

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Кацай Олексій Григорович

УДК 615.014.23: 615.457.3: 615.27: 543.4: 543.544

ДИСЕРТАЦІЯ

**Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для
лікування офтальмологічних захворювань**

226 – Фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

О. Г. Кацай

(підпис, ініціали та прізвище дисертанта)

Науковий керівник Рубан Олена Анатоліївна, докторка фармацевтичних наук,
професорка, завідувачка кафедри заводської технології ліків НФаУ

Харків – 2020

АНОТАЦІЯ

Кацай О. Г. Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для лікування офтальмологічних захворювань. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація». – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2020.

У розділі I «Ліпосомальні лікарські засоби та сучасні проблеми їх розробки (огляд літератури)» розглянуто основні способи отримання та сучасні вимоги до розробки, виробництва та контролю ліпосомальних лікарських засобів. Установлено переваги та перспективи застосування ліпосом як нанорозмірних систем доставки ліків (drug delivery system) у сучасній офтальмологічній практиці.

Розглянуто етіопатогенетичні аспекти запальних захворювань ока та показано, що інгібування окисних процесів у всіх тканинах, які знаходяться спереду кришталика (рогівка та внутрішньоочна рідина), має велике значення для пригнічення розвитку катаракти, а також сприяє більш швидкому процесу регенерації тканини та зниженню запальної реакції при ураженнях рогівки. Проведено узагальнення даних літератури щодо застосування цитохрому С в офтальмології, обґрунтовано доцільність введення цитохрому С у комплексі з фосфоліпідами з метою підвищення ефективності використання цитохрому С в офтальмології.

Проаналізовано асортимент ліпосомальних офтальмологічних лікарських засобів, світового фармацевтичного ринку та проведено маркетингове дослідження фармацевтичного ринку щодо забезпечення населення офтальмологічними лікарськими препаратами, які містять цитохром С як

активний фармацевтичний компонент. Показано необхідність розробки та виробництва сучасних оригінальних офтальмологічних препаратів, які, на відміну від дженеричних форм, не лише можуть бути представлені на ринку України, але й мати великий експортний потенціал.

У розділі 2 «Об'єкти та методи досліджень» обґрунтовано загальну концепцію досліджень. Відповідно до сучасних рекомендацій та вимог ДФУ, FDA, EMA до розробки ліпосомальних лікарських засобів розроблено план досліджень із пошуку оптимального складу і технології створення очних крапель ліпосомального цитохрому С.

Наведено характеристику діючої речовини, фосфоліпідів та допоміжних речовин (компонентів буферного розчину, кріопротекторів), проаналізовано вимоги до якості створення очних крапель ліпосомального цитохрому С.

Здійснено вибір методів дослідження, необхідних для фармацевтичної розробки та оцінки якості очних крапель ліпосомального цитохрому С відповідно до вимог ДФУ.

У розділі 3 «Теоретичне та експериментальне обґрунтування складу та технології ліпосомальної форми цитохрому С» наведено результати експериментальних досліджень з обґрунтування складу та розробки оптимальної дослідно-промислової технології виробництва ліпосомального цитохрому С.

На першому етапі досліджень були розроблені специфікації вхідного контролю на діючу речовину та фосфоліпіди. Проведено дослідження їх фізико-хімічних і технологічних показників відповідно до загальних вимог ДФУ до фармацевтичних субстанцій та норм специфікацій виробників.

З урахуванням на фізико-хімічних властивостей запропонованих фосфоліпідів та діючої речовини запропоновано спосіб отримання ліпосомального цитохрому С, що полягає в: отриманні плівки фосфоліпідів; гідратації фосфоліпідної плівки в розчині цитохрому С для отримання емульсії мультіламелярних (багатошарових) везикул (MLV); гомогенізації під високим

тиском емульсії MLV до отримання емульсії малих юніламельярних везикул (SUV). Для розробки був обраний фосфатний сольовий буфер із рН 6,8, що не виявляє токсичних властивостей і широко використовується у виробництві лікарських препаратів.

Оцінено вплив складу ліпосом на рівень інкапсуляції та розмір часток при створенні ліпосомальної форми цитохрому С. За результатами досліджень запропоновано співвідношення фосфатидилхолін : дипальмітоїлфосфатидилгліцерол (1,20 : 1,0), що забезпечує максимальну інкапсуляцію цитохрому С (95,88 %).

Проведено дослідження режимів гомогенізації при отриманні уніламельярних везикул ліпосомального цитохрому С. Експериментально був обґрунтований рівень тиску гомогенізації у 800 bar, що дозволяє проводити процес протягом 5 циклів гомогенізації і не перевищувати оптимальний температурний режим 38-44 °С. Для визначення ступеня інкапсуляції були запропоновані методики визначення загальної концентрації цитохрому С та концентрації неінкапсульованого цитохрому С. Загальну концентрацію цитохрому С у ліпосомальній формі (C_{total}) визначали спектрофотометричним методом. Визначення неінкапсульованого цитохрому С (C_{free}) проводили методом гель-хроматографії. У результаті була отримана ліпосомальна форма цитохрому С із концентрацією цитохрому С – 0,67 мг/мл, ступенем інкапсуляції – 95,8 %, середнім розміром часток 156,6 нм (визначення методом динамічного світлорозсіювання), вмістом лізофосфатидилхоліну – 0,60 % та вільних жирних кислот – 0,40 % (від суми ліпідів), що свідчило про стабільність компонентів у процесі гомогенізації. Контроль та підтвердження морфології ліпосом із цитохромом С здійснювали методом сканувальної електронної мікроскопії (SEM) із використанням STEM детектора.

За результатами оцінки ефективності стерилізуючої фільтрації було встановлено, що отримана ліпосомальна форма цитохрому С може піддаватися

стерилізуючій фільтрації зі збереженням основних фізико-хімічних властивостей, що підтверджує розмір отриманих ліпосомальних часток (≤ 220 нм) та відкриває шлях потенційному використанню ліпосомальної форми цитохрому С у клінічній практиці як стерильного лікарського засобу.

Обґрунтовано доцільність проведення ліофілізації, за допомогою підходу Quality by Design досліджено процес ліофілізації ліпосомальної форми цитохрому С, оцінено вплив кріопротекторів і температури вторинного сушіння на якість ліофільно висушеного ліпосомального цитохрому С. Оптимальним кріопротектором була обрана лактоза в концентрації 6 %. Установлено значення оптимальної температури вторинного сушіння 30 °С, при якій зразки демонстрували кращі результати збереження початкових розмірів, вмісту залишкової вологи, а також давали кращі результати за показниками часу утворення емульсії.

Досліджено фізико-хімічні, морфологічні та мікробіологічні показники отриманої рідкої емульсії та ліофільно висушеної форми ліпосомального цитохрому С і проведено порівняння їх стабільності протягом 12 місяців. У водній емульсії ліпосомального цитохрому С спостерігалось зростання продуктів деградації: вільних жирних кислот та лізофосфатидилхоліну на 202,5 і 409,7 % відповідно порівняно з вихідними значеннями, а також зниження вмісту фосфатидилхоліну та дипальмітоїлфосфатидилгліцеролу на 1,5 і 1,0 % відповідно. Водночас істотних змін у складі зразків ліофільно висушеного ліпосомального цитохрому С не виявлено.

Запропоновано склад ліофільно висушеного ліпосомального цитохрому С, що містить на 1 флакон: 2,025 мг цитохрому С, 18 мг фосфатидилхоліну яєчного, 15 мг дипальмітоїлфосфатидилгліцеролу, 180 мг лактози моногідрату, 2,34 мг калію дигідрофосфату та 2,44 мг динатрію гідрофосфату б/в.

Обґрунтовано та розроблено оптимальну промислову технологію одержання ліофільно висушеного ліпосомального цитохрому С. Загалом

показано, що усі технологічні операції не спричиняють суттєвих змін фізико-хімічних характеристик основних компонентів (цитохрому С, фосфоліпідів) під час одержання ліофільно висушеної форми ліпосомального цитохрому С.

У розділі 4 «Розробка методик контролю показників якості у препараті» представлено дослідження з розробки методик контролю показників якості готової лікарської форми ліофільно-висушеного ліпосомального цитохрому С. Визначено його фізико-хімічні, мікробіологічні та фармакотехнологічні показники. На підставі рекомендацій FDA, вимог ДФУ 2.0 («Ліпосомальні лікарські засоби N», «Очні лікарські засоби»), вимог настанови 42-3.2:2004 «Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування на критерії прийнятності» складено проєкт МКЯ.

Розроблено методику, що дозволяє визначати ступінь інкапсуляції цитохрому С, і проводити ідентифікацію складу ліпосомального цитохрому С. Відповідно до рекомендованих критеріїв (ICH Q2) методика валідована за показниками «специфічність», «межа виявлення» та «робасність».

Розроблено методику кількісного визначення фосфатидилхоліну та дипальмітоїлфосфатидилгліцеролу в препараті методом ВЕРХ. Методика валідована за показниками «специфічність», «правильність або точність», «збіжність», «внутрішньолабораторна прецизійність», «стабільність розчинів у часі» та «робасність».

Розроблено методику кількісного визначення цитохрому С у препараті методом УФ-спектрометрії. Методика валідована за показниками: «специфічність», «незначущість фонового поглинання», «правильність», «збіжність», «внутрішньолабораторна прецизійність», «лінійність», «стабільність розчинів у часі», «робасність», «межа кількісного визначення», «межа детектування».

Проведено вивчення стабільності зразків ліофільно висушеного ліпосомального цитохрому С, одержаних в умовах дослідно-промислового

виробництва. Запропоновано термін зберігання при температурі мінус $(15 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ – 18 місяців.

У розділі 5 «Мікробіологічні та фармакологічні дослідження препарату» наведено результати дослідження специфічної активності ліофільно-висушеного ліпосомального цитохрому С in vivo та in vitro.

Дослідженням специфічної активності in vivo на моделі ураження рогівки кролів, що проводили на базі ЗАТ «Санкт-Петербурзький інститут фармації», доведена ефективність препаратів цитохрому С при проникаючій травмі рогівки. Було встановлено, що застосування очних крапель ліпосомального цитохрому є більш ефективним, ніж застосування неліпосомального цитохрому С, стосовно процесів запалення та регенерації.

Проведено дослідження специфічної активності ліпосомального цитохрому С на моделі світової катаракти кролів. Дослідження проводились на базі ДУ «Інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України», (м. Одеса), Україна. Застосування ліпосомального цитохрому С сприяло нормалізації ензиматичних порушень у кришталіку, виявляло захисний ефект відносно антиоксидантної системи та уповільнювало процеси помутніння кришталіка, що свідчило про його профілактично-лікувальну дію. Установлено, що ліпосомальний цитохром С виявляє високу антикатарактальну дію. на біохімічні показники ПОЛ (КФ, МДА, ДК, каталаза), що перевищує дію препарату порівняння.

Оцінено реакційна здатність ліпосомального цитохрому С in vitro. За результатами дослідження встановлено, що цитохром С у ліпосомальній формі зберігає здатність приймати та віддавати електрони, як розчин неліпосомальній формі цитохрому С.

Ключові слова: Ліпосоми, цитохром С, очні лікарські засоби, технологія, гомогенізація високого тиску, стерилізуюча фільтрація, ліофілізація, катаракта, ураження рогівки.

Список публікацій здобувача

Статті у фахових виданнях

1. Katsai O., Ruban O. Preparation And Characterization Of Liposomal Delivery System Of Natural Heme Protein. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. P. 418–425. (Особистий внесок: розробка методів отримання та характеристикації ліпосомальної форми цитохрому С, експериментальне дослідження впливу технологічних параметрів на ключові показники якості (розмір часток, домішки, стерильність), дослідження специфічної активності *in vitro*, оформлення та підготовка статті до друку). (**Scopus**).

2. Pylypenko D. M., Gorbach T. V., Katsai O. G., Grigoryeva A. S., Krasnopol'sky Y. M. A study of oxidative stress markers when using the liposomal antioxidant complex. *Pharmakeftiki*. 2019. T. 31, № 1. С. 40-47. (Особистий внесок: отримання ліпосомальних форм кверцетину та убіхінону методом ліпідної плівки, фіз.-хім. характеристика отриманих зразків). (**Scopus**).

3. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopol'skyi Y. M. "Quality-by-design" approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C. *Pharmakeftiki*. 2018. T. 30, № 2. С. 76-87. (Особистий внесок: розробка підходу QbD при виборі лікарської форми ліпосомальної форми цитохрому С, дослідження впливу типу, концентрації кріопротектора, та параметрів ліофілізації на критичні показники якості, оформлення та підготовка статті до друку). (**Scopus**).

4. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopol'skyi Y. M. Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. T. 72, № 12. С. 736-740. (Особистий внесок: розробка технології отримання, методів контролю та вивчення стабільності отриманих зразків ліпосомальної форми цитохрому С, оформлення

та підготовка статті до друку). (*Scopus/Web of science*).

5. Krasnopol'skiy Y. M., Grigor'eva A. S., Katsai A. G., Konakhovich N. F., Prokhorov V. V., Stadnichenko A.V., Balaban'yan V. Y., Lyutik A. I., Shvets V. I. Technologies and perspectives of liposomal drug application in clinical practice. *Nanotechnologies in Russia*. 2017. Т. 12, № 7-8. С. 461-470. (Особистий внесок: експериментальна розробка технології отримання ліпосомальних форм цитохрому С, оксаліплатину – методом хімічного зв'язку; рифабутину та доцетакселу – методом ліпідної плівки, розробка методів контролю та стандартизації лікарських форм). (*Scopus / Web of science*).

6. Кацай А. Г., Рубан Е. А., Краснополяский Ю. М., Влияние состава липосом на степень инкапсуляции размер частиц при создании липосомальной формы цитохрома С. *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. 2017. № 4 (8). С. 32-36. (Особистий внесок: експериментальне дослідження впливу складу ліпосом на ступінь інкапсуляції та розмір часток; оформлення та підготовка статті до друку).

7. Пилипенко Д. М., Кацай А. Г., Прохоров В. В., Конахович Н. Ф., Григорьева А. С., Краснополяский Ю. М. Исследование антиаритмической активности липосомальной формы цитохрома С. *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. 2017. № 3 (7). С. 51-57. (Особистий внесок: отримання зразків ліпосомального цитохрому С, фіз.-хім. характеристика отриманих зразків).

8. Григорьева А. С., Кацай А. Г., Конахович Н. Ф., Прохоров В. В., Стадниченко А. В., Шве́ц В. И., Краснополяский Ю.М. Реальная нанофармакология: 25 лет разработки и применения липосомальных лекарственных препаратов в Украине. *Фармаком*. 2016. № 1. С. 41-47. (Особистий внесок: участь у розробці технологічної платформи отримання ліпосомальних препаратів, проведення аналізу основних методів включення лікарських субстанцій у ліпосоми, розробка методів контролю та стандартизації лікарських форм фармацевтичних субстанцій (цитохром С, оксаліплатин, доцетаксел).

9. Кацай О. Г., Прохоров В. В., Грігор'єва Г. С., Краснопольський Ю. М. Розробка та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах. *Фармацевтичний журнал*. 2016. № 5. С. 69–75. (Особистий внесок: розробка та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах, оформлення та підготовка статті до друку).

