

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**

**СТАДНІЧЕНКО ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ**

УДК 615.071: 615.456.1: 616-006.04

**НАУКОВЕ ОБГРУНТУВАННЯ ТА РОЗРОБКА ЛІПОСОМАЛЬНИХ  
ПРОТИПУХЛИННИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ ІРИНОТЕКАНУ  
І ОКСАЛІПЛАТИНУ**

**15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова  
фармація**

**АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора фармацевтичних наук**

**Харків – 2019**

Дисертацією є рукопис.

Дисертаційна робота виконана на кафедрі технології ліків Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України, м. Харків.

**Науковий керівник:** доктор фармацевтичних наук, професор,  
заслужений діяч науки і техніки України,  
лауреат Державної премії України  
в галузі науки і техніки

**ЯРНИХ ТЕТЯНА ГРИГОРІВНА**

Національний фармацевтичний університет,  
завідуюча кафедрою технології ліків.

**Офіційні опоненти:** доктор фармацевтичних наук, професор,  
**ДАВТЯН ЛЕНА ЛЕВОНІВНА**  
Національна медична академія післядипломної  
освіти імені П.Л. Шупика, м. Київ,  
завідуюча кафедрою фармацевтичної технології  
і біофармації;

доктор фармацевтичних наук, професор,  
**ГЛАДИШЕВ ВІТАЛІЙ ВАЛЕНТИНОВИЧ**  
Запорізький державний медичний університет,  
завідувач кафедри технології ліків;

доктор фармацевтичних наук, професор,  
**ШМАТЕНКО ОЛЕКСАНДР ПЕТРОВИЧ**  
Українська військово-медична академія, м. Київ,  
начальник кафедри військової фармації.

Захист відбудеться « \_\_\_\_\_ » квітня 2019 року о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.02 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий « 7 » березня 2019 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
доктор фармацевтичних наук, професор

О.В. Посилкіна

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Актуальною проблемою сучасної медицини є лікування онкологічних захворювань, серед яких значне місце займають злоякісні пухлини шлунково-кишкового тракту. Також гострою є проблема резистентності новоутворень до хіміотерапії.

Однією з причин низької ефективності протипухлинних препаратів є неконтрольований розподіл лікарської речовини в організмі та, як наслідок, низька концентрація у цільовому органі терапії. Враховуючи, що хіміотерапевтичні препарати зазвичай високотоксичні, підвищення терапевтичної дози для досягнення бажаного ефекту неможливо, оскільки побічна дія може призвести до ушкоджень серцевої системи і критично відбитися на стані всього організму.

У цьому аспекті одним зі шляхів вирішення цієї проблеми є ліпосомальні форми хіміотерапевтичних препаратів, які зменшують токсичність лікарської речовини для пацієнта, при цьому зберігаючи високу лікувальну дію, до того ж дозволяють подолати резистентність і покращити ефективність терапії. Окрім цього, за рахунок інкапсуляції лікарського засобу в наночастинках цитостатики не зазнають руйнівної дії при уведенні.

Дослідження учених за цією проблемою проводяться у різних напрямках: пошук ефективних мікроносіїв для лікарських речовин, розробка нових технологій, створення існуючих препаратів в інших лікарських формах нового покоління, стандартизація ліпосомальних препаратів (Г. І. Борщевський, О. І. Гризодуб, Ю. М. Краснопольський, В. І. Швець, Г. С. Григор'єва, Н. Ф. Конаховіч, Л. С. Стрельников та ін.).

Ефективними засобами терапії колоректальних новоутворень є лікарські препарати іринотекану гідрохлориду й оксаліплатину у формі концентратів та ліофілізатів для приготування розчинів для інфузій. Але на сьогодні в Україні немає повного циклу їх виробництва, зокрема ліпосомальних форм. Висока протипухлинна активність вказаних препаратів супроводжується їх високою токсичністю. Тому, актуальним питанням сучасної фармацевтичної технології є створення низькотоксичних ліпосомальних лікарських препаратів іринотекану гідрохлориду й оксаліплатину для більш повного розкриття їх терапевтичного потенціалу.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт НФаУ «Розробка складу, технології та біофармацевтичні дослідження лікарських засобів на основі природної та синтетичної сировини» (№ 0114U000945), тему дисертаційної роботи затверджено і уточнено на засіданнях вченої ради Національного фармацевтичного університету МОЗ України (протокол № 4 від 21.12.2015 р. та протокол № 4 від 26.12.2016 р.).

**Мета і завдання дослідження.** Метою дисертаційної роботи є наукове обґрунтування методології створення ЛП та розробка складу і технології двох ліпосомальних протипухлинних лікарських засобів на основі похідного камптотецину – іринотекану гідрохлориду та препарату комплексної форми платини – оксаліплатину для лікування онкологічних захворювань.

Реалізація поставленої мети вимагала вирішення таких науково-практичних завдань:

- ✓ здійснити аналіз та узагальнити дані інформаційних джерел щодо сучасного стану хіміотерапевтичних агентів, визначити роль препаратів цитостатиків у лікуванні онкологічних хвороб, проаналізувати існуючі лікарські форми природних та напівсинтетичних протипухлинних засобів, особливостей технології отримання та контролю якості ліпосомальних форм препаратів протипухлинної дії;

- ✓ науково обґрунтувати методологію створення ліпосомальної лікарської форми іринотекану (ЛЛФІ) та ліпосомальної лікарської форми оксаліплатину (ЛЛФО) на підставі сучасних фізико-хімічних та фармакотехнологічних досліджень;

- ✓ вивчити хімічну стабільність іринотекану гідрохлориду та оксаліплатину в різних буферних системах;

- ✓ розробити та науково обґрунтувати склад ЛЛФІ та ЛЛФО на основі фізико-хімічних досліджень;

- ✓ розробити, теоретично та науково обґрунтувати технологію отримання ЛЛФІ та ЛЛФО;

- ✓ розробити методики контролю якості на ЛЛФІ та ЛЛФО;

- ✓ стандартизувати технологічний процес отримання ЛЛФІ та ЛЛФО і виготовити зразки препаратів для проведення доклінічних досліджень;

- ✓ розробити технологічну й аналітичну документацію на виробництво ЛЛФІ та ЛЛФО;

- ✓ визначити тип пакування, умови і термін зберігання ЛЛФІ та ЛЛФО, провести дослідження стабільності;

- ✓ провести апробацію технології ЛЛФІ та ЛЛФО, а також МКЯ до них у дослідно-промислових умовах ТОВ «Технологія ліків» ГК «ХімРар» (м. Хімки) та виготовити зразки для проведення клінічних випробувань;

- ✓ отримати дозвіл на проведення клінічних досліджень та розпочати їх;

- ✓ провести масштабування і трансфер технології в умовах ТОВ «Наномедтех» (м. Київ);

- ✓ результати проведених досліджень упровадити у навчальний і науковий процеси низки закладів вищої освіти фармацевтичного (медичного) профілю.

**Об'єкти дослідження.** Діючі речовини: іринотекан у формі гідрохлориду, оксаліплатин, фосфоліпіди, холестерин, допоміжні речовини (компоненти буферних розчинів, кріопротектори, стабілізатори), ліпосомальні лікарські форми іринотекану гідрохлориду та оксаліплатину, технологічні методи отримання ліпосомальних форм.

**Предмет дослідження.** Наукове обґрунтування та експериментальне підтвердження методології створення ЛП, розробка складу, технології та МКЯ ЛЛФІ та ЛЛФО. Установлення умов і терміну їх придатності, розробка проектів технологічної і аналітичної документації. Приготування дослідно-промислових та промислових зразків ЛЛФІ та ЛЛФО для проведення доклінічних і клінічних досліджень.

**Методи дослідження.** Для реалізації окреслених у роботі завдань були використані сучасні фізичні та фізико-хімічні методи дослідження: газова хроматографія (ГХ), високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), також і у варіанті гель-проникної хроматографії, метод динамічного розсіювання світла, визначення остаточної води у ліофілізатах методом К. Фішера, потенціометричний метод визначення рН розчинів. Фармакотехнологічні методи: екструзія при високому тиску, гомогенізація ультразвуком, створення градієнта іонів на ліпідному бішарі, ультрафільтрація, ліофілізація. Фармакологічні дослідження проводили *in-vivo* та *in-vitro*. Статистичну обробку даних проводили методами математичної статистики згідно з вимогами ДФУ, за допомогою програми Microsoft Excel 7.0.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Науково обґрунтовано та експериментально опрацьовано методологію створення нових ліпосомальних лікарських засобів, яка полягає в плануванні експерименту, визначенні методів отримання ліпосом, оптимізації складу, розробці технології виробництва та методик контролю якості ЛЛФІ та ЛЛФО.

Розроблено науково-методичну основу для створення ліпосомальних форм препаратів протипухлинної дії, а саме методичні рекомендації «Методологія розробки технології ліпосомальних цитостатиків», «Методологія трансферу та масштабування технології промислового виробництва ліпосомальних цитостатиків», затверджені ПК «Фармація» МОЗ і НАМН України (протокол № 103 від 25.10.2017) та Вченою радою НФаУ (протокол № 9 від 30.05.2018 р.) та монографія «Липосомальные противоопухолевые препараты», затверджена Вченою радою Харківської медичної академії післядипломної освіти (протокол № 7 від 26.09.2018 р.).

Уперше, на підставі фізико-хімічних досліджень теоретично обґрунтовано та експериментально розроблено склад і технологію, що має потенціал масштабування, для отримання ліпосом з іринотекану гідрохлоридом методом «хімічного градієнту рН». Для виготовлення ліпосом з оксаліплатином уперше науково обґрунтовано технологію «пасивного захоплення» у поєднанні із методом «іонної сорбції», а саме: систему та методологію отримання максимальної інкапсуляції, склад і концентрацію ліпідів, тип і концентрацію кріопротектору, режим гомогенізації. При застосуванні розроблених технологій уперше досліджено хімічну стабільність іринотекану гідрохлориду в буферних розчинах з оптимальним діапазоном рН 1,9-5,0 та оксаліплатину у водному розчині.

Уперше досліджено параметри отримання моноламільярних ліпосом із запропонованим складом допоміжних компонентів та критичні стадії технологічних процесів виробництва ліпосомальних препаратів іринотекану гідрохлориду та оксаліплатину, екструзія високого тиску, ультрафільтрація, ліофільне сушіння. Проведено випробування стабільності розроблених ліпосомальних препаратів іринотекану гідрохлориду та оксаліплатину. Доведено їх стабільність упродовж 12 місяців із моменту виготовлення.

Уперше розроблено МКЯ на ліпосомальні препарати іринотекану гідрохлориду та оксаліплатину. Валідовано ВЕРХ методики контролю ступеня інкапсуляції активної речовини у препаратах, кількісного визначення АФІ у готових лікарських формах (ГЛФ).

Новизна досліджень захищена Євразійським патентом на винахід № 023079 В1 «Способ получения липосомальной формы иринотекана (варианты)» від 29.04.2016 г., та патентом України на корисну модель «Спосіб отримання ліпосомального лікарського засобу з оксаліплатином» від 11.08.2016 р.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено та запропоновано для практичної фармації і медицини два нових препарати, а саме «Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» та «Оксаліплатин ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій», для лікування онкологічних захворювань.

Розроблено нормативно-технологічну документацію, апробовано технологію (акт апробації від 16.05.2012 р.) та виготовлено зразки ліпосомальних препаратів у лабораторних і дослідно-промислових умовах ТОВ «Технологія ліків» ГК «ХімРар» (м. Хімки). Проведено доклінічні дослідження ліпосомальних препаратів з позитивними результатами.

Погоджено проведення клінічних випробувань ЛЛФІ та ЛЛФО (МЗ РФ, Рада з Етики пр. № 76 від 21.01.2014 р.). Для препаратів «Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» (внутрішній номер ЄК-45939) й «Оксаліплатин ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» (внутрішній номер ЄК-45940) погоджено проведення відкритого дослідження з визначення безпеки, переносимості, токсичності та фармакокінетичних параметрів (№ пр. МА/0713-4 та МА/1113-8 відповідно).

Для препарату «Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» успішно проведено I фазу клінічних випробувань у пацієнтів із пухлинами шлунково-кишкового тракту (дозвіл на клінічні дослідження № 481 від 22.08.2014 р.).

Проведено масштабування і трансфер технології запропонованих ліпосомальних препаратів в умовах ТОВ «Наномедтех» (м. Київ). Розроблено та затверджено технологічні регламенти і МКЯ на виробництво ЛЛФІ та ЛЛФО (акт апробації від 28.09.2018 р.). Препарати внесено до перспективного плану виробництва ТОВ «Наномедтех» (м. Київ) на 2018-2020 рр. (лист вх. № 1248 від 24.10.2018 р.).

Результати дисертаційної роботи упроваджені у навчальний процес низки закладів вищої освіти України фармацевтичного (медичного) профілю, а саме: Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського (акт впровадження від 30.08.2018 р.); Української військово-медичної академії (кафедра військової фармації, акт впровадження від 10.09.2018 р.); Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (кафедра фармації, акт впровадження від 19.09.2018 р.); Запорізького державного медичного університету (кафедра технології ліків, акт впровадження від 03.10.2018 р.); Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (кафедра аптечної і промислової технології ліків, акт впровадження від 08.10.2018 р.); Національного фармацевтичного університету (кафедри заводської технології ліків і біотехнології, акти впровадження від 15.10.2018 р. та 23.10.2018 р. відповідно); Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут» (3 акти впровадження від 19.11.2018 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є завершеною цілісною науковою працею. Дисертантом особисто проведено аналіз світових і вітчизняних інформаційних джерел із проблем створення технології та МКЯ на ЛЛФІ та ЛЛФО. Дисертантом визначено мету та методологію досліджень, здійснено планування усіх експериментальних робіт; обрано обладнання, необхідне для вирішення завдань, проведено експериментальні роботи за тематикою дисертації; проведено науковий аналіз отриманих даних; теоретично обґрунтовано і розроблено склад і технологію отримання ЛЛФІ та ЛЛФО; розроблено технологічні регламенти та МКЯ; опрацьовано та узагальнено результати доклінічного вивчення ЛЛФІ та ЛЛФО.

Усі наукові та практичні результати, положення, висновки та рекомендації, що викладені в дисертації, отримано автором самостійно. У всіх наукових працях, що опубліковані у фахових наукових виданнях у співавторстві (відповідно до списку опублікованих наукових праць за темою дисертації), дисертантом визначено мету, розроблено методи дослідження, реалізовано експериментальні дослідження, проведено аналіз і узагальнення одержаних результатів, підготовлено матеріали до друку.

Співавторами наукових праць дисертанта захищено такі дисертації: Швець В.І. «Дослідження в області складноестерних гліцерин фосфатидів і глікозилдигліцеридів», Москва, 1973 р.; Краснопольський Ю.М. «Вивчення залежності біологічної активності лікувальних та діагностичних препаратів від хімічної будови ліпідів», Харків, 1988 р.; Шахмаєв А. Е. «Розробка технології одержання ліпосомальної ін'єкційної форми убідекаренону, що має кардіопротекторну дію», Харків, 2017 р.; Балабаньян В. Ю. «Фармакологические и фармацевтические аспекты создания наноразмерных форм факторов роста нервной ткани, феназепам и паклитаксела», Москва, 2015 р.; Натікан А. А. «Определение аминокислот и их оптических изомеров методом двумерной ВЭЖХ», Москва, 2011 р.

