

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

*На правах рукописи*

Хашем Али

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

14.04.01 – Технология получения лекарств

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

**Научный руководитель:**  
кандидат фармацевтических наук, доцент  
Король Людмила Анатольевна

Москва – 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Производные индолокарбазола	10
1.1.1. Современные противоопухолевые препараты. Общая характеристика производных индолокарбазола	10
1.1.2. Отечественные представители класса производных индолокарбазола. ЛХС-1208	16
1.2. Липосомальные противоопухолевые препараты	20
1.2.1. Липосомы как способ солюбилизации труднорастворимых в воде противоопухолевых ЛВ и повышения эффективности химиотерапии	20
1.2.2. Общая характеристика и классификация липосом	29
1.2.3. Методы получения липосом	33
1.2.4. Стерилизация липосом	36
1.2.5. Лиофилизация как способ стабилизации липосомальных препаратов	38
1.2.6. Характеристика и контроль качества липосомальных препаратов	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	47
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1. Материалы и реактивы	49
2.2. Оборудование	52
2.3. Методы исследования	53
2.3.1. Приготовление липосомальной дисперсии ЛХС-1208	53
2.3.2. Лиофилизация липосомальной дисперсии ЛХС-1208	54
2.3.3. Контроль качества и стандартизация ЛЛФ ЛХС-1208 и ее лиофилизата	55
2.3.4. Изучение цитотоксической активности ЛЛЛФ ЛХС-1208	60
2.3.5. Статистическая обработка данных	61
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	62
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЛЛФ ЛХС-1208	62
3.1. Разработка состава ЛЛФ ЛХС-1208	63
3.2. Особенности получения МСЛ ЛХС-1208	66
3.3. Оценка методов получения ОСЛ ЛХС-1208	69
3.3.1. Обработка ультразвуком	69

3.3.2. Экструзия	70
3.3.3. Гомогенизация	71
3.4. Изучение стабильности ЛЛФ ЛХС-1208	72
3.5. Оценка влияния антиоксиданта на качество ЛЛФ ЛХС-1208	74
3.6. Подбор условий лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208	75
3.6.1. Выбор криопротектора для лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208	76
3.6.2. Выбор режима лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208	79
3.6.3. Выбор объема наполнения флакона липосомальной дисперсией ЛХС-1208	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЛЛФ ЛХС-1208	87
4.1. Разработка и валидация методики спектрофотометрического анализа ЛХС- 1208 в ЛФ	87
4.1.1. Изучение спектральных характеристик ЛХС-1208	87
4.1.2. Количественное определение ЛХС-1208 в ЛФ	90
4.1.3. Валидация методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 в ЛФ	93
4.2. Разработка методики ТСХ-анализа ЛЛЛФ ЛХС-1208	100
4.2.1. Методика ТСХ-анализа ЛХС-1208 и липидных компонентов	101
4.2.2. Методика ТСХ-анализа сахарозы в ЛЛЛФ ЛХС-1208	103
4.2.3. Выбор подвижной фазы для хроматографического анализа	103
4.2.4. Оценка пригодности хроматографических систем	106
4.3. Стандартизация ЛЛЛФ ЛХС-1208	109
4.4. Исследование стабильности ЛЛЛФ ЛХС-1208 в процессе хранения	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ГЛАВА 5. Изучение цитотоксической активности ЛЛЛФ ЛХС-1208	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	122
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	124
ПРИЛОЖЕНИЕ	139

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Несмотря на достижения в области молекулярной биологии опухолевых клеток, разнообразие схем хирургического, радиационного и фармакологического воздействий на различные этапы и звенья опухолевого роста, задача создания эффективных методов терапии до сих пор в основном не решена. При этом увеличение эффективности лекарственного лечения злокачественных опухолей продолжается по различным направлениям, основным среди которых остается поиск новых селективно действующих на новообразования лекарственных веществ (ЛВ) и их подходящих лекарственных форм (ЛФ), позволяющих в будущем разрабатывать режимы и схемы полихимиотерапии, оптимизировать методики применения ЛВ и методы комплексной и комбинированной терапии злокачественных новообразований.

В числе химических веществ природного и синтетического происхождения выделяют следующий класс производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов, обладающих различными видами биологической активности, в том числе противоопухолевую. Установлено, что производные индолокарбазола оказывают сильное ингибирующее воздействие на циклинзависимые киназы, протеинкиназу C и тирозинкиназу, к тому же способны эффективно подавлять топоизомеразу I, участвующую в процессах транскрипции, репликации и репарации ДНК.

Одним из перспективных представителей класса производных индолокарбазола является ЛХС-1208, полученное в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. ЛХС-1208 в исследованиях *in vivo* продемонстрировал высокую противоопухолевую активность в отношении лимфоцитарной лейкемии P-388, эпидермоидной карциномы легкого Льюис, лимфоидной лейкемии L-1210, асцитной опухоли Эрлиха, меланомы B-16, рака шейки матки РШМ-5 и аденокарциномы толстого

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

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

### **Степень разработанности темы исследования**

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

### **Цель исследования**

Создание лиофилизированной стерически стабилизированной ЛЛФ производного индолокарбазола ЛХС-1208.

### **Задачи исследования**

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

### **Научная новизна работы**

В результате проведенных исследований впервые создана стабильная при хранении ЛЛЛФ оригинального отечественного производного индолокарбазола ЛХС-1208. Разработан оптимальный состав и технология получения ЛЛЛФ ЛХС-1208, имеющие ряд особенностей, связанных с наличием у субстанции гидрофобных свойств. Предложены методики качественного и количественного анализа разработанной липосомальной формы ЛХС-1208. Определены показатели качества и проведена стандартизация ЛЛЛФ ЛХС-1208. В *in vitro* исследовании доказано превосходство противоопухолевой активности ЛЛЛФ в сравнении с ИЛФ-лио ЛХС-1208.

### **Теоретическая значимость работы**

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в обосновании выбора оптимального состава и способа получения стерически стабилизированной стабильной ЛЛФ ЛХС-1208, являющегося гидрофобным соединением. Доказано и экспериментально обосновано использование технологии лиофилизации для повышения стабильности при хранении ЛЛФ ЛХС-1208. Экспериментально-практический материал, показанный в

диссертации может быть использован в качестве теоретической основы для разработки новых ЛЛФ гидрофобных ЛВ.

### **Практическая значимость исследования**

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

### **Основные положения, выносимые на защиту**

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

### **Методология и методы исследования**

Методология диссертационной работы базируется на результатах анализа научных данных по разработке липосомальных форм лекарственных препаратов (ЛП), представленных в публикациях отечественных и зарубежных авторов. В работе использованы методы фармакопейного анализа, включенные в ГФ РФ XIII издания. При проведении исследования использованы технологические методы (метод получения липидной пленки, экструзия, обработка ультразвуком, гомогенизация, лиофилизация), химико-фармацевтические методы (спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, потенциометрия, лазерная спектроскопия рассеяния) и

статистические методы анализа и обработки результатов, полученных в процессе экспериментальных исследований.

### **Достоверность научных положений и выводов**

В ходе проведения экспериментальных исследований применено современное сертифицированное оборудование. Правильность и прецизионность полученных результатов подтверждена методами статистической обработки, что позволяет считать их достоверными.

### **Апробация работы**

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

### **Личный вклад автора**

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

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты диссертационного исследования по разработке технологии получения и методик анализа ЛЛЛФ ЛХС-1208 внедрены в работу

лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Акт внедрения).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

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

### **Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки**

Диссертационные исследования проведены в соответствии с тематикой и планом научных исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), комплексная тема: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования». Номер государственной регистрации 01.2.011.68237.

### **Публикации**

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

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 142 листах машинописного текста и содержит 17 рисунков и 26 таблиц. Структура диссертационной работы включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, три главы собственных экспериментальных исследований, общее заключение, общие выводы, список литературы и приложение. Список литературы состоит из 127 источников, в том числе 57 – на иностранном языке.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Производные индолокарбазола

#### 1.1.1. Современные противоопухолевые препараты. Общая характеристика производных индолокарбазола

В течение последних десятилетий в значительной степени повысилась роль лекарственных средств (ЛС) в жизни общества, что способствует росту во всем мире фармацевтических доклинических и клинических исследований. И в нашей стране проблема разработки ЛС является одной из основных направлений прогресса медицинской науки, причем значительное внимание устремлено на необходимость разработки и промышленного выпуска отечественных ЛС, включая – для лечения злокачественных новообразований [44].

Термин химиотерапия был предложен в начале 20 века П. Эрлихом и определялся как «использование ЛС, поражающих паразита и не причиняющих вреда хозяину». Эрлих считал, что ЛС исполняет роль «магической пули», избирательно поражающей мишень – уязвимое место болезнетворной клетки. Предсказания настолько не соответствовали уровню науки того времени, что не привлекли внимания ученых. В настоящее время ученые формулируют значение химиотерапии злокачественных опухолей как использование ЛС, тормозящих пролиферацию или необратимо повреждающих опухолевые клетки. Термин «химиотерапия опухолей» в широком смысле отражает все виды лекарственного лечения злокачественных новообразований, связанного с влиянием фармакологических средств непосредственно на опухоль [55].

В настоящее время химиотерапия остается основой лекарственного лечения злокачественных опухолей. Это основной метод лечения гемобластозов и важный компонент в лечении многих солидных опухолей наряду с хирургическим и лучевым методами. Однако, не существует и, по-

видимому, никогда не появится единого, универсального средства, дающего эффект при всех злокачественных опухолях. Спектр действия того или иного препарата обычно ограничивается небольшим количеством, а в отдаленных случаях и одной опухолью или ее морфологической разновидностью. Как самостоятельный метод клинической онкологии химиотерапия злокачественных новообразований известен с 1946 г., когда впервые был использован эмбихин, производное азотистого иприта – БОВ Первой мировой войны, для лечения человека. В 1950 г под руководством академика Л.Ф. Ларионова, основоположника отечественной химиотерапии, был создан первый в СССР цитостатик – новэмбихим [9, 33].

Спустя прошедшие годы арсенал онкологов значительно пополнился противоопухолевыми препаратами, разделяющиеся на классы, в которых выделяют различные типы препаратов. Типы группируются по происхождению, биохимической структуре, механизму действия или физиологическим эффектам [57].

В настоящее время для лечения онкологических заболеваний широко используются алкилирующие препараты (хлорэтиламины, эфиры дисульфоновых кислот, нитрозопроизводные,) и схожие с ними по механизму действия комплексные соединения платины и триазины, действие которых обусловлено химической трансформацией биомакромолекул посредством ковалентного связывания алкильных групп с нуклеофильными фрагментами ДНК, РНК и белков, вследствие чего изменяются их функции, в результате приводя к замедлению роста, прекращению деления и гибели клеток-мишеней.

Следующей группой противоопухолевых препаратов являются антиметаболиты, которые представляют собой синтетические аналоги нативных субстратов (пиримидиновых и пуриновых нуклеозидов и оснований, фолиевой кислоты) [9].

Также широко применяются гормоны и блокаторы их рецепторов, противоопухолевые антибиотики (флеомицины антрациклины и их синтетические аналоги); соединения, получаемые из растительного сырья (таксаны, алкалоиды барвинка, эпиподофиллотоксины); что дает возможность сочетать ЛП различных классов с целью увеличения эффективности проводимого лечения и понижения его побочного воздействия [9].

В конце XX века на этапе создания новых перспективных противоопухолевых препаратов на базе веществ с предварительно прогнозируемыми характеристиками и благодаря интенсивному изучению происходящих в злокачественных клетках молекулярных процессов появился новый класс препаратов, которые получили название «таргетных». «Таргетные» ЛП по сравнению с традиционными цитостатиками и цитотоксинами оказывают действие в отношении молекулярных мишеней, которые осуществляют передачу сигналов «выживания» и «смерти» внутрь клетки [9, 13, 57].

Среди химических веществ природного и синтетического происхождения можно выделить класс индолокарбазолов и их производных, которые обладают различными видами биологической активности, а точнее такими видами активности как антибактериальная, противоопухолевая и иммуномодулирующая. Важную роль играют производные, содержащие углеводные остатки, связанные с фармаконом. В ряду этих веществ найдены соединения, являющиеся ингибиторами протеинкиназы C, топоизомераз I и II, а также циклин-зависимой киназы CDK-1. В группу гликозидов индоло[2,3-а]карбазола входят противоопухолевый антибиотик ребеккамицин, алкалоид стауроспорин и их аналоги [58, 62, 105].

Ребеккамицин – противоопухолевый антибиотик, выделенный в 1986 г. в Панаме из мицелия штамма C-38,383. Ребеккамицин представляет собой галогенпроизводное индолокарбазола, молекула которого состоит из

симметричного гетероциклического агликона с двумя атомами хлора, связанного посредством гликозидной связи с остатком глюкозы (Рисунок 1а). В экспериментах *in vivo* данное соединение показало высокую противоопухолевую активность в отношении лейкемии P-388, L-1210 и меланомы В-16 за счет встраивания в ДНК и ингибирования топоизомеразы I. Кроме того, ребеккамицин подавляет рост аденокарциномы клеток легкого человека [72, 75].

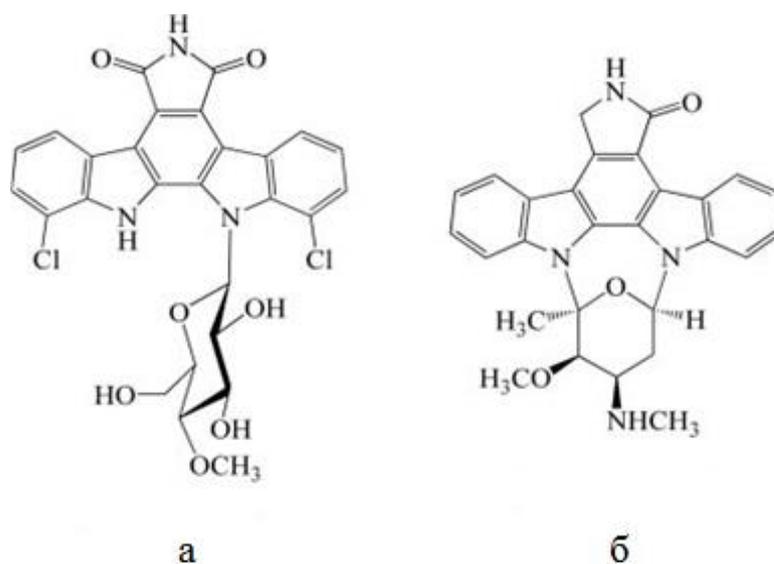


Рисунок 1. Структурные формулы ребеккамицина (а) и стауроспорина (б)

Близким с ребеккамицином является алкалоидный антибиотик стауроспорин, выделенный в 1977 г. из *Streptomyces staurosporeus* и *Streptomyces actuosus*. В отличие от ребеккамицина стауроспорин не содержит в своей структуре связанные с гетероциклическим агликоном атомы хлора (Рисунок 1б). Стауроспорин обладает различными видами биологической активности: оказывает противогрибковое и гипотензивное действие, подавляет агрегацию тромбоцитов, а также подавляет активность фосфолипид/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеинкиназы С и протеин-тирозин киназы, что обуславливает его применение в качестве потенциального противоопухолевого агента [93, 103, 108, 109].

Для получения более эффективных соединений продолжаются активные исследования по синтезу и скринингу производных стауроспорина. Среди нескольких сотен синтезированных соединений наиболее активным по сравнению с стауроспорином оказалось производное J-107088, получившим название эдотекарин. J-107088 содержит спиртовую группу вместо формильной в положении N-6 в отличие от стауроспорина и две гидроксильные группы в положениях 2 и 10 вместо позиций 1 и 11, соответственно. Модификация структуры стауроспорина способствовало увеличению ингибирующей активности в отношении топоизомеразы I и усилению цитотоксического действия. Доказана противоопухолевая эффективность эдотекарина на 31 различных клеточных линиях рака человека как в монотерапии, так и в комбинации с другими препаратами (5-фторурацил, иринотекан, цисплатин, оксалиплатин и др.). Эдотекарин проходит клинические исследования при лечении гепатоцеллюлярной карциномы, глиобластомы [78, 101, 116, 124].

Несмотря на высокий противоопухолевый эффект существенными недостатком данных препаратов являются низкая растворимость в воде. В исследовании [87] проводился синтез водорастворимых производных ребеккамицина путем включения в молекулу аминоалкильной группы, обеспечивающей улучшение физико-химических свойств соединения и возможность создания парентеральных ЛФ. Полученные соли обладали не только лучшей растворимостью в воде по сравнению с ребеккамицином, но и оказывали значительно высокий противоопухолевый эффект при лейкемии P-388 и меланоме B-16 – наблюдалось увеличение активности приблизительно в 14 раз. Таким образом, дальнейшее изучение данных соединений являются весьма перспективными.

Водорастворимым диэтиламиноэтиловым производным ребеккамицина является соединение XL119 (NSC 655649), на основе которого получен препарат бетатекарин. По сравнению с ребеккамицином бетатекарин не

активен в отношении топоизомеразы I, однако оказывает сильный ингибирующий эффект на топоизомеразу II. Бетатекарин обладает противоопухолевой активностью против лейкемии P-388, меланомы, ретикулярной клеточной саркомы, клеточных линий саркомы легкого и толстой кишки и др. В настоящее время производятся клинические исследования бетатекарина в монотерапии и комбинированной терапии с цисплатином, оксалиплатином, а также иными противоопухолевыми препаратами рака пищевода, желчных путей, поджелудочной и предстательной железы, мелкоклеточного рака легких, острой лейкемии и миелодиспластического синдрома и др. [74, 82, 92, 99, 106].

Преобладающая часть синтетических исследований в этой области в последние годы посвящена разработке методов получения агликонов, т.е. производных бис(индолил)фурана – пиррола и родственных карбазолов, что, по-видимому, связано с трудностями гликозилирования индола и его производных стандартными методами. Другое направление представляет модификацию известных природных соединений [37].

В процессе исследования взаимосвязи структура-активность группой французских ученых был синтезирован ряд гликозидных производных ребеккамицина, потенциальных противоопухолевых агентов, путем прикрепления части молекулы сахара к одному или обоим индольным азотам. Некоторые из этих соединений сохраняют генотоксичность путем интеркаляции в ДНК и/или топоизомеразы-I-опосредованного расщепления ДНК, таким образом имеют двойной механизм действия и могут избирательно индуцировать гибель раковых клеток [89].

ZW2-1 – новое производное индолокарбазола – 4(5,7-дигидроиндоло[2,3-b]карбазол-6-ил)фенол, обладающее активностью ингибирования гистондеацетилазы, играющей значительную роль в развитии некоторых видов рака, включая лейкемию. ZW2-1 подавляет популяционный рост в концентрации 2–12  $\mu\text{M}$ , индуцируя в клетках как апоптоз, так и

аутофагию. Данное соединение также вызывает дифференциацию в HL-60 и KB4 клетках путем увеличения экспрессии CD11b, CD14 и CD38 в концентрации 4  $\mu\text{M}$ . При относительно высоких концентрациях (8  $\mu\text{M}$ ) ZW2-1 значительно сокращается уровень внутриклеточной гистондеацетилазы. Таким образом ZW2-1 может быть одновременно новым противолейкозным агентом, индуцируя апоптоз и аутофагию, и способствуя дифференциации клеток [119].

Также одним из перспективных противоопухолевых препаратов из группы производных индолокарбазола является новый мультикиназный ингибитор – ЕС-70124. Протеинкиназы играют ключевую роль в развитии рака, в частности при тройном негативном раке молочной железы, являющимся практически неизлечимым заболеванием с ограниченными терапевтическими возможностями химиотерапии. ЕС-70124 является гибридом индолокарбазола, полученного путем комбинированного биосинтеза генов ребеккамицина и стауроспорина и показавшего в исследованиях *in vivo* антипролиферативное действие и противоопухолевую активность при лечении широкого спектра солидных опухолей путем ингибирования ключевых сигнальных точек [80].

### **1.1.2. Отечественные представители класса производных индолокарбазола. ЛХС-1208**

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (лаборатория химического синтеза) разработан оригинальный метод получения N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов, который дает возможность синтезировать аналоги вещества с различными углеводными остатками и/или заданными заместителями в гетероциклической части молекулы (агликоне). С использованием данного метода было синтезировано и охарактеризовано более 100 соединений производных индолокарбазола, цитотоксические свойства которых изучали в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина на культурах клеток меланомы линии MS (меланома Симпсона),

рака яичника человека линии CaOv и рака молочной железы линии MCF-7wt и в системе скрининга Национального института рака США на 60 клеточных линиях человеческих опухолей. В результате был отобран ряд активных соединений класса N-гликозидов производных индоло[2,3-а]карбазолов и проведены биологические исследования на перевиваемых опухолях животных по сравнительной оценке их противоопухолевых свойств *in vivo* [6, 20, 37–40, 58].

Соединения ЛХС-1006, ЛХС-999 и ЛХС-1208 были отобраны в качестве наиболее активных в противоопухолевом отношении в результате первичного отбора[20].

ЛХС-1006 или гликозид индолокарбазола – 12-( $\alpha$ -L-арабинопиранозил)-индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион, является структурным аналогом ребеккамицина и стауроспорина и обладает мощной ингибирующей активностью в отношении циклинзависимой киназы (Cdk1) и протеинкиназы C. При действии ЛХС-1006 механизмы клеточной гибели включают подавление пролиферации, прекращение клеточного цикла и инициацию программированной гибели клетки (апоптоз), которые проявляются в зависимости от лидерного соединения и его взаимодействия с конкретными внутриклеточными мишенями, концентрации. Важной для осуществления противоопухолевого эффекта ЛХС-1006 мишенью внутри клетки является двухцепочечная ДНК, при взаимодействии с которой формируются 2 вида комплекса с низкой и высокой константой. В результате этого связывания происходит снижение активности топоизомеразы I нарушение конформации дуплекса и p53-зависимая трансактивация генной транскрипции. При действии ЛХС-1006 характерной особенностью клеточной гибели является фенотип вакуолизации цитоплазмы, который связан с быстрым расширением лизосомального компартмента в результате влияния вакуолярной АТФазы. Соединение ЛХС-1006 является эффективным в отношении лимфоцитарной лейкемии P-388 (уровень

продолжительности жизни (УПЖ) 85 %) и эпидермоидной карциномы легкого Льюиса (Lewis lung carcinoma, LLC), при лечении которой сразу после окончания терапии торможение роста опухоли (ТРО) составляет 90 % и не утрачивается в течение 10 дней (ТРО = 54 %) [8, 20, 62].

В отличие от ЛХС-1006 более высоким противоопухолевым эффектом на Р-388 обладает производное 12-(β-D-галактопиранозил)-индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион (ЛХС-999) – УПЖ = 115 %. ТРО при терапии LLC ЛХС-999 непосредственно после окончания лечения заболевания также составляет 90 %, показатель сохраняется статистически значимым до десятого дня наблюдения (ТРО = 62 %). Соединения ЛХС-1006 и ЛХС-999 на меланоме В-16 не оказывают противоопухолевого эффекта [20].

При изучении цитотоксической активности синтезированных соединений из группы гликозидных производных индолокарбазола на культуре клеток рака толстой кишки человека НСТ-116 наибольший эффект был выявлен у 6-амино-12-(1-α-L-арабинопиранозил)индоло[2,3а]-пирроло[3,4с]карбазол-5,7-дион (ЛХС-1208), обладающего также цитотоксической активностью на клеточных линиях опухолей человека: LS174Т (рак толстой кишки), SKOV<sub>3</sub> (рак яичников), MeWo (меланома) и DU145 (рак предстательной железы) [40].

Противоопухолевую активность ЛХС-1208 изучали на 7 моделях перевиваемых опухолей мышей – лимфоцитарной лейкемии Р-388, лимфоидной лейкемии L-1210, асцитной опухоли Эрлиха, LLC, меланоме В-16 и раке шейке матки (РШМ-5), аденокарциноме толстого кишечника АКАТОЛ. Установлено УПЖ мышей с лейкозом Р-388 на 91 %, с асцитной опухолью Эрлиха на 198 % и высокий противоопухолевый эффект на солидных опухолях непосредственно после окончания лечения: ТРО составило в отношении LLC 91 %, меланомы В-16 – 91 % и РШМ-5 – 97 %.

На аденокарциноме АКАТОЛ непосредственный эффект составил ТРО 81 % и сохранялся на уровне 56 % до 29 дня [40].

В результате проведенных биологических исследований производное индолокарбазола ЛХС-1208 было отобрано для дальнейших исследований в качестве потенциального противоопухолевого препарата. На базе лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России выполнялись технологические исследования по разработке ЛФ производного индолокарбазола ЛХС-1208. При применении солюбилизаторов LutrolE-400/KollisolVPEG-400, применяемых только для перорального и местного использования, удалось достигнуть полного растворения гидрофобного вещества без добавления органического растворителя. Однако, в результате оценки эффективности на животных с экспериментальными опухолями модели пероральной ЛФ ЛХС-1208 не выявлено существенного терапевтического действия. Вследствие дальнейших исследований была разработана стабильная ИЛФ-лио ЛХС-1208 с использованием солюбилизатора Kollidon 17PF и соразтворителя активной субстанции ДМСО [31].

Сравнительное исследование эффективности субстанции и ИЛФ-лио ЛХС-1208 при внутрибрюшинном введении в продолжение 5 дней на модели LLC продемонстрировало превосходство ЛФ в дозе 110 мг/кг. При применении ЛФ ТРО находилось на уровне 74–75 % на протяжении 8 дней после окончания терапии, причем субстанция ЛХС-1208 при том же режиме применения и в той же дозе не оказывала противоопухолевого действия. Результаты доклинического изучения противоопухолевой активности ЛХС-1208 в ЛФ продемонстрировали значительную противоопухолевую активность на разного гистогенеза опухолях при различных режимах внутривенного введения: лимфаденоз Фишера L5178Y (УПЖ = 76 %, излечение в 33 % случаев), лимфобластоз Р-388 (УПЖ = 76 %) в дозе 25 мг/кг при ежедневном введении продолжительностью 5 дней; РШМ-5 (ТРО = 74–

56 % в течение 9 дней) и солидные опухоли LLC (ТРО = 95–81 % в течение 9 дней) в дозе 150 мг/кг при однократном введении [21].

Вследствие изучения противоопухолевой активности ИЛФ-лио ЛХС-1208 на модели LLC в широком диапазоне доз от 50 до 170 мг/кг установлена селективность противоопухолевого действия: терапевтический индекс  $TI_{50} = 2,8$ . Сравнительное исследование противоопухолевой активности ЛХС-1208 и ингибитора топоизомеразы I, препарата сравнения – иринотекана в соответствующих терапевтических дозах 150 и 66 мг/кг при однократном внутривенном введении, показало, что действие ЛХС-1208 достоверно превосходит эффект иринотекана по продолжительности торможения роста LLC: ТРО после окончания лечения в течение 20 дней составило 95–52 и 94–27 %, соответственно [22].

Доказано, что механизм противоопухолевого воздействия ЛХС-1208 связан с интеркаляцией в двухцепочечную ДНК и формированием высокоаффинных комплексов. Одна молекула ЛХС-1208 охватывает фрагмент, который равен 4–5 нуклеотидным остаткам. Повреждение конформации двойной спирали, вызываемые комплексообразованием нарушают матричные синтезы. Следовательно, в микромолекулярных концентрациях ЛХС-1208 ингибирует топоизомеразу I [22].

## **1.2. Липосомальные противоопухолевые препараты**

### **1.2.1. Липосомы как способ солюбилизации труднорастворимых в воде противоопухолевых ЛВ и повышения эффективности химиотерапии**

Исследования по разработке новых противоопухолевых препаратов обращены на получение таких ЛС, которые минимально повреждали здоровые клетки и ткани организма при максимальном ингибирующем действии на клетки опухоли. В течение длительного периода Поиск противоопухолевых веществ, в большей степени цитостатиков,

осуществлялся в основном эмпирически. Поэтому основная часть имеющихся противоопухолевых препаратов не имела вполне высокой селективности и оказывала побочное действие на здоровые, в первую очередь, интенсивно пролиферирующие ткани – костный мозг, эпителий слизистой оболочки кишечника, фолликулы волос, гонады [47].

Повышение эффективности химиотерапии опухолей идет по разным направлениям, одним из которых является создание оптимальной ЛФ для противоопухолевого агента.

Как правило, значительная часть ЛВ, которые оказывают цитотоксическое или цитостатическое действие, используются в ЛФ для внутривенного введения. Данная черта свойственна активным веществам, отличающимся малой шириной фармакологического действия и высокой реакционной способностью. Инъекционное введение подобных ЛФобеспечивает:

- стандартную и быструю биодоступность;
- требуемая скорость и место введения;
- возможность введения больших объемов жидкости капельно;
- точность дозирования ЛП;
- предотвращение разрушения препарата в желудочно-кишечном тракте;
- возможность завершения введения при возникновении нежелательных побочных эффектов.