10. Шахмаев А. Е., Кацай А. Г., Прохоров В. В., Стадниченко А. В., Балабаньян В. Ю., Краснопольський Ю. М., Шве́ц В. И. Исследование методов включения лекарственных субстанций в липосомальные наночастицы. *Ремедиум*. 2015. № 12. С. 56-59. (Особистий внесок: експериментальне дослідження методів включення у ліпосоми цитохрому С, оксаліплатину – методом хімічного зв'язку; кверцетину та доцетакселу – методом ліпідної плівки).

Патенти

11. Спосіб отримання фармакологічно активної ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та ліпосомальна композиція, отримана таким способом : пат. 118583 України / Григор'єва Г. С., Кацай О. Г., Краснопольський Ю. М., Прохоров В. В., Хромов О. С., Пасєчнікова Н. В., Добреля Н. В. № а 201610776 ; заявл. 27.10.2016 ; опубл. 11.02.2019, Бюл. № 3. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, опис заявки, участь у підготовці патентної формули).

12. Способ получения липосомальной формы цитохрома С : пат. 22183 РФ / Шоболов Д. Л., Краснопольський Ю. М., Ульянов А. М., Натыкан А. А., Тарасов В. В., Балабаньян В. Ю., Шве́ц В. И., Кацай А. Г. ; Евразийское патентное ведомство № 201201592 ; заявл. 24.12.2012 ; опубл. 30.11.2015. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, написання опису заявки, участь у підготовці патентної формули).

13. Method of producing of pharmacologically active liposomal composition containing cytochrome c, and liposomal composition obtained by this method : pat. 2018/0116957 A1 US / Grygor'ieva G. S., Katsai O. H., Krasnopol'skyi Y. M., Prokhorov V. V., Khromov O. S., Pasyechnikova N. V., Dobrelia N. V. № a 201610776 ; appl. 25.10.2017 ; publ. 03.05.2018. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, опис заявки, участь у підготовці патентної формули).

Тези доповідей

14. Пилипенко Д. М., Кацай О. Г. Дослідження кардіологічної дії ліпосомальної форми цитохрому С. *Біотехнологія: звершення та надії* : зб. тез VI міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. до 120-річчя НУБіП України, м. Київ, 14-16 листоп. 2017 р. Київ, 2017. С. 140-141.

15. Григор'єва Г. С., Конахович Н. Ф., Прохоров В. В., Кацай О. Г. Реальна нанофармакологія: розробка та медичне застосування ліпосомальних препаратів в Україні. *V Національний з'їзд фармакологів України*, 18-20 жовт. 2017 р. Запоріжжя, 2017. С. 30.

16. Кацай О. Г., Рубан О. А., Краснопольський Ю. М. Вплив складу ліпосом на ступень інкапсуляції та розмір часток при фармацевтичній розробці ліпосомальної форми цитохрому С. *Інновації в медицині: досягнення молодих вчених* : 40-ювіл. наук.-практ. конф. молодих вчених НМАПО ім.

П. Л. Шупика з міжнар. участю, присвяч. “Дню науки”, 18 травня 2017 р. Київ, 2017. С. 103–104.

17. Кацай А. Г., Рубан Е. А. Определение фосфолипидного состава липосом с цитохромом С методом ВЭЖХ. *Современные аспекты создания экстенпоральных алопатических, гомеопатических и косметических лекарственных средств* : I Междунар. науч.-практ. интернет-конф., 3-4 марта 2017 г. Харьков, 2017. Вип. 2. С. 98.

18. Кацай О. Г., Прохоров В. В., Рубан О. А., Краснопольський Ю. М. Вплив складу фосфоліпідів на інкапсуляцію активного інгредієнту в ліпосомах. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VI наук.-прак. конф. з міжнар. участю, 10–11 листоп. 2016 р. Тернопіль, 2016. С. 112-113.

19. Григорьева А. С., Кацай А. Г., Конахович Н. Ф., Прохоров В. В., Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Шве́ц В. И. Нанотерапевтика – перспективное направление фармацевтической науки и промышленности. *Химия, био- и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности* : сб. материалов IV междунар. науч.-практ. конф., 17-18 октяб. 2016 г. Харьков, 2016. С. 76-79.

20. Кацай А. Г., Прохоров В. В., Краснопольский Ю. М. Разработка и валидация методики определения степени инкапсуляции цитохрома С в липосомы. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи* : матеріали VIII нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 13 – 16 верес. 2016 р. Харків НФаУ, 2016. С. 191.

21. Кацай А. Г., Прохоров В. В., Стадниченко А. В., Шахмаев А. Е., Краснопольский Ю. М., Шве́ц В. И. Изучение влияния состава и заряда липосомальных наночастиц на их физико-химические и биологические свойства. *Химия, био-и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности* : сб. материалов II-й междунар. науч.-практ. конф. Харьков, 2014. С. 208-211.

ANNOTATION

Katsai O. G. Development of the technology to obtain the liposomal cytochrome C for the treatment of ophthalmic diseases. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a Doctor of Philosophy degree in specialty 226 «Pharmacy» - National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2020.

In *Section 1, «Liposomal drugs and current problems of their development (literature review)»* considered the basic methods of development, production, and quality control of liposomal drugs. Advantages and perspectives of the application of liposomes as novel drug delivery systems in modern ophthalmic practice – were established.

Etio-pathogenetic aspects of inflammatory diseases of the eye have been considered. It was found that inhibition of oxidative processes in all tissues located in the Anterior Segment of the eyeball (cornea and intraocular fluid) is significant for the inhibition of the cataract process. Furthermore, it contributed to the faster tissue regeneration at the corneal injury. It was summarized the literature data on the use of cytochrome C in ophthalmology. It was substantiated the feasibility of use cytochrome C in combination with phospholipids to increase its efficiency in ophthalmology.

Liposomal ophthalmic drugs in the world pharmaceutical market were analyzed. A study of the pharmaceutical market was conducted on the provision of ophthalmic drugs containing cytochrome C as API. It showed the necessity of the development and production of original ophthalmic preparations, which, unlike the generic forms, can potentially be presented not only in the Ukrainian market but also have good export potential.

In *Section 2, «Objects and Methods»* substantiated the general concept of research. Following the current recommendations and requirements of the State

Pharmacopoeia of Ukraine, FDA, EMA for the development of liposomal drugs, a plan of study was developed.

Characteristics of an active ingredient, phospholipids, and excipients (components of buffer solution, cryoprotectants) - were given. Quality requirements for the creation of eye drops of liposomal cytochrome C were analyzed.

The choice of research methods required for pharmaceutical development and quality assessment of liposomal cytochrome C eye drops following the requirements of State Pharmacopoeia of Ukraine was made.

In *Section 3, «Theoretical and experimental substantiation of the composition and technology of the liposomal cytochrome C»* presented the results of an experimental study on the development of the composition and the development of optimal technology for the production of liposomal cytochrome C.

The first phase of the study developed the specifications of the entrance control for the active ingredients and phospholipids. Following the general requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine for pharmaceutical substances and specifications of manufacturers, the study of their physicochemical and technological parameters was performed.

A method was proposed of producing a liposomal cytochrome C. The critical steps of this method: obtaining a lipid film; hydration of this film in a solution of cytochrome C until obtaining an emulsion of multilamellar vesicles (MLV); high-pressure homogenization of MLV emulsion to getting small unilamellar vesicle (SUV). For development, we have chosen a phosphate salt buffer with pH 6.8, which has no toxic properties and widely uses in the manufacture of drugs.

The influence of liposome composition was evaluated on the encapsulation efficiency and particle size during the creation of the liposomal form of cytochrome C. As a result of studies, the ratio of phosphatidylcholine: dipalmitoylphosphatidylglycerol (1.20: 1.0) was proposed, which provides the maximum encapsulation of cytochrome C (95.88%).

The homogenization regime was investigated for obtaining unilamellar vesicles. Experimentally substantiated the homogenization pressure level of 800 bar, which allows the process of five cycles of homogenization in the optimal temperature regime 38-44 °C. The methods for determining the total concentration of cytochrome C and the concentration of "non-encapsulated" cytochrome C - were proposed. The total concentration of cytochrome C in the liposomal (C_{total}) was determined by the spectrophotometric method. The determination of "non-encapsulated" cytochrome C (C_{free}) – was performed by gel chromatography. As a result – the liposomal cytochrome C was obtained with a concentration of cytochrome C – 0,67 mg/ml, the encapsulation efficiency – 95.8%, the mean particle size of 156.6 nm, the content of lysophosphatidylcholine – 0.60%, free fatty acids - 0.40% (of the total amount of lipids), the content of lysophosphatidylcholine – 0.60%, and free fatty acids - 0.40% (of the total amount of lipids). Liposome morphology was monitored and verified by scanning electron microscopy using a STEM detector.

It was found that the liposomal cytochrome C was able to subject the sterilizing filtration, with the preservation of its main physicochemical properties, which confirmed the size of the obtained liposomal particles (≤ 220 nm) and opens the way for the potential use of cytochrome C as a sterile drug.

The lyophilization process was developed using the Quality-by-Design (QbD) approach. The influence of cryoprotectants and the temperature of secondary drying on the CQAs of freeze-dried liposomal cytochrome C - were evaluated. Lactose with a concentration of 6% was the optimal type of cryoprotectant. At the lyophilization program selected secondary drying temperature value was 30°C.

The necessity to choose the form of lyophilization for solution preparation was shown with the example of stability evaluation of aqueous cytochrome C-containing liposomes and freeze-dried cytochrome C-containing liposomes. During the observation period, the aqueous solution shows the growth of degradation products (free fatty acids and lysophosphatidylcholine) by 202.5% and 409.7%, respectively,

compared with the reference values, as well as the decrease of the content of phosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine by 1.5 and 1.0%. At the same time, there were no significant changes in the composition of FD-Cyt-LS samples.

The composition of freeze-dried cytochrome C-liposomes contained per 1 vial: 2.025 mg of cytochrome C, 18 mg of egg phosphatidylcholine, 15 mg of DPPG, 180 mg of lactose monohydrate, 2.34 mg of potassium dihydro phosphate, 24.4 disodium hydrophosphate.

The optimum industrial technology of obtaining freeze-dried liposomal cytochrome C is substantiated and developed.

In *Section 4, «Development of quality control methods»*, quality control methods to the finished dosage form of freeze-dried liposomal cytochrome C were developed. Its physicochemical, microbiological, and pharmacotechnological parameters were determined. Based on FDA recommendations, requirements of DPhU 2.0 («Liposomal Drugs N», «Ophthalmic Drugs»), and the requirements of regulation 42-3.2: 2004 «Medicines. Specifications: eligibility tests» drafted the QCM.

It was developed to determine the encapsulation efficacy of cytochrome C and to identify the composition of liposomal cytochrome C. According to the recommended criteria (ICH Q2), the methodology was validated in terms of specificity, detection limit, and robustness.

The quantitative determination of phosphatidylcholine and DPPG by HPLC was developed and validated in terms of specificity, accuracy, convergence, laboratory precision, the stability of solutions over time, and robustness.

The assay of cytochrome C by the method of UV spectrometry has been developed. The methodology was validated by specificity, the insignificance of background absorption, correctness, convergence, laboratory precision, linearity, stability, robustness, the limit of quantitative determination, and the limit of detection.

The stability of samples of freeze-dried liposomal cytochrome C obtained under conditions of industrial production was studied. The recommended state of storage for the drug is minus 15 ± 2 °C per 18 months.

In section 5, «*Microbiological and Pharmacological Investigations*», the specific activity of freeze-dried liposomal cytochrome C in-vivo and in-vitro was investigated.

A study of specific in vivo activity on rabbit corneal injury model was performed on the «St. Petersburg Institute of Pharmacy». This study was shown that the use of eye drops of liposomal cytochrome was more effective than the use of non-liposomal cytochrome C for inflammation and regeneration processes.

The specific activity of liposomal cytochrome C on a rabbit cataract model was performed on the State Institution «Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy. V.P. Filatov NAMS of Ukraine», Odesa, Ukraine. The use of liposomal cytochrome C led to the normalization of enzymatic disorders in the lens, gave a protective effect, and slowed the lens's turbidity, thereby having a preventive and therapeutic effect. Liposomal cytochrome C has an anti-cataract high impact. The impact of the drug liposomal cytochrome C on the biochemical parameters exceeds the comparison drug.

The reactivity of liposomal cytochrome C in vitro was evaluated. Cyt-LS exhibit specific activity, similar to a non-liposomal cytochrome C solution.

Keywords: Liposomes, cytochrome C, ophthalmic drug delivery, high-pressure homogenization, technology, sterilizing filtration, lyophilization, cataract, corneal injury.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	21
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1 ЛІПОСОМАЛЬНІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ ТА СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ЇХ РОЗРОБКИ (Огляд літератури)	32
1.1 Ліпосоми, їх властивості та методи отримання	32
1.2 Застосування ліпосом в офтальмологічній практиці	39
1.3 Етіопатогенетичні аспекти запальних захворювань ока	43
1.4 Цитохром С та його використання в офтальмології	46
1.5 Аналіз ринку ліпосомальних препаратів для застосування в офтальмології	48
Висновки до розділу 1	54
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	57
2.1 Обґрунтування загальної концепції досліджень	57
2.2 Характеристика діючих та допоміжних речовин	59
2.3 Характеристика методів дослідження	68
2.4 Якісне та кількісне визначення діючих речовин	70
2.5 Методи проведення мікробіологічних та фармакологічних досліджень	72
2.6 Статистична обробка результатів дослідження	74
Висновки до розділу 2	75
РОЗДІЛ 3 ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ ЦИТОХРОМУ С	78
3.1 Дослідження фізико–хімічних і технологічних властивостей діючої речовини та фосфоліпідів	78
3.2 Розробка способу отримання та визначення	

	оптимального складу ліпосомального цитохрому С	19
3.3	Визначення умов стерилізації ліпосомального цитохрому С	83
3.4	Обґрунтування вибору допоміжних речовин при розробці ліпосомальної форми цитохрому С	94
3.5	Технологічний процес одержання препарату	96
Висновки до розділу 3		107
РОЗДІЛ 4	РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ ПРЕПАРАТУ	115
4.1	Характеристика ліпосомального цитохрому С та розробка специфікації на ліофілізований продукт	119
4.2	Розробка та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах	125
4.3	Розробка та валідація методики кількісного визначення фосфатидилхоліну та дипальмітоїлфосфатидилгліцеролу в препараті Cyt-LS	132
4.4	Розробка та валідація методики кількісного визначення цитохрому С в препараті Cyt-LS	145
4.5	Вивчення показників якості та стабільності розробленого препарату	158
Висновки до розділу 4		161
РОЗДІЛ 5	МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРЕПАРАТУ	164
5.1	Дослідження специфічної активності in vivo на моделі ураження рогівки	164
5.2	Дослідження специфічної активності in vivo на моделі світлової катаракти кролів	170
5.3	Дослідження специфічної активності in vitro	174

	20
Висновки до розділу 5	177
ВИСНОВКИ	180
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	183
ДОДАТКИ	200

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ – активні фармацевтичні інгредієнти;
ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;
ВЖК – вільні жирні кислоти;
ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;
ВП – вертепорфін;
ГХ – газова хроматографія;
ДПФГ – дипальмітоїлфосфатидилгліцерол;
ДФУ – Державна фармакопея України;
ЗВО – заклади вищої освіти;
ЛЗ – лікарський засіб;
ЛС – ліпосоми;
ЛС-ЛЗ – ліпосомальний лікарський засіб;
ЛФХ – лізофосфатидилхолін;
МКЯ – методи контролю якості;
МОЗ – Міністерство охорони здоров'я;
НД – нормативний документ;
ТШХ – тонкошарова хроматографія;
ФЛ – фосфоліпіди;
ФХ – фосфатидилхолін;
CQAs – критичні показники якості;
Cyt-C – цитохром С;
Cyt-LS – ліпосомальний цитохром С;
DLS – динамічне світлорозсіяння;
DoE – експериментальний дизайн;
FD-Cyt-LS – ліофільно висушений ліпосомальний цитохром С;
GUV – гігантські юніламелярні везикули;

LUV – великі юніламельярні везикули;

MLV – мультиламельярні (багатошарові) везикули;

QbD – Quality by Design;

SEM – сканувальна електронна мікроскопія;

SUV – малі юніламельярні везикули;

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Розширення арсеналу лікарських засобів (ЛЗ) для боротьби з основними групами хвороб людини залишається актуальним завданням практичної медицини та має велике соціальне значення. Під час розробки нових типів ЛЗ особливу увагу приділяють проблемам спрямованої доставки ліків, біодоступності та тривалості дії. Перспективним напрямом створення нових високоефективних лікарських засобів (ЛЗ) є нанорозмірні системи доставки ліків (drug delivery system), в основі яких лежать наночастки різноманітної структури. Ці наночастки здатні забезпечувати спрямованість дії та підвищення біодоступності активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ).

