидилхолина (НСРС). Это, прежде всего, связано с удобством получения данных липидов, их низкой стоимостью по отношению к «чистым» липидам, а также удобством применения в фармацевтическом производстве. Кроме того, физико-химические свойства данных липидов хорошо изучены. Исходя из данных фактов, в качестве основы липидной композиции было решено использовать именно насыщенный соевый и яичный фосфатидилхолин.

Яичный фосфатидилхолин активно использовался при создании липосомальных структур загруженных антибиотиками антрациклинового ряда уже существующих на рынке, в частности препарата Myocet (Teva Pharmaceutical Industries Ltd.). Также он широко представлен в работах отечественных разработчиков липосомальных лекарственных форм противоопухолевых препаратов [1,8,13,16,38,39]. Кроме того, на базе яичного фосфатидилхолина в

РОНЦ им. Н.Н. Блохина О.В. Хугаевой была создана липосомальная лекарственная форма митоксантрона [38,39].

В свою очередь, насыщенный соевый фосфатидилхолин (HSPC) является основой липидной композиции первого успешного липосомального препарата Doxil/Caelyx (Janssen Products, LP, США) и его аналога Lipo-dox (SUN Pharmaceutical ltd., Индия). Композиции на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина хорошо изучены и активно применяются в разработке новых липосомальных и иммунолипосомальных форм антибиотиков антрациклинового ряда [170,171].

Важным компонентом липидной мембраны является холестерин, он определяет свойства липидного бислоя, а именно его механические свойства, упаковку липидных молекул, проницаемость липидной стенки. Также содержание холестерина оказывает влияние на захват липосом клетками печени и селезенки в процессе циркуляции в кровеносном русле и проникновение липосом в таргетируемые клетки [201,51,95]. Для липосом на основе яичного фосфатидилхолина оптимальное количество холестерина было определено экспериментально при разработке липосомальной формы митоксантрона на основе яичного лецитина в работе О.В. Хугаевой на уровне около 50% (в молярных процентах)[38,39]. Такое количество холестерина обеспечивает необходимую жесткость липидной мембраны и предотвращает утечку препарата в ходе его циркуляции по кровеносному руслу.

Для липосом на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина так же существуют экспериментальные данные по липидным композициям и оптимальному количеству холестерина, связанные с разработками препарата Doxil [95,48,49]. В большинстве случаев, оптимальными соотношениями холестерина и насыщенного соевого фосфатидилхолина, являются соотношения липид : холестерин, близкие к 2 : 1 (в молярном соотношении) или 70 : 30 (в моль%). Данное количество холестерина обеспечивает наилучшие показатели загрузки и высвобождения широкого спектра химических веществ[64]. Также в последних исследованиях липосомальных композиций были показаны

приемлемые характеристики у смеси с соотношениями 60:40 (в моль%)[64]. Известно, что максимальным количеством холестерина, используемым в липосомальных композициях, является его содержание на уровне 50 моль%. Холестерин в смесях с насыщенными липидами увеличивает их проницаемость, снижает температуру фазового перехода гель – жидкий кристалл и определяет структуру липидной стенки, важную при производстве липосом [64,144]. Таким образом, для выявления наилучшей для включения митоксантрона композиции, было решено исследовать три липидных состава на основе соевого фосфатидилхолина с различным содержанием холестерина (30, 40 и 50 моль%).

Для предотвращения захвата посредством РЭС, стерической стабилизации липосомальных частиц в состав был введен ПЭГ-ДСФЭ-2000. Самым распространенным содержанием ПЭГ-ДСФЭ-2000 применяемым в ССЛ является 4-6 моль%. Данное содержание ПЭГ обеспечивает наилучшую стерическую стабилизацию, структуру липидного бислоя и повышает термодинамическую устойчивость частиц [112,111]. Однако большая стабильность липосом на основе насыщенных липидов позволила использовать для стерической стабилизации более низкое содержание ПЭГ (около 1 моль%). Данное содержание было решено использовать и в нашей работе для стабилизации частиц на основе соевого фосфатидилхолина.

### **3.1.2 Получение больших многослойных липосом (МЛВ)**

Методы получения липосом описаны в Главе 2 (пункты 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3) Промежуточным продуктом получения липосомальных наночастиц является суспензия многослойных липосом.

Для выбора оптимального состава было разработано 4 модели липосом с различным липидным составом, три из которых на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина (HSPC) с различным содержанием холестерина (от 30 до 50 моль%) и одна на основе яичного фосфатидилхолина (EPC) основу состава которой составила композиция ранее исследованная в РОНЦ им. Н.Н. Блохина [38,39]. Липидные композиции представлены в Таблице 7 и Таблице 8.

Расчет липидной композиции производился таким образом, чтобы суммарное количество (моль) липидов – компонентов каждой смеси было одинаковым. Данным подходом достигалась точность формирования липидных смесей, а именно близкое количество молекул, составляющих липидную смесь.

Таблица 7 – Липидный состав МЛВ

№ п/п	Липиды	Моль %	Мол. Вес, г/моль	Конц., мг/мл	Молярное соотношение липидов	Суммарно Моль
1	S-PC3	50	779,76	7,79	10	$\Sigma = 0,0002$
	Холестерин	49,5	386,7	3,82	9,9	
	DSPE – PEG–2000	0,5	2805,5	0,28	0,1	
				$\Sigma = 11,9$		
2	S-PC3	70	779,76	10,91	14	$\Sigma = 0,0002$
	Холестерин	29,5	386,7	2,28	5,9	
	DSPE – PEG–2000	0,5	2805,5	0,28	0,1	
				$\Sigma = 13,47$		
3	S-PC3	60	779,76	9,35	12	$\Sigma = 0,0002$
	Холестерин	39,5	386,7	3,05	7,9	
	DSPE – PEG–2000	0,5	2805,5	0,28	0,1	
				$\Sigma = 12,68$		
4	ЕРС	52,38	760,09	7,962	10,47	$\Sigma = 0,0002$
	Холестерин	42,86	386,7	3,314	8,57	
	DSPE – PEG–2000	4,76	2805,5	2,670	0,95	
				$\Sigma = 13,94$		

Таблица 8 – Навески, использованные при приготовлении МЛВ различных липидных составов.

№	Липиды	Молярный процент липидов	Масса навески в граммах
1	S-PC3	50	0,0779
	Холестерин	49,5	0,0382
	DSPE – PEG–2000	0,5	0,0028
2	S-PC3	70	0,1091
	Холестерин	29,5	0,0228
	DSPE – PEG–2000	0,5	0,0028
3	S-PC3	60	0,0935
	Холестерин	39,5	0,0305
	DSPE – PEG–2000	0,5	0,0028
4	ЕРС	52,38	0,0796
	Холестерин	42,86	0,0331
	DSPE – PEG–2000	4,76	0,0267

В ходе исследования производился анализ размеров дисперсий МЛВ после смывки тонкой липидной пленки. Значения среднего диаметра МЛВ представлены в Таблице 9. Из приведенных данных видно, что размеры МЛВ распределены в диапазоне от 400 до 700 нм. Составы липосом на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина имели различное распределение по размерам в зависимости от состава. Наименьшими показателями размера  $479 \pm 58$  нм обладали МЛВ с содержанием холестерина в 39,5 моль%. Увеличение содержания холестерина в сторону значений, близких к бинарной смеси (49,5 моль%), незначительно увеличивало размеры МЛВ до  $528 \pm 167$  нм. Следует также отметить, что при увеличении размеров также расширялось и распределение значений. Уменьшение содержания холестерина до 29,5 моль% вызывало увеличение размеров МЛВ. Данный факт может быть обусловлен изменениями жесткости липидной мембраны при различных концентрациях холестерина. Холестерин увеличивает текучесть мембраны, состоящей из насыщенных липидов, что влияет на размеры частиц МЛВ, получаемых при

смывке липидной пленки. Повышение содержания холестерина до уровня бинарной смеси снижает стабильность размеров получаемых МЛВ и расширяет диапазон их размеров. В свою очередь, меньшее содержание холестерина также приводит к увеличению диаметра получаемых МЛВ. Состав на основе ненасыщенного яичного фосфатидилхолина показал малые значения среднего диаметра МЛВ ( $421 \pm 79$  нм), сопоставимые с минимальными значениями для дисперсий на основе насыщенных липидов.

Таким образом, наименьшими размерами обладали МЛВ составов №3 и №4, что делает их наиболее предпочтительными при проведении экструзии через мембранные фильтры.

Таблица 9 – Средний Диаметр МЛВ

№	Состав	Соотношение липидов Липид:Хол:ДСФЭ-ПЭГ		Диаметр везикул, нм
		молярное	В моль%	
1	S PC-3:ХОЛ:mPEG <sub>2000</sub> DSPE	10:9,9:0,1	50:49,5:0,5	528± 167
2	S PC-3:ХОЛ:mPEG <sub>2000</sub> DSPE	14:5,9:0,1	70:29,5:0,5	673± 49
3	S PC-3:ХОЛ:mPEG <sub>2000</sub> DSPE	12:7,9:0,1	60:39,5:0,5	479± 58
4	E PC:ХОЛ:mPEG <sub>2000</sub> DSPE	11: 9: 1	52:43:4,7	421± 79

### 3.1.3 Получение малых однослойных липосом (МОЛ)

Малые однослойные липосомы, могут быть получены множеством методов, подробно описанных в Главе 1. Однако наиболее распространенным в лабораторной практике, является метод экструзии через поликарбонатные мембранные фильтры с определенным размером пор. Преимуществами данного метода для нашей работы являлась главным образом, способность получения малых партий липосом с наиболее однородными размерами. В связи с вышеупомянутыми преимуществами, экструзионный метод был выбран в нашей работе для получения МОЛ.

Важным параметром для получения липосом данным способом является липидный состав МЛВ и его свойства, такие как вязкость и температура фазового перехода гель – жидкий кристалл. Так, мембрана липосом, состоящих из яичного

фосфатидилхолина, при комнатной температуре 25°C, находится в более подвижном состоянии, что позволяет производить многократную экструзию через поликарбонатные мембранные фильтры без подвода дополнительного тепла. В свою очередь, насыщенные фосфолипиды, такие как гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин, являются более ригидными в данном диапазоне температур. Что требует для успешного проведения экструзии МЛВ на основе насыщенных фосфолипидов дополнительного подвода тепла [189]. Экструзию в этом случае производят при температуре выше температуры фазового перехода гель – жидкий кристалл. Гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин является смесью насыщенных липидов и состоит из 85% дистеароил фосфатидилхолина и 15% дипальмитоил фосфатидилхолина, температуры фазовых переходов для которых составляют ~ 41 – 42 °С и ~54 – 55 °С соответственно [150]. Таким образом, для наилучшей экструзии блок экструдера нагревали до 55 °С.

Кроме того, важным фактором, для производства МОЛ экструзионным методом, является количество циклов пропускания через поликарбонатный мембранный фильтр. Минимальным количеством циклов для получения стабильных размеров частиц является 5 [83,128]. Рекомендуемое производителем число циклов экструзии составляет более 7, однако отмечено, что большее количество циклов увеличивает однородность получаемых частиц. В нашей работе для гарантированного получения МОЛ с более однородными геометрическими характеристиками использовалось 15 циклов экструзии. На Рисунок 11 и Рисунок 12 представлены результаты измерения размеров МОЛ, основными компонентами которых являются гидрогенизированный соевый и яичный фосфатидилхолин.

Рисунок 11 – Размеры дисперсии липосом на основе S PC–3

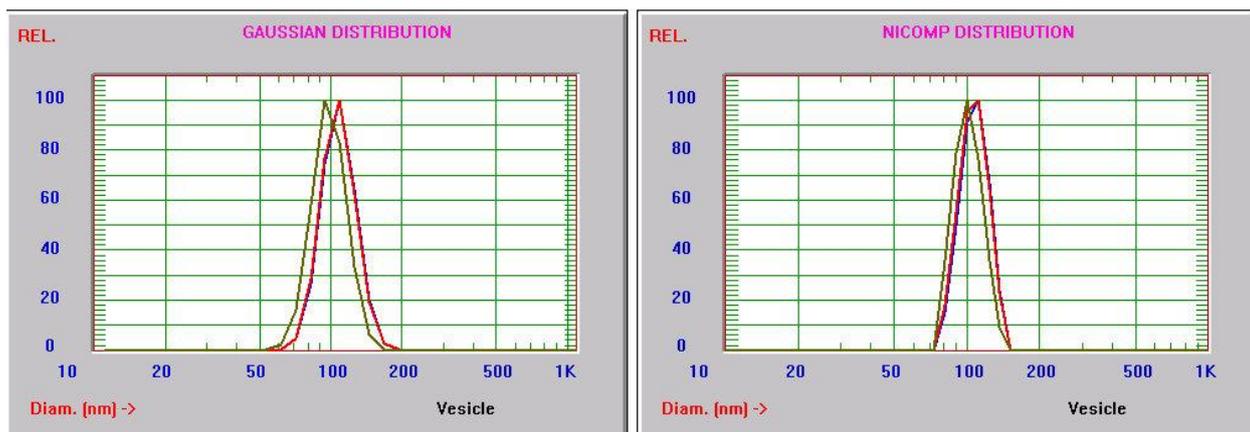
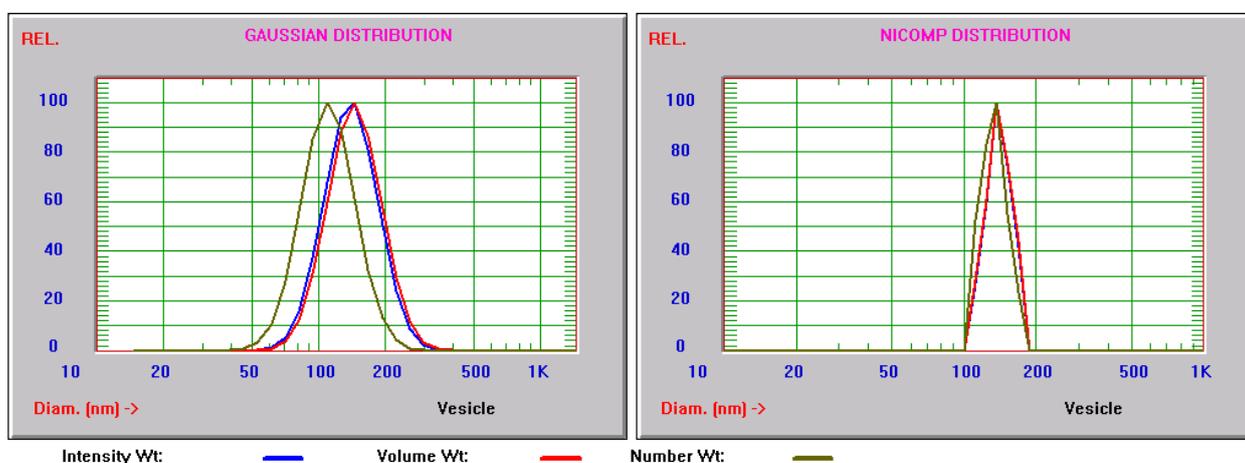


Рисунок 12 – Размеры дисперсии липосом на основе E-PC.

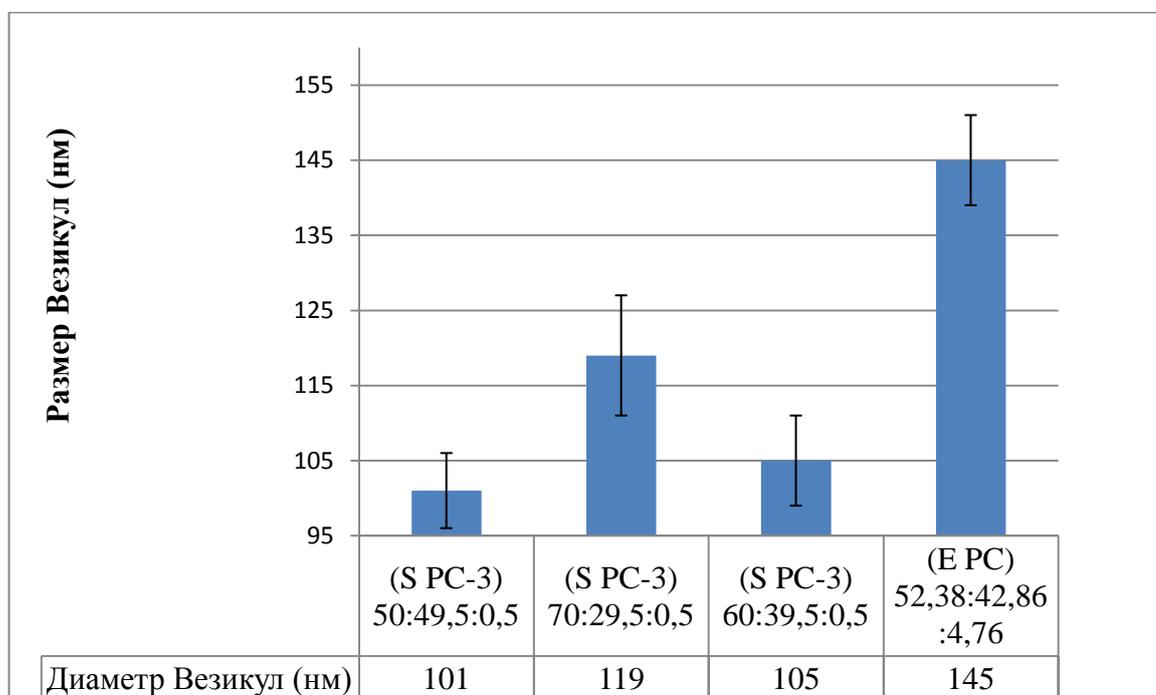


МОЛ получали методом, описанным в Главе 2. (пункт 2.3.2.). Экструзию МЛВ на основе яичного фосфатидилхолина проводили при комнатной температуре, а МЛВ состоящие из S PC–3 экструдировали с подводом к блоку тепла (при температуре 55 °С).

На Рисунок 13 представлены результаты измерения диаметра МОЛ различного состава, полученные в результате экструзии. Размеры частиц после экструзии распределены от 145 до 101 нм. Липосомы состоящие из яичного фосфатидилхолина состава № 4 показали наибольшее значение размеров, что вероятно связано с большей текучестью липидной мембраны на основе ненасыщенных липидов, однако данные результаты вполне согласуются с данными полученными в предыдущих исследованиях данной композиции. Размеры липосом на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина различного состава были распределены в интервале от 101 до 119 нм, что в среднем меньше

чем размеров липосом на основе яичного фосфатидилхолина. Данный факт может обуславливаться большей ригидностью слоя насыщенных липидов. Стоит отметить, что липосомы на основе насыщенных липидов также распределились по размерам в зависимости от содержания холестерина. Наименьшими значениями обладали липосомы с содержанием холестерина близким к бинарной смеси состава №1 (101 нм) и с содержанием холестерина близким к 40 моль% (105 нм). Наибольшие значения для липосом из насыщенных липидов показал состав №2 с 30 моль% содержанием холестерина. Данные различия размеров, так же могут быть обусловлены различием физических свойств мембран.

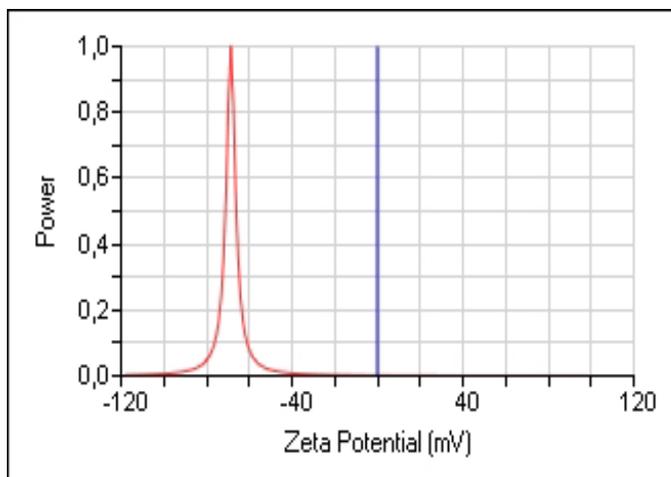
Рисунок 13 – Диаметр везикул различного липидного состава.



Для оценки стабильности дисперсии липосом состава № 3 на основе соевого фосфатидилхолина производилось измерение показателя электрофоретической подвижности  $\zeta$  (дзета) – потенциала. В дисперсии липосом состава № 3  $\zeta$  – потенциал составил  $-68,61 \pm 3,4$  мВ. Отрицательный показатель  $\zeta$  – потенциала свидетельствует об отрицательном заряде частиц и вероятно связан с наличием на поверхности образца отрицательно заряженных фосфоэфирных групп ПЭГ-ДСФЭ, данный факт также отражен в исследованиях подобных липидных композиций [111,112]. В свою очередь, значение заряда, превышающее  $\pm 30$  мВ, свидетельствует о хорошей стабильности липосомальной дисперсии и малой

склонности к образованию конгломератов [7]. Кривые измерения  $\zeta$  – потенциала частиц представлены на Рисунок 14.

Рисунок 14 – График измерения  $\zeta$  (дзета) – потенциала липосомальной дисперсии состава № 3.

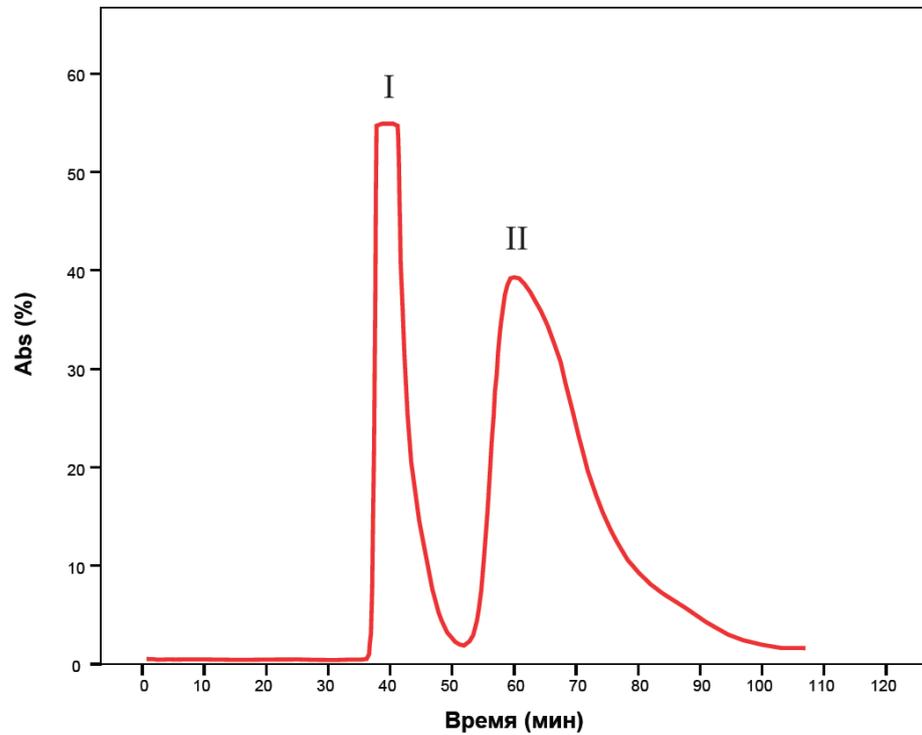


### 3.1.4 Загрузка препарата

#### *Выбор оптимальных условий загрузки*

Полученные МОЛ нагружали препаратом спомощью метода активной загрузки, подробно описанного в Главе 2 (пункт 2.3.3.). Липосомы ,состоящие из яичного фосфатидилхолина , загружались согласно методике, разработанной ранее и проверенной для данного типа липосом Хугаевой [38,39]. Для липосом, состоящих из соевого фосфатидилхолина выполнялся подбор оптимальных условий проведения загрузки, в виду специфической структуры их мембраны. Первоначально, производилась попытка загрузки при условиях, сходных с условиями для яичного фосфатидилхолина (125мМ раствор сульфата аммония; 12ч при 4°C), однако в результате включение препарата составило 40%, что является низким показателем для активной загрузки. На РисункеРисунок 15 представлена хроматограмма липосом загруженных без подвода тепла. Как видно из представленного рисунка – большая часть загружаемого препарата находилась вне липосом.