Также противоопухолевые препараты могут приводить к повреждению тканей в месте введения. В данной ситуации применение разведенных до безопасной концентрации *extempore* цитотоксических препаратов возможно только в ЛФ для внутривенного введения [43].

Большинство современных фармацевтических субстанций, показавших при скрининге высокую биологическую активность, плохо растворимы в воде. Для получения ЛФ с высокой биодоступностью применяется целый ряд подходов, к числу которых относят химические, физические, физико-химические и технологические методы. Улучшить биологическую и фармацевтическую доступность ЛВ также позволяют комбинации этих методов [15].

Наиболее физиологически приемлемым способом увеличения растворимости активных противоопухолевых субстанций и, следовательно, их биодоступности, является использование биосовместимых наноструктурированных систем доставки – липосом.

Самыми важными аспектами, касающиеся перспектив практического применения липосом в клинике, являются следующие:

- липосомы как наноструктуры значительно ближе по своей химической структуре тканям организма, а именно к биологическим мембранам, чем фуллерены, дендримеры, нанотрубки, квантовые точки и другие;
- липосомы обладают свойством самосборки и деградации благодаря амфифильности молекул фосфолипидов без образования токсических метаболитов для организма человека;
- липосомы являются биологически обоснованными контейнерами для транспорта лекарств в организме человека, так как за счет своей бимолекулярной мембраны, предохраняют инкапсулированные препараты от преждевременного метаболизма лекарств метаболизирующими ферментами;
- липосомы позитивно изменяют фармакодинамические и фармакокинетические параметры ЛС, что делает их более биодоступными, а, следовательно, более активными, чем традиционные формы;

- липосомы проникают через гистогематические барьеры, в том числе и гематоэнцефалический барьер и проносят с собой ЛВ (транслокация и трансфекция);
- липосомы снижают токсичность ЛВ, что особенно важно при применении химиотерапевтических препаратов, используемых для лечения рака [29, 30, 50, 56, 67, 70].

Система, которая позволила бы сохранить высокий уровень ЛП в крови после внутривенного введения является главной целью доставки ЛС. При данном пути введения свободный ЛП вскоре разводится в большом количестве крови, в плазме снижается его концентрация и с клетками опухоли взаимодействует ЛВ на низком уровне. Липосомы, как никакая другая ЛФ, решают этот вопрос. Использование липосом при лечении рака базируется на возможности улучшения эффективности известных ЛС за счет изменения фармакокинетики препарата, что приводит к высокой эффективности и снижению токсичности. Необходимо также отметить медленное высвобождение ЛС из липосом, приводящее к пролонгированности действия и перенос липосомами нестабильных ЛВ, например, препаратов платины [50, 69].

Важным свойством липосом, которое обеспечивает их применение в лечении злокачественных новообразований, является их способность обеспечивать селективную доставку противоопухолевых субстанций к клеткам-мишеням путем пассивного и активного нацеливания.

После внутривенного введения липосомы опсонизируются, т.е. связываются белками-опсонинами, распознаваемыми клетками иммунной системы, осуществляющими фагоцитоз. Таким образом происходит быстрая элиминация липосом из кровеносной системы (в течение нескольких минут) и накопление их в печени (клетки Купфера), селезенке (макрофаги), а также, в меньшем количестве, в костном мозге. Для увеличения времени циркуляции липосом в кровеносной системе и повышения вероятности

достижения опухолевых клеток в состав липидных везикул вводят гидрофильный полимер полиэтиленгликоль либо фосфолипиды, образующие на поверхности липосом «щетину» – стерическое препятствие, не позволяющее молекулам опсонинов и макрофагам (клеткам иммунной системы, осуществляющим фагоцитоз) взаимодействовать с липосомами. У грызунов период полувыведения данных липосом повысился с 15 до 24 ч, у человека – свыше 45 ч [7, 50, 63, 118].

Накопление липосом со стерической оболочкой в ткани опухоли осуществляется за счет пассивного нацеливания или эффекта повышенной проницаемости и удерживания (Enhanced permeability and retention effect – EPR-effect). Эндотелиальные клетки сосудов опухоли пролиферируют в 30–40 раз активнее в отличие от эндотелиальных клеток сосудов здоровых тканей. Растущие опухоли ввиду больших потребностей в питательных веществах, кислороде, газовом обмене и удалении продуктов метаболизма создают беспорядочно расположенные капилляры со сверх высокой проницаемостью. Капилляры солидных опухолей характеризуются наличием крупных пор между эндотелиальными клетками (в зависимости от типа опухоли от 380–780 нм до 1,2 мкм), что влечет к увеличению проницаемости капилляров опухоли по сравнению с капиллярами здоровых тканей (размер пор около 7 нм). Явное отличие в проницаемости кровеносных сосудов здоровых и опухолевых тканей представляется положительным фактором, способствуя накоплению липосом в опухолевой ткани, которые не могут проникать через эндотелиальный барьер в здоровых тканях, но активно проникают в опухоли. Самая васкуляризованная область опухолей – периферическая, в то время как центральная часть в результате нарушенного кровоснабжения, как правило, некротизирована (Рисунок 2). Клетки опухоли выживают на расстоянии от кровеносного сосуда около 110 мкм. Чтобы все клетки опухоли получили необходимое количество ЛП, молекулам вещества или липосомам, загруженным препаратом, необходимо проникнуть через опухолевое

интерстициальное пространство к удаленным клеткам. Вследствие значительного интерстициального давления среды, которое гораздо выше в опухолях, чем в окружающих нормальных тканях, данный процесс труден. На интерстициальное давление влияет размер опухоли и ее расположение, с градиентом от центра опухоли к периферии. Интерстициальное давление среды возрастает пропорционально опухоли. Однако давление в капиллярах опухоли в свою очередь может быть на 1–2 порядка выше, чем давление в здоровых тканях, таким образом, упрощается проникновение липосом в ткань опухоли. Подобным образом липосомы избирательно накапливаются в опухоли [5].

Активное нацеливание заключается в прикреплении какого-нибудь специфично направленного лиганда к поверхности везикул, таким образом усиливая связывание с тканями и клетками, через взаимодействие с подходящими маркерами, расположенными на поверхности данных клеток. Известно несколько стратегий для прикрепления аналогичного молекулярного адреса к липосомальной поверхности. Присоединение молекулы может осуществляться как непосредственно к гидрофобному якорю, так и посредством спейсера. Поскольку для прикрепления спейсера важное значение имеют его строение и длина, выбор данных молекул проводится с учетом предотвращения сложностей во взаимодействии лиганда и полимерных цепей, которые обеспечивают стерическое покрытие липосомальной частицы [7].

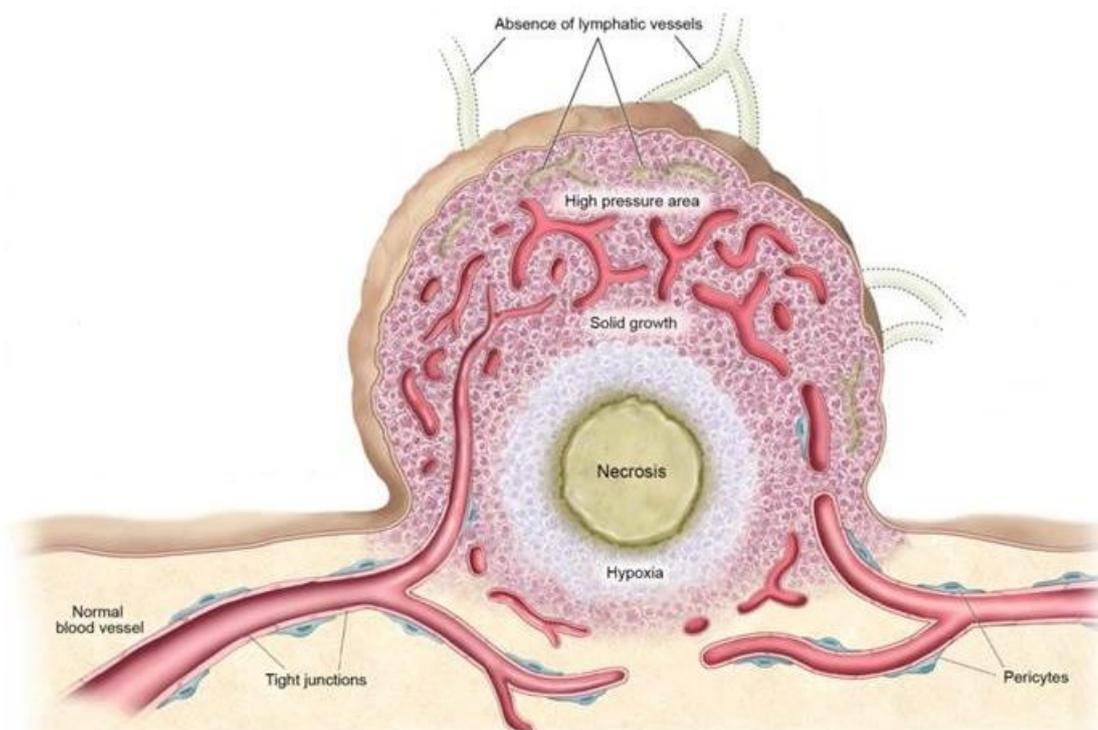


Рисунок 2. Структура опухоли

Обозначения: absenceoflymphaticvessels – отсутствие лимфатических сосудов, highpressurearea – область высокого давления, solidgrowth – устойчивый рост, necrosis – некроз, hypoxia – гипоксия, pericytes – перициты (перикапиллярные клетки), tightjunctions – плотные соединения, normalbloodvessel – нормальный кровеносный сосуд.

Применение липосом, меченых антителами – молекулами, специфично распознаваемыми определенными рецепторами на поверхности только опухолевых клеток, позволяет вводить ЛС только в клетки-мишени, что значительно уменьшает сильное токсическое воздействие противоопухолевых препаратов на организм. Поскольку на клетках не всех типов опухолей имеются рецепторы, распознаваемые антителами, применяются приемы направленного транспорта ЛП к опухолевым клеткам, связанные с:

– прикреплением к липосомам лигандов, распознаваемых определенными участками поверхности опухолевых клеток (олигосахаридов, витаминов, пептидов, белков);

– включением в состав липосом холестерина, химически модифицированного лигандами для специфического связывания с определенными органами или типами клеток;

– включением в состав липосом парамагнитных наночастиц, приводимых в движение при наложении статистического магнитного поля, для нацеливания липосом прямо к больному органу [63].

*Иммунолипосомы* – липосомы, к поверхности которых прикреплены молекулы моноклональных антител или их фрагменты. Мишенями иммунолипосом могут выступать мембранные антигены, неограниченно расположенные на клетках опухоли вновь образующихся сосудов и отсутствующие на здоровых клетках. Применение «адресных» липосом позволяет оптимизировать лечебные свойства ЛВ, а также корректировать терапевтическую дозу. Данный класс липосом широко изучаются уже более 10 лет, но в то же время эти работы представлены лишь интенсивными доклиническими исследованиями. Клинические испытания иммунолипосомального препарата еще не проводились, что обусловлено вероятностью возникновения осложнений при применении в качестве векторов доставки моноклональных антител мыши. Однако за последнее время ситуация внезапно изменилась. Доступным средством в руках исследователей оказались неиммуногенные одноцепочечные антитела, которые легко видоизменять и прикреплять к липосомальной поверхности. Таким образом в этой области стоит ждать стремительного прогресса и появления в онкологической практике следующего поколения иммунолипосомальных ЛП [5, 50].

В последнее время значительное внимание получили исследовательские работы по части использования липосомальных ЛС в комбинации с различными экзогенными (свет, ультразвук, нагрев) и эндогенными (пониженное значение рН, наличие специфических ферментов) воздействиями, а также их сочетания, которые способствуют повышению

селективности доставки ЛВ к месту действия и регулировать его высвобождение из липосом внутри опухоли. Механизм действия данных липосом заключается в ответе на триггерное действие, провоцирующее деструкции мембраны липосом, вследствие которой в опухолевую ткань высвобождается инкапсулированное ЛВ. Регулируемое высвобождение наиболее необходимо при лечении активно прогрессирующих опухолей, при котором для проявления стойкого противоопухолевого эффекта требуется быстрое создание высоких концентраций вещества [19].

Из этого следует, что ЛП на основе липосом обладают выраженной противоопухолевой активностью, а также снижают токсичность цитостатических агентов, более того, могут быть применены с целью преодоления лекарственной устойчивости к свободным формам химиотерапевтических препаратов, заключенных в липосомы [69].

Липосомальные препараты различной направленности используются в практике мировой фармакологии уже более двух десятилетий. Кроме того, ведутся активные разработки новых липосомальных ЛП (Таблица 1). Липосомальные препараты широко используются в первую очередь в онкологии, в вакцинологии, дерматологии, офтальмологии, пульмонологии и иных областях медицины [11, 12, 32, 34].

Таблица 1

Некоторые липосомальных препаратов

Фармакологическая группа	Активное вещество	Ссылка [ ]
Противоопухолевые антибиотики	Доксорубин	114
	Даунорубин	98
Алкилирующие средства	Цисплатин	79
	Лизомустин	23
Противоопухолевые соединения растительного происхождения	Винкрестин	93
	Паклитаксел	113
	9-нитрокамптотецин	129
Антиметаболиты	Комбрестатин	42
	Цитарабин	84
Местноанестезирующее средство	Бупивакаин	120

НПВС	Мелоксикам	86
Корректоры метаболизма костной и хрящевой ткани	Алендронат	87
Антибиотики группы аминогликозидов	Амикацин	123
Хинолоны/Фторхинолоны	Ципрофлоксацин	82
Антигельминтные средства	Албендазол	97
Противогрибковые средства	Амфотерицин В	110

### 1.2.2. Общая характеристика и классификация липосом

Впервые липосому создал англичанин О. Леман почти 100 лет тому назад – в 1911 г., а в середине 60-х гг. английский ученый А. Бэнгхем выяснил и опубликовал сведения, как устроены липосомы [4, 56].

Установлено, что липосомы – это небольшие самообразующиеся сферической частицы размером от 50 до 1000 нм. Водная фаза липосом окружена одним или несколькими бислоями, получаемые из фосфолипидных молекул [36, 73].

Фосфолипиды по химической структуре относятся к группе амфифильных веществ. Молекулы фосфолипидов состоят из обладающей сродством к воде гидрофильной полярной головки и гидрофобных неполярных углеводородных цепей. В липосомальной мембране гидрофобные цепи липидов обращены друг к другу и формируют внутри неполярную область, тем временем как их полярные части расположены на поверхности бислоя и защищают гидрофобные цепи от контакта с водой. Тенденция к предотвращению контакта углеводородных цепей с водой способствует сворачиванию плоской мембраны в везикулы сферической формы (Рисунок 3) [4].

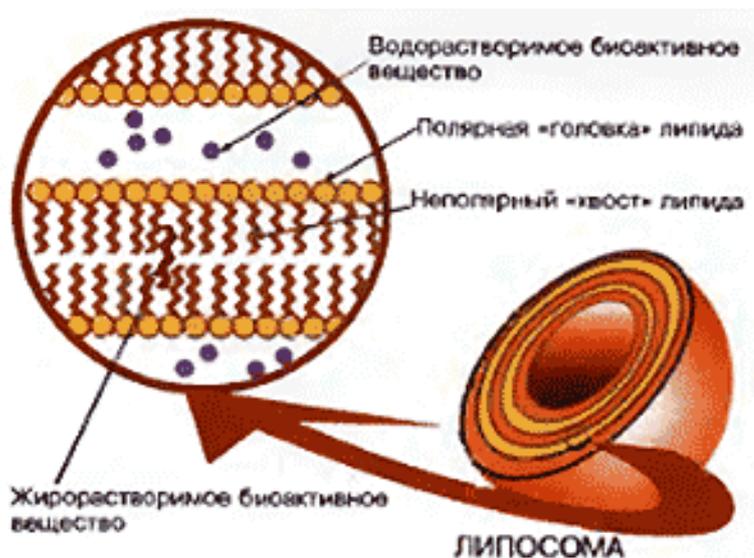


Рисунок 3. Строение липосомы

Важным положительным свойством липосом, который является уникальным средством для решения всесторонних медицинских задач, заключается в способности инкапсулировать различные соединения независимо от размеров молекул и свойств и их химической природы – от неорганических ионов и низкомолекулярных органических соединений до нуклеиновых кислот и крупных белков. Липосомы позволяют получить ЛЛФ как гидрофильного, так и гидрофобного вещества, а также препарат, содержащий обе субстанции одновременно. При этом водорастворимые соединения инкапсулируются во внутреннее гидрофильное ядро липосомы; гидрофобные и жирорастворимые ЛВ включаются непосредственно в липидный бислой. Вещества, одновременно имеющие гидрофобные и гидрофильные группы, могут содержаться в водной среде как вне, так и внутри липосомы и в бислое [12, 18, 32, 35, 46, 60, 66, 71, 85].

Липосомы могут быть приготовлены с использованием многих фосфолипидов природного и синтетического происхождения, насыщенных и ненасыщенных, нейтральных или заряженных (положительно или отрицательно). Наиболее часто используют для приготовления липосом такие фосфолипиды, как яичный и соевый фосфатидилхолин, синтетические дипальмитоил-DL- $\alpha$ -фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, сфингомиелин,

фосфатидилинозитол. Липосомы, состоящие из фосфолипидов с насыщенными остатками жирных кислот, значительно хуже подвергаются экструзии через мембранные фильтры. В связи с этим при изготовлении липосом необходимо учитывать характеристики смеси липидов. В то же время, липосомы, состоящие из насыщенных жирных кислот, являются более стабильными в сравнении с липосомами, состоящими из яичного фосфатидилхолина. Обычно в качестве основного липида для приготовления липосом используется цвиттер-ионный или неионный липид. Поверхностный заряд липосомы можно модифицировать включением в состав положительно заряженных липидов, таких как стеариламин, или отрицательно заряженных, таких как дисфосфатидилглицерин, диацетилфосфат, фосфатидилглицерол, фосфатидилсерин, фосфатидная кислота. Присутствие отрицательно или положительно заряженных липидов приводит к увеличению общего объема водной фазы во внутреннем пространстве липосомы (в результате отталкивания соседних бислоев) и уменьшению вероятности агрегации липосом после их приготовления [11, 25, 36, 48, 63, 68, 71, 104, 115].

Известно, что липосомы, состоящие только из фосфотидилхолина, отличаются низкой стабильностью и высокой степенью утечки препарата. Для стабилизации фосфатидилхолина в состав липосом вводят холестерин. Молекулы холестерина играют важную роль в фазовом переходе фосфолипидного бислоя. Когда молекулы холестерина присутствуют в фосфолипидном бислое, образуется третья фаза, т.е. жидкая упорядоченная фаза, вместо твердой упорядоченной или жидкой неупорядоченной фазы. Поэтому молекула холестерина, взаимодействуя с двумя молекулами фосфолипида, предотвращает их переход через гель в жидкокристаллическую фазу. Включение холестерина в липидную бислойную мембрану обычно приводит к повышению стабильности липосом в сыворотке, уменьшению проницаемости мембран к растворимым в воде молекулам и повышению текучести или микровязкости бислоя [48, 63].

Липидная мембрана, несмотря на толщину молекулы (около 4 нм), обладает исключительной гибкостью и механической прочностью. Липиды в жидкокристаллическом состоянии имеют высокую молекулярную подвижность, поэтому бислои представляют собой вполне текучую, жидкую фазу, вследствие чего липосомы при различных повреждениях сохраняют целостность структуры, а их бислой способен к самозалечиванию дефектов, возникающих в нем. При этом текучесть бислоя и его гибкость обеспечивают высокую пластичность липосомам. Например, при изменении осмотической концентрации внешнего водного раствора везикулы меняют форму и размер. Целостность мембраны может нарушиться при сильном осмотическом стрессе бислоя, и как следствие липосомы могут разделиться на более мелкие везикулы [4].

В зависимости от размера и количества бислоев липосомы подразделяются на несколько классов (Таблица 2). По своей структуре липосомы бывают однослойными (моноламеллярные) и многослойными (мультиламеллярные). Однослойные липосомы подразделяются на мелкие (20–200 нм), большие (200–1000 нм) и крупные (более 1000 нм). Многослойные липосомы имеют размеры от нескольких сотен до тысяч нм [86, 112].

На размер и форма липосом, образующихся в воде, влияет ряд факторов – присутствия солей, кислотность среды и т.д. При этом липосомы могут иметь не только глобулярную форму, а представлять собой длинные и тонкие трубки или уплощенные дискообразные структуры (тубулярные липосомы и дискомы, соответственно) [4].

Таблица 2

## Классификация липосом

№	Название липосом	Обозначение	Количество бислоев	Размер, нм
1	Мультиламеллярные (многослойные)	МЛЛ или МСЛ	от 2 до нескольких	500–5000

2	Крупные одноламеллярные (однослойные)	КОЛ	1	более 1000
3	Большие одноламеллярные (однослойные)	БОЛ	1	200–1000
4	Малые одноламеллярные (однослойные)	МОЛ	1	20–200

### 1.2.3. Методы получения липосом

Существуют различные методы приготовления липосом, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Выбор способа определяется поставленными при разработке ЛЛФ задачами, а также от физико-химических свойств активной субстанции и липидов. Характеристика наиболее распространенных способов получения липосом представлены ниже.

#### *Метод липидной пленки или конвекционный метод*

Согласно методу, фосфолипиды растворяются в органическом растворителе (этанол, метанол, хлороформ и др.) и выделяются из раствора, формируя тонкую пленку на стенках колбы посредством упаривания растворителей на роторном испарителе в условиях вакуума. Получение пленки из липидов осуществляют перемешиванием органического раствора липидов при температуре 37–43 °С. При приготовлении липосом с липофильным веществом получают раствор субстанции в подходящем органическом растворителе, который смешивают с раствором липидов. Для получения МСЛ пленку липидов с активной субстанцией гидратируют водой или буферным раствором. Гидрофильные ЛВ растворяют в воде или буферном растворе, предназначенными для гидратации липидную пленку. При приготовлении липосом требуется учитывать ряд факторов: концентрация липидов и соотношение липид/ЛВ, рН и ионная сила буфера, физико-химические свойства используемых компонентов, заряд липида.

Кроме того, температура гидратации должна быть выше температуры фазового перехода применяемых липидов необходимо. С целью защиты липидов от процессов окисления липосомальную дисперсию насыщают инертным газом [53, 63, 68].

**Озвучивание** – метод приготовления липосом, который заключается в воздействии на водно-липидную смесь ультразвуковых волн. В аспекте технологии производства способ имеет следующие недостатки: нагревание смеси, окисление и гидролиз липосомальных липидов в процессе обработки, длительность процесса и низкая производительность. Полученные липосомы нестабильны при хранении, поэтому возникает необходимость добавления стабилизирующих веществ. Помимо этого образующиеся липосомы имеют неоднородный состав. Ультразвук часто приводит к нарушению структуры ЛВ и быстрому перекисному окислению фосфолипидов [27, 51, 67].

**Экструзия** – метод получения липосом, который заключается в продавливании дисперсии МСЛ под высоким давлением через поры в мембране. Экструдирование липосомальных дисперсий проводят на экструдерах, работающих под высоким давлением. Размер липосом, получаемых при экструзии, зависит от диаметра пор мембранного фильтра, его материала, а также определяется липидным составом и концентрацией компонентов. Преимуществами данного метода является получение липосом однородного состава, минимальная степень окисления и гидролиза используемых липидов, высокая производительность, стабильность структуры ЛВ и везикул, отсутствие воздействия температуры при проведении процесса [17, 27, 54].

### ***Гомогенизация***

Гомогенизация осуществляется в гомогенизаторах высокого давления, вследствие чего крупные везикулы при продавливании дисперсии липосом через специальный клапан под действием высокого давления разделяются на более мелкие. Основными достоинствами метода гомогенизации являются

высокая производительность процесса, минимальная степень окисления и гидролиза используемых липидов, полученные липосомы стандартны по составу, стабильность большинства ЛП/субстанций и самих липосомальных везикул. Также важным преимуществом является наличие для проведения работ под высоким давлением стандартного промышленного оборудования и производство ЛП в закрытом режиме в асептических условиях с возможностью полного контроля технологических параметров. Для отвода выделяемого насосом при сжатии тепла липосомальную дисперсию необходимо постоянно охлаждать. Критическими факторами при гомогенизации являются давление в гомогенизаторе, температура, число циклов или время рециркуляции липосомальной дисперсии. Важное значение [24, 28, 53].

В основе *метода спонтанной везикуляции липидов* лежит формирование липосом посредством быстрого подщелачивания смесей воды и фосфолипидов. Метод имеет ряд ограничений вследствие небольшого числа используемых фосфолипидов (фосфатидилхолин и фосфатидные кислоты) и высокой скорости протекания процесса, что для получения ЛП в больших объемах не совсем технологично. Кроме того, высокий уровень pH (9,0 и более) технологического процесса и существенное влияние температуры не допускают применение метода для ряда ЛВ [27].

Липосомы также можно приготовить путем растворения липидов в органическом растворителе и впрыскивания полученного раствора в водную среду. Данный способ получил название *инжекция*. Достоинства метода включают возможность контролировать размер получаемых липосом посредством регуляции температуры водной фазы и скорости перемешивания, выбор растворителя для фосфолипидов и их концентрации. Недостатки метода – нестандартность и низкая устойчивость получаемых липосом, низкая эффективность инкапсуляции вещества в везикулы [27].

**Метод растворения и удаления детергента** включает применение детергента (неионного, анионного или катионного сурфактанта) для растворения липидов. Процедура включает растворение липидов в водном растворе детергента и белков, подлежащих инкапсуляции. Детергент должен иметь высокую концентрацию мицеллообразования, так что он легко удаляется диализом или колоночной хроматографией. В результате образуются везикулы диаметром 0,08–0,2 мкм [63].

**Метод обращения фаз** состоит в быстром введении водного раствора ЛВ в органический растворитель, содержащий растворенные липиды, при одновременной звуковой обработке смеси, что приводит к образованию капель воды в органическом растворителе (эмульсии типа «вода в масле»). Полученная эмульсия высушивается до полутвердого геля в роторном испарителе, который подвергается сильному механическому воздействию до получения фазового изменения из дисперсии «вода в масле» в «масло в воде» (т. е. водную суспензию везикул). В процессе механического действия часть капель воды формируют внешнюю фазу, при этом другие образуют внутри везикул замкнутый водный объем. Таким образом получают липосомы диаметром 0,1–1,0 мкм [63].

#### **1.2.4. Стерилизация липосом**

Существенным этапом в разработке ЛС на основе липидных везикул для инъекционного применения является выбор способа стерилизации. Вследствие гидролитической неустойчивости и термолабильности противоопухолевых соединений и подверженности образующих липосомальный бислой липидов перекисному окислению и гидролизу, основные существующие методы стерилизации (термические) не подходят для производства липосомальных препаратов. Поэтому стерилизацию липосом в основном проводят посредством фильтрации через стерильные мембраны с последовательным снижением диаметра пор от 1,2 до 0,22 мкм. Необходимо проводить исследования по выбору оптимального материала

фильтра с минимальной сорбцией активной субстанции и липосом. При этом способ и режим фильтрации не должны приводить к снижению фармакологического эффекта ЛП и оказывать минимальное влияние на стабильность липосом [61].

Однако некоторые авторы [27] не исключают возможность применения термических методов стерилизации липосом, которая определяется двумя факторами: устойчивостью везикул к окислению и термостойкостью инкапсулируемых ЛВ. Так, например, не выявлено изменения и физико-химических свойств ЛП в случае тепловой стерилизации липосом, образованных липидами с насыщенными жирными кислотами. Для повышения устойчивости липосом в процессе термической стерилизации также применяют стабилизаторы. В исследованиях наилучший эффект в качестве стабилизаторов, препятствующих процессу окисления липосомальных фосфолипидов, показал сульфит натрия. Радикалы  $\text{SO}_3^-$  способны связывать гидроксил-ионы и, как следствие, уменьшать образование свободных радикалов НО. Например, при автоклавировании липосомального геля с цитарабином, являющегося перспективной ЛФ для лечения глиобластомы, сульфит натрия обеспечивал стабильность действующего вещества и фосфолипидов [97].

Теплое воздействие во многих случаях не позволяет обеспечить надежную стерильность препарата, полная гарантия стерильности липосомальных препаратов может быть обеспечена при проведении технологического процесса в условиях GMP [27].

Также одним из возможных способов стерилизации липосомальных препаратов для парентерального применения является  $\gamma$ -облучение.  $\gamma$ -излучение характеризуется глубоким проникновением и эффективно убивает микроорганизмы. Тем не менее, облучение может влиять на качество обрабатываемого препарата: его ионизирующее свойство может привести к фрагментации ковалентной связи. Основной критической точкой при

радиационной стерилизации является доза облучения. В ряде исследований по стерилизации липосомальных препаратов эффективная доза ионизирующего облучения, обеспечивающая получение качественного продукта, составила значения менее 25 кГр [102, 113].