Особливе місце у сучасних системах доставки ліків посідають ліпосоми (ЛС), що мають цілу низку переваг у порівнянні з іншими наночастками, а саме: неімуногенність, малотоксичність, легка біодеградація в організмі; за певних умов можуть зливатися з фосфоліпідами (ФЛ) клітинних мембран та доставляти свій вміст усередину клітин.

Одним із перспективних напрямів розробки ліпосомальних лікарських засобів (ЛС-ЛЗ) є їх застосування в офтальмологічній практиці. Очна доставка ліків є складним завданням із досягнення оптимальної концентрації ліків завдяки унікальним захисним механізмам очей. Тому за останнє десятиліття були досліджені численні системи доставки АФІ з метою подолання обмежень звичайних ЛЗ (розчинів, суспензій) для системного та місцевого застосування в офтальмологічній практиці. Нові формуляції систем доставки ліків, такі, як ЛС, дендримери та ніосоми, були розроблені для підвищення біодоступності АФІ. Однак слід зауважити, що методи розробки таких систем доставки ліків були спрямовані не тільки на вирішення основної проблеми – тривалої та контрольованої доставки ліків, але й на досягнення адресної доставки до клітини–мішені та мінімізації несприятливих наслідків. Очікується, що саме ці

підходи забезпечать максимальну терапевтичну користь з мінімальними побічними ефектами. Тому серед таких систем доставки ліків саме ЛС широко вивчаються останнім часом як потенційні ЛЗ в офтальмології.

Порушення зору можуть обмежувати можливості людей у виконанні їх повсякденних функцій та впливати на якість життя і здатність взаємодіяти з навколишнім світом. Сліпота – найтяжча форма порушення зору, внаслідок якої людина втрачає можливість пересуватися без сторонньої допомоги. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), катаракта та ураження рогівки, обумовлені різноманітними факторами, є основними причинами сліпоти у світі. Розвиток патологічного процесу в цих випадках пов'язаний зі змінами в судинному тракті ока, що призводять до порушення регуляції гідро- та гемодинаміки. Інгібування окисних процесів у всіх тканинах, що знаходяться спереду кришталика (рогівки та водянистої вологи) має велике значення для пригнічення патологічних процесів із виникненням вільних радикалів, які можуть призвести до помутніння кришталика. Також інгібування цих процесів сприяє більш швидкому процесу регенерації тканини та зниженню запальної реакції при ураженнях рогівки. Тому суттєве значення має створення офтальмологічних ЛЗ на основі антиоксидантів, дія яких полягає в стимуляції регенеративних та обмінних процесів, а також захисті від вільних радикалів.

Однією з найбільш перспективних речовин з такою дією є цитохром С (Cyt–C), що має загальновизнану терапевтичну активність при терапії офтальмологічних хвороб. Однак застосування водорозчинної форми цитохрому С має низку суттєвих недоліків: цитохром С у незначній кількості проникає крізь біологічні мембрани у клітини та досить швидко виводиться з організму, що обумовлює його доволі низьку біодоступність.

Тому очевидна доцільність уведення цитохрому С у складі ліпосомальної системи доставки. Наявність ліпідної частини в цій системі сприятиме полегшенню проникнення цитохрому С крізь ліпідні ділянки біомембран й

утриманню його в деструктивних ділянках, що, зрештою, й підвищить ефективність використання цитохрому С в офтальмології.

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 на засіданні проблемної комісії «Фармація» Національного фармацевтичного університету МОЗ України (протокол № 7 від 11.01.2017 р.).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційного дослідження є розробка технології виробництва ліпосомальної форми цитохрому С (Cyt-LS) для лікування офтальмологічних захворювань.

Для реалізації поставленої мети слід було вирішити такі науково–практичні завдання:

- здійснити аналіз та узагальнити дані інформаційних джерел щодо сучасних способів отримання, вимог та рекомендацій до розробки, виробництва та контролю ЛС-ЛЗ;

- розглянути етіопатогенетичні аспекти запальних захворювань ока та узагальнити дані літератури щодо застосування цитохрому С в офтальмологічній практиці. Обґрунтувати доцільність введення цитохрому С у комплексі з ФЛ для підвищення ефективності використання цитохрому С у терапії офтальмологічних хвороб;

- здійснити аналіз офтальмологічних ЛС-ЛЗ на світовому фармацевтичному ринку та провести маркетингове дослідження фармацевтичного ринку щодо питання забезпечення офтальмологічними ЛЗ, які містять цитохром С як активний компонент;

- провести фізико–хімічні та технологічні дослідження АФІ та ФЛ. Визначити методи дослідження, що необхідні для розробки та контролю офтальмологічного ЛЗ;
- обґрунтувати вибір складу Cyt-LS на підставі сучасних фізико–хімічних та біофармацевтичних досліджень;
- розробити оптимальну дослідно–промислову технологію виробництва Cyt-LS;
- провести фізико–хімічні дослідження запропонованого препарату та розробити проєкт МКЯ;
- провести апробацію промислової технології виробництва Cyt-LS за проєктом регламенту виробництва та МКЯ в умовах ТОВ «Наномедтех» (м. Київ);
- проаналізувати вплив умов зберігання на стабільність отриманих зразків Cyt-LS;
- визначити специфічну активність Cyt-LS;
- упровадити в освітньо–науковий процес закладів вищої освіти фармацевтичного та медичного профілю результати досліджень.

Об’єкти дослідження: цитохром С, природні та напівсинтетичні ФЛ, фосфатні компоненти буферних розчинів, кріопротектори, вода для ін’єкцій, Cyt-LS.

Предмет дослідження: наукове обґрунтування та експериментальне підтвердження технології отримання Cyt-LS, розробка складу, технології та методик контролю якості Cyt-LS; установлення умов зберігання і терміну придатності, розробка проєктів технологічного регламенту виробництва та МКЯ; приготування дослідно–промислових та промислових зразків Cyt-LS для проведення доклінічних досліджень.

Методи дослідження. Для вирішення науково–практичних завдань були використані: *фізико–хімічні методи дослідження:* високоефективна рідинна

хроматографія (ВЕРХ), гель-хроматографія, тонкошарова хроматографія (ТШХ), газова хроматографія (ГХ), спектрофотометрія в УФ та видимих ділянках, ІЧ-спектрофотометрія, метод динамічного світлорозсіювання (DLS), метод світлоблокування для визначення розміру часток, сканувальна електронна мікроскопія (SEM), метод К. Фішера для визначення залишкової води у ліофілізатах, визначення втрати в масі при висушуванні, потенціометричне визначення рН, визначення осмолярності; *мікробіологічні методи дослідження*: мікробіологічна стерильність – проводять методом мембранної фільтрації закритого типу Steritest; *фармакотехнологічні методи дослідження*: випарювання під вакуумом, гомогенізація при високому тиску, фільтрація, ліофілізація. *Фармакологічні дослідження* проводили на моделях *in vivo* та *in vitro*.

Статистичну обробку проводили методом математичної статистики, згідно з вимогами ДФУ, за допомогою програми Statistica (StatSoft, USA) та Excel (Microsoft, USA).

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше на основі фізико-хімічних, мікробіологічних, фармакотехнологічних та фармакологічних досліджень була науково обґрунтована та експериментально опрацьована технологія виробництва Cyt-LS у формі ліофілізату для приготування очних крапель.

Уперше на основі теоретичного обґрунтування та експериментальних досліджень було обрано склад діючої та допоміжних речовин, що забезпечує отримання Cyt-LS із високим ступенем інкапсуляції цитохрому С. Досліджено технологічні параметри технології виробництва, що дозволяють отримувати Cyt-LS стандартного складу, основна маса яких представлена наночастками розміром не більше 200 нм, що дає можливість проводити процес стерилізуючої фільтрації й отримати стерильний продукт.

Розроблено та валідовано сучасні методики ідентифікації й кількісного визначення діючої речовини, ступеня її інкапсуляції, кількісного визначення ФЛ та розроблено проєкт МКЯ.

Обрано оптимальні умови і термін зберігання Cyt-LS, які забезпечують його стабільність протягом 18 місяців.

Уперше встановлена фармакологічна активність *in vivo* Cyt-LS щодо процесів запалення та регенерації, а також профілактики катаракти на моделях ураження рогівки та світлової катаракти.

За результатами досліджень отримано патент Євразійської патентної організації (ЕАПО) № 022183 В1; патент України (UA) на винахід № 118583 С2; опублікована заявка до відомства з патентів і товарних знаків США (USPTO) Patent US 2018/0116957 А1.

Практичне значення отриманих результатів. На підставі проведених досліджень було розроблено та запропоновано оригінальний ЛЗ «Цитохром С ліпосомальний, ліофілізат для приготування очних крапель» з метою використання у практичній медицині для терапії офтальмологічних захворювань.

Розроблено проєкт технологічного регламенту для виробництва Cyt-LS, а також проєкт МКЯ, що містить опис методик контролю якості вказаного препарату. Розроблено технологічну схему процесу та виконано його апаратурне оформлення.

Технологію виробництва та методики контролю якості лікарського препарату апробовано в умовах промислового виробництва ТОВ «Наномедтех» (акт впровадження від 20.07.2017 р.)

Фрагменти роботи упроваджено в освітньо–науковий процес: кафедри технології ліків Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 06.09.2019 р.); кафедри технології ліків Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 15.10.2019 р.); кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії Національного технічного

університету «Харківський політехнічний інститут» (акт впровадження від 22.10.2019 р.)

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійно завершеною науковою працею. Здобувачем особисто проведено аналіз та узагальнення світових і вітчизняних літературних даних із досліджуваної проблеми (розробка технологій отримання ЛС-ЛЗ для лікування офтальмологічних захворювань).

Здобувачем разом з науковим керівником визначено мету та обґрунтовано загальну методологію досліджень. Теоретично обґрунтовано та розроблено склад і технологію отримання Cyt-LS. Здійснено планування усіх експериментальних робіт; обрано аналітичне і технологічне обладнання та приміщення, що були необхідні для вирішення завдань, а також проведено експериментальні дослідження за темою дисертації. За допомогою фізико-хімічних та мікробіологічних методів експериментально обґрунтовано вибір ФЛ та допоміжних речовин. Визначено метод інкапсуляції цитохрому С, вплив складу обраних ФЛ та умов технології виробництва на ступінь інкапсуляції, розмір часток, стабільність. Розроблено та валідовано методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С, кількісного визначення цитохрому С та ФЛ. Проведено науковий аналіз та систематизацію отриманих даних; розроблено технологічний регламент та МКЯ; опрацьовано та узагальнено результати фармакологічного вивчення специфічної активності Cyt-LS. Усі наукові та практичні результати, положення, висновки та рекомендації, що викладені в дисертації, отримані автором самостійно.

У всіх наукових працях, що були опубліковані у фахових наукових виданнях у співавторстві з О. А. Рубан, Ю. М. Краснопольським, Г. С. Григор'євою, В. І. Швецом, В. В. Прохоровим, О. В. Стадніченко, В. Ю. Балабаньяном, А. Е. Шахмаєвим, Т. В. Горбач, Д. М. Пилипенко, здобувачем було виконано планування та проведення експериментальних

досліджень з технології виробництва, розроблено методики контролю якості готової лікарської форми та сировини, проведено аналіз, систематизацію та узагальнення одержаних результатів, а також підготовлено матеріали до друку.

Співавторами наукових праць дисертанта захищено такі дисертації: Рубан О. А. «Наукове обґрунтування складу та технології лікарських препаратів протиалергічної дії на основі полісахаридів смородини чорної», Харків, 2009 р.; Краснопольський Ю. М. «Вивчення залежності біологічної активності лікувальних та діагностичних препаратів від хімічної будови ліпідів», Харків, 1988 р.; Григор'єва Г. С. «Координационно–химические аспекты оптимизации фармакологического эффекта лекарственных средств классов НПВС и симпатомиметических катехоламинов», Харків, 1992; Швець В. І. «Исследование в области сложноэстерных глицеринфосфатидов и гликозилдиглицеридов», Москва, 1973 р.; Стадніченко О. В. «Наукове обґрунтування та розробка ліпосомальних протипухлинних лікарських засобів на основі іринотекану і оксаліплатину», Харків, 2019; Балабаньян В. Ю. «Фармакологические и фармацевтические аспекты создания наноразмерных форм факторов роста нервной ткани, феназепам и паклитаксела», Москва, 2015; Шахмаев А. Е. «Розробка технології одержання ліпосомальної ін'єкційної форми убідекаренону, що має кардіопротекторну дію», Харків, 2017 р.; Горбач Т. В. «Динаміка стану регуляторних систем (моноамінів, простагландинів, циклічних нуклеотидів) та енергозабезпеченості головного мозку та серця щурів», Харків, 1990.

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

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи викладені та обговорені на: II Международной научно–практической конференции «Химия, био- и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности» (Харків, 2014); VIII Національному з'їзді фармацевтів (Харків, 2016); IV Международной научно–практической

конференции «Химия, био– и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности» (Харків, 2016); VI науково–практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2016); I Международной научно–практической интернет-конференции «Современные аспекты создания экстенпоральных алопатических, гомеопатических и косметических лекарственных средств» (Харків, 2017); 40-й ювілейній науково-практичній конференції молодих вчених НМАПО імені П. Л. Шупика з міжнародною участю, присвяченій Дню науки «Інновації в медицині: досягнення молодих вчених» (Київ, 2017); V Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017); VI Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 120-річчю НУБіП України (Київ, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 21 наукова праця, а саме: 10 статей у наукових фахових виданнях (6 – у закордонних виданнях, з них 5 індексуються наукометричною базою даних Scopus, 2 – наукометричною базою даних Web of Science), 1 Євразійський патент на винахід, 1 патент України на винахід, 1 заявка на патент США, 8 тез доповідей.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 211 сторінках. Робота складається зі вступу, огляду літератури, експериментальної частини (розділи 2–5), загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг основного тексту складає 182 сторінок. Робота містить 38 рисунків та 47 таблиць. Список джерел інформації налічує 164 найменувань, з них 61 вітчизняних та 103 іноземних.