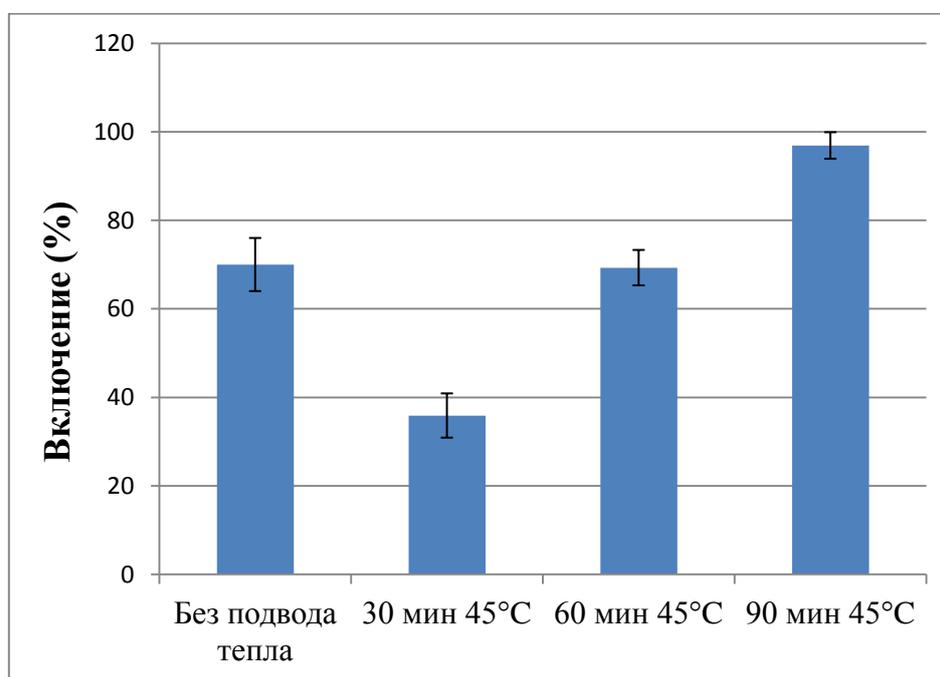
Рисунок 15 – Хроматограмма очистки липосом митоксантрона от незагруженного препарата : I – фракция липосом с митоксантроном; II – Не загруженный мтоксантрон. Условия хроматографии: колонка: С 10/20 (Amersham Biosciences); элюент: 0,15М NaCl; скорость элюции: 0,3 мл/мин; детектор на длине волны 215 нм; температура колонки: комнатная.



Полученный результат мог являться следствием низкой проницаемости мембран липосом из насыщенных липидов, которые находятся в твердом состоянии при комнатной температуре. Известно, что смесь насыщенного соевого фосфатидилхолина и холестерина изменяет характеристики проницаемости при различной температуре связанные с фазовыми переходами. В интервале комнатных температур мембраны липосом из соевого фосфатидилхолина находятся в состоянии плохо проницаемого ламеллярного геля. При повышении температуры наблюдается двухстадийный фазовый переход: 45–47 °С (гель – неравномерный гель), 50–53 °С (неравномерный гель – жидкий кристалл)[145,144]. Проницаемость липидной стенки при этом меняется также постадийно и принимает максимальные значения при жидкокристаллическом состоянии, фаза неравномерного геля имеет частичную проницаемость.

Проведение активной загрузки при температуре фазового перехода гель-жидкий кристалл не целесообразно, так как скорость истечения сульфата аммония в этом случае будет максимальна, что приведет к уменьшению движущей силы процесса. В связи с этим, наиболее удобной для загрузки температурой является интервал предфазового перехода гель – неравномерный гель (45–47 °С). В нашем исследовании инкубация производилась на водяной бане при температуре 45°С. Чтобы повысить эффективность загрузки липосом данного состава, было решено также увеличить концентрацию сульфата аммония в 2 раза (с 125 мМ до 250 мМ) с целью усиления градиента, так как насыщенные липиды в сравнении с ненасыщенными имеют меньшие показатели проницаемости. Для определения оптимального времени инкубации производилось исследование загрузки при нагревании (использовался липидный состав 3). Результаты выбора оптимального времени загрузки представлены на Рисунок 16.

Рисунок 16 – Выбор оптимальных условий загрузки для липосом из насыщенного соевого фосфатидилхолина.



Согласно полученным результатам были выбраны оптимальные условия для проведения процедуры загрузки липосомального митоксантрона, 1,5 часа при температуре 45°С. Для проведения более полной процедуры загрузки и

стабилизации дисперсии после нагрева липосомы оставляли на 12 часов при температуре 4°C, после чего производили дальнейшие исследования.

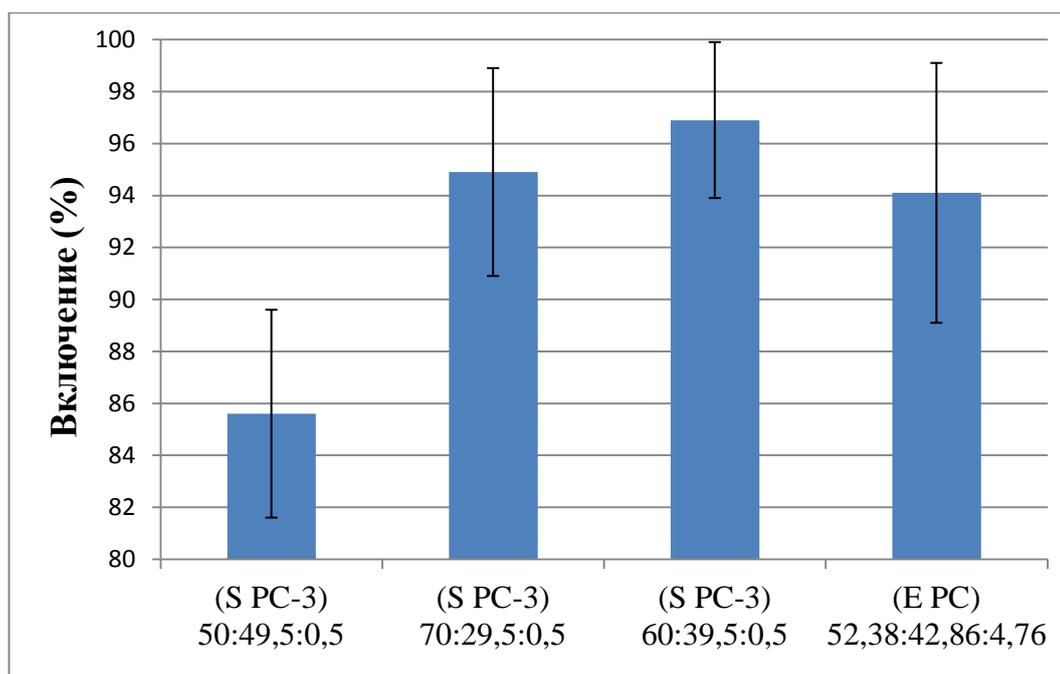
### ***Подбор оптимальной липидной композиции***

Эффективность загрузки препарата в липосомы также зависит от состава мембраны липосом и их размеров. Кроме того, размер и степень загруженности липосом влияет на эффективность действия липосомальной формы. Для выбора оптимальной липидной композиции загрузку препарата производили при различных составах липосом, результаты представлены в Таблица 10 и Рисунок 17.

Таблица 10 – Результаты измерения загрузки липосом в зависимости от липидной композиции.

№ п/п	Базовый Липид	Соотношение липидов моль %	Процент загрузки	Средний диаметр
1	S PC-3	50:49,5:0,5	85,6±4	101±5
2	S PC-3	70:29,5:0,5	94,9±4	117±8
3	S PC-3	60:39,5:0,5	96,9±3	105±6
4	E PC	52,38:42,86: 4,76	94,1±5	145±7

Рисунок 17 – Процент загрузки липосомальных дисперсий при различных липидных составах.



Все липидные композиции показали сравнительно высокие показатели загрузки: от 85 до 97 %. Меньшими показателями по размерам частиц и загрузке обладают липосомы состава № 1 с содержанием холестерина около 50 моль% ( $101 \pm 5$  нм и  $85,6 \pm 4$  % соответственно). Липосомы состава №2 с 30 моль% содержанием холестерина показали наибольший размер, среди липосом состоящих из насыщенных липидов  $117 \pm 8$  нм. При этом, показатели загрузки были сходны со значениями для липосом на основе яичного фосфатидилхолина  $94,9 \pm 4$ %. Средний диаметр липосом состава № 3 был незначительно выше липосом с составом №1 и составлял  $105 \pm 6$  нм, однако обладал наилучшими показателями загрузки  $96,9 \pm 3$  %. Дисперсия на основе яичного фосфатидилхолина при значительно больших размерах  $145 \pm 7$  нм показала средние результаты по загрузке  $94,1 \pm 5$  %. Таким образом, наилучшими показателями по размерам дисперсии и загрузке препарата показала композиция состава № 3 (60:39,5:0,5). В дальнейших исследованиях она использовалась в качестве базовой для создания иммунолипосомальной формы препарата на базе насыщенных липидов в связи с ее теоретически большим потенциалом доставки цитостатика внутрь опухоли. Также в дальнейших исследованиях приняла участие и липосомальная форма на основе яичного фосфатидилхолина №4 (52,38:42,86:4,76).

#### ***Подбор соотношения препарат : суммарные липиды***

Важным фактором для процедуры загрузки является массовое соотношение препарата к суммарным липидам. Данное соотношение, прежде всего, важно для обеспечения полноты и максимальной эффективности загрузки конкретной липидной смеси. В 11 представлены результаты подбора оптимального соотношения загружаемого препарата в качестве модельной липидной смеси использовался состав №3 (60:39,5:0,5). При проведении эксперимента МОЛ с одинаковым липидным составом и содержанием загрузочного буфера подвергались загрузке различными количествами препарата.

Таблица 11 – Результаты подбора оптимального соотношения препарат : суммарные липиды.

№	Весовое соотношение препарат: липиды	Концентрация митоксантрона в дисперсии, мг/мл	Включение митоксантрона в липосомы, %
1	0,12 : 1	1	96,9±3
2	0,2 : 1	1,6	84,54±3
3	0,24 : 1	2	67,3±10

Согласно вышеописанным результатам, увеличение количества препарата, используемого при загрузке липосом, приводило к уменьшению значений включения, что свидетельствует о предельной загруженности препаратом. Наибольший процент включения был достигнут в весовом соотношении (препарат : суммарные липиды) 0,12 : 1. В дальнейшем данное весовое соотношение использовалось для приготовления липосомальных композиций и иммунолипосомальных композиций на их основе.

### 3.2 Количественное определение митоксантрона включенного в липосомы.

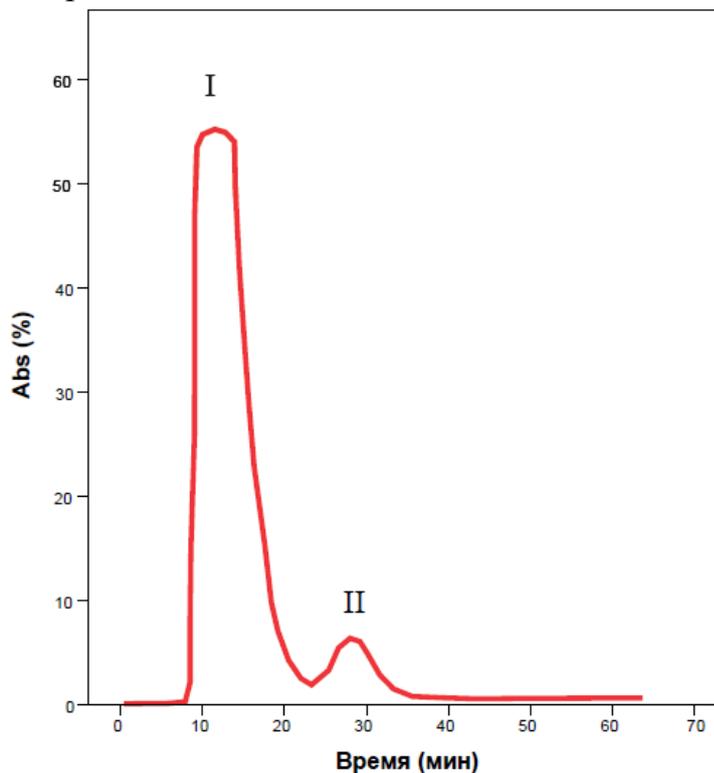
Для оценки эффективности загрузки количественное определение загруженного и «свободного» митоксантрона производилось в две стадии. На первой производилась очистка препарата методом гельфильтрации описанным в Главе 2. (пункт 2.3.6), и его разделение на две фракции (липосомальный митоксантрон и свободный препарат). После чего производилась оценка эффективности включения препарата путем определения общего содержания митоксантрона в исходной дисперсии и двух полученных фракциях. Спектрофотометрию производили согласно методике, описанной в Главе 2. (пункт 2.3.8) В 12 представлены результаты количественного определения митоксантрона, ошибка определения среднего результата не более  $1,0 \pm 0,05\%$  .

На Рисунке 18 представлен пример гельфильтрации липосомальной конструкции митоксантрона после подбора оптимальных условий загрузки. На рисунке видно два пика соответствующих первой фракции (липосомального митоксантрона) и второй фракции (незагруженный препарат).

Таблица 12 – Пример количественного определения липосомального митоксантрона в I фракции.

Серия препарата	Оптическая плотность, I фракция	Содержание Митоксантрона в Липосомах, мг/мл	Метрологические Характеристики	Эффективность включения, %	Метрологические характеристики
250614	0,5308	0,9615	$\bar{x}=0,9706$	96,69	$\bar{x}=96,9554$
	0,5357	0,9704	$S_2=0,0003$	97,25	$S_2=0,36634$
	0,5380	0,9746	$S_x=0,0055$	96,03	$S_x=0,6053$
	0,5384	0,9754	$S_{\bar{x}}=0,0025$	97,25	$S_{\bar{x}}=0,2707$
	0,5358	0,9706	$\Delta \bar{x}=0,0001$	97,56	$\Delta \bar{x}=0,7536$
			$\bar{\varepsilon}=0,0064$		$\bar{\varepsilon}=0,7773$
020514	0,5304	0,9607	$\bar{x}=0,9596$	96,08	$\bar{x}=95,9640$
	0,5316	0,9629	$S_2=0,0004$	96,30	$S_2=0,38632$
	0,5247	0,9504	$S_x=0,0062$	95,05	$S_x=0,6215$
	0,5337	0,9668	$S_{\bar{x}}=0,0028$	96,68	$S_{\bar{x}}=0,2780$
	0,5283	0,9571	$\Delta \bar{x}=0,0001$	95,71	$\Delta \bar{x}=0,7947$
			$\bar{\varepsilon}=0,0083$		$\bar{\varepsilon}=0,8281$

Рисунок 18 – Хроматограмма очистки липосомального митоксантрона от несвязавшихся МКА и препарата : I – фракция очищенных липосом с митоксантроном; II – Не загруженный митоксантрон.



### 3.3 Получение иммунолипосомальной конструкции митоксантрона

Для создания иммунолипосомальной конструкции митоксантрона использовались две модели липидного состава. Первая на основе яичного, вторая на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина. В обоих липидных составах часть ДСФЭ-ПЭГ-2000 частично заменялась на п-нитрофенилкарбонил-ПЭГ-3000-ФЭА (pNP-PEG-PE). Использование более длинных цепей PEG 3000 обусловлено противодействием экранирования антител цепями ДСФЭ-ПЭГ-2000. Использование для создания иммунолипосомальной конструкции митоксантрона pNP-PEG-PE также позволило производить одностадийное эффективное конъюгирование моноклональных антител. Конечный липидный состав иммунолипосомальных композиций представлен в Таблица 13 и Таблица 14. Загрузка препарата в липосомы производилась согласно методике указанной в Главе 2 (пункты 2.3.3, 2.3.4).

Таблица 13 – Молярный процент липидов, входящих в состав иммунолипосом на базе состава №3 и навески для приготовления МЛВ (расчет на 3мл).

	<b>Молек. Масса</b>	<b>Молярный %</b>	<b>Навески для приготовления МЛВ</b>
<b>S PC-3</b>	779,76	60	0,0935
<b>Холестерин</b>	386,7	39,5	0,0305
<b>DSPE-PEG2000</b>	2805,05	0,45	0,0025
<b>pNP-PEG3000-lipid</b>	3400	0,05	0,0003
			$\Sigma = 0,1269$

Таблица 14 – Молярный процент липидов, входящих в состав иммунолипосом состава №4 (яичный ФХ) и навески для приготовления МЛВ (расчет на 3мл).

	<b>Молек. Масса</b>	<b>Молярный %</b>	<b>Навески для приготовления МЛВ</b>
<b>E PC</b>	760,09	52,38	0,0796
<b>Холестерин</b>	386,7	42,86	0,0331
<b>DSPE-PEG2000</b>	2805,05	4,71	0,0264
<b>pNP-PEG3000-lipid</b>	3400	0,05	0,0003
			$\Sigma = 0,1395$

Измерение размера частиц в полученных иммунолипосомальных композициях производили методом динамического светорассеяния. Результаты данного исследования представлены на Рисунок 19 и Рисунок 20. Размер иммунолипосомальной конструкции по отношению к липосомальной конструкции изменился незначительно: на 4 нм для липосом из насыщенных липидов и на 2 нм для липосом на основе яичного фосфатидилхолина. Размер частиц при этом составил для иммунолипосомальной композиции на основе соевого фосфатидилхолина  $109 \pm 6$  нм, а для композиции на основе яичного фосфатидилхолина  $147 \pm 8$  нм.

Рисунок 19 – Распределение ИК Митоксантрона на основе соевого фосфатидилхолина по размерам, полученное на наносайзере Nicomp 380 Submicron Particle Sizer.

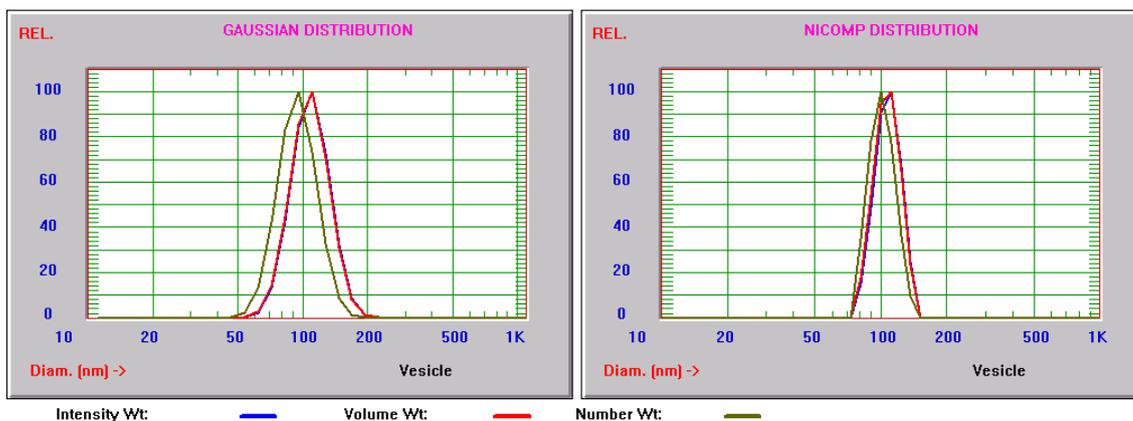
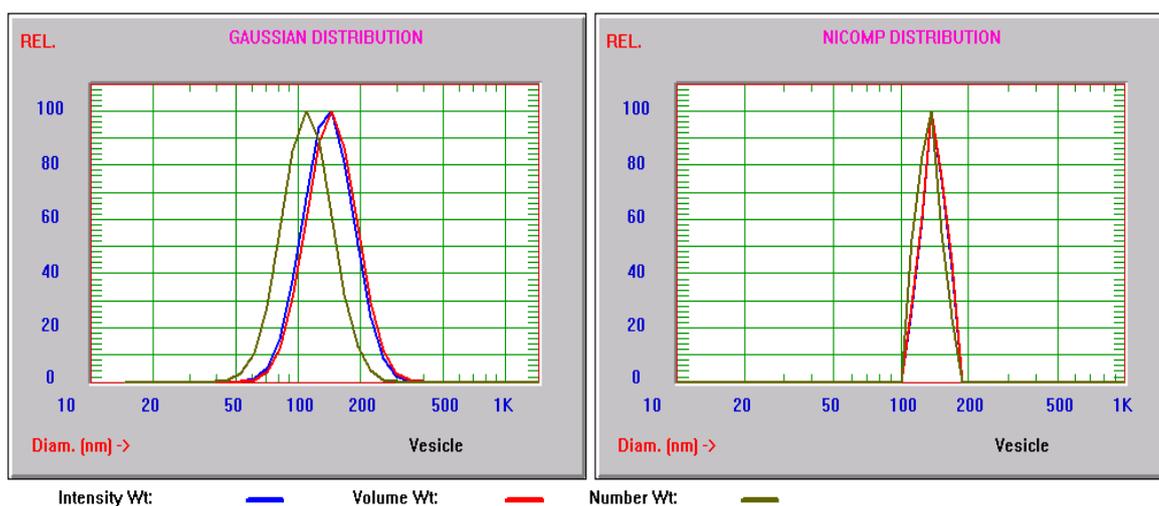


Рисунок 20 – Распределение ИК Митоксантрона на основе яичного фосфатидилхолина по размерам, полученное на наносайзере Nicomp 380 Submicron Particle Sizer.



### 3.3.1 Очистка иммунолипосомального митоксантрона

Очистка иммунолипосомальной конструкции митоксантрона от невключившегося препарата, несвязавшихся моноклональных антител проводилась методом гель – фильтрации. Контроль разделения осуществлялся с использованием спектрофотометрического детектора при длине волны 215 нм. Полученные фракции собирались в стерильные пробирки и подвергали дальнейшему спектрофотометрическому анализу.

Для более полного анализа разделения производилась гельфильтрация «пустых» иммунолипосом и липосом с загруженным митоксантроном. При

разделении «пустых» иммунолипосом по методике, описанной в Главе 2 (2.3.6) на выходе из хроматографической системы регистрировалось три пика, соответствующих чистой фракции иммунолипосом, не связавшимся МКА и загрузочному буферу. Рисунок 21. При анализе иммунолипосом, загруженных препаратом регистрировалось четыре пика: иммунолипосомы загруженные митоксантроном, не связавшиеся МКА, загрузочный буфер и фракция невключившегося митоксантрона. Рисунок 21. Наибольшую интенсивность светопоглощения показывали фракции, содержащие в себе, иммунолипосомы - их пики на хроматограмме были наиболее выраженными. Данный факт обусловлен их крупным молекулярным весом и оптическими свойствами липидов. Также стоит отметить, что ИЛКМ митоксантрона имеют самое малое время удерживания в связи с тем, что не взаимодействуют с сорбентом. Меньшую интенсивность светопоглощения показали фракции антител, митоксантрона, загрузочные буферы. Данные фракции также распределялись по времени удерживания в порядке уменьшения молекулярной массы частиц.

Рисунок 21 – Хроматограмма «пустых» ИЛ от несвязавшихся МКА : I – фракция очищенных ИЛКМ; II – МКА HER-2 neu; III – буфер HEPES с NaCl.