### **1.2.5. Лиофилизация как способ стабилизации липосомальных препаратов**

Главным препятствием применения липосом в медицинской практике является их неустойчивость в процессе хранения. Известно, что фосфолипидные мембраны подвержены гидролизу, поскольку в структуре липидов имеется сложноэфирная связь. В результате гидролиза перестройка липидов с ламеллярной структурой в мицеллярную с образованием жирных кислот и лизофосфатидилхолина, что в конечном итоге способствует повышению проницаемости бислоя. Другим путем деградации липидов и, как следствие, увеличения проницаемости бислоя является перекисидация ненасыщенных ацильных цепей [10].

Для липосомальных препаратов следует различать два типа стабильности – химическую стабильность отдельных компонентов (т.е. липидов и основного вещества) и стабильность комплексов липидов с введенными ЛВ. Стабильность химического состава можно достичь подбором оптимальных температурных режимов хранения. Для стабилизации комплекса липид–ЛВ используют метод сублимационного высушивания [27].

Лиофилизация – это способ стабилизации, включающий замораживание раствора препарата, удаление растворителя (главным образом, воды) методом сублимации (первичная сушка) и десорбции (вторичная сушка). Использование сублимационного высушивания с целью повышения устойчивости ЛЛФ препятствует возникновению гидролиза лабильных ЛВ и липосомальных липидов, при этом благодаря низкой молекулярной подвижностью липидов в твердой фазе тормозятся процессы физической и

химической деградации. Поскольку, самосублимационное высушивание может способствовать разрушению структуры бислоя липосом, требуется ее проведение в определенном режиме и с введением криопротекторов – специальных веществ, которые обеспечивают стабильность структуры мембраны [3].

Режим лиофилизации влияет на стабильность липосомального препарата, размер везикул и уровень включения в липосомы ЛВ. Лиофилизации позволяет получить сухую форму препарата липосом, стабильную при хранении и легко восстанавливаемую до дисперсии при добавлении регидранта. Поскольку процесс сублимации включает замораживание дисперсии с последующим удалением воды, появляется проблема, связанная с тем, что на этапах замораживания и обезвоживания может произойти физическое повреждение бислоевой структуры, необходимо тщательно следить за процессом лиофилизации. Кроме того, когда мембрана липосом достигает температуры фазового перехода, происходит ее переход из гелевой фазы в жидкокристаллическую и включенное вещество легко высвобождается из везикул. Также одним из наиболее существенных факторов при сублимации является подбор криопротектора, который не должен кристаллизоваться при замерзании, т. е. не должен иметь эвтектические свойства. Среди криопротекторов выделяют вещества, относящиеся к различным классам химических соединений. Однако при лиофилизации липосомальных препаратов наиболее эффективными являются углеводы – сахароза, лактоза, трегалоза и др. [3, 28, 77, 122, 123].

При типичном цикле замораживания и сушки внешнюю температуру снижают с постоянной скоростью, пока эта температура не окажется ниже температуры замерзания продукта. Скорость охлаждения выбирают такой, чтобы могли образоваться кристаллы льда, что впоследствии облегчает сублимацию воды из замороженного образца. Как правило, температура

изменения матрицы растворенного вещества дисахаридов (сахароза, мальтоза, лактоза) находится между  $-30$  и  $-33$  °С, а моносахаридов (глюкоза и фруктоза) – между  $-40$  и  $-48$  °С. Считается, что использование веществ-криопротекторов с более высокими температурами превращений матрицы обладает рядом достоинств, включая ускорение этапа первичной сушки [28].

Следовательно, криопротектор после предотвращения фазового перехода, предохраняет при замораживании мембраны липосом от повреждения кристаллами льда и предотвращает их слияние и агрегацию. Введение перед замораживанием с последующей сублимацией криопротектора в водную фазу дисперсии липосом (внутри и снаружи) способствует предотвращению фазового расслоения липидной смеси, защите включенного активного вещества от вытекания и сохранению способности липосомального лиофилизата к регидратации [3].

Начальную фазу дегидратации называют первичной сушкой, которая, в значительной мере, включает в себя сублимацию воды из кристаллов льда – происходит удаление до 80–85 % свободной воды, притом, что скорость сушки постоянна и составляет 40–50 % от общего времени. Во время первичной сушки температура продукта остается существенно ниже внешней в результате потери тепла при испарении воды. Когда первичная сушка закончена, температура продукта повышается и становится равной внешней температуре в лиофилизаторе. В этот момент внешнюю температуру можно повысить, чтобы облегчить удаление остатков воды, в процессе, именуемом вторичной сушкой. На этом этапе удаляется до 95–98 % связанной воды, т.е. входящей в структуру липосом [28].

В задачу исследователя-разработчика входит отработка ряда критических точек, в том числе время замораживания и сублимации, определение точки эвтектики и ряд других факторов. При этом в каждом конкретном случае режим лиофилизации должен быть подобран индивидуально экспериментальным путем.

Например, при разработке режима лиофилизации липосомального тиосенса изучали влияние на качество препарата предварительной заморозки и замораживания в камере лиофильной сушки. С этой целью дозировали липосомальную дисперсию во флаконы и помещали в низкотемпературную камеру, постепенно замораживая препарата от +20 до -50 °С, после того как образцы достигнут температуры  $-(45 \pm 2)$  °С их выдерживали в течение 6–7 ч в данных условиях. Затем флаконы выставляли на полки лиофильной сушки и сублимировали. При замораживании в камере сублимационной сушки ЛЛФ тиосенса, дозированную во флаконы, сразу загружали на полки камеры сушки и проводили лиофилизацию. При сравнительном анализе полученных с применением вышеуказанных методов заморозки лиофилизатов, выявлено, что подвергавшиеся предварительному замораживанию образцы имели вкрапления и не сохраняли исходный размер после регидратации. В результате анализа образца лиофилизата, лиофилизация которого прошла в камере сублимационной сушки без предварительного замораживания, в структуре препарата не обнаружено вкраплений, а размер липосом находился на допустимом уровне [53].

С целью выбора подходящего режима лиофилизации дисперсии липосом фотодитазина осуществляли процесс сублимационной сушки тремя методами, которые отличались по скорости и времени замораживания препарата и его первичной сушки. Анализ полученных лиофилизатов по показателю уровня включения ЛВ в везикулы и размеру липосом показал, что оптимальным является режим с постепенным замораживанием в камере сублимационной установки и медленным подъемом температуры. В то же время результаты исследований по разработке оптимального режима лиофилизации ЛЛФ борхлорина показали, что показатели качества конечного продукта не зависят от способа замораживания и режимы с медленным и быстрым замораживанием позволяют получить качественные образцы лиофилизатов липосомального борхлорина [1, 17].

### 1.2.6. Характеристика и контроль качества липосомальных препаратов

Характер действия липосом *invitro* и *invivo* определяется их физическими и химическими свойствами. Таким образом, важным является наличие аналитических методов для установления и контроля этих свойств. При приготовлении и контроле качества липосом на различных этапах применяются самые различные физико-химические методы исследования, которые подробно описаны в отечественной и иностранной литературе. Качество такого специфического продукта как липосомальный препарат определяется индивидуальными особенностями ЛВ и определенной совокупностью физических и химических свойств компонентов в ЛФ. В таблице 3 приведены характеристики липосомальной композиции и методы их оценки на различных этапах разработки препарата, а также контроля качества готового коммерческого продукта [98, 100, 114, 127].

Таблица 3

Характеристики и показатели качества липосомальных препаратов

	Характеристика	Метод анализа
ОСНОВНЫЕ	рН	Потенциометрия
	Осмолярность	Осмометрия
	Захваченный объем	Измерение внутрилипосомальной водной фазы
	Концентрация фосфолипидов	Определение содержания липидного фосфора (модифицированный метод Барлетта), ВЭЖХ, ферментативный анализ
	Фосфолипидный состав	ТСХ (в комбинации с методом Барлетта), ВЭЖХ
	Состав ацильных цепей фосфолипида	ГХ
	Концентрация холестерина	Ферментативный анализ, ВЭЖХ
	Остаточный органический растворитель и тяжелые металлы	ЯМР, ГХ, фармакопейная статья
	Соотношение активное соединение/фосфолипид	Определение концентраций активного соединения и фосфолипида
	[H] <sup>+</sup> или ионный градиент до и после активной загрузки	Флюоресцентный анализ, определение ЭПС, <sup>31</sup> P-ЯМР, <sup>19</sup> F-ЯМР, концентрация внутрилипосомального ионов
ХИМИЧЕСКИЕ	Гидролиз фосфолипидов	ВЭ-ТСХ, ВЭЖХ
	Концентрация ненасыщенных жирных кислот	ВЭЖХ или ферментативный анализ
	Окисленность ацильных цепей фосфолипида	Обнаружение системы сопряженных двойных связей, определение перекисного окисления

		липидов, реакция с тиобарбитуровой кислотой, ГХ
	Окисленность холестерина	ТСХ, ВЭЖХ
ФИЗИЧЕСКИЕ	Внешний вид	Фармакопейная статья (визуально)
	Диаметр везикул и распределение по размерам	Динамическое светорассеяние, лазерное светорассеяние, фотонная корреляционная спектроскопия, турбидиметрия, гель-фильтрация, микроскопия
	Поверхностный заряд и электрический потенциал	Свободный электрофорез, измерение дзета-потенциала
	Термотропное состояние, фазовый переход и фазовое разделение	Дифференциальная сканирующая калориметрия, ЯМР, флюоресцентные методы, инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье, рамановская спектроскопия, ЭПС
	Содержание не включенной субстанции	Гель-фильтрация, ионообменная хроматография, осаждение полиэлектролитом, (ультра)центрифугирование
МИКРО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ	Стерильность	Фармакопейная статья
	Пирогенность	Фармакопейная статья

Заключительным этапом получения липосомальных препаратов является контроль качества готового препарата сразу после приготовления и в процессе хранения для изучения устойчивости. При исследовании показателей качества липосомальных препаратов базируются на анализе 3-х групп параметров:

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

II – показатели, которые характеризуют готовую ЛФ – pH, стерильность, пирогенность (эндотоксины), аномальная токсичность и др.

III – показатели, определяющие характеристики липосом – размер и дзета-потенциал везикул, количество включенного ЛВ и др. [26].

Таким образом должны исследоваться те свойства готовой ЛФ, которые могут изменяться при хранении и влиять на ее, при этом методы количественного анализа должны давать возможность для характеристики стабильности препарата [28].

Существенным параметром устойчивости липосомальных препаратов является присутствие примесей. Качественно и количественно оценить содержание примесей в процессе получения и хранения липосомальных форм можно методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), по определению индекса окисления липидов и перекисного числа. В ходе окисления липидов с ненасыщенными связями наблюдается перегруппировка двойных связей в диеновую конъюгированную систему; в результате образуется продукт называемый малоновым диальдегидом (МДА), содержание которого наиболее часто контролируют по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой и последующим спектрофотометрическим определением продукта реакции. Для определения степени окисления также применяется адсорбционная спектроскопия в ультрафиолетовой области, основанная на обнаружении системы сопряженных двойных связей, что характеризуется появлением нового максимума в спектре поглощения при 233 нм. Индекс окисленности (соотношение интенсивности полос поглощения в УФ спектре анализируемых липидов,  $A_{233}/A_{215}$ ) может достаточно полно отражать процессы окисления, проходящие в липидах как в ходе получения и хранения липидов, так и при формировании липосом [10, 28].

Для оценки стабильности липосомального препарата также проводят определение дзета ( $\zeta$ )-потенциала, электрического потенциала, возникающего на поверхности скольжения за счет взаимодействия частицы и дисперсионной среды.  $\zeta$ -потенциал является мерой электростатического взаимодействия между частицами и важным критерием, определяющим устойчивость дисперсных систем. В соответствии с теорией ДЛФО (Дерягина, Ландау, Фервея и Овербека), теорией агрегативной стабильности дисперсных систем, устойчивость обуславливается двойным электрическим слоем и наличием Ван-дер-Ваальсовых сил, которые обеспечивают сближение частиц друг с другом. Образованный силами отталкивания энергетический барьер должен быть в достаточной степени большим,

способным не допустить взаимодействие частиц друг с другом, их сцепление и формирование агрегатов. При преодолении данного барьера за счет Ван-дер-Ваальсовых сил будет наблюдаться взаимодействие и адгезия частиц между собой, что нежелательно в случае липосомальных систем доставки различных веществ. Важной задачей при изготовлении липосомальных препаратов является получение устойчивой монодисперсной системы со стабильным размером везикул. Таким образом, поскольку заряд является причиной взаимодействия везикул,  $\zeta$ -потенциал является показателем стабильности липосомальной системы. Липосомы с высоким отрицательным или положительным  $\zeta$ -потенциалом отталкиваются друг от друга и остаются монодисперсными и стабильными. Липосомальные частицы, обладающие низким  $\zeta$ -потенциалом, имеют склонность к слиянию, агрегации и формированию неустойчивых составов. Определение данного показателя позволяет сделать предположение о возможности взаимодействия липосом с белками, липопротеинами, мембранами клеток при их системном введении. Кроме того,  $\zeta$ -потенциал позволяет определить структуру липосом с инкапсулированным ЛВ – содержится оно снаружи или внутри них, что имеет большое значение, поскольку вещество, адсорбированное на поверхности может быть подвергнуто ферментной деградации или быстро высвободиться из ЛФ сразу после введения [12, 88].

Важной задачей является разработка способа количественного анализа ЛВ, инкапсулированного в везикулы, причем определение содержания вещества должно осуществляться и в ходе получения липосом и их сублимации, и при хранении лиофилизата в течение срока годности. Данная проблема должна исследователем конкретно для каждого вида липосом, причем обязательным условием применения метода является его валидация. Основными методами количественного анализа действующего вещества в липосомальной форме является спектрофотометрия в УФ- и видимых областях спектра и ВЭЖХ [26, 28, 52, 59, 65, 83, 94, 121].

Для определения размеров липосом используют методы динамического рассеивания света (ДРС) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Установлено, что определенные методом ДРС размеры липосом на 5–7% больше везикул, определенных методом ПЭМ. Подобное различие является характерным и обусловлено тем, что при применении ДРС определяется гидродинамический радиус везикулы, который всегда больше чем истинный [10].

Испытание на посторонние частицы или механические включения также является одним из проблемных вопросов, поскольку их анализ представляется довольно сложным. Во-первых, липосомальный препарат представляет собой эмульсионную жидкость, окрашенную в белый, красный или зеленый цвета, а во-вторых, для оценки лиофилизированной формы требуется высокий класс чистоты при приготовлении и розливе препарата (класс А), высокого качества стекло и укупорочные материалы. В настоящее время ГФ XIII для контроля невидимых механических включений в липосомальных препаратах для парентерального применения предусматривает использование метода микроскопии (ОФС.1.4.2.0006.15) [14, 28].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современной онкологической клинике в химиотерапии злокачественных новообразований применяются ЛП различной химической структуры и разного фармакологического действия. В числе химических веществ природного и синтетического происхождения выделяют класс индолокарбазолов и их производных, которые обладают различными видами биологической активности, в том числе противоопухолевой. Индолокарбазолы воздействуют на различные мишени, ингибируя протеинкиназу С, топоизомеразы I и II, а также циклин-зависимую киназу CDK-1.

Одним из перспективных представителей класса производных индолокарбазола является соединение ЛХС-1208, синтезированное в лаборатории химического синтеза ФГУБ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. При изучении цитотоксической активности ЛХС-1208 доказана его противоопухолевая эффективность на линиях опухолевых клеток человека: рака толстой кишки (LS174Т и НСТ-116), яичников (SKOV<sub>3</sub>), меланомы (MeWo) и предстательной железы (DU145). Исследования *in vivo* показали высокую противоопухолевую активность ЛХС-1208 в отношении асцитной опухоли Эрлиха, лимфоцитарной лейкемии Р-388, лимфоидной лейкемии L-1210, эпидермоидной карциноме легкого Льюис, меланоме В-16 и рака шейки матки РШМ-5 и аденокарциномы толстого кишечника АКАТОЛ. В лаборатории разработки лекарственных форм ФГУБ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России была разработана стабильная ИЛФ-лио ЛХС-1208 с использованием солюбилизатора Kollidon 17PF и соразтворителя ДМСО. Результаты доклинического изучения активности ИЛФ-лио ЛХС-1208 на опухолях разного гистогенеза при дифференцированных режимах внутривенного введения: лимфобластома Р-388, лимфаденоза Фишера L5178Y, LLC и РШМ-5 показали ее высокий противоопухолевый эффект.

Одним из наиболее перспективных направлений по созданию ЛП нового поколения является разработка наноразмерных систем доставки на основе липосом. Зарубежные и отечественные исследования ЛЛФ известных и новых противоопухолевых препаратов доказывают улучшение физико-химических свойств (растворимость, стабильность при хранении) и терапевтических характеристик (эффективность, стабильность при введении в организм, селективность накопления в патологических областях, снижение токсичности) большинства исследованных ЛП.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1. Материалы и реактивы

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

#### *Действующее вещество:*

Аминоиндолокарбазол (ЛХС-1208) – 6-амино-12-(1- $\alpha$ -L-арабинопиранозил)индоло[2,3a]-пирроло[3,4c]карбазол-5,7-дион (Рисунок 4) (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, патент РФ № 2548045) – аморфный порошок оранжевого цвета без запаха. Не растворим в воде, практически не растворим в хлороформе, мало растворим в этаноле и ацетоне, растворим в ДМСО и диметилформамиде.

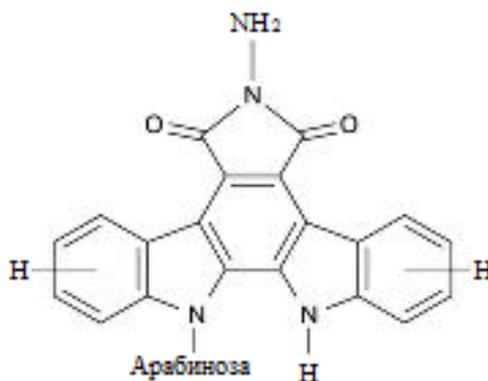


Рисунок 4. Структурная формула ЛХС-1208

#### *Компоненты липосомальной мембраны:*

- *Фосфатидилхолин яичный Е РС S* (лецитин) ((Lipoid, Германия). Представляет собой порошок белого цвета с желтоватым оттенком, не растворимый в воде и ацетоне, но растворимый в хлороформе, эфире,

метаноле, этаноле, толуоле.  $M = 734$  г/моль. Структура лецитина представлена на Рисунке 5.

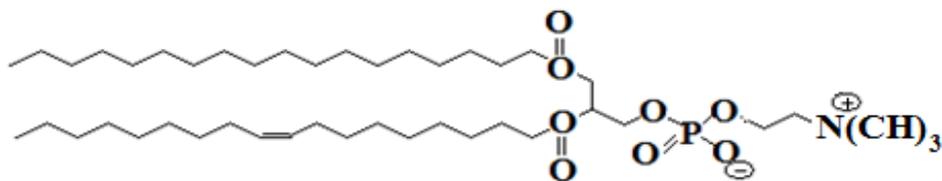


Рисунок 5. Структурная формула фосфатидилхолина

- *Холестерин*,  $\geq 92,5$  % (GL) (Sigma-Aldrich, Co., Япония) – кристаллический порошок от белого до бледно-желтого цвета без запаха или со слабым запахом, чувствительный к действию света. Холестерин практически не растворим в воде и метаноле, умеренно растворим в этаноле и ацетоне, растворим в 1,4-диоксане, легко растворим в хлороформе и диэтиловом эфире.  $M = 386,7$  г/моль. На Рисунке 6 представлена структурная формула холестерина.

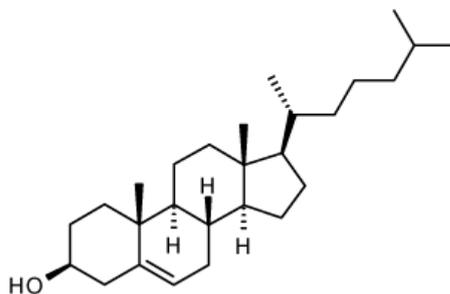


Рисунок 6. Структурная формула холестерина

- *PEG-2000-DSPE 18:0* – 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси (полиэтиленгликоль)-2000] аммониевая соль (ПЭГ-2000-ДГФА) (Рисунок 7) (Lipoid, Германия) представляет собой порошок белого цвета не растворимый в воде и ацетоне и растворимый в хлороформе, толуоле, метаноле и этаноле.  $M = 2787,49$  г/моль.

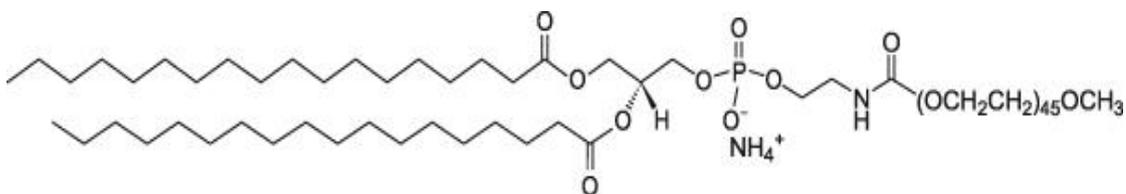


Рисунок 7. Структурная формула ПЭГ-2000-ДГФА

**Криопротекторы:**

- Глюкоза моногидрат, ГОСТ 975-88 (Химмед, Россия)
- Сахароза, ГОСТ 5833-75 (Химмед, Россия);
- Трегалоза-D дигидрат «ОСЧ» (Химмед, Россия).

**Растворители:**

- Аммиак водный 25 % «ОСЧ», ГОСТ 24147-80 (Химмед, Россия);
- Ацетон «ЧДА», ГОСТ 2603-79 изм. 1, 2 (Химмед, Россия);
- Бензол «ХЧ», ГОСТ 5955-75 (ЗАО «ЭКОС-1», Россия);
- Вода очищенная, ФС.2.2.0019.15;
- Вода для инъекций, ФС.2.2.0020.15;
- Гексан «ХЧ», ТУ 2631-006-29483781-2008 (Химмед, Россия);
- н-Бутанол «ЧДА», ГОСТ 6006-78 (ЗАО «ЭКОС-1», Россия);
- Ледяная уксусная кислота «ХЧ», ГОСТ 61-75, изм. 1–3 (ЗАО «Мосреактив», Россия);
- Метанол «ХЧ», ГОСТ 6995-77 (Химмед, Россия);
- Пропанол-2 (изопропиловый спирт) «ОСЧ», ТУ-2632-011-29483781-2009 (Химмед, Россия);
- Спирт этиловый 95 %, ФС.2.1.0036.15 (ОАО «Флора Кавказа», Россия);
- Хлороформ (трихлорметан) стабилизированный «ХЧ», ТУ 2631-001-29483781-04 изм. 1,2 (Химмед, Россия).

**Иные реактивы:**

- 1-Нафтол «ЧДА» (Россия);
- $\alpha$ -Токоферола ацетат, раствор масляный 30 % (Марбиофарм, Россия);
- Йод кристаллический «Ч», ГОСТ 4159-79 (Химмед, Россия);
- Кислота серная «ОСЧ 11-5», ГОСТ 14262-78 (ООО «Сигма Тек», Россия);
- Тиобарбитуровая кислота,  $\geq 98$  % (Sigma-Aldrich, Co., Германия);
- Трихлоруксусная кислота Ph. Eur. (AppliChem Panreac, Германия).

### ***Вспомогательные материалы:***

#### ***1. мембранные фильтры:***

- Поликарбонатные «Nuclepore» диаметром 25 мм, с размером пор 0,2 мкм (Whatman, Великобритания);
- Полиэфирсульфоновые «Express Plus®» диаметром 25 мм, с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия);
- Нейлоновые «Pall» N66 диаметром 25, 47 и 90 мм и с размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (ООО Палл Евразия, Россия).

#### ***2. для ТСХ:***

- Пластинки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А. Тип сорбента – силикагель СТХ-1ВЭ. Зернение – 8–12 мкм. Толщина слоя – 100 мкм. Связующее вещество – силиказоль. Тип подложки – алюминий. Размер пластин – 10 × 15 см.
- Стеклокамера с крышкой для ТСХ-анализа.

#### ***3. для спектрофотометрии:***

- Кюветы кварцевые с крышкой для спектрофотометрии (Россия).

## **2.2. Оборудование**

### ***1. Технологическое:***

- Весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия);
- Весы лабораторные AND DL-120 (A&D Company Limited, Япония);
- Водяная баня Büchi Heating Bath В-490 (Büchi Labortechnik AG Швейцария);
- Гомогенизатор Microfluidizer М-110S (Microfluidics, США);
- Роторный испаритель Heidolph Hei-VAP Advantage (Heidolph, Германия);
- Моечно-дезинфекционная машина Lancer 1400 UP DIN (Lancer, Франция);
- Холодильник низкотемпературный Queue Cryostar (Cryostar, Франция);
- Полуавтомат ПЗР-34-ВИПС-МЕД для закупорки флаконов колпачками К-2-20 и К-3-34 (ООО «Фирма «ВИПС-МЕД», Россия);

- Система получения воды для инъекций УВОИ-М-Ф/1812 (МедианаФильтр, Россия).
- Стерилизатор сухожаровой Binder ED (Binder, Германия);
- Сублимационная сушка «Edwards Minifast DO.2» (Ero Electronic S.p. A., Италия);
- Ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия);
- Экструдеры Lipex™ Thermobarrel Extruder 10, 100 и 800 мл (Northern Lipids Inc., Канада).

## **2. Аналитическое:**

- рН-метр HANNA HI 2211 (Hanna Instruments, Румыния);
- Наносайзер Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США);
- Дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern, Великобритания);
- Спектрофотометр Cary 100 (Agilent Technologies, Австралия);
- Фотометрический анализатор «Multiskan» (Thermo Labsystems, Финляндия)

## **2.3. Методы исследований**

### **2.3.1. Приготовление липосомальной дисперсии ЛХС-1208**

#### ***Получение дисперсии МСЛ ЛХС-1208***

МСЛ ЛХС-1208 получали методом гидратации липидной пленки. Навески лецитина, холестерина и ПЭГ-2000-ДФА растворяли в хлороформе, ЛХС-1208 – в ацетоне. Ацетоновый и хлороформный растворы указанных компонентов смешивали и фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 0,22 мкм. Полученную смесь растворов переносили в круглодонную колбу и выпаривали органические растворители на роторном испарителе при температуре  $37 \pm 1$  °С под вакуумом (200 мбар) до образования полупрозрачной липидной пленки. Сформировавшуюся пленку

досушивали под вакуумом (120 мбар) до постоянной массы и затем гидратировали водой для инъекций с получением дисперсии МСЛ ЛХС-1208.

### ***Получение дисперсии однослойных липосом (ОСЛ) ЛХС-1208***

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

*Озвучивание.* Профильтрованную дисперсию обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 10–30 мин.

*Экструзия.* Липосомальную дисперсию пропускали на экструдере через фильтры различного типа с диаметром пор 0,2–0,22 мкм.

*Гомогенизация.* Дисперсию липосом ЛХС-1208 рециркулировали в гомогенизаторе высокого давления Microfluidiser M-110S в течение 1–5 мин.

### ***Получение пустых липосом***

Пустые липосомы получали как и липосомы с ЛХС-1208, но без добавления действующего вещества.

### ***Стерилизация липосом ЛХС-1208***

Для стерилизации липосомальной дисперсии ЛХС-1208 через стерильные нейлоновые фильтры с размером пор 0,22 мкм проводили фильтрацию под давлением на экструдере с соблюдением асептических условий.

### **2.3.2. Лиофилизация липосомальной дисперсии ЛХС-1208**

Для стабилизации липосомального ЛХС-1208 после стерилизующей фильтрации и дозирования проводили его сублимационную сушку. Для обеспечения качества получаемого лиофилизата проводили подбор

оптимальных условий лиофилизации – выбор режима и типа и концентрации криопротектора.

Для определения температуры эвтектики ЛХС-1208 использовали термический способ, который основывается на фиксации температуры образца, замороженного ниже эвтектической точки, в процессе медленного оттаивания [21].

### **2.3.3. Контроль качества и стандартизация ЛЛФ ЛХС-1208 и ее лиофилизата**

#### ***Качественный хроматографический анализ ЛЛЛФ ЛХС-1208***

Для установления подлинности компонентов препарата использовали метод ТСХ с использованием хроматографических пластин «Sorbfil». Результаты исследования по разработке методики ТСХ-анализа ЛЛЛФ ЛХС-1208 приведены в разделе 4.2.