РОЗДІЛ 1

ЛІПОСОМАЛЬНІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ ТА СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ЇХ РОЗРОБКИ (огляд літератури)

1.1 Ліпосоми, їх властивості та методи отримання

Перспективним напрямом створення високоефективних лікарських засобів (ЛЗ) є нанорозмірні системи доставки ліків (drug delivery system), в основі яких лежать наночастки різноманітної структури. Ці наночастки здатні забезпечувати спрямованість дії та підвищення біодоступності активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ). Особливе місце у сучасних системах доставки ліків посідають ліпосоми (ЛС), що мають цілу низку переваг у порівнянні з іншими наночастками, а саме: вони неімуногенні, малотоксичні, піддаються легкій біодеградації в організмі; за певних умов можуть зливатися з фосфоліпідами (ФЛ) клітинних мембран і доставляти свій вміст усередину клітин [1, 2].

ЛС були широко вивчені як носії АФІ у фармацевтичній та медичній галузях. Установлено, що використання ЛС перешкоджає швидкому виведенню АФІ з організму, що, зі свого боку, збільшує терапевтичний ефект за рахунок зміни фармакокінетики та біорозподілу. Крім того, при використанні ЛС можливе створення рідких лікарських форм гідрофобних АФІ, що розширює можливість їх застосування [3]. Особливе значення має факт накопичення ЛС у пухлинах та місцях запалення, що насамперед пов'язано зі зміненою структурою системи судин пухлини та підвищеною проникністю її ендотелію [4]. ЛС привертають увагу дослідників при розробці ЛЗ ще й тому, що ліпідні везикули, отримані з природних і напівсинтетичних ФЛ, повністю біорозкладні та біосумісні з організмом [5, 6]. За останні 30 років дослідження ЛС значно розширилась сфера їх застосування, що включає доставку АФІ та генів, діагностику, косметичну, харчову та хімічну промисловість.

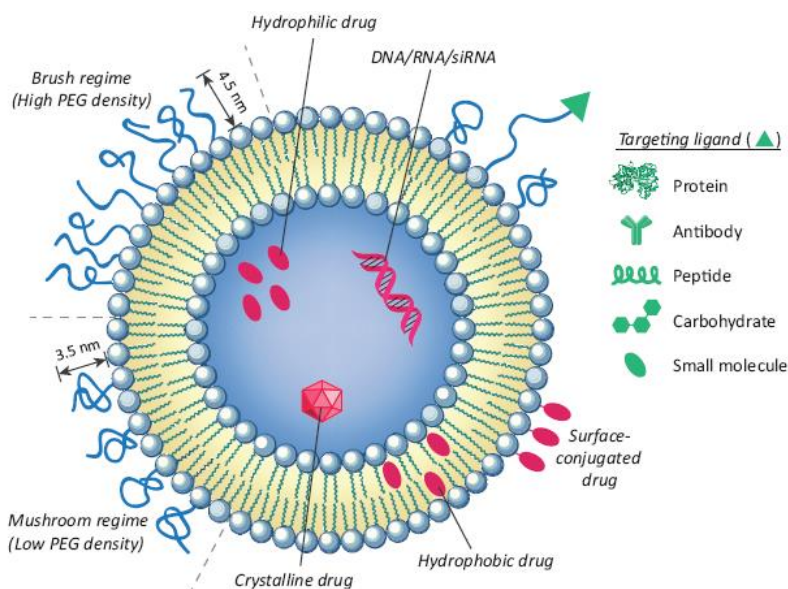


Рис. 1.1 Структурні та конструктивні аспекти доставки ліпосомальних лікарських засобів (ЛС-ЛЗ) [7]

На рис. 1.1 зображена ЛС, яка може переносити різні АФІ та ліганди (антитіла, білки, пептиди, вуглеводи та ін.), що забезпечують спрямований транспорт ЛС до клітини-мішені, та має різноманітні конфігурації поверхні [7].

ЛС були вперше отримані у 60-х роках 20 століття британським біофізиком Алеком Дугласом Бангамом, який займався вивченням механізмів згортання крові. За його спостереженням ФЛ мимовільно утворюють мультиламелярні везикули у водному розчині. Реорганізація ФЛ у водному середовищі обумовлена гідрофобним ефектом, що утворює їх амфотильні молекули для мінімізації ентропічно несприятливих взаємодій між гідрофобними ацильними ланцюгами та навколишнім водним середовищем. Багато дослідників працювали з цими структурами з моменту відкриття їх Бангамом, зробивши ЛС, вочевидь, найпопулярнішими нанорозмірними системами [8].

Ці нанорозмірні системи складаються з водного ядра, що оточено ФЛ бішаром природного або синтетичного походження. ЛС, як правило, класифікуються за їх розмірами та кількістю бішарів (рис. 1.2).

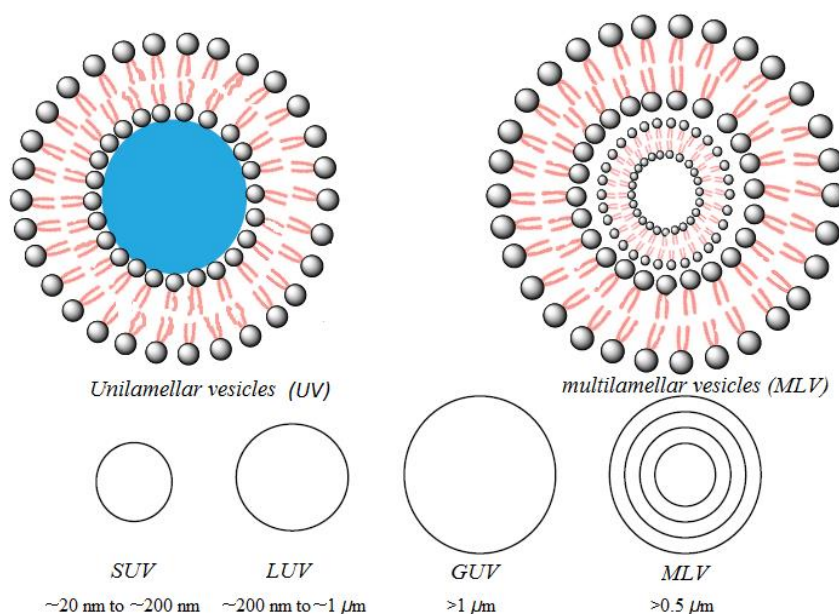


Рис. 1.2 Схематичне зображення основних структур та різних типів ліпосом

За кількістю фосфоліпідних бішарів ЛС поділяються на юніламельярні (одношарові) везикули (UV) або мультиламельярні (багатошарові) везикули (MLV). Крім того, за розміром ЛС поділяються на малі юніламельярні везикули (SUV), великі юніламельярні везикули (LUV) та гігантські юніламельярні везикули (GUV) [9].

До складу ЛС входять природні та/або синтетичні ФЛ. Бішар ліпосомний може також містити інші складові: холестерин, гідрофільні полімери, кон'юговані з ліпідами, та воду. Холестерин широко використовується для поліпшення характеристик бішару ЛС, таких, як стійкість, плинність, та зменшення проникності водорозчинних молекул крізь мембрану.

Як вже зазначалось, очевидною перевагою ЛС є той факт, що ліпідна мембрана виготовляється з фізіологічних ліпідів, які зменшують небезпеку гострої та хронічної токсичності.

Існує декілька класичних методів отримання ЛС.

Гідратація тонкої ліпідної плівки – метод, що був запропонований Бангамом. Суміш ФЛ розчиняють в органічному розчиннику. Потім органічний

розчинник випаровують, використовуючи роторний випарювач при зниженому тиску до отримання ліпідної плівки. Отриману ліпідну плівку гідратують з додаванням водного буферного розчину при перемішуванні та температурі вище температури фазового переходу ліпідів [10].

Цей метод дає можливість отримувати мультиламелярні ЛС (MLV), неоднорідні як за розміром, так і за формою (діаметром 1–5 мкм).

Метод випарювання у зворотній фазі – метод, що був запропонований F. Szoka та D. Papahadjopoulos. Отримання ЛС методом випарювання у зворотній фазі засновано на створенні «перевернутих міцел», тобто дрібних крапель води, що стабілізовані фосоліпідним бішаром та диспергуються у надлишку органічного розчинника [11]. Водний буферний розчин додають до розчину ФЛ в органічній фазі. За допомогою випарювання органічний розчинник повільно видаляють. Це приводить до трансформації «перевернутих міцел» у гелеподібну структуру. У критичній точці цієї стадії гель руйнується і деякі з «перевернутих міцел» розпадаються. Надлишок ФЛ сприяє формуванню бішару навколо міцел, що залишились, унаслідок чого утворюються GUV везикули з великим внутрішнім водним об'ємом та високим ступенем інкапсуляції.

Метод інжекції органічного розчинника – отримання ЛС шляхом упорскування у водне середовище розчину ФЛ у леткому органічному розчиннику.

Спосіб ін'єкції етанольного розчину ФЛ – метод, описаний S. Batzri та Едвардом Корном у 1973 р., полягає в тому, що ЛС можуть бути отримані шляхом уведення етанольного розчину ФЛ у воду [12]. Також відомий спосіб ін'єкції ефірного розчину ФЛ [13], що відрізняється від методу ін'єкції етанольного розчину тим, що ефір не змішується з водною фазою. Після ін'єкції отриману суміш нагрівають для видалення розчинника з ліпосомального продукту. До недоліків цього методу необхідно віднести низьку ефективність включення в ЛС

лікарських речовин, необхідність видалення розчинника з продукту, а також нестандартність отриманого складу ЛС.

Метод видалення детергенту – метод, при якому ФЛ солюбілізуються детергентом, утворюючи змішані міцели. Детергент та речовини з низькою молекулярною масою, що не укорінилися у везикули, видаляють за допомогою діалізу, в результаті чого утворюються гомогенні за розміром ЛС [14].

Метод спонтанної везикуляції – метод, заснований на спонтанному утворенні ЛС при швидкому збільшенні рівня рН водних дисперсій, що містять ФЛ. До недоліків цього методу варто віднести обмеженість у використанні фосфоліпідного складу, високу швидкість процесу та високе значення рН, що робить його не зовсім придатним для лікарських та біологічних речовин [15].

Для виробництва ЛС-ЛЗ у промисловому масштабі спектр методів їх приготування був розширений низкою методик, а саме:

Озвучування – процес отримання ЛС за допомогою ультразвуку. Ліпідну емульсію MLV піддають ультразвуковій обробці, в результаті чого відбувається подрібнення великих міцел до утворення SUV. Недоліком цього методу є низька продуктивність, окиснення та гідроліз ФЛ [16, 17].

Методика заморожування–розморожування – отримання ЛС шляхом заморожування та відтаювання емульсії MLV.

Завдяки дифузії АФІ, злиттю та дестабілізації ЛС під час заморожування–розморожування відбувається подрібнення великих міцел до утворення SUV. Недоліком цього методу є також вкрай низька продуктивність, окиснення, гідроліз ФЛ і тривалість технологічного процесу [18, 19].

Екструзія – отримання SUV шляхом пропускання емульсії MLV крізь полікарбонатні мембрани зі стандартним розміром діаметра пор. Різні параметри процедури екструзії, зокрема прикладений тиск, кількість циклів і розмір пор, впливають на середній діаметр і розподіл розмірів (полідисперсність) вироблених ЛС [20, 21].

Гомогенізація під високим тиском – процес, який здійснюється в гомогенізаторах високого тиску. В результаті руйнуються великі міцели під час пропускання ФЛ емульсії під високим тиском через спеціальну камеру при температурі вище фазового переходу ФЛ, які використовуються у складі ЛЗ. Перевагою цього методу є стандартність складу SUV, висока продуктивність, мінімальне окиснення та гідроліз ФЛ, збереження та стабільність ЛС, а також реальна можливість постійного контролю за температурою і тиском [22, 23].

Одним із найважливіших етапів отримання ЛС-ЛЗ є інкапсуляція (включення) АФІ в ЛС. Сьогодні відомо декілька методів інкапсуляції АФІ в ЛС: у внутрішній об'єм ЛС, у гідрофобну частину бішару ФЛ, шляхом адсорбції на поверхні ЛС і за рахунок хімічного зв'язування з компонентами ЛС.

Принцип методу утворення ліпідної плівки полягає в отриманні розчину ФЛ та ліпофільного АФІ в органічних розчинниках (етанол, метанол, хлороформ та ін.) з подальшим утворенням плівки, що містить ФЛ та АФІ. Ліпідну плівку отримують шляхом випаровування розчину ФЛ. При використанні ліпофільних АФІ їх розчиняють у відповідному органічному розчиннику та змішують з розчином ФЛ. Далі плівку з ФЛ або ФЛ з АФІ гідратують у буферному розчині (або воді) для отримання MLV. При використанні гідрофільних АФІ плівку з ФЛ гідратують водою або буферним розчином, що містить АФІ. Температура в процесі гідратації має бути вище температури фазового переходу ФЛ, що використовуються. При отриманні MLV необхідно враховувати низку факторів: температуру, рН та іонну силу буфера, концентрацію ФЛ та співвідношення ФЛ/АФІ, інші фізико-хімічні властивості компонентів, що використовуються. Крім цього, необхідно в кожному конкретному випадку враховувати заряд ФЛ. Також для запобігання процесам окиснення ФЛ використовують інертний газ [24 – 27].

Хімічний градієнт. Сьогодні добре відомі ЛС-ЛЗ, що отримані з використанням методу хімічного градієнту. Метод заснований на підкисленні

внутрішнього об'єму ЛС, унаслідок чого нейтральні молекули АФІ, що проникають усередину ЛС, приєднують протон, набуваючи позитивного заряду, і вже не можуть вийти у зовнішнє середовище [28, 29].

Хімічний зв'язок – заснований на можливості утворення хімічного зв'язку між компонентом бішару ЛС та АФІ [30].

Сучасні вимоги та рекомендації щодо виробництва та контролю ЛС-ЛЗ викладені в монографії ДФУ 2.0, «Guidance for industry Liposome Drug Products» CDER FDA, а також в «Reflection paper on the data requirements» EMA [31 – 33].

ЛС-ЛЗ мають витримувати необхідні випробування на діючі та допоміжні речовини, випробування, характерні для конкретної дозованої форми, а також випробування, специфічні для ЛС, а саме:

- визначення розміру часток, їх розподілу та морфології;
- визначення ступеня інкапсуляції;
- визначення фосфоліпідного складу ЛС;
- визначення ступеня окиснення ліпідних компонентів;
- домішки фосфоліпідів (лізолецитин і вільні жирні кислоти);
- залишкові кількості органічних речовин.