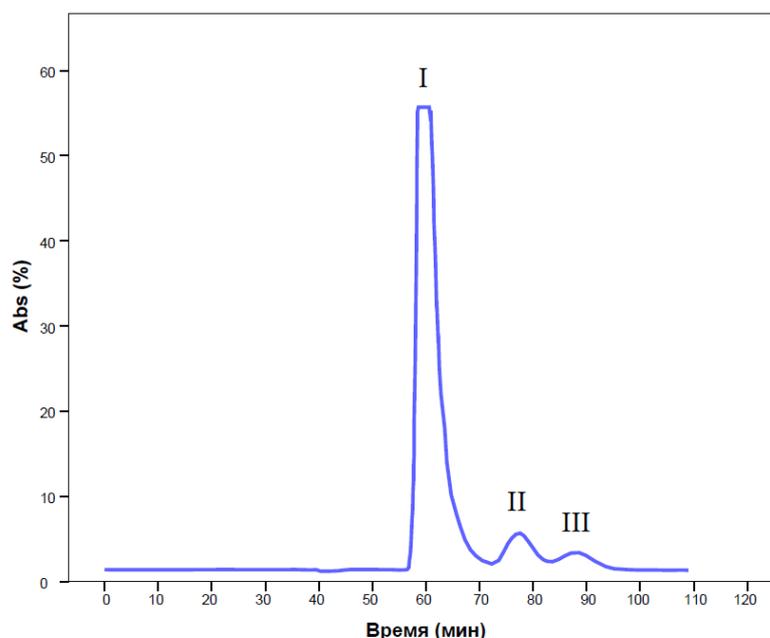
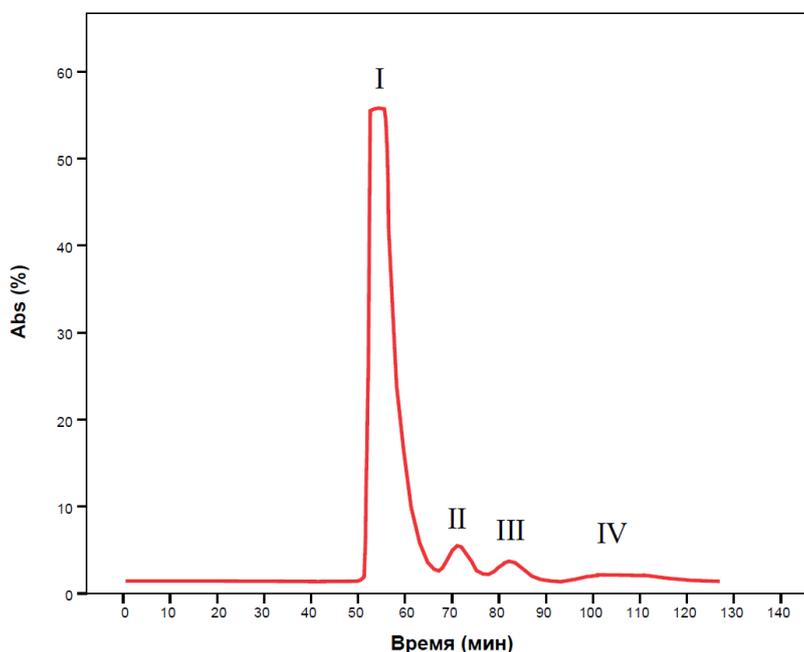


Рисунок 22 – Хроматограмма ИЛ митоксантрона от несвязавшихся МКА и препарата : I – фракция очищенных ИЛКМ; II – МКА HER-2 neu; III–.буфер HEPES с NaCl; IV – не включившийся митоксантрон.



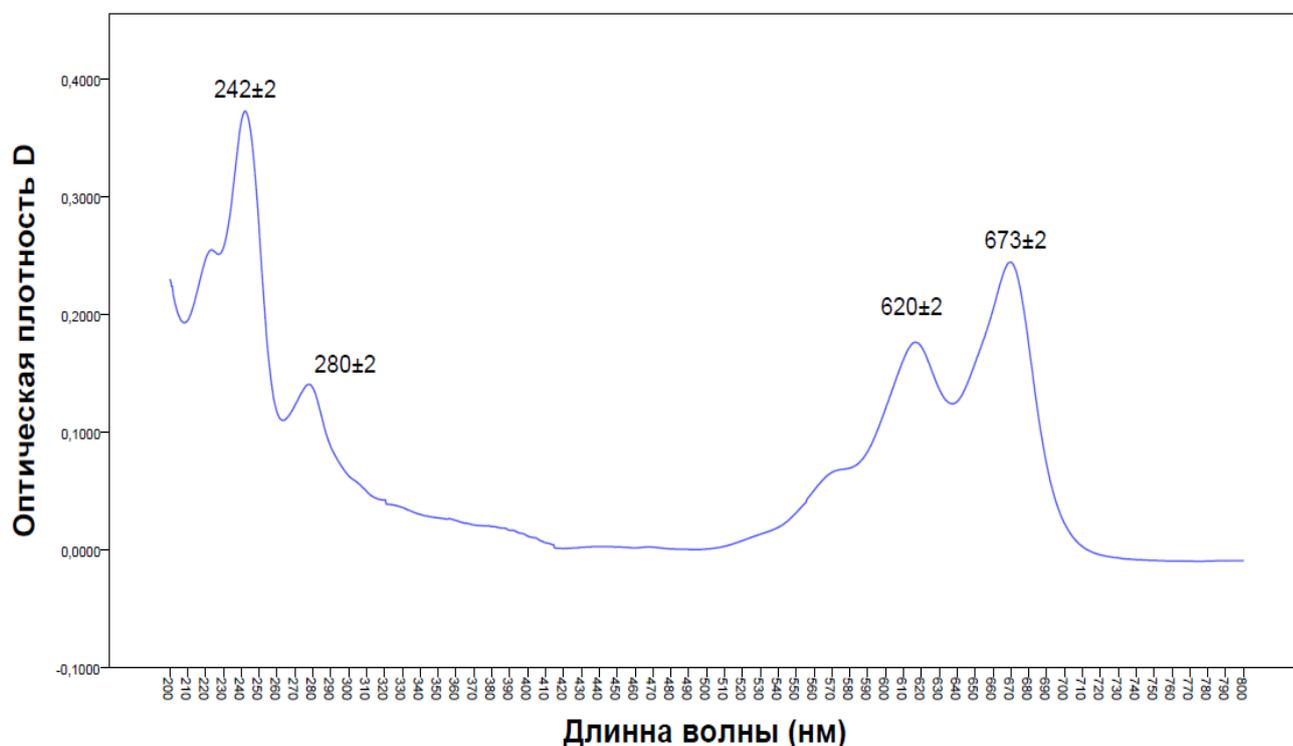
### **3.4 Спектрофотометрическое определение содержания митоксантрона в иммунолипосомальной конструкции**

#### **3.4.1 Определение влияния антител на спектрофотометрические характеристики иммунолипосомального митоксантрона.**

Методики спектрофотометрического определения митоксантрона изложены в Главе 2 (пункт 2.3.8). Для определения влияния липосомальной конструкции на спектры поглощения митоксантрона исследовались соответственно: спектры поглощения митоксантрона, иммунолипосом с загруженным препаратом и спектры поглощения липосом и иммунолипосом. В качестве растворителя в данных исследованиях использовали 95% этиловый спирт. Спектры поглощения измеряли в диапазоне длин волн от 200 до 800 нм в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм, относительно 95% этилового спирта. Максимумы поглощения митоксантрона полностью совпадали с описанными в литературе Глава 1.(пункт 1.3.1) и составляли  $242 \pm 2$  нм,  $280 \pm 2$  нм,  $620 \pm 2$  нм и  $673 \pm 2$  нм. На Рисунок 23 представлен спектр поглощения субстанции митоксантрона. По

результатам спектрофотометрического исследования в качестве аналитической выбрали длину волны, на которой пик митоксантрона был наиболее выраженным и узким. Такой пик был определен при длине волны  $242\pm 2$  нм.

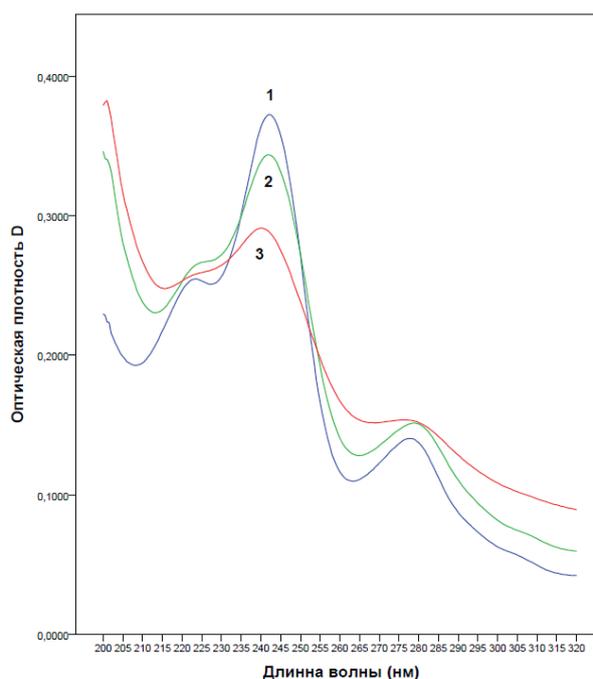
Рисунок 23 – Спектрофотометрия спиртового раствора субстанции митоксантрона.



Для определения влияния структуры липосом и иммунолипосом на количественное определение митоксантрона исследовались спектры субстанции митоксантрона, и митоксантрона загруженного в липосомальную и иммунолипосомальную форму. В ходе исследования было выявлено, что спектры поглощения растворов липосомальной и иммунолипосомальной форм митоксантрона были сходными по положению максимумов, интенсивности и форме кривой спектру чистой субстанции.

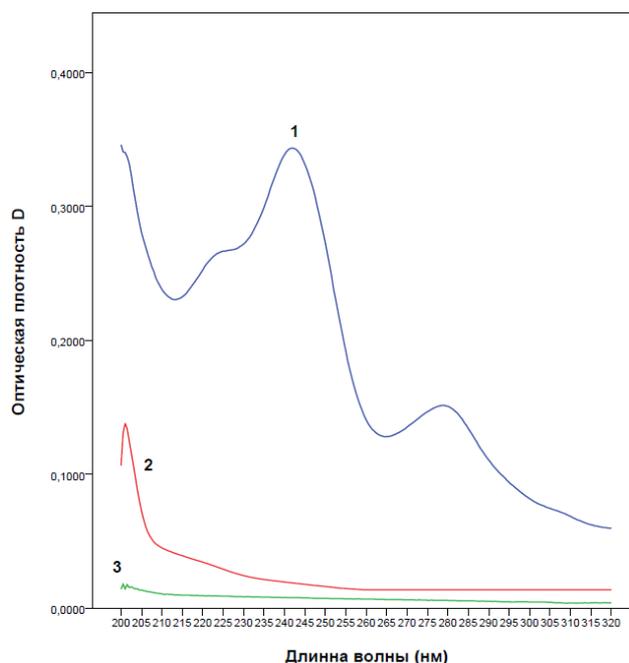
На Рисунке 24 представлены результаты измерения оптической плотности различных форм митоксантрона.

Рисунок 24 – Спектрофотометрия спиртового раствора: 1- Субстанции митоксантрона, 2- ЛЛФ, 3- HER-2-пеи-ИЛЛФ.



Для исследования влияния HER-2 пеи и пустых липосом на спектральные характеристики митоксантрона изучались спектры поглощения разбавленных в 20 раз растворов антител и липосом. Пример спектра поглощения раствора пустых иммунолипосом представлен на Рисунок 25.

Рисунок 25 – Спектрофотометрия пустых иммунолипосом: 1- HER-2-пеи-ИЛЛФ, 2- «пустые» ИЛФ, 3- 95% спирт.

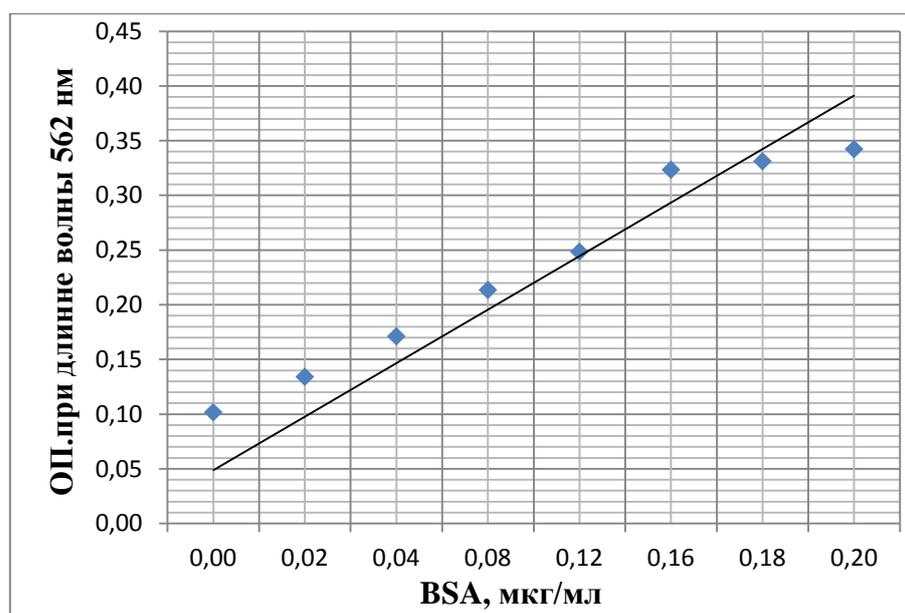


Было показано, что на спектры поглощения митоксантрона не влияют компоненты входящие в состав липосом, МКА в концентрациях, используемых при приготовлении иммунолипосом и загрузочные буферы. Максимум поглощения «пустых» липосом наблюдается при длине волны  $202\pm 2$  и не оказывает влияние на поглощение при аналитической длине волны  $242\pm 2$  нм в анализируемых концентрациях.

### 3.5 Определение количества моноклональных антител, связанных с поверхностью липосом

Определение количества белка, связанного с поверхностью липосом производили методом, описанным в Главе 2 (пункт). Однако определение белка на иммунолипосомальной конструкции митоксантрона было затруднено присутствием препарата, образующего комплексы с бицинхониновой кислотой. В связи с этим, определение количества белка связанного с липосомами производилось в препаратах пустых пегилированных иммунолипосом, очищенных от несвязавшихся МКА. По данным оптической плотности растворов стандартных образцов строилась калибровочная кривая, по которой определялось содержание белка в анализируемых образцах. Рисунок 26.

Рисунок 26 – Калибровочный график для определения белка с бицинхониновой кислотой.



Расчет количества антител на 1 липосому производился исходя из размера липосомальных частиц. Согласно данным, полученным в результате измерений размеров липосом, определялось количество молекул на одну липосому (Глава 2 пункт(2.3.10.) , затем рассчитывалось количество активных групп pNP-PEG3000-lipid на 1 липосому и соответствующее количеству антител, молекулярная масса МКА была известной и составляла 148 000 Да. Среднее количество белка во всей очищенной фракции иммунолипосомальных частиц составляло 0,080 мг. Количество антител на 1 липосому в среднем составило ~ 20. Таким образом, на липосомах было достигнуто необходимое количество антител для обеспечения их специфической доставки к клеткам-мишеням. Данное количество лигандов на липосому, согласно исследованиям иммунолипосомальных форм доксорубицина, является средним и обеспечивает наилучшее с точки зрения кардиотоксичности и безопасности действие *in vivo*[221].

### **3.6 Лиофилизация липосомального митоксантрона.**

Длительное хранение дисперсий липосом и ИЛЛФ в жидком виде осложняется дестабилизацией липидного бислоя, утечкой препарата из липосом, агрегацией липосом. Кроме того для ИЛЛФ важным фактором является сохранение антител в активном состоянии, которое легче поддерживается в условиях, когда препарат находится в замороженном состоянии и в отсутствие воды. Для продления срока хранения липосомальных и ИЛЛФ митоксантрона были произведены исследования лиофилизации полученной формы на основе соевого фосфатидилхолина.

Хранение липосом загруженных митоксантроном на основе яичного фосфатидилхолина хорошо исследовано в работе Хугаевой О.В[38,39]. В связи с этим, вопросы, связанные с разработкой методов лиофилизации липосомальной дисперсии были рассмотрены только для липосом на основе соевого фосфатидилхолина.

Для липосом и иммунолипосом на основе соевого фосфатидилхолина, соответствии с результатами, описанными в главе 3 и главе 4, в качестве рабочей

модели была избрана липосомальная форма состава №3. Её композиция изложена в Таблица 15. Для данного состава производился подбор технологии лиофилизации.

Таблица 15 – Состав липосомальной лекарственной формы митоксантрона на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина (Состав №3).

Липиды	Моль %	Мол. Вес, г/моль	Масса навески в граммах
S-PC3	60	779,76	0,0935
Холестерин	39,5	386,7	0,0305
DSPE – PEG–2000	0,5	2805,5	0,0028

Лиофилизация липосомальных лекарственных форм производилась с использованием сублимационной сушки GAMMA 1–16 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungs anlagen GmbH, Германия).

Лиофильная сушка растворов липосомальных частиц состояла из трех стадий:

1. Замораживание.
2. Основная сушка.
3. Досушивание.

При проведении процедуры лиофилизации лекарственная форма подвергается воздействию низких температур и низкого давления, что влияет на качества лекарственной формы, ее структуру и свойства. Лиофилизация липосом без использования защитных агентов (криопротекторов) приводит к изменениям в структуре наночастиц, агрегации и утечке препарата за пределы липидных везикул. Процент включения у лиофилизированных липосомальных форм зависит от липидного состава, процедуры заморозки и выбора криопротекторов, используемых в процессе.

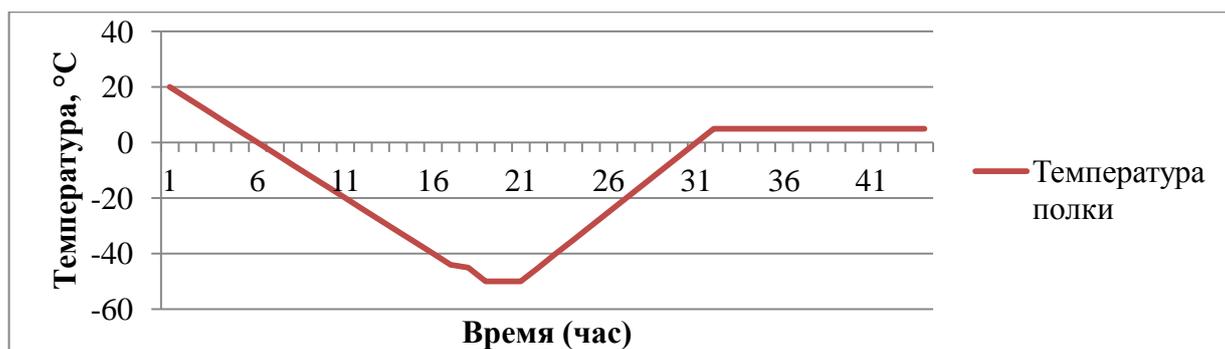
### **3.6.1 Подбор криопротекторов для липосомальной формы митоксантрона.**

При проведении лиофилизации и последующего ресуспендирования липосом липидный бислой проходит через два последовательных изменения своей структуры. Удаление воды в процессе лиофилизации приводит к увеличению расстояний между липидными молекулами и повышение общей температуры плавления, что влияет на утечку препарата в ходе ресуспендирования. Добавление криопротекторов в липосомальную форму позволяет избежать значительных потерь препарата благодаря уменьшению общей температуры фазового перехода липидной смеси. Также криопротекторы снижают ущерб причиняемый образованием ледяных кристаллов в ходе заморозки и ингибируют агрегацию липосом. Одной из самых эффективных групп криопротекторов, применяемых в настоящее время являются дисахариды (сахароза, мальтоза, трегалоза). Дисахариды являются природными криопротекторами и встречаются у ряда организмов, переживающих осмотический стресс или серьезную дегидратацию длительные периоды времени (эффект «ангидробиоза»). Дисахариды эффективно защищают целостность мембраны и предотвращают утечку препарата благодаря относительно высокой температуре стеклования, что делает их предпочтительными криопротекторами во время лиофилизации липосом [82,167]. Наиболее распространенными дисахаридами, используемыми в процессе лиофилизации, являются сахароза и лактоза.

В процессе сублимационной сушки изучалось воздействие криопротекторов сахарозы (2,4,6,8,10 %) и лактозы (2,4,6,8,10 %) на утечку препарата из липосом и размер частиц лиофилизатов после гидратации. Процесс заморозки производился методами, описанными в пункте 3.6.2. Основная сушка производилась после достижения препаратом температуры от  $-40$  до  $-45^{\circ}\text{C}$  и выдерживания его в течение 12ч при данной температуре, далее температуру полок понижали до  $-50^{\circ}\text{C}$  при минимальном давлении в камере  $(4,0-6,0) \times 10^{-2}$  мБар в течение 1 часа,

затем температуру полок повышали до температуры  $+5^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ . После достижения температуры  $+5^{\circ}\text{C}$  (при давлении  $4,0 \times 10^{-2}$  мБар) производилась финальная сушка. Препарат выдерживали при этой температуре в течение 12 ч. Суммарное время лиофилизации (без процедуры заморозки) составляло 23 ч. Диаграмма процесса представлена на 27.

Рисунок 27 – Диаграмма температурного режима лиофилизации.



По окончании процесса сушки вакуум в сублимационной камере снижали чистым стерильным воздухом, пропущенным через фильтр с размером пор 0,22мкм. Флаконы с готовым препаратом укупоривали резиновыми пробками и предварительно проанализировав, помещали в морозильную камеру при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ . Анализ характеристик лиофилизированного липосомального митоксантрона производился после добавления 2 мл деионизированной воды. Результаты анализа лиофилизатов представлены в Таблица 16. Согласно данным, полученным в результате анализа лиофилизированных липосомальных частиц, наиболее оптимально проявили себя составы с криопротектором Сахарозой 10 % и Лактозой 4 %. Данные составы показали наибольший процент включения препарата после лиофилизации. Лيوфилизат при данных концентрациях криопротектора представлял собой сухую пористую массу синего цвета. При этом использование лактозы в качестве криопротектора затрудняло количественное определение включенного в лиофилизат препарата в связи с ее низкой растворимостью в спиртовых растворах. Исходя из этого, оптимальным криопротектором для липосомальной конструкции и иммунолипосомальной конструкции митоксантрона на основе соевого фосфатидилхолина был выбран

раствор сахарозы 10%. Дальнейшее изучение стабильности при хранении и характеристик частиц производилось с его использованием.

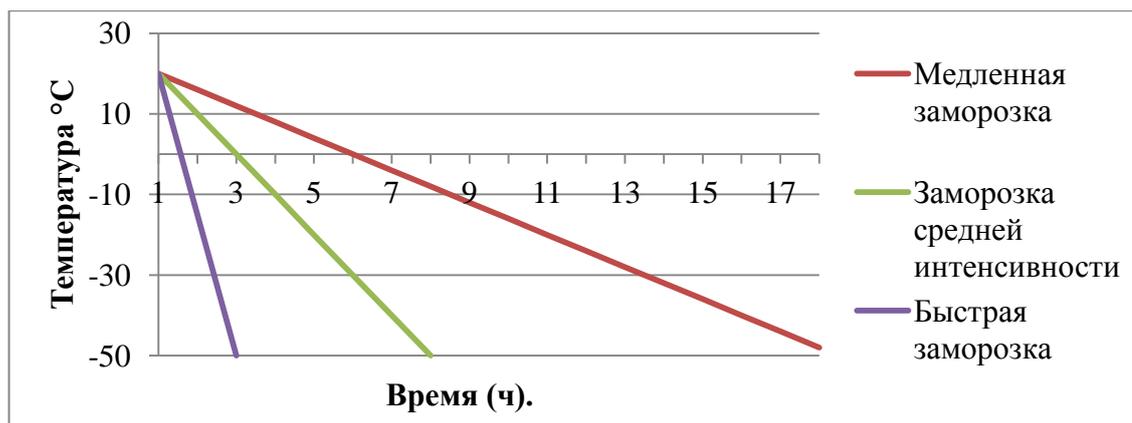
Таблица 16 – Эффективность включения митоксантрона в лиофилизированных липосомах.