#### ***Количественный спектрофотометрический анализ ЛХС-1208 в составе ЛФ***

Количественное содержание ЛХС-1208 определяли методом спектрофотометрии в УФ- и видимой области (ГФ XIII ОФС.1.2.1.1.0003.15) при длине волны ( $319 \pm 2$  нм) на спектрофотометре Cary 100 с использованием рабочего стандартного образца (СО). Оптическую плотность анализируемого образца измеряли с использованием в качестве раствора сравнения спирта 95 %. Результаты исследования по разработке методики количественного спектрофотометрического анализа ЛЛЛФ ЛХС-1208 приведены в разделе 4.1.

#### ***Валидация методики количественного спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 в составе ЛЛЛФ***

Валидация (validation) – это процесс экспериментального подтверждения того, что аналитическая методика обеспечивает получение необходимой и достоверной информации об объекте анализа и пригодна для практического использования [14].

Проведение процедуры валидации методов контроля качества – это действия не только рекомендуемые, но и обязательные, предписанные нормативными документами, регламентирующими обращение ЛП [49].

При валидации проводили оценку методики количественного спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 в составе ЛЛФ, руководствуясь ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», по представленным ниже типичным характеристикам:

- специфичности
- диапазону применения или аналитической области
- линейности
- правильности
- прецизионности.

#### ***Определение эффективности включения ЛХС-1208 в липосомы***

В связи с тем, что ЛХС-1208 при формировании липосом включается непосредственно в липосомальную мембрану и является гидрофобным веществом, эффективность включения (В) была рассчитана по соотношению концентрации ЛВ в липосомальной дисперсии после фильтрации через нейлоновые мембранные фильтры с порами диаметром 0,22 мкм (1 раз) к концентрации ЛХС-1208 в дисперсии до фильтрации. Показатель выражали в процентах:

$$B = C_{\phi} / C \times 100 (\%),$$

где: В – включение, %;

$C_{\phi}$  – концентрация ЛХС-1208 в дисперсии после фильтрации, мг/мл;

С – концентрация ЛХС-1208 в дисперсии до фильтрации, мг/мл.

#### ***Анализ размера липосом ЛХС-1208***

Определение распределения липосом по размеру проводили методом ДРС (лазерная дифракция света) с использованием фотонного корреляционного анализатора SubmicronParticleSizerNICOMP 380.

Метод лазерной дифракции света, используемый для определения распределения частиц по размеру, основан на анализе профиля рассеяния света, возникающего при освещении частицы коллимированным лазерным лучом. Принцип метода заключается в следующем: образец, диспергированный в жидкости или газе с необходимой концентрацией, подвергается воздействию лазерного облучения. Свет, рассеянный от частиц на различных углах, измеряется многоэлементным детектором. Численные значения, представляющие профиль рассеяния света, регистрируются для последующего анализа. В дальнейшем эти значения математически преобразуются с помощью оптической модели в доли от общего объема отдельных размерных классов, формируя, таким образом, объемное распределение частиц по размеру [14].

Методика пробоподготовки должна обеспечивать получение репрезентативного образца требуемого объема для измерения размера частиц. Для того чтобы получить приемлемое соотношение «сигнал–шум» в детекторе, концентрация частиц (липосом) в дисперсии должна превышать минимальный уровень. Также она должна быть меньше максимального уровня во избежание многократного рассеяния [14].

#### *Методика пробоподготовки и измерения размера липосом ЛХС-1208*

Автоматической пипеткой отмеривают 100 мкл исследуемого образца липосомальной дисперсии (лиофилизат предварительно регидратируют водой), переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Полученный образец помещают в кювету, которую вставляют в ячейку анализатора и проводят определение размера везикул. Измерение размера липосом проводят не менее трех раз.

#### ***Определение значения $\zeta$ -потенциала липосомального ЛХС-1208***

Измерение  $\zeta$ -потенциала липосомального ЛХС-1208 проводили с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS. Определение  $\zeta$ -потенциала

основано на измерении электрофоретической подвижности частиц с использованием эффекта Доплера. Липосомальную дисперсию помещают в электрическое поле, под воздействием которого они перемещаются со скоростью, зависящей от их  $\zeta$ -потенциала. Измерение данной скорости позволяет рассчитать электрофоретическую подвижность, а из нее –  $\zeta$ -потенциал и его распределение [125].

*Методика определения значения  $\zeta$ -потенциала липосомальной дисперсии*

Автоматической пипеткой отмеривают 100 мкл исследуемого образца липосомальной дисперсии (лиофилизат предварительно регидратируют водой), переносят в мерную колбу объемом 100 мл и доводят водой до фиксированной метки. Полученный в ходе реализации эксперимента образец помещают в кювету, которую вставляют в ячейку анализатора и проводят определение размера везикул. Измерение размера липосом проводят не менее трех раз.

***Определение значения рН липосомального ЛХС-1208***

Определение рН препарата определяли методом потенциометрии с использованием рН-метра HANNA. Измерения проводили в интервале температур 20–25 °С.

*Методика определения значения рН липосомальной дисперсии*

В липосомальной дисперсии значение рН измеряют, не разбавляя анализируемый образец.

*Методика определения значения рН лиофилизата*

К лиофилизату добавляют 6 мл воды, перемешивают до образования однородной дисперсии и проводят измерение значения рН.

***Определение перекисного окисления липидов в ЛЛФ ЛХС-1208***

Для оценки влияния включения антиоксиданта в состав ЛФ на качество липосомальной дисперсии ЛХС-1208 определяли концентрацию конечного продукта перекисного окисления – МДА.

*Приготовление раствора сравнения (реагента)*

15,0 г трихлоруксусной кислоты и 0,67 г тиобарбитуровой кислоты растворяли в 100 мл воды очищенной и нагревали на водяной бане до полного растворения.

*Методика определения перекисного окисления липидов в ЛЛФ по содержанию МДА*

В термостойкую пробирку отмеривают 0,5 мл анализируемой липосомальной дисперсии и 3 мл раствора сравнения, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Измеряли оптическую плотность полученного раствора относительно раствора сравнения на спектрофотометре Cary 100 при длинах волн 532 и 580 нм.

Концентрацию МДА (нмоль/мл) рассчитывали по формуле:

$$C = (A_{532} - A_{580}) \times 6 \times 1000 / 155 \text{ (мл} \times \text{мкмоль}^{-1} \times \text{см}^{-1})$$

где:  $A_{532}$  и  $A_{580}$  – оптическая плотность анализируемого образца при длине волны 532 и 580 нм;

6 – коэффициент разведения образца;

155 – коэффициент молярной экстинкции МДА-тиобарбитуровая кислота.

***Определение потери в массе при высушивании***

Поскольку лиофильно высушенные препараты склонны к поглощению влаги из окружающей среды после получения и в процессе хранения необходимо контролировать ЛЛЛФ ЛХС-1208 по показателю качества «Потеря в массе при высушивании». При определении остаточной влажности в препарате «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления

дисперсии для инъекций 1,8 мг» руководствовались ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» ГФ XIII издания [14].

#### *Методика определения влажности в лиофилизате ЛЛФ ЛХС-1208*

Точную навеску препарата (0,5 г) помещают в предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный в условиях проведения испытания бюкс. Пробу сушат с открытой крышкой бюкса до постоянной массы в вакуумном шкафу над пятиокисью фосфора при комнатной температуре и остаточном давлении 5 мм рт.ст. [17].

#### **2.3.4. Изучение цитотоксической активности ЛЛФ ЛХС-1208 в МТТ-тесте**

Исследование проводили на клеточных линиях метастатической меланомы человека *melHbr* и *melKor*, полученных из Банка клеточных линий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, глутамина и антибиотиков. С культуральных флаконов клетки снимали раствором Версена.

Для оценки цитотоксической активности использовали МТТ-тест, впервые предложенный Т. Мосманном [91]. 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) – желтый водорастворимый тетразолиевый краситель, который проникает через плазматическую и митохондриальные мембраны клетки. В митохондриях жизнеспособных и гликолитически активных клеток МТТ восстанавливается действием НАД- или НАДФ-зависимых дегидрогеназ в формазан, представляющий собой кристаллы фиолетового цвета. Количество выработанного в результате этой реакции формазана зависит от числа клеток и их жизнеспособности. Когда эта реакция завершается, оставшиеся жизнеспособные клетки погибают, формазан растворяют и измеряют оптическую плотность, которая отражает количество клеток, представленное в конце оцениваемого периода.

Для постановки МТТ-теста клетки рассаживали в 96-луночные планшеты в количестве 7 тыс. клеток на лунку. Через сутки, после того как клетки прикреплялись к пластику, в лунки добавляли исследуемые ЛВ в концентрациях ЛХС-1208 от 1,875 до 120 мкг/мл и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Через 48 ч в лунки добавляли раствор МТТ, затем инкубировали еще 4 часа, после чего в лунки добавляли ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана и производили подсчет оптической плотности на фотометрическом анализаторе при длине волны 540 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Цитотоксичность (Ц, %) рассчитывали по формуле:

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

где: O<sub>o</sub> – оптическая плотность в опытных лунках,

O<sub>k</sub> – оптическая плотность в контрольных лунках.

Для характеристики цитотоксического эффекта определяли ИК<sub>50</sub> – концентрацию вещества, вызывающую гибель 50 % клеток.

### **2.3.5. Статистическая обработка данных**

Полученные в ходе экспериментов результаты подвергали статистической обработке с целью установления достоверности выявленных различий согласно ГФ XIII в программах Excel и Statistica 6.0 [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЛФ ЛХС-1208

Особая роль в обеспечении надлежащей терапевтической эффективности, биодоступности и биоэквивалентности принадлежит ЛФ, ее составу и технологии производства. Знание технологических факторов, изучение характера их влияния на свойства продукта является необходимым элементом современной фармацевтической разработки. Открытие биофармацевтического значения ЛФ, ее определяющей роли в обеспечении терапевтической эффективности ЛП послужило отправной точкой для развития особого направления фармацевтической технологии, направления, посвященного созданию систем доставки лекарств, среди которых ведущее место занимают липосомы [64].

Для возможности внутривенного введения гидрофобного ЛВ, снижения токсичности и повышения биодоступности противоопухолевого препарата предложено инкапсулирование производного индолокарбазола ЛХС-1208 в липосомы.

Разработка липосомального препарата представляет собой многофакторную задачу, решение которой требует учета всех ее многочисленных составляющих от выбора исходных компонентов до контроля качества конечного продукта, а также детального научного теоретического и практического обоснования всех технологических параметров [17].

Создание ЛЛФ для гидрофобной субстанции включает в себя комплекс исследований, состоящий из выбора:

- оптимального состава липосомальной мембраны,
- условий для получения липидной пленки и ее гидратации,
- способа и условий получения ОСЛ оптимального размера,

- метода и условий стерилизации липосомальной дисперсии,
- способа и условий стабилизации ЛЛФ.

### 3.1. Разработка состава ЛЛФ ЛХС-1208

В качестве базового компонента, формирующего липосомальный бислой, применяли натуральный фосфолипид – яичный фосфатидилхолин (лецитин). Фосфатидилхолины являются одними из самых распространенных молекул клеточных мембран, они нетоксичны, биосовместимы и биodeградируемы. Для повышения стабильности липосомальной конструкции путем увеличения жесткости и механической устойчивости липосомальной мембраны добавляли холестерин. Для предотвращения процесса опсонизации и поглощения липосом клетками ретикулоэндотелиальной системы в состав ЛФ вводили фосфолипид – фосфатидилэтаноламин, конъюгированный с гидрофильным полимером, – ПЭГ-2000-ДГФА.

Важно, чтобы липосомальная форма ЛХС-1208 содержала максимально возможное количество действующего вещества (ДВ) и обладала оптимальными для терапии размерами везикул (не более 200–220 нм) [5, 16]. Для решения этих задач необходимо было определить оптимальный липидный состав липосом и подобрать подходящую концентрацию липидов и субстанции в ЛФ.

Молярные соотношения липидных композиций ЛЛФ ЛХС-1208 подбирали экспериментально с учетом гидрофобных свойств ЛВ и воспроизводимости технологического процесса получения стабильной ЛФ.

При разработке состава липосомы с ЛХС-1208 получали по следующей **технологии**. Навески лецитина, холестерина и ПЭГ-2000-ДГФА растворяли в хлороформе, ЛХС-1208 – в ацетоне. Полученные растворы смешивали и переносили в круглодонную колбу. Смесь органических растворителей выпаривали на роторном испарителе под вакуумом при температуре водяной

бани  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  до формирования на стенках колбы равномерной липидной пленки, которую досушивали в условиях низкого давления (120–130 мбар) до постоянной массы и затем смывали водой для инъекций с образованием дисперсии МСЛ. Полученную дисперсию фильтровали через нейлоновые фильтры с размером пор 1,2 (1 раз), 0,45 (1 раз) и 0,22 (2 раза) мкм.

Были получены и проанализированы экспериментальные модели составов ЛЛФ ЛХС-1208 с различными молярными соотношениями компонентов (Таблица 4). Качество модельных ЛЛФ оценивали по основным показателям – включение ДВ в липосомы и размеры везикул, а также учитывали такие технологические параметры как продолжительность гидратации пленки и способность к экструзии.

ЛЛФ ЛХС-1208 состава 1 готовили при молярных соотношениях липидов лецитин : холестерин : ПЭГ-2000-ДФФА = 1 : 0,25 : 0,003 и ЛХС-1208 : лецитин = 1 : 50 с концентрацией ДВ 0,6 мг/мл. При этом из-за высокого содержания ЛВ при экструзии липосомальной дисперсии на фильтре осаждалось значительное количество субстанции, а включение в среднем составило значение 59 %.

Поскольку лецитин является основным структурообразующим компонентом липосомального бислоя и связывает при инкапсуляции гидрофобные ЛВ, далее увеличивали его содержание и снижали концентрацию ЛХС-1208 с сохранением аналогичного молярного соотношения липидов. В результате получили состав 5 с концентрацией ДВ 0,2 мг/мл и повышением уровня включения до 91 %. При последующем увеличении лецитина относительно ЛВ до их молярного соотношения 1 : 175 (состав 9) привело к резкому снижению включения – 65 %. Липидную пленку, полученную по данному составу, гидратировали длительное время с образованием густой массы, фильтрация и экструзия которой проходила с затруднениями. Поэтому остановились на молярном соотношении ЛХС-1208 : лецитин = 1 : 150.

## Модельные составы ЛЛФ ЛХС-1208

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

Экспериментальную работу продолжали, исследуя различные сочетания лецитин : холестерин : ПЭГ-2000-ДГФА в составах 4–8. В результате было установлено, что с изменением содержания холестерина как в большую (состав 4), так и в меньшую сторону способствует не только увеличению включения, но и улучшению гидродинамических свойств дисперсии: липосомы легко экструдировались с образованием везикул со средним размером около 185 нм. Кроме того, изменение концентрации холестерина позволило увеличить концентрацию ДВ в дисперсии с 0,2 до 0,3 мг/мл. В липосомальных композициях с составами 7 и 8 отмечалось снижение уровня включения ЛХС-1208, что вероятно обусловлено низким содержанием холестерина и, следовательно, меньшей механической устойчивости бислоя, что способствовало потере вещества при формировании везикул в процессе гидратации и экструзии.

Поскольку при молярных соотношениях ЛХС-1208 : лецитин = 1 : 150 и лецитин : холестерин : ПЭГ-2000-ДГФА = 1 : 0,20 : 0,003 инкапсулирование ДВ максимально ( $94 \pm 1 \%$ ), из модельных композиций 4 и 6 для получения ЛЛФ ЛХС-1208 выбран состав 6.

### **3.2. Особенности получения МСЛ ЛХС-1208**

МСЛ с ЛХС-1208 получали широко распространенным методом липидной пленки в модификации для гидрофобных субстанций.

Первоначальная стадия данного технологического этапа получения ЛЛФ ЛХС-1208 включает операции по взятию навесок ДВ и липидных компонентов ЛФ и их растворение в соответствующем органическом растворителе. Как было упомянуто в п.п. 1.2.3. (стр. 36) для получения липидной пленки в качестве органических растворителей применяют хлороформ, метанол, этанол и ацетон, поскольку эти растворители легколетучи и способны растворять липиды и большинство гидрофобных фармацевтических субстанций.

Исходя из растворимости ЛХС-1208 и используемых липидов (Таблица 5), а также свойств самих растворителей, необходимо было подобрать оптимальные условия для получения раствора компонентов ЛФ и последующей отгонке органического растворителя с получением тонкой липидной пленки на стенках колбы.

Таблица 5

Растворимость\* компонентов ЛЛФ ЛХС-1208 в органических растворителях

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

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

Таким образом, для получения липидной пленки в соответствии с выбранным составом 6 навески лецитина, холестерина и ПЭГ-2000-ДФА растворяли в хлороформе. К навеске ЛХС-1208 приливали ацетон и помещали на ультразвуковую ванну на 5 мин для ускорения процесса растворения. Полученные растворы компонентов ЛЛФ смешивали и

переносили в круглодонную колбу на 2 л. Ацетоно-хлороформный раствор выпаривали на роторном испарителе при температуре водяной бани  $+(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  и скорости вращения ротора 90–110 оборотов в минуту (об/мин), обеспечивающей равномерное распределение пленки на стенках колбы и достаточную скорость отгона органических растворителей из раствора, в условиях низкого давления до образования полупрозрачной липидной пленки [21]. С целью полного удаления органических растворителей липидную пленку досушивали до постоянной массы под вакуумом (120 мбар). Время досушивания пленки в зависимости от загрузки круглодонной колбы составляло от 30 мин до 1 ч.

Липидную пленку гидратировали водой для инъекций на роторном испарителе для получения дисперсии МСЛ с концентрацией ЛХС-1208 0,35 мг/мл. В ходе исследования было отмечено, что большое значение при гидратации имеет скорость вращения ротора, которая обуславливает качество получаемой липосомальной дисперсии. При скорости вращения ротора не более 30–35 об/мин формируется гомогенная дисперсия со средним размером везикул  $310 \pm 25$  нм. При увеличении скорости вращения ротора более 35 об/мин отмечалось образование пенистой дисперсии МСЛ более крупного размера – от 500 до 900 нм в зависимости от скорости вращения (Таблица 6).

Таблица 6

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

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

После получения до проведения последующих экспериментов липосомальную дисперсию ЛХС-1208 хранили в холодильнике.

### **3.3. Оценка методов получения ОСЛ ЛХС-1208**

Эффективность противоопухолевой терапии химиотерапевтических агентов в липосомальной форме достигается благодаря направленному транспорту и накоплению наноносителя непосредственно в опухолевой ткани. Однако определяющим фактором для проникновения в опухоль липосом, нагруженных ЛВ, является их размер, который должен составлять не более 200–220 нм. Поэтому для уменьшения размеров МСЛ, полученных в процессе гидратации липидной пленки, применяют различные методы их «измельчения», которые имеют свои достоинства и недостатки. В данном исследовании сравнивали эффективность 3-х способов методов измельчения липосом ЛХС-1208 – ультразвуковую обработку дисперсии, экструзию и гомогенизацию.

#### ***3.3.1. Обработка ультразвуком***

Дисперсию МСЛ ЛХС-1208, объемом 30 мл озвучивали в течение 10, 20 и 30 мин в ультразвуковой ванне с частотой 20 кГц (Таблица 7). Воздействие ультразвука на дисперсию привело к уменьшению размера липосом: спустя 20 мин обработки размер везикул составил минимальное значение 190 нм. Однако увеличение времени озвучивания дисперсии до 30 мин способствовало обратному укрупнению липосом – до 210 нм. При хранении полученных липосомальных дисперсий ЛХС-1208 спустя сутки наблюдали увеличение размеров везикул по сравнению с исходными до 245–320 нм. Кроме того, обработка ультразвуком способствовала значительным потерям ДВ – после проведения фильтрации на фильтре отмечали наличие осадка, при этом уровень включения снизился до 90–85 % в зависимости от времени воздействия.

Таблица 7

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

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

### 3.3.2. Экструзия

Эффективность экструзии липосом зависит от следующих факторов:

- диаметр пор фильтра,
- число циклов экструзии,
- тип или материал фильтра.

Благодаря молекулярной структуре ЛХС-1208 является окрашенным соединением и подобно красителям обладает сильными сорбционными свойствами, причем степень сорбции определяется материалом окрашиваемой поверхности. В связи с учетом данной особенности важной задачей при определении оптимального режима экструзии липосом ЛХС-1208 являлось установление, в первую очередь, типа фильтра, использование которого обеспечивало бы получение ОСЛ приемлемого размера с минимальными потерями ДВ.

Предварительно профильтрованную дисперсию МСЛ ЛХС-1208 пропускали от 1 до 6 раз под давлением 0,9–1,0 бар через поликарбонатные, нейлоновые и полиэфирсульфоновые фильтры с диаметром пор 0,2–0,22 мкм.

Из представленным в таблице 8 результатов видно, что экструзия с использованием поликарбонатного фильтра позволяет получить ОСЛ ЛХС-1208 минимального размера в сравнении с другими фильтрами – 170 нм. Однако с уменьшением размера везикул при экструзии наблюдались значительные потери ДВ на фильтре.

Эффективность экструзии липосом ЛХС-1208 с использованием различных типов фильтров

Показатели качества		Размер везикул*, нм			В*, %		
Фильтр		ПК	Н	ПЭС	ПК	Н	ПЭС
Число циклов	1	190 ± 5	205 ± 10	210 ± 8	90 ± 1	94 ± 1	94 ± 1
	2	182 ± 7	195 ± 10	192 ± 8	87 ± 2		
	3	170 ± 6	185 ± 5	185 ± 6	83 ± 2		93 ± 1
	4	171 ± 5	182 ± 5	185 ± 5	81 ± 2	93 ± 1	92 ± 1
	5	-	176 ± 8	186 ± 6	-		
	6	-	180 ± 8	182 ± 7	-	92 ± 1	91 ± 1

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

При сравнении нейлоновых и полиэфирсульфоновых фильтров по показателям качества наиболее эффективной является экструзия с использованием нейлоновых фильтров – достигается минимальный размер липосом 176 нм с сохранением высокого уровня включения ЛХС-1208.

Таким образом, оптимальным режимом экструзии для получения ОСЛ ЛХС-1208 приемлемого размера является не менее чем 4–5-кратное пропускание дисперсии МСЛ через нейлоновые фильтры.

### 3.3.3. Гомогенизация

В отличие от экструзии гомогенизация под высоким давлением позволяет получить липосомальные препараты в промышленных масштабах, благодаря высокой производительности метода. В ходе исследования 80 мл предварительно профильтрованной дисперсии МСЛ ЛХС-1208 гомогенизировали в камере микрофлюидайзера под давлением 40 psig (280 кПа) в течение 1–5 мин с отбором проб через каждую минуту от начала циркуляции. Результаты исследования представлены в таблице 9.

Изменение размера везикул и включения ЛХС-1208 в липосомы в зависимости от времени гомогенизации

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

Использование гомогенизации позволило получить дисперсию липосом ЛХС-1208 с заметно меньшим, чем при экструзии размером везикул – через 4 мин диаметр преобладающей фракции везикул составил 60 нм. В то же время, увеличение времени гомогенизации дисперсии на 1 мин способствовало обратному процессу – укрупнению липосом до 115 нм.

Однако, несмотря на достоинства данного метода, при гомогенизации наблюдаются большие потери препарата – включение ДВ на каждой минуте снижается в среднем на 4–5 %, что вероятно обусловлено разрушением липосомальной мембраны вследствие значительного нагревания дисперсии в процессе рециркуляции и термолабильностью самого ЛХС-1208. Вследствие этого метод гомогенизации при последующих технологических исследованиях не применяли.

Обобщая полученные данные сравнительного анализа эффективности способов приготовления ОСЛ, можно сделать вывод, что экструзия с использованием нейлоновых фильтров является наиболее приемлемым методом «измельчения» МСЛ ЛХС-1208, полученных в процессе гидратации липидной пленки.

### 3.4. Исследование стабильности ЛЛФ ЛХС-1208

Для изучения стабильности разработанной ЛЛФ ЛХС-1208 во времени липосомальную дисперсию хранили в холодильнике при температуре  $+(4 \pm 2)$  °С. Оценку стабильности проводили по основным показателям качества –

размер везикул, включение, рН. Кроме того, поскольку важной характеристикой устойчивости липосомальной системы является  $\zeta$ -потенциал, на протяжении всего периода исследования измеряли значение данного показателя.

Согласно результатам, представленным в таблице 10, ЛЛФ ЛХС-1208 сохраняет стабильность в течение 5 дней от момента получения по таким показателям качества, как размер везикул и включение. В этот период наблюдается медленное снижение значения рН и  $\zeta$ -потенциала, что свидетельствует о процессах дестабилизации липосомальной системы, обусловленных явлениями окисления и гидролиза липосомальных фосфолипидов. При более длительном хранении наблюдается расслоение дисперсии с образованием двух фракций везикул, постепенно укрупняющихся в размере, и снижением уровня включения ДВ в липосомах.

Таблица 10

Оценка показателей качества ЛЛФ ЛХС в процессе хранения

Время хранения, сутки	Показатели качества			
	Средний размер везикул, нм	В, %	рН	$\zeta$ , mV
0	$180 \pm 5$	$93 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,5$	$-(29,3 \pm 0,5)$
1	$176 \pm 6$		$6,9 \pm 0,3$	$-(30,1 \pm 0,6)$
2	$178 \pm 5$			$-(28,4 \pm 0,6)$
3	$180 \pm 5$		$6,8 \pm 0,3$	$-(28,5 \pm 0,5)$
4	$181 \pm 8$		$6,6 \pm 0,5$	$-(28,0 \pm 0,7)$
5	$184 \pm 10$		$6,5 \pm 0,5$	$-(28,0 \pm 0,8)$
6	$190 \pm 8 / 12 \pm 3$	$92 \pm 0,5$	$6,3 \pm 0,5$	$-(28,2 \pm 0,5)$
7	$210 \pm 10 / 15 \pm 3$	$91 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,5$	$-(27,8 \pm 0,6)$

Полученные данные свидетельствуют о низкой стабильности данной ЛФ ЛХС-1208 и необходимости применения способа повышения ее устойчивости.

С целью исследования путей стабилизации липосомальной формы ЛХС-1208 и тем самым увеличения срока годности препарата исследовали два метода:

- 1) химический – введение антиоксиданта в состав ЛЛФ,
- 2) физический – применение лиофилизации.

### **3.5. Оценка влияния антиоксиданта на качество ЛЛФ ЛХС-1208**

В процессе хранения фосфолипиды, содержащие ненасыщенные связи, подвергаются перекисному окислению (ПО). Для предотвращения и замедления ПО липидов в состав ЛЛФ вводят специальные вещества – антиоксиданты. Наиболее распространенным антиоксидантом в природе является витамин Е ( $\alpha$ -токоферол).  $\alpha$ -токоферол – липофильная молекула, способная инактивировать свободные радикалы непосредственно в гидрофобном слое мембран и, таким образом, предотвращать развитие цепи ПО [96].

В данном исследовании изучали влияние антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола на качество липосом ЛХС-1208 путем определения концентрации МДА в получаемой дисперсии.  $\alpha$ -токоферол добавляли к ацетон-хлороформному раствору компонентов ЛФ до упаривания на роторном испарителе. В ходе эксперимента сравнивали следующие липосомальные дисперсии ЛХС-1208:

- свежеприготовленная липосомальная дисперсия ЛХС-1208 без добавления антиоксиданта;
- свежеприготовленная липосомальная дисперсия ЛХС-1208 с добавлением антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола (1,0 % от массы лецитина).

Определение МДА проводили по методике, изложенной в разделе 2.3.3. (стр. 61). При добавлении антиоксиданта в состав ЛЛФ ЛХС-1208 в процессе гидратации и экструзии отмечалось образование вязкой пенистой дисперсии с более крупными везикулами по сравнению с дисперсией, приготовленными без добавления  $\alpha$ -токоферола (Таблица 11).

Из результатов, представленных в таблице 11 видно, что средняя концентрация МДА в свежеприготовленной дисперсии липосом ЛХС-1208 без антиоксиданта составляла 6,72 нмоль/мл при относительной погрешности анализа – 2,0 %. При добавлении  $\alpha$ -токоферола в качестве антиоксидантного агента в липосомальную дисперсию отмечалось незначительное снижение концентрации МДА до 6,4 нмоль/мл. Ошибка в данном случае составила 1,4 %.