Фармакологічні і токсикологічні властивості можуть значно варіюватися залежно від кількості діючих речовин, включених у ЛС, та складу ЛС-ЛЗ. Властивості таких діючих речовин можуть істотно змінюватися при зміні складу препарату. Тому слід обґрунтовувати склад препарату та граничні межі вмісту кожного компонента, які мають бути максимально вузькими.

Оскільки ЛС особливо чутливі до зміни технологічного процесу та масштабування, необхідно чітко ідентифікувати та оцінити критичні виробничі параметри (наприклад, метод інкапсуляції, температуру, розмір часток, заряд та ін.). Тому при фармацевтичній розробці ЛС-ЛЗ слід приділяти особливу увагу детальній розробці способу отримання ЛС та методу інкапсуляції АФІ.

1.2 Застосування ліпосом в офтальмологічній практиці

Одним із перспективних напрямів розробки ЛС-ЛЗ є їх застосування у складі очних ЛЗ. Біодоступність очних ЛЗ є складним завданням у досягненні оптимальної концентрації ліків через унікальні захисні механізми очей. Тому розробка системи доставки ліків для досягнення терапевтичної концентрації на цільовому місці вимагає всебічного розуміння статичних та динамічних бар'єрів ока. Око розділяється на два сегменти – передній та задній. Передній сегмент – це передня третина очного яблука, до якої входять структури, розміщені попереду склоподібного тіла: рогівка, райдужка, циліарне (війчасте) тіло, кришталик. Задній сегмент – це задні дві третини ока, до яких входять гіалоїдна мембрана та всі структури, що знаходяться за нею: склоподібне тіло, сітківка, хоріоїдеа (судинна оболонка ока), зоровий нерв.

Загальні способи введення ЛЗ для лікування очних розладів поділяються на системні, ін'єкційні (інтравітреальні та періокулярні) та місцеві.

Системне введення може забезпечити терапевтичний рівень у задньому сегменті, але необхідність введення високих доз часто призводить до серйозних побічних ефектів. Гематоводянистий та гемато–ретинальний бар'єри є двома основними бар'єрами для доставки ліків до переднього та заднього сегментів відповідно після системного введення. Щільні сполучні комплекси, розташовані у двох дискретних клітинних шарах, ендотелії райдужно-циліарних судин та непігментований циліарний епітелій, створюють гематоводянистий бар'єр, який перешкоджає проникненню розчинних речовин у водянисту вологу. Гематоретинальний бар'єр складається з клітин двох типів, клітин ендотелію судин сітківки та клітин пігментного епітелію сітківки, що перешкоджає потраплянню розчинної речовини в сітківку.

Ін'єкційні інтравітреальний та періокулярний шляхи введення, крім доволі складної техніки виконання, що обов'язково проходить в умовах медичного

закладу, можуть супроводжуватися великою кількістю ускладнень. Існує високий ризик крововиливу у різні частини ока, відшарування сітківки, енд офтальміту, набряків та інших побічних ефектів.

Усі ці побічні ефекти можна мінімізувати шляхом розробки ліпосомальних систем доставки, які забезпечують контрольовану та цільову доставку ліків протягом тривалого періоду [34 – 37].

Місцеве застосування ліків є більш бажаним способом доставки ліків для лікування офтальмологічних захворювань, що має найзручніший та найменш інвазивний характер. Після місцевої інстиляції всмоктування ЛЗ відбувається або рогівковим шляхом (рогівка, склоподібне тіло, внутрішньоочні тканини), або нерогівковим шляхом (кон'юнктива, склера, судинна оболонка/пігментний епітелій сітківки). Склад рогівки в основному поділяється на епітелій, строму та ендотелій, де кожен шар має різну полярність та структуру, що обмежує швидкість проникнення лікарського засобу. Однак небагато препаратів для місцевого застосування, як правило, менше 5%, досягають внутрішньоочних тканин. Факторами, що зумовлюють погану біодоступність АФІ до ока, крім місцевої інстиляції, є прерогівковий дренаж та ліпоїдальний характер епітелію рогівки. Крім того, основна частина препарату досягає системного кровообігу через кон'юнктивальні судини та носослізну протоку, що призводить до серйозних несприятливих наслідків. Тобто, місцеве застосування очних ЛЗ має обмеження у досягненні терапевтичних концентрацій препарату в задньому сегменті.

За останнє десятиліття було досліджено багато систем доставки лікарських засобів з метою подолання обмежень звичайних ЛЗ (розчинів, суспензій) для системного та місцевого застосування в офтальмологічній практиці. Нові формуляції систем доставки ліків, зокрема ЛС, дендримери та ніосоми, були розроблені для підвищення біодоступності ЛЗ. Однак слід зауважити, що мета розробки таких систем доставки ліків була спрямована не тільки на вирішення

основної проблеми – тривалої та контрольованої доставки ліків, але й на досягнення адресної доставки до клітини-мішені та мінімізації несприятливих наслідків. Очікується, що саме ці підходи забезпечать максимальну терапевтичну користь з мінімальними побічними ефектами. Тому серед таких систем доставки ліків саме ЛС широко вивчаються останнім часом як потенційні ЛЗ. Виконаний значний обсяг експериментальних досліджень із використанням ЛС-ЛЗ в офтальмології. Проведені дослідження переконливо довели зниження кліренсу та меншу токсичність порівняно з неліпосомальними формами АФІ. Було показано, що ЛС-ЛЗ забезпечують аналогічну або більш високу ефективність порівнянно із застосуванням неліпосомальних форм ліків [38, 39].

Механізми взаємодії ЛС з клітинними мембранами, що сприяють внутрішньоклітинній доставці ліків, сьогодні широко вивчаються. Однак слід зауважити, що через дуже складний характер цієї взаємодії інтерпретація експериментальних даних часто є складною. Початкова взаємодія клітинної мембрани з ЛС являє собою ключовий процес внутрішньоклітинної доставки ліків. ЛС може включати різні рецептори для різних типів клітин або більше одного рецептора для певної клітини. Загалом дослідники виділяють чотири механізми внутрішньоклітинної доставки ЛС, а саме:

Адсорбцію: адсорбція ЛС до клітинної мембрани є одним із важливих механізмів внутрішньоклітинної доставки АФІ. Адсорбовані ЛС у присутності білків клітинної поверхні вивільняють їх вміст біля клітинної мембрани. Це приводить до більш високої концентрації АФІ, близької до клітинної мембрани, і полегшує клітинне поглинання АФІ шляхом пасивної дифузії або транспорту [40].

Ендоцитоз: адсорбція ЛС на поверхні клітинної мембрани супроводжується їх поглинанням та інтерналізацією в ендосоми. Ендосоми транспортують ЛС до лізосом. Згодом лізосомальні ферменти руйнують ліпіди та вивільняють інкапсульований АФІ у цитоплазму [41].

Злиття: бішар ФЛ ЛС зливається з мембраною клітини шляхом змішування та дифузії ліпідів, що сприяє прямій доставці ЛС вмісту в цитоплазму [42].

Ліпідний обмін: через схожість ліпідів ЛС мембрани з фосfolіпідами клітинної мембрани білки переносу ліпідів у клітинній мембрані розпізнають ЛС і викликають ліпідний обмін. Це викликає дестабілізацію ЛС мембран та внутрішньоклітинне вивільнення молекул ліків [43] (рис. 1.3).

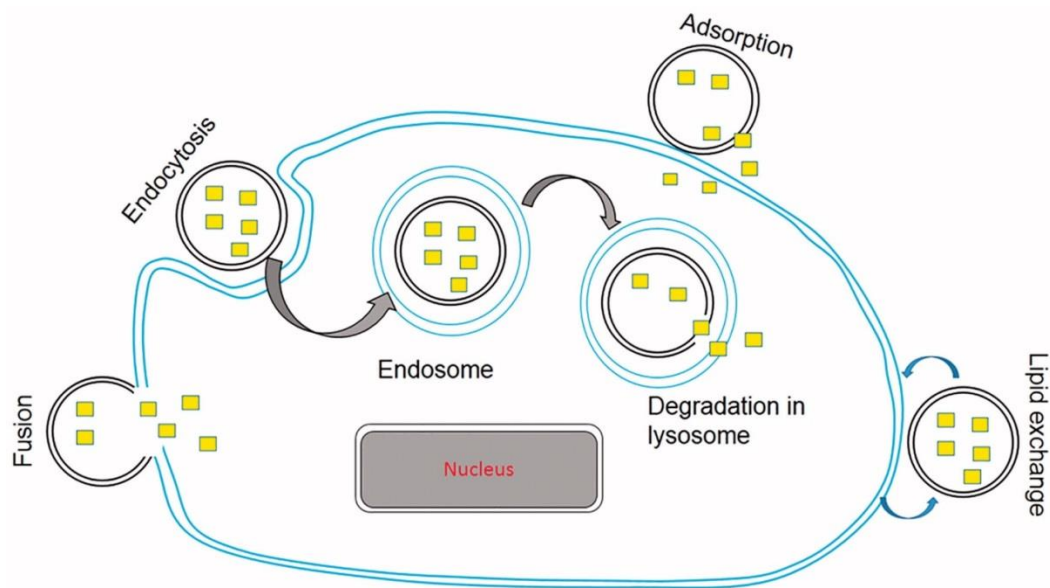


Рис. 1.3 Схематичне зображення різних механізмів доставки ліпосом

Квадрати вказують на інкапсульовані АФІ у ліпосомі.

Отже, вже найближчим часом завдяки перевагам ЛС-ЛЗ знайдуть широке застосування в усіх лікувально–діагностичних та дослідницьких аспектах офтальмології.

1.3 Етіопатогенетичні аспекти запальних захворювань ока

Сьогодні катаракта та хвороби, що вражають рогівку, є головною причиною сліпоти у світі. Розвиток патологічного процесу тут пов'язаний зі змінами в судинному тракті ока, які призводять до порушення регуляції гідро- та гемодинаміки. У процесі прогресування катаракти у кришталіку зменшується кількість білків, зникають пзв'язані з протеїнами амінокислоти, набуває розвитку метаболічний ацидоз [44 – 46].

Клінічно процес прогресування вікової катаракти складається з чотирьох стадій: початкової, незрілої, зрілої та перезрілої. Діагноз верифікується на основі скарг хворого, ступеня зниження гостроти зору, зміни рефракції, внутрішньоочного тиску та даних огляду. У початковій стадії кортикальної катаракти центральні ділянки кришталіка залишаються прозорими, тому гострота зору не змінюється, проте іноді з'являються відчуття «мушок», «плям» перед оком або монокулярна поліопія (подвоєння або зміна зображення) [47].

Пацієнти з ядерною та задньою субкапсулярною катарактою зазвичай скаржаться на погіршення зору при яскравому освітленні та його поліпшення в сутінках. На цій стадії можливе набухання кришталіка за рахунок затримки рідини та подальшого збільшення його в об'ємі, зменшення глибини та звуження профілю кута передньої камери, що призводить до підвищення внутрішньоочного тиску. При зрілій кортикальній катаракті спостерігається помутніння всіх коркових шарів до передньої капсули. Кількість рідини, що утримується в кришталіку, зменшується, передня камера стає глибшою, внутрішньоочний тиск залишається в межах норми. Гострота зору знижується до

світловідчуття з правильною проєкцією світла. При ядерній формі наростає інтенсивність забарвлення ядра, кришталік виглядає темно–коричневим або навіть чорним; повного помутніння передніх шарів не буває ніколи [48, 49].

Захворювання та пошкодження рогівки також посідають значне місце в патології органу зору. Найчастіше ураження рогівки є наслідком травм та опіків, що належать до найтяжчої патології органа зору. За даними ВООЗ, серед причин, що призводять до незворотньої втрати зору, рогівкова сліпота посідає третє місце [50].

Наслідком проникного ушкодження ока є грубі рубці рогівки, які нерідко бувають великими за площею та глибиною. До того ж вони часто бувають зрощені з райдужкою, капсулою кришталіка та склоподібного тіла [51]. Уповільнення процесів регенерації може призвести до приєднання вторинної інфекції та утворення більш грубого рубця. Тому, вирішення питань стимуляції репаративних процесів у рогівці вимагає розробки комплексного підходу до вирішення проблеми швидкого та прозорого загоєння рогівки. Рогівка, що є однією з найважливіших оптичних структур ока через свою локалізацію та майже безперервний контакт з навколишнім середовищем, належить до найбільш уразливого відділу очного яблука. Травматичні пошкодження та захворювання рогівки далеко не завжди бувають ізольованими і спричиняють зміни інших відділів ока – кон'юнктив склери, судинного тракту, а також супроводжуються помутнінням рогівки – освітлення більма, що призводить до зниження зору різного ступеня [52]. При травматичному пошкодженні рогівки процес загоєння проходить стадії запалення, проліферації та формування рубця. Від вираженості тієї чи іншої стадії залежить морфологічний та функціональний результат травми. Уповільнена регенерація, виражена запальна фаза ранового процесу спричиняє грубу проліферації рубцевої тканини. Установлено, що інфіковані проникні поранення ока проходять на тлі порушення як загального, так і місцевого імунного статусу. Одним із факторів, що обтяжують перебіг ранового

процесу, є розвиток внутрішньоочних гнійних ускладнень. Одним із найбільш тяжких ускладнень проникних поранень очей є травматичний увеїт. Незважаючи на сучасні, ефективні методи хірургічного та медикаментозного лікування, це захворювання нерідко призводить до сліпоти, а також до розвитку симпатичної офтальмії.

Слід зазначити, що хірургічні методи лікування не виключають, а доповнюють консервативні, які застосовуються до та після операції [53].

Враховуючи все вищесказане, можна стверджувати, що інгібування окисних процесів у всіх тканинах, що знаходяться спереду кришталика (рогівка та внутрішньоочна рідина), має велике значення для пригнічення розвитку катаракти, оскільки ультрафіолетове випромінювання викликає в цих тканинах ланцюгові реакції з виникненням вільних радикалів, які можуть викликати помутніння кришталика. Також інгібування таких процесів сприяє швидшому процесу регенерації тканини та зниженню запальної реакції при ураженнях рогівки. Тому суттєве значення має створення офтальмологічних препаратів на основі антиоксидантів, дія яких полягає в стимуляції регенеративних та обмінних процесів, а також захисті від вільних радикалів [54 – 57].

Однією з найбільш перспективних речовин із подібною дією, є цитохром С, що має загальновизнану лікувальну активність при терапії офтальмологічних захворювань [57].

Цитохром С – фермент, що бере участь у процесах клітинного дихання. Являє собою високомолекулярну залізовмісну речовину, що діє як потужний антиоксидант [58]. Цитохром С видаляє супероксид (O_2^-) і перекис водню (H_2O_2) з мітохондрій (рис 1.4). Тому, цитохром С необхідний у мітохондріях не тільки для клітинного дихання, але й для обмеження продукції O_2^- і H_2O_2 [154].

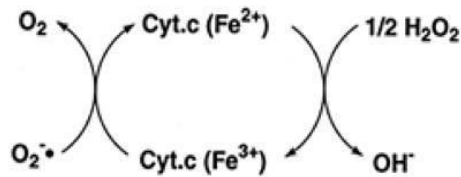


Рис 1.4. Видалення O_2^- та H_2O_2 Cyt–C

Саме ця обставина відіграє головну роль у біохімічному процесі редукції окиснення в тканинах очного яблука, де цитохром С також має високу хімічну активність по відношенню до утилізації кисневих радикалів [59].