Визначення цілей, шляхів їх реалізації, обговорення результатів отриманих даних проведено разом із науковим консультантом.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи викладені й обговорені на: X Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Управління якістю в фармації» (Харків, 2016); VIII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 2016); XIII International scientific and practical conference on Chemistry and chemical technology «Trends of modern science – 2017» (Велика Британія, 2017); III Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків 2017); The international scientific conference «Science and life» (Карлові Вари – Київ, 2017); Сб. тезисов научных трудов XXV международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной науки» (Москва – Астана – Харків – Відень, 2017); Міжнародній науково-практичній конференції. «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини» (Одеса, 2017); Materiály XIV Mexinárdni vědecko-practická conference «Věda a technologie: krok do budoucnosti – 2018» (Прага, 2018); Матеріали

за XIV Міжнародна научна практична конференція «Найновітє научні постиження – 2018» (Софія, 2018); *Materialy XIV międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Подходи к планированию експеримента при разработке липосомальных цитостатиков»* (Перемишль, 2018).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 42 наукові праці, а саме: 24 статті у наукових фахових виданнях (з них 9 - у закордонних виданнях, 3 з яких цитуються наукометричною базою даних SCOPUS), 1 монографія, 2 методичних рекомендації, 1 Євразійський патент на винахід, 1 патент України на корисну модель, 11 тез доповідей, 2 статті в інших виданнях.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота представлена на 366 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), експериментальних досліджень (розділи 2–5), загальних висновків, списку використаних джерел, додатків. Обсяг основного тексту складає 282 сторінки. Робота проілюстрована 55 рисунками та 42 таблицями. Список джерел інформації налічує 352 найменувань, з яких 244 іноземні.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

У *вступі* наведено обґрунтування вибору теми, сформульовано мету та основні завдання дисертаційного дослідження, визначено наукову новизну та практичну цінність напрацьованих результатів, вказано структуру роботи.

У *розділі 1 «Сучасні принципи фармакоterapiї онкологічних захворювань. Роль хіміотерапевтичних препаратів в терапії – реалії та перспективи створення»* проаналізовано та структуровано дані сучасної світової літератури щодо класифікації препаратів протипухлинної дії. Коротко розглянуто механізми дії цих сполук, їх місце у терапії пухлинних захворювань. Проаналізовано лікарські форми препаратів цієї групи, що є у наявності на фармацевтичному ринку України. Показано, що головний недолік звичайних форм протипухлинних препаратів – низька селективність, та висока токсичність, що перешкоджає повному розкриттю терапевтичного потенціалу препаратів при лікуванні та знижує якість життя пацієнта.

Показано, що особливе місце у даному аспекті займають ліпосомальні форми протипухлинних препаратів. Ліпосомальні препарати (ЛП) зменшують пошкодження ендотеліального шару судин при уведенні, що характерно при хіміотерапії за допомогою звичайних препаратів. Розглянуто загальні технології створення ЛП та методики контролю їх якості. Показано, що препарати іринотекану гідрохлориду та оксаліплатину є сучасними протипухлинними АФІ, що виявляють синергізм при одночасному застосуванні, тому вони перспективні для створення нових лікарських форм на основі ліпосомальних носіїв.

У *розділі 2 «Обґрунтування загальної методології досліджень. Об'єкти і методи»* викладено загальну методологію досліджень, яку створено для вирішення науково-практичних невизначеностей, що виникають при фармацевтичній розробці ЛЛФІ та ЛЛФО. Запропонована методологія має за основу послідовну реалізацію низки фізико-хімічних та фармакотехнологічних досліджень для створення



лікарських форм, що відповідають сучасним вимогам до ліпосомальних нанорозмірних препаратів.

Охарактеризовано об'єкти досліджень, визначено вимоги до характеристик діючих та допоміжних речовин, які використовуються для створення ліпідного бішару, є компонентами досліджуваних буферних розчинів, стабілізують ліпосомальну емульсію. Наведено дані з розробки методик визначення інкапсуляції водорозчинних речовин у ліпосоми методом ВЕРХ.

У розділі 3 «Наукове обґрунтування складу і технології лікарського препарату «Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій»» наведено результати теоретичних досліджень та експериментальних розробок з обґрунтування складу і технології створення ЛЛФІ. Розроблено МКЯ для ГЛЗ і технологічну схему його виробництва, на базі якої складено технологічний регламент.

На першому етапі роботи було проведено обґрунтування концентрації іринотекану гідрохлориду в ліпосомальній формі, яка склала 2 мг/мл. За основу було обрано склад цього препарату, який існує на фармацевтичному ринку України у формі розчину для парентерального застосування.

Було досліджено стабільність іринотекану гідрохлориду в різних буферних системах при різних варіаціях рН. На рис. 1 наведено хімічну будову іринотекану в молекулярній формі із зазначенням циклічних складових структури, які мають можливість виявляти лабільні властивості. Біологічна активність молекули іринотекану гідрохлориду пов'язана із взаємодією білка топоізомераза I, а саме його зв'язування із кільцем лактону E, що відбувається шляхом розкривання циклу й утворення кон'югата іринотекан – топоізомераза I.

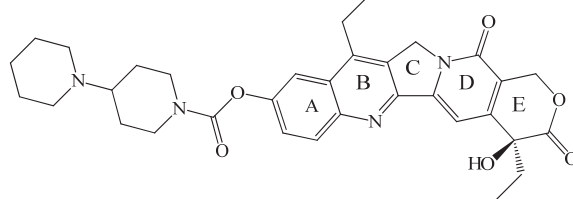


Рис. 1 Хімічна будова іринотекану в молекулярній формі із зазначенням циклічних складових структури

При значеннях рН вище 5,0 має місце конверсія активного лактоного кільця E іринотекану (рис. 1) за механізмом, наведеним на рис. 2.

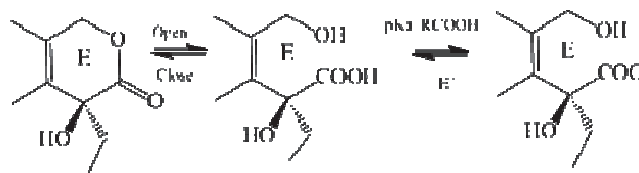


Рис. 2 Ймовірний механізм конверсії активного лактона E в неактивний аніон гідроксикислоти

При цьому відбувається утворення похідного – гідроксикислоти, з подальшим її депротонуванням і формуванням аніона. Це призводить до утворення небажаних

супровідних домішок, вміст яких виходить за межі специфікації, та зменшення активності готового лікарського засобу.

Оскільки похідне іринотекану у формі гідроксикислоти не має потрібної біологічної активності, при розробці його ліпосомальної лікарської форми було досліджено технологічні та фізико-хімічні параметри, які б дозволили максимально зберегти активну структуру і запобігти утворенню небажаних домішок. Було проведено дослідження впливу рН на утворення небажаних домішок аніона гідроксикислоти (табл. 1). Для дослідження використовували ВЕРХ методику визначення домішок у ЛЛФІ.

Таблиця 1

**Дослідження стабільності іринотекану гідрохлориду при різних значеннях рН**

№	рН	Стабільність	Вміст домішки
1	1,9	Стабільний	Не утворюються
2	3,5	Стабільний	Не утворюються
3	5,0	Стабільний упродовж 12 годин	0,3 % за 12 годин
4	5,5	Стабільний упродовж 1 години	1,3 % за 1 годину
5	8,1	Нестабільний	Розкладання АФІ

Наведена хроматограма випробувань стабільності іринотекану гідрохлориду в середовищі 0,002 М натрію фосфату однозаміщеного при рН 5,0 при дослідженні протягом 8 годин (рис. 3).

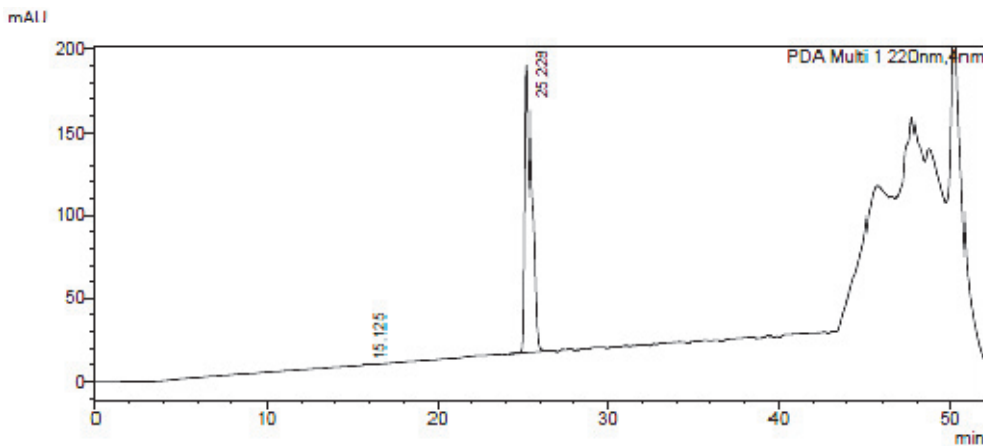


Рис. 3 Хроматограма іринотекану гідрохлориду при термостатуванні протягом 8 годин у фосфатному буферному розчині при рН 5,0

При цьому на 4-ту годину дослідження на 15,1 хвилині на хроматограмі з'являється домішка, характерна для деструкції лактоного кільця Е іринотекану. На 6-й годині випробувань вміст домішки сягає 0,2 %, а на 12-й годині - 0,3 %.

Із метою запобігання деструкції іринотекану, що виходить за межі специфікації, значення 0,3 % домішки гідроксикислоти було визначено нами як максимально допустиме при проведенні технологічного процесу.

Відповідно до МКЯ верхнє значення вмісту одиначної домішки у готовому продукті не має перевищувати 0,4 % (співпадає з вимогами до сторонніх домішок препарату розчину іринотекану гідрохлориду для парентерального застосування).

Слід врахувати, що з моменту уведення іринотекану в емульсію його кількість у зовнішньому буфері відразу починає зменшуватися за рахунок інкапсуляції і переходу всередину ліпосом у кисле середовище (при використанні технології «градієнта рН»). При цьому знижується динаміка утворення домішки. Тобто, рН 5,0 є прийнятним для технології.

Для визначення стратегії розробки проводили досліди з обрання перспективних технологій мікронізації ліпосомальної емульсії, заміни розчинників для створення системи «хімічного градієнта». Для зменшення розмірів ліпосом використовували два методи – ультразвукової обробки та екструзії. Ультразвукова обробка дозволяє використовувати більш доступне обладнання, але метод екструзії дає більш гомогенний та вузький діапазон розмірів частинок після обробки.

Для обробки ультразвуком використовували ультразвукову баню «Сапфір», для екструзії - гомогенізатори високого тиску. За допомогою методу динамічного розсіювання світла на устаткуванні Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) було встановлено, що при ультразвуковій обробці не вдається повністю гомогенізувати емульсію на частинки менше 220 нм. Разом з тим, при обробці ультразвуком упродовж 2 годин одночасно із частинками розміром 1 мкм з'являються частинки розміром приблизно 30 і 4875 нм, що є технологічно неприйнятним для виробництва ліпосомальних парентеральних засобів. Було проведено порівняння технологій створення хімічного градієнту методами «градієнта амонію» та «градієнта рН».

Основою технології «хімічного градієнта амонію» є створення градієнта концентрації іонів ззовні та всередині ліпосом. Дуже важливим для цієї технології є показник константи протонування активної речовини. За даними програми ACD 6,0, константа протонування речовини іринотекану складає  $pK_a=6,57 \pm 0,7$  за таким рівнянням:



Будова ліпідного шару дозволяє проникати крізь фосфоліпідну мембрану об'єктів тільки у молекулярній, не в іонізованій формі, тобто тих, що не мають поверхневого заряду. Об'єкти, що мають поверхневий заряд, можуть проникати лише в гідрофільну частину мембрани, що створена залишками кислоти фосфорної, і не можуть проникати крізь подвійний гідрофобний шар залишків жирних кислот. При рН у діапазоні 5,0–6,0 виходячи із  $pK_a$  молекули іринотекану, лише невелика частина молекул перебуває у депротонованому молекулярному стані. Молекулярна форма адсорбується на поверхні ліпосом і проходить усередину крізь гідрофобний бішар.

Молекулярна форма речовини залишає сферу реакції, за принципом Ле-Шательє реакція компенсує рівновагу дисоціацією протонів від зарядженої молекули іринотекану. Переходячи усередину ліпосом, молекула іринотекану протонується завдяки іону амонію і втрачає здатність проходити крізь ліпідний бішар. За цим механізмом виходить, що чим вище різниця концентрацій іонів амонію ззовні та усереднені ліпосоми, тим більшою є тенденція іринотекану до проникнення у ліпосому.

Також величина рН зовнішнього буфера має бути ретельно підібрана, щоб не тільки сприяти проникненню протонованої форми всередину, але й не руйнувати

молекулярну структуру. При цьому інкапсульована кількість активної речовини усередині ліпосоми значною мірою залежатиме від ємності буферного розчину усередині ліпосоми. За цією технологією рН у середині ліпосом складає 5,2.

Технологія «градієнта рН» має спільний механізм із технологією «градієнта амонію», проте інкапсуляція відбувається за рахунок різниці рН всередині та зовні ліпосом. При рН у діапазоні 5,0–6,0 частина молекул іринотекану знаходиться у молекулярному стані. Оскільки крізь бішар фосфоліпідів можуть проходити лише незаряджені молекули, частина іринотекану в молекулярній формі адсорбується на поверхні та проникає всередину ліпосом, де протонується за рахунок наявності протонів.

При цьому молекула втрачає можливість проходити крізь ліпідний бішар і накопичується всередині ліпосоми. У зовнішньому фосфатному буфері відбувається депротонування зарядженої молекули іринотекану, потім вона проникає усередину ліпосом крізь фосфоліпідний бішар, де протонується за рахунок наявного надлишку протонів. Кількість накопичуваної усередині ліпосом речовини буде залежати від ємності внутрішнього буферного розчину та різниці рН, тобто від значення «градієнта» між внутрішнім та зовнішнім буферними розчинами.

У табл. 2 наведено порівняння переваг та недоліків технологій «хімічного градієнта рН» та «хімічного градієнта амонію»

Таблиця 2

**Порівняння технологій «хімічного градієнта рН» та «хімічного градієнта амонію» при отриманні ліпосомальної форми іринотекану**

Показник	Технологія «хімічного градієнта рН»	Технологія «хімічного градієнта амонію»
Складність реалізації технології	Обидві технології однакові за складністю	
Застосування технологій у світовій практиці	Обидві технології застосовуються	
Використання допоміжних речовин фармакопейної якості	Допоміжні матеріали дозволені до парентерального уведення	
Фізіологічність рН препарату	Фізіологічне	
Стабільність активної речовини в умовах технології	Стабільна	Піддається руйнуванню
Наявність потенціалу поліпшення умов інкапсуляції за рахунок збільшення «градієнта»	Потенціал є, потрібен експеримент	Потенціал вичерпано
Усереднене значення ступеня інкапсуляції при апробації обох технологій у порівняльних умовах, %	42,15 ± 0,5 %	33,75 ± 0,7 %

Беручи до уваги ризик руйнування активної структури іринотекану гідрохлориду при значеннях показника рН у разі технології «градієнта амонію», а також кращі показники інкапсуляції при використанні технології «градієнта рН», було обрано технологію з «градієнтом рН». Далі досліджували внутрішній об'єм ліпосом, співвідношення ліпідів у складі бішару, загальну концентрацію ліпідів у препараті.

Із використанням технології «градієнта рН» був виконаний цикл експериментів із підбору співвідношення EPC/Chol на мембрані, із використанням різних кріопротекторів, та загальною концентрацією ліпідів 15 мг/мл (табл.3).

Таблиця 3

**Вміст EPC та Chol для проведення експерименту з апробації кріопротекторів. Вміст ліпідів в емульсії – 15 мг/мл**

№	Співвідношення EPC та Chol, % (мас.)	Середня інкапсуляція, до ліофілізації, %	Тип кріопротектора, інкапсуляція після ліофілізації, %
1	EPC 100	33,0 ± 0,9	Лактоза 12,0 ± 0,9 Трегалоза дигідрат 19,0 ± 0,8 Мальтоза 7,0 ± 1,1 Цукроза 13,0 ± 0,8
2	EPC/Chol 95 / 5	44,0 ± 1,0	Лактоза 16,0 ± 0,9 Трегалоза дигідрат 28,0 ± 1,1 Мальтоза 12,0 ± 0,8 Цукроза 18,0 ± 1,1
3	EPC/Chol 85 / 15	57,0 ± 1,2	Лактоза 39,0 ± 0,8 Трегалоза дигідрат 43,0 ± 1,1 Мальтоза 35,0 ± 1,1 Цукроза 42,0 ± 1,0
4	EPC/Chol 70 / 30	71,0 ± 1,0 Ускладнення при фільтрації	Лактоза 46,0 ± 0,9 Трегалоза дигідрат 51,0 ± 0,7 Мальтоза 42,0 ± 1,2 Цукроза 48,0 ± 0,9

Проведений експеримент показав, що мембрани зі складом 100 % EPC та 95/5 % EPC/Chol не мають високих ступенів інкапсуляції та не стійкі до ліофілізації, незважаючи на кріопротектор, який застосовується. На увагу заслуговує мембрана 85/15 % EPC/Chol, яка показала високий ступінь інкапсуляції разом зі стійкістю до ліофілізації. Особливо слід відзначити кріопротектор трегалозу дигідрат, який виявив найкращий захист ступеня інкапсуляції під час ліофілізації, тому є перспективним для подальших експериментів.