Таблица 11

Оценка влияния антиоксиданта на качество ЛЛФ ЛХС-1208

Липосомальная дисперсия ЛХС-1208	Средний размер везикул, нм	№ пробы	Концентрация МДА, нмоль/мл	Статистические характеристики
без антиоксиданта	$180 \pm 6$	1	6,58	$n = 6; f = 5; x_{\text{ср}} = 6,72; S^2 = 1,72 \times 10^{-2};$ $S = 1,3 \times 10^{-1};$ $Sx_{\text{ср.}} = 5,35 \times 10^{-2};$ $t(95\%, 5) = 2,57;$ $\Delta x = 1,4 \times 10^{-1}; \varepsilon = 2,0\%$
		2	6,89	
		3	6,74	
		4	6,77	
		5	6,54	
		6	6,77	
с добавлением антиоксиданта	$194 \pm 10$	1	6,29	$n = 6; f = 5; x_{\text{ср}} = 6,40; S^2 = 7,24 \times 10^{-3}; S = 8,51 \times 10^{-2};$ $Sx_{\text{ср.}} = 3,47 \times 10^{-2};$ $t(95\%, 5) = 2,57;$ $\Delta x = 8,93 \times 10^{-2}; \varepsilon = 1,4\%$
		2	6,34	
		3	6,48	
		4	6,44	
		5	6,35	
		6	6,50	

Таким образом, антиоксидант способствует незначительному снижению ПО фосфолипидов, а его введение в состав ЛФ ухудшает качество липосомальной дисперсии. Поэтому  $\alpha$ -токоферол не был введен в состав липосом с ЛХС-1208.

### 3.6. Подбор условий лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208

Для повышения устойчивости и продления срока годности липосомальных препаратов целесообразно применение метода лиофилизации. Лиофилизация – это процесс стабилизации, при котором раствор препарата замораживается, количество растворителя (вода) уменьшается первоначально

методом сублимации (первичная сушка), а затем методом десорбции (вторичная сушка) [2, 3, 42, 45].

Разработка технологии лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208 включает решение 3 основных задач – выбор эффективного криопротектора, оптимального объема наполнения флакона и определение режима лиофилизации.

### ***3.6.1. Выбор криопротектора для лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208***

В качестве криопротекторов исследовали представителей класса «углеводы» – глюкозу, сахарозу и трегалозу, которые вводили в состав ЛФ в молярных соотношениях лецитин/криопротектор 1 : 2, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 7,5 и 1 : 10 путем растворения вещества в воде для инъекций, предназначенной для гидратации липидной пленки. Далее липосомальную дисперсию фильтровали и экструдировали через нейлоновые фильтры с диаметром пор 1,2 (1 раз), 0,45 (1 раз) и 0,22 (5 раз) мкм. В качестве образца сравнения (контроль) использовали дисперсию без криопротектора.

Эффективность криопротекторов оценивали по показателям качества: внешний вид ЛЛФ после регидратации лиофилизата, средний размер везикул и включение ЛХС-1208 в липосомы.

Как видно из представленных в таблице 12 результатов исследования отсутствие криопротектора (контрольный образец) или низкое содержание криопротектора в липосомальной дисперсии (глюкоза 1 : 2 и 1 : 3, сахароза 1 : 2, трегалоза 1 : 2) способствует слиянию везикул на стадии замораживания и получаемые лиофилизаты представляют собой вязкую массу, не способную к регидратации. При избыточном содержании криопротектора (образцы с сахарозой 1 : 7,5 и 1 : 10, трегалозой 1 : 5, 1 : 7,5 и 1 : 10) лиофилизаты регидратируются с образованием липосомальной дисперсии с осадком и признаками расслоения.

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

Криопротектор		Внешний вид ЛЛФ после регидратации лиофилизата	Средний размер везикул, нм			В, %
Вещество	Молярное соотношение лецитин / криопротектор		До лиофилизации	Сразу после регидратации лиофилизата	Спустя 3 ч после регидратации лиофилизата	
Контроль		Вязкая масса желтого цвета	181 ± 7	415 ± 25 (90 %) / 32 ± 11 (10 %)	471 ± 21 (96 %) / 17 ± 3 (4 %)	93 ± 0,5
Глюкоза	1 : 2		Светло-желтая гомогенная дисперсия, без осадка и признаков расслоения	180 ± 6	256 ± 16 (96%) / 37 ± 10 (4 %)	260 ± 15 (96 %) / 32 ± 5 (4 %)
	1 : 3	175 ± 6		230 ± 15 (99 %) / 16 ± 4 (1 %)	232 ± 17	
	1 : 5	178 ± 5		200 ± 10	198 ± 8	90 ± 1
	1 : 7,5	175 ± 7	185 ± 8	194 ± 10	89 ± 1	
	1 : 10	178 ± 8	188 ± 6	190 ± 10 (99 %) / 11 ± 2 (1 %)		
Сахароза	1 : 2	Вязкая масса желтого цвета	175 ± 8	198 ± 10	205 ± 9	93 ± 1
	1 : 3	Светло-желтая гомогенная липосомальная дисперсия, без осадка и признаков расслоения	174 ± 7	175 ± 6	175 ± 5	92 ± 0,8
	1 : 5		178 ± 8	180 ± 5	177 ± 6	91 ± 1
	1 : 7,5		180 ± 8	188 ± 6 (97 %) / 21 ± 5 (3 %)	190 ± 8	
	1 : 10	признаками расслоения	180 ± 10	217 ± 12 (92 %) / 28 ± 3 (8 %)	230 ± 10 (98 %) / 25 ± 3 (2 %)	89 ± 1

Таблица 12 (продолжение)

Трегалоза	1 : 2	Вязкая масса желтого цвета	$180 \pm 6$	$192 \pm 11$ (98 %) / $24 \pm 5$ (2 %)	$194 \pm 12$ (99 %) / $17 \pm 3$ (1 %)	$92 \pm 0,6$
	1 : 3	Светло-желтая гомогенная липосомальная дисперсия, без осадка и признаков расслоения	$175 \pm 6$	$190 \pm 10$	$185 \pm 8$	$91 \pm 0,5$
	1 : 5	Светло-желтая дисперсия с осадком	$179 \pm 8$	$185 \pm 6$ (98 %) / $11 \pm 2$ (2 %)	$195 \pm 10$	80
	1 : 7,5		$178 \pm 8$	$202 \pm 12$	$200 \pm 10$ (99 %) / $11 \pm 2$ (1 %)	$90 \pm 1$
	1 : 10	Вязкая масса желтого цвета с признаками расслоения	$179 \pm 10$	$197 \pm 10$ (75 %) / $45 \pm 10$ (25 %)	$204 \pm 9$ (74 %) / $44 \pm 5$ (26 %)	

Таким образом, обобщая данные таблицы, криопротектором, обеспечивающим получение продукта с оптимальными показателями качества, является сахароза, вводимая в ЛФ в молярном соотношении лецитин/криопротектор 1 : 3. В данном случае при регидратации лиофилизата отмечалось образование светло-желтой дисперсии без осадка и признаков расслоения со средним размером везикул 175 нм и уровнем включения ЛХС-1208 92 %.

### ***3.6.2. Выбор режима лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208***

Качество лиофилизата липосомального препарата также зависит от режима сублимационного высушивания. Ключевой стадией лиофилизации, определяющей формирование кристаллов льда и морфологию замороженного материала, является замораживание. Данная стадия характеризуется такими основными факторами, как скорость и температура замораживания, а также скорость формирования льда. При выборе оптимальных условий лиофилизации липосомального ЛХС-1208 исследовали 3 режима – с медленным замораживанием, быстрым замораживанием и режим с предварительным замораживанием препарата в течение суток в морозильной камере.

#### **1) Медленное замораживание**

Флаконы с липосомальной дисперсией ЛХС-1208 помещали в камеру сублимационной сушки при комнатной температуре +(20–25) °С. Препарат замораживали, используя «медленное» (постепенное) понижение температуры: охлаждение от комнатной температуры до -15 °С с выдерживанием в течение 50 мин, охлаждение от -15 до -25 °С и выдерживание в течение 50 мин, охлаждение от -25 до -35 °С и выдерживание в течение 40 мин, охлаждение от -35 до -45 °С. После достижения и уравнивания минимальной температуры продукта флаконы с препаратом выдерживали в течение 3 ч, далее начинали откачку воздуха из камеры сублимационной установки. После включения вакуумного

насоса и выравнивания вакуума (около 3 ч) осуществляли: нагрев полок до температуры  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$  и выдерживание полок на температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч, нагрев полок до температуры  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$  и нагрев полок до комнатной температуры  $+(20\text{--}22)\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{час}$ . Далее препарат досушивали для удаления остаточной влаги около 3 ч по критерию неизменности остаточного давления паров в сублимационной камере при перекрывании вакуумной магистрали. Общее время лиофилизации препарата составило приблизительно 34 ч [1]. График сублимационной сушки ЛЛФ ЛХС-1208 по режиму с медленным замораживанием представлен на рисунке 8.

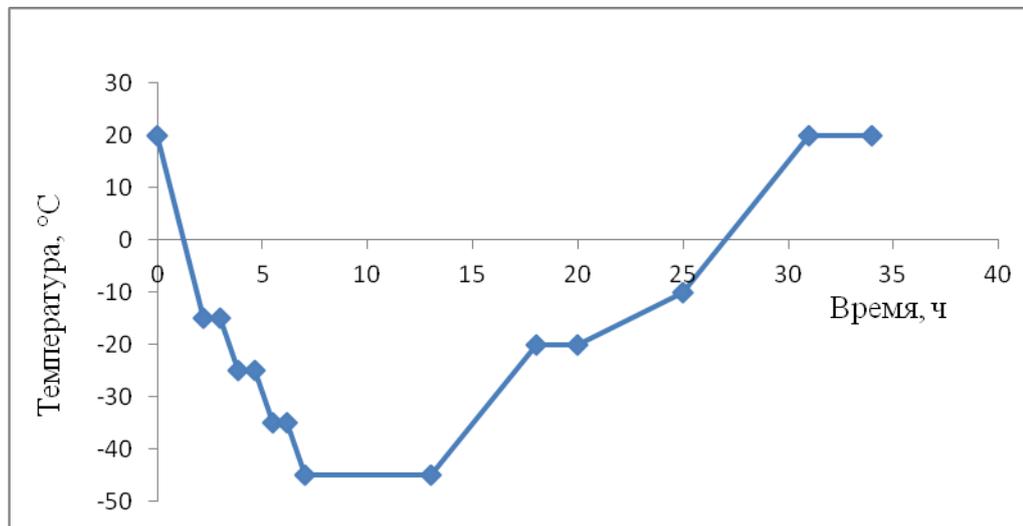


Рисунок 8. График сублимационной сушки ЛЛФ ЛХС-1208 по Режиму 1

## 2) Быстрое замораживание

Флаконы с дисперсией ЛХС-1208 помещали на полки сублимационной камеры при комнатной температуре  $+(20\text{--}25)\text{ }^{\circ}\text{C}$  и охлаждали их до  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч. После достижения заданной температуры на препарате выдерживали в течение 3 ч. Затем включали вакуум в камере. После выравнивания температуры и вакуума (около 3 ч) начинали сублимационную сушку: поднимали температуру от  $-45$  до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$  и выдерживали полки на температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч, далее нагревали полки до температуры  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$  и от  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  до комнатной

температуры  $+(20-22)$  °С со скоростью  $+5$  °С/час. Далее препарат досушивали для удаления остаточной влаги около 3 ч по критерию неизменности остаточного давления паров в сублимационной камере при перекрытии вакуумной магистрали. Общее время лиофилизации препарата составило приблизительно 29 ч [1]. График сублимационной сушки ЛЛФ ЛХС-1208 по режиму с медленным замораживанием представлен на рисунке 9.

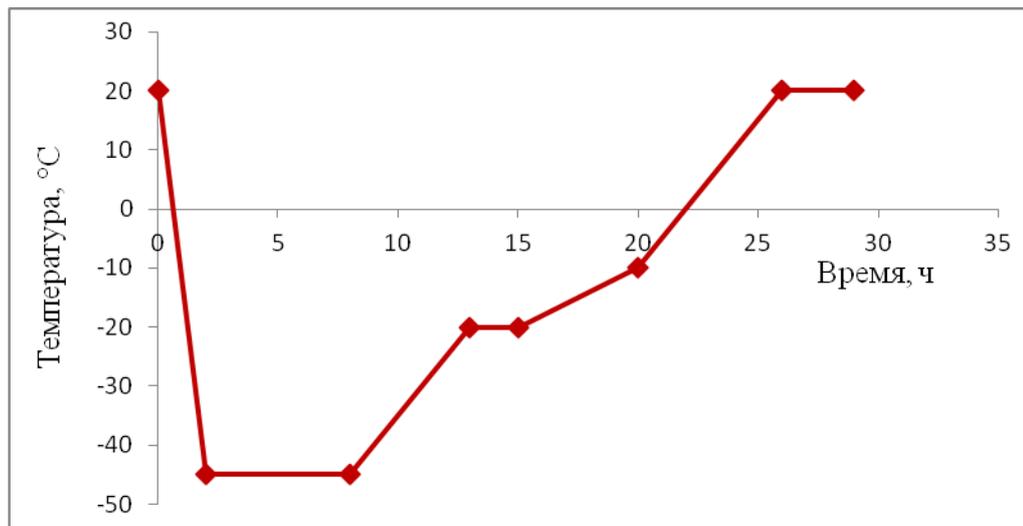


Рисунок 9. График сублимационной сушки ЛЛФ ЛХС-1208 по Режиму 2

### 3) Режим с предварительным замораживанием препарата в течение суток в низкотемпературной камере

Флаконы с липосомальной дисперсией ЛХС-1208 помещали в низкотемпературную камеру и выдерживали в течение суток при  $-40$  °С. Далее флаконы помещали на предварительно охлажденные до  $-45$  °С полки сублимационной камеры и охлаждали их до  $-45$  °С в течение 1 ч. После достижения заданной температуры на препарате выдерживали в течение 3 ч. Затем включали вакуум в камере. После выравнивания температуры и вакуума (около 3 ч) начинали сублимационную сушку. Поднимали температуру от  $-45$  до  $-20$  °С со скоростью  $5$  °С/ч и выдерживали полки на температуре  $-20$  °С в течение 2 ч, далее нагревали полки до температуры  $-10$  °С со скоростью  $2$  °С/ч и от  $-10$  °С до комнатной температуры  $+(20-22)$  °С со

скоростью  $+5$  °С/час. Далее препарат досушивали для удаления остаточной влаги около 3 ч по критерию неизменности остаточного давления паров в сублимационной камере при перекрывании вакуумной магистрали [17]. Общее время сублимационной сушки (без стадии предварительного замораживания) составило 27,5 ч (Рисунок 10).

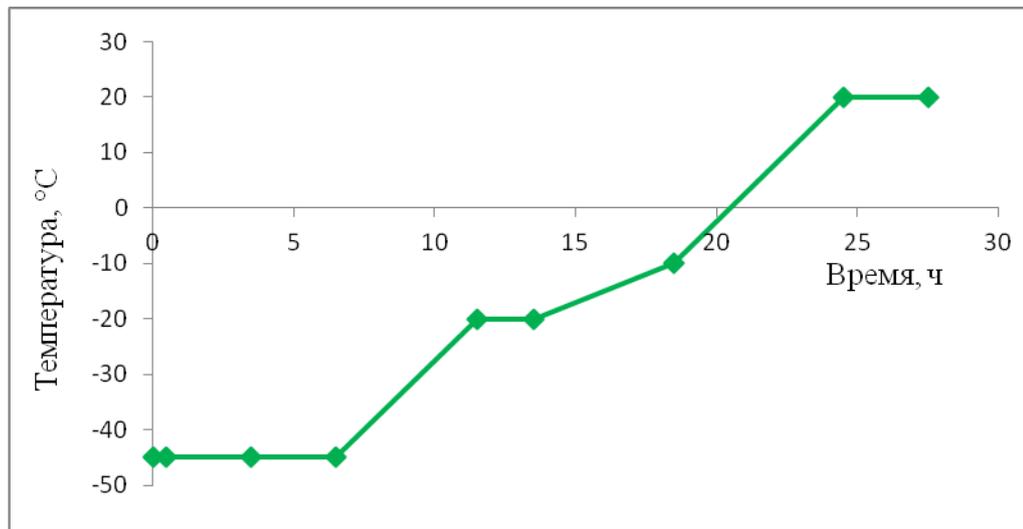


Рисунок 10. График сублимационной сушки ЛЛФ ЛХС-1208 по Режиму 3

В результате проведения серии сублимационных высушиваний ЛЛФ ЛХС-1208 с использованием 3 различных режимов лиофилизации установлено, что скорость и время замораживания влияет на качество конечного продукта. Согласно данным, представленным в таблице 13, полученные лиофилизаты представляли собой сухую пористую массу светло-желтого цвета, легко регидратируемую при добавлении воды. Используемые режимы 1 и 2 не оказывали влияния на изначальный размер липосом, который до и после лиофилизации составил в среднем 180 нм, а включение ДВ сохранялось на уровне 92 %. Однако предварительное замораживание и длительное выдерживание (в течение суток) препарата при температуре  $-40$  °С ухудшает качество лиофилизата и после регидратации отмечается образование липосом размером 195 нм.

Таблица 13

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

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

Поскольку режим с быстрым замораживанием требует меньших затрат времени и электроэнергии и обеспечивает получение качественного лиофилизата, данный режим рекомендован для получения ЛЛЛФ ЛХС-1208.

### **3.6.3. Выбор объема наполнения флакона липосомальной дисперсией ЛХС-1208**

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

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

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

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

Обобщенная схема технологии получения ЛЛЛФ ЛХС-1208 представлена на рисунке 11.

С использованием разработанной технологии получения наработаны 3 экспериментальные серии ЛЛЛФ ЛХС-1208.



Рисунок 11. Схема технологии получения ЛЛЛФ ЛХС-1208

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан состав и технология получения липосомального ЛХС-1208. В качестве вспомогательных компонентов ЛЛФ использованы лецитин, холестерин и ПЭГ-2000-ДГФА в молярных соотношениях 1 : 0,20 : 0,003, соответственно. Максимальное включение ДВ в липосомы отмечается при соотношении ЛХС-1208 / лецитин 1 : 150.

Эффективным методом уменьшения размера липосом с ЛХС-1208 оказалась экструзия с нейлоновыми фильтрами, так как она превосходит другие способы измельчения по показателям включения и получаемого размера липосом. Для получения везикул приемлемого размера липосомальную дисперсию необходимо последовательно пропускать через нейлоновые фильтры с диаметром пор 1,2 (1 раз), 0,45 (1 раз) и 0,22 мкм (не менее 4–5 раз).

Для увеличения стабильности ЛЛФ ЛХС-1208 разработана технология ее лиофилизации. В качестве криопротектора выбрана сахароза, вводимая в состав ЛФ на стадии гидратации липидной пленки в молярном соотношении лецитин / криопротектор 1 : 3. Для лиофилизации липосомальной дисперсии рекомендован режим с быстрым снижением температуры на стадии замораживания.

## **Глава 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЛЛФ ЛХС-1208**

Одним из этапов исследований по созданию ЛС является разработка методик качественного и количественного определения ДВ в лекарственном препарате. Выбор методов контроля качества проводится на стадии фармацевтической разработки и диктуется задачами контроля производственных стадий и контроля качества готовой продукции. При этом большое значение имеют методы анализа, позволяющие на самых ранних стадиях исследования быстро и надежно выявить отклонения в качестве и свойствах препарата.

Простыми и надежным методами контроля качества ЛФ, получивших широкое применение в фармацевтическом анализе липосомальных препаратов, являются хроматография с тонким слое сорбента (ТСХ) и спектрофотометрия в видимой и УФ-областях спектра.

В данной главе приведены результаты исследований по:

- разработке и валидации методики спектрофотометрического анализа для подтверждения подлинности и количественного определения ЛХС-1208 в липосомальной форме;
- разработке методики ТСХ-анализа действующего и вспомогательных компонентов ЛЛЛФ ЛХС-1208;
- стандартизации и изучению стабильности при хранении ЛЛЛФ ЛХС-1208.

### **4.1. Разработка и валидация методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 в ЛФ**

#### **4.1.1. Изучение спектральных характеристик ЛХС-1208**

Первоначальный этап разработки спектрофотометрической методики количественного определения ЛХС-1208 в ЛФ включал в себя решение ряда задач:

- изучение электронного спектра поглощения ЛХС-1208 в спиртовом растворе;
- выбор рабочей длины волны при количественном определении ЛХС-1208 в ЛФ;
- изучение влияния вспомогательных ингредиентов, входящих в состав ЛФ, на спектральные характеристики ЛХС-1208;
- выбор рабочей концентрации спиртового разведения ЛФ ЛХС-1208;
- оценка соблюдения закона Бугера-Ламберта-Бера.

В электронном спектре поглощения спиртового раствора субстанции ЛХС-1208 в области от 200 до 800 нм обнаружены максимумы при  $(319 \pm 2)$  нм,  $(286 \pm 2)$  нм,  $(238 \pm 2)$  нм и  $(203 \pm 2)$  нм (Рисунок 12). Наиболее интенсивная полоса поглощения отмечена при длине волны  $(319 \pm 2)$  нм.

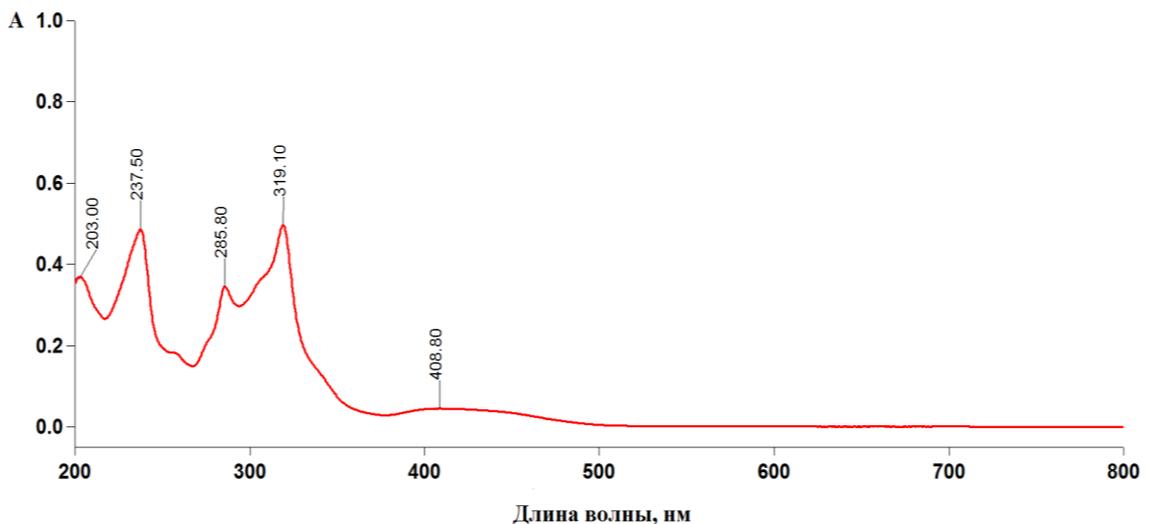


Рисунок 12. Электронный спектр поглощения спиртового разведения субстанции ЛХС-1208

При изучении электронного спектра поглощения спиртового разведения «пустых» липосом установлено, что вспомогательные компоненты имеют максимумы поглощения при  $(203 \pm 2)$ ,  $(269 \pm 2)$  и  $(280 \pm 2)$  нм (Рисунок 13). При длине волны  $(319 \pm 2)$  нм значение оптической плотности для спиртового разведения вспомогательных компонентов составляет 0,007 нм и, таким образом, не влияет на идентификацию и

количественное определение ЛХС-1208 в составе ЛФ. Поэтому измерение оптической плотности разведения ЛФ проводили относительно спирта этилового 95 %.

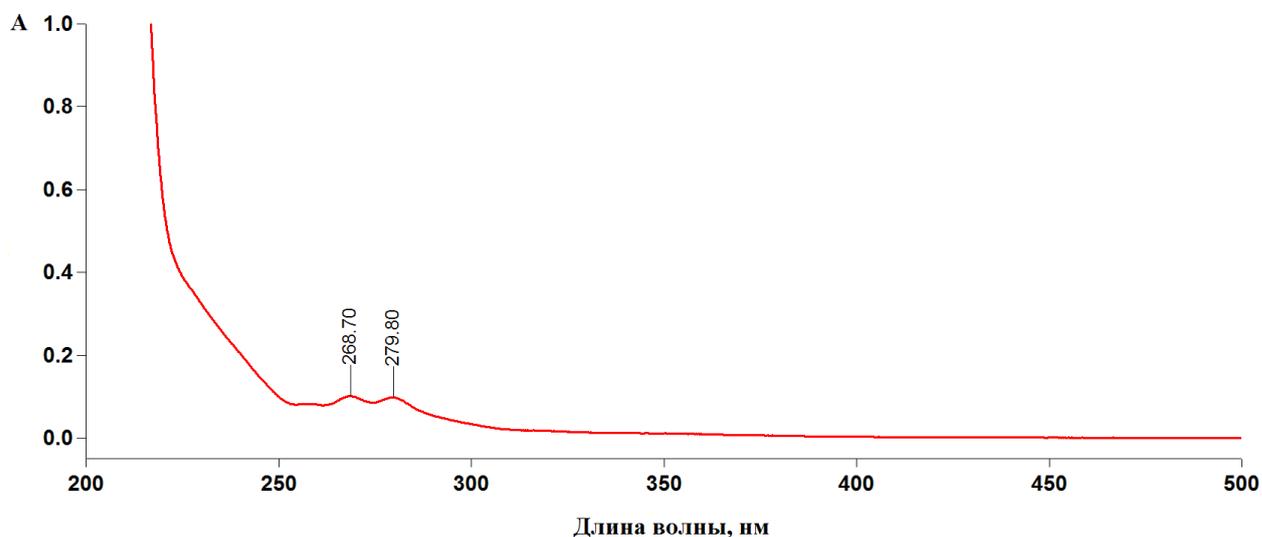


Рисунок 13. Электронный спектр поглощения спиртового разведения «пустых» липосом

С целью выбора рабочей концентрации и проверки соблюдения закона Бугера-Ламберта-Бера при длине волны  $(319 \pm 2)$  нм готовили спиртовые разведения субстанции ЛХС-1208 в диапазоне концентраций 0,001–0,010 мг/мл. Для этого к 1,0 мг субстанции ЛХС-1208 добавляли 15–20 мл спирта 95 % и помещали в ультразвуковую ванну на 5–10 мин для ускорения процесса растворения. Полученный раствор помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили спиртом до метки (раствор А). Далее из раствора А с концентрацией ЛХС-1208 0,01 мг/мл готовили спиртовые разведения согласно таблице 14 и измеряли их оптическую плотность относительно спирта 95 %.

Таблица 14

Проверка соблюдения закона Бугера-Ламберта-Бера спиртовых растворов ЛХС-1208 при длине волны 319 нм

№	Спиртовой раствор		Концентрация ЛХС-1208 в растворе, мг/мл	Оптическая плотность
	Взятый объем раствора А, мл	Добавленный объем спирта 95 %, мл		
1	-	-	0,010	1,110
2	9	1	0,009	1,000

3	8	2	0,008	0,870
4	7	3	0,007	0,774
5	6	4	0,006	0,669
6	5	5	0,005	0,557
7	4	6	0,004	0,447
8	3	7	0,003	0,325
9	2	8	0,002	0,218
10	1	9	0,001	0,117

Для спиртовых разведений субстанции ЛХС-1208 линейную зависимость оптической плотности от концентрации при длине волны 319 нм наблюдали во всем исследуемом диапазоне (Рисунок 14), что указывает на соблюдение основного закона светопоглощения – закона Бугера-Ламберта-Бера.

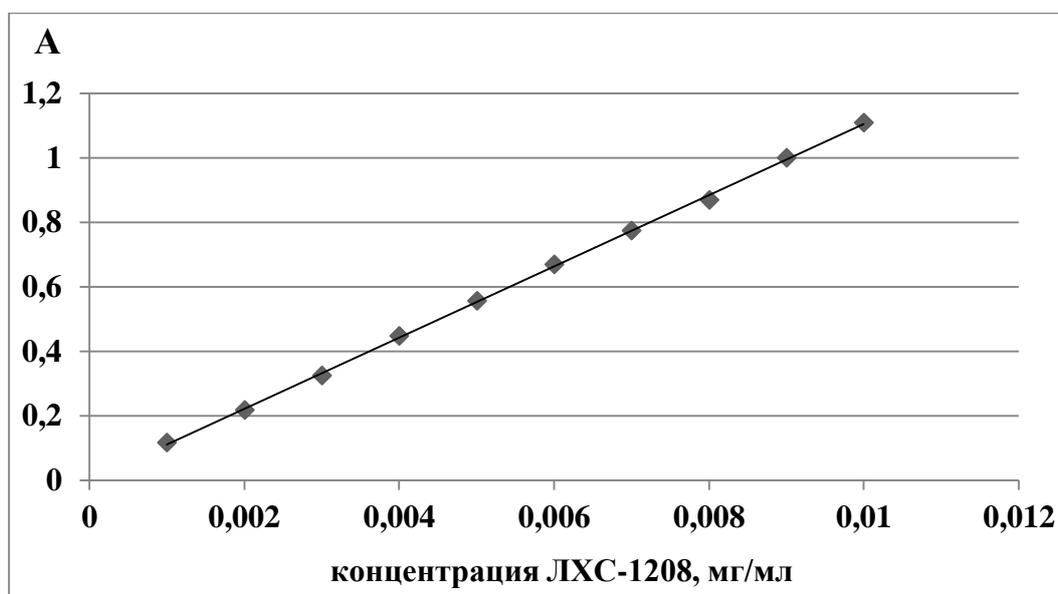


Рисунок 14. Оценка соблюдения закона Бугера-Ламберта-Бера

Поскольку для количественного определения значение оптической плотности должно составлять около значения 0,5, далее проводили подбор разведения липосомальной дисперсии ЛХС-1208 и ее лиофилизата для получения анализируемых спиртовых растворов с концентрацией действующего вещества 0,004–0,005 мг/мл.