1.4 Цитохром С та його використання в офтальмології

Препарати цитохрому С знайшли широке застосування в терапії офтальмологічних захворювань, вони ефективні в комплексному лікуванні неспецифічних неінфекційних запальних захворювань переднього відділу ока. Це підтверджено клінічними дослідженнями у хворих із запаленнями і травмами, з такими порушеннями метаболізму рогівки та кон'юнктиви, як постгерпетична кератопатія, дистрофічні зміни рогівки, сухий кератит, хронічний кератокон'юнктивіт, хронічний блефарокон'юнктивіт [60 – 62].

Препарати цитохрому С широко застосовуються у вигляді очних крапель у комплексній терапії катаракти. Установлено, що в кришталіку, ураженому катарактою, концентрація цитохрому С знижена. Зі свого боку, цитохром С має здатність до нейтралізації вільних кисневих радикалів у певних окисно-відновних процесах та може запобігати розвитку катаракти. Як результат, наприклад, при лікуванні препаратами цитохрому С пацієнтів із кортикальними катарактами, зафіксована висока частота збільшення гостроти зору (62% пацієнтів) [63].

Також в експериментальних дослідженнях на тваринах застосування очних крапель цитохрому С забезпечувало статистично достовірне уповільнення

прогресування не тільки розвитку катаракти, але й зниження макулярної дистрофії сітківки [64].

Однак при всіх потенційно можливих перевагах застосування водорозчинна форма цитохрому С має низку істотних недоліків: цитохром С незначно проникає крізь біологічні мембрани в клітини, досить швидко виводиться з організму. За літературними даними, що стосуються вивчення комбінації цитохрому С, аденозину та нікотинаміду, клінічний ефект спостерігався при регулярному застосуванні препарату протягом понад 6 місяців ($p < 0,05$) [65]. Зазначені недоліки відомих препаратів – крапель на основі водних розчинів цитохрому С – обумовлюють істотне зниження біодоступності та вимагають частого введення розчину. Причину швидкого виведення цитохрому С з організму слід шукати в ослабленні утримання водорозчинного переносника електронів у дихальному ланцюзі в умовах гіпоксії, що є наслідком деструктивних змін у фосфоліпідному шарі мітохондріальних мембран у результаті активування процесів окиснення ліпідів та фосфоліпаз. Як відомо, ФЛ компонент мітохондріальних мембран, виконуючи функцію «цементу», забезпечує сувору послідовність переносників електронів у дихальному ланцюзі, а також їх певну просторову орієнтацію, що забезпечує необхідну ефективність процесу трансформації енергії в клітині. Крім того, ліпіди змінюють конформацію білкової молекули, полегшуючи електронний транспорт. Зміна конформації пов'язана із взаємодією білкових молекул з мітохондріальними ФЛ з утворенням цитохрому С – фосфоліпідного комплексу. В результаті комплексування водорозчинна молекула цитохрому С набуває гідрофобного бар'єру, стабілізує її проти води та денатурувальних агентів.

Руйнування гідрофобного бар'єру в умовах тканинної гіпоксії призводить до утворення гідрофільних ділянок, які орієнтуються на водне середовище, роблячи доступним для вимивання цитохром С – найважливіший компонент дихального ланцюга.

Отже, структурні пошкодження термінальної ланки при гіпоксії призводять до одночасної втрати цитохрому С та ФЛ у дихальному ланцюзі мітохондрій [66]. Тому очевидна доцільність введення цитохрому С у комплексі з ФЛ для відновлення термінальної ланки біологічного окиснення, що зазнала значної деструкції в умовах гіпоксії, та підвищення енергетичного потенціалу клітини. Разом з цим наявність ліпідної частини в молекулі комплексу зумовить його ліпофільність, що полегшить проникнення комплексу крізь ліпідні ділянки біомембран, а також буде сприяти утриманню його в деструктивних ділянках, що, зі свого боку, може збільшити проникнення цитохрому С в тканини ока та підвищити ефективність використання цитохрому С в офтальмології.

Багато робіт присвячено вивченню цитохром С – ліпідного комплексу. Однак, незважаючи на всі успіхи наукових досліджень, залишається відкритим питання про створення готового ЛЗ на основі подібного комплексу. Всі отримані раніше ЛС композиції мали порівняно невисокий ступінь включення цитохрому С 38–60% [66 – 69], а також були мало технологічні, не враховували сучасних вимог до розробки стерильних і ЛС-ЛЗ [69].

1.5 Аналіз ринку ліпосомальних препаратів для застосування в офтальмології

Сьогодні, за оцінками ВООЗ, в усьому світі близько 285 млн людей страждають від порушення зору, з яких 39 млн уражені сліпотою, в 40 % з них (близько 15,6 млн) причиною сліпоти є катаракта. Слід зауважити, що сліпота, яка виникла в результаті катаракти, оборотна, але для цього потрібна операція. Однак, на жаль, у всьому світі хірургічну допомогу встигають надати лише 8 млн пацієнтів на рік. Тому на початковій стадії провідне місце посідає медикаментозна терапія. За даними МОЗ України, кількість хворих на катаракту в країні постійно збільшується. Середній рівень поширеності катаракти за період 2009–2012 р.р. склав 539,8 тис. хворих серед усього населення (1171,6 на 100

тис.). Також, за даними ВООЗ, серед причин, що призводять до необоротної втрати зору, друге місце після катаракти посідає рогівкова сліпота, викликана різноманітними ураженнями рогівки. При цьому також варто зауважити, що близько 90 % людей, які страждають від порушення зору, мешкають у країнах із низьким рівнем доходу, а 82 % людей, які страждають від сліпоти, входять у вікову групу 50 років та старше. Тобто, зі зростанням кількості людей похилого віку в багатьох країнах все більше їх будуть піддаватися ризику порушення зору внаслідок очних хвороб та процесів старіння [70, 71].

Згідно з прогнозом аналітичної компанії «GBI Research» до 2023 р. обсяг реалізації офтальмологічних препаратів може досягти 35 млрд дол. [72].

Виходячи з таких оцінок та прогнозів, питання розробки нових офтальмологічних препаратів залишається особливо актуальним не тільки в нашій країні, але й у всьому світі.

Сьогодні світовою фармацевтичною наукою та промисловістю розроблені, ліцензовані та виведені на світовий ринок ЛС-ЛЗ, що використовуються в сучасній офтальмологічній практиці (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Офтальмологічні ліпосомальні лікарські засоби на світовому фармацевтичному ринку

Торгова назва	Виробник, країна	Форма	Показання	АФІ
1	2	3	4	5
Візудин	Novartis, Швейцарія	Ліофілізат, для пр. роз. для ін'єкцій	Хоріоїдальна неоваскуляризація	Вертепорфін
Ліпофлавон	Фармстандарт–Біолік, Україна	Ліофілізат, для пр. роз. для крапель	Різнорізанітні показання в офтальмології	Кверцетин

Продовження табл. 1.1

Торгова назва	Виробник, країна	Форма	Показання	АФІ
1	2	3	4	5
Тіарс агеїн	Optima Pharmazeutische GmbH, Німеччина	Спрей	Лікування захворювань сухого ока	Соевий лецитин, вітаміни А та Е
Вісео	Yneo Pharma, Франція	Спрей	Лікування захворювань сухого ока	Соевий лецитин, вітаміни А та Е, декспантенол
Оптрекс активіст	Optima Medical Swiss AG, Швейцарія	Спрей	Лікування захворювань сухого ока	Соевий лецитин, вітаміни А та Е
Лакрисек плюс	Bios Italia, Італія	Краплі очні	Лікування захворювань сухого ока, алергія очей, кон'юнктивіт, блефарит	Фосфатидилхолін гідрований, вітаміни А та Е, амінокислоти

Як видно з табл. 1.1, ЛС-ЛЗ випускаються у формах ліофілізатів для приготування розчину для ін'єкцій або очних крапель та спреїв. Застосовуються в клінічній практиці внутрішньовенно та шляхом нанесення на слизові оболонки ока.

Візудин (Visudyne), виробництва компанії «Novartis», Швейцарія – це препарат, який уводиться шляхом внутрішньовенної інфузії. Використовується в офтальмології для лікування хворих переважно з класичною субфовеальною хоріоїдальною неоваскуляризацією, що виникла внаслідок вікової дегенерації сітківки, або субфовеальною хоріоїдальною неоваскуляризацією патологічної міопії.

До складу препарату на один флакон входить: вертепорфін (ВП) – 15 мг, диміристоїлфосфатидилхолін – 70,5 мг, фосфатидилгліцерин яєчного жовтка – 48,75 мг, лактоза – 690 мг, аскорбілпалмітат – 0,15 мг, гідрокситолуол – 0,015 мг.

Специфічна дія заснована на зданості виявляти цитотоксичність за рахунок утворення радикалів кисню при активації лазером (689 нм). Інкапсульований у

ЛС ВП орієнтований на клітини пухлинних судин та неоваскулярні ендотеліальні клітини. Візудин приводить до утворення цитотоксинів тільки при активації світлом у присутності кисню, в результаті чого утворюється нестійкий, з коротким періодом життя, синглетний кисень із високою реакційною здатністю. Синглетний кисень викликає руйнування біологічних структур, що, зі свого боку, спричиняє локальну оклюзію судин, руйнування клітин та їх загибель. Селективність фотодинамічної терапії при використанні ЛС форми ВП заснована не тільки на локалізованому впливі світла, але й на селективному швидкому захопленні та утриманні ВП клітинами, що швидко проліферують включаючи ендотелій хороїдальної зони неоваскуляризації [73, 74].

Ліпофлавон – ЛС – форма біофлавоноїду кверцетину, виробництва ПАТ «Фармстандарт–Біолік», Україна. До складу препарату на один флакон входять: кверцетин – 0,75 мг, лактоза 27,5 мг, фосфатидилхолін (ФХ) яєчного жовтка 27,5 мг. Ліпофлавон у вигляді очних крапель застосовується при ураженнях рогівки (проникних і непроникних); післяопераційних ранах рогівки (після екстракції катаракти); кератитах різного генезу; запальних станах очей. Дія препарату базується на протизапальних, ранозагоювальних, ангіопротекторних ефектах кверцетину в ЛС формі [75]. Кверцетин має антиоксидантну дію, знижує синтез лейкотрієнів і патологічно підвищену судинно–тканинну проникність та сприяє нормалізації тканинної трофіки. Ліпосомальна структура ліпофлакону забезпечує розчинність й офтальмобіодоступність при інсталяціях у формі очних крапель. Краплі ліпофлакону добре переносяться хворими, не викликають побічних ефектів та алергічних реакцій. Препарат ефективний при лікуванні хворих з травматичними кератитами, при цьому прискорюється час епітелізації, зменшується тривалість збереження больових відчуттів у порівнянні з хворими контрольної групи. Застосування Ліпофлакону сприяє швидкій регресії запального процесу при комплексному лікуванні хворих після екстракції катаракти з подальшою імплантацією. Виявлено ефективність препарату в

комплексному лікуванні дегенеративних захворювань сітківки, наприклад, при непроліферативній діабетичній ретинопатії. При цьому відбувається тривала стабілізація патологічного процесу в сітківці, підвищення зорових функцій, підвищенню активності ферментів антиоксидантного захисту [76 – 78].

Крім зазначених ЛЗ, які вже використовуються в клінічній практиці, на світовому ринку присутні ЛС формуляції у формі спреїв та очних крапель для лікування захворювань сухого ока шляхом відновлення та стабілізації ліпідного шару слізної плівки, який запобігає випаровуванню води та зневодненню поверхні ока.

Сьогодні на світовому ринку відома низка брендів офтальмологічних ЛЗ, що містять Cyt-C (табл. 1.2).

Таблиця 1.2

Бренди офтальмологічних ЛЗ, що містять цитохром–С

Торгова назва	Виробник, країна	Лікарська форма
Офтан катахром	Santen, Фінляндія	Краплі очні
Вітафакол	Laboratoires H. Faure, Франція	Краплі очні
Цитохром С	Самсон–мед, Російська Федерація (РФ)	Краплі очні
Катрікс	Incepta Pharmaceuticals Ltd, Бангладеш	Краплі очні
Факовіт	Aristopharma, Бангладеш	Краплі очні
Рактовіт	The IBN SINA, Бангладеш	Краплі очні
Анцис	MonicoPharma Limited, Бангладеш	Краплі очні
Вітафол	Popular Pharmaceutical, Бангладеш	Краплі очні

Як видно з табл. 1.2, препарати цитохрому С знайшли широке використання в офтальмології і випускаються лише у формі очних крапель.

Нами був проведений маркетинговий аналіз ринку ЛЗ України, що містять цитохром С та застосовуються для терапії офтальмологічних захворювань, згідно з Державним реєстром ЛЗ України та класифікаційною системою АТС.

За Державним реєстром ЛЗ України, наразі єдиним зареєстрованим препаратом для терапії офтальмологічних захворювань, що містить цитохром С,

є Офтан катахром, краплі очні, виробництва АТ «Сантен», Фінляндія. РУ UA / 5593/01/01 наказ МОЗ від 20.09.2017 р., АТС код – S01XA [57].

Препарат випускається у формі очних крапель у флаконах з крапельницею по 10 мл, № 1 у картонній упаковці. Склад діючих речовин: 1 мл очних крапель містить: цитохрому С – 0,675 мг, аденозину – 2 мг, нікотинамід – 20 мг. Показання для застосування: катаракта різного генезу, профілактика катаракт; по 1–2 краплі в кожне уражене око, 3 рази на добу. Особливі вказівки та запобіжні заходи – відкритий флакон використовують протягом одного місяця.

Також, наразі, в Україні на стадії клінічних випробувань (фаза 1) знаходиться препарат Офтахром виробництва ТОВ «Фармекс Груп», розроблений ТОВ «Дослідний завод «ДНЦЛЗ», що являє собою дженерик Офтан катахрому і також містить Сyt–С, аденозин та нікотинамід як активні компоненти [79].

Виходячи з результатів проведених досліджень можна стверджувати, що ринок препаратів, які містять цитохром С як АФІ, характеризується вкрай несприятливо для населення України: імпортозалежність, вузький спектр фармакологічної активності (лише терапія катаракти) відсутність пропозицій за видами упаковки та форми.

Отже, зі зростанням чисельності людей, що страждають на очні хвороби, очевидна гостра необхідність розробки і виробництва сучасних оригінальних офтальмологічних препаратів, які, на відміну від дженеричних форм, можуть мати більш широкий спектр дії, кращу біодоступність, не лише будуть представлені на ринку України, але й матимуть великий експортний потенціал.

Висновки до розділу 1

1. Розглянуті основні способи отримання та сучасні вимоги і рекомендації до розробки, виробництва та контролю ЛС-ЛЗ. Установлено, що технологія промислового одержання ЛС-ЛЗ включає низку критичних показників якості. ЛС-ЛЗ мають витримувати необхідні випробування на діючі та допоміжні речовини, випробування, характерні для конкретної дозованої форми, а також випробування, специфічні для ЛС, а саме: визначення розміру часток, їх розподіл та морфологія, визначення ступеня інкапсуляції, визначення ФЛ складу і ступеня окиснення ліпідних компонентів.