Мембрана 70/30 % EPC/Chol виявила достатню жорсткість і високий ступінь інкапсуляції як до, так і після ліофілізації. Але наявність частинок більш ніж 1 мкм ускладнює стерилізаційну фільтрацію у промислових умовах.

Було проведено експеримент для оцінки можливості використання

фосфатного буфера як внутрішнього. При порівнянні результатів в однакових умовах інкапсуляція склала 31 %, однак при застосуванні іонів цитрату із рН 3,5 був досягнутий ступінь інкапсуляції 55 %, що робить цитратний буферний розчин більш перспективним.

Оскільки було встановлено, що мембрана зі складом EPC/Chol 85/15 % підходить для створення ліпосом, а мембрана EPC/Chol 70/30 % хоч і має кращі показники інкапсуляції, не забезпечує відсутності частинок понад 1000 нм, було вирішено повторити експеримент з дослідження мембран із проміжним складом ліпідів (табл. 4). Концентрація фосфоліпідів склала 15 мг/мл. Було зменшено значення рН внутрішнього буферного розчину до 2,5. рН зовнішнього буферного розчину склало 4,8. При цьому різниця в значенні рН при створенні «хімічного градієнта рН» склала 2,3 одиниці.

Таблиця 4

#### Характеристики отриманих ліпосом при різному співвідношенні EPC / Chol

№	Склад ліпідів: EPC / Chol, % (мас.)	Середній діаметр ліпосом, нм	Ступінь інкапсуляції іринотекану, %	Примітка
1	85/15	86,0 ± 2,3	63,0 ± 1,1	Частинки понад 220 нм відсутні
2	80/20	108,0 ± 3,1	79,0 ± 0,9	Частинки понад 220 нм відсутні
3	75/25	131,0 ± 2,9	87,0 ± 0,8	Наявні частинки понад 1000 нм
4	70/30	128,0 ± 3,1	92,0 ± 1,1	Наявні частинки понад 1000 нм

Таблиця 4 підтверджує данні попередніх експериментів: незважаючи на високий ступінь інкапсуляції, при співвідношенні ліпідів EPC/Chol 75/25 та 70/30 % неможливо позбавитися від частинок розміром понад 1000 нм. Також можна побачити, що мембрана зі співвідношенням ліпідів EPC/Chol 80/20 % показала ступінь інкапсуляції іринотекану – 79 %, разом із технологічною перевагою – відсутністю частинок понад 1000 нм. Для подальшої оптимізації складу ліпосом доцільно обрати мембрану зі співвідношенням ліпідів EPC/Chol 80/20 % як найбільш перспективну.

Наступним кроком було вирішено випробувати більш потужний екструдер Microfluidics Microfluidiser M-110P, верхній діапазон тиску для якого складає 2500 атм. Був проведений дослід з порівняння ефективності роботи екструдерів при роботі з ліпосомами на режимі 1500 атм. Як модельну ліпідну мембрану використовували мембрану з концентрацією ліпідів 15 мг/мл та співвідношенням ліпідів EPC/Chol 80/20 %. За перший цикл екструдер Avestin C-3 зменшив розмір частинок до 684 нм, екструдер Microfluidics Microfluidiser M-110P – до 223 нм (рис. 4). Для наочності не показаний вихідний розмір ліпосом. В обох випадках він був на рівні 6000 нм.

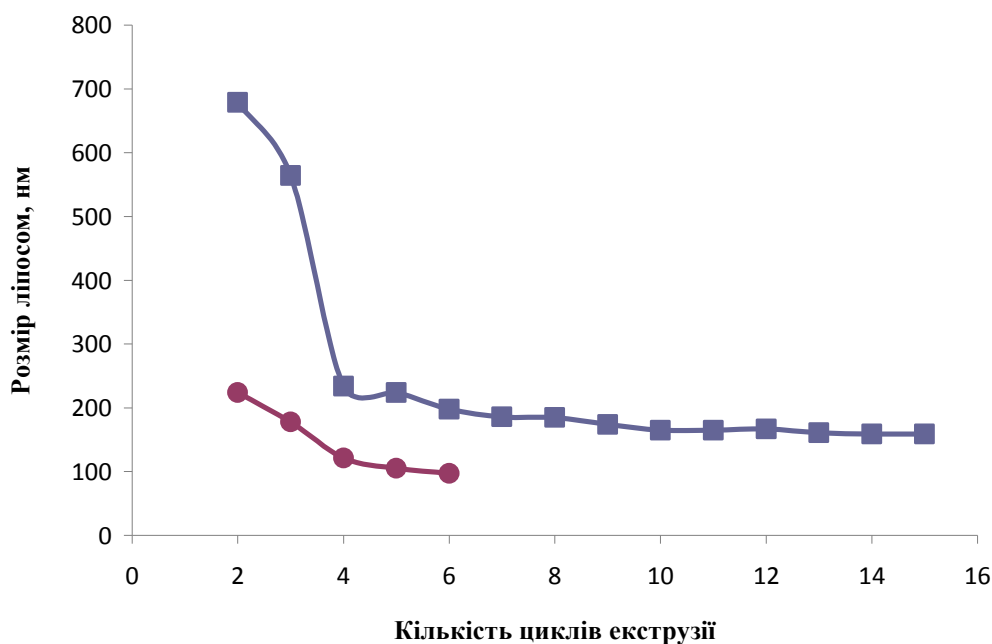


Рис. 4 Порівняння ефективності роботи екструдерів Avestin C-3 (■ – верхній графік) та Microfluidics Microfluidiser M-110P (● – нижній графік)

Далі використовували екструдер Microfluidics Microfluidiser M-110P. Було проведено експеримент з дослідження концентрації ліпідів для досягнення максимального ступеня інкапсуляції (табл. 5) Як модельний зразок було обрано співвідношення фосfolіпідів 80/20 % EPC/Chol.

Таблиця 5

#### Підбір концентрації фосfolіпідів для отримання ліпосом

№	Концентрація фосfolіпідів, мг/мл	Кількість циклів екструзії	Середній діаметр ліпосом, нм	Ступінь інкапсуляції, %	Примітка
1	10	3	109,0 ± 2,7	55,0 ± 0,7	Частинки понад 220 нм відсутні
2	15	6	114,0 ± 3,1	78,0 ± 0,9	Частинки понад 220 нм відсутні
3	20	7	107,0 ± 2,6	82,0 ± 0,6	Частинки понад 220 нм відсутні
4	25	14	151,0 ± 3,2	Не проводили	Наявні частинки понад 1000 нм.
5	30	17	Понад 200	Не проводили	Наявні частинки понад 1000 нм.

Із табл. 5 видно, що розчини експерименту 1–3 показали задовільні результати. Експерименти 4–5 показали ускладнення при проведенні технологічного процесу. Із експериментів 1–3, які показали задовільні результати, найбільш

перспективним є розчин із концентрацією ліпідів 20 мг/мл, що використовувалося у подальших експериментах.

При дослідженні впливу рН на стабільність іринотекану гідрохлориду було встановлено, що його структура не руйнується навіть у сильнокислотному середовищі, в присутності 0,2 М розчину кислоти лимонної моногідрату при рН 1,9.

Також, використовуючи теорію «хімічного градієнта рН», можна спрогнозувати, що найбільша інкапсуляція буде очікуватися при найбільшій  $\Delta$  - різниці концентрації протонів усередині та ззовні ліпосом. Вирішено було перевірити ефективність зменшення рН буферного розчину всередині ліпосом і оцінити вплив на кількість супровідних домішок, які будуть утворюватися в процесі.

Під час проведення досліджень було виявлено, що при термостатуванні ліпосомальної емульсії із завантаженим іринотеканом гідрохлоридом початкове значення рН 4,5 поступово зменшується до значення рН 4,2 за рахунок інкапсуляції іринотекану гідрохлориду в ліпосоми і вивільнення протонів. Було доведено, що при рН 5,0 стабільність зберігається протягом 12 годин.

Враховуючи, що кількість іринотекану гідрохлориду в буфері навколо ліпосом знижується упродовж інкапсуляції, а процес утворення домішок уповільнюється, було вирішено підтримувати «градієнт рН» за рахунок додавання 0,1 М натрію гідрооксиду для підтримки значення рН 5,0 на етапі завантаження активної речовини та витримки емульсії до моменту стерильної фільтрації перед етапом розливу у флакони у подальших експериментах.

За допомогою ВЕРХ було доведено, що значення рН на рівні 5,0 не викликає появу домішок, які виходять за межі специфікації. У подальших експериментах використовували зовнішній буферний розчин зі значенням рН 5,0.

Для перевірки обрано 0,2 М буферні розчини амонію цитрату з рН 2,5 та 2,0 а також розчин кислоти лимонної моногідрату з рН 1,9. Як модель обрано ліпосоми зі складом мембрани 80/20 % ЕРС/Chol та загальною концентрацією фосфоліпідів 20 мг/мл (табл. 6). рН зовнішнього буферного розчину складав 5,0.

*Таблиця 6*

**Визначення ступеня інкапсуляції іринотекану гідрохлориду при використанні внутрішнього буфера з різним значенням рН**

№	рН внутрішнього буферу	$\Delta$ із зовнішнім буфером	Ступінь інкапсуляції, %	Примітка
1	2,5	2,5	$82,0 \pm 0,8$	Частинки понад 220 нм відсутні
2	2,0	3,0	$84,0 \pm 0,7$	Частинки понад 220 нм відсутні
3	1,9	3,1	$89,0 \pm 0,8$	Частинки понад 220 нм відсутні

Із табл. 6 видно, що, як і очікувалося, найбільший ступінь інкапсуляції іринотекану гідрохлориду був досягнутий при використанні максимального



Δ «хімічного градієнта рН», який склав 3,1 при використанні 0,2 М розчину кислоти лимонної моногідрату з рН 1,9. Показник «супровідні домішки» вкладався у межі специфікації.

Був проведений експеримент з випробування фосфоліпідної мембрани із додаванням заряджених ліпідів – дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (DPPG), дипальмітоїлфосфатидилетаноламін (DPEA), кислота фосфатидна (PA). Усі заряджені ліпіди додавалися у співвідношенні 10 % від загальної пропорції відпрацьованої мембрани 80/20 % EPC/Chol.

Жоден із застосованих заряджених ліпідів не показав переваг у порівнянні з ліпідною плівкою зі складом 80/20 % EPC/Chol. Був проведений дослід з вивчення впливу молярності зовнішнього буфера на ступінь інкапсуляції та середній діаметр ліпосом, завантажених іринотекану гідрохлоридом (табл. 7).

*Таблиця 7*

### **Вплив зовнішнього буфера на розмір ліпосом та ступінь інкапсуляції**

№	Молярність зовнішнього буферного розчину, М	Середній діаметр ліпосом після термостатування 12 годин при рН 5,0	Інкапсуляція після витримки 12 годин, %
1	0,1	145 нм великі частинки відсутні	96,9 ± 1,1
2	0,05	152 нм великі частинки відсутні	96,7 ± 1,2
3	0,025	156 нм великі частинки відсутні	97,1 ± 0,9
4	0,01	147 нм великі частинки відсутні	97,8 ± 1,3

Як видно із табл. 7, середній діаметр ліпосом та ступінь інкапсуляції при використанні фосфатного буферного розчину з різною концентрацією залишається майже однаковим. Однак за аналізом ступеня інкапсуляції після інкубації протягом 12 годин із метою зменшення сольового навантаження на організм пацієнтів було вирішено використовувати буферний розчин із концентрацією 0,01 М.

Для стабільності готового продукту було додатково відпрацьовано технологію ліофільного сушіння. Одним з основних факторів, що впливає на режим сушіння препарату, є тривалість стадії первинного сушіння, при якій видаляється більшість води з ліофілізату. Також, великий вплив чинить температура вторинного сушіння (так званого «досушування»). При цьому треба збалансувати кінцеву температуру сушіння і кількість залишкової води у препараті (табл. 8).

На рис. 5 наведено графік режиму ліофільного сушіння з досушування при 15 °С, з якого видно, що температура продукту наближається до температури полиць у районі 1200 хв, що є свідченням закінчення фази первинного сушіння, і повною сублімацією льоду з маси ліофілізату. Далі температура продукту відтворює

температуру полиць камери на початку процесу вторинного сушіння і випаровування залишкової води.

Таблиця 8

### Вміст води у ЛЛФІ при різній температурі вторинного сушіння

№	Температура вторинного сушіння, °С	Вода у ліофілізаті (ДФУ 2.0 2.5.12), %	Втрата ступеня інкапсуляції у порівнянні зі значеннями до розливу, %
1	20	0,8 - 0,9	20-25
2	15	1,1 - 1,6	12-14 (21 % при заморожуванні препарату не у камері ліофільного сушіння при - 40 °С, а в морозильнику при - 20 °С)

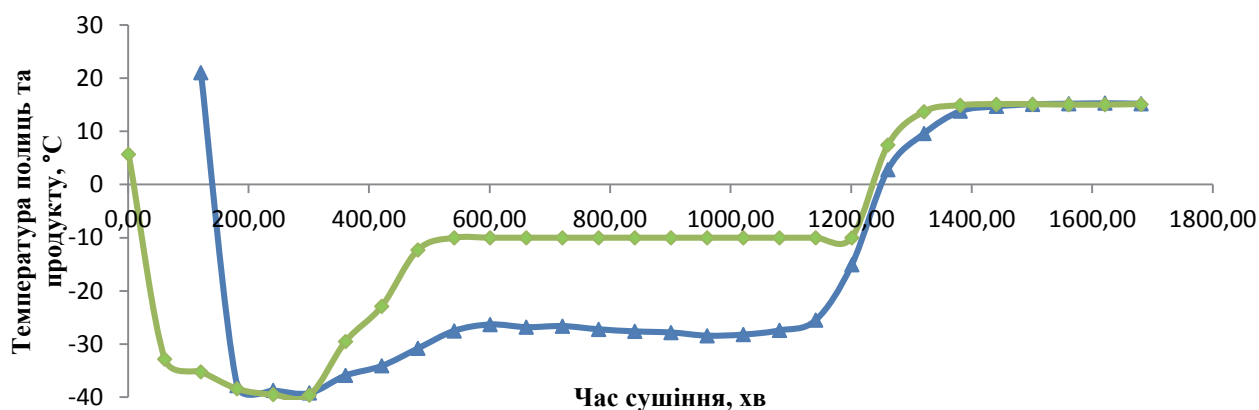


Рис. 5 Режим ліофільного сушіння з досушуванням при 15 °С. ◆ – температура полиць ліофільного сушіння, ▲ – температура продукту під час процесу

Це підтверджує належний контакт дна флаконів препарату із полицями камери. Поступове наближення та співпадіння температури продукту із температурою полиць свідчить про закінчення процесу сушіння та випаровування води.

Для проведення експерименту нами використовувалися флакони фірми Schott: VADIN10R, ємністю 10 мл, VADIN20R, ємністю 20 мл, VAT05020C, ємністю 50 мл із плоским дном. При проведенні процесу ліофілізації флакони заповнювалися на 50 % максимального вмісту. Після завершення ліофільного сушіння флакони докупорювалися гумовими пробками із залишковим вакуумом у камері ліофільного сушіння, виймалися, завальцьовувалися алюмінієвими ковпачками, милися, сушилися стиснутим повітрям і зберігалися у морозильнику.

Оскільки найкращі показники інкапсуляції були отримані при застосуванні трегалози дигідрату як кріопротектора, було проведено оцінку втрати ступеня інкапсуляції після ліофілізації, при використанні фосфоліпідної плівки складу 80/20 % EPC/Chol, загальної концентрації ліпідів 20 мг/мл та концентрації трегалози дигідрату 5, 6, 8 та 10 % (табл. 9).