Криопротектор	Содержание криопротектора, %	Содержание лиофилизированного Мит. в липосомах, %	Содержание лиофилизированного Мит. в липосомах, мг/мл
Сахароза	2	43,3±3	0,43±0,03
	4	57,2±2	0,57±0,02
	6	68,1±2	0,68±0,02
	8	72,4±3	0,72±0,03
	<b>10</b>	<b>79,8±4</b>	<b>0,79±0,04</b>
Лактоза	2	42,8±3	0,42±0,03
	<b>4</b>	<b>78,4±4</b>	<b>0,78±0,04</b>
	6	68,2±4	0,68±0,04
	8	62,1±3	0,62±0,03
	10	59,9±2	0,59±0,02

### 3.6.2 Изучение влияния способов замораживания.

Важную роль в процессе лиофилизации играет процесс заморозки липосомальных везикул, так как он определяет структуру кристаллов, а соответственно время сублимации и качество полученного лиофилизата. Для анализа способов заморозки партию липосомального митоксантрона подвергли заморозке различными способами и дальнейшей лиофилизации. Изучалось 3 варианта заморозки везикул: быстрое замораживание (в парах жидкого азота), медленное в камере лиофильной сушки 4°С/ч и средней интенсивности 10°С/ч. Диаграммы заморозки представлены на Рисунок 28.

Рисунок 28 – Различные варианты заморозки липосомальной дисперсии.



Для анализа влияния замораживания на структуру липосомальной дисперсии и процесс лиофилизации исследовались такие параметры как размер и загрузка препарата в липосомы. Результаты данных исследований представлены в Рисунок 29 и Рисунок 30.

Рисунок 29 – Включение препарата в ЛЛФ после лиофилизации с использованием различных способов замораживания.

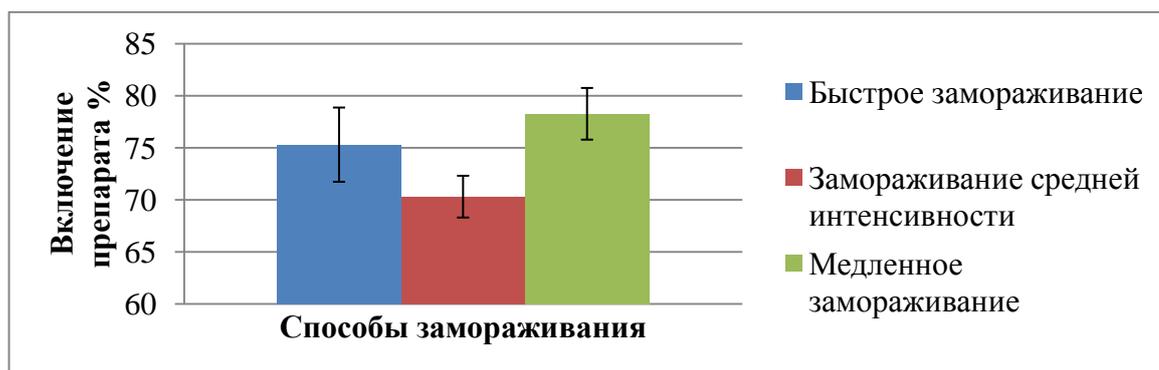
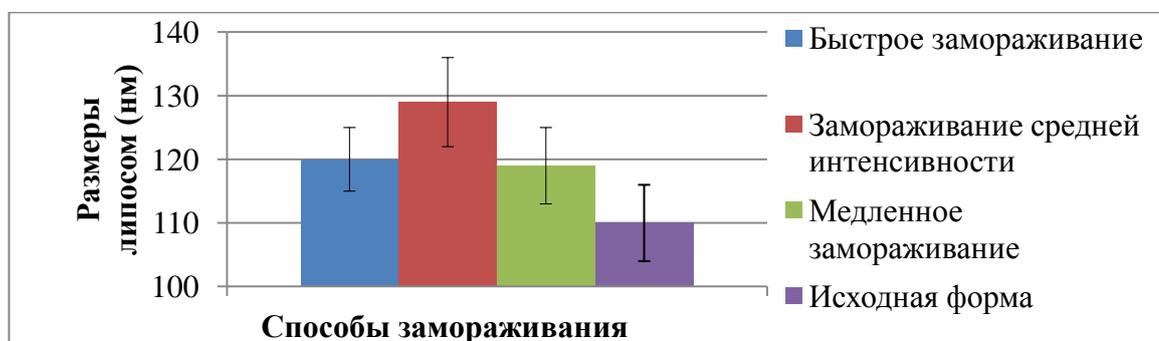


Рисунок 30 – Размер везикул ЛЛФ после лиофилизации с использованием различных способов замораживания.

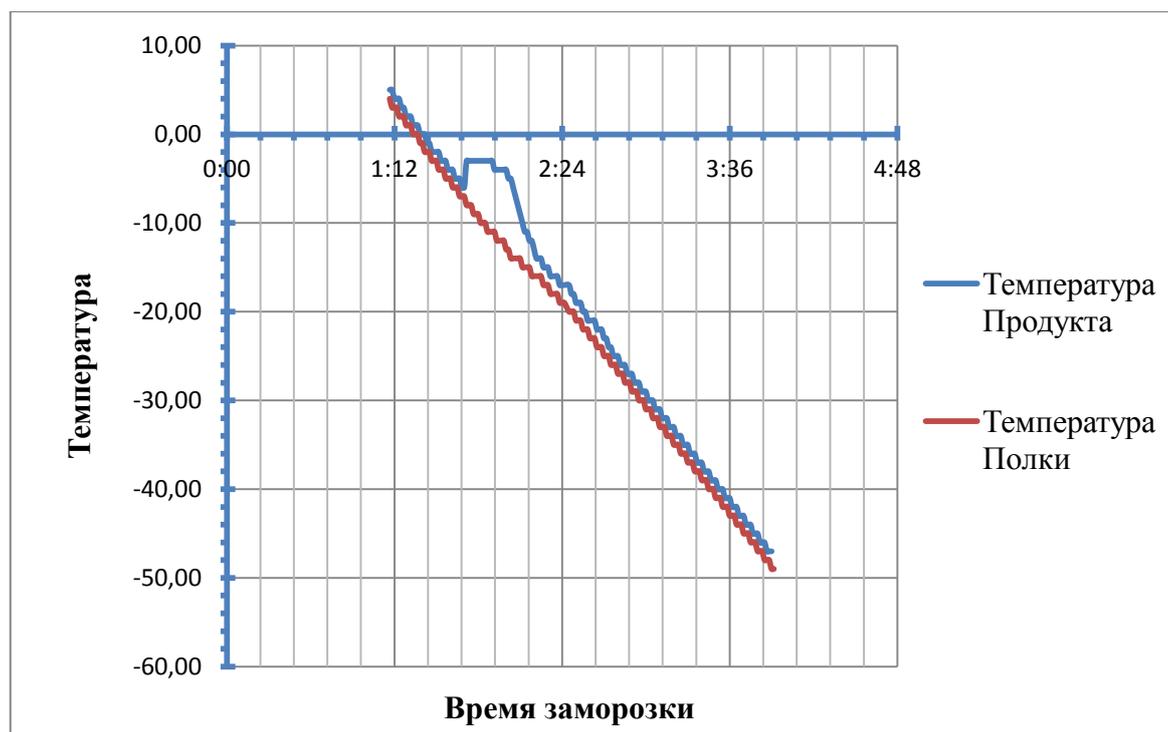


Согласно данным видно, что размеры ЛЛФ при различных способах заморозки незначительно отличались, наименьшие изменения размеров показали

как ЛЛФ при медленной, так и при быстрой заморозке. Включение препарата в липосомы так же незначительно различалось при различных способах заморозки ЛЛФ. Однако при использовании медленного способа замораживания процент включения в полученном лиофилизате был незначительно выше. Так как при медленном замораживании удалось достичь относительно более высоких результатов по загрузке и относительно меньшего изменения размеров частиц, в дальнейших исследованиях использовалось медленное замораживание ЛЛФ перед лиофилизацией.

В процессе заморозки производились замеры температуры, для определения температуры заморозки для раствора ЛЛФ Рисунок 31 . Средняя эвтектическая температура для раствора липосомальной дисперсии с 10% содержанием криопротектора (сахарозы) составила  $10 \pm 3^\circ\text{C}$ .

Рисунок 31 – График заморозки липосомальной дисперсии митоксантрона, криопротектор 10 % сахара.



### 3.6.3 Изучение влияния процесса сублимации на размер частиц.

Изучение влияния лиофилизации на размер частиц липосомального митоксантрона производился после растворения препаратов в 2 мл

деионизированной воды. Исследования показали, что размер частиц после лиофилизации незначительно увеличивался в пределах 9–12 нм в зависимости от серии препарата. Результаты измерения диаметров частиц различных партий представлены в Таблица 17.

Таблица 17 – Изучение влияния лиофилизации на размер везикул.

Серия препарата	Препарат	Диаметр Липосомальных наночастиц (нм)
020315	До лиофилизации	106±7
	После лиофилизации	118±5
100315	До лиофилизации	110±8
	После лиофилизации	119±6
160315	До лиофилизации	109±5
	После лиофилизации	121±7

### 3.6.4 Влияние продолжительности хранения на характеристики липосомального митоксантрона.

В ходе исследования в течение 6 месяцев производилось изучение влияния продолжительности хранения на загрузку препарата в липосомы. Средний процент включения препарата после лиофилизации составлял для трех исследуемых партий препарата  $78,57 \pm 0,69$  % , средняя утечка препарата при лиофилизации составила  $18,12 \pm 1$  % , а утечка в процессе хранения в течение шести месяцев в морозильной камере при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$  составила не более 1%

Таблица

18.

Таблица 18 Количественное определение Митоксантрона в лиофилизированных партиях

Партия препарата	020315			100315			160315		
	0	3	6	0	3	6	0	3	6
Срок хранения, месяцев									
Оптическая плотность, Iфр	0,5558 0,5530 0,5548 0,5564 0,5520	0,4128 0,4156 0,4174 0,4146 0,4136	0,4159 0,4127 0,4163 0,4136 0,4130	0,5635 0,5590 0,5628 0,5600 0,5545	0,4084 0,4057 0,4083 0,4115 0,4068	0,4089 0,4034 0,4097 0,4065 0,4049	0,5546 0,5560 0,5545 0,5592 0,5581	0,4113 0,4083 0,4109 0,4078 0,4075	0,4107 0,4097 0,4072 0,4070 0,4060
Содержание Митоксантрона в Липосомах, мг	0,9716 0,9667 0,9698 0,9727 0,9649	0,7908 0,7962 0,7996 0,7942 0,7923	0,7966 0,7906 0,7974 0,7923 0,7911	0,9682 0,9604 0,9669 0,9621 0,9526	0,7824 0,7772 0,7822 0,7883 0,7793	0,7834 0,7728 0,7848 0,7787 0,7758	0,9695 0,9719 0,9694 0,9775 0,9756	0,7879 0,7822 0,7872 0,7812 0,7806	0,7868 0,7848 0,7801 0,7797 0,7778
Метрологические характеристики	0,9691 0,00001 0,0033 0,0015 0,000022 0,0023%	0,7946 0,00001 0,0034 0,0015 0,000024 0,0031%	0,7937 0,00001 0,0032 0,0014 0,000021 0,0026%	0,9620 0,00003 0,0062 0,0028 0,000079 0,0082%	0,7819 0,00001 0,0042 0,0019 0,000036 0,0046%	0,7791 0,00002 0,0051 0,0023 0,000053 0,0067%	0,9728 0,00001 0,0036 0,0016 0,000027 0,0028%	0,7838 0,00001 0,0035 0,0015 0,000025 0,0031%	0,7819 0,00001 0,0038 0,0017 0,000029 0,0038%
Эффективность включения, %	97,16 96,68 96,99 97,27 96,50	79,09 79,62 79,97 79,42 79,23	79,67 79,07 79,75 79,24 79,12	96,82 96,05 96,69 96,21 95,27	78,24 77,72 78,22 78,83 77,93	78,34 78,28 78,48 77,87 77,58	96,96 97,20 96,94 97,76 97,56	78,79 78,22 78,72 78,12 78,06	78,68 78,48 78,02 77,97 77,79
Метрологические характеристики	96,91 0,1056 0,3251 0,1454 0,2174 0,2243%	79,46 0,1188 0,3448 0,1542 0,2445 0,3078%	79,36 0,1007 0,3174 0,1419 0,2071 0,2610%	96,20 0,37935 0,6159 0,2754 0,7804 0,8112%	78,18 0,1730 0,4159 0,1860 0,3559 0,4552%	77,90 0,2553 0,5053 0,2260 0,5253 0,6743%	97,28 0,13367 0,3656 0,1635 0,2750 0,2827%	78,38 0,1196 0,3460 0,1547 0,2462 0,3141%	78,18 0,1430 0,3782 0,1691 0,2942 0,3763%

### 3.7 Заключение

Получено 3 модели липосомальной формы митоксантрона на основе соевого фосфатидилхолина и 1 модель на основе яичного фосфатидилхолина

Исследование среднего диаметра МЛВ на приборе Submicron Particle Sizer NICOMP 380, показало влияние различных липидных составов на размер полученных липосом. Наиболее оптимальные результаты были достигнуты для составов №3 и №4,  $479 \pm 58$  и  $421 \pm 79$  соответственно.

Отработана методика получения МОЛ на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина методом экструзии при температуре  $55^\circ\text{C}$ .

При анализе размеров полученных дисперсий МОЛ получены следующие данные: Для составов на основе S PC-3: №1( $101 \pm 5$  нм), №2( $117 \pm 8$  нм), №3( $105 \pm 6$  нм) и E-PC №4( $145 \pm 7$  нм).

Показано что состав МЛВ влияет на размеры дисперсии МОЛ после экструзии.

Подобраны оптимальные условия загрузки для дисперсий МОЛ на основе соевого фосфатидилхолина. (1,5 при температуре  $45^\circ\text{C}$  и 12ч при температуре  $4^\circ\text{C}$ )

Показано, что состав липидной композиции влияет на загрузку МОЛ на основе соевого фосфатидилхолина субстанцией митоксантрона модифицированным методом. Количество включенного в липосомы митоксантрона составляло для композиций на основе соевого фосфатидилхолина №1и №2, 85,6% и 94,9% соответственно, для композиции №3 96,9%.

Согласно данным, полученным при исследовании липосомальных композиций на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина, оптимальным составом для получения МОЛ стал состав № 3 с соответствующими мольными соотношениями в моль% (60:39,5:0,5).

Для композиции №3 на основе соевого фосфатидилхолина оптимальное массовое соотношение митоксантрона к липиду составило 0,12:1. Было выявлено,

что дальнейшее увеличение количества включаемого препарата вызывает снижение процента включения митоксантрона.

Разработана технология получения иммунолипосомальных конструкций митоксантрона с МКА против HER-2 neu. Для получения иммунолипосом использовали насыщенный соевый фосфатидилхолин (S PC-3), яичный фосфатидилхолин (E-PC), холестерин, mPEG<sub>2000</sub>-DSPE и pNP-PEG<sub>3000</sub>-lipid. Для создания иммунолипосомальных конструкций использовались следующие композиции липидов в моль% S PC-3: Холестерин: DSPE – PEG-2000: pNP-PEG3000-lipid (60:39,5:0,45:0,05), E PC: Холестерин: DSPE – PEG-2000: pNP-PEG3000-lipid (52,38:42,86:4,71:0,05). Загрузку композиций производили с использованием градиента сульфата аммония. Степень включения препарата в липосомы составила  $\approx 96,9\%$  и  $\approx 94,1\%$  для S PC-3 ИЛКМ и E PC ИЛКМ соответственно. Среднее количество молекул антител на 1 липосому составило  $\sim 20$ .

При спектрофотометрических исследованиях было выявлено, что вспомогательные вещества из состава иммунолипосом на основе соевого фосфатидилхолина и МКА не создавали существенных помех для количественного определения препарата в иммунолипосомах при аналитической длине волны  $242 \pm 2$  нм.

Отработана методика лиофильной сушки липосомальной конструкции митоксантрона на основе соевого фосфатидилхолина. Оптимальным криопротектором для липосомальной конструкции и иммунолипосомальной конструкции митоксантрона на основе соевого фосфатидилхолина был выбран раствор сахарозы 10%.

Были исследованы различные методы заморозки липосомальной дисперсии. При различных способах замораживания размеры липосомальных частиц практически не отличались, также различные способы заморозки не оказали значительного влияния на утечку препарата из липосом. Однако способ медленной заморозки показал незначительно более высокие показатели по

размерам частиц и проценту включения препарата в ресуспендированных липосомах.

Средняя эвтектическая температура для раствора липосомальной дисперсии составила –  $10\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Изучение влияния процесса сублимационной сушки на геометрические характеристики частиц показало, что размер частиц после лиофилизации незначительно увеличивался в пределах 9–12 нм в зависимости от серии препарата.

Анализ эффективности инкапсулирования митоксантрона в липосомы показал, что содержание митоксантрона в ресуспендируемых везикулах не менялось и составило ~ 77-79 % на протяжении шести месяцев хранения лиофилизированной липосомальной дисперсии в морозильной камере при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ . При этом средняя утечка при лиофилизации составила  $18,12\pm 1\%$ , а утечка препарата в процессе хранения составила не более 1%.

## **ГЛАВА 4. Исследование липосомальной и иммунолипосомальной лекарственной формы препарата *in vitro***

Цитотоксическую активность липосомальной и иммунолипосомальной формы митоксантрона двух липидных составов: на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина и на основе яичного фосфатидилхолина, оценивали с помощью МТТ – теста на линии клеток SK–BR–3. Составы липосомальной и иммунолипосомальной формы митоксантрона описаны в Главе 3 (пункты 3.1. и 3.3.).

### **4.1 Исследование цитотоксической активности липосомальной формы митоксантрона на клетках мишенях.**

Цитотоксическую активность липосомальной лекарственной формы митоксантрона в исследованиях *in vitro* оценивали двумя методами: с отмывкой после инкубации при 4 °С в течение часа и без отмывки. Отмывка производилась с целью определения специфического действия и биодоступности частиц, таким образом в среде оставались только компоненты, успевшие провзаимодействовать с клетками-мишенями в период первичной часовой инкубации. В эксперименте изучалась активность субстанции митоксантрона, и липосомальных форм митоксантрона различного состава при концентрациях 6,25, 12,5, 25, 50 и 100 мкг/мл. Гибель клеток определялась после инкубации в течение 48 ч. Результаты опытов представлены на Рисунке 32 и Рисунке 33.

Рисунок 32 – Цитотоксический эффект липосомальных форм митоксантрона и субстанции на клетках SK-BR-3, время инкубации 48 ч.

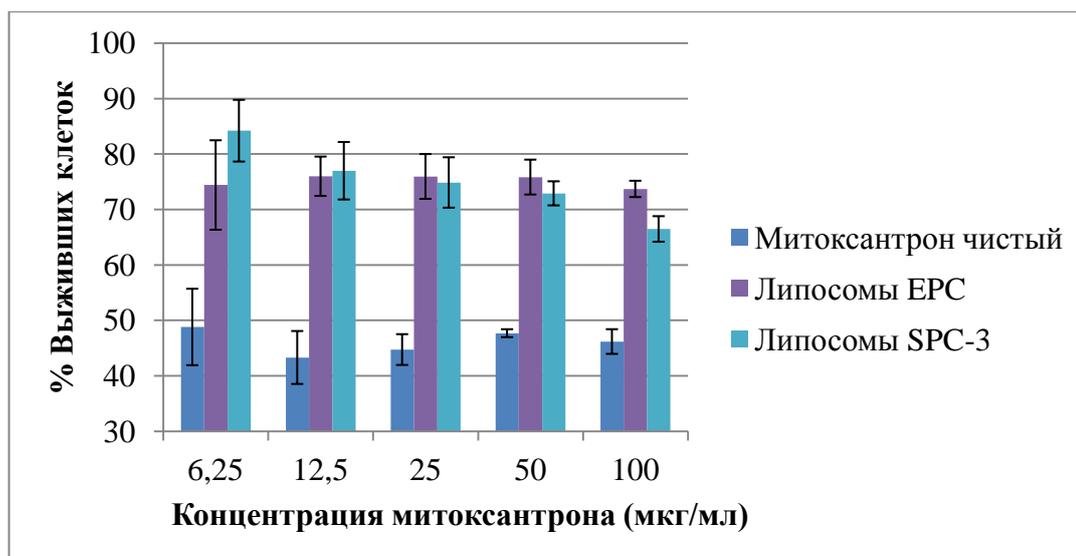
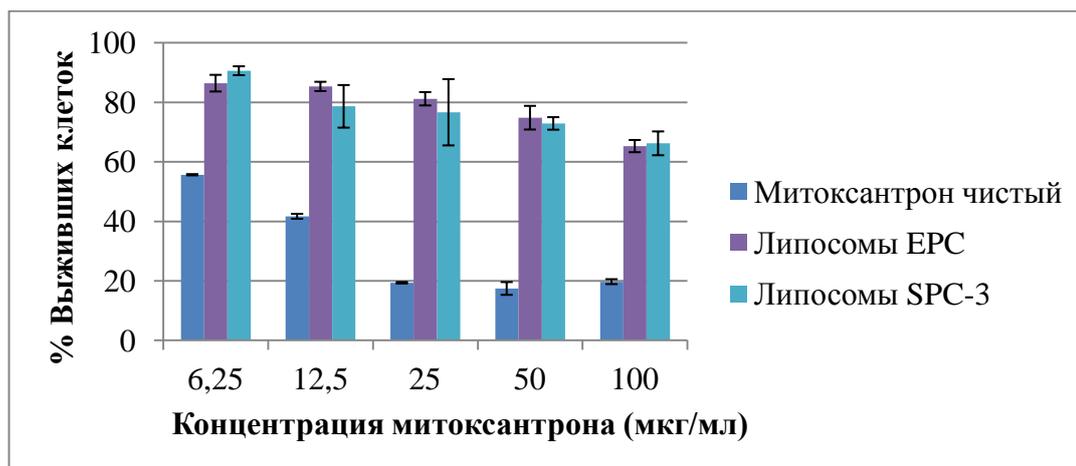


Рисунок 33 – Цитотоксический эффект липосомальных форм митоксантрона и субстанции на клетках SK-BR-3, инкубация 1ч 4°C, отмывка, время инкубации 48 ч.



Из данных, приведенных выше следует, что липосомальные лекарственные формы проявляют меньшую цитотоксичность, чем раствор субстанции в соответствующих концентрациях в среднем на 30 – 40%. Данный факт прежде всего связан с более медленным проникновением липосомальных препаратов в клетку по причине их стерической стабилизации. Свободно растворенный в среде митоксантрон быстрее захватывается клетками мишенями и оказывает на них свое цитотоксическое действие. В то же время, липосомальные лекарственные формы на основе E PC и S PC-3 не имеют между собой значимых различий цитотоксичности на клетках линии SK-BR-3 при инкубировании с отмывкой, что

говорит о их эквивалентной биодоступности для клетки-мишени. Однако стоит отметить, что при инкубации в малых концентрациях (6,25 мкг/мл) без проведения отмывки липосомы на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина показали большую цитотоксичность в сравнении с липосомами на основе яичного фосфатидилхолина в среднем на 10%.

#### **4.2 Оценка влияния пустых иммунолипосомальных и липосомальных конструкций на цитотоксичность.**

Для оценки влияния антител, закрепленных на поверхности липосом и липосомальной структуры на цитотоксичность, производилась оценка цитотоксичности пустых липосом и иммунолипосом в различных разведениях. В качестве образца для исследования, были использованы иммунолипосомы и липосомы на основе яичного и насыщенного соевого фосфатидилхолина. Опыт производился при условиях, сходных с описанными в пункте 4.1. Данный опыт производился также с целью исключить влияние цитотоксичности антител и компонентов липосомальной структуры на результаты исследований цитотоксичности при концентрациях менее 100 мкг/мл. Результаты исследования представлены на Рисунке 34 и Рисунке 35. Согласно приведенным данным, иммунолипосомальная форма отличается по цитотоксичности, однако антитела не оказывают существенного влияния на цитотоксичность в концентрациях ниже разбавления в 4 раза, соответствующего концентрации препарата 250 мг/мл. Цитотоксичность антител при разведении 1/8 (125 мг/мл) составляет в среднем около 10%. Из чего следует, что липосомальная и иммунолипосомальная композиция не оказывает значимого влияния на цитотоксичность в микрограммовых концентрациях.