2. Проаналізовані та узагальнені данні літератури щодо застосування ЛС-ЛЗ. Розглянуті переваги та перспективи застосування ЛС як нанорозмірних систем доставки ліків (drug delivery system) у сучасній офтальмологічній практиці.

3. Проаналізовані загальні способи введення ЛЗ для лікування очних розладів та механізми взаємодії ЛС з клітинними мембранами, які сприяють внутрішньоклітинній доставці ліків.

4. Розглянуті етіопатогенетичні аспекти запальних захворювань ока. Установлено, що інгібування окисних процесів у всіх тканинах, що знаходяться спереду від кришталика (рогівка та внутрішньоочна рідина), має велике значення для пригнічення розвитку катаракти. Також інгібування таких процесів сприяє більш швидкому процесу регенерації тканини та зниженню запальної реакції при ураженнях рогівки. Тому суттєве значення має створення офтальмологічних препаратів на основі антиоксидантів, дія яких полягає в стимуляції регенеративних та обмінних процесів і захисті від вільних радикалів.

5. Проаналізовані та узагальнені дані літератури щодо застосування цитохрому С та його використання в офтальмології. Препарати цитохрому С ефективні в комплексному лікуванні неспецифічних неінфекційних запальних

захворювань переднього відділу ока. Ці препарати широко застосовуються у вигляді очних крапель в комплексній терапії катаракти та уражень рогівки.

6. Обґрунтована доцільність введення цитохрому С у комплексі з ФЛ для відновлення термінальної ланки біологічного окиснення, що значно зазнала деструкції в умовах гіпоксії, та підвищення енергетичного потенціалу клітини. Разом з тим наявність ліпідної частини в молекулі комплексу зумовить його ліпофільність, що полегшить проникнення цитохрому С крізь ліпідні ділянки біомембран, а також буде сприяти його утриманню в деструктивних ділянках, що, зі свого боку, може збільшити проникнення цитохрому С в тканини ока та підвищити ефективність використання цитохрому С в офтальмології.

7. Проаналізовані офтальмологічні ЛС-ЛЗ на світовому фармацевтичному ринку. ЛС-ЛЗ випускаються у формах ліофілізатів для приготування розчину для ін'єкцій, спреїв та очних крапель. Застосовуються в клінічній практиці внутрішньовенно та шляхом нанесення на слизові оболонки ока.

8. Проведено маркетингове дослідження фармацевтичного ринку щодо забезпечення офтальмологічними лікарськими препаратами, що містять цитохром С як активний фармацевтичний інгредієнт. Ринок України характеризується несприятливим середовищем для населення: імпорто-залежність, відсутність пропозицій за видами упаковки, обмеження застосування лише терапією катаракти. Показана необхідність розробки сучасних оригінальних офтальмологічних препаратів, які, на відміну від дженеричних форма, можуть бути представлені не лише на місцевому ринку, але й мати великий експортний потенціал.

Результати досліджень за розділом наведено у таких публікаціях:

1. Шахмаев А. Е., Кацай А. Г., Прохоров В. В., Стадниченко А. В., Балабаньян В. Ю., Краснополяский Ю. М., Шве́ц В. И. Исследование методов включения лекарственных субстанций в липосомальные наночастицы. *Ремедиум*. 2015. № 12. С. 56-59. (Особистий внесок: експериментальне дослідження методів включення у ліпосоми цитохрому С, оксаліплатину – методом хімічного зв'язку; кверцетину та доцетакселу – методом ліпідної плівки).

2. Григорьева А. С., Кацай А. Г., Конахович Н. Ф., Прохоров В. В., Стадниченко А. В., Краснополяский Ю. М., Шве́ц В. И. Нанофармакология – перспективное направление фармацевтической науки и промышленности. *Химия, био- и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности* : сб. материалов IV междунар. науч.-практ. конф., 17-18 октяб. 2016 г. Харьков, 2016. С. 76-79.

3. Krasnopol'skyi Y. M., Grigor'eva A. S., Katsai A. G., Konakhovich N. F., Prokhorov V. V., Stadnichenko A. V., Balaban'yan V. Y., Lyutik A. I., Shvets V. I. Technologies and perspectives of liposomal drug application in clinical practice. *Nanotechnologies in Russia*. 2017. Т. 12, № 7-8. С. 461-470. (Особистий внесок: експериментальна розробка технології отримання ліпосомальних форм цитохрому С, оксаліплатину – методом хімічного зв'язку; рифабутину та доцетакселу – методом ліпідної плівки, розробка методів контролю та стандартизації лікарських форм). (*Scopus / Web of science*).

4. Pylypenko D. M., Gorbach T. V., Katsai O. G., Grigoryeva A. S., Krasnopol'sky Y. M. A study of oxidative stress markers when using the liposomal antioxidant complex. *Pharmakeftiki*. 2019. Т. 31, № 1. С. 40-47. (Особистий внесок: отримання ліпосомальних форм кверцетину та убіхінону методом ліпідної плівки, фіз.-хім. характеристика отриманих зразків). (*Scopus*).

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Обґрунтування загальної концепції досліджень

Згідно з рекомендаціями FDA «Guidance for industry Liposome Drug Products», ЕМА, та монографії ДФУ 2.0 [31 – 33] ЛС продукти складаються з таких компонентів: АФІ; ліпіди; неліпідні компоненти ЛС; неліпосомні неактивні інгредієнти (напр., буферні компоненти).

Головним фактором, від якого залежить ефективність ЛС-ЛЗ для місцевого застосування, є здатність АФІ впливати на стан патологічного процесу. Саме тому розробка таких ЛС-ЛЗ, передусім, полягає у пошуку ефективних АФІ, та виборі їх носія. Одним із головних завдань при розробці ЛС-ЛЗ є вибір ФЛ та їх співвідношення, які будуть забезпечувати належну стабільність та фармакологічну дію таких ЛС-ЛЗ.

АФІ та допоміжні речовини, які використовують при виробництві ЛС-ЛЗ, мають витримувати вимоги загальної монографії «Субстанції для фармацевтичного застосування» [80], та вимоги відповідних монографій Фармакопеї України [81]. Конкретні ЛЗ, окрім вимог, наведених у цій монографії, також мають відповідати вимогам відповідних загальних статей на таку дозовану лікарську форму.

Вибір фосфоліпідної основи до складу ЛС має бути обґрунтований майбутнім призначенням ЛЗ, його ефективністю, безпечністю, і стабільністю протягом терміну придатності. Для отримання ЛС можуть бути використані природні, напівсинтетичні або синтетичні ліпіди, які можуть розщеплюватися або не розщеплюватися в організмі.

Фармакологічні й токсикологічні властивості ЛС-ЛЗ залежно від складу препарату можуть значно варіюватися. Тому слід чітко специфікувати й обґрунтувати склад препарату та межі вмісту кожного компонента.

Спосіб та параметри виробництва ЛС-ЛЗ мають дозволяти постійно отримувати серії, аналогічні серіям з підтвердженою клінічною ефективністю та безпекою для людини. Оскільки ЛС особливо чутливі до зміни технологічного процесу й масштабування, необхідно чітко ідентифікувати й оцінити критичні виробничі параметри (метод інкапсуляції, температуру, розмір часток, заряд та ін.) при проведенні технологічних процесів. Слід установити специфікації для проміжних продуктів та ЛЗ. Мають бути проведені й описані всі заходи щодо визначення та підтримання стабільності препарату.

Із урахуванням вищевикладеного нами було розроблено такий план досліджень:

- обґрунтування та вибір складу Cyt-LS;
- обґрунтування лікарської форми;
- розробка оптимальної дослідно–промислової технології виготовлення Cyt-LS;
- проведення фізико–хімічних досліджень розробленого Cyt-LS та розробка проєкту МКЯ;
- проведення апробації промислової технології виробництва Cyt-LS за проєктом регламенту виробництва та МКЯ в умовах ТОВ «Наномедтех» (м. Київ);
- визначення впливу умов зберігання на стабільність отриманих зразків Cyt-LS;
- визначення специфічної активності Cyt-LS;
- упровадження в освітньо–науковий процес ЗВО фармацевтичного та медичного профілю результатів проведених досліджень.

2.2 Характеристика діючої та допоміжних речовин

У дослідженнях нами були використані: природна речовина – цитохром С як діюча речовина, сучасні ФЛ природного та напівсинтетичного походження, а також інші допоміжні речовини (регулятори рН, кріопротектори), що широко застосовуються для розробки лікарських засобів.

2.2.1 Цитохром С

Цитохром С – низькомолекулярний гемовмісний білок, що належить до класу цитохромів, містить у структурі гем типу С.

Назва активної субстанції: Цитохром С (із серця коней).

Міжнародна непатентована назва: Cytochrome C.

Структурна формула зображена на рис. 2.1.

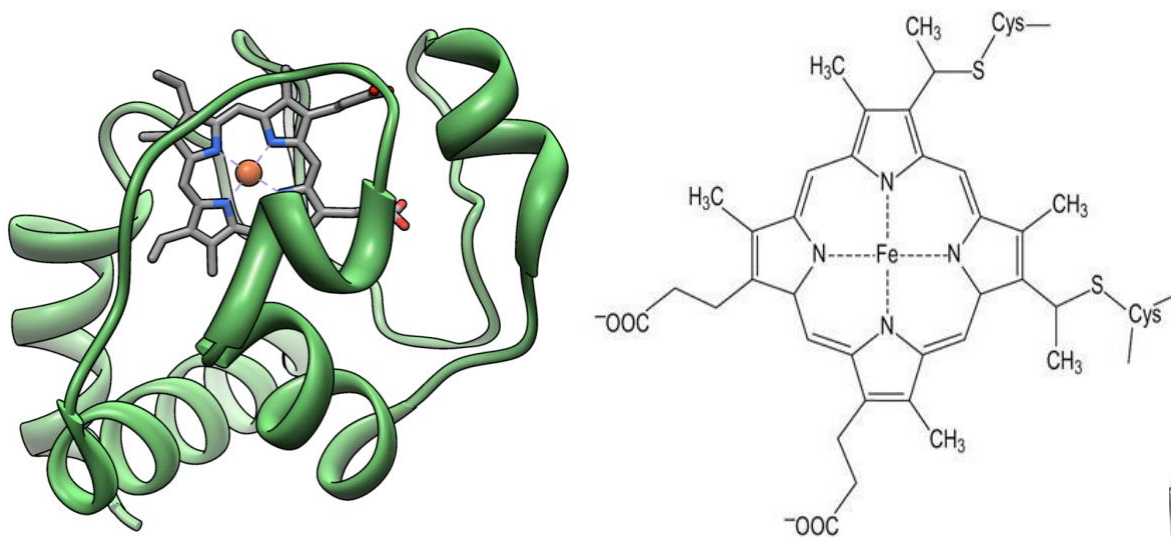


Рис. 2.1 Структурна формула цитохрому С

Молекулярна маса: Близько 12 кДа. CAS номер: 9007–43–6.

Загальні властивості:

Цитохром С – протеїн класу цитохромів, що містить гем типу С. Аморфний порошок темно-червоного кольору. Помірно розчинний у воді. Цитохром С є

ферментом, який бере участь у процесах тканинного дихання. Залізо, яке міститься у простетичній групі цитохрому С, здатне зворотно переходити з окисної у відновлювальну форму. Уведення цитохрому С збільшує його вміст у тканинах, нормалізує та прискорює окисно–відновні реакції, утилізацію кисню та зменшує гіпоксію. Цитохром С має цитопротекторні, антигіпоксичні та антиоксидантні властивості [82 – 84].

Виробник субстанції: Farmasino pharmaceuticals (Jiangsu) Co., ltd., Китай.

Стабільність та умови зберігання субстанції цитохрому С вивчались виробником при різних температурних режимах $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, $(+5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$, $(+20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ при зберіганні у запаяних подвійних поліетиленових пакетах, поміщених у пластикові банки. Вся речовина зберігалась в атмосфері азоту в захищеному від світла місці.

На підставі вивчення стабільності рекомендовано зберігати субстанцію у подвійних поліетиленових пакетах, вміщених у зовнішні пакети з алюмінієвої фольги, або у поліетиленових пляшках, заповнених азотом при температурі $(-20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, у захищеному від світла місці. За таких умов субстанція придатна протягом 2 років.

2.2.2 Фосфатидилхолін яєчний

Фосфатидилхолін яєчний Lipoid E PC S – високоочищений фосфатидилхолін (ФХ), отриманий із курячого яйця, ступінь чистоти якого складає не менше 96,0 %.

Назва активної субстанції: Фосфатидилхолін яєчний.

Міжнародна непатентована назва: Phosphatidylcholine, egg.

Хімічна назва: 1,2–діацил–sn–гліцеро–3–фосфохолін, отриманий із яйця.

Молекулярна формула: $\text{C}_{42}\text{H}_{82}\text{NO}_8\text{P}$.

Структурна формула наведена на рис. 2.2.

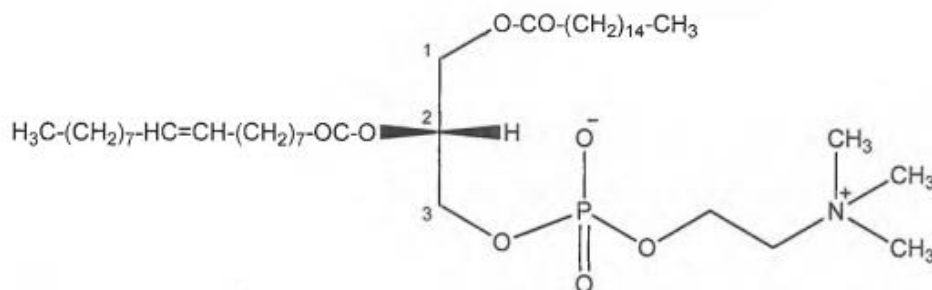


Рис. 2.2 Структурна формула фосфатидилхоліну яєчного

Молекулярна маса: Молекулярні маси ФЛ залежать від складу їх ацильних груп. Основними компонентами яєчного ФХ (Lipoid E PC) є 1–пальмітоїл–2–олеоїл–фосфатидилхолін (ММ 760) та 1–стеароїл–2–олеоїл–фосфатидилхолін (ММ 788). Розрахункова маса ФХ Е РС складає приблизно 775.

CAS номер: 97281–44–2

Загальні властивості:

ФХ яєчний (LIPOID E PC S) – речовина природного походження, яка належить до групи ФЛ, пористі тверді агломерати від білого до світло-жовтого кольору з характерним запахом. Диспергується водою з утворенням емульсії (5 % розчин при 20°C), легко розчиняється в етанолі (96 %) Р, хлороформі Р. Вміст фосфатидилхоліну – не менше 96,0 %; фосфатидилетаноламіну – не більше 0,1%; лізофосфатидилхоліну – не більше 1,0 %; сфінгомієліну – не більше 1,0 %. ФХ яєчний використовують як основний мембраноутворювальний ліпід. ФХ утворює штучні мембрани (ЛС) [85 – 87].

Виробник субстанції: Lipoid GmbH, Німеччина.