Таблиця 9

Порівняння ступеня інкапсуляції до та після ліофілізації при використанні різних кількостей трегалози дигідрату

№	Кількість трегалози дигідрату, %	Середнє значення інкапсуляції до ліофілізації, %	Середнє значення інкапсуляції після ліофілізації, %
1	5	88,0 ± 1,3	42,0 ± 1,0
2	6	95,8 ± 0,9	72,0 ± 1,2
3	8	98,1 ± 0,9	85,0 ± 0,9
4	10	93,1 ± 1,1	68,0 ± 0,8

Оптимальна концентрація трегалози дигідрату як криопротектора складала 8 %.

Після регідратації ЛЛФІ виявляє схильність до втрати термодинамічної стабільності емульсії, що неприйнятно, оскільки препарат має бути стабільним до моменту введення під час проведення терапії. Тому, далі було вивчено вплив присутності амінокислот як модифікатора дзета-потенціалу для забезпечення необхідної стабільності ліпосом з іринотекану гідрохлоридом після регідратації (табл. 10).

Таблиця 10

Значення дзета-потенціалу ліпосом з іринотекану гідрохлоридом при використанні амінокислот із різними концентраціями

Модифікатор					
<i>l-Lys</i>		<i>l-Arg</i>		<i>l-Gly</i>	
Концентрація, % (мас.)	Дзета-потенціал, мВ	Концентрація, % (мас.)	Дзета-потенціал, мВ	Концентрація, % (мас.)	Дзета-потенціал, мВ
0	-1,2 ± 0,02	0	-1,2 ± 0,02	0	-1,2 ± 0,02
0,004	-2,8 ± 0,02	0,004	-4,5 ± 0,02	0,004	-1,3 ± 0,02
0,008	-4,1 ± 0,02	0,008	-6,9 ± 0,02	0,008	-1,4 ± 0,02
0,012	-5,1 ± 0,02	0,012	-9,3 ± 0,02	0,012	-1,4 ± 0,02
0,016	-6,5 ± 0,02	0,016	-12,2 ± 0,02	0,016	-1,5 ± 0,02
0,02	-7,7 ± 0,02	0,02	-14 ± 0,02	0,02	-1,7 ± 0,02

Доведено, що при концентрації *l*-лізину, починаючи від 0,02 % (мас.), та *l*-аргініну в концентрації, починаючи від 0,008 % (мас.), відбувається вивільнення іринотекану гідрохлориду з ліпосом, а інкапсуляція при цьому зменшується до 20 %, гліцин у будь-якій із наведених концентрацій практично не впливає на дзета-потенціал. Як перспективний модифікатор був обраний *l*-лізин у концентрації

0,012 % (мас.) як достатній для підтримки термодинамічної стабільності. При регідратації ЛЛФІ препарат залишається термодинамічно стабільним протягом 5 годин, при цьому значення інкапсуляції і розміру ліпосом статистично не відрізняються від вихідних значень.

Після визначення концентрації і типу модифікатора дзета-потенціалу відкритим залишилося питання про спосіб його уведення в препарат. Були апробовані дві технології: 1) додавання необхідної кількості L-лізину перед процесом ліофілізації; 2) використання для регідратації розчину L-лізину у вигляді розчинника.

При проведенні експериментів за технологією 1 було з'ясовано, що необхідна стабільність не досягається. Виходячи з цього, було вирішено для регідратації ліофілізату використовувати розчин L-лізину як розчинник ліофілізованої форми препарату.

Отже, на підставі проведених досліджень визначено оптимальний склад ліпосомального препарату іринотекану гідрохлориду на один флакон ємністю 1032 мг **«Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій»**: іринотекан гідрохлорид у перерахунку на безводну речовину – 20,0 мг, фосфатидилхолін з яєчних жовтків – 160,0 мг, холестерин – 40,0 мг, трегалоза дигідрат – 800,0 мг, кислота лимонна моногідрат – 0,04 мг, натрію дигідрофосфат – 12,1 мг.

Із метою проведення контролю якості препарату, у відповідності з вимогами ДФУ, були визначені фізико-хімічні і фармакотехнологічні показники та розроблено проект МКЯ (табл. 11).

На підставі проведених досліджень розроблено технологічну схему та затверджено технологічний регламент на виробництво лікарського препарату **«Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій»**

*Таблиця 11*

**Показники якості препарату «Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» згідно з МКЯ**

Показники якості	Допустимі межі за МКЯ
1	2
Опис	Має відповідати
Справжність: Іринотекан гідрохлорид Фосфатидилхолін Холестерин	Має відповідати
Середня маса вмісту одного флакона	Від 928,8 до 1135,2 мг
Колоїдна стабільність	Без ознак розшарування протягом 120 хв
Розмір частинок	Не більше 220 нм
pH	Від 4,5 до 6,5
Залишкова вода	Не більше 4 %

1	2
Сторонні домішки	Іринотекану гідрохлорид Вміст домішки – не більше 0,4 %, Сумарна кількість домішок – не більше 2,0% Фосфатидилхолін Вміст домішок – не більше 7 %
Ступінь інкапсуляції	Не менше ніж 80 % для препарату, розведеного розчинником
Залишкові кількості органічних розчинників	Етанол – не більше 0,4 %
Бактеріальні ендотоксини	Граничний вміст бактеріальних ендотоксинів має бути не більше 0,45 ЕС/мг іринотекану гідрохлориду.
Стерильність	Має бути стерильним
<i>Кількісне визначення:</i> Іринотекану гідрохлорид	Вміст іринотекану гідрохлорид безводного у флаконі має бути від 19,0 до 21,0 мг
Фосфатидилхолін	Вміст фосфатидилхоліну у флаконі має бути від 144 до 176 мг у флаконі
Холестерин	Вміст холестерину у флаконі має бути від 36 до 44 мг у флаконі
Пакування	Відповідно до МКЯ
Маркування	Відповідно до МКЯ
Зберігання	У сухому, захищеному від світла місці при температурі від мінус 20 °С до мінус 25 °С
Термін придатності	12 місяців. Приготована емульсія зберігається не більше 2 годин при кімнатній температурі

Була вивчена стабільність препарату упродовж 15 місяців. Для досліджень обрана схема контролю, що складається із п'яти точок: відразу після виготовлення, через 3, 6, 9, 12 та 15 місяців. Ступінь інкапсуляції істотно не змінювався упродовж терміну спостереження і складав від 83 до 87 %. Розмір частинок упродовж дослідження не змінювався і залишався постійним у діапазоні 115–121 нм упродовж усього терміну зберігання, який досліджувався. Це разом із визначенням термодинамічної стійкості та ступеня інкапсуляції свідчить про збереження тримірної наноструктури препарату та її легке повне відновлення в емульсію із розмірами частинок менше 220 нм при регідратації розчинником.

У розділі 4 «Наукове обґрунтування складу і технології лікарського препарату «Оксаліплатин ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій»» наведено результати та висновки теоретичних та експериментальних досліджень з обґрунтування складу, технології виробництва ЛЛФО та розробки технологічної й аналітичної документації на готовий лікарський препарат.

На першому етапі розробки було проведено теоретичний аналіз складових лікарських форм оксаліплатину, що існують на фармацевтичному ринку України, та обґрунтування концентрації діючої речовини у ЛП, яка склала 2 мг / мл.

Комплексна сполука платини – оксаліплатин – хімічно несумісна із солями. Тому ліпосомальна форма препарату не має містити сольових буферних компонентів. За допомогою методу ВЕРХ було визначено, що оксаліплатин зберігає стабільність у водному розчині упродовж 24 годин – у період спостереження.

Молекула оксаліплатину є комплексом, в якому в молекулі центральне місце посідає атом платини, оточений лігандами – оксалатом і діаміноциклогексаном (рис. 6). Це обумовлює комплексоутворювальні можливості оксаліплатину по відношенню як до позитивно, так і негативно заряджених молекул.

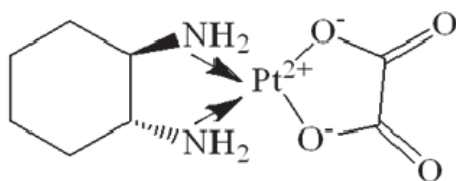


Рис. 6 Структурна формула оксаліплатину

Константа протонізації ( $pK_a$ ) оксаліплатину, за даними програми ACD Labs, становить 5,88, що характеризує її як практично нейтральну. Структура оксаліплатину, за відсутністю аміногруп, які протонуються, робить неможливим застосування методу «хімічного градієнта».

Оскільки оксаліплатин є гідрофільною речовиною, і практично не розчинний в етанолі, так само неможливо застосувати технологію його спільного розчинення з ліпідами з подальшим утворенням ліпідної плівки. Виходячи з цього нами була апробована низка технологій для отримання ліпосомальної форми оксаліплатину, заснованих на сорбції молекул оксаліплатину на ліпосомальну мембрану. Експеримент включав 3 етапи розробки складу ліпідної оболонки: нейтральна ліпідна мембрана, позитивно заряджена ліпідна мембрана і негативно заряджена ліпідна мембрана (табл. 12).

Таблиця 12

**Порівняльні дані за ступенем інкапсуляції оксаліплатину в ліпосоми з різним складом ліпідної мембрани**

№	Склад ліпідної мембрани, %	Середній діаметр ліпосом, нм	Заряд поверхні ліпосоми	Середня інкапсуляція оксаліплатину, %
1	ЕРС/ Chol 80/20	102	Нейтральний заряд	10,1 ± 0,2
2	ЕРС / Chol / DOTAP 60/20/20	148	Позитивний заряд	8,9 ± 0,1
3	DPEA / Chol / ЕРС 5/20/75	Ліпосоми не утворювалися		
4	ЕРС / Chol / DPPG 70/20/10	131	Негативний заряд	15,8 ± 0,1

Із даних табл. 12 видно, що склади ліпосом з нейтральними та позитивно зарядженими мембранами мають показники інкапсуляції на рівні пасивного включення розчину оксаліплатину при формуванні ліпосом 9-10 %.

Однак, негативно заряджені ліпосоми мають інкапсуляцію на рівні 15,8 %, що свідчить про наявність додаткового механізму поряд із пасивною інкапсуляцією, ймовірно, сорбції, що підвищує інкапсуляцію оксаліплатину. Виходячи з отриманих даних подальші експерименти проводили із негативно зарядженими ліпосомами, використовуючи як модифікатор DPPG.

Після отримання перспективних результатів експерименту з модифікацією ліпідної мембрани DPPG було проведено вивчення залежності включення оксаліплатину в ліпосоми від вмісту в бішарі DPPG. Критерієм відбору стало отримання ліпосом в діапазоні 100-120 нм, із максимальним ступенем інкапсуляції, за відсутності частинок розміром вище 220 нм.

На основі попередньо проведеного експерименту екструзію проводили при постійному режимі роботи - 900 атм, 8 циклів. Розмір ліпосом в експерименті відображав жорсткість ліпідної мембрани, що є важливим аспектом при проведенні процесу ліофілізації ліпосомальних форм.

В експерименті підтримували постійне співвідношення фосфоліпідів (сумарну кількість EPC + DPPG) / Chol – 80/20 % для створення мембрани із достатньою жорсткістю. Вміст DPPG варіювали від 10 до 40 %. При цьому постійним залишався вміст Chol – 20 % (рис. 7).

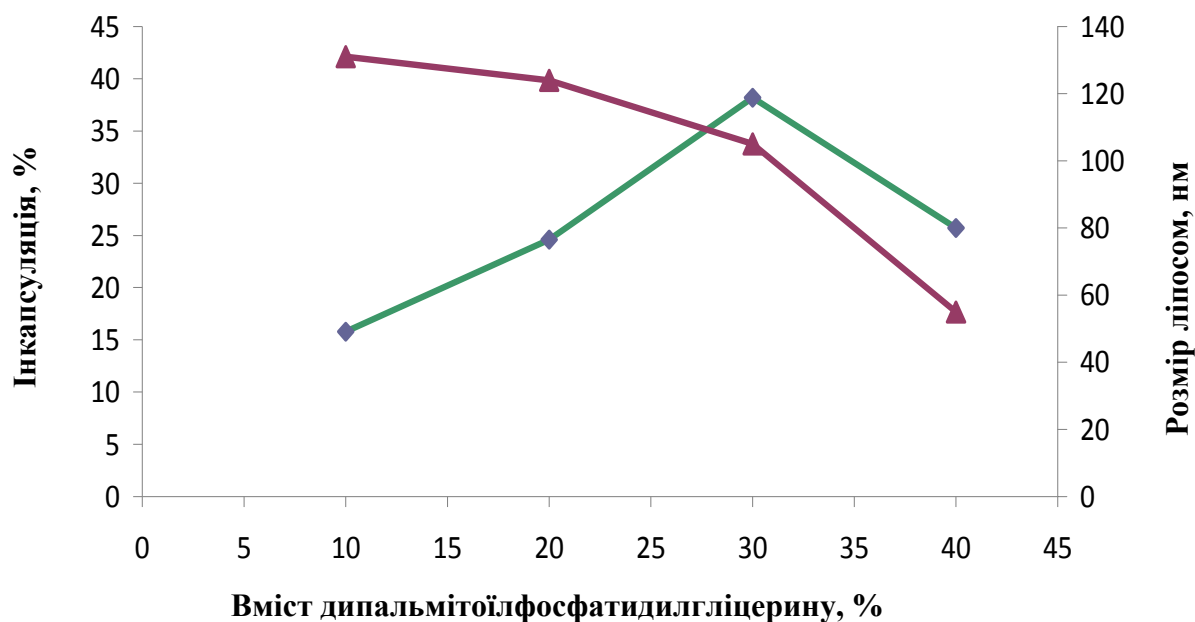


Рис. 7 Вплив вмісту дипальмітоїлфосфатидилгліцерину на інкапсуляцію оксаліплатину і на розмір ліпосом: ▲ – залежність розміру ліпосом від вмісту дипальмітоїлфосфатидилгліцерину; ◆ – залежність інкапсуляції від вмісту дипальмітоїлфосфатидилгліцерину

Із рис. 7 видно, що розмір ліпосом при збереженні режиму екструзії 900 атм. і 8 циклів зменшується, що свідчить про зниження жорсткості мембрани зі збільшенням вмісту DPPG. Разом з тим, максимум інкапсуляції (31,2 %) припадає на склад EPC / Chol / DPPG 50 / 20 / 30 % за масою. Далі при зростанні вмісту DPPG відбувається зниження ступеня інкапсуляції, що, можливо, пов'язано зі зміною розмірів, а отже, площі поверхні і внутрішніх об'ємів ліпосом. Так само було відзначено, що ліпосоми з цим складом мембрани були термодинамічно стабільні протягом як мінімум 4 годин після приготування.

Для подальшого експерименту було використано співвідношення ліпідів EPC / Chol / DPPG 50 / 20 / 30 %. З огляду на те, що цей склад дозволяє ефективно проводити екструзію без роботи приладу під високим тиском, було вирішено підвищити пасивну інкапсуляцію із застосуванням концентрованих розчинів ліпідних компонентів ліпосом.

Був проведений експеримент за початковим отриманням концентрованої ліпідної плівки з концентрацією 40 мг/мл з метою захоплення більшої кількості активної речовини (оксаліплатину), та більш концентрованого розчину оксаліплатину (4 мг/мл) для попередньої гідратації ліпідної плівки. За запропонованою схемою інкапсуляція складала 64 %.

Був проведений експеримент з оптимізації режиму роботи екструдера. Оскільки екструдер Microfluidizer M-110P дозволяє продуктивно працювати при тиску 1500 атм, була вивчена залежність розмірів ліпосом від кількості циклів і тиску екструзії при роботі з ліпідною емульсією EPC / Chol / DPPG в масовому співвідношенні 50/20/30 % і загальною концентрацією ліпідів 40 мг/мл. Критерієм відбору було досягнення середнього розміру ліпосом 100-120 нм при найменшій кількості циклів. Початковий розмір частинок в емульсії становив орієнтовно 3000 нм.