#### 4.1.2. Количественное определение ЛХС-1208 в ЛФ

*Приготовление СО.* К точной навеске субстанции ЛХС-1208 1,0 мг добавляют 15–20 мл спирта 95 % и помещают в ультразвуковую ванну на 5–

10 мин для ускорения процесса растворения. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят спиртом до метки (раствор А). 5 мл раствора А отбирают в колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом до метки (раствор Б). Раствор Б используют свежеприготовленным.

*Методика количественного спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии.* 2 мл липосомальной дисперсии ЛХС-1208 отбирают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 10–15 мл спирта 95 %, перемешивают, доводят спиртом до метки и вновь перемешивают (раствор А). 5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют небольшое количество спирта 95 %, перемешивают, доводят спиртом до метки и вновь перемешивают (раствор Б). Измеряют величину оптической плотности полученного раствора Б в максимуме поглощения в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм относительно раствора сравнения – спирта 95 %. Определение оптической плотности раствора СО субстанции ЛХС-1208 относительно спирта 95 % проводится параллельно.

Концентрацию ЛХС-1208 в дисперсии (С, мг/мл) рассчитывают по формуле:

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

где: А и А<sub>0</sub> – соответственно оптические плотности растворов исследуемого образца липосомальной дисперсии и СО субстанции ЛХС-1208;

a<sub>0</sub> – навеска СО субстанции ЛХС-1208, в мг;

V и V<sub>0</sub> – разведения образца липосомальной дисперсии и СО ЛХС-1208, соответственно.

Как видно из данных таблицы 15, относительная погрешность количественного определения ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии составляет 0,33 %.

Таблица 15

Результаты количественного определения ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии

№ образца ЛЛФ ЛХС-1208	Оптическая плотность исследуемого раствора	Оптическая плотность СО	Концентрация ЛХС-1208 в образце ЛЛФ	Статистические характеристики
1	0,535	0,440	0,304	n = 6, f = 5, $x_{\text{ср}} = 0,303$ , $S^2 = 1,6 \times 10^{-6}$ , $S = 1,26 \times 10^{-3}$ , $x_{\text{ср}} \pm \Delta x (P = 95 \%) =$ $0,303 \pm 0,002$ , $\varepsilon = 0,33 \%$
2	0,532		0,302	
3	0,536		0,305	
4	0,531		0,302	
5	0,535		0,304	
6	0,534		0,303	

*Методика количественного спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 в лиофилизате.* К содержимому флакона ЛЛЛФ ЛХС-1208 добавляют 5,6 мл воды и перемешивают до получения гомогенной липосомальной дисперсии. Дисперсию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 10–15 мл спирта 95 %, перемешивают и доводят спиртом до метки (раствор А). 3 мл раствора А отмеривают в колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом до метки (раствор Б). Измеряют величину оптической плотности полученного раствора Б в максимуме поглощения в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм относительно спирта 95 %. Параллельно проводят определение оптической плотности раствора СО субстанции ЛХС-1208 относительно спирта 95 %.

Содержание ЛХС-1208 во флаконе (X, мг) рассчитывают по формуле:

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

где: A и A<sub>0</sub> – соответственно оптические плотности растворов образца ЛЛЛФ и СО ЛХС-1208;

a<sub>0</sub> – навеска СО ЛХС-1208, в мг;

V и V<sub>0</sub> – разведения образца ЛЛЛФ и СО ЛХС-1208, соответственно.

Относительная погрешность количественного определения ЛХС-1208 в ЛЛЛФ составляет 0,56 % (Таблица 16).

Таблица 16

Результаты количественного определения ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии

№ флакона ЛЛЛФ ЛХС-1208	Оптическая плотность исследуемого раствора	Оптическая плотность СО	Содержание ЛХС-1208 во флаконе	Статистические характеристики
1	0,476	0,446	1,78	$n = 6, f = 5,$ $x_{cp} = 1,78,$ $S^2 = 1,2 \times 10^{-4},$ $S = 1,1 \times 10^{-2},$ $x_{cp} \pm \Delta x (P = 95 \%) =$ $1,78 \pm 0,01,$ $\varepsilon = 0,56 \%$
2	0,475		1,78	
3	0,473		1,77	
4	0,470		1,76	
5	0,479		1,79	
6	0,477		1,78	

#### 4.1.3. Валидация методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 в ЛФ

Главной задачей валидации аналитической методики является экспериментальное доказательство пригодности данной методики для достижения тех целей, для которых она предназначена [49].

##### *Специфичность*

Специфичность, иначе избирательность методики, проявляется в способности аналитического испытания измерять содержание анализируемого вещества в пробе в составе других компонентов, наличие которых в препарате вполне вероятно [49].

Для подтверждения специфичности методики спектрофотометрического определения ЛХС-1208 в ЛФ сравнивали электронные спектры поглощения спиртовых разведений субстанции ЛХС-1208, вспомогательных веществ и ЛЛЛФ ЛХС-1208. Как видно на рисунке 15 кривые раствора субстанции (1) и ЛЛЛФ (3) схожи по форме и положению максимумов, а оптическая плотность вспомогательных веществ в области 320 нм близка к нулю (кривая 2) и не оказывает значительного влияния на значение концентрации ДВ в ЛФ. Таким образом, электронный спектр поглощения липосомального ЛХС-1208 может применяться для определения подлинности ЛХС-1208 в ЛФ, а методику можно считать специфичной.

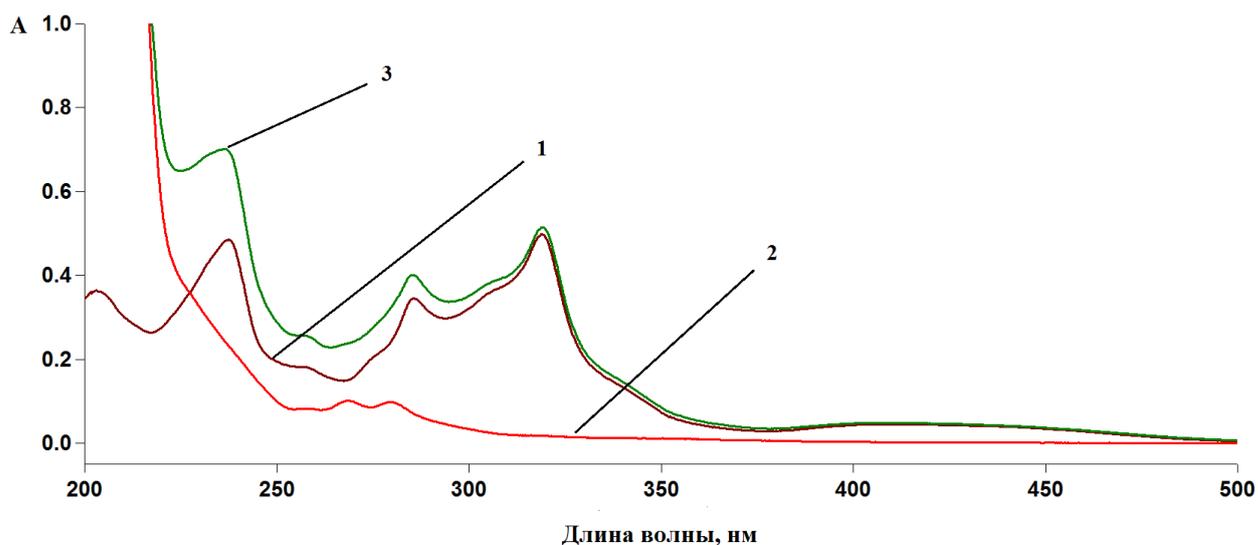


Рисунок 15. Электронные спектры поглощения спиртовых разведений субстанции ЛХС-1208 (1), вспомогательных веществ (2) и ЛЛЛФ ЛХС-1208 (3)

#### *Диапазон применения*

Диапазон служит мерилем максимальной концентрации анализируемого вещества, которую можно измерить с приемлемой степенью точности и сходимости. Это верхний предел определения линейности [49].

Для методики количественного определения ЛХС-1208 в ЛЛЛФ установлен диапазон применения 80–120 % от искомой концентрации аналитического раствора (1,8 мг/флакон). Результаты, которые могут быть получены с использованием валидируемой методики, согласно требованиям должны иметь приемлемый уровень линейности, правильности и прецизионности в пределах данного интервала.

#### *Линейность*

Потенциал контрольного исследования получать результаты испытаний (так называемый фактор отклика), прямо пропорциональных концентрации анализируемого исследуемого вещества в пробе характеризуют линейность. Определение этого параметра позволяет уточнять диапазон измерений конкретного аналитического испытания [49]. Экспериментальные данные обрабатывают методом наименьших квадратов с использованием линейной модели

$$y = b \times x + a,$$

где:  $y$  – величина отклика,

$x$  – количество или концентрация определяемого вещества,

$b$  – угловой коэффициент,

$a$  – свободный член,

а также рассчитывают величину коэффициента корреляции  $r$  [14].

Линейность разработанной методики количественного определения ЛХС-1208 в ЛЛЛФ подтверждали в заданном диапазоне применения путем измерения оптической плотности анализируемого раствора на 5 уровнях концентрации вещества в пробе – 80, 90, 100, 110 и 120 %.

Для проведения исследования готовили аналитические растворы ЛЛЛФ, представляющие собой спиртовые растворы действующего и вспомогательных веществ (кроме сахарозы) с различными концентрациями ЛХС-1208 (Таблица 17). Сахарозу в модельные смеси не добавляли, т.к. она очень мало растворима в спирте. Ранее было установлено, что сахароза не поглощает излучение при используемой в анализе длине волны ( $319 \pm 2$ ) нм.

Таблица 17

Навески ЛХС-1208 и вспомогательных веществ ЛЛЛФ, используемые для приготовления анализируемых растворов при валидации методики количественного анализа по характеристикам «линейность» и «правильность»

Компонент	Навеска компонента, мг				
	Анализируемый раствор				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
ЛХС-1208	1,44	1,62	1,80	1,98	2,16
Лецитин	432,0				
Холестерин	45,0				
ПЭГ-2000-ДФА	5				

#### Приготовление аналитического раствора

Навески лецитина, холестерина и ПЭГ-2000-ДФА, указанные в таблице 17, растворяли в 15–20 мл спирта 95 %. К точной навеске ЛХС-1208 (1,44; 1,62; 1,80; 1,98 или 2,16 мг) добавляли 20 мл спирта 95 % и помещали в

ультразвуковую ванну на 10–15 мин для ускорения процесса растворения. Полученные растворы помещали в мерную колбу на 50 мл и доводили до метки спиртом (Раствор А). Отбирали 3 мл раствора А в колбу на 25 мл и доводили спиртом до метки.

Величину оптической плотности полученного раствора измеряли в максимуме поглощения ЛХС-1208 в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм относительно спирта 95 %. Значение оптической плотности для каждого аналитического раствора (№ 1–5) было получено путем расчёта среднего значения из нескольких измерений. Результаты исследования приведены в таблице 18.

Коэффициент корреляции составил значение более 0,999, что свидетельствует о наличии тесной линейной зависимости между концентрацией ЛХС-1208 и оптической плотностью в заданном диапазоне применения 80–120 %. Уравнение линейной регрессии, примененное к результатам, имеет вид  $y = 1,673x - 0,024$ . Графическое изображение линейности методики показано на рисунке 16.

Таблица 18

Оценка линейности методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1208

<i>Концентрация ЛХС-1208</i>		<i>Значение оптической плотности, А</i>	<i>Регрессия</i>
<i>%</i>	<i>мг/мл</i>		
80	0,24	0,374	0,378
90	0,27	0,430	0,428
100	0,30	0,480	0,478
110	0,33	0,528	0,528
120	0,36	0,576	0,578
<i>Статистические характеристики</i>			<i>Результаты</i>
Наклон прямой ( <i>b</i> )			1,673

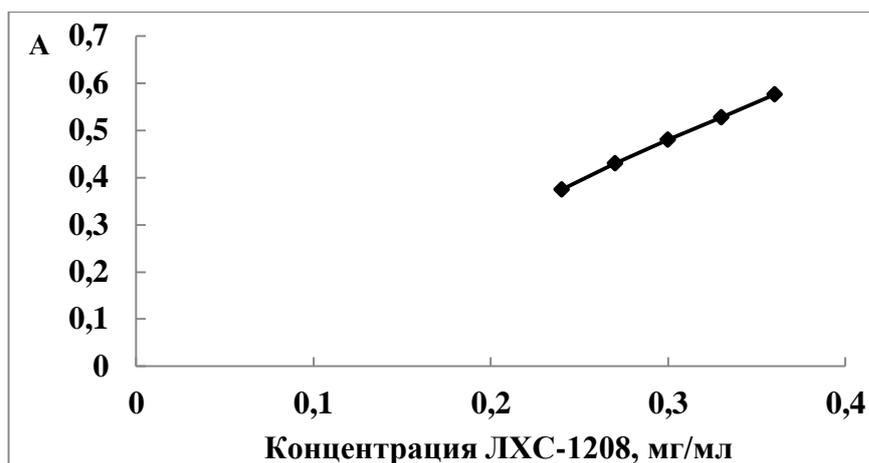


Рисунок 16. График регрессионной прямой линейности методики количественного определения ЛХС-1208 в ЛЛЛФ в максимуме поглощения 319 нм

### *Правильность (точность)*

Правильность выражает степень соответствия фактического параметра препарата его расчетному значению. Измерение правильности проводится путем испытания при искусственно создаваемых нагрузках, и определяется степень результативности анализов – пробу, характеристики которой известны, смешивают с наполнителями, а фактический параметр препарата сопоставляют с результатом контрольного исследования. Принято выразить правильность в величине систематической ошибки или в процентах погрешности между измеренной и истинной величиной (экспериментальное значение/действительное значение  $\times 100\%$ ) [49].

Правильность методики количественного определения ЛХС-1208 в ЛЛЛФ оценивали с использованием девяти определений на трех концентрациях действующего вещества, охватывающих заданный диапазон применения 80–120 %. С этой целью, по аналогии с оценкой «линейности», готовили по 3 анализируемых раствора для каждой из 3-х концентраций – 80, 100 и 120 % (в Таблице 18 соответственно растворы № 1, 3 и 5). На основании полученных результатов от девяти измерений были рассчитаны процентное отношение разности величин заданной и истинной к заданной величине (отклик), доверительный интервал и относительную погрешность среднего результата.л

По результатам исследования, представленным в таблице 19, видно, что разработанную методику количественного определения ЛХС-1208 в ЛЛЛФ может считаться правильной, поскольку получаемые результаты близки к действительному значению и значение относительной погрешности среднего результата в результате исследования не превышает 0,23 %.

Таблица 19

## Оценка правильности методики количественного анализа ЛХС-1208

Концентрация, %	№ пробы	Содержание ЛХС-1208, мг		Отклик, %
		экспериментальное значение	действительное значение	
80	1	1,45	1,44	100,69
	2	1,45	1,45	100,00
	3	1,44	1,44	100,00
100	1	1,81	1,80	100,56
	2	1,80	1,80	100,00
	3	1,82	1,82	100,00
120	1	2,16	2,16	100,00
	2	2,18	2,17	100,46
	3	2,16	2,15	100,47
<i>Статистические характеристики, %</i>				<i>Результаты</i>
Среднее значение				100,24
Стандартное отклонение				0,295
Доверительный интервал (P = 95 %)				100,24 ± 0,23
Относительная погрешность среднего результата				0,23

*Прецизионность*

Валидация аналитической методики для количественного определения включает оценку прецизионности. Прецизионность проявляется в степени соответствия между серией измерений, полученных в итоге контрольного исследования. Эту категорию принято выражать в коэффициенте вариации (CV, %). Коэффициент вариации представляет собой среднеквадратическое отклонение экспериментальных величин, поделенное на концентрацию анализируемого вещества. В измерениях принято использовать несколько типов прецизионности [14, 49].

Прецизионность разработанной методики спектрофотометрического определения ЛХС-1208 в ЛЛЛФ оценивалась в двух вариантах:

1. повторяемость (сходимость)
2. внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность.

➤ *Повторяемость (сходимость)*

Повторяемость методики оценивали по независимой по независимым результатам, полученным в одинаковых условиях в одной лаборатории (один исполнитель, одно оборудование) в пределах короткого промежутка времени на 6 определениях при 100 % концентрации аналитического раствора (1,8 мг/флакон) [14]. Результаты исследования методики в условиях повторяемости представлены в таблице 20.

На основании полученных в ходе исследования данных разработанную методику количественного анализа можно считать прецизионной в условиях повторяемости, это подтверждается тем, что коэффициент вариации имеет значение менее 10 % (0,88 %), что свидетельствует о незначительной изменчивости вариационного ряда.

Таблица 20

Оценка сходимости методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1208

<i>Концентрация, %</i>	<i>№ пробы (флакона)</i>	<i>Содержание ЛХС-1208 в пробе, мг</i>
100	1	1,82
	2	1,83
	3	1,80
	4	1,82
	5	1,84
	6	1,80
<i>Статистические характеристики</i>		<i>Результаты</i>
Среднее значение, мг/флакон		1,82
Стандартное отклонение, мг/флакон		$1,6 \times 10^{-2}$
CV, %		0,88
Доверительный интервал (P = 95 %), мг/флакон		$1,82 \pm 0,02$
Относительная погрешность среднего результата, %		1,1

➤ *Внутрилабораторная прецизионность*

Внутрилабораторную прецизионность валидируемой методики оценивали при различных условиях работы одной лаборатории (оценка производилась в разные дни, разными исследователями, которые предварительно не обменивались опытом оценки между собой) на 6 определениях при 100 % концентрации аналитического раствора (1,8 мг/флакон).

При сравнении результатов количественного определения ЛХС-1208 в ЛЛЛФ, полученных двумя исследователями, установлено, что  $F_{\text{расч}} < F_{\text{табл}}$  и  $t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}$ , следовательно, различия между средними значениями и стандартными отклонениями результатов случайны и методику можно считать прецизионной в условиях внутрилабораторной прецизионности (Таблица 21).

Таблица 21

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1208

Концентрация, %	№ пробы (флакона)	Содержание ЛХС-1208 в пробе, мг	
		Исследователь 1	Исследователь 2
100	1	1,82	1,81
	2	1,83	1,80
	3	1,80	1,82
	4	1,82	1,82
	5	1,84	1,81
	6	1,80	1,81
<i>Статистические характеристики</i>		<i>Результаты</i>	
Среднее значение, мг/флакон		1,82	1,81
Стандартное отклонение, мг/флакон		$1,6 \times 10^{-2}$	$7,75 \times 10^{-3}$
Коэффициент вариации, %		0,88	0,43
Доверительный интервал (P = 95 %), мг/флакон		$1,82 \pm 0,02$	$1,81 \pm 0,01$
Относительная погрешность среднего результата, %		1,10	0,55
$F_{\text{табл}} (5 \% ; 5 ; 5) = 5,05$		$F_{\text{расч}} = 4,33$	
$t_{\text{табл}} (95 \% ; 10) = 2,23$		$t_{\text{расч}} = 1,37$	

#### 4.2. Разработка методики ТСХ-анализа ЛЛЛФ ЛХС-1208

Цель данной работы – установление оптимальных условий хроматографического разделения компонентов ЛЛЛФ ЛХС-1208. Основу

исследований составили литературные данные о качественном ТСХ-анализе липосомальных препаратов и объекта исследования – ЛХС-1208.

При ТСХ-анализе ЛЛЛФ ЛХС-1208 использованы пластинки для хроматографии с силикагелем «Sorbfil» марки ПТСХ-АФ-А.

Поскольку сахара присутствует в ЛФ в значительно большем количестве, чем остальные компоненты, хроматографический анализ данного вспомогательного вещества проводили отдельно.

#### **4.2.1. Методика ТСХ-анализа ЛХС-1208 и липидных компонентов ЛФ**

##### *Приготовление исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1208*

К лиофилизату приливают 5,6 мл воды и перемешивают. Затем добавляют 12 мл спирта 95 %, перемешивают. В полученном образце концентрация ЛХС-1208 составляет 0,1 мг/мл.

##### *Приготовление стандартных образцов веществ-свидетелей (СОВС):*

*СОВС-1 – спиртовой раствор ЛХС-1208 0,1 мг/мл. 1,0 мг ЛХС-1208 растворяют в 10 мл спирта 95 % на ультразвуковой ванне.*

*СОВС-2 – спиртовой раствор лецитина 24 мг/мл. 120,0 мг лецитина растворяют в 5 мл спирта 95 %.*

*СОВС-3 – спиртовой раствор холестерина 2,5 мг/мл. 25 мг холестерина растворяют в 10 мл спирта 95 %.*

##### *Подготовка хроматографической камеры*

В отдельной емкости смешивают растворители и переливают в камеру, которую плотно закрывают крышкой и оставляют на 30 мин для насыщения камеры парами подвижной фазы.

##### *Подготовка йодной камеры*

На дно эксикатора устанавливают тигель с 1,0 г йода и оставляют на 10–15 мин для его возгонки.

##### *Приготовление 20 % раствора серной кислоты*

Осторожно при помешивании к 100 мл воды приливают 25 мл концентрированной серной кислоты.

#### *Методика анализа*

На линию старта хроматографической пластинки наносят по 5 мкл исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1208 и спиртовых растворов СОВС: ЛХС-1208 (СОВС-1 – 0,5 мкг), лецитина (СОВС-2 – 120 мкг) и холестерина (СОВС-3 – 12,5 мкг). Пластинку с нанесенными пробами подсушивают на воздухе и помещают в хроматографическую камеру с элюентом, плотно закрывают крышкой и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом подвижной фазы линии финиша (пробег 12 см) пластинку вынимают из камеры и высушивают до полного удаления запаха растворителей в потоке воздуха.

ЛХС-1208 идентифицируют визуально без использования специфических реактивов по характерным пятнам светло-желтого цвета. Для обнаружения лецитина пластинку помещают в йодную камеру и выдерживают около одной минуты до появления пятен желтого цвета данного вещества. Совместно с лецитином проявляются быстро исчезающие светло-желтые пятна холестерина, которые детектируют путем опрыскивания хроматографической пластинки 20 % раствором серной кислотой с последующим ее нагреванием до появления розово-фиолетовых пятен. В связи с низкой концентрацией в анализируемых пробах (0,28 мг/мл) ПЭГ-ДГФА не определяется.

Обнаруженные пятна в липосомальных образцах идентифицируют относительно пятен СОВС и характеризуют по величине удерживания  $R_f$ , рассчитываемой по формуле:

$$R_f = L_b/L_\phi,$$

где:  $L_b$  – расстояние от линии старта до центра хроматографической зоны исследуемого вещества, мм;

$L_\phi$  – расстояние от линии старта до линии финиша элюента, мм [14].

#### 4.2.2. Методика ТСХ-анализа сахарозы в ЛЛЛФ ЛХС-1208

##### *Приготовление исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1208*

К лиофилизату добавляют 5,6 мл воды и перемешивают до получения липосомальной дисперсии, 1 мл которой для реализации процесса переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до фиксированной метки. В полученном образце концентрация сахарозы составляет 1 мг/мл.

##### *Приготовление СОВС-4 – водный раствор сахарозы 1 мг/мл.*

Навеску сахарозы 10,0 мг растворяют в 10 мл воды.

##### *Приготовление раствора $\alpha$ -нафтола*

Навеску  $\alpha$ -нафтола 0,5 г растворяют в 50 мл смеси 19 : 1 по объему спирта 95 % и концентрированной серной кислоты. Полученный раствор помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят той же смесью растворителей до метки.

##### *Методика анализа*

На линию старта пластинки для хроматографирования наносят по 2 мкл исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1208 (сахароза – 2,0 мкг) и водного раствора СОВС-4 (сахароза – 2,0 мкг), которую помещают в камеру со смесью растворителей, плотно закрывают крышкой и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт элюента пройдет расстояние 12 см, хроматографическую пластинку вынимают из камеры и высушивают до полного удаления растворителей в потоке теплого воздуха. Пластинку опрыскивают раствором  $\alpha$ -нафтола и нагревают до появления характерных для сахарозы темно-фиолетовых пятен. Рассчитывают  $R_f$  пятен сахарозы для ЛФ и СОВС-4.

#### 4.2.3. Выбор подвижной фазы для хроматографического анализа

Для приготовления элюента использовали растворители, широко применяемые в химико-фармацевтическом анализе: хлороформ, этанол 95 %, пропанол-2, н-бутанол, метанол, бензол, ацетон, аммиак водный 25 %, ледяную уксусную кислоту, гексан и воду. Эффективность подвижной фазы

оценивали по величине удерживания  $R_f$  и количеству детектируемых пятен на хроматографической пластинке. При этом систему растворителей считали приемлемой, если значения величины удерживания для пятен определяемых веществ находились в диапазоне 0,3–0,7.

Было изучено 14 элюирующих систем различного качественного и количественного состава. Результаты исследования по выбору подвижной фазы представлены в таблице 22.

Ранее при разработке методики ТСХ-анализа ИЛФ-лио ЛХС-1208 в качестве подвижной фазы для качественного определения ДВ в ЛФ была выбрана система растворителей бензол – спирт этиловый (1 : 1), при которой значение  $R_f$  для ДВ составило 0,63. Однако данная система при хроматографировании ЛЛЛФ оказалась менее эффективной –  $R_f$  для ЛХС-1208 составило значение 0,36. Кроме того, при использовании данной системы лецитин остался на старте, а значения  $R_f$  для холестерина и сахарозы составили 0,8 и 0,24, соответственно.

Как видно из таблицы 22, ни одна из предложенных систем не позволяет провести одновременный анализ всех определяемых компонентов ЛФ. Непригодными для анализа оказались системы 2, 5, 7 и 11, в которых обнаруженные пятна имели значения  $R_f$  менее 0,3 и более 0,7, а системы 6, 9, 13 и 14 применимы только для анализа одного компонента.

В результате сравнения данных, полученных при хроматографировании в системах 3, 4, 8, 10 и 11 для совместной идентификации ЛХС-1208 и холестерина в ЛФ выбрана система 8 – хлороформ–этанол–гексан (5 : 3 : 3), при которых  $R_f$  составили значения 0,54 и 0,68, соответственно. Система 10 – хлороформ–этанол–вода (16 : 6 : 1) позволяет проводить одновременно в одной хроматографической камере, но на разных пластинках, ТСХ-анализ лецитина и сахарозы.

Таблица 22

## Оценка эффективности различных систем растворителей при ТСХ-анализе ЛЛЛФ ЛХС-1208

№	Система растворителей	Значение R <sub>f</sub>							
		ЛХС-1208		лецитин		холестерин		сахароза	
		ЛФ	СОВС-1	ЛФ	СОВС-2	ЛФ	СОВС-3	ЛФ	СОВС-4
1	бензол–спирт этиловый (1 : 1)	0,36	0,37	старт	0,02	0,80	0,82	0,24	0,24
2	бутанол–ледяная уксусная кислота–вода (6 : 3 : 2)	0,25	0,26	0,03	0,03	0,86	0,86	0,08	0,09
3	хлороформ–этанол–ледяная уксусная кислота–вода (40 : 7 : 7 : 5)	0,63	0,63	0,31	0,30	1,00	1,00	0,12	0,13
4	хлороформ–этанол–ледяная уксусная кислота–ацетон–вода (6 : 2 : 2 : 1 : 1)	0,32	0,32	0,35	0,35	1,00	1,00	0,18	0,20
5	хлороформ–этанол (7 : 4)	0,72	0,72	старт	старт	1,00	1,00	0,29	0,29
6	хлороформ–аммиак (4 : 1)	0,23	0,26	старт	старт	0,68	0,67	0,88	0,89
7	хлороформ–метанол–аммиак–вода (18 : 1 : 1 : 1)	0,12	0,12	старт	старт	0,79	0,80	-	107
8	хлороформ–этанол–гексан (5 : 3 : 3)	0,54	0,54	0,11	0,11	0,68	0,69	старт	старт
9	хлороформ–метанол–аммиак (88 : 1 : 1)	старт	старт	старт	старт	0,64	0,65	-	-
10	хлороформ–этанол–вода (16 : 6 : 1)	0,85	0,86	0,37	0,37	0,91	0,91	0,47	0,48
11	хлороформ–ледяная уксусная кислота–этанол–аммиак (12 : 6 : 1 : 1)	0,27	0,29	0,23	0,24	0,84	0,84	0,25	0,25
12	хлороформ–ледяная уксусная кислота–бутанол–аммиак (12 : 6 : 1 : 1)	0,54	0,53	0,38	0,38	0,91	0,92	0,08	0,10
13	гексан–ледяная уксусная кислота (1 : 1)	0,72	0,73	старт	старт	0,95	0,95	0,43	0,4
14	ацетон–ледяная уксусная кислота (15 : 3 : 2)	0,22	0,23	0,02	0,02	0,82	0,83	0,35	0,35

#### 4.2.4. Оценка пригодности хроматографических систем

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

##### *Оценка пригодности системы хлороформ–этанол–гексан (5 : 3 : 3)*

*Приготовление исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1208* – См. раздел 4.2.1.