Рисунок 34 – Цитотоксический эффект пустой липосомальной и иммунолипосомальной формы на клетках SK-BR-3, 48 ч. инкубация.ч. инкубация.

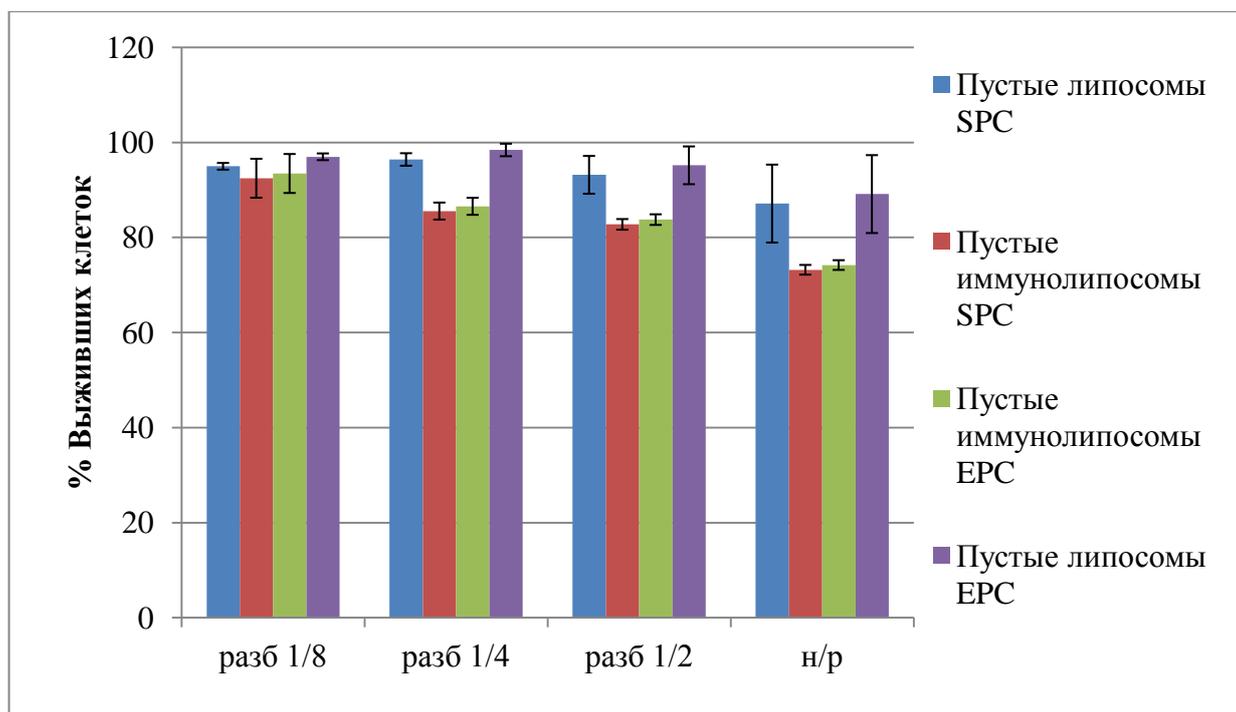
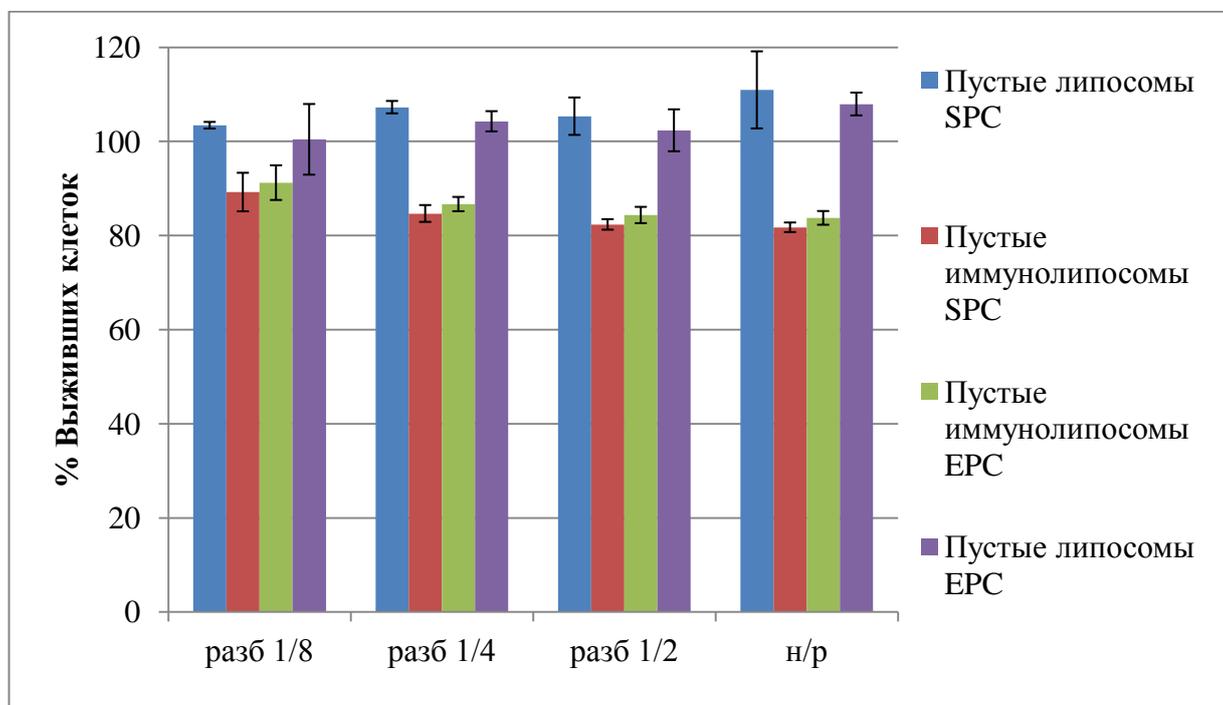


Рисунок 35 – Цитотоксический эффект пустой липосомальной и иммунолипосомальной формы на клетках SK-BR-3, инкубация 1ч 4°C, отмывка, время инкубации 48 ч.



### **4.3 Исследование цитотоксической активности иммунолипосомальной формы митоксантрона на клетках мишенях.**

Исследование цитотоксической активности производилось в условиях, сходных, с описанными в пункте 4.1. Цитотоксический эффект оценивали на клетках линии SK-BR-3, имеющих рецепторы к антителам HER-2 neu. Результаты представлены на Рисунке 36, Рисунке 37 и Рисунке 38. Из приведенных данных следует, что иммунолипосомальные формы обладают значительно меньшей (в среднем на 38%) цитотоксичностью, чем субстанция митоксантрона. Данные результаты соотносятся с результатами исследования цитотоксичности, полученными для HER-2 иммунолипосомального доксорубина на клеточной линии SK-BR-3, где цитотоксичность липосом и иммунолипосом была значительно ниже цитотоксичности свободного препарата[221]. Кроме того, липосомальные и иммунолипосомальные конструкции не имеют существенных различий при проведении МТТ теста без отмывки, однако при отмывке после инкубации на холоду цитотоксичность иммунолипосомальных форм выше на 10 %. Данный факт связан, прежде всего, с тем, что специфичные иммунолипосомы в отличие от липосом способны реагировать с поверхностными антигенами клеток – мишеней и оказывать цитотоксический эффект. Также было показано, что иммунолипосомальная лекарственная форма на основе соевого фосфатидилхолина обладает большей цитотоксичностью по отношению к клеткам мишеням, чем липосомальные формы. Рисунок 38. Общий прирост цитотоксичности по отношению к обычным липосомам составляет в среднем около 20%. В свою очередь, иммунолипосомы на основе яичного фосфатидилхолина не проявили подобного эффекта. Для иммунолипосомальной лекарственной формы на основе соевого фосфатидилхолина было определено значение ингибирующей концентрации  $IK_{50}=75$  мкг/мл. Также данный показатель был определен для субстанции митоксантрона  $IK_{50}=7,6$  мкг/мл.

Рисунок 36 – Цитотоксический эффект иммунолипосомальных форм митоксантрона и субстанции на клетках SK-BR-3, время инкубации 48 ч.

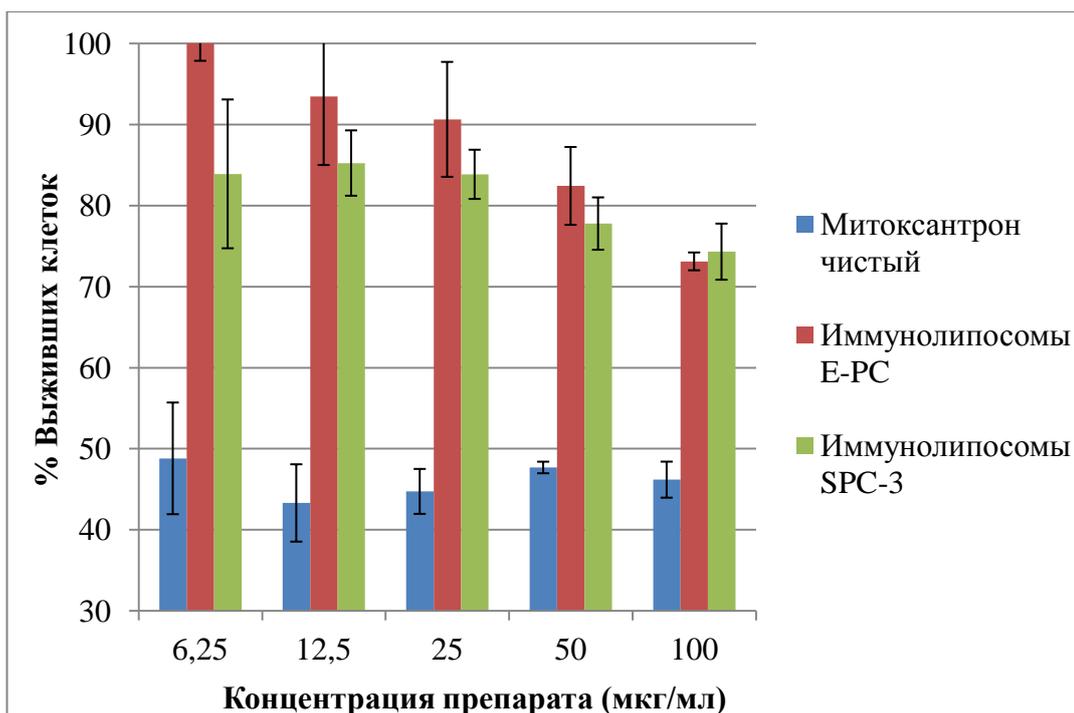


Рисунок 37 – Цитотоксический эффект иммунолипосомальных форм митоксантрона и субстанции на клетках SK-BR-3, инкубация 1ч 4°C, отмывка, время инкубации 48 ч.

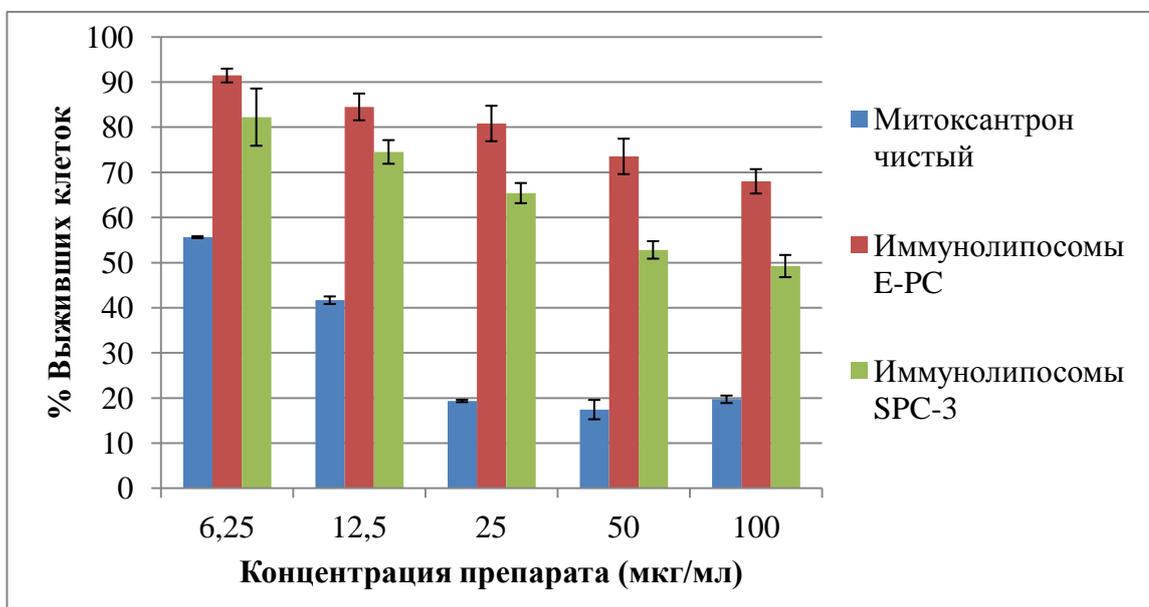
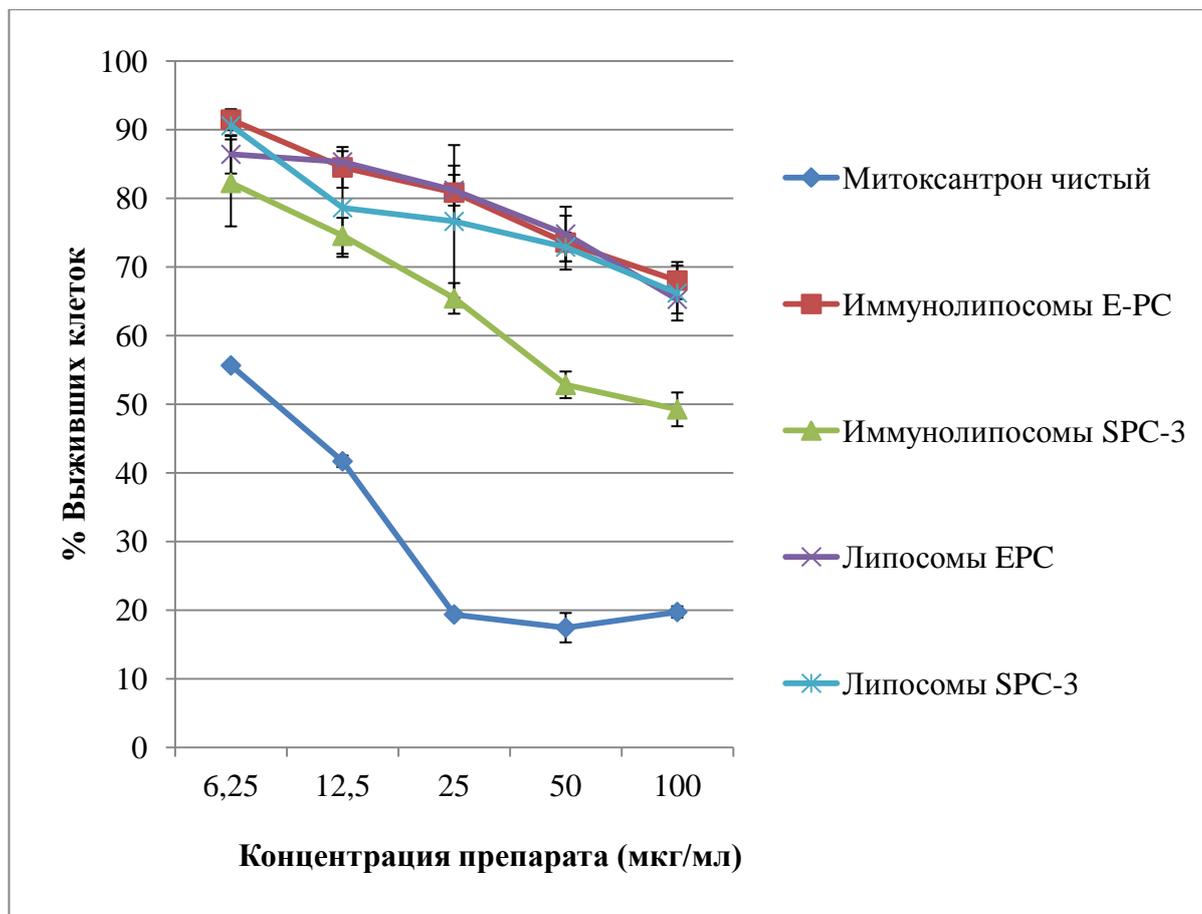


Рисунок 38 – Цитотоксический эффект иммунолипосомальных форм митоксантрона, липосомальных форм и субстанции на клетках SK–BR–3, инкубация 1ч 4°С, отмывка, время инкубации 48 ч.



Оценка способности к связыванию полученных иммунолипосом производлась с помощью непрямой реакции поверхностной иммуофлюоресценции. В качестве клеток–мишеней использовались клетки линии SK–BR–3. Подробное описание метода содержится в Главе 2 (пункты 2.3.13). С помощью МКА к HER–2 пептиду было выявлено 96,7% связывание используемых антител с клетками – мишенями Рисунок 39. В качестве контроля использовались неокрашенные клетки и клетки, инкубированные с липосомальной формой митоксантрона Рисунок 40. При инкубировании клеток SK–BR–3 с иммунолипосомальной конструкцией митоксантрона наблюдалось связывание с 95,3% клеток, что свидетельствует о высокой специфичности полученной ИЛЛФ по отношению к клеткам – мишеням Рисунок 41.

Рисунок 39 – Анализ специфического связывания HER-2 neu с клетками SK-BR-3 методом проточной цитофлуориметрии (антитела в разведении 1:500).

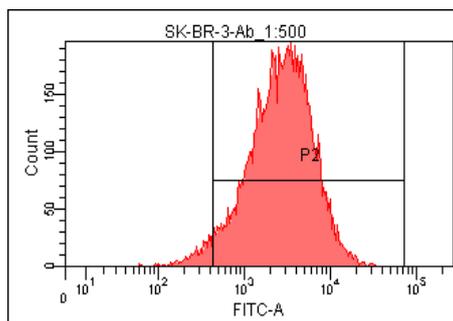


Рисунок 40 – Контроль анализа специфического связывания HER-2 neu с клетками SK-BR-3 методом проточной цитофлуориметрии (клетки инкубированные с липосомальной формой митоксантрона (справа) и неокрашенные клетки (слева)).

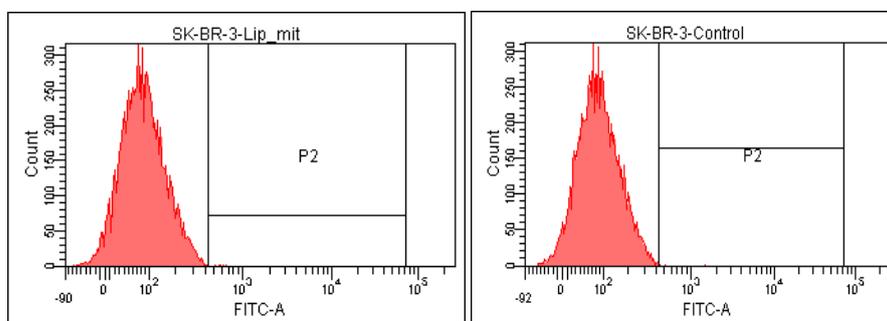
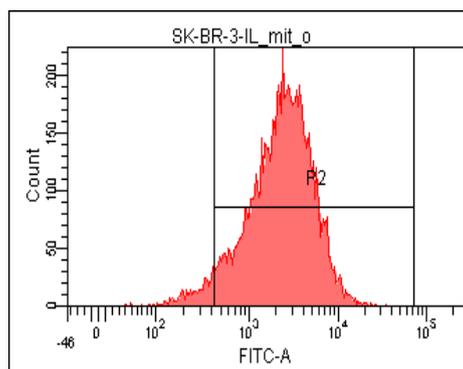


Рисунок 41 – Анализ специфического связывания HER-2 neu с клетками SK-BR-3 методом проточной цитофлуориметрии (иммунолипосомы с митоксантроном).



#### 4.4 Заключение

Исследование цитотоксической активности липосомальной формы митоксантрона в 48 часовой инкубации показало ее более низкую активность по отношению к субстанции препарата на клетках линии SK-BR-3, что может быть связано с недостаточным проникновением препарата в клетку по причине стерической стабилизации липосомальных наночастиц.

Исследование цитотоксической активности пустых иммунолипосом показало, что антитела, закрепленные на их поверхности не оказывают существенного влияния на цитотоксический эффект. При разбавлении 1/8 (125 мг/мл) они вызывают гибель только 10% клеток, что говорит о том, что в исследуемых диапазонах (менее 200 мкг/мл) липосомы не оказывают самостоятельного цитотоксического эффекта.

Исследование цитотоксического действия иммунолипосомальных композиций также показало их значительно меньшую эффективность *in vitro* по отношению к субстанции препарата, однако у композиции, состоящей из S PC-3 в качестве основного компонента, цитотоксичность значительно отличалась от аналогичной липосомальной формы в среднем на 20% в диапазоне концентраций от 25 до 100 мкг/мл. ИК50 для S PC-3 ИЛКМ составило 75 мкг/мл, соответствующая ИК50 для митоксантрона при этом составила 7,5 мкг/мл.

Исследования специфического связывания иммунолипосомальных конструкций показало, что используемая технология изготовления не влияет на активность антител (95,3% клеток связывалось с иммунолипосомальной конструкцией, связывание с контролем при этом составило 96,7%).

## Выводы

1. Разработан состав и оптимальный метод изготовления стерически стабилизированных липосомальных дисперсий митоксантрона на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина со средним диаметром  $105\pm 6$  нм. Для липосом на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина подобраны оптимальные условия загрузки (1,5 часа при температуре  $45^{\circ}\text{C}$ ). Процент включения препарата составил  $96,9\pm 3\%$
2. Разработан состав и оптимальный метод изготовления стерически стабилизированных иммунолипосомальных конструкций митоксантрона с МКА к HER-2 пеп на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина со средним диаметром  $109\pm 6$  нм и процентом включения  $96,9\pm 3\%$ . Среднее количество антител на 1 липосому составило  $\sim 20$ .
3. Разработана методика изготовления стерически стабилизированных иммунолипосомальных конструкций митоксантрона с МКА к HER-2 пеп на основе яичного фосфатидилхолина со средним диаметром  $147\pm 8$  нм и процентом включения  $95\pm 3\%$ . Среднее количество антител на 1 липосому составило  $\sim 20$ .
4. Отработана методика количественного определения митоксантрона в ИЛЛФ и ЛЛФ митоксантрона на основе соевого фосфатидилхолина методом спектрофотометрии при аналитической длине волны  $242\pm 2$  нм.
5. Отработана методика лиофильной сушки ЛЛФ и ИЛЛФ митоксантрона на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина. Оптимальным криопротектором для процедуры лиофилизации липосомальных конструкций митоксантрона был выбран 10% раствор сахарозы. Размер частиц после лиофилизации увеличился на 9 – 12 нм. Содержание митоксантрона в ресуспендируемых везикулах составило  $\sim 77-79\%$  на протяжении шести месяцев хранения ЛЛЛФ в морозильной камере при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ .

6. Было проведено исследование цитотоксической активности ЛЛФ и ИЛЛФ митоксантрона на клетках линии SK-BR-3 при 48 часовой инкубации. ИК50 для S PC-3 ИЛКМ составило 75 мкг/мл.
7. Исследования специфического связывания иммунолипосомальных конструкций показало, что используемая технология изготовления не влияет на активность антител и МКА к HER-2 нец сохраняют свою специфичность.
8. Разработаны проекты ФСП на «Митоксантрон липосомальный лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2мг» и «Митоксантрон иммунолипосомальный лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2мг».