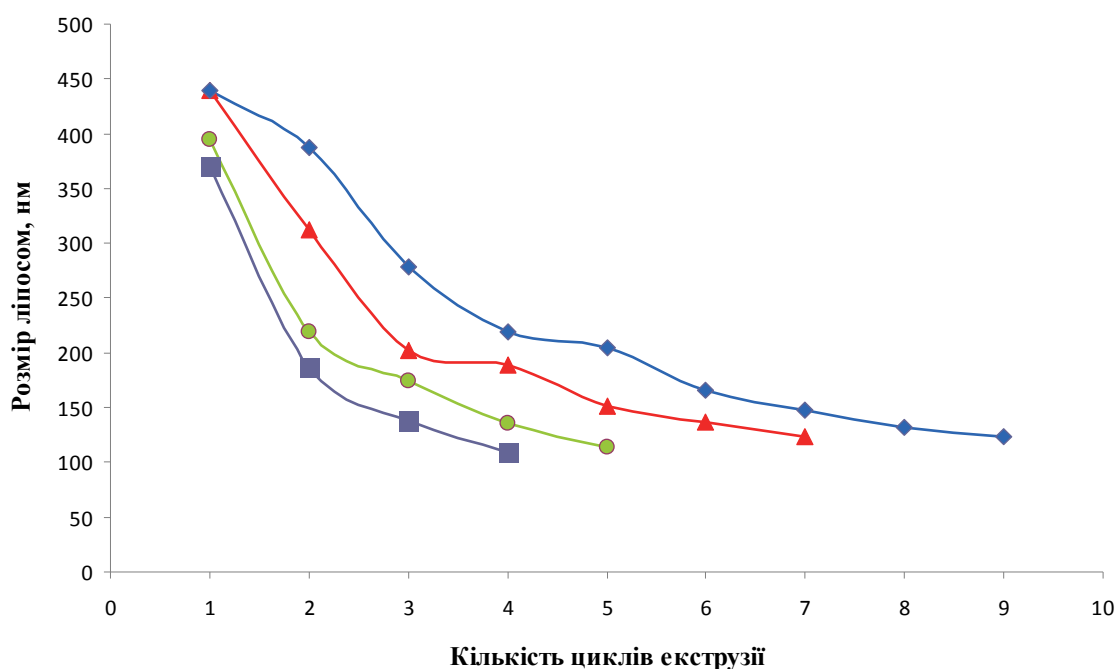


Рис. 8 Залежність розміру ліпосом від кількості циклів екструзії і тиску: ◆ – залежність при 900 атм., ▲ – залежність при 1100 атм., ● - залежність при 1300 атм., ■ – залежність при 1500 атм.



Для підтвердження ефективності інкапсуляції був проведений експеримент із застосуванням режиму екструзії 1500 атм. Використовували ліпіди EPC / Chol / DPPG у масовому співвідношенні 50 / 20 / 30 %. Плівку отримували розчиненням ліпідів у хлороформі. Потім розчин ліпідів упарювали на ротаційному випарнику при залишковому тиску 40 мбар при 30 °С. Розчин оксаліплатину в концентрації 4 мг/мл отримували при перемішуванні протягом 20 хв. Ліпідну плівку гідратували розчином при 100 об/хв протягом 1 години при кімнатній температурі, концентрація ліпідів - 40 мг/мл. Отриману грубу емульсію гомогенізували на екструдері Microfluidizer M-110P у режимі 1500 атм. Для досягнення розмірів 109 нм було потрібно 4 циклу екструзії. Отримана емульсія була стабільна, без ознак розшарування або випадіння осаду.

Далі розводили емульсію в 2 рази до досягнення загальної концентрації ліпідів 20 мг/мл і концентрації оксаліплатину 2 мг/мл. Потім проводили стерилізаційну фільтрацію крізь фільтри із поліефірсульфону з діаметром пор 0,22 мкм. Була відзначена висока швидкість фільтрації отриманої ліпосомальної емульсії. Середній розмір ліпосом після розведення склав 102 нм, інкапсуляція – 67 %. Із цього експерименту можна зробити висновок, що режим екструзії при тиску 1500 атм. не впливає на процес інкапсуляції і може використовуватися у технології отримання ЛЛФО.

Був проведений експеримент з видалення не включеного оксаліплатину методом ультрафільтрації. Визначена низька ефективність процесу ультрафільтрації при видаленні незв'язаного оксаліплатину. Це може бути пов'язано із застосуванням DPPG і його взаємодією з матеріалом мембран, що призводить до зменшення їх проникності для заряджених сполук, зокрема оксаліплатину. Дзета-потенціал отриманих ліпосом складав -58,25 mV.

Таке високе негативне значення заряду пов'язане з наявністю 30 % масових DPPG у ліпідному бішарі. Цим можна пояснити високу стійкість емульсії і можливість роботи з концентраціями ліпідів до 40 мг/мл включно, що неможливо у ліпосом, що складаються тільки з EPC та Chol.

Був проведений експеримент з вибору оптимального кріопротектору для збереження розмірів ліпосом і зберігання ефективності інкапсуляції. Порівнювали лактозу, сахарозу, трегалозу дигідрат і мальтозу як кріопротекторів в концентрації 6 % (мас.).

Із цією метою була отримана ліпідна плівка EPC / Chol / DPPG з масовим співвідношенням 50 / 20 / 30 %. Розчини кріопротекторів додавали до ліпосомальної емульсії, при цьому враховували доданий об'єм таким чином, що б концентрація оксаліплатину в кінцевому продукті (після розведення) для кожного експерименту становила 2 мг/мл, а загальна концентрація ліпідів 20 мг/мл. Було отримано стабільну емульсію, без ознак розшарування.

Після ліофілізації було визначено вміст води згідно з ДФУ, за методом К. Фішера. Отримано дані щодо наявності води (табл. 13). Далі зразки регідратували до загального об'єму 10 мл і вимірювали загальний вміст оксаліплатину, розмір ліпосом та ступінь інкапсуляції.

**Результати вивчення типу кріопротекторів для ліофілізації ліпосом, що містять оксалиплатин**

№	Тип кріопротектора	Загальна концентрація оксалиплатину, мг/мл	Середній розмір ліпосом, нм	Інкапсуляція, %	Вміст води, %
1	Лактоза	2,0	116,0 ± 2,2	42,0 ± 0,7	0,8 ± 0,01
2	Сахароза	2,0	110,0 ± 2,5	37,0 ± 0,9	0,7 ± 0,01
3	Трегалоза дигідрат	2,0	114,0 ± 2,6	46,0 ± 1,1	0,8 ± 0,01
4	Мальтоза	2,0	112,0 ± 2,3	35,0 ± 0,9	0,5 ± 0,01

Із табл. 13 видно, що інкапсуляція при застосуванні різних кріопротекторів знаходиться в одному діапазоні – 35-46 %. Таку низьку розбіжність даних можна пояснити втратою речовини інкапсульованої в ліпосоми, тоді, як сорбційний механізм діє при будь-якому кріопротекторі. Розмір ліпосом так само зберігається після ліофілізації, що пояснюється потужним негативним дзета-потенціалом ліпосом, модифікованих DPPG, їх високою термодинамічною стабільністю і високими гідратаційними властивостями. Також цей режим дозволяє практично повністю видаляти вологу зі зразків.

Оскільки найкращий результат за ступенем інкапсуляції, виходячи з попередньо отриманих даних, показали зразки з трегалозою дигідратом, був проведений експеримент з визначення оптимальної концентрації цього кріопротектора (рис.9).

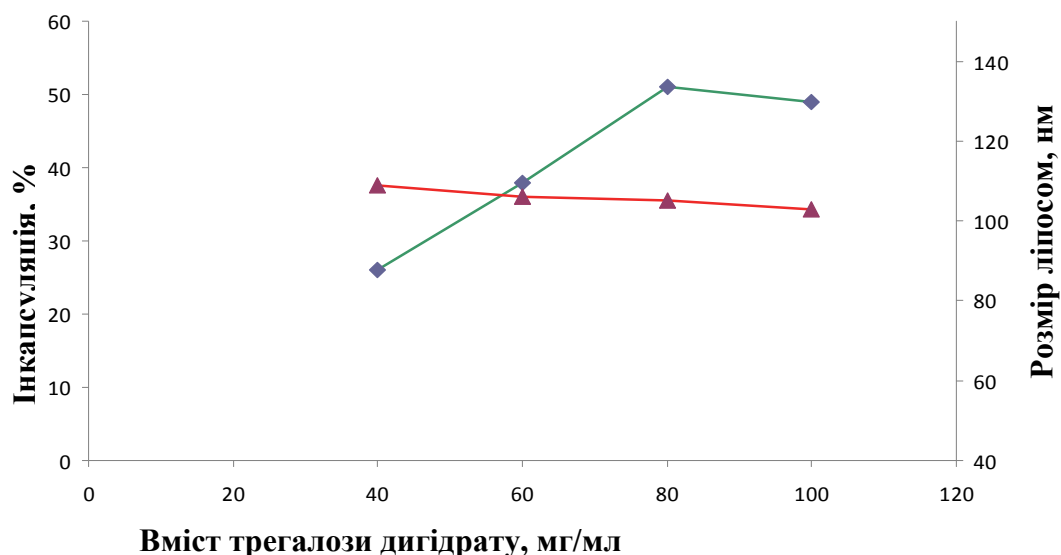


Рис. 9 Вплив вмісту трегалози дигідрату на ступінь інкапсуляції і розмір ліпосом: ▲ – залежність розміру ліпосом від вмісту трегалози дигідрату; ◆ – залежність інкапсуляції від вмісту трегалози дигідрату

Вивчали кріопротекторні властивості трегалози дигідрату в таких концентраціях: 40, 60, 80 і 100 мг/мл. Кріопротектор розчиняли в мінімальному об'ємі води для ін'єкцій, фільтрували крізь фільтри з поліефірсульфону з розміром

пор 0,22 мкм. Розчини кріопротектора додавали до ліпосомальної емульсії, при цьому враховували доданий об'єм таким чином, щоб концентрація оксаліплатину в кінцевому продукті для кожного експерименту становила 2 мг/мл, а загальна концентрація ліпідів 20 мг/мл. Після приготування препарату інкапсуляція в кінцевому продукті становила 64 %, розмір ліпосом – 103 нм. Таким чином, оптимальний вміст трегалози дигідрату складає 80 мг/мл, або 8 % (мас.).

Отже, теоретично та експериментально розроблено оптимальний склад ліпосомального препарату на 1 флакон ємністю 1020 мг «**Оксаліплатин ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій**»: оксаліплатин у перерахунку на безводну речовину – 20,0 мг, фосфатидилхолін із яєчного жовтка – 100,0 мг, дипальмітоїлфосфатидилгліцерин – 60,0 мг, холестерин – 40,0 мг, трегалоза дигідрат – 800,0 мг.

Далі був проведений експеримент з оптимізації процесу ліофілізації. Режим ліофілізації, прийнятний для лабораторних досліджень, займає понад 50 годин та не є технологічним при трансфері технології препарату в промислові умови. Виходячи з цього, було проведено експеримент зі скорочення часу ліофільного сушіння для ліпосом з оксаліплатином. Вимогами до режиму ліофільного сушіння є збереження розмірів ліпосом, максимальне збереження інкапсуляції оксаліплатину в ліпосомі, вміст залишкової води від 1 до 5 %.

За основу була взята програма ліофілізації, яка добре зарекомендувала себе при ліофілізації ЛЛФІ. Було збільшено час первинного висушування на 60 хв, для видалення залишкової води, оскільки вторинне висушування виникає при температурі 15 °С. Незважаючи на те, що час первинного висушування було збільшено на 60 хв, у порівнянні із аналогічним режимом для висушування ЛЛФІ, можна побачити, що температура продукту під час закінчення первинного висушування не наблизилася до температури полиць, що свідчить про вміст великої кількості остаточної вологи в продукті, і недостатності часу первинного сушіння (рис. 10).

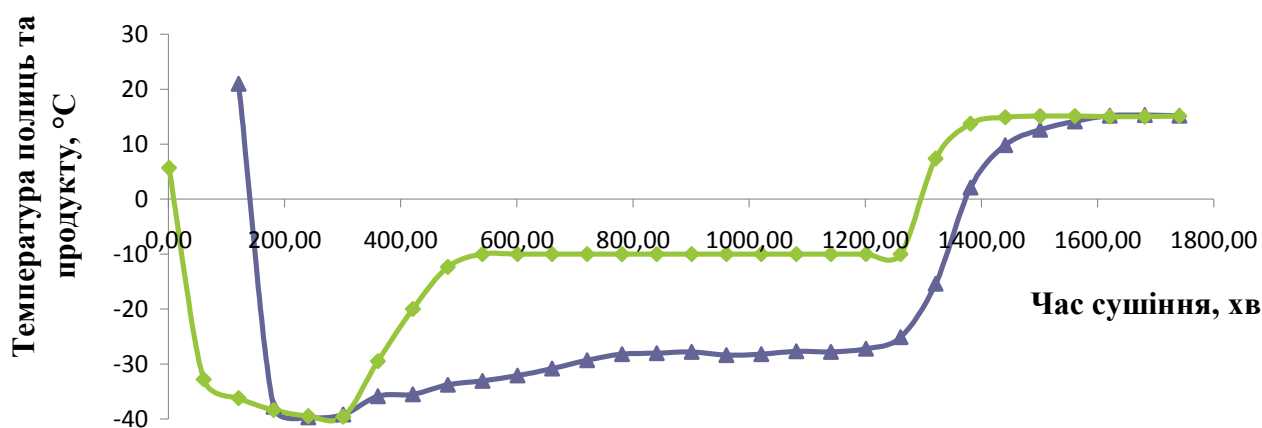


Рис. 10 Режим ліофільного сушіння ліпосом з оксаліплатином: ◆ – температура полиць ліофільного сушіння, ▲ – температура продукту під час процесу сушіння

Після вилучення продукту було виявлено, що ліофільна маса піниста, що свідчить про інтенсивний процес сублимації. Швидше за все, це сталося через недостатність часу первинного сушіння. Так само було виміряно вміст води в ліофільній таблетці. Залишкова вода склала 7,4 % масових, що є завищеним показником і неприйнятно для ліпосомальних препаратів. Підвищений вміст вологи, понад 5 % призводить до поступової усадки ліофілізованої маси і руйнування ліпосом у процесі зберігання. Таку відмінність у результатах порівнянно з ліпосомами з іринотекану гідрохлоридом можна пояснити наявністю сильного заряду на поверхні ліпосом із оксаліплатином, зважаючи на присутність у складі ліпідної мембрани DPPG.

При цьому заряджені ліпосоми з оксаліплатином краще сорбують воду порівнянно з нейтральними ліпосомами з іринотекану гідрохлоридом. З огляду на результати експерименту, програма ліофілізації була оптимізована. Час первинного сушіння було збільшено на 300 хвилин, в порівнянні з попереднім експериментом. Загальний час процесу склав 2041 хвилину, або 34 години, що також прийнятно з погляду промислової технології.

Було виміряно розмір ліпосом, вміст остаточної води і ступінь інкапсуляції. Середній розмір складав 112 нм, що є доказом збереження структури ліпосом. Ступінь інкапсуляції складала 57 %, при цьому з огляду на те, що вихідний показник був 65 %, можна відзначити, що втрата становить 8 %, це є високим показником ефективності процесу. Вміст вологи, за методом К. Фішера, становив 2,3 %, що так само відповідає вимогам і підтверджує коректність обраного режиму сушіння. У табл. 14 наведено підсумкові дані за тривалістю сушіння і залишкової вологи для вибору режиму ліофілізації.

Таблиця 14

#### Залежність залишкової вологи від режиму ліофілізації

№	Тривалість сушіння, год	Залишкова вода, %
1	52	Менше $0,8 \pm 0,01$
2	28	$7,4 \pm 0,01$
3	34	$2,3 \pm 0,01$

На підставі комплексу проведених досліджень розроблено технологічну схему отримання ЛЛФО (рис. 11), на базі якої складено та затверджено технологічний регламент на виробництво ЛП.

Фізико-хімічними дослідженнями було визначено показники якості препарату: опис, тотожність, середня маса вмісту одного флакона, колоїдна стабільність, розмір частинок, рН, сторонні домішки, залишкова вода, ступінь інкапсуляції, залишкові кількості органічних розчинників, бактеріальні ендотоксини, стерильність, кількісне визначення (оксаліплатин, фосфатидилхолін, дипальмітоїлфосфатидилгліцерин, холестерин), пакування, маркування, зберігання, термін придатності, які відповідали вимогам ДФУ.