*Приготовление СОВС:*

*СОВС-1* – спиртовой раствор ЛХС-1208 0,1 мг/мл – См. раздел 4.2.1.

*СОВС-3* – спиртовой раствор холестерина 2,5 мг/мл – См. раздел 4.2.1.

*СОВС-3/1* – спиртовой раствор холестерина 1,0 мг/мл. 10,0 мг холестерина растворяют в 10 мл спирта 95 %.

*Приготовление 20 % раствора серной кислоты.* – См. раздел 4.2.1.

*Методика анализа*

На линию старта пластинки для хроматографирования наносят пробы: по 5 мкл исследуемого образца ЛФ (ЛХС-1208 – 0,5 мкг, холестерин – 12,5 мкг), СОВС-1 (ЛХС-1208 – 0,5 мкг) и СОВС-3 (холестерин 12,8 мкг), и по 1 мкл СОВС-1 (ЛХС-1208 – 0,1 мкг) и СОВС-3/1 (холестерин 1,0 мкг). Подсушенную на воздухе хроматографическую пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру со смесью хлороформ–этанол–гексан (5 : 3 : 3), плотно закрывают крышкой и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом подвижной фазы линии финиша хроматографическую пластинку вынимают из камеры и высушивают до полного удаления запаха растворителей в потоке воздуха. ЛХС-1208 определяют на пластинке визуально без использования специфических

реактивов по характерным светло-желтым пятнам. Детектирование пятен холестерина проводят путем обработки пластинки 20 % раствором серной кислоты и нагреванием до появления розово-фиолетовых пятен.

При проверке пригодности подвижной фазы хлороформ–этанол–гексан (5 : 3 : 3) значения  $R_f$  составили:

- образец ЛФ: ЛХС-1208 – 0,55, холестерин – 0,68;
- СОВС-1 – 0,54;
- СОВС-3 – 0,68;
- СОВС-1 – 0,55;
- СОВС-3/1 – 0,68.

Таким образом, систему растворителей хлороформ–этанол–гексан (5 : 3 : 3) можно считать пригодной, если на хроматографической пластинке против СОВС-1 (ЛХС-1208 0,1 мкг) обнаруживается округлое пятно светло-желтого цвета, а против СОВС-3/1 (холестерин 1,0 мкг) при проявлении 20 % раствором серной кислоты – пятно розового цвета.

***Оценка пригодности системы хлороформ–этанол–вода (16 : 6 : 1)***

*Приготовление исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1208 для анализа лецитина (№ 1) – См. раздел 4.2.1.*

*Приготовление исследуемого образца ЛЛЛФ ЛХС-1208 для анализа сахарозы (№ 2) – См. раздел 4.2.2.*

*Приготовление СОВС:*

*СОВС-2 – спиртовой раствор лецитина 18 мг/мл. – См. раздел 4.2.1.*

*СОВС-2/1 – спиртовой раствор лецитина 1 мг/мл. Навеску лецитина 10,0 мг растворяют в 10 мл спирта 95 %.*

*СОВС-4 – водный раствор сахарозы 1 мг/мл. – См. раздел 4.2.2.*

*СОВС-4/1 – водный раствор сахарозы 0,1 мг/мл. 10,0 мг сахарозы растворяют в 100 мл воды.*

*Приготовление раствора  $\alpha$ -нафтола. – См. раздел 4.2.2.*

*Подготовка йодной камеры.* – См. раздел 4.2.1.

*Методика анализа*

На линию старта 1-ой пластинки наносят пробы: по 5 мкл исследуемого образца ЛФ (лецитин – 90,0 мкг) и СОВС-2 (лецитин – 90,0 мкг) и 1 мкл СОВС-2/1 (лецитин – 1,0 мкг). На линию старта 2-ой пластинки наносят пробы: по 2 мкл исследуемого образца ЛФ (сахароза – 2,0 мкг) и СОВС-2 (сахароза – 2,0 мкг) и 1 мкл СОВС-2/1 (сахароза – 0,1 мкг). Подсушенные на воздухе хроматографические пластинки с нанесенными пробами помещают в камеру со смесью хлороформ–этанол–вода (16 : 6 : 1), плотно закрывают крышкой и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом элюента линии финиша пластинки вынимают из камеры и высушивают до полного удаления запаха растворителя в потоке теплого воздуха. ЛХС-1208 проявляется в виде светло-желтого пятна без использования специфических реактивов. Лецитин идентифицируют, помещая 1-ую пластинку в йодную камеру и выдерживают ее до появления характерных пятен желтого цвета. Совместно с лецитином проявляются светло-желтые быстро исчезающие пятна холестерина. 2-ую пластинку обрабатывают раствором  $\alpha$ -нафтола с последующим нагреванием до появления характерных для сахарозы темно-фиолетовых пятен.

При проверке пригодности системы растворителей хлороформ–этанол–вода (16 : 6 : 1) значения  $R_f$  составили:

Пластинка № 1:

- образец ЛФ: ЛХС-1208 – 0,85, лецитин – 0,37;
- СОВС-2 – 0,38;
- СОВС-2/1 – 0,37.

Пластинка № 2:

- образец ЛФ: сахароза – 0,47;
- СОВС-4 – 0,47;

– СОВС-4/1 – 0,47.

Хроматографическую систему хлороформ–этанол–вода (16 : 6 : 1) можно считать пригодной, если на пластинке напротив СОВС-2/1 (лецитин 1,0 мкг) при проявлении парами йода детектируется пятно светло-желтого цвета и напротив СОВС-4/1 (сахароза 0,1 мкг) при проявлении раствором  $\alpha$ -нафтола обнаруживается пятно розово-фиолетового цвета.

### 4.3. Стандартизации ЛЛЛФ ЛХС-1208

Решение проблемы контроля качества ЛП, в частности липосомальных препаратов, невозможно без критического отбора показателей качества. Согласно ОФС.1.4.1.0001.15 [14] анализ качества ЛП в различных ЛФ проводят, как правило, по показателям качества ДВ и, при необходимости, вспомогательных веществ данного ЛП. К показателям, которые являются обязательными для оценки качества ЛП независимо от ЛФ, относятся «Описание», «Подлинность», «Количественное определение», «Микробиологическая чистота» (для нестерильных лекарственных форм) и «Стерильность» (для стерильных лекарственных форм). Для отдельных ЛФ могут быть выделены характерные показатели качества, обусловленные особенностями самой ЛФ и технологии ее получения [14]. При стандартизации и контроле качества инъекционных липосомальных форм ЛП, помимо обязательных показателей, необходимо определение следующих параметров: «Размер везикул», «Регидратируемость», «рН», «Однородность дозирования», «Масса содержимого флакона», «Потеря в массе при высушивании», «Пирогенность».

При характеристике 3-х экспериментальных серий ЛФ «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» по указанным показателям получены следующие результаты.

«*Описание*». По внешнему виду препарат 3-х серий представлял собой сухую пористую массу светло-желтого цвета.

«Регидратируемость». При добавлении к содержимому флакона 5,6 мл воды и перемешивании в течение 10–15 мин образовывалась дисперсия светло-желтого цвета.

«Подлинность» препарата определяли 2 методами – спектрофотометрии и ТСХ:

*Спектрофотометрический анализ* (см. раздел 4.1.). В электронных спектрах поглощения анализируемых растворов для количественного определения ЛХС-1208 области от 300 до 400 нм обнаружен максимум при длине волны  $319 \pm 2$  нм.

*ТСХ-анализ* (см. раздел 4.2.). На хроматограмме при использовании системы растворителей хлороформ–этанол–гексан (5 : 3 : 3) наблюдали пятно ЛХС-1208 желтого цвета на уровне СОВС-1 ( $R_f = 0,54$ ). После помещения хроматограммы в йодную камеру идентифицировали пятно лецитина желтого цвета на уровне СОВС-2 ( $R_f = 0,11$ ). При обработке хроматограммы разведенной серной кислотой и нагревании проявлялось розовое пятно холестерина на уровне СОВС-3 ( $R_f = 0,68$ ). При использовании системы хлороформ–этанол–вода (16 : 6 : 1) на хроматограмме наблюдали пятно светло-желтого цвета на уровне СОВС-1 ЛХС-1208 ( $R_f = 0,85$ ). При обработке пластинки парами йода на хроматограмме наблюдали образование пятна желтого цвета лецитина на уровне СОВС-2 ( $R_f = 0,37$ ), а после опрыскивания пластинки разбавленной серной кислотой и нагревания проявлялось розовое пятно холестерина на уровне СОВС-3 ( $R_f = 0,91$ ). При использовании системы хлороформ–этанол–вода (16 : 6 : 1) после обработки пластинки раствором  $\alpha$ -нафтола в смеси спирта 95 % и концентрированной серной кислоты на хроматограмме детектировали пятно сахарозы розово-фиолетового цвета на уровне СОВС-4 ( $R_f = 0,55$ ).

«Количественное определение» и «Однородность дозирования».

Количественный анализ ЛХС-1208 проводили с использованием метода

спектрофотометрии (методика представлена в разделе 4.1.2.). Результаты оценки количественного содержания ЛХС-1208 в ЛЛЛФ приведены в таблице 23.

Оценку качества препарата по показателю «однородность дозирования» проводили путем случайного отбора 10 флаконов от каждой испытуемой серии и количественного определения содержания ЛХС-1208 в каждом отобранном образце. Результаты анализа выражали в процентах от номинального содержания ЛХС-1208 в одном флаконе – 1,8 мг (100 %).

Согласно данным исследования, представленным в таблице 23, количественное содержание ДВ во всех флаконах 3-х испытуемых серий препарата составляло значение от номинального, что укладывается в допустимые нормы отклонения ( $\pm 15\%$ ), установленные ОФС.1.4.2.0008.15 «Однородность дозирования».

Таблица 23

*Оценка качества ЛЛЛФ ЛХС-1208 по показателям «Количественное определение» и «Однородность дозирования»*

Серия препарата	№ образца	Содержание ЛХС-1208		Статистические характеристики
		мг/флакон	% от номинала	
030516	1	1,79	99,4	$n = 10, f = 9,$ $x_{cp} = 1,81,$ $S^2 = 5,0 \times 10^{-4},$ $S = 2,24 \times 10^{-2},$ $\Delta x (P = 95\%) = 1,6 \times 10^{-2},$ $\varepsilon = 0,9\%$
	2	1,84	102,2	
	3	1,78	98,9	
	4	1,79	99,4	
	5	1,82	101,1	
	6	1,80	100,0	
	7	1,84	102,2	
	8	1,83	101,7	
	9	1,83	101,7	
	10	1,81	100,6	
040516	1	1,82	101,1	$n = 10, f = 9,$ $x_{cp} = 1,83,$ $S^2 = 6,44 \times 10^{-4},$ $S = 2,54 \times 10^{-2},$ $\Delta x (P = 95\%) = 1,8 \times 10^{-2},$ $\varepsilon = 1,0\%$
	2	1,82	101,1	
	3	1,80	100,0	
	4	1,86	103,3	
	5	1,87	103,9	
	6	1,84	102,2	
	7	1,83	101,7	
	8	1,87	103,9	

	9	1,81	100,6	
	10	1,82	101,1	
050616	1	1,77	98,3	$n = 10, f = 9,$ $x_{cp} = 1,78,$ $S^2 = 5,0 \times 10^{-4},$ $S = 2,24 \times 10^{-2},$ $\Delta x (P = 95 \%) = 1,6 \times 10^{-2},$ $\varepsilon = 0,9 \%$
	2	1,76	97,8	
	3	1,77	98,3	
	4	1,82	101,1	
	5	1,75	97,2	
	6	1,78	98,9	
	7	1,77	98,3	
	8	1,78	98,9	
	9	1,80	100,0	
	10	1,75	97,2	

«Размер везикул». Определение размера липосом для 3-х испытуемых серий препарата проводили по методике, представленной в разделе 2.3.3., на 5 флаконах для каждой серии. Согласно результатам анализа средний размер везикул образцов ЛЛЛФ ЛХС-1208 находился в диапазоне от 175 до 190 нм (Таблица 24).

Таблица 24

Оценка качества ЛЛЛФ ЛХС-1208 по показателям «Размер везикул» и «рН»

Показатель		Средний размер везикул, нм			Среднее значение рН		
Серия		030516	040516	050616	030516	040516	050616
№ флакона	1	180	175	185	6,60	7,05	6,15
	2	183	176	190	6,62	6,95	6,10
	3	180	183	184	6,55	7,00	6,12
	4	175	185	187	6,61	6,90	6,05
	5	177	175	188	6,58	6,96	6,09
Среднее значение		179	179	187	6,59	6,97	6,10

«рН». Определение значения рН ЛЛЛФ ЛХС-1208 проводили по методике, представленной в разделе 2.3.3. Для всех испытуемых серий препарата значение рН составило 6,05–7,05 (Таблица 24).

«Масса содержимого флакона». Анализ средней массы содержимого флакона проводили на 20 единицах упаковки каждой серии. Согласно ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм» допускается отклонение от средней массы  $\pm 10 \%$ .

*Масса содержимого флакона препарата «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг»*

№ флакона	Масса содержимого, г			№ флакона	Масса содержимого, г		
	Серия				Серия		
	030516	040516	050616		030516	040516	050616
1	1,090	1,115	1,051	11	1,100	1,120	1,056
2	1,085	1,119	1,063	12	1,089	1,112	1,071
3	1,094	1,115	1,059	13	1,093	1,108	1,069
4	1,092	1,114	1,072	14	1,094	1,112	1,073
5	1,088	1,117	1,075	15	1,088	1,116	1,065
6	1,098	1,108	1,062	16	1,085	1,110	1,066
7	1,097	1,109	1,070	17	1,090	1,111	1,060
8	1,086	1,118	1,055	18	1,089	1,119	1,062
9	1,082	1,110	1,060	19	1,092	1,108	1,070
10	1,089	1,109	1,055	20	1,091	1,115	1,073
				Средняя масса, г	1,091	1,113	1,064

Номинальная масса содержимого флакона для препарата «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» – 1,086 г. Средняя масса содержимого флаконов испытуемых серий находилась в диапазоне от 1,064 до 1,113 г (Таблица 25).

*«Потеря в массе при высушивании».* Анализ препарата по содержанию влаги проводили по методике, изложенной в разделе 2.3.3. Во всех исследованных образцах потеря в массе не превышала значения 0,5 %.

#### **4.4. Исследование стабильности ЛЛЛФ ЛХС-1208 в процессе хранения**

Для изучения стабильности препарата «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг» 3 серии были заложены на хранение в морозильную камеру с температурой  $-(18-20) ^\circ\text{C}$ . Согласно требованиям ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» [14] качество препарата оценивали каждые 3 месяца в первый год хранения после получения. Результаты исследования стабильности ЛП по показателям качества: описание, количественное содержание ЛХС-1208,

средняя масса во флаконе, размер везикул, рН, потеря в массе при высушивании приведены в таблице 26.

Из таблицы видно, что разработанная ЛЛЛФ ЛХС-1208 сохраняет стабильность в течение 6 месяцев хранения. Исследование по установлению срока годности продолжается.

Таблица 26

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

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

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработана методика спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 в ЛЛФ и ЛЛЛФ. В процессе изучения спектральных характеристик ЛХС-1208 было установлено, что спектр поглощения липосомального ЛХС-1208 идентичен спектру поглощения его субстанции по форме кривой и положению максимумов. В качестве рабочей длины волны для количественного определения ЛХС-1208 в ЛФ выбрана полоса поглощения высокой интенсивности с максимумом  $319 \pm 2$  нм, при которой вспомогательные компоненты практически не поглощают излучение. Относительная погрешность количественного анализа концентрации ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии до и после лиофилизации составила менее 2 %. По результатам валидационной оценки выявлено, что разработанная методика является специфичной, линейной, правильной и прецизионной.

В результате разработки методики ТСХ-анализа ЛЛЛФ ЛХС-1208 установлены оптимальные условия хроматографирования и выбраны подвижные фазы, обеспечивающие наилучшее разделение компонентов ЛФ. Для анализа ЛХС-1208 и холестерина предложена система хлороформ–этанол–гексан (5 : 3 : 3), лецитина и сахарозы – хлороформ–этанол–вода (16 : 6 : 1). Проведена оценка пригодности выбранных хроматографических систем.

Проведена стандартизация ЛЛЛФ ЛХС-1208 по показателям – описание, регидратируемость, подлинность, количественное определение, однородность дозирования, размер везикул, рН, масса содержимого флакона и потеря в массе при высушивании.

Изучена стабильность трех экспериментальных серий ЛЛЛФ ЛХС-1208 в процессе хранения по показателям качества, по которым проводили стандартизацию. Установлено, что разработанная ЛЛЛФ ЛХС-1208 сохраняет стабильность в течение 6 месяцев хранения.

## Глава 5. ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЛЛФ ЛХС-1208

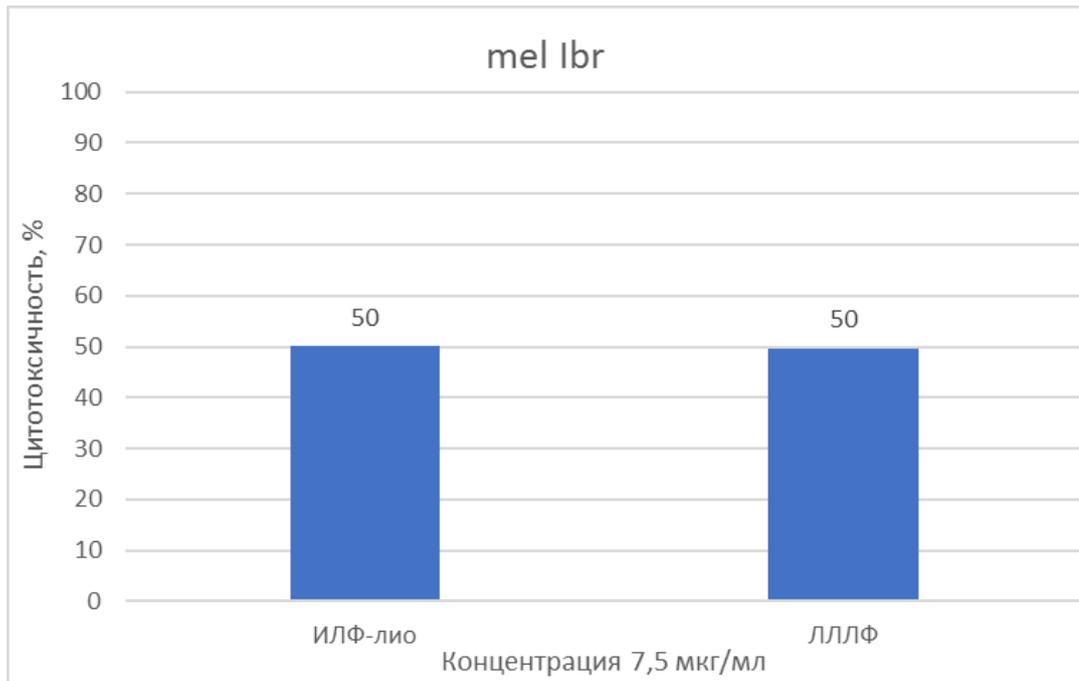
Определение влияния новых ЛП на пролиферацию и жизнеспособность специфических клеточных линий, растущих в культуре, является решающим шагом для понимания их эффективности. Оценка эффективности *invitro* учитывается при скрининге большинства противоопухолевых соединений, после чего наиболее активные вещества отбираются для исследований *invivo* на подходящих моделях опухолей у животных.

В МТТ-тесте сравнили цитотоксическую активность ЛЛЛФ ЛХС-1208 и ИЛФ-лио соединения ЛХС-1208. Кроме того, оценили цитотоксичность «пустых» липосом, не содержащих ЛХС-1208, но содержащих все вспомогательные вещества. «Пустые» липосомы оказывали цитотоксическое действие не более чем на 10 % клеток в обеих клеточных линиях.

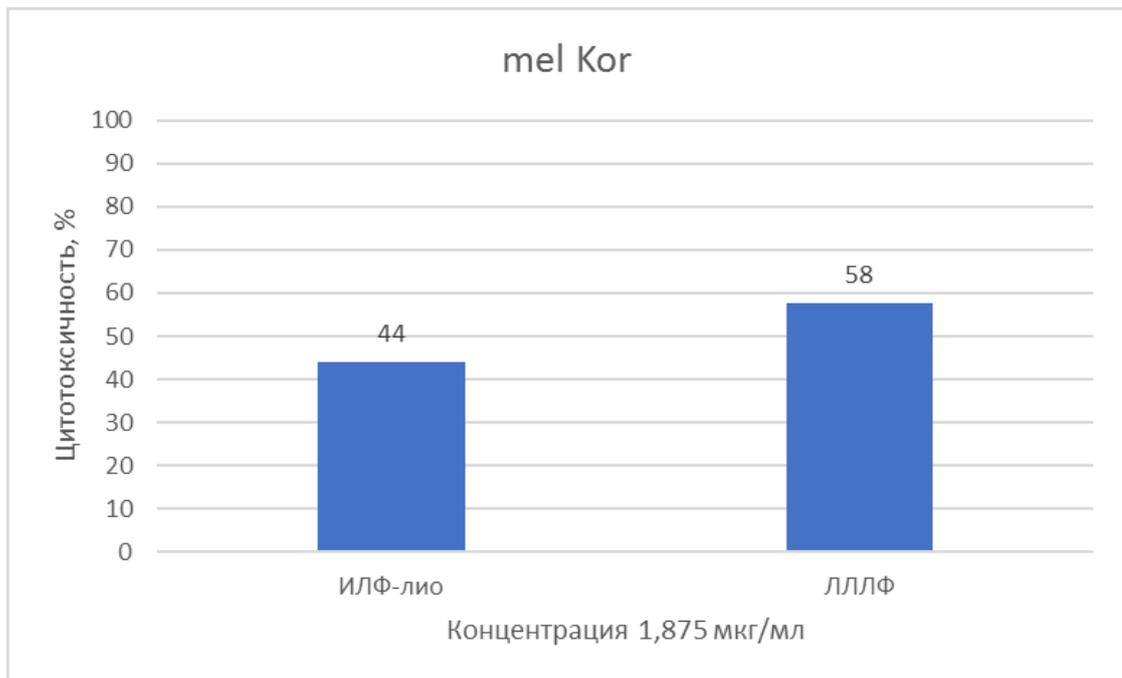
Исследование проводили на клеточных линиях метастатической меланомы человека *melBr* и *melCo* в широком диапазоне концентраций ЛХС-1208 – от 1,875 до 120 мкг/мл.

В результате на клеточной линии *melBr* ИК<sub>50</sub> для обеих ЛФ составила 7,5 мкг/мл (Рисунок 17А). Клетки линии *melCo* оказались более чувствительны к ЛХС-1208: ИК<sub>50</sub> для ЛЛЛФ составила менее 1,875 мкг/мл, а для ИЛФ-лио – 3,75 мкг/мл. Таким образом, на клеточной линии *melCo* ЛЛЛФ ЛХС-1208 проявил большую цитотоксичность по сравнению с ИЛФ-лио (Рисунок 17Б).

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



А



Б

Рисунок 17. Сравнение цитотоксической активности ЛЛЛФ ЛХС-1208 и ИЛФ-лио ЛХС-1208: А – melIbr в концентрации 7,5 мкг/мл; Б – melKor в концентрации 1,875 мкг/мл.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования изучена цитотоксическая активность ЛЛЛФ ЛХС-1208 на клеточных линиях метастатической меланомы человека melIbr и melKor. На клеточной линии melIbr ИК<sub>50</sub> для ЛЛЛФ составила 7,5 мкг/мл, melKor – менее 1,875 мкг/мл. Сравнение цитотоксической активности ЛЛЛФ и ИЛФ-лио показало, что липосомальный ЛХС-1208 оказывает больший противоопухолевый эффект в отношении клеток melKor в отличие от традиционной ЛФ (ИК<sub>50</sub> (ИЛФ-лио) = 3,75 мкг/мл).

## ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение эффективности лекарственной терапии злокачественных новообразований продолжается по разным направлениям, среди которых основным остается поиск новых избирательно действующих на опухоли ЛВ и их рациональных ЛФ, которые, в свою очередь, позволяют в дальнейшем оптимизировать методики применения ЛВ [44].

Среди химических соединений природного и синтетического происхождения, обладающих противоопухолевой активностью, можно выделить класс производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов. Известно, что производные индолокарбазола обладают сильным ингибирующим действием в отношении циклинзависимых киназ, протеинкиназы C и тирозинкиназы, а также способны эффективно подавлять топоизомеразу I [20].

Одним из перспективных представителей класса производных индолокарбазола является соединение ЛХС-1208, синтезированное в ФГУБ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследования *in vivo* показали высокую противоопухолевую активность ЛХС-1208 в отношении лимфоцитарной лейкемии P-388, лимфоидной лейкемии L-1210, асцитной опухоли Эрлиха, эпидермоидной карциноме легкого Льюис, меланоме В-16 и рака шейки матки РШМ-5 и аденокарциномы толстого кишечника АКАТОЛ [20, 40]. В связи с этим соединение ЛХС-1208 было отобрано для проведения дальнейших исследований по созданию потенциального противоопухолевого препарата.

Перспективным направлением по созданию ЛП нового поколения является разработка наноразмерных систем доставки на основе липосом. Важным свойством липосом, которое обеспечивает их применение в лечении злокачественных новообразований, является их способность обеспечивать селективную доставку противоопухолевых субстанций к клеткам-мишеням путем пассивного и активного нацеливания. Защита здоровых клеток от

токсического воздействия активного вещества – преимущество ЛЛФ, а включенной субстанции – от деградации в условиях организма; пролонгировании действия ЛВ; возможности создания водорастворимой ЛФ для ряда гидрофобных препаратов, а значит - увеличении тем самым их биодоступности.

На первоначальном этапе исследования разрабатывали состав и технологию получения липосомального ЛХС-1208. В качестве вспомогательных компонентов ЛЛФ использовали лецитин, холестерин и ПЭГ-2000-ДГФА. В результате из 9 экспериментальных составов ЛЛФ выбран оптимальный с молярными соотношениями ЛХС-1208 / лецитин = 1 : 150 и лецитин / холестерин / ПЭГ-2000-ДГФА = 1 : 0,20 : 0,003. Эффективным методом уменьшения размера липосом с ЛХС-1208 оказалась экструзия с нейлоновыми фильтрами, так как она превосходит другие способы измельчения по показателям – включение ДВ в липосомы и размеры везикул. Для получения везикул приемлемого размера липосомальную дисперсию необходимо последовательно пропускать через нейлоновые фильтры с диаметром пор 1,2 (1 раз), 0,45 (1 раз) и 0,22 мкм (не менее 4–5 раз). Для увеличения срока хранения ЛЛФ ЛХС-1208 разработана технология ее лиофилизации. В качестве криопротектора выбрана сахароза, которая вводится в состав ЛФ на стадии гидратации липидной пленки в молярном соотношении лецитин / криопротектор 1 : 3. Для лиофилизации липосомальной дисперсии рекомендован режим с быстрым снижением температуры на стадии замораживания.

На следующем этапе работы разрабатывали методики качественного и количественного анализа липосомального ЛХС-1208. Для количественного определения ДВ разработана и валидирована методика спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 в ЛЛФ и ЛЛЛФ. При изучении спектральных характеристик ЛХС-1208 установлено, что спектры поглощения липосомального ЛХС-1208 и субстанции схожи по форме

кривой и положению максимумов. В качестве рабочей длины волны для количественного определения ЛХС-1208 в ЛФ выбрана полоса поглощения высокой интенсивности с максимумом  $319 \pm 2$  нм, при которой вспомогательные компоненты практически не поглощают излучение. Относительная погрешность количественного анализа концентрации ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии до и после лиофилизации составила менее 2 %. По результатам валидационной оценки выявлено, что разработанная методика является специфичной, линейной, правильной и прецизионной. Для качественного анализа компонентов ЛФ разработана методика ТСХ-анализа и выбраны системы растворителей: для анализа ЛХС-1208 и холестерина – система хлороформ–этанол–гексан (5 : 3 : 3), лецитина и сахарозы – хлороформ–этанол–вода (16 : 6 : 1). Проведена оценка пригодности выбранных хроматографических систем.