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- AUC – площадь под кривой
- BP – британская фармакопея
- CD – кластер дифференцировки
- Chol – ХОЛ –холестерин
- Chol – холестерин
- CYP 450– цитохромы P 450
- DMPC – димиристоил фосфатидилхолин
- DMPC – димиристоилфосфатдилхолин
- DMPG – димиристоил фосфатидилглицерол
- DOPC – диолеоил фосфатидилхолин
- DOTAP - 1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропан
- DPPC – дипальмитоилфосфатидилхолин
- DPPG – дипальмитоил фосфатидилглицерол
- DSPC – дистеароилфосфатидилхолин
- DSPG – дистеароил фосфатидилглицерол
- E-PC – яичный фосфатидилхолин
- EPG – яичный фосфатидилглицерол
- Eur. Ph. – европейская фармакопея
- Fab-, F(ab)2–фрагменты – антигенсвязывающие фрагменты в молекуле иммуноглобулина
- FFF – фракционирование в потоке при наличии поля
- FITC – флуоресцеинизотиоцианат
- HEPES – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота
- HSPC (SPC-3, SPC)– гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин
- IgG – иммуноглобулин класса G
- mPEG2000-DSPE – [метокси(полиэтиленгликоль)]1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин-N
- MSPC – моностеароил фосфатидилхолин

- PA – фосфатидная кислота
- PBS –изотонический фосфатно–солевой буфер
- PC – ФХ – фосфатидилхолин
- pNP–PEG–PE (pNP–ПЭГ–ФЭА) – п–нитрофенилкарбонил–  
полиэтиленгликоль–фосфатидилэтаноламин.
- USP – фармакопея США
- БОВ – большие однослойные везикулы
- БОВ (LUV) – большие однослойные везикулы
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- в/в – внутривенно
- ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГОВ (GUV) – гигантские однослойные везикулы
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДСР (DLS) – динамическая спектроскопия светорассеяния
- и/п – интраплеврально
- и/сп – интерспинально
- ИК – инфракрасный
- ИЛКМ – иммунолипосомальная конструкция митоксантрона
- ИЛЛФ – иммунолипосомальная лекарственная форма
- Инг. – ингаляционно
- ККМ – критическая концентрация мицеллообразования
- ЛВ – лекарственное вещество
- ЛЛФМ – лиофилизированная липосомальная форма митоксантрона
- ЛФ – лекарственная форма
- ЛФМ – липосомальная форма митоксантрона
- МВВ (MVV) – мультивезикулярные везикулы
- МКА – моноклональные антитела
- МЛВ – многослойные везикулы

- МЛВ (MLV) – мультиламеллярные везикулы
- МОВ – малые однослойные везикулы
- МОВ (SUV) – малые однослойные везикулы
- МОЛ – малые однослойные липосомы
- МТТ – 3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5 дифенилтетразолий бромид
- ОЛ – обычные липосомы
- П/К – подкожно
- ПАВ – поверхностно активное вещество
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- РИФ – реакция поверхностной иммунофлуоресценции
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РСО – рабочий стандартный образец
- РЭС – ретикулоэндотелиальная система
- СПОЛ – свободное перекисное окисление липидов
- ССЛ – стерически стабилизированные липосомы
- СФМ – спектрофотометрия
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
- УЗ – ультразвук
- УФ – ультрафиолет
- ФДТ – фотодинамическая терапия
- ФСП – фармакопейная статья предприятия
- Эа – эпидуральная анестезия
- ЭХ – эксклюзионная хроматография
- ЯМР (NMR) – ядерный магнитный резонанс

## СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

### *Список рисунков*

Рисунок 1 – Химическое строение представителей группы антрациклиновых антибиотиков...	10
Рисунок 2 – Митоксантрон гидрохлорид.....	11
Рисунок 3 – Различные виды липосом: мультиламеллярные везикулы (МЛВ); мультивезикулярные везикулы (МВВ); большие одно– или моноламеллярные везикулы (БОВ или БМВ); гигантские однослойные везикулы (ГОВ); малые одно– или моноламеллярные везикулы (МОВ или ММВ); тубулярные везикулы; дискомы.....	24
Рисунок 4– Схема устройства микрофлюидайзера: 1–Резервуар для образца, 2– Насос высокого давления,3 – Датчик давления, 4– Реакционная камера,5– резервуар для готового продукта. ....	30
Рисунок 5 - Инкапсуляция препарата в липосомы с использованием градиента сульфата аммония. ....	41
Рисунок 6 –Принципиальная схема строения ОЛ и ССЛ. ....	43
Рисунок 7- Схема реакции присоединения лиганда к pNP-PEG-lipid. ....	45
Рисунок 8 – Структурная формула П–нитрофенилкарбонил – ПЭГ–липида .....	49
Рисунок 9 – Структурная формула ДСФЭ–ПЭГ–2000 .....	50
Рисунок 10 – Структурная формула холестерина.....	50
Рисунок 11 – Размеры дисперсии липосом на основе S PC–3.....	74
Рисунок 12 – Размеры дисперсии липосом на основе E–PC.....	74
Рисунок 13 – Диаметр везикул различного липидного состава. ....	75
Рисунок 14 – График измерения $\zeta$ (дзета) – потенциала липосомальной дисперсии состава № 3. ....	76
Рисунок 15 – Хроматограмма очистки липосом митоксантрона от незагруженного препарата : I – фракция очищенных липосом с митоксантроном; II – Не загруженный мтоксантрон. Условия хроматографии: колонка: С 10/20 (Amersham Biosciences); элюент: 0,15М NaCl; скорость элюции: 0,3 мл/мин; детектор на длине волны 215 нм; температура колонки: комнатная. ....	77
Рисунок 16 – Выбор оптимальных условий загрузки для липосом из насыщенного соевого фосфатидилхолина. ....	78

Рисунок 17 – Процент загрузки липосомальных дисперсий при различных липидных составах. .....	79
Рисунок 18 – Хроматограмма очистки липосомального митоксантрона от несвязавшихся МКА и препарата : I – фракция очищенных липосом с митоксантроном; II – Не загруженный митоксантрон. ....	83
Рисунок 19 – Распределение ИК Митоксантрона на основе соевого фосфатидилхолина по размерам, полученное на наносайзере Nicomp 380 Submicron Particle Sizer.....	85
Рисунок 20 – Распределение ИК Митоксантрона на основе яичного фосфатидилхолина по размерам, полученное на наносайзере Nicomp 380 Submicron Particle Sizer.....	85
Рисунок 21 – Хроматограмма «пустых» ИЛ от несвязавшихся МКА : I – фракция очищенных ИЛКМ; II – МКА HER–2 neu; III–буфер HEPES с NaCl.....	86
Рисунок 22 – Хроматограмма ИЛ митоксантрона от несвязавшихся МКА и препарата : I – фракция очищенных ИЛКМ; II – МКА HER–2 neu; III–буфер HEPES с NaCl; IV – не включившийся митоксантрон. ....	87
Рисунок 23 – Спектрофотометрия спиртового раствора субстанции митоксантрона. ....	88
Рисунок 24 – Спектрофотометрия спиртового раствора:1- Субстанции митоксантрона, 2- ЛЛФ, 3- HER–2–neu–ИЛЛФ.....	89
Рисунок 25 – Спектрофотометрия пустых иммунолипосом: 1- HER–2–neu–ИЛЛФ, 2- «пустые» ИЛФ, 3- 95% спирт. ....	89
Рисунок 26 – Калибровочный график для определения белка с бицинхониновой кислотой. ....	90
Рисунок 27 – Диаграмма температурного режима лиофилизации.....	94
Рисунок 28 – Различные варианты заморозки липосомальной дисперсии. ....	96
Рисунок 29 – Включение препарата в ЛЛФ после лиофилизации с использованием различных способов замораживания. ....	96
Рисунок 30 – Размер везикул ЛЛФ после лиофилизации с использованием различных способов замораживания.....	96
Рисунок 31 – График заморозки липосомальной дисперсии митоксантрона, криопротектор 10 % сахара. ....	97
Рисунок 32 – Цитотоксический эффект липосомальных форм митоксантрона и субстанции на клетках SK–BR–3, время инкубации 48 ч. ....	104
Рисунок 33 – Цитотоксический эффект липосомальных форм митоксантрона и субстанции на клетках SK–BR–3, инкубация 1ч 4°C, отмывка, время инкубации 48 ч. ....	104

- Рисунок 34 – Цитотоксический эффект пустой липосомальной и иммунолипосомальной формы на клетках SK–BR–3, 48 ч. инкубация. .... 106
- Рисунок 35 – Цитотоксический эффект пустой липосомальной и иммунолипосомальной формы на клетках SK–BR–3, инкубация 1ч 4°С, отмывка, время инкубации 48 ч. .... 106
- Рисунок 36 – Цитотоксический эффект иммунолипосомальных форм митоксантрона и субстанции на клетках SK–BR–3, время инкубации 48 ч. .... 108
- Рисунок 37 – Цитотоксический эффект иммунолипосомальных форм митоксантрона и субстанции на клетках SK–BR–3, инкубация 1ч 4°С, отмывка, время инкубации 48 ч. .... 108
- Рисунок 38 – Цитотоксический эффект иммунолипосомальных форм митоксантрона, липосомальных форм и субстанции на клетках SK–BR–3, инкубация 1ч 4°С, отмывка, время инкубации 48 ч. .... 109
- Рисунок 39 – Анализ специфического связывания HER–2 neu с клетками SK–BR–3 методом проточной цитофлуориметрии (антитела в разведении 1:500). .... 110
- Рисунок 40 – Контроль анализа специфического связывания HER–2 neu с клетками SK–BR–3 методом проточной цитофлуориметрии (клетки инкубированные с липосомальной формой митоксантрона (справа) и неокрашенные клетки (слева)). .... 110
- Рисунок 41 – Анализ специфического связывания HER–2 neu с клетками SK–BR–3 методом проточной цитофлуориметрии (иммунолипосомы с митоксантроном). .... 110

*Список таблиц*

Таблица 1 – Физико–химические свойства митоксантрона и митоксантрона дигидрохлорида..	11
Таблица 2 – Описание максимумов поглощения митоксантрона гидрохлорида и митоксантрона основания в некоторых растворителях.....	18
Таблица 3 – Липосомальные лекарственные формы, в настоящее время одобренные FDA к медицинскому применению. ....	20
Таблица 4 – Липосомальные лекарственные формы, находящиеся на стадии клинических исследований.....	21
Таблица 5 – Классификация липосом. ....	25
Таблица 6 – Схема приготовления серии растворов БСА для построения калибровочного графика. ....	61
Таблица 7 – Липидный состав МЛВ.....	70
Таблица 8 – Навески, использованные при приготовлении МЛВ различных липидных составов. ....	71
Таблица 9 – Средний Диаметр МЛВ .....	72
Таблица 10 – Результаты измерения загрузки липосом в зависимости от липидной композиции. ....	79
Таблица 11 – Результаты подбора оптимального соотношения препарат : суммарные липиды.	81
Таблица 12 – Пример количественного определения липосомального митоксантрона в I фракции. ....	82
Таблица 13 – Молярный процент липидов, входящих в состав иммунолипосом на базе состава №3 и навески для приготовления МЛВ (расчет на 3мл). ....	84
Таблица 14 – Молярный процент липидов, входящих в состав иммунолипосом состава №4 (яичный ФХ) и навески для приготовления МЛВ (расчет на 3мл). ....	84
Таблица 15 – Состав липосомальной лекарственной формы митоксантрона на основе насыщенного соевого фосфатидилхолина (Состав №3).....	92
Таблица 16 – Эффективность включения митоксантрона в лиофилизированных липосомах.....	95
Таблица 17 – Изучение влияния лиофилизации на размер везикул.....	98
Таблица 18 Количественное определение Митоксантрона в лиофилизированных партиях.....	99

## Список литературы

1. Альбассит Б. и др. Разработка липосомальной лекарственной формы нового соединения из класса нитрозоалкилмочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12. – №. 2.
2. Бабаян С, Карапетян Л., Казарян З. и др. Особенности плавления комплексов ДНК с митоксантроном при малых концентрациях // Биофизика. -1997.- т.42, № 2.- С 367-371.
3. Барсуков Л.И. Липосомы // Соросовский образовательный журнал – 1998. - № 10. – С. 2-8.
4. Барышников А.Ю., Степанова Е.В., Личиницер М.Р. Оценка ангиогенеза опухолей человека / А.Ю. Барышников, Е.В. Степанова, М.Р. Личиницер // Успехи современной биологии. — 2000. — Т. 120, № 6. — С. 599-604.
5. Барышникова М.А., Зангиева М.Т., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных капсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал.– 2013.Т.12, №1.– С.11-15.
6. Берштейн И.Я., Каминский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии.- 2-е изд., перераб. и доп. Л.: Химия.-1986.- 200с.
7. Брусслер Я. И др. Липосомальная форма новых синтетических ингибиторов тромбина // Научно-производственный журнал Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – №. 4.
8. Водовозова Е. Л. и др. Противоопухолевые липосомы с липофильными пролекарствами и углеводным лигандом селективных // НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ 2010. – 2010. – С. 37.
9. Вышковский Г. Л., Абрамов В. В. Регистр лекарственных средств России. – 2002.
10. Григорьева И.Н., Харатешвили Т.К., Барышников А.Ю. Васкулогенная мимикрия: альтернативный механизм кровоснабжения опухоли? // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 25–30.
11. Грицков А. Фотометрия, спектрофотометрия и колориметрия / Александр Грицков,- София : Унив. изд-во "Св. Кл. Охридски".- 2000.
12. Давыдов М. И., Барышников А. Ю. Экспериментальная онкология на рубеже веков // М.: Издательская группа РОНЦ им. НН Блохина РАМН. – 2003. – С. 147-159.
13. Дмитриева М. В. и др. Липосомальная лекарственная форма борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13. – №. 1.
14. Дудниченко А. С., Краснопольский Ю. М., Швец В. И. Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике // Харьков: РА-Каравелла. – 2001.
15. Зангиева М.Т., Барышникова М.А., Игнатьева Е.В. и др. Разработка состава пространственно стабилизированных иммунолипосом направленных против Her-2 рецептора // Российский биотерапевтический журнал. – 2014.- Т.13.- №1.- С.85.
16. Иен Ч. Т. Х. и др. Липосомальная лекарственная форма фотодитазина // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9. – №. 2.
17. Казеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012.- Т.11.- №2.- С.24.
18. Ключкова Т.И., Лопатин П.В., Мкртчян Т.В. и др. Масштабирование производства лекарственной формы аранозы лиофилизированной для инъекций и его особенности. // Химиотерапия опухолей в СССР. – М.,1988. – №. 51. – С. 63-66.
19. Кортава М.А., Оборотова Н.А., Меерович Г.А. и др. Значение коэффициента преломления для эффективной фотодинамической терапии при лечении аденокарциномы молочной железы Ca755 у мышей двумя инфракрасными

- фотосенсибилизаторами // Российский биотерапевтический журнал. – 2006 - Т.5.- №4.- С.64-67.
20. Кортава М.А., Палкина Т.Н., Толчева Е.В и др. Подходы к созданию иммунолипосом на примере доксорубцина // Российский биотерапевтический журнал. – 2003 - Т.2.- №1.- С.6.
  21. Краснов В.П., Чупахин О.Н., Левит Г.Л и др. Химические аспекты создания оригинального противоопухолевого препарата лизомустин. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. / Под ред. М.И. Давыдов, А.Ю. Барышников – Москва, 2003. – с.551.
  22. Краснопольский Ю.М., Балабаньян В.Ю., Шаболов Д.Л., Швец В.И. Липосомальные лекарственные препараты в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013 - Т.12.- №2.- С.48.
  23. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И. Некоторые аспекты технологии получения липосомальных форм лекарственных препаратов // Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – Т. 33, № 10. – С. 20-23.
  24. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Изучение «хронической» токсичности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы тиосенса на крысах // Российский биотерапевтический журнал. – 2012 - Т.11.- №2.- С.30.
  25. Курдюмова Т. Н. Химия антрахинона и его производных М. : НИИТЭ хим., 1981 - 39с., Файн В. Я. Электронные спектры поглощения и строение 9,10-антрахинонов /Центр фотохимии РАН-М.: Наука.- 2002. - 1080с.
  26. Ланцова А.В., Оборотова Н.А., Перетолчина Н.М. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности липосомальных лекарственных форм препаратов производных нитрозоалкиломочевины.// Сибирский онкологический журнал. 2005; 2(14)-С.25-29.
  27. Ланцова А.В., Оборотова., Перетолчина Н.М. и др. Разработка и изучение стерически стабилизированной липосомальной формы лизомустина.// Российский биотерапевтический журнал. 2004- Т.3, №4.- С. 19-23.
  28. Лебедев А.В., Иванова М.В, Красновид Н.И. и др. Кислотные свойства и взаимодействие с супероксид анион-радикаломэхинохрома и его структурных аналогов //Вопросы медицинской химии .-1999.- N 2.- с. 7-10.
  29. Музычкина Р.А. Природные антрахиноны. Биологические и физико-химические свойства.- М.-.ФАЗИС.-1998.- 864С.
  30. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
  31. Оборотова Н.А., Толчева Е.В. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – № 1. – С. 54-61.
  32. Смирнова З.С., Санарова Е.В., Борисова Л.М. и др. Противоопухолевая активность фотодинамической терапии с липосомальной лекарственной формой тиосенса на перевиваемых опухолях мышей // Российский биотерапевтический журнал.- 2011.- Т.10- № 2. – С. 56-60.
  33. Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.В. и др. Игнитомеры ангиогенеза растительного происхождения: перспективы использования в клинической онкологии // Российский биотерапевтический журнал.- 2010.- Т.9- № 4. – С.3-10.
  34. Сычев С. Н. Методы совершенствования хроматографических систем и механизмы удерживания в ВЭЖХ / Орел: ГТУ , 2000 - 211с.
  35. Тазина Е.В., Костин К.В., Оборотова Н.А. Особенности инкапсулирования лекарственных препаратов в липосомы (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, №8. – С. 30-39.

36. Толчева, Е.В. Создание конструкции иммунолипосомы и изучение иммунополипосомальной формы противоопухолевого препарата доксорубин: Дисс. канд. биол. наук: 14.00.14 / Е.В. Толчева. — Москва, 2007. — 109 с.
37. Франциянц Е.М., Комарова Е.Ф., Верескунова М.И. Состояние некоторых маркеров ангиогенеза и пролиферации в ткани опухолей репродуктивной системы // Российский биотерапевтический журнал. — 2012. — Т. 11, № 2. — С. 58.
38. Хугаева О. В. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности различных лекарственных форм митоксантрона // Российский биотерапевтический журнал. — 2010. — Т. 9. — №. 3.
39. Хугаева О. В. и др. ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ МИТОКСАНТРОНА // Российский биотерапевтический журнал. — 2012. — Т. 11. — №. 4.
40. Allen T. M. et al. Pharmacokinetics and anti-tumor activity of vincristine encapsulated in sterically stabilized liposomes // International journal of cancer. — 1995. — Т. 62. — №. 2. — С. 199-204.
41. Allen T. M. et al. Use of the post-insertion method for the formation of ligand-coupled liposomes // Cellular and Molecular Biology Letters. — 2002. — Т. 7. — №. 2. — С. 217-219.
42. Andersson B. S. et al. Anthraquinone-induced cell injury: acute toxicity of carminomycin, epirubicin, idarubicin and mitoxantrone in isolated cardiomyocytes // Toxicology. — 1999. — Т. 135. — №. 1. — С. 11-20.
43. Andreopoulou E. et al. Pegylated liposomal doxorubicin HCL (PLD; Caelyx/Doxil®): Experience with long-term maintenance in responding patients with recurrent epithelial ovarian cancer // Annals of oncology. — 2007. — Т. 18. — №. 4. — С. 716-721.
44. Avnir Y. et al. Amphipathic weak acid glucocorticoid prodrugs remote-loaded into sterically stabilized nanoliposomes evaluated in arthritic rats and in a Beagle dog: A novel approach to treating autoimmune arthritis // Arthritis & Rheumatism. — 2008. — Т. 58. — №. 1. — С. 119-129.
45. Badmeier R., Chen H. Hydrolysis of cellulose acetate and cellulose acetate butyrate pseudolatexes prepared by a solvent evaporation-microfluidization method // Drug development and industrial pharmacy. — 1993. — Т. 19. — №. 5. — С. 521-530.
46. Bangham A. D. Techniques in the Life Science, B4/11 // Lipid and Membrane Biochemistry B. — 1982. — Т. 420. — С. 1-25.
47. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids // Journal of molecular biology. — 1965. — Т. 13. — №. 1. — С. 238-IN27.
48. Barenholz Y. C. Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned // Journal of Controlled Release. — 2012. — Т. 160. — №. 2. — С. 117-134.
49. Barenholz Y. Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: from an idea to a product // Handbook of Harnessing Biomaterials in Nanomedicine: Preparation, Toxicity, and Applications, Pan Stanford Publishing, Singapore. — 2012. — С. 335-398.
50. Barenholz Y. Liposome application: problems and prospects // Current opinion in colloid & interface science. — 2001. — Т. 6. — №. 1. — С. 66-77.
51. Barenholz Y., Cohen R. Rational design of amphiphile-based drug carriers and sterically stabilized carriers // Journal of Liposome Research. — 1995. — Т. 5. — №. 4. — С. 905-932.
52. Barenholz Y., Haran G. Method of amphipathic drug loading in liposomes by ammonium ion gradient : пат. 5316771 США. — 1994.
53. Batist G. et al. A multicenter, phase II study of CPX-1 liposome injection in patients (pts) with advanced colorectal cancer (CRC) // ASCO Annual Meeting Proceedings. — 2008. — Т. 26. — №. 15\_suppl. — С. 4108.
54. Batist G. et al. Phase 2 study of CPX-1 liposome injection: UGT1A1 and prediction of severe toxicities // Ann Oncol. — 2008. — Т. 19. — С. 103.

55. Batzri S., Korn E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 1973. – T. 298. – №. 4. – C. 1015-1019.
56. Beijnen J. H., Bult A., Underberg W. J. M. Mitoxantrone hydrochloride // *Analytical profiles of drug substances*. – 1988. – T. 17. – C. 221-258.
57. Bellosillo B. et al. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells // *British journal of haematology*. – 1998. – T. 100. – №. 1. – C. 142-146.
58. Betageri G. V., Jenkins S. A., Parsons D. Liposome drug delivery systems. – CRC Press, 1993.
59. Boorjian S. A. et al. Phase 1/2 Clinical Trial of Interferon  $\alpha$ 2b and Weekly Liposome-encapsulated All-trans Retinoic Acid in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma // *Journal of Immunotherapy*. – 2007. – T. 30. – №. 6. – C. 655-662.
60. Booser D. J. et al. Phase I study of liposomal anamycin // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2000. – T. 46. – №. 5. – C. 427-432.
61. Booser D. J. et al. Phase II study of liposomal anamycin in the treatment of doxorubicin-resistant breast cancer // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2002. – T. 50. – №. 1. – C. 6-8.
62. Bressler N. M., Bressler S. B. Photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne): impact on ophthalmology and visual sciences // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2000. – T. 41. – №. 3. – C. 624-628.
63. British Medical Association/Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 1998
64. Briuglia M. L. et al. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release // *Drug delivery and translational research*. – 2015. – T. 5. – №. 3. – C. 231-242.
65. Brown D. M. et al. Lucentis® using Visudyne® study: determining the threshold-dose fluence of verteporfin photodynamic therapy combined with intravitreal ranibizumab for exudative macular degeneration // *Clinical Ophthalmology*. – 2010. – T. 4. – C. 1073-1079.
66. Budavari S. et al. The Merck Index, Merck Research Laboratories Division of Merck & Co // *Inc.*, Whitehouse Station, NJ. – 1996. – C. 137-138.
67. Cafiso D. S., Petty H. R., McCONNELL H. M. Preparation of unilamellar lipid vesicles at 37° C by vaporization methods // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 1981. – T. 649. – №. 1. – C. 129-132.
68. Carvalho B. et al. Single-Dose, Extended-Release Epidural Morphine (DepoDur™) Compared to Conventional Epidural Morphine for Post-Cesarean Pain // *Anesthesia & Analgesia*. – 2007. – T. 105. – №. 1. – C. 176-183.
69. Cattaneo A. G. et al. Nanotechnology and human health: risks and benefits // *Journal of applied Toxicology*. – 2010. – T. 30. – №. 8. – C. 730-744.
70. Cencia-Rohan L., Silvestri S. Effect of solvent system on microfluidization-induced mechanical degradation // *International journal of pharmaceutics*. – 1993. – T. 95. – №. 1. – C. 23-28.
71. Charlesworth P. Mitoxantrone, a novel antitumor agent // *New sensitizers for photodynamic therapy: a photophysical study*, Chapter 3.- 1997.- p.80-101.
72. Chatterjee S., Banerjee D. K. Preparation, isolation, and characterization of liposomes containing natural and synthetic lipids // *Liposome Methods and Protocols*. – 2002. – C. 3-16.
73. Cheng, W.K. Targeted delivery of anti-CD19 liposomal doxorubicin in Bcell lymphoma: a comparison of whole monoclonal antibody, Fab' fragments and single chain Fv / W.K. Cheng, T.M. Allen // *J. Control. Release*. — 2008. — Vol. 126. — P. 50–8.
74. Chonn A., Cullis P.R., Chonn A., Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery // *Adv. Drug Del. Rev.* – 1998. – Vol. 30. — № 1/3. – P. 73-76. №8-p.439-441.