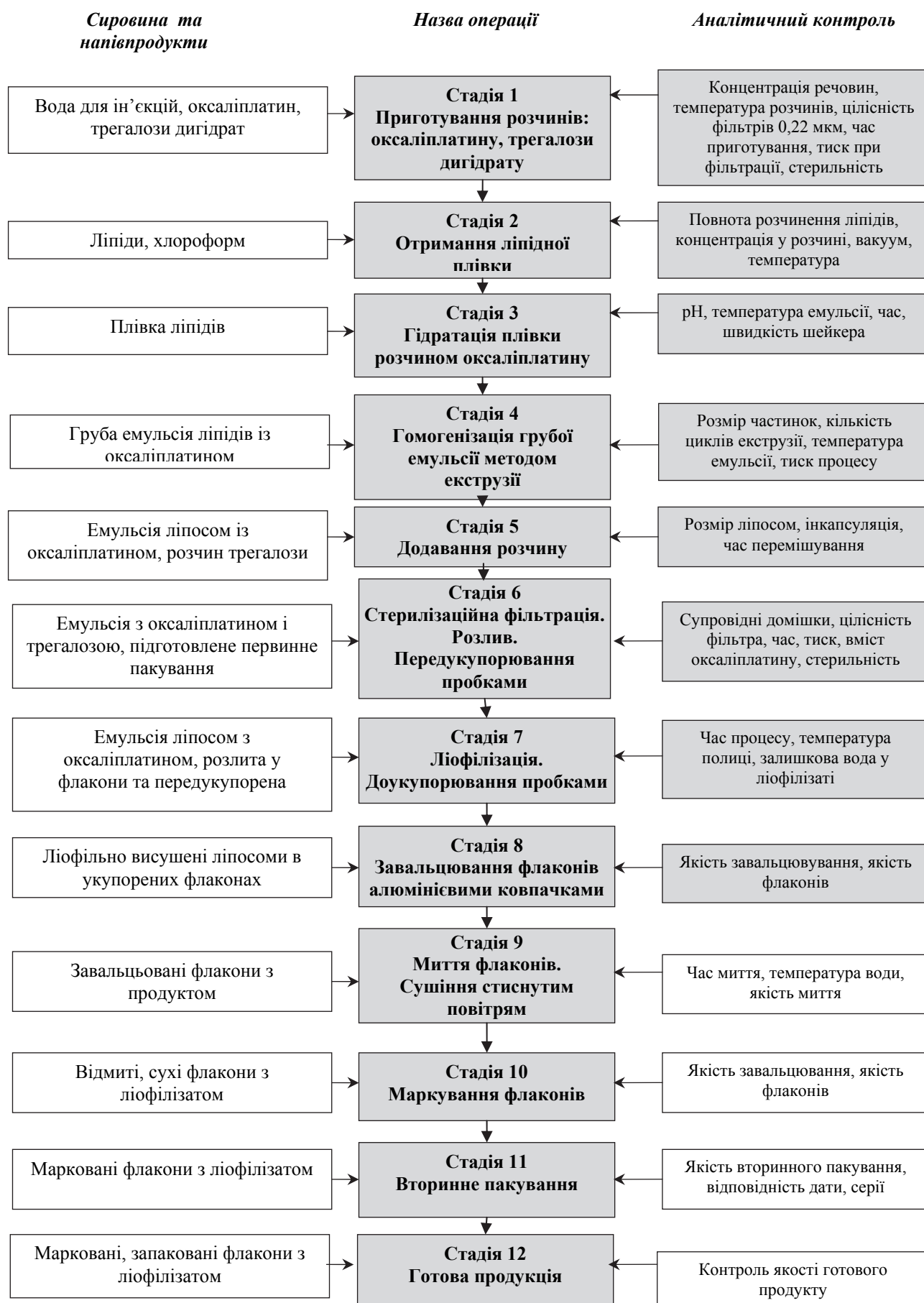


Рис. 11 Технологічна схема виробництва препарату «Оксаліплатин ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій»

За розробленим проектом МКЯ було досліджено стабільність ЛЛФО упродовж 15 місяців зберігання. Доведено, що препарат за всіма показниками якості стабільний у період спостереження, досліджені характеристики не виходили за межі МКЯ, що дало змогу установити термін придатності – 12 місяців.

У розділі 5 *«Масштабування виробництва та технологічні аспекти виготовлення ліпосомальних препаратів іринотекану гідрохлориду і оксаліплатину на одній технологічній лінії»* розглянуто аспекти масштабування технології запропонованих ЛП та методи видалення залишків попередніх продуктів при виробництві препаратів на одній ділянці. Розроблено критерії прийнятності для валідації очищення обладнання.

Проаналізовано та структуровано досвід із масштабування процесу виробництва ліпосомального препарату іринотекану гідрохлориду з об'ємів 100-200, до 1000 та до 5000 мл. Визначено критичні одиниці обладнання та стадії, які мають бути досліджені, до них належать стадії екструзії та ультрафільтрації для методу хімічного градієнта.

Для проведення стадії екструзії, з розміром серій понад 200 мл визначена необхідність використання потужного гомогенізаційного обладнання, такого, як Microfluidics Microfluidiser M-110. Також показана необхідність рідинного примусового охолодження екструдера та емульсії упродовж технологічних циклів.

Для стадії ультрафільтрації показано, що 1000 мл є максимальним об'ємом, який можна приготувати на лабораторному обладнанні. Починаючи з об'єму 1000 мл доцільно застосовувати промислові ультрафільтраційні системи та перистальтичні насоси високої продуктивності.

При виробництві препаратів варто використовувати метод кампанії для послідовного напрацювання декількох серій препарату з мінімальним очищенням між серіями. Оскільки іринотекану гідрохлорид та оксаліплатин водорозчинні, доцільно використовувати воду, із контролем залишків АФІ.

При переході між серіями препаратів доцільно використовувати розчин луку, оскільки він остаточно руйнує АФІ, як у ліпосомальному препараті іринотекану гідрохлориду, так і у ліпосомальному препараті оксаліплатину.

У розділі 6 *«Дослідження критичних параметрів технології виробництва ліпосомальних препаратів іринотекану гідрохлориду та оксаліплатину»* проведено оцінку внутрішнього об'єму ліпосом, досліджено кінетику інкапсуляції оксаліплатину в ЛЛФІ, визначено індекси окисненості ліпосом, вплив матеріалу фільтроелементів на втрати АФІ.

Із метою оцінки кількості кислоти лимонної, що залишається у ліпосомальній емульсії, та для визначення внутрішнього об'єму ліпосом було проведено експеримент з визначення кількості кислоти лимонної моногідрату, яка залишається у препараті після проведення ультрафільтрації, а також з поліпшення параметрів технологічного процесу при масштабуванні отримання ліпосом з іринотекану гідрохлоридом від 200 до 1000 мл.

Була використана методика визначення концентрації кислоти лимонної моногідрату у фільтраті методом ВЕРХ. Кислота лимонна виходить на 5,2 хв (рис. 12). Розроблену методику можна віднести до експрес-методів, оскільки повний цикл одного аналізу відбувається за 8 хв.

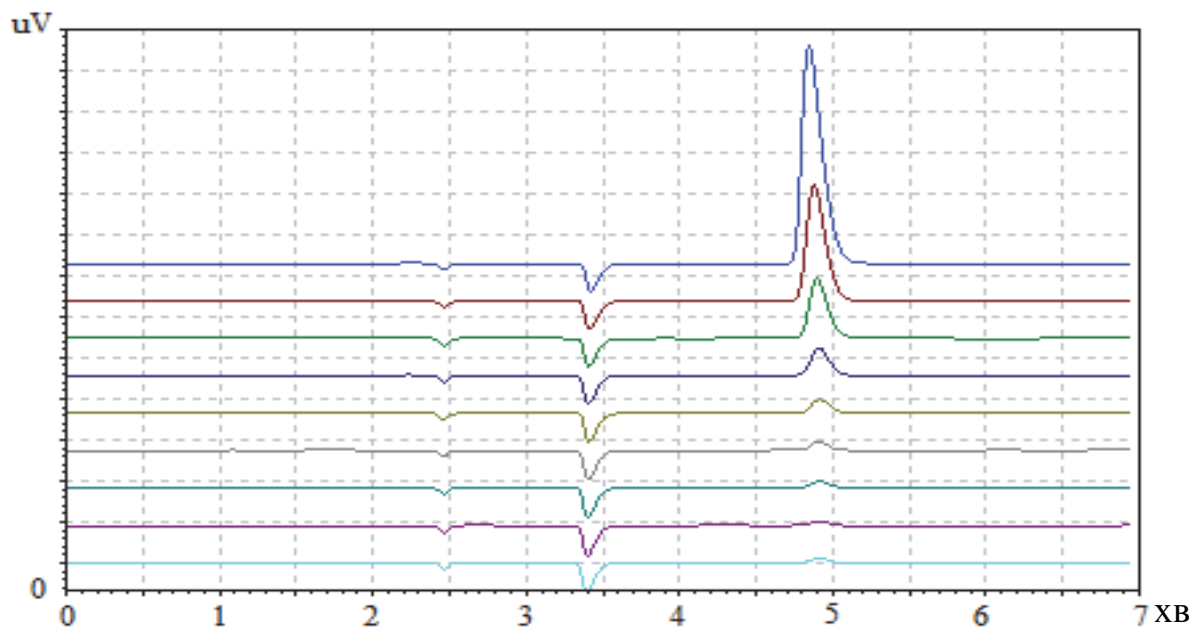


Рис. 12 Хроматограма аналізу фільтрату після обробки ліпосомальної емульсії методом ультрафільтрації

Оскільки була відома початкова кількість кислоти лимонної моногідрату в емульсії і кількість у відфільтрованому розчині, було враховано, що в емульсії при апробації у чотирьох експериментах залишається  $10,45 \pm 0,64$  % кислоти лимонної моногідрату від початкової кількості, що дорівнює об'єму ліпосом у препараті.

За отриманими даними можна зробити ще один важливий висновок: при концентрації іринотекану гідрохлориду в ліпосомальній емульсії 2 мг/мл, до стадії ліофілізації та інкапсуляції на рівні до 95-98 % концентрація іринотекану гідрохлориду у ліпосомах складає 19–20 мг/мл, що наближається до його концентрації у звичайних препаратах-концентратах для приготування розчинів для інфузій.

На початку робіт із масштабування технології від 100 до 1000 мл було локалізовано проблему раптового зниження інкапсуляції при переході на збільшені об'єми (1000 мл) з метою напрацювання препарату для доклінічних випробувань. Було з'ясовано, що є проблема, пов'язана з тривалістю ультрафільтрації і супутнім нагріванням розчину в трубопроводах і на дні головної ємності ультрафільтраційного устаткування вище  $35^{\circ}\text{C}$  упродовж декількох годин через нагрів її двигуна при роботі.

Для попередження цього ефекту було вирішено примусово охолоджувати систему. Це вирішило проблему втрати ліпідів під час ультрафільтрації та дозволило отримувати відтворені і прогнозовані значення ступеня інкапсуляції при роботі з об'ємами продукту 1000 мл. Одночасно в ході експерименту було проведено дослідження кінетики інкапсуляції іринотекану гідрохлориду в ліпосоми на двох розмірах серії ліпосомальної емульсії – 200 та 1000 мл (рис. 13).

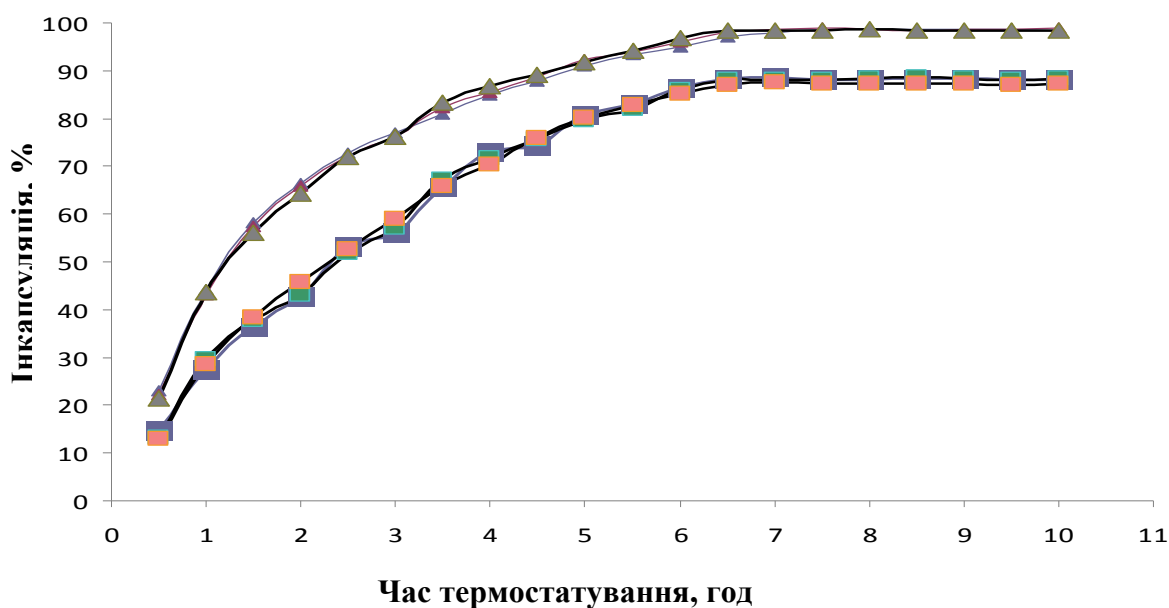


Рис. 13 Кінетичні залежності інкапсуляції іринотекану гідрохлориду в ліпосомі: верхні залежності ▲ – розмір серії 200 мл; нижні залежності ■ – розмір серії 1000 мл

Із рис. 13 видно, що кінетика інкапсуляції має подібну динаміку для обох розмірів серії. Однак, між серіями з різними об'ємами є різниця на початковому етапі інкапсуляції, а також у максимальному рівні інкапсуляції. У серіях з об'ємом 1000 мл, інкапсуляція проходить повільніше, і досягає лише значення 87–88 % у порівнянні з кінетичними залежностями для серій об'ємом 200 мл. Можна припустити, що на якість інкапсуляції впливає загальний час процесу ультрафільтрації і температура емульсії.

Для зменшення часу стадії ультрафільтрації на установці Minim II фірми Pall, установка була дооснащена двома додатковими ультрафільтраційними касетами із верхньою межею відсікання 30 kDa. При цьому площа ультрафільтрації збільшилася у три рази – з 50 до 150 см<sup>2</sup>. Після дооснащення час проведення стадії ультрафільтрації серії 1000 мл наблизився до часу ультрафільтрації серії 200 мл, а кінетичні залежності стали співпадати.

При дослідженні індексу окисненості ( $I_o$ ) ліпосом було виявлено неможливість прямого виміру на зразках готових препаратів. Це пов'язано з заважаючою дією АФІ іринотекану гідрохлориду та оксаліплатину. У зв'язку з цим було досліджено індекси окисненості на модельних зразках препаратів без додавання АФІ, але з повним моделюванням технологічного процесу. Було доведено, що чинники технологічного процесу не спричиняють окиснення ліпідів як складової частини структури препаратів. Значення  $I_o$  становило 0,372 для ЛЛФІ та 0,323 для ЛЛФО при нормі не більше 0,6.

На характеристики технологічного процесу на стадії стерилізаційної фільтрації було досліджено вплив матеріалу фільтроелементів - N66 (найлон 66), PES (полієфірсульфат), PVDV (полівініліденфторид). У табл. 15 наведено результати визначення сорбції АФІ на досліджуваних типах фільтрів, з якої видно, що найкращим матеріалом для фільтрації розчинів з погляду втрати АФІ при



сорбції є матеріал PES. Він використовувався в експериментальних дослідженнях із розробки ЛЛФІ та ЛЛФО і запропонований для промислового виробництва.