Проведена стандартизация ЛЛЛФ ЛХС-1208 по показателям качества – регидратируемость, подлинность, описание, количественное определение, однородность дозирования, размер везикул, рН, масса содержимого флакона, а также потеря в массе при высушивании. Изучена стабильность экспериментальных серий ЛЛЛФ ЛХС-1208 в процессе хранения и установлено, что препарат сохраняет устойчивость в течение 6 месяцев хранения.

На заключительном этапе исследований изучали цитотоксическую активность разработанной ЛЛЛФ ЛХС-1208 на клеточных линиях метастатической меланомы человека *melHbr* и *melKor*. На клеточной линии *melHbr* ИК<sub>50</sub> для ЛЛЛФ составила 7,5 мкг/мл, *melKor* – менее 1,875 мкг/мл. Сравнение цитотоксической активности ЛЛЛФ и ИЛФ-лио показало, что липосомальный ЛХС-1208 оказывает больший противоопухолевый эффект в отношении клеток *melKor* в отличие от традиционной ЛФ (ИК<sub>50</sub> (ИЛФ-лио) = 3,75 мкг/мл).

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований установлен оптимальный состав стерически стабилизированной липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208 для внутривенного введения с молярными соотношениями компонентов ЛХС-1208 / лецитин 1 : 150 и лецитин / холестерин / ПЭГ-2000-ДФФА = 1 : 0,20 : 0,003.
2. Разработана технология получения стабильной при хранении лиофилизированной липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208 для внутривенного введения. Для обеспечения максимальной стабилизации липосом в процессе лиофилизации подобран эффективный криопротектор – сахароза, вводимая в лекарственную форму в молярном соотношении лецитин / сахароза 1 : 3.
3. Разработана методика качественного хроматографического анализа компонентов лекарственной формы ЛХС-1208 с использованием хроматографических пластинок «Sorbfil» и выбраны системы растворителей – хлороформ–этанол–гексан (5 : 3 : 3) для обнаружения ЛХС-1208 и холестерина, хлороформ–этанол–вода (16 : 6 : 1) для определения лецитина и сахарозы. Разработана и валидирована методика количественного спектрофотометрического анализа липосомального ЛХС-1208 при длине волны  $319 \pm 2$  нм с использованием стандартного образца.
4. Проведена стандартизация лиофилизированной липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208 и изучена ее стабильность в процессе хранения. Установлено, что препарат сохраняет устойчивость в течение 6 месяцев хранения.
5. Изучена цитотоксическая активность лиофилизированной липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208 в опытах *invitro*. На клеточной линии *me1Pr*  $ИК_{50}$  для лиофилизированной липосомальной лекарственной формы составила 7,5 мкг/мл, *me1Kor* – менее 1,875 мкг/мл.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

- БОЛ – большие однослойные липосомы
- ДВ – действующее вещество
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДРС – динамическое рассеивание света
- ИЛФ-лио – лиофилизированная инъекционная лекарственная форма
- КОЛ – крупные однослойные липосомы
- ЛВ – лекарственное вещество
- ЛЛЛФ – лиофилизированная липосомальная лекарственная форма
- ЛЛФ – липосомальная лекарственная форма
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛС – лекарственное средство
- ЛФ – лекарственная форма
- МДА – малоновый диальдегид
- МЛЛ – мультиламеллярные липосомы
- МОЛ – малые однослойные липосомы
- МСЛ – многослойные липосомы
- МТТ – 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид
- ОСЛ – однослойные липосомы
- ПО – перекисное окисление
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
- РШМ – рак шейки матки
- СО – стандартный образец
- ТРО – торможение роста опухоли
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- УПЖ – увеличение продолжительности жизни
- EPR-effect – enhanced permeability and retention effect
- LLC – Lewislungcarcinoma

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аршинова О.Ю. Технология и стандартизация лиофилизированных лекарственных препаратов фотодитазина // автор. дис. ...канд.фарм.наук: 14.04.01 / Аршинова Ольга Юрьевна. – Москва, 2015. – 24 с.
2. Аршинова О.Ю., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – №1 (2). – С. 20–24.
3. Аршинова О.Ю., Санарова Е.В., Ланцова А.А., Оборотова Н.А. Особенности лиофилизации липосомальных лекарственных препаратов // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46, № 4. – С. 29–34.
4. Барсуков Л.И. Липосомы // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 2–9.
5. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–30.
6. Бахмедова А.А., Гараева Л.Д., Горюнова О.В. и др. N-гликозиды производных индоло[2,3-а]карбазолов // Биоорганическая химия. – 1997. – Т. 23, № 8. – С. 667–674.
7. Безруков Д.А., Баландин Т.Г., Деев С.М. и др. Возможные подходы к конструированию сложных липосомных систем доставки лекарственных препаратов // Вестник МИТХТ. – 2006. – № 1. – С. 14–18.
8. Блохин Д.Ю. Программированная гибель клеток в механизмах циторедуктивной терапии опухолей: автор. дис. ...докт. мед. наук: 14.00.14 / Блохин Дмитрий Юрьевич. – Москва, 2004. – 45 с.
9. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза и апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 17–24.

10. Борщевский Г.И., Янчук И.Б., Ярных Т.Г. Изучение физико-химических свойств липосомальных препаратов // Украинский биофармацевтический журнал. – 2015. – № 6 (41). – С. 4–8.
11. Борщевский Г.И., Ярных Т.Г. Разработка технологии липосомального препарата в форме спрея для наружного применения // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. – 2014. – Вып. 26, № 11 (182). – С. 247–250.
12. Брусслер Я., Нифонтова Г.О., Баковски У. и др. Липосомальная форма новых синтетических ингибиторов тромбина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 4 (август). – С. 36–46.
13. Гарин А.М., Базин И.С. Таргетная терапия солидных опухолей // Альманах «Лекарственная противоопухолевая терапия». – 2010. – С. 16–49.
14. Государственная фармакопея РФ. 13-ое издание. Федеральная электронная медицинская библиотека, 2015. URL:<http://femb.ru/feml>.
15. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В. и др. Применение фармацевтической технологии для повышения биодоступности лекарственных веществ // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 101–108.
16. Гуревич Д.Г., Меерович И.Г., Меерович Г.А. и др. Влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления тиосенса в опухоли // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 45–49.
17. Дмитриева М.В. Создание липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора на основе борированного хлорина е<sub>6</sub>: дис. ...канд.фарм.наук: 14.04.01 / Дмитриева Мария Вячеславовна. – Москва, 2015. – 193 с.
18. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Орлова О.Л. и др. Липосомальная лекарственная форма борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 31–36.
19. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В., Бунятыян Н.Д. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 21–27.

20. Киселева М.П., Смирнова З.С., Борисова Л.М. и др. Поиск новых противоопухолевых соединений среди производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов // Российский онкологический журнал. – 2015. – Т. 20, № 1. – С. 33–37.
21. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение I // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 71–77.
22. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение II // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 3. – С. 41–47.
23. Костин К.В., Игнатъева Е.В., Тазина Е.В. и др. Технология получения и анализ липосомальной лекарственной формы лизомустина // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 7. – С. 44–47.
24. Котова Е.А. Создание и биофармацевтическое изучение липосомальных лекарственных форм противоопухолевых препаратов производных бис-(β-хлорэтил)-амина: автор. дис. ...канд.фарм.наук: 14.04.01 / Котова Елена Александровна. – Москва, 2012. – 24 с.
25. Краснопольский Ю.М., Балабаньян В.Ю., Шоболов Д.Л., Швец В.И. Липосомальные лекарственные препараты в онкологии // Материалы Белорусско-Российской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». Минск, 23–25 мая 2013 г. С. 48.
26. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И. Липидная технологическая платформа для создания новых лекарственных форм и транспорта активных фармацевтических субстанций // Биофармацевтический журнал. – 2011. – Т.3, №2. – С. 10–18.

27. 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.
28. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов в условиях GMP // Биофармацевтический журнал. – 2009. – Т. 1, № 3. – С. 18–29.
29. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И., Шахмаев А.Е. Липосомальные препараты для вспомогательной терапии в онкологии // Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». Нижний Новгород, 31 мая – 1 июня 2012 г. С. 29.
30. Ланцова А.В., Котова Е.А., Санарова Е.В. и др. Разработка лиофилизированной липосомальной лекарственной формы цифелина // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 79–84.
31. Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазола – ЛХС-1208 // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 25–32.
32. Лепарская Н.Л., Сорокоумова Г.М., Сычева Ю.В. и др. Липосомы, содержащие дексаметазон: получение, характеристика и использование в офтальмологии // Вестник МИТХТ. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 37–42.
33. Манзюк Л.В., Иванова Л.Ф. Основы лекарственного лечения злокачественных опухолей / Под ред. Чистякова С.С. – Онкология для практикующих врачей. – М., 2009. – С. 37–49.
34. Малиновская Ю.А., Демина Н.Б. Разработка липосомальных форм симвастатина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 5. – С. 46–53.
35. Матюшин А.А., Хугаева О.В., Барышникова М.А. и др. Получение и изучение анти-CD5 иммунолипосом митоксантрона *in vitro* // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 33–42.

36. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии:  
1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 3–8.
37. Мельник С.Я. Синтез и изучение гликозидов, производных бисиндола и родственных индоло[2,3-а]карбазолов. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова. М.: Изд-е РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. – С. 281–292.
38. Мельник С.Я., Бахмедова А.А., Гараева Л.Д. и др. Синтез и антипролиферативные свойства гликозидов бис(индолил)фуран-2,5-диона и бис(индолил)-1*H*-пиррол-2,5-диона // Биоорганическая химия. – 1996. – Т. 22, № 6. – С. 458–467.
39. Мельник С.Я., Бахмедова А.А., Гараева Л.Д. и др. 3-(1*H*-индол-3-ил)-4-(1-гликозилининдол-3-ил)-1*H*-пиррол-2,5-дионы: синтез и изучение антипролиферативных свойств // Биоорганическая химия. – 1996. – Т. 22, № 10–11. – С. 832–837.
40. Мельник С.Я., Власенкова Н.К., Гараева Л.Д. и др. Способ получения *N*-гликозидов производных индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионов, обладающих цитотоксической и противоопухолевой активностью. Патент №2427585 от 10.12.2009 г.
41. Моисеева Е.В., Кузнецова Н.Р., Свирщевская Е.В. и др. Липосомальные формы пролекарств комбрестатина А4 и его 4-арилкумаринового аналога: противоопухолевое действие на мышинной модели рака молочной железы // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58, вып. 3. – С. 326–338.
42. Николаева Л.Л., Гулякин И.Д., Санарова Е.В. и др. Влияние вспомогательных веществ на процесс лиофилизации ЛХС-1208 и ОР-2011 // Материалы I Международной научно-практической Интернет-конференции «Технологические и биофармацевтические аспекты растворения лекарственных препаратов разной направленности действия». Харьков: 7–8 ноября 2014 года. Харьков: НФУ Минздрава Украины, 2014. – С. 216.

43. Оборотова Н.А. Основные проблемы создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 2. – С. 27–31.
44. Оборотова Н.А. Противоопухолевые субстанции и их лекарственные формы, созданные в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова. М.: Изд-е РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. – С. 5–58.
45. Оборотова Н.А., Краснюк И.И., Томашевская Н.В. Технологические возможности сублимационной сушки фармацевтических препаратов // Фармация. – 2007. – № 2. – С. 25–26.
46. Оборотова Н.А., Смирнова З.С., Полозкова А.П., Барышников А.Ю. Фармацевтические аспекты разработки липосомальных лекарственных форм для внутривенного введения гидрофобных цитостатиков // Вестник РАМН. – 2002. – № 1. – С. 42–45.
47. Противоопухолевая химиотерапия. Справочник / Авт.: А.М. Гарин, А.Б. Сыркин, М.Б. Бычков и др.; Под ред. Н.И. Переводчиковой. – М.: Медицина, 1986. – 208 с.
48. Райков А.О., Матюшин А.А., Краснюк И.И. Оптимизация метода получения липосомальной формы митоксантрона // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 73–80.
49. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов. Под ред. Быковского С.Н., проф., д.х.н. Василенко И.А., к.м.н. Харченко М.И., к.фарм.н. Белова А.Б., к.фарм.н. Шохина И.Е., к.п.н. Дориной Е.А. – М. Изд-во Перо, 2014. – 656 с.: ил.
50. Саквина О.И., Барышников А.Ю. Липосомы в направленной доставке противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 80–85.
51. Санарова Е.В., Полозкова А.П., Меерович И.Г. и др. Влияние технологических факторов на качество липосомальной лекарственной формы

- нового фотосенсибилизатора – тиосенса // Химико-фармацевтический журнал. – 2011.– Т. 45, № 12. – С. 32–36.
52. Санарова Е.В., Полозкова А.П., Меерович И.Г. и др. Количественное определение тиосенса в новой липосомальной лекарственной форме // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т.46, №6. – С. 54–56.
53. Санарова Е.В., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. Лиофилизированная наноструктурированная лекарственная форма тиосенса // Всероссийский журнал научных публикаций. – 2011. – август. – С. 74–76.
54. Санарова Е.В., Чжан Си, Дмитриева М.В. и др. Особенности технологии получения липосомальной лекарственной формы аналога гипоталамического гормона соматостатина // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 4. – С. 78–83.
55. Сафаев Р.Д., Бабский В.И., Сукирко В.А., Хилько В.С. Роль фторпиримидиновых препаратов в онкологической практике // Альманах «Лекарственная противоопухолевая терапия». – 2010. – С. 93–112.
56. Сейфулла Р.Д. Фармакология липосомальных препаратов (в эксперименте и клинике). – М.: Глобус Континенталь, 2010. – 244 с.: ил.
57. Скил Роланд Т. Основные противоопухолевые препараты и модификаторы биологических реакций. В кн.: Противоопухолевая химиотерапия. Руководство. Под ред. Роланда Т. Скила; пер. с англ. В.С. Покровского, под ред. С.В. Орлова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – С. 87–244.
58. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Борисова Л.М. и др. Противоопухолевая активность N-гликозидов производных индоло[2,3-а]карбазола // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 123–127.
59. Тазина Е.В., Игнатьева Е.В., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. качественный и количественный анализ термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубина // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т.46, №1. – С. 38–44.

60. Тазина Е.В., Костин К.В., Оборотова Н.А. Особенности и инкапсулирования лекарственных препаратов в липосомы (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 8. – С. 30–40.
61. Тазина Е.В., Полозкова А.П., Игнатъева Е.В. и др. Стерилизующая фильтрация термолипосомальной дисперсии с доксорубицином // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции. Нижний Новгород, 18–19 мая 2010 г. С. 90–91.
62. Татарский В.В. Механизмы гибели опухолевых клеток при действии новых углеводородных производных индолокарбазолов: автор. дис. ...канд. биол. наук: 14.01.12 / Татарский Виктор Вячеславович. – Москва, 2010. – 22 с.
63. Туранская С.П., Туров В.В., Горбик П.П. Приготовление липосом для направленной доставки лекарственных препаратов // Сборник научных статей «Химия, физика и технология поверхности». – 2009. – № 15. – С. 189–214.
64. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. Быковского С.Н., Василенко И.А., Деминой Н.Б. и др. – М.: Перо, 2015. – 472 с.: ил.
65. Чан Тхи Хай Йен, Игнатъева Е.В., Полозкова А.П. и др. Качественный и количественный анализ новой лиофилизированной липосомальной лекарственной формы фотодитазина // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т.44, №6. – С. 53–56.
66. Чан Тхи Хай Йен, Поздеев В.И., Меерович Г.А. и др. Липосомальная лекарственная форма фотодитазина // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 105–107.
67. Шадрина А.В., Перетолчина Н.М., Полозкова А.П. и др. Биофармацевтические исследования липосомального лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 49–53.

68. Шахмаев А.Е., Кацай А.Л., Прохоров В.В. и др. Исследование методов включения лекарственных субстанций в липосомальные наночастицы // Ремедиум. – 2015. – декабрь. – С. 56–59.
69. Швец В.И., Краснопольский Ю.М. Липосомы в фармации. Продукты нанобиотехнологии // Провизор. 2008. – Вып. № 3. – 4 с.
70. Шоуа И.Б., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Действие липосомального доксорубина на клетки линии, экспрессирующие активный PGP170 // Российский биотерапевтический журнал – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 20–23.
71. Arigita C., Bevaart L., Everse L.A. et al. Liposomal meningococcal B vaccination: role of dendritic cell targeting in the development of a protective immune response // *Infection and immunity*. – 2003. – Vol. 71, № 9. – P. 5210–5218.
72. Bailly C., Colson P., Houssier C. et al. Recognition of specific sequences in DNA by a topoisomerase I inhibitor derived from the antitumor drug rebeccamycin // *Molecular Pharmacology*. – 1998. – 53 (1). – P. 77–87.
73. Bharali D.J., Khalil M., Gurbuz M. et al. Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers // *International Journal of Nanomedicine*. – 2009. – № 4. – P. 1–7.
74. Borthakur G., Alvarado Y., Ravandi-Kashani F. et al. Phase 1 study of XL119, a rebeccamycin analog, in patients with refractory hematologic malignancies // *Cancer*. – 2008. – Vol. 113, № 2. – P. 360–366.
75. Bush J.A., Long B.H., Catino J.J. et al. Production and biological activity of rebeccamycin, novel antitumor agent // *The journal of antibiotics*. – 1987. – Vol. XL, № 5. – P. 668–678.
76. Calvalho Junior A.D., Vieira F.P., De Melo V.J. et al. Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes // *Brazilian journal of medical and biological research*. – 2007. – 40. – P. 1149–1157.
77. Christensen D., Foged C., Rosenkrands I. et al. Trehalose preserves DDA/TDB liposomes and their adjuvant effect during freeze-drying // *Biochimica et biophysica acta*. – 2007. – 1768. – P. 2120–2129.

- 78.Ciomei M., Croci V., Ciavolella A. et al. Antitumor efficacy of edotecarin as a single agent and in combination with chemotherapy agents in a xenograft model // *Clinical Cancer Research*. – 2006. – Vol. 12, № 9. – P. 2856–2861.
- 79.Cipolla D., Blanchard J., Gonda I. Development of liposomal ciprofloxacin to treat lung infections // *Pharmaceutics*. – 2016. – Vol. 8, № 1. – P. 1–31.
- 80.Cuenca-Lopez M.D., Serrano-Heras G., Montero J.C. et al. Antitumor activity of the novel multi-kinase inhibitor EC-70124 in triple negative breast cancer // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, № 29. – P. 27923–27937.
- 81.Deepa Bhojwani, Ching-Hon Pui. Intrathecal liposomal cytarabine: more friend than foe // *Leuk lymphoma*. – 2008. – Vol. 49, № 8. – P. 1427–1430.
- 82.Dowlati A., Posey J., Ramanathan R.K. et al. Phase II and pharmacokinetic trial of rebeccamycin analog in advanced biliary cancers // *Cancer chemother pharmacol*. – 2009. – 65. – P. 73–78.
- 83.Duangjit S., Opanasopit P., Rojanarata T., Ngawhirunpat T. Characterization and in vitro skin permeation of meloxicam-loaded liposomes versus transfersomes // *Journal of drug delivery*. – 2011. – P. 1–9.
- 84.Gutman D., Golomb G. Liposomal alendronat for the treatment of restenosis // *Journal control release*. – 2012. – Vol. 161, № 2. – P. 619–627.
- 85.Himanshu A., Sitasharan P., Singhai A.K. Liposomes as drug carriers // *IJPLS*. – 2011. – № 2 (7). – P. 945–951.
- 86.Jesorka A., Orwar O. Liposomes: technologies and analytical application // *Annual reviews of analytical chemistry*. – 2008. – 1. – P. 801–832.
- 87.Kaneko T., Wong H., Utzig J. et al. Water soluble derivatives of rebeccamycin // *The journal of antibiotics*. – Vol. XLIII, № 1. – P. 125–127.
- 88.LercheD., SobischT. Оценка взаимодействия частиц и стабильности дисперсных систем с помощью величины дзета-потенциала и технологии STEP. URL:[http://tirit.org/articles/mills\\_05.php](http://tirit.org/articles/mills_05.php). (Дата обращения: 04.11.16 г.).
- 89.Marminon C., Anizon F., Moreau P. et al. Rebeccamycin derivatives as dual DNA-damaging agents and potent checkpoint kinase 1 inhibitors // *Molecular Pharmacology*. – 2008. – Vol. 74, № 6. – P. 1620–1629.

90. Mayer L.D., Bally M.B., Loughrey H. Liposomal vincristine preparations which exhibit decreased drug toxicity and increased activity against murine L1210 and P388 tumors // *Cancer research*. – 1990. – 50. – P. 575–579.
91. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mossman // *J. Immunol. Meth.* – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63.
92. Nock C.J., Brell J.M., Bokar J.A. et al. A phase I study of rebeccamycin analog in combination with oxaliplatin in patients with refractory solid tumors // *Invest new drugs*. – 2011. – 29. – P. 126–130.
93. Omura S., Sasaki Y., Iwai Y. and Takeshima H. Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism // *The journal of antibiotics*. 1995. – Vol. 48, № 7. – P. 535–548.
94. Panwar P., Pandey B., Lakhera P.C., Singh K.P. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes // *International journal of nanomedicine*. – 2010. – 5. – P. 101–108.
95. Petre C.E., Dittmer D.P. Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi's sarcoma // *International journal of nanomedicine*. – 2007. – Vol. 2, № 3. – P. 277–288.
96. Pinchuk I., Shoal H., Dotan Y., Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2012. – Vol. 165, Is. 6. – P. 638–647.
97. Qi Na, Tang Xing, Gu Pengfei et al. Sterilization stability of vesicular phospholipid gels loaded with cytarabine for brain implant // *International journal of pharmaceutics*. – 2012. – Vol. 427, № 2. – P. 234–241.
98. Ren G., Liu D., Guo W. et al. Docetaxel prodrug liposomes for tumor therapy: characterization, in vitro and in vivo evaluation // *Drug delivery*. – 2016. – Vol. 23, № 4. – P. 1272–81.
99. Ricart A.D., Hammond L.A., Kuhn J.G. et al. Phase I and pharmacokinetic study of the rebeccamycin analogue NSC 655649 and cisplatin in patients with advanced

- solid tumors // *Clinical Cancer Research*. – 2005. – Vol. 11, № 24. – P. 8728–8736.
100. Ruozi B., Belletti D., Tombesi A. et al. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study // *International Journal of Nanomedicine*. – 2011. – № 6. – P. 557–563.
101. Saif M.W., Sellers S., Diasio R.B., Douillard J-Y. A phase I dose-escalation study of edotecarin (J-107088) combined with infusional 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced/metastatic solid tumors // *Anticancer drugs*. – 2010. – Vol. 21, № 7. – P. 716–723.
102. Sakar F., Ozer A.Y., Erdogan S. et al. Nano drug delivery systems and gamma radiation sterilization // *Pharmaceutical development and technology*. – 2016. – P. 1–10.
103. Salas A.P., Zhu L., Sanchez C. et al. Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumour indolocarbazole staurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase // *Mol Microbiol*. – 2005. – Vol. 58, № 1. – P. 17–27.
104. Samadikhah H.R., Majidi A., Nikkhah M., Hosseinkhani S. Preparation, characterization, and efficient transfection of cationic liposomes and nanomagnetic cationic liposomes // *International journal of nanomedicine*. – 2011. – 6. – P. 2275–2283.
105. Sanchez C., Zhu L., Brana A.F. et al. Combinatorial biosynthesis of indolocarbazole compounds // *PNAS*. – 2005. – Vol. 102, № 2. – P. 461–466.
106. Schwandt A., Mekhail T., Halmos B. et al. Brief report: phase II trial of rebeccamycin analogue, a dual topoisomerase I and II inhibitor, in relapsed «sensitive» small cell lung cancer // *J Thorac oncol*. – 2012. – Vol. 7, № 4. – P. 751–754.
107. Steimbach L.M., Tonin F.S., Virtuoso S. et al. Efficacy and safety of amphotericin B lipid-based formulations-A systematic review and meta-analysis // *Mycoses*. – 2016. – P. 1–9.

108. Takahashi I., Kobayashi E., Asano K. et al. UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C from *Streptomyces* // *The journal of antibiotics*. – 1987. – Vol. 40 (12). – P. 1782–4.
109. Tamaoki T., Nomoto H., Takahashi I. et al. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ $\text{Ca}^{++}$  dependent protein kinase // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1986. – 135 (2). – P. 397–402.
110. Tao Yang, Fu-De Cui, Min-Koo Choi et al. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation // *International journal of pharmaceutics*. – 2007. – 338. – P. 317–326.
111. Tardi P.G., Boman N.L., Cullis P. Liposomal doxorubicin // *Journal of drug targeting*. – 1996. – Vol. 4, № 3. – P. 129–140.
112. Torchilin V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers // *Drug discovery*. – 2005. – Vol. 4. – P. 145–160.
113. Turker S., Ozer A.Y., Kilic E. et al. Gamma-irradiated liposome/niosome and lipogelosome/niogelosome formulations for the treatment of rheumatoid arthritis // *Interventional Medicine and Applied Science*. – 2013. – Vol. 5, № 2. – P. 60–69.
114. Urey C., Weiss V.U., Gondikas A. et al. Combining gas-phase electrophoretic mobility molecular analysis (GEMMA), light scattering, field flow fractionation and cryo electron microscopy in a multidimensional approach to characterize liposomal carrier vesicles // *International journal pharmaceutics*. – 2016. – Vol.513, Is. 1–2. – P. 309–318.
115. Van Hoogevest P., Wendel A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients // *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. – 2014. – 116. – P. 1088–1107.
116. Vrdoljak E., Boban M., Saratlija-Novakovic Z., Jovic J. Long-lasting partial regression of glioblastoma multiforme achieved by edotecarin: case report // *Croat Med J*. – 2006. – 47. – P. 305–309.
117. Vyas K.S., Rajendran S., Morrison S.D. et al. Systematic review of liposomal bupivacaine (Exparel) for postoperative analgesia // *Plast. reconstr. surg*. – 2016. – Vol.138, №4. – P. 748–756.

118. Wan-Liang Lu, Xian-Rong Qi, Qiang Zhang et al. A pegylated liposomal platform: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicity in mice using doxorubicin as a model drug // *Journal pharmacol sciences.* – 2004. – 95. – P. 381–389.
119. Wang W., Lv M., Zhao X., Zhang J. Developing a novel indolocarbazole as histone deacetylases inhibitor against leukemia cell lines // *Journal of analytical methods in chemistry.* – 2015. – 9 p.
120. Waters V., Ratjen F. Inhaled liposomal amikacin // *Expert rev. respir. med.* – 2014. – Vol. 8, № 4. – P. 401–409.
121. Wen Chih-Jen, Zhang Li-Wen, Al-Suwayeh Saleh A et al. Theranostic liposomes loaded with quantum dots and apomorphine for brain targeting and biomaging // *International Journal of Nanomedicine.* – 2012. – № 7. – P. 1599–1611.
122. Wen-Hua Huang, Zhi-Jun Yang, Heng Wu et al. Development of liposomal salbutamol sulfate dry powder inhaler formulation // *Biol. pharm. bull.* – 2010. – Vol. 33, № 3. – P. 512–517.
123. Yang S., Liu C., Liu W. et al. Preparation and characterization of nanoliposomes entrapping medium-chain fatty acids and vitamin C by lyophilization // *International journal of molecular sciences.* – 2013. – 14. – P. 19763–19773.
124. Yoshinari T., Ohkubo M., Fukasawa K. et al. Mode of action of a new indolocarbazole anticancer agent, J-107088, targeting topoisomerase I // *Cancer research.* – 1999. – 59. – P. 4271–4275.
125. ZetasizerNanoZS. Эффективность, простота, многофункциональность. Сайт компании «Malvern». URL:<http://www.malvern.com/ru/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/default.aspx>. (Дата обращения 04.11.16 г.)
126. Zheng S., Chang S., Lu Jinli et al. Characterization of 9-nitrocamptothecin liposomes: anticancer properties and mechanisms on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6, № 6. – P. 1–9.

127. Zuidam N.J., De Vreeh R., Crommelin D.J.A. Liposomes. Chapter 2. Characterization of liposomes. Edited by V.P. Torchilin and V. Weissing. Oxford University Press, 2003: 31–78.

## Приложение



## АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных достижений

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

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

следующее предложение: использование результатов диссертационной работы Али Хашема «Создание и биофармацевтические исследования липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола», в том числе технологию изготовления лекарственного препарата «ЛХС-1208 липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 1,8 мг».

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

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

 О.Л. Орлова

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

 А.П. Полозкова

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

 М.В. Дмитриева