75. Chou H. H. et al. Pegylated liposomal doxorubicin (Lipo-Dox®) for platinum-resistant or refractory epithelial ovarian carcinoma: A Taiwanese gynecologic oncology group study with long-term follow-up //Gynecologic oncology. – 2006. – T. 101. – №. 3. – C. 423-428.
76. Clerc S., Barenholz Y. A quantitative model for using acridine orange as a transmembrane pH gradient probe //Analytical biochemistry. – 1998. – T. 259. – №. 1. – C. 104-111.
77. Clerc S., Barenholz Y. Loading of amphipathic weak acids into liposomes in response to transmembrane calcium acetate gradients //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1995. – T. 1240. – №. 2. – C. 257-265.
78. ClinicalTrials.gov [homepage on the Internet]. Study of Liposome Encapsulated Mitoxantrone (LEM) in Patients With Advanced Cancer. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00024492>; [accessed 05.09.12].
79. Cohen B. E., Bangham A. D. Diffusion of small non-electrolytes across liposome membranes. – 1972.
80. Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia: Supplement. – Council of Europe, 1998.
81. Corti, A. Tumor vascular targeting with Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and chemotherapeutic drugs / A. Corti, M. Ponzoni // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2004. — Vol. 1028. — P. 104–112.
82. Crowe L. M. et al. Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1986. – T. 861. – C. 131-140.
83. Cullis P. R., Hope M. J., Bally M. B. Extrusion technique for producing unilamellar vesicles : пат. 5008050 США. – 1991.
84. Cullis PR, Hope MJ, Bally MB, et al. Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1997;1331:187-211
85. Cursiefen S., Flachenecker P., Rieckmann K.V. et al. Mitoxantron (Novantron) zur Therapie der schwerer laufen den multiplen Sklerose // *Nervenarzt*- 1999.-Vol.70.-P.723-731.
86. Cursiefen S., Flachenecker PP., Toyka K. et al. Escalating immunotherapy with mitoxantrone in patients with very active relapsing remitting or progressive multiple sclerosis // *European neurology*.- 2000.-Vol. 43, N 3.-P.186-187.
87. D.D. Lasic, B. Ceh, M.C. Stuart, L. Guo, P.M. Frederik, Y. Barenholz, Transmembrane gradient driven phase transitions within vesicles: lessons for drug delivery, *Biochim. Biophys. Acta* 1239 (2) (1995) 145–15
88. Danielli JF, Davson H (1925) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Comp Physiol* 5:495–508
89. Dasa S., Bhattacharyaa A., Mandala P.C, One-electron reduction of 1,2-dihydroxy-9,10-anthraquinone and some of its transition metal complexes in aqueous solution and in aqueous isopropanol-acetone-mixed solvent: a steady-state and pulse radiolysis study // *Radiation Physics and Chemistry*.- 2002.- Vol. 65.-P. 93-100.
90. De Isabella PP., Capranico G., Palumbo M. Sequence selectivity of topoisomerase II DNA cleavage stimulated by mitoxantrone derivatives: relationships to drug DNA binding and cellular effects // *Molecular Pharmacology*. –Vol.43, N 5.-1993.- P. 715-721.
91. Deamer D, Bangham AD: Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta* 1976, 443(3):629–634.
92. Dragovich T. et al. A Phase 2 trial of the liposomal DACH platinum L-NDDP in patients with therapy-refractory advanced colorectal cancer // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2006. – T. 58. – №. 6. – C. 759-764.
93. Drakaki A., Hurvitz S. A. HER2-Positive Breast Cancer: Update on New and Emerging Agents // *American Journal of Hematology/Oncology®*. – 2015. – T. 11. – №. 4.

94. Dromi S. et al. Pulsed-high intensity focused ultrasound and low temperature-sensitive liposomes for enhanced targeted drug delivery and antitumor effect // *Clinical Cancer Research*. – 2007. – T. 13. – №. 9. – C. 2722-2727.
95. Drummond D. C. et al. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors // *Pharmacological reviews*. – 1999. – T. 51. – №. 4. – C. 691-744.
96. Duffaud F. et al. Phase II study of OSI-211 (liposomal lurtotecan) in patients with metastatic or loco-regional recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck: an EORTC New Drug Development Group study // *European Journal of Cancer*. – 2004. – T. 40. – №. 18. – C. 2748-2752.
97. Edwards K.A., Baeummer A.J. Analysis of liposomes // *Talanta*. – 2006. – № 68. – C. 1432-1441.
98. Ehniger G, Schuler U, Proksch B. et al. Pharmacokinetics and metabolism of mitoxantrone // *Clinical Pharmacokinetics*.-1990.-T.18. – № 5. – C.365-380.
99. Enoch H. G., Strittmatter P. Formation and properties of 1000-Å-diameter, single-bilayer phospholipid vesicles // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1979. – T. 76. – №. 1. – C. 145-149.
100. Fantini M. et al. Lipoplatin treatment in lung and breast cancer // *Chemotherapy research and practice*. – 2010. – T. 2011.
101. Fasol U. et al. Vascular and pharmacokinetic effects of EndoTAG-1 in patients with advanced cancer and liver metastasis // *Annals of oncology*. – 2011. – C. mdr300.
102. Fassas A., Anagnostopoulos A. The use of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in acute myeloid leukemia // *Leukemia & lymphoma*. – 2005. – T. 46. – №. 6. – C. 795-802.
103. Faulds D. et al. Mitoxantrone // *Drugs*. – 1991. – T. 41. – №. 3. – C. 400-449.
104. Feldman E. J. et al. First-in-man study of CPX-351: a liposomal carrier containing cytarabine and daunorubicin in a fixed 5: 1 molar ratio for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia // *Journal of Clinical Oncology*. – 2011. – T. 29. – №. 8. – C. 979-985.
105. Fetterly G. J. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling and simulation of neutropenia during phase I development of liposome-entrapped paclitaxel // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – T. 14. – №. 18. – C. 5856-5863.
106. Florey K. et al. Analytical profiles of drug substances and excipients. – Academic press, 1992. – T. 20.
107. Floyd J. et al. Cardiotoxicity of anthracycline-like chemotherapy agents // *UpToDate*, Waltham, MA. – 2014. – T. 2014.
108. Fox E. J. Mechanism of action of mitoxantrone // *Neurology*. – 2004. – T. 63. – №. 12 suppl 6. – C. S15-S18.
109. G. Gregoriadis, “Liposome research in drug delivery: the early days,” *Journal of Drug Targeting*, vol. 16, no. 7-8, pp. 520–524, 2008.
110. Gabizon A., Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1988. – T. 85. – №. 18. – C. 6949-6953.
111. Garbuzenko O. et al. Electrostatics of PEGylated micelles and liposomes containing charged and neutral lipopolymers // *Langmuir*. – 2005. – T. 21. – №. 6. – C. 2560-2568.
112. Garbuzenko O., Barenholz Y., Prieв A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer // *Chemistry and physics of lipids*. – 2005. – T. 135. – №. 2. – C. 117-129.
113. Gardikis K. et al. New chimeric advanced Drug Delivery nano Systems (chi-aDDnSs) as doxorubicin carriers // *International journal of pharmaceutics*. – 2010. – T. 402. – №. 1. – C. 231-237.
114. Geciova J., Bury D., Jelen P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review // *International Dairy Journal*. – 2002. – T. 12. – №. 6. – C. 541-553.

115. GERRITSEN W. J. et al. Freeze-Fracture Appearance and Disposition of Band 3 Protein from the Human Erythrocyte Membrane in Lipid Vesicles //European Journal of Biochemistry. – 1978. – T. 85. – №. 1. – C. 255-261.
116. Gill P. S. et al. Randomized phase III trial of liposomal daunorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in AIDS-related Kaposi's sarcoma //Journal of Clinical Oncology. – 1996. – T. 14. – №. 8. – C. 2353-2364.
117. Gorter E., Grendel F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood //The Journal of experimental medicine. – 1925. – T. 41. – №. 4. – C. 439-443.
118. Goyal P. et al. Liposomal drug delivery systems-clinical applications //Acta pharmaceutica. – 2005. – T. 55. – №. 1. – C. 1-25.
119. Gregoriadis G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine //New England Journal of Medicine. – 1976. – T. 295. – №. 13. – C. 704-710.
120. Gregoriadis G., Leathwood P. D., Ryman B. E. Enzyme entrapment in liposomes //FEBS letters. – 1971. – T. 14. – №. 2. – C. 95-99.
121. Gregoriadis G., Ryman B. E. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases //Biochemical Journal. – 1971. – T. 124. – №. 5. – C. 58P.
122. Hansen C. B. et al. Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1995. – T. 1239. – №. 2. – C. 133-144.
123. Haran G. et al. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1993. – T. 1151. – №. 2. – C. 201-215.
124. Harrington K. J. et al. Phase I-II study of pegylated liposomal cisplatin (SPI-077 TM) in patients with inoperable head and neck cancer //Annals of oncology. – 2001. – T. 12. – №. 4. – C. 493-496.
125. Hartrick C. T., Hartrick K. A. Extended-release epidural morphine (DepoDur™): review and safety analysis //Expert review of neurotherapeutics. – 2008. – T. 8. – №. 11. – C. 1641-1648.
126. Hauser H., Gains N. Spontaneous vesiculation of phospholipids: a simple and quick method of forming unilamellar vesicles //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1982. – T. 79. – №. 6. – C. 1683-1687.
127. Himanshu A., Sitasharan P., Singhai A. K. Liposomes as drug carriers //IJPLS. – 2011. – T. 2. – №. 7. – C. 945-951.
128. Hope M. J. et al. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1985. – T. 812. – №. 1. – C. 55-65.
129. Hospira Healthcare Corporation. Mitoxantrone Injection, USP Product Monograph. Saint Laurent, Quebec; 13 June 2007.)
130. Huang C. H., Mason J. T. Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1978. – T. 75. – №. 1. – C. 308-310.
131. Hui H. W., Robinson J. R., Lee V. H. L. Design and fabrication of oral controlled release drug delivery systems //Controlled Drug Delivery—Fundamentals and Applications. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc. – 1987. – C. 373.
132. Immordino M. L. et al. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential //International journal of nanomedicine. – 2006. – T. 1. – №. 3. – C. 297.
133. International Agency for Research on Cancer et al. World cancer report 2014 //Geneva: WHO. – 2014.

134. J.H. Senior, Fate and behaviour of liposomes in vivo: a review of controlling factors, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 3 (1987) 123–193.
135. Jedrzejczak M. et al. Changes in plasma membrane fluidity of immortal rodent cells induced by anticancer drugs doxorubicin, aclarubicin and mitoxantrone // *Cell biology international*. – 1999. – T. 23. – №. 7. – C. 497-506.
136. Jeijnen J. H. // *Analytical profiles of drug substances*. – 1988. – T. 17. – C. 221-258.
137. Jesorka A., Orwar O. Liposomes: technologies and analytical applications // *Annu. Rev. Anal. Chem.* – 2008. – T. 1. – C. 801-832.
138. Kagawa Y., Racker E. Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation XXV. RECONSTITUTION OF VESICLES CATALYZING 32Pi—ADENOSINE TRIPHOSPHATE EXCHANGE // *Journal of Biological Chemistry*. – 1971. – T. 246. – №. 17. – C. 5477-5487.
139. Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. Interactions of antitumor agents Ametantrone and Mitoxantrone (Novatrone) with double-stranded DNA // *Biochemical pharmacology*. – 1985. – T. 34. – №. 24. – C. 4203-4213.
140. Kasaai M. R. et al. Fragmentation of chitosan by microfluidization process // *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. – 2003. – T. 4. – №. 4. – C. 403-413.
141. Kharasch E. D., Novak R. F. Mitoxantrone and ametantrone inhibit hydroperoxide-dependent initiation and propagation reactions in fatty acid peroxidation // *Journal of Biological Chemistry*. – 1985. – T. 260. – №. 19. – C. 10645-10652.
142. Kikuchi H., Yamauchi H. Method for producing liposomes : пат. 4687661 CIIIA. – 1987.
143. Kim H. H. Y., Baianu I. C. Novel liposome microencapsulation techniques for food applications // *Trends in Food Science & Technology*. – 1991. – T. 2. – C. 55-61.
144. Kitayama H. et al. Thermotropic Phase Behavior of Hydrogenated Soybean Phosphatidylcholine–Cholesterol Binary Liposome Membrane // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2014. – T. 62. – №. 1. – C. 58-63.
145. Kitayama H. et al. Thermotropic Phase Behavior of Hydrogenated Soybean Phosphatidylcholine–Cholesterol Binary Liposome Membrane // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2014. – T. 62. – №. 1. – C. 58-63.
146. Koeller J., Eble M. Mitoxantrone: a novel anthracycline derivative // *Clinical pharmacy*. – 1988. – T. 7. – №. 8. – C. 574-581.
147. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *nature*. – 1975. – T. 256. – C. 495-497.
148. Konno H. et al. Antitumor effect of a neutralizing antibody to vascular endothelial growth factor on liver metastasis of endocrine neoplasm // *Japanese journal of cancer research*. – 1998. – T. 89. – C. 933-939.
149. Kozłowska D. et al. Molecular and magnetic resonance imaging: The value of immunoliposomes // *Advanced drug delivery reviews*. – 2009. – T. 61. – №. 15. – C. 1402-1411.
150. Kučerka N., Nieh M. P., Katsaras J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2011. – T. 1808. – №. 11. – C. 2761-2771.
151. Lagoueyte N., Paquin P. Effects of microfluidization on the functional properties of xanthan gum // *Food Hydrocolloids*. – 1998. – T. 12. – №. 3. – C. 365-371.
152. Lammers T., Hennink W. E., Storm G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice // *British journal of cancer*. – 2008. – T. 99. – №. 3. – C. 392-397.
153. Langmuir I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. 1 // *Journal of the American Chemical Society*. – 1917. – T. 39. – №. 9. – C. 1848-1906.

154. Lasic D. D. et al. Transmembrane gradient driven phase transitions within vesicles: lessons for drug delivery //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1995. – T. 1239. – №. 2. – C. 145-156.
155. Lasic D. D. Liposomes: from physics to applications. – Elsevier Science Ltd, 1993.
156. Lasic D. D. The mechanism of vesicle formation //Biochemical Journal. – 1988. – T. 256. – №. 1. – C. 1.
157. Leonard R. C. F. et al. Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: Focus on liposomal doxorubicin (Myocet™) //The Breast. – 2009. – T. 18. – №. 4. – C. 218-224.
158. Leserman L., Machy P. Ligand targeting of liposomes //Liposomes: From Biophysics to Therapeutics. New York: Marcel Dekker, Inc. – 1987. – C. 157-194.
159. Li C. L. et al. Encapsulation of mitoxantrone into pegylated SUVs enhances its antineoplastic efficacy //European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2008. – T. 70. – №. 2. – C. 657-665.
160. Li Z. et al. Characterization of nebulized liposomal amikacin (Arikace™) as a function of droplet size //Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery. – 2008. – T. 21. – №. 3. – C. 245-254.
161. Llu L., Yonetani T. Preparation and characterization of liposome-encapsulated haemoglobin by a freeze-thaw method //Journal of microencapsulation. – 1994. – T. 11. – №. 4. – C. 409-421.
162. Lown J. W. Anthracycline and anthracenedione-based anticancer agents. – Elsevier; Distributors for the US and Canada, Elsevier Science Pub. Co., 1988.
163. Lown J. W. et al. Characteristics of the binding of the anticancer agents mitoxantrone and ametantrone and related structures to deoxyribonucleic acids //Biochemistry. – 1985. – T. 24. – №. 15. – C. 4028-4035.
164. Lown J., Reszka K., Kolodziejczyk P., and Wilson, W. Molecular pharmacology of the anticancer agent mitoxantrone and related structures//Molecular Mechanisms of Carcinogenic and Antitumor Activity. - 1987.- C. 243-274.
165. Lu C. et al. Phase II study of a liposome-entrapped cisplatin analog (L-NDDP) administered intrapleurally and pathologic response rates in patients with malignant pleural mesothelioma //Journal of clinical oncology. – 2005. – T. 23. – №. 15. – C. 3495-3501.
166. Maa Y. F., Hsu C. C. Performance of sonication and microfluidization for liquid–liquid emulsification //Pharmaceutical development and technology. – 1999. – T. 4. – №. 2. – C. 233-240.
167. Madden T. D. et al. Protection of large unilamellar vesicles by trehalose during dehydration: retention of vesicle contents //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1985. – T. 817. – №. 1. – C. 67-74.
168. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting //Advances in enzyme regulation. – 2001. – T. 41. – №. 1. – C. 189-207.
169. Mahdi Jafari S., He Y., Bhandari B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization—a comparison //International Journal of Food Properties. – 2006. – T. 9. – №. 3. – C. 475-485.
170. Mamot C. et al. Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study //The lancet oncology. – 2012. – T. 13. – №. 12. – C. 1234-1241.
171. Manjappa A. S. et al. Antibody derivatization and conjugation strategies: application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor //Journal of Controlled Release. – 2011. – T. 150. – №. 1. – C. 2-22.
172. Martin F. J. Clinical pharmacology and antitumor efficacy of DOXIL (pegylated liposomal doxorubicin) //Medical applications of liposomes. – 1998. – T. 635. – C. 688.

173. Martin F. J. Pharmaceutical manufacturing of liposomes //Drugs and the pharmaceutical sciences. – 1990. – T. 41. – C. 267-316.
174. Maruyama K. et al. Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes //Advanced drug delivery reviews. – 1999. – T. 40. – №. 1. – C. 89-102.
175. Maurer-Spurej E. et al. Factors influencing uptake and retention of amino-containing drugs in large unilamellar vesicles exhibiting transmembrane pH gradients //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1999. – T. 1416. – №. 1. – C. 1-10.
176. Mayhew E., Nickolopoulos G., King A. S. An advanced technique for the manufacture of liposomes //Am. Biotech. Lab. – 1985. – T. 3. – C. 36-41.
177. McEvoy G. K. AHFS Drug Information. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists. – 2007. – C. 1143-1145.
178. Meunier F., Prentice H. G., Ringden O. Liposomal amphotericin B (AmBisome): safety data from a phase II/III clinical trial //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1991. – T. 28. – №. suppl B. – C. 83-91.
179. Millefiorini E. et al. Randomized placebo-controlled trial of mitoxantrone in relapsing-remitting multiple sclerosis: 24-month clinical and MRI outcome //Journal of neurology. – 1997. – T. 244. – №. 3. – C. 153-159.
180. Milsmann M. H. W., Schwendener R. A., Weder H. G. The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1978. – T. 512. – №. 1. – C. 147-155.
181. Mitra A., Lee C. H., Cheng K. Advanced drug delivery. – John Wiley & Sons, 2013.
182. Moser C., Metcalfe I. C., Viret J. F. Virosomal adjuvanted antigen delivery systems //Expert review of vaccines. – 2003. – T. 2. – №. 2. – C. 189-196.
183. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays //Journal of immunological methods. – 1983. – T. 65. – №. 1-2. – C. 55-63.
184. Mozafari M. R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques //Cellular and Molecular Biology Letters. – 2005. – T. 10. – №. 4. – C. 711.
185. Mozafari M. R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques //Cellular and Molecular Biology Letters. – 2005. – T. 10. – №. 4. – C. 711.
186. Murdock K. C. et al. Antitumor agents. 1. 1, 4-Bis [(aminoalkyl) amino]-9, 10-anthracenediones //Journal of medicinal chemistry. – 1979. – T. 22. – №. 9. – C. 1024-1030.
187. Murdock K. C. Novel 1, 4-bis (substituted-amino)-5, 8-dihydroxyanthraquinones and leuco bases thereof : пат. 4410524 CIIIA. – 1983.
188. Myers C. E. et al. Anthracycline and anthracenedione-based anticancer agents //by Lown JW, Elsevier, Amsterdam. – 1988. – C. 527-569.
189. Nayar R., Hope M. J., Cullis P. R. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1989. – T. 986. – №. 2. – C. 200-206.
190. Nichols J. W., Deamer D. W. Catecholamine uptake and concentration by liposomes maintaining pH gradients //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1976. – T. 455. – №. 1. – C. 269-271.
191. Novopharm Limited. Mitoxantrone Injection Product Monograph. Toronto, Ontario; 19 May 2005.
192. Ohkuma S., Poole B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1978. – T. 75. – №. 7. – C. 3327-3331.
193. Ohsawa T, Miura H, Harada K. Improvement of encapsulation efficiency of water-soluble drugs in liposomes formed by the freeze-thawing method //Chemical and pharmaceutical bulletin. – 1985. – T. 33. – №. 9. – C. 3945-3952.