Таблиця 15

### Сорбція іринотекану гідрохлориду та оксаліплатину на фільтрах

№	Марка фільтра	Втрата АФІ при фільтрації, мг/мл
<b>Іринотекану гідрохлорид</b>		
1	N66, Ultipore	0,09 ± 0,001
2	PES, Suppor	0,02 ± 0,001
3	PVDV, Fluorodyne	0,05 ± 0,001
<b>Оксаліалатин</b>		
4	N66, Ultipore	0,11 ± 0,001
5	PES, Suppor	0,04 ± 0,001
6	PVDF, Fluorodyne	0,08 ± 0,001

Примітка:  $n = 3$ ,  $p < 0,05$

У розділі 7 «Вивчення фармакологічних властивостей препаратів «Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» та «Оксаліплатин ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» наведено узагальнені дані фармакологічних характеристик запропонованих ліпосомальних препаратів, що були отримані в умовах доклінічного експерименту.

Доклінічне вивчення було проведено на базі ЗАТ «Санкт-Петербурзький Інститут Фармації» у необхідному обсязі: протипухлинна активність *in vitro* на цільових видах перещеплюваних клітин; загальна токсичність, специфічні види токсичності – тест ДНК-комет, тест Еймса на мутагенність, імунотоксичні властивості.

Вивчення протипухлинної активності показало, що субстанція препарату іринотекану гідрохлориду та ЛЛФІ чинили виражену терапевтичну дію на моделі карциноми товстої кишки у мишей лінії BALB/c. Доведено, що у дозі 116 мг/кг вони збільшували середню тривалість життя тварин на 25,1 % (субстанція) та на 26,7 % (ліпосомальна форма препарату).

Препарат «Оксаліплатин ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» показав більш високі значення ЛД<sub>50</sub> у порівнянні з неліпосомальною формою оксаліплатину.

Вперше за допомогою доклінічних *in vitro* та *in vivo* випробувань показано, що у порівнянні із неліпосомальними розчинами для ін'єкцій іринотекану й оксаліплатину, їх ліпосомальні форми мають менші показники токсичності при однаковій протипухлинній активності.

Позитивні результати доклінічного вивчення дозволили отримати дозвіл на клінічні випробування розроблених препаратів і розпочати їх проведення. Для препарату «Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» успішно завершено I фазу клінічних досліджень у пацієнтів із пухлинами шлунково-кишкового тракту.

## ВИСНОВКИ

Дисертація є науковою роботою, в якій вперше теоретично й експериментально вирішено питання фармацевтичної розробки складу і технології двох протипухлинних лікарських засобів: «Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» та «Оксаліплатин ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» для лікування онкологічних захворювань.

1. Проаналізовано та узагальнено дані інформаційних джерел щодо сучасного стану хіміотерапевтичних агентів; доведено перспективу створення ліпосомальних форм іринотекану гідрохлориду та оксаліплатину як сучасних препаратів, які не виробляються в Україні. Визначено сучасні технології створення ліпосомальних препаратів протипухлинної дії у вигляді ліофілізатів.

2. Науково обґрунтовано та визначено методологію створення двох ліпосомальних лікарських форм іринотекану гідрохлориду й оксаліплатину на підставі теоретичних та сучасних фізико-хімічних (високоєфективна рідинна хроматографія, газова хроматографія, метод динамічного розсіювання світла) та фармакотехнологічних (екструзія високого тиску, ультрафільтрація, ліофільне сушіння) досліджень. Окреслено коло завдань та поступових кроків їх виконання.

3. Вивчено хімічну стабільність іринотекану гідрохлориду й оксаліплатину в різних буферних системах. Показано стабільність іринотекану гідрохлориду в буферних розчинах у діапазоні рН 1,9–5,0, оксаліплатину у водному розчині.

4. Науково обґрунтовано та вперше розроблено склад ЛЛФІ. Експериментально доведено, що склад ліпідів ЕРС / Chol 80 / 20 % (мас.) у концентрації 20 мг / мл, із 0,2 М кислотою лимонною моногідратом як внутрішнього буферного розчину, 0,01 М фосфатним буферним розчином з рН 5,0 як зовнішнього, 8 % (мас.) трегалози дигідрату забезпечують оптимальні показники інкапсуляції, розмір частинок та агрегатну стабільність (новизну досліджень підтверджено Євразійським патентом № 023079 В1 «Способ получения липосомальной формы иринотекана (варианты)» від 29.04.2016 р.).

5. Розроблено технологію отримання ліпосомальної лікарської форми іринотекану гідрохлориду. Експериментально підтверджено, що оптимальним є застосування методу «градієнта рН», що включає: гомогенізацію високого тиску при 1500 атм, ультрафільтрацію крізь мембрани з межею відсікання 30 кДа, ліофільне сушіння протягом 28 годин із вторинним сушінням при 15 °С.

6. Науково обґрунтовано та розроблено склад ліпосомальної лікарської форми оксаліплатину. Експериментально доведено, що склад ліпідів ЕРС / Chol / DPPG 50 / 20 / 30 % (мас.) у концентрації 20 мг/мл, 8 % (мас.) трегалози дигідрату забезпечує найкращі показники інкапсуляції, розмір частинок та агрегатну стабільність (новизну досліджень підтверджено патентом України на корисну модель «Спосіб отримання ліпосомального лікарського засобу з оксаліплатином» від 11.08.2016 р.).

7. Розроблено технологію отримання ліпосомальної лікарської форми оксаліплатину. Експериментально підтверджено, що оптимальною є технологія «пасивного захоплення» у поєднанні з методом «іонної сорбції», що включає отримання ліпідної плівки з одночасним внесенням оксаліплатину, гомогенізацію високого тиску при 1500 атм, ліофільне сушіння протягом 34 годин із вторинним сушінням при 15 °С.

8. Розроблено та валідовано методики ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин у лікарських препаратах. Складено проекти МКЯ, на підставі яких визначено умови і термін зберігання запропонованих препаратів. Розроблено технологічну документацію, технологію стандартизовано, апробовано в промислових умовах та виготовлено зразки для проведення доклінічних і клінічних випробувань.

9. Виготовлено зразки розроблених препаратів та проведено їх доклінічні дослідження з позитивними результатами. Отримано дозвіл МЗ РФ (Рада з етики пр. № 76 від 21.01.2014 р.) на клінічні випробування «Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» і «Оксаліплатин ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» (внутрішній номер ЄК-45939 та ЄК-45940 відповідно). Для препарату іринотекану гідрохлориду успішно проведено I фазу клінічних досліджень.

10. Проведено масштабування і трансфер технології в умовах ТОВ «Наномедтех» (м. Київ). Доведено збереження показників якості готових препаратів у відповідності з МКЯ при різних масштабах виробництва на одній технологічній лінії. Визначено критерії прийнятності для валідації очищення обладнання. Розроблено і затверджено технологічні регламенти, препарати внесено до перспективного плану виробництва на 2018-2020 рр. (акт апробації від. 28.09.2018 р., лист вх. № 1248 від 24.10.2018 р.).

11. Результати дисертаційних досліджень впроваджено у навчальний процес низки закладів вищої освіти фармацевтичного (медичного) профілю.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Статті у фахових виданнях*

1. Technologies and perspectives of liposomal drug application in clinical practice / Yu. M. Krasnopolskii, A. S. Grigor'eva, A. G. Katsai, N. F. Konakhovich, V. V. Prokhorov, A. V. Stadnichenko, V. Yu. Balaban'yan, A. I. Lyutik, V. I. Shvets. *Nanotechnologies in Russia*. 2017. Vol. 12, № 7–8. С. 449–458. (Особистий внесок: вивчення особливостей використання ліпосомальних ліків в медичній практиці, оформлення статті). (Scopus)

2. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Ярных Т. Г. Оптимизация параметров дзета-потенциала при создании липосом с иринотеканом. *Фармация Казахстана*. 2017. № 6. С. 7–10. (Особистий внесок: планування експерименту, обробка отриманих результатів).

3. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Ярных Т. Г. Исследование окисленности фосфолипидов при получении липосом с цитостатиками. *Вестник фармации*. 2017. № 3(77). С. 29–33. (Особистий внесок: планування експерименту, обробка отриманих результатів, оформлення статті).

4. Stadnichenko A. V., Krasnopolsky Y. M., Yarnykh T. G. Standardization of extrusion parameters during liposomal oxaliplatin creation. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2017. Vol. 10, Is. 3. P. 785–788. (Особистий внесок: проведення експерименту, узагальнення результатів дослідження, оформлення статті). (Scopus)

5. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Ярных Т. Г. Изучение факторов, влияющих на стабильность липосом с цитостатиками при регидратации. *Рецепт*. 2017. Т. 20, № 2. С. 146–152. (Особистий внесок: планування експерименту, обробка отриманих результатів, оформлення статті).

6. Исследование методов включения лекарственных субстанций / А. Е. Шахмаев, А. Л. Кацай, В. В. Прохоров, А. В. Стадниченко, В. Ю. Балабаньян, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец. *Ремедиум*. 2015. № 12. С. 56–59. (Особистий внесок: планування та проведення експерименту, обробка отриманих результатів, оформлення статті).

7. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Швец В. И. Разработка и валидация методики определения степени инкапсуляции иринотекана гидрохлорида в липосомы (краткое сообщение). *Биофармацевтический журнал*. 2015. Т. 7, № 1. С. 53–55. (Особистий внесок: приготування зразків препаратів, обробка отриманих результатів, оформлення статті). (Scopus)

8. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Швец В. И. Некоторые аспекты получения липосомальной формы оксалиплатина. *Тонкие химические технологии*. 2015. Т. 10, № 1. С. 60–65. (Особистий внесок: участь у дослідженні, обробка отриманих результатів, підготовка статті).

9. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Швец В. И. Технология получения липосомальных форм иринотекана (обзор). *Биофармацевтический журнал*. 2014. Т. 6, № 6. С. 3–9. (Особистий внесок: аналіз літературних даних, оформлення статті).

10. Стадніченко О. В., Краснопольський Ю. М., Ярних Т. Г. Особливості трансферу технології і масштабування при промисловому освоєнні виробництва ліпосомальних цитостатиків. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2018. № 2(54). С. 23–28. (Особистий внесок: вивчення особливостей трансферу технології і масштабування, обробка отриманих результатів, підготовка статті).

11. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Ярных Т. Г. Валидация методики определения степени инкапсуляции оксалиплатина в липосомы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Ліки України плюс*. 2018. № 1(34). С. 16–19. (Особистий внесок: проведення експерименту, обробка отриманих результатів, оформлення статті).

12. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Ярных Т. Г. Разработка опытно-промышленной технологии получения липосом с иринотеканом. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2018. № 2. С. 179–184. (Особистий внесок: проведення експерименту, узагальнення результатів досліджень, оформлення статті).

13. Стадніченко О. В., Краснопольський Ю. М., Ярних Т. Г. Технологічні параметри виробництва ліпосом з оксалиплатином. *Фармацевтичний часопис*. 2018. № 1(45). С. 57–62. (Особистий внесок: планування та проведення експерименту, узагальнення результатів досліджень, підготовка статті).

14. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Ярных Т. Г. Валидация методики количественного определения иринотекана гидрохлорида в липосомальной форме методом ВЭЖХ. *Фармаком*. 2018. № 1. С. 71–77. (Особистий

внесок: планування досліджень, проведення експерименту, аналіз та узагальнення результатів, оформлення статті).

15. Stadnichenko O. V., Krasnopolsky Yu. M., Yarnykh T. G. Experiment planning at the pharmaceutical development of liposomal cytostatics. *Український біофармацевтичний журнал*. 2017. № 6(53). P. 24–28. (Особистий внесок: вивчення методологічних аспектів створення ліпосомальних цитостатиків).

16. Stadnichenko A., Krasnopolsky Y., Yarnykh T. Study of the composition of cryoprotector and technological regime in liophilization of liposomes with oxaliplatinum. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2017. № 6(10) P. 21–25. (Особистий внесок: приготування зразків, проведення експерименту, узагальнення результатів досліджень, оформлення статті).

17. Stadnichenko O. V., Krasnopolsky Yu. M., Yarnykh T. G. The study of liophilization parameters in the liposomal irinotecan development. *Вісник фармації*. 2017. № 4(92). P. 45–49. (Особистий внесок: проведення експерименту, узагальнення результатів досліджень, оформлення статті).

18. Стадніченко О. В., Краснопольський Ю. М., Ярних Т. Г. Вплив концентрації ліпідів на ступінь інкапсуляції та розмір часток при розробці ліпосомальної форми іринотекану. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2017. Т. 10, № 1(23). С. 37–41. (Особистий внесок: приготування зразків, проведення експерименту, узагальнення результатів досліджень, оформлення статті).

19. Стадніченко О. В., Краснопольський Ю. М., Ярних Т. Г. Дослідження складу ліпідної мембрани при створенні ліпосом із іринотеканом. *Фармацевтичний часопис*. 2017. № 1. С. 22–27. (Особистий внесок: приготування зразків, проведення експерименту, узагальнення результатів досліджень, оформлення статті).

20. Определение внутреннего объёма липосом с иринотеканом / А. В. Стадніченко, Ю. М. Краснопольський, В. И. Швець, Т. Г. Ярних. *Український біофармацевтичний журнал*. 2016. № 5(46). С. 64–68. (Особистий внесок: планування та проведення експерименту, узагальнення результатів досліджень, оформлення статті).

21. Stadnichenko O. V., Krasnopolsky Yu. M., Yarnykh T. G. The study of the lipid membrane charge effect when creating liposomes with oxaliplatin. *Вісник фармації*. 2016. № 4(88). С. 34–37. (Особистий внесок: планування та проведення експерименту, узагальнення результатів досліджень, оформлення статті).

22. Исследование стабильности иринотекана при использовании различных методов активной загрузки липосом / А. В. Стадніченко, Ю. М. Краснопольський, В. И. Швець, Т. Г. Ярних. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2016. № 2(2). С. 30–35. (Особистий внесок: планування та проведення експерименту, узагальнення результатів досліджень, оформлення статті).

23. Стадніченко О. В., Краснопольський Ю. М., Ярних Т. Г. Вивчення оптимальних параметрів екструзії у разі створення ліпосом із іринотеканом. *Фармацевтичний журнал*. 2016. № 2. С. 77–82. (Особистий внесок: приготування зразків, проведення експерименту, узагальнення результатів досліджень, оформлення статті).

24. Реальная нанофармакология: 25 лет разработки и применения липосомальных лекарственных препаратов в Украине / А. С. Григорьева, А. Г. Кацай, Н. Ф. Конахович, В. В. Прохоров, А. В. Стадниченко, В. И. Швец, Ю. М. Краснопольский. *Фармаком*. 2016. № 1. С. 41–46. (*Особистий внесок: аналіз літературних даних, оформлення статті*).

#### **Патенти**

25. Спосіб отримання ліпосомального лікарського засобу з оксаліплатином: пат. 113456 України. Стадніченко О. В., Краснопольський Ю. М., Ярних Т. Г. № 2016 08223; заявл. 25.07.2016; опубл. 25.01.2017, Бюл. № 20. 4 с. (*Особистий внесок: планування патентного пошуку, розробка технології, участь у підготовці патенту*).

26. Способ получения липосомальной формы иринотекана (варианты): пат. 023079 Евразийский патент. Шоболов Д. Л. (RU), Краснопольский Ю. М. (UA), Ульянов А. М., Натыкан А. А., Тарасов В. В., Балабаньян В. Ю., Швец В. И. (RU), Стадниченко А. В. 2012 000272; заявл. 24.12.2012; опубл. 29.04.2016, Бюл. № 4. 8 с. (*Особистий внесок: планування патентного пошуку, розробка технології, участь у підготовці патенту*).

#### **Монографія та методичні рекомендації**

27. Липосомальные противоопухолевые препараты : моногр. / авт. кол. : А.В. Стадниченко, А.С. Дудниченко, Ю.М. Краснопольский. Харьков: Типография Мадрид, 2018. 256 с. (*Особистий внесок: узагальнення даних та участь у написання монографії*).

28. Методологія трансферу та масштабування технології промислового виробництва ліпосомальних цитостатиків : метод. рек. / О. В. Стадніченко, Ю. М. Краснопольський, Т. Г. Ярних. Х.: НФаУ, 2018. 38 с. (*Особистий внесок: планування змісту та написання методичних рекомендацій*).

29. Методологія розробки технології ліпосомальних цитостатиків: метод. рек. / О. В. Стадніченко, Ю. М. Краснопольський, Т. Г. Ярних. Х.: НФаУ, 2018. 38 с. (*Особистий внесок: планування змісту та написання методичних рекомендацій*).

#### **Тези доповідей**

30. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Ярних Т. Г. Подходы к планированию эксперимента при разработке липосомальных цитостатиков. *Dynatika naukowych badan – 2018*. Materiały XIV międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji, Przemysl, 07 – 15 lipca 2018 r. Przemysl, 2018. P. 37–39.

31. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Ярних Т. Г. Особенности доклинических исследований липосомальной формы иринотекана. *Найновите научни постижения – 2018*: материалы за XIV Международна научна практична конференция, София, 15–22 марта 2018 г. София, 2018. С. 35–37.

32. Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Ярних Т. Г. Внутрипроизводственный контроль в производстве липосомальных форм цитостатиков. *Věda a technologie: krok do budoucnosti – 2018*: materiály XIV Mezinárodní vědecko-praktická conference, 22 – 28 února 2018. Praha, 2018. P. 83–85.

33. Стадниченко А. В., Ярних Т. Г., Краснополяский Ю. М. “In process control” при создании липосомальных препаратов платины. *Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини: зб. тез наук. робіт міжнар. наук.-практ. конф., Одеса, 15-16 груд. 2017 р. Одеса, 2017. С. 25–26.*

34. Стадниченко А. В., Краснополяский Ю. М., Ярних Т. Г. Перспективы создания липосомального препарата оксалиплатина. *Актуальные проблемы современной науки: сб. тезисов науч. трудов XXV Междунар. науч.-практ. конф., Москва – Астана – Харьков – Вена, 28 дек. 2017 г. Международный научный центр, 2017. С.36–38.*

35. Стадниченко А. В., Краснополяский Ю. М., Ярних Т. Г. Аспекты лиофильной сушки липосомальных форм цитостатиков. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії: Матеріали III Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., Харків, 14-15 листоп. 2017 р. Харків: НФаУ, 2017. С. 245–246.*

36. Стадніченко О. В., Краснополяський Ю. М., Ярних Т. Г. Фармакокінетичні властивості ліпосомальної форми оксалиплатину. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини. Підсумкова LX наук.–практ. конференція, Тернопіль, 14 черв. 2017 р. Тернопіль: ТДМУ, 2017. С. 354 – 355.*

37. Стадніченко О. В., Краснополяський Ю. М., Ярних Т. Г. Технологічні аспекти створення ліпосомальної форми іринотекану. *Сучасні підходи до вищої медичної освіти в Україні: матеріали XIV Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 60-річчю ТДМУ, Тернопіль, 18–19 травня 2017 р: у 2 т. Т.2. Тернопіль: ТДМУ, 2017. С. 318.*

38. Стадніченко О. В., Краснополяський Ю. М., Ярних Т. Г. Створення ліпосомальних препаратів на основі напівсинтетичних природних речовин та на основі сполук платини. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи: матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, Харків, 13-16 верес. 2016 р.: у 2 т. Т.1. Харків: НФаУ, 2016. С. 282.*

39. Стадніченко О. В., Краснополяський Ю. М. Стандартизація складу та забезпечення якості при розробці ліпосомальної форми іринотекану. *X Науково-практична конференція з міжнародною участю «Управління якістю в фармації», Харків, 20 трав. 2016 р. НФаУ, 2016. С. 151.*

40. Изучение влияния состава и заряда липосомальных наночастиц на их физико–химические и биологические свойства / А. Л. Кацай, В. В. Прохоров, А. В. Стадниченко, А. Е. Шахмаев, Ю. М. Краснополяский, В. И. Швец. *Химия, био– и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности: Сб. материалов II-й Междунар. науч.–практ. конф., Харьков, 8–10 декабря 2014 г. Харьков: ХПИ, 2014. С. 208–211.*

#### **Статті у збірниках**

41. Стадниченко А. В., Краснополяский Ю. М., Ярних Т. Г. Перспективы разработки наноразмерной формы иринотекана. *Science and life: proceedings of articles of the international scientific conference, Czech Republic, Karlovy Vary – Ukraine, Kyiv, 22 December 2017. Czech Republic, Karlovy Vary: Skleněný Můstek,*

2017. Р. 558–561. (*Особистий внесок: визначення перспективних напрямків, аналіз літературних даних, написання та оформлення статті*).

42. Стадніченко О. В., Краснопольський Ю. М., Ярних Т. Г. Особливості механізму інкапсуляції при створенні ліпосомальних форм хіміотерапевтичних препаратів. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології*: зб. наук. пр., Харків, 2017. С. 180–182. (*Особистий внесок: аналіз особливостей механізмів інкапсуляції, оформлення статті*).

## АНОТАЦІЯ

**Стадніченко О. В. Наукове обґрунтування та розробка ліпосомальних протипухлинних лікарських засобів на основі іринотекану і оксалиплатину. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація. Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2019.

Дисертацію присвячено науковому та експериментальному обґрунтуванню складу і технології виробництва двох ліофілізованих ліпосомальних форм іринотекану гідрохлориду та оксалиплатину, призначених для лікування онкологічних захворювань. Запропоновано науково–практично обґрунтовану модель проведення фармацевтичної розробки ЛЛФІ та ЛЛФО.

Запропоновано загальну методологію визначення ступеня інкапсуляції для водорозчинних АФІ ЛЛФІ та ЛЛФО методом ВЕРХ в її гель-фільтраційному варіанті. Аналітичні методики розроблено, валідовано та апробовано. Методики використовуються як при контролі ГЛЗ, так і у проміжному технологічному контролі виробництва.

Проведено експеримент з визначення складу ліпідної мембрани та вибору оптимального кріопротектору. Експериментально обґрунтовано склад ліпідного бішару розроблених препаратів. Доведено, що склад 80 / 20, EPC / Chol, із концентрацією 20 мг/мл є оптимальним з погляду розміру частинок та ступеня інкапсуляції для ЛЛФІ. Склад EPC / Chol / DPPG, 50 / 20 / 30 із концентрацією 20 мг/мл у кінцевому продукті є оптимальною для ЛЛФО. Найкращім кріопротектором було визначено трегалозу дигідрат у концентрації 8 % (мас.). Досліджено способи отримання моноламілярних ліпосом із розміром 80–120 нм методами ультразвукового озвучування та екструзії при високому тиску. Доведено перевагу методу екструзії. Метод оптимізовано з огляду на розмір частинок, склад ЛЛФІ та ЛЛФО.

Досліджено кінетику інкапсуляції іринотекану гідрохлориду в ліпосоми. Розроблено МКЯ для ЛЛФІ та ЛЛФО. Запропоновано та апробовано технологічну схему отримання препаратів. Проведено масштабування розроблених технологій. Надано рекомендації щодо методів очищення обладнання при виробництві препаратів на одній ділянці.



Доклінічне вивчення було проведено на базі ЗАТ «Санкт-Петербурзький Інститут Фармації» у необхідному обсязі: протипухлинна активність *in vitro* на цільових видах перещеплених клітин; загальна токсичність, специфічні види токсичності – тест ДНК-комет, тест Еймса на мутагенність, імунотоксичні властивості.

Вперше за допомогою доклінічних *in vitro* та *in vivo* випробувань показано, що у порівнянні із неліпосомальними розчинами для ін'єкцій іринотекану й оксалиплатину, їх ліпосомальні форми мають менші показники токсичності при однаковій протипухлинній активності.

Отримано дозвіл на проведення клінічних досліджень. За запропонованою технологією виготовлено серії препарату «Іринотекан ліпосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» в умовах GMP для клінічного вивчення та успішно проведено I фазу його клінічних досліджень.

**Ключові слова:** протипухлинні лікарські засоби, іринотекану гідрохлорид, оксалиплатин, ліпосоми, технологія, метод хімічного градієнта, екструзія високого тиску, стерилізаційна фільтрація, ліофілізація.

## АННОТАЦІЯ

**Стадниченко А. В. Научное обоснование и разработка липосомальных противоопухолевых лекарственных средств на основе иринотекана и оксалиплатина.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 15.00.01 – технология лекарств, организация фармацевтического дела и судебная фармация. Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2019.

Диссертация посвящена научному и экспериментальному обоснованию состава и технологии производства двух лиофилизированных липосомальных форм иринотекана гидрохлорида и оксалиплатина, предназначенных для лечения онкологических заболеваний.

Предложено общую методологию определения степени инкапсуляции для водорастворимых АФИ иринотекана гидрохлорида и оксалиплатина методом ВЭЖХ в ее гель-фильтрационном варианте. Аналитические методики разработаны, валидированы и апробированы. Проведен эксперимент по определению состава липидной мембраны и оптимального криопротектора.

Определены внутренний объём липосом в ЛЛФИ и концентрация иринотекана гидрохлорида внутри липосом. На основании исследований предложена эффективная технология лиофильной сушки препаратов. Исследована устойчивость липосомальной эмульсии после регидратации, предложены пути по повышению термодинамической устойчивости за счет увеличения дзета – потенциала.

Исследована кинетика инкапсуляции иринотекана гидрохлорида в липосомы. Разработаны МКК для препаратов «Иринотекан липосомальний, ліофілізат для приготування емульсії для інфузій» и «Оксалиплатин липосомальний,

лиофилизат для приготовления эмульсии для инфузий». Предложена и апробирована технологическая схема получения препаратов. Даны рекомендации к методам очистки оборудования при производстве липосомальных препаратов на одном производственном участке.

Доклиническое изучение было проведено на базе ЗАО «Санкт-Петербургский Институт Фармации» в необходимом объеме: противоопухолевая активность *in vitro* на целевых видах перевиваемых клеток; общая токсичность, специфические виды токсичности - тест ДНК-комет, тест Эймса на мутагенность, иммунотоксические свойства.

Проведены доклинические исследования разработанных липосомальных препаратов, на основании которых получено разрешение на проведение клинических исследований. Успешно проведена I фаза клинических испытаний препарата «Иринотекан липосомальный, лиофилизат для приготовления эмульсии для инфузий».

**Ключевые слова:** противоопухолевые лекарственные средства, иринотекана гидрохлорид, оксалиплатин, липосомы, технология, метод «химического градиента», экструзия высокого давления, стерилизующая фильтрация, лиофилизация.

## SUMMARY

**Stadnichenko A.V. Scientific backgrounding and development of liposomal antineoplastic drugs on the basis of irinotecan and oxaliplatin.** – A manuscript copyright.

The thesis for a degree of Doctor of Pharmacy in speciality 15.00.01 “Drugs technology, organisation of pharmacy and judicial pharmacy”. – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2019.

The thesis is devoted to the scientific and experimental substantiation of the composition and technology of the production of two lyophilized liposomal forms of irinotecan hydrochloride and oxaliplatin intended for the treatment of cancer. The review of scientific world literature on the problem of development and creation of cytostatic forms of medicine was conducted. A scientifically-substantiated model of conducting pharmaceutical development of LLFI and LLFO is proposed.

Based on the results of physical and chemical research the concentration of the active substance in the developed preparations - irinotecan hydrochloride and oxaliplatin has been substantiated. As a result of pharmaco-experimental experimental studies, the stability of substances in the range of pH values, in which the development of drugs was planned, was investigated. The optimal pH range of 1,9-5,0 for irinotecan hydrochloride is proposed, and oxaliplatin is stable in an aqueous solution.

The study of active loading of irinotecan hydrochloride by the method of "chemical gradient" was conducted. The technologies of "chemical ammonium gradient" and "chemical pH gradient" were tested. On the basis of the experimental data obtained, the advantage of the technology of the "chemical pH gradient" as the degree of encapsulation and the stability of the active substance during the technological cycle for LLFI has been proved. The advantage of the technology of "passive capture" in combination with the

"ionic sorption" AFI method on lipid bilayer in the case of LLFI is proved. A general methodology for determining the degree of encapsulation for water-soluble AFI LLFI and LLFO by the HPLC method in its gel filtration variant is proposed. Analytical techniques have been developed, validated and tested. The methods are used both in the control of finished medicinal product, and in the intermediate technological control of production.

An experiment was conducted to determine the composition of the lipid membrane and to select an optimal cryoprotectant. The composition of the lipid bichar of the developed drugs is experimentally substantiated. It has been proved that the composition of 80/20, EPC / Chol, at a concentration of 20 mg / ml is optimal in terms of the size of particles and the degree of encapsulation for LLFI. The composition of EPC / Chol / DPPG, 50/20/30 at a concentration of 20 mg / ml in the final product, is optimal for LLFO. Trehalose dihydrate was identified as the best cryoprotectant in a concentration of 8% (wt.). Methods of obtaining monolamillary liposomes with the size of 80-120 nm by methods of ultrasonic sounding and extrusion at high pressure have been investigated. The advantage of the extrusion method is proved. The method is optimized due to the size of the particles, the composition of LLFI and LLFO.

The internal volume of liposomes in LLFI as well as the concentration of irinotecan hydrochloride within the liposome has been determined. The existing technologies of creating a "chemical gradient" on the lipid bilayer have been analyzed, resulting in the method of "pH gradient", which includes: homogenization of high pressure, ultrafiltration and lyophilization, recognized as the most technological with high scalability. The method is tested on the size of the series up to 5 liters of finished product. On the basis of researches an effective technology of lyophilic drying of preparations is offered. The stability of the liposomal emulsion after rehydration is investigated, ways have been proposed to improve thermodynamic stability by increasing the zeta potential.

The kinetics of irinotecan hydrochloride encapsulation in liposomes was investigated. Developed by methods of quality control for LLFI and LLFO. A technological scheme for obtaining drugs is proposed and tested. The scale of the developed technologies is carried out. Recommendations on methods of cleaning the equipment in the manufacture of drugs at one site are given.

Pre-clinical study was conducted on the basis of the JSC "St. Petersburg Institute of Pharmacy" to the extent necessary: antitumor activity in vitro on target species of transfected cells; general toxicity, specific toxicity types - DNA comet test, Ames test for mutagenicity, immunotoxic properties.

For the first time, using preclinical in vitro and in vivo tests, it has been shown that in comparison with non-liposomal solutions for irinotecan and oxaliplatin injections, their liposomal form has lower toxicity rates with the same antitumor activity.

Permission to conduct clinical trials has been obtained. The proposed technology produced series of drug "Irinotecan liposomal, lyophilizate for the preparation of an emulsion for infusion" in terms of GMP for clinical study and successfully conducted the first phase of its clinical studies.

**Key words:** antineoplastic drugs, irinotecan hydrochloride, oxaliplatin, liposomes, technology, chemical gradient method, high pressure extrusion, ultrafiltration, sterilizing filtration, lyophilization.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт  
ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія  
ВТД – вища терапевтична доза  
ГЛЗ – готовий лікарський засіб  
ЛЛФІ – ліпосомальна лікарська форма іринотекану  
ЛЛФО – ліпосомальна лікарська форма оксаліплатину  
МКЯ – методики контролю якості  
Chol – cholesterol – холестерин  
DPEA – dipalmitoylethanolamine – дипальмітоїлфосфатидилетаноламін  
DPPG – dipalmitoylphosphatidylglycerol – дипальмітоїлфосфатидилгліцерин  
EPC – egg phosphatidylcholine – фосфатидилхолін яєчний  
EPR – enhanced permeability and retention effect – ефект прикнення судин  
I<sub>o</sub> – index of oxidation – індекс окислення  
N66 – nylon 66 – найлон 66  
PA – phosphatidic acid – фосфатидна кислота  
PES – polyethersulfone – поліетерсульфон  
PVDF – polyvinylidene fluoride – полівініліденфторид



---

Підписано до друку 06.03.2019. Формат 60×84/16. Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman. Друк цифровий. Ум. друк. арк. 0,9. Наклад 100 пр. Зам. № 577.  
Надруковано СПД ФО Степанов В. В., м. Харків, вул. Академіка Павлова, 311.  
Номер запису про включення відомостей до ЄДР про фізичну особу-підприємця  
№ 2 480 017 0000 020623 від 28.01.2003р.  
e-mail: [uatorg0@gmail.com](mailto:uatorg0@gmail.com) тел.: 063 1913464