194. Okusanya Ó. O. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of liposomal amikacin for inhalation in cystic fibrosis patients with chronic pseudomonal infection //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2009. – T. 53. – №. 9. – C. 3847-3854.
195. O'Neil M. J. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. – RSC Publishing, 2013.
196. Papahadjopoulos D. P., Szoka Jr F. C. By forming an emulsion, evaporation of the organic solvent to form a gel : пат. 4235871 CИIA. – 1980.
197. Park J. W. et al. Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1995. – T. 92. – №. 5. – C. 1327-1331.
198. Park Y. S. Tumor-directed targeting of liposomes //Bioscience reports. – 2002. – T. 22. – №. 2. – C. 267-281.
199. Participants V. R. Guidelines for using verteporfin (Visudyne) in photodynamic therapy for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration and other causes: update //Retina. – 2005. – T. 25. – №. 2. – C. 119-134.
200. Patel H. M. Serum opsonins and liposomes: Their interaction and opsonophagocytosis //Critical reviews in therapeutic drug carrier systems. – 1991. – T. 9. – №. 1. – C. 39-90.
201. Patel H. M., Tužel N. S., Ryman B. E. Inhibitory effect of cholesterol on the uptake of liposomes by liver and spleen //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 1983. – T. 761. – №. 2. – C. 142-151.
202. Perez-Soler R. Liposomes as carriers of antitumor agents: toward a clinical reality //Cancer treatment reviews. – 1989. – T. 16. – №. 2. – C. 67-82.
203. Perry P. J. et al. 1, 4-and 2, 6-disubstituted amidoanthracene-9, 10-dione derivatives as inhibitors of human telomerase //Journal of medicinal chemistry. – 1998. – T. 41. – №. 17. – C. 3253-3260.
204. Phuphanich S. et al. A pharmacokinetic study of intra-CSF administered encapsulated cytarabine (DepoCyt®) for the treatment of neoplastic meningitis in patients with leukemia, lymphoma, or solid tumors as part of a phase III study //Journal of neuro-oncology. – 2007. – T. 81. – №. 2. – C. 201-208.
205. Pick U. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures //Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1981. – T. 212. – №. 1. – C. 186-194.
206. Poste G., Kirsh R., Koestler T. The challenge of liposome targeting in vivo //Liposome technology. – 1984. – T. 3. – C. 1-28.
207. Pratt W. B. et al. The Anticancer Drugs, 1994 //Oxford University, Oxford,(b), Takeuchi Y., Kitaomo M., Chang MR, Shirasaka S., Shimamura C., Okuno Y., Yamato M., Harayama T., Chem. Pharm. Bull. – 1997. – T. 45. – C. 2096.
208. Riaz M. Liposomes preparation methods //Pak J Pharm Sci. – 1996. – T. 9. – №. 1. – C. 65-77.
209. Robinson J., Lee V. H. L. (ed.). Controlled drug delivery: fundamentals and applications. – Informa Health Care, 1987. – T. 29. – C. 433-465.
210. Rodriguez M. A. et al. Vincristine sulfate liposomes injection (Marqibo) in heavily pretreated patients with refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma //Cancer. – 2009. – T. 115. – №. 15. – C. 3475-3482.
211. Rosenthal D. I. et al. A Phase I study of SPI-077 (Stealth® liposomal cisplatin) concurrent with radiation therapy for locally advanced head and neck cancer //Investigational new drugs. – 2002. – T. 20. – №. 3. – C. 343-349.
212. Sahil K. et al. Stealth liposomes: a review //Int J Res Ayurveda Pharm. – 2011. – T. 2. – №. 5.
213. Sapra P. et al. Improved therapeutic responses in a xenograft model of human B lymphoma (Namalwa) for liposomal vincristine versus liposomal doxorubicin targeted via

- anti-CD19 IgG2a or Fab' fragments //Clinical cancer research. – 2004. – T. 10. – №. 3. – C. 1100-1111.
214. Sapra P., Allen T. M. Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs //Cancer Research. – 2002. – T. 62. – №. 24. – C. 7190-7194.
215. Sarris A. H. et al. Liposomal vincristine in relapsed non-Hodgkin's lymphomas: early results of an ongoing phase II trial //Annals of Oncology. – 2000. – T. 11. – №. 1. – C. 69-72.
216. Schieren H. et al. Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles: ESR, diffusion and entrapment analyses //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 1978. – T. 542. – №. 1. – C. 137-153.
217. Schuler U. et al. Pharmacokinetics and Metabolism of Mitoxantrone A Review //Clinical pharmacokinetics. – 1990. – T. 18. – №. 5. – C. 365-380.
218. Sekretariat R. L. Rote Liste 1998. – 1998.
219. Semple S. C. et al. Optimization and characterization of a sphingomyelin/cholesterol liposome formulation of vinorelbine with promising antitumor activity //Journal of pharmaceutical sciences. – 2005. – T. 94. – №. 5. – C. 1024-1038.
220. Seymour L. W. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates //Critical reviews in therapeutic drug carrier systems. – 1991. – T. 9. – №. 2. – C. 135-187.
221. Shmeeda H. et al. Her2-targeted pegylated liposomal doxorubicin: retention of target-specific binding and cytotoxicity after in vivo passage //Journal of Controlled Release. – 2009. – T. 136. – №. 2. – C. 155-160.
222. Shmeeda H. et al. Her2-targeted pegylated liposomal doxorubicin: retention of target-specific binding and cytotoxicity after in vivo passage //Journal of Controlled Release. – 2009. – T. 136. – №. 2. – C. 155-160.
223. Silvestri S., Gabrielson G., Wu L. L. Effect of terminal block on the microfluidization induced degradation of a model ABA block copolymer //International journal of pharmaceutics. – 1991. – T. 71. – №. 1. – C. 65-71.
224. Silvestri S., Ganguly N., Tabibi E. Predicting the effect of nonionic surfactants on dispersed droplet radii in submicron oil-in-water emulsions //Pharmaceutical research. – 1992. – T. 9. – №. 10. – C. 1347-1350.
225. Singer S. J., Nicolson G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes //Science. – 1972. – T. 175. – №. 4023. – C. 720-731.
226. Smith I. E. Mitoxantrone (novantrone): a review of experimental and early clinical studies //Cancer treatment reviews. – 1983. – T. 10. – №. 2. – C. 103-115.
227. Sorgi F. L., Huang L. Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization //International journal of pharmaceutics. – 1996. – T. 144. – №. 2. – C. 131-139.
228. Stathopoulos G. P., Boulikas T. Lipoplatin formulation review article //Journal of drug delivery. – 2011. – T. 2012.
229. Synthesis of amino-substituted 9,10-antracenediones. - DDR Patent 290774 A7.-1987
230. Synthesis of antineoplastic agent DHAQ.-DDR Patent 294389 A7.-1988.
231. Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1978. – T. 75. – №. 9. – C. 4194-4198.
232. Szoka Jr F., Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes) //Annual review of biophysics and bioengineering. – 1980. – T. 9. – №. 1. – C. 467-508.
233. The Merck Index, Centennial Edition.-1992, Mitoxantrone .-P.979.

234. Thompson A. K., Mozafari M. R., Singh H. The properties of liposomes produced from milk fat globule membrane material using different techniques //Le Lait. – 2007. – T. 87. – №. 4-5. – C. 349-360.
235. Torchilin V. Antibody-modified liposomes for cancer chemotherapy //Expert opinion on drug delivery. – 2008. – T. 5. – №. 9. – C. 1003-1025.
236. Torchilin V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers //European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2009. – T. 71. – №. 3. – C. 431-444.
237. Torchilin V. P. et al. p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2001. – T. 1511. – №. 2. – C. 397-411.
238. Torchilin V. P. et al. p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2001. – T. 1511. – №. 2. – C. 397-411.
239. Torchilin V. P. Multifunctional nanocarriers //Advanced drug delivery reviews. – 2012. – T. 64. – C. 302-315.
240. Torchilin V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging //The AAPS journal. – 2007. – T. 9. – №. 2. – C. E128-E147.
241. Torchilin V., Weissig V. Liposomes: a practical approach. – Oxford University Press, 2003. – №. 264. – C. 153.
242. Torchilin V., Weissig V. Liposomes: a practical approach. – Oxford University Press, 2003. – №. 264.
243. Tulpule A. et al. Phase I/II trial of nonpegylated liposomal doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone in the treatment of newly diagnosed aggressive non-Hodgkin's lymphoma //Clinical Lymphoma and Myeloma. – 2006. – T. 7. – №. 1. – C. 59-64.
244. United States Pharmacopoeia XXII, Rockville, 2003.- C.1034-1036.
245. Van Zanten J. et al. A nonviral carrier for targeted gene delivery to tumor cells //Cancer gene therapy. – 2004. – T. 11. – №. 2. – C. 156-164.
246. Vartanian A. A. et al. Melanoma vasculogenic mimicry is strongly related to reactive oxygen species level //Melanoma research. – 2007. – T. 17. – №. 6. – C. 370-379.
247. Vartanian A. A. et al. Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in clear cell renal cell carcinoma //The Canadian journal of urology. – 2009. – T. 16. – №. 4. – C. 4726-4732.
248. Vartanian A. A. et al. The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry //Melanoma research. – 2007. – T. 17. – №. 1. – C. 1-8.
249. Vartanian A. et al. VEGFR1 and PKC $\alpha$  signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VEGFR2 kinase-independent manner //Melanoma research. – 2011. – T. 21. – №. 2. – C. 91-98.
250. Vemuri S. et al. Large-scale production of liposomes by a microfluidizer //Drug development and industrial pharmacy. – 1990. – T. 16. – №. 15. – C. 2243-2256.
251. Voinea M., Simionescu M. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs //Journal of cellular and molecular medicine. – 2002. – T. 6. – №. 4. – C. 465-474.
252. Wang G. Acute effects of mitoxantrone on the electromechanical properties of ventricular myocardium : дис. – Universitätsbibliothek, 2000.
253. Warren G. B. et al. Reversible lipid titrations of the activity of pure adenosine triphosphatase-lipid complexes //Biochemistry. – 1974. – T. 13. – №. 27. – C. 5501-5507.
254. Wasserman V. et al. The antioxidant tempamine: in vitro antitumor and neuroprotective effects and optimization of liposomal encapsulation and release //Langmuir. – 2007. – T. 23. – №. 4. – C. 1937-1947.

255. Weiner A. L. Chemistry and biology of immunotargeted liposomes //Targeted diagnosis and therapy. – 1990. – T. 3. – C. 305.
256. Woodbury D. J. et al. Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions //Journal of liposome research. – 2006. – T. 16. – №. 1. – C. 57-80.
257. Woodle M. C., Lasic D. D. Sterically stabilized liposomes //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes. – 1992. – T. 1113. – №. 2. – C. 171-199.
258. Woodle MC, Papahadjopoulos D. Liposome preparation and size characterization. 1997. Academic Press, INC, San Diego; 1997
259. Wu H. C., Chang D. K., Huang C. T. Targeted therapy for cancer //J Cancer Mol. – 2006. – T. 2. – №. 2. – C. 57-66.
260. Wu Y. L. et al. INSPIRE: a phase III study of the BLP25 liposome vaccine (L-BLP25) in Asian patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer //BMC cancer. – 2011. – T. 11. – №. 1. – C. 1.
261. XXIV U. S. P. United States Pharmacopoeial Convention //Inc: Rockville, MD. – 2006. – T. 20001943.
262. Yarmolenko P. S. et al. Comparative effects of thermosensitive doxorubicin-containing liposomes and hyperthermia in human and murine tumours //International Journal of Hyperthermia. – 2010. – T. 26. – №. 5. – C. 485-498.
263. Yuan F. et al. Mirovascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft //Cancer research. – 1994. – T. 54. – №. 13. – C. 3352-3356.
264. Zee-Cheng R. K. Y., Cheng C. C. Antineoplastic agents. Structure-activity relationship study of bis (substituted aminoalkylamino) anthraquinones //Journal of medicinal chemistry. – 1978. – T. 21. – №. 3. – C. 291-294.
265. Zhang J. A. et al. Development and characterization of a novel Cremophor® EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation //European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics. – 2005. – T. 59. – №. 1. – C. 177-187.
266. Zhang Y. P., Čeh B., Lasic D. D. Liposomes in drug delivery. – 2002.

**ПРИЛОЖЕНИЯ****Приложение 1.**

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № \_\_\_\_\_

Дата регистрации « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России,  
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2  
(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение,  
адрес)

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**

\_\_\_\_\_ (номер)

Митоксантрон липосомальный  
торговое наименование лекарственного препарата

Митоксантрон (Mitoxantrone)  
международное непатентованное или химическое наименование

лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2 мг  
лекарственная форма, дозировка

**ПРОИЗВОДИТЕЛЬ**

ФГБНУ «Государственный научный центр «РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН»

**ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)**

ФГБНУ «Государственный научный центр «РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН»

**УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)**

ФГБНУ «Государственный научный центр «РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН»

**ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

ФГБНУ «Государственный научный центр «РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН»

## СПЕЦИФИКАЦИЯ

**Митоксантрон липосомальный,  
лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2 мг  
ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России**

Показатели 1	Методы 2	Нормы 3
Описание	Визуальный	Лиофилизированная сухая пористая масса темно-синего цвета без запаха.
Подлинность	А) Спектрофотометрия  Б) ТСХ	Электронный спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения, в области от 230 нм до 700 нм должен иметь максимумы при длинах волн: 242±2 нм, 277±2 нм, 612±2 нм, 663±2 нм. По методике контроля чистоты препарата при сравнении с РСО митоксантрона: сравнивают положение основных пятен.
Средняя масса и однородность массы	ГФ XI	От 0,23 до 0,27 г Отклонение от средней массы ± 5,0 %
рН	ГФ XII, ч.1	7,2 – 7,4 (раствор содержимого 1 флакона в 10 мл воды)
Размер частиц	ГФ XII, ч.2	Не более 200 нм.
Потеря в массе при высушивании	ГФ XI, вып. 1, с.176	Не более 3,0 %
Пирогенность	ГФ XII, ч.1	Должен быть апиrogenным
Аномальная токсичность	ГФ XII, ч.1	Должен выдерживать требования
Стерильность	ГФ XII, ч.1	Должен быть стерилен (метод прямого посева)
Количественное определение	Спектрофотометрия	Содержание Митоксантрона в одном флаконе должно быть от 0,017 – 0,023 г
Однородность дозирования	Спектрофотометрия	85 – 115 %
Упаковка	<p>Во флакон из трубки стеклянной для лекарственных средств из ФО-1-20-НС-1 по ТУ 64-2-10-87, укупоренный пробкой из резины марки 52-599/3 или 52-599/1, или 52-599/2 по ТУ 38.006108-95 под обкатку алюминиевым колпачком по ГОСТ Р 51314-99.</p> <p>По 10 флаконов вместе с инструкцией по применению укладывают в картонную пачку из картона для потребительской тары марки коробочной или хром-эрзац по ГОСТ 7989-89 или бумаги пачечной двухслойной по ГОСТ 6290-74 или импортной. Групповая упаковка и транспортная упаковка в соответствии с ГОСТ 17768-90.</p>	

Маркировка	На этикетке флакона указывают предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, торговое название препарата на русском языке, лекарственную форму препарата, дозировку, «Стерильно», «Внутривенно», «Применять по назначению врача», условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности. На пачке и групповой упаковке дополнительно указывают состав, количество флаконов, «Применять в условиях стационара» и штриховой код. Маркировка транспортной тары по ГОСТ 14192-96.
Хранение	Список Б. В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше -18 °С
Срок годности	Устанавливается.

## МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № \_\_\_\_\_

Дата регистрации « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России,  
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2  
(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение,  
адрес)

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**\_\_\_\_\_  
(номер)

Митоксантрон иммунолипосомальный  
торговое наименование лекарственного препарата

Митоксантрон (Mitoxantrone)  
международное непатентованное или химическое наименование

лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2 мг  
лекарственная форма, дозировка

**ПРОИЗВОДИТЕЛЬ**

ФГБНУ «Государственный научный центр «РОНЦ им.Н.Н Блохина РАМН»

**ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)**

ФГБНУ «Государственный научный центр «РОНЦ им.Н.Н Блохина РАМН»

**УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)**

ФГБНУ «Государственный научный центр «РОНЦ им.Н.Н Блохина РАМН»

**ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

ФГБНУ «Государственный научный центр «РОНЦ им.Н.Н Блохина РАМН»

## СПЕЦИФИКАЦИЯ

**Митоксантрон иммунолипосомальный,  
лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2 мг  
ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России**

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный	Лиофилизированная сухая пористая масса темно-синего цвета без запаха. Восстановленный раствор – мутная жидкость от синего до светло-синего цвета.
Подлинность	А) Спектрофотометрия  Б) ТСХ	Электронный спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения, в области от 230 нм до 700 нм должен иметь максимумы при длинах волн: 242±2 нм, 277±2 нм, 612±2 нм, 663±2 нм. По методике контроля чистоты препарата при сравнении с РСО митоксантрона: сравнивают положение основных пятен.
Средняя масса и однородность массы	ГФ XI	От 0,2373 до 0,2621 г Отклонение от средней массы ±5 %
рН	ГФ XII, ч.1	7,2-7,4 (раствор содержимого 1 флакона в 10 мл воды)
Размер частиц	ГФ XII, ч.2	Не более 200 нм.
Потеря в массе при высушивании	ГФ XI, вып. 1, с.176	Не более 3,0 %
Пирогенность	ГФ XII, ч.1	Должен быть апиrogenным
Аномальная токсичность	ГФ XII, ч.1	Должен выдерживать требования
Стерильность	ГФ XII, ч.1	Должен быть стерилен (метод прямого посева)
Количественное определение	Спектрофотометрия	Содержание Митоксантрона в одном флаконе должно быть от 0,017 – 0,023 г
Однородность дозирования	Спектрофотометрия	85 – 115 %
Упаковка	Во флакон из трубки стеклянной для лекарственных средств из ФО-1-20-НС-1 по ТУ 64-2-10-87, укупоренный пробкой из резины марки 52-599/3 или 52-599/1, или 52-599/2 по ТУ 38.006108-95 под обкатку алюминиевым колпачком по ГОСТ Р 51314-99.  По 10 флаконов вместе с инструкцией по применению укладывают в картонную пачку из картона для потребительской тары марки коробочной или хром-эрзац по ГОСТ 7989-89 или бумаги пачечной двухслойной по ГОСТ 6290-74 или импортной. Групповая упаковка и транспортная упаковка в соответствии с ГОСТ 17768-90.	

Маркировка	На этикетке флакона указывают предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, торговое название препарата на русском языке, лекарственную форму препарата, дозировку, «Стерильно», «Внутривенно», «Применять по назначению врача», условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности. На пачке и групповой упаковке дополнительно указывают состав, количество флаконов, «Применять в условиях стационара» и штриховой код. Маркировка транспортной тары по ГОСТ 14192-96.
Хранение	Список Б. В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше -18 °С
Срок годности	Устанавливается.

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по учебной работе  
ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени  
И.М. Сеченова Минздрава России  
кандидат Фармацевтических наук,  
доцент Литвинова Т.М.



« \_\_\_\_\_ » 2015г.

### **АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

#### **результатов научных достижений**

Мы, ниже подписавшиеся, комиссия в составе: Бардаков Александр Иванович (доцент), Скатков Сергей Александрович (доцент), Король Людмила Анатольевна (доцент), составили настоящий акт о том, что наше подразделение: кафедра фармацевтической технологии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России использует в учебном процессе с «01» февраля 2015 г. следующее предложение: использование результатов диссертационной работы «Работка технологии и состава иммунолипосомальной лекарственной формы митоксантрона с гуманизированными моноклональными антителами к HER-2 антигену», в том числе технологию изготовления лекарственных препаратов «Митоксантрон иммунолипосомальный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2 мг» и «Митоксантрон липосомальный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2 мг». Все результаты эксперимента были получены в ходе экспериментальных исследований в рамках диссертационной работы «Работка технологии и состава иммунолипосомальной лекарственной формы митоксантрона с гуманизированными моноклональными антителами к HER-2 антигену» по теме НИР: совершенствование образовательной технологии додипломного и последипломного фармацевтического образования.

Авторы предложения:

Райков Александр Олегович бывший аспирант кафедры фармацевтической технологии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Краснюк Иван Иванович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической технологии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Доцент кафедры  
фармацевтической технологии  
фармацевтического факультета  
ГБОУ ВПО Первый МГМУ  
им. И.М. Сеченова Минздрава РФ,  
к.ф.н.

Бардаков А. И.

Доцент кафедры  
фармацевтической технологии  
фармацевтического факультета  
ГБОУ ВПО Первый МГМУ  
им. И.М. Сеченова Минздрава РФ,  
к.ф.н.

Скатков С. А.

Доцент кафедры  
фармацевтической технологии  
фармацевтического факультета  
ГБОУ ВПО Первый МГМУ  
им. И.М. Сеченова Минздрава РФ,  
к.ф.н.

Король Л. А.

УТВЕРЖДАЮ  
 Зам. директора по научной работе  
 ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»  
 Минздрава России –  
 директор НИИ ЭДиТО  
 ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»  
 Минздрава России,  
 к.фарм.н. Шпрах З.С.



«      »      2015 г.

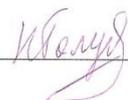
**АКТ ВНЕДРЕНИЯ  
 результатов научных достижений**

Мы, члены комиссии в составе: в.н.с. лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, к.ф.н. М.А. Барышникова, с.н.с. лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, к.б.н. О.С. Бурова, с.н.с. лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, к.б.н. Н.В. Голубцова, составили настоящий акт о том, что наше подразделение лаборатория экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России использует в повседневной работе следующее предложение: использование результатов диссертационной работы А.О. Райкова «Разработка технологии и состава иммунолипосомальной формы митоксантрона с гуманизированными моноклональными антителами к HER-2 антигену», в том числе технологию изготовления лекарственных препаратов «Митоксантрон иммунолипосомальный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2 мг» и «Митоксантрон липосомальный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 2 мг».

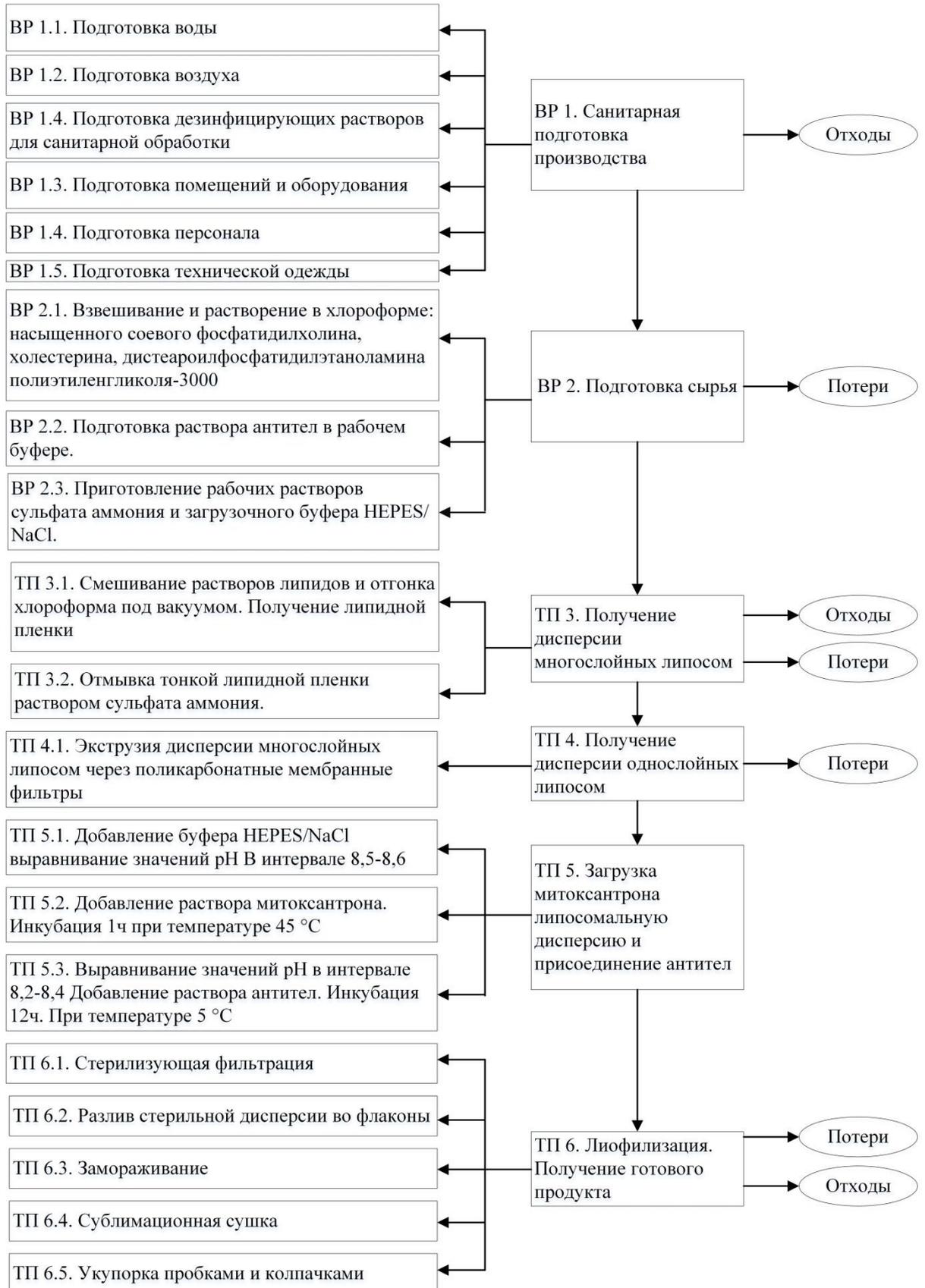
Авторы предложения: зав. кафедрой фармацевтической технологии фармацевтического факультета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, доктор фармацевтических наук, профессор И.И. Краснюк, лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, аспирант кафедры фармацевтической технологии фармацевтического факультета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова А.О. Райков.

В.н.с. лаборатории экспериментальной диагностики  
 и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО  
 ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, к.фарм.н.  М.А. Барышникова

С.н.с. лаборатории экспериментальной диагностики  
 и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО  
 ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, к.б.н.  О.С. Бурова

С.н.с. лаборатории экспериментальной диагностики  
 и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО  
 ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, к.б.н.  Н.В. Голубцова

## Приложение 5. Технологическая схема получения ИЛЛФ митоксантрона.



## Приложение 6. Технологическая схема получения ЛЛФ митоксантрона.