Стабільність та умови зберігання субстанції вивчались виробником в різних температурних режимах: $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$, $(+5 \pm 3)^\circ\text{C}$, $(+20 \pm 2)^\circ\text{C}$ та $(+35 \pm 2)^\circ\text{C}$, при зберіганні у запаяних подвійних поліетиленових пакетах, поміщених в алюмінієву фольгу, та в поліетиленових пляшках. Уся речовина зберігалась в атмосфері азоту в захищеному від світла місці.

Установлено, що залежно від виду пакування відбувається збільшення кількості води та накопичуються продукти гідролізу ФЛ: збільшення перекисного числа та кількості ЛФХ.

За результатами вивчення стабільності рекомендовано зберігати субстанцію у подвійних поліетиленових пакетах, поміщених у зовнішні пакети з алюмінієвої фольги або у поліетиленових пляшках, заповнених азотом, при температурі $(-20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ у захищеному від світла місці. За таких умов субстанція придатна протягом 3 років.

Молекулярні сполуки, знайдені у LIPOID E PC, були вивчені за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та мас–спектрометричним методом іонізації, розпиленням в електричному полі та підтверджені дослідженнями фірми–виробника.

Субстанцію використовують як основний мембраноутворювальний ліпід.

2.2.3 Дипальмітоїлфосфатидилгліцерол

Дипальмітоїлфосфатидилгліцерол (ДПФГ) Lipoid PG 16:0/16:0(DPPG–Na) – синтетичний ФЛ, отриманий шляхом ферментативної обробки синтетичного Dipalmitoyl–sn–glycero–3–phosphocholine.

Назва активної субстанції: Дипальмітоїлфосфатидилгліцерол (ДПФГ).

Інші назви: 1,2–Dihexadecanoyl–sn–glycero–3–phospho–(1'–rac–glycerol) sodium salt, L– α –Phosphatidyl–DL–glycerol, dipalmitoyl, DPPG–Na, Hexadecanoic acid 1–[[[(2,3–dihydroxypropoxy)hydroxyphosphinyl]oxy]methyl]–1,2–ethanediyl ester, PG 16:0/16:0.

Хімічна назва: 1,2–Dipalmitoyl–sn–glycero–3–phospho–rac–(1–glycerol) sodium salt.

Коротка назва: DPPG–Na (dipalmitoylphosphatidylglycerol – Na salt).

Структурна формула наведена на рис. 2.3.

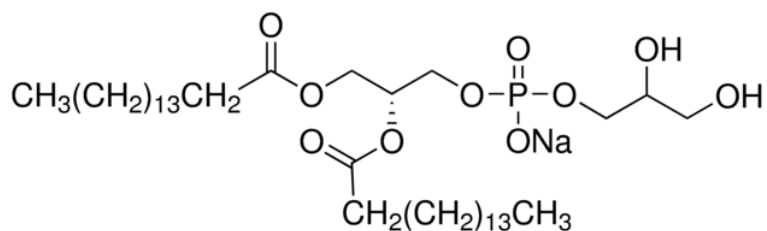


Рис. 2.3 Структурна формула дипальмітоїлфосфатидилгліцеролу

Молекулярна формула: $C_{38}H_{74}O_{10}PNa$.

Молекулярна маса: 745 г/моль.

CAS номер: 67232–81–9

Загальні властивості:

порошок білого кольору. Диспергується у воді при 50 °С, не розчиняється в етанолі при 20 °С, частково диспергується в хлороформі при 20 °С, розчиняється у суміші хлороформ/метанол/вода (65/25/4). Оптичне обертання 2 % розчину в суміші хлороформ/метанол/вода (65/25/4) $[\alpha]_{25^\circ}^{589 \text{ нм}}$: +5° до +9°С [88, 89].

Виробник субстанції: Lipoid GmbH, Німеччина.

Стабільність та умови зберігання субстанції.

Стабільність ДПФГ вивчалась виробником у різних температурних режимах: $(-18 \pm 2)^\circ\text{C}$, $(+5 \pm 3)^\circ\text{C}$, $(+20 \pm 2)^\circ\text{C}$ та $(+35 \pm 2)^\circ\text{C}$ при зберіганні у запаяних подвійних поліетиленових пакетах, поміщених в алюмінієву фольгу. Вся речовина зберігалась в атмосфері азоту в захищеному від світла місці.

Установлено, що залежно від виду пакування відбувається збільшення кількості води та накопичуються продукти гідролізу ФЛ.

За результатами вивчення стабільності рекомендовано зберігати субстанцію у подвійних поліетиленових пакетах, поміщених у зовнішні пакети з алюмінієвої фольги або у поліетиленових пляшках, заповнених азотом, при температурі $(-18 \pm 2)^\circ\text{C}$ в захищеному від світла місці. За таких умов субстанція придатна протягом 5 років.

Молекулярні сполуки, знайдені у ДПФГ (Lipoid PG 16:0/16:0), були вивчені за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та мас-спектрометричним методом іонізації, розпиленням в електричному полі та підтверджені дослідженнями фірми–виробника.

Субстанції використовують як допоміжний мембраноутворювальний ліпід.

2.2.4 Допоміжні речовини

При розробці ЛС форми цитохрому С використовували такі допоміжні речовини:

Назва допоміжно речовини	Функціональне призначення
Лактоза моногідрат (ДФУ)	Стабілізатор, кріопротектор
Трегалози дигідрат (DMF)	Стабілізатор, кріопротектор
Калію дигідрофосфат (ДФУ)	Компоненти буферу
Динатрію фосфат (ДФУ)	Компоненти буферу
Вода для ін'єкцій (ДФУ)	Розчинник

Допоміжні речовини, що використовуються для виробництва лікарського засобу, відповідають вимогам монографій ДФУ 2.0 та розроблених специфікацій за вхідним контролем.

Лактоза моногідрат

Міжнародна непатентована назва: Lactose monohydrate.

Хімічна назва: β -D-галактопіранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкоза.

Структурна формула наведена на рис. 2.4.

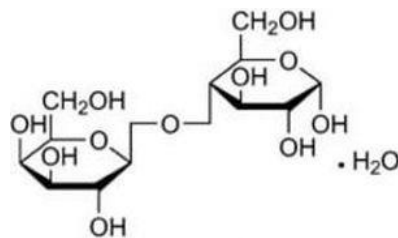


Рис. 2.4 Структурна формула лактози моногідрату

Молекулярна формула: $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$

Молекулярна маса: 360,31. CAS номер: 5989–81–1.

Загальні властивості:

Лактоза являє собою кристалічний порошок білого або майже білого кольору. Легко, але повільно розчиняється у воді Р, практично не розчиняється у 96% етанолі Р. Питоме оптичне обертання – від $+54,4^{\circ}\text{C}$ до $+55,9^{\circ}\text{C}$, важкі метали – не більше 5ppm, вода – від 4,5 до 5,5 %, сульфатна зола – не більше ніж 0,1 %, мікробіологічна чистота: загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів – не більше ніж 102 (аеробних бактерій та грибів сумарно) у грамі [90].

Використовують як стабілізатор, кріопротектор.

Трегалози дигідрат

Назва субстанції: Трегалоза дигідрат.

Міжнародна непатентована назва: Trehalose dihydrate.

Хімічна назва: (2R,3S,4S,5R,6R)–2–(Hydroxymethyl)–6–[(2R,3R,4S,5S,6R)–3,4,5–trihydroxy–6–(hydroxymethyl)oxan–2–yl]oxyoxane–3,4,5–triol.

Структурна формула наведена на рис. 2.5.

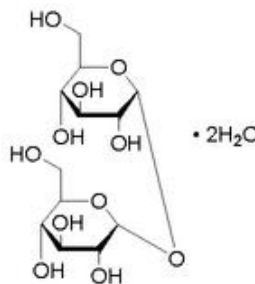


Рис. 2.5 Структурна формула трегалози дигідрату

Молекулярна формула: $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$.

Молекулярна маса: 378.327. CAS номер: 6138–23–4

Загальні властивості:

Трегалоза являє собою порошок білого або майже білого кольору, добре розчиняється у воді, не має запаху. Вміст води в трегалозі – не більше 10,5%, чистота – більше 99,0 %. Температура плавлення (97–104) °C, важких металів не більше ніж 10 ppm; специфічне обертання +178 – +185° [91].

Використовують в якості стабілізатора, кріопротектора.

Калію дигідрофосфат

Назва субстанції: Калію дигідрофосфат.

Міжнародна непатентована назва: Potassium dihydrogenphosphate.

Хімічна назва: Potassium dihydroxidodioxidophosphate(1–).

Структурна формула наведена на рис. 2.6.

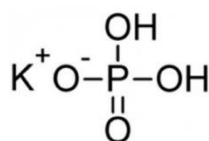


Рис. 2.6 Структурна формула калію дигідрофосфату

Молекулярна формула: KH_2PO_4

Молекулярна маса: 136,086.

CAS номер: 7778–77–0

Загальні властивості:

Містить від 98 до 100,5% основної речовини у перерахунку на суху речовину. Легко розчиняється у воді Р, практично не розчиняється у 96 % етанолі Р. Показник рН від 4,2 до 4,5, втрата в масі при висушуванні $\leq 1,0$ %, хлориди – не більше 0,001 % (10 ppm), сульфати – не більше 0,02 % (200 ppm), арсен – не більше 0,0001 % (1 ppm), залізо – не більше 0,001 % (10 ppm), натрій – не більше 0,1 %, важкі метали – не більше ніж 0,001 % (10 ppm) [92].

Використовують як компонент буферу.

Динатрію фосфат

Назва субстанції: Disodium phosphate.

Хімічна назва: Sodium hydrogen phosphate.

Структурна формула представлена на рис. 2.7.

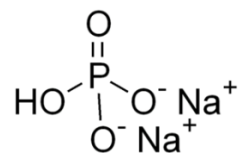


Рис. 2.7 Структурна формула динатрію фосфату

Молекулярна формула: Na_2HPO_4

Молекулярна маса: 141,96. CAS номер: 7558–79–4

Загальні властивості:

Являє собою кристалічний порошок білого кольору. Містить від 98 до 100,5% основної речовини. Розчиняється у воді Р, практично не розчиняється в 96 % етанолі Р. Втрата в масі при висушуванні – не більше 1,0 %. рН від 8,4 до 9,6. Хлориди – не більше ніж 0,005 % (50 ppm), сульфати – не більше ніж 0,02 %, арсен – не більше ніж 0,0002 % (2 ppm), залізо – не більше ніж 0,002 % (20 ppm), натрій – не більше ніж 0,1 %, важкі метали – не більше ніж 0,002 % (20 ppm) [93].

Використовують як компонент буферу.

Вода для ін'єкцій

Вода для ін'єкцій стерильна має бути прозорою та безбарвною, без запаху та смаку. Ендотоксини $\leq 0,25$ МО/мл, хлориди ($\leq 0,5$ ppm), сульфати (протягом 1 год видимі зміни розчину мають бути відсутні), солі амонію ($\leq 0,2$ ppm), нітрати ($\leq 0,2$ ppm), важкі метали ($\leq 0,1$ ppm).

Використовується як розчинник для приготування експериментальних зразків [94].

2.3 Характеристика методів дослідження

Визначення розміру ЛС часток.

Розмір часток визначали методом динамічного світлорозсіювання на приладі Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) [98 – 101]. Розмір часток вимірювали за такими умовами: довжина хвилі – 375 нм, температура зразка – 30°C. Прилад дозволяє визначати розмір часток від 1 нм до 5000 мкм.

Візуалізація ЛС часток.

Проводили методом сканувальної електронної мікроскопії. Зразок Cyt-LS наносили на мідну сіточку, покриту тонким шаром вуглецю. Зразок контрастували 2 % розчином уранілацетату. Далі готовий зразок досліджували на сканувальному електронному мікроскопі Tescan Mira 3 LMU (Czech Rep.) із використанням STEM детектора, який дозволяє проводити дослідження в режимі сканування з детекцією сигналу, що пройшов через зразок [101].

pH Cyt-LS вимірювали на Schott instruments Lab860 (Німеччина) [98 – 101].

Осмолярність Cyt-LS визначали на осмометрі Gonotec OSMOMAT 3000 (Німеччина) [98 – 101].

Втрата в масі при висушуванні.

Близько 0,2 г (точна наважка) ліофілізату Cyt-LS сушили у вакуум-сушильній шафі при тиску 1,5–2,5 КПа і температурі (60 ± 1) °C протягом 3 год [100].

Залишкові органічні розчинники.

Визначення проводили методом газової хроматографії відповідно до вимог ДФУ 5.4, 2.4.24.

Умови хроматографування:

- колонка: DB–624 (№ USA149855H) розмірами 30 м · 0,32 мм або аналогічна, для якої виконуються вимоги придатності хроматографічної системи;

- температура печі: початкова – 35°C, витримка – 5 хв; 40 °C/хв до 180°C, витримка – 4 хв;
- газ-носії: азот; швидкість газу-носія – 2 мл/с, розподіл потоку 3,4:1;
- температура детектора – 250 °C;
- температура інжектора – 180 °C;
- введення проби (газ) – 2,5 мл;
- температура флакона – 90°C; температура спіралі – 100°C; температура передаточної лінії – 100°C;
- час ГХ-циклу – 28 хв; час герметизації – 0,1 хв; час наповнення спіралі – 0,1 хв; час установлення рівноваги у спіралі – 0,05 хв; час уведення – 0,2 хв.

Придатність хроматографічної системи:

– значення відносного стандартного відхилення для площі піка етанолу на хроматограмі шести заколів стандартного розчину не перевищує 10 %.

Розрахунок вмісту залишкових органічних розчинників у продукті

Вміст етанолу (ppm) та хлороформу (ppm) в продукті визначають за формулою:

$$X \text{ (ppm)} = \frac{\frac{A_U}{A_{int.st.}} \cdot c_{St}}{\frac{A_{St}}{A_{int.st.}} \cdot c_U} \cdot 10^6,$$

де

A_U – площа відповідного піка на хроматограмі випробовуваного розчину;

A_{St} – площа відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння;

$A_{int.st.}$ – площа відповідного піка на хроматограмі розчину внутрішнього стандарту;

c_{St} – концентрація розчинника у розчині порівняння, мг/мл;

c_U – вміст зразка у випробовуваному розчині, мг/мл. $c_U = \frac{m_{нав}}{2}$.

Однорідність маси для одного флакона. Випробування проводили відповідно до ДФУ 2.9.5.

Механічні включення: невидимі частки. Випробування проводили відповідно до вимог ДФУ, 2.9.19 методом світлоблокування, використовуючи прилад для автоматичного визначення кількості часток розміром ≥ 25 та ≥ 10 мкм, APSS–2000, або аналогічний, конфігурація: EP (2.9.19) SVP, об'єм контейнера – 10 мл.

2.4 Якісне та кількісне визначення діючих речовин

Ідентифікація цитохрому C

Визначення проводили на спектрофотометрі Shimadzu UV–1800 (Японія) УФ-спектр розчину в кюветах із товщиною шару 10 мм у діапазоні 400–600 нм має відповідати спектру поглинання розчину стандарту Cyt–C і мати максимум поглинання при (409 ± 2) нм [98 – 101].

Кількісне визначення цитохрому C

Загальну концентрацію цитохрому C (C_{total}) у Cyt-LS кількісно визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Shimadzu UV1800 (Японія), використовуючи УФ-спектр поглинання розведеної емульсії Cyt-LS в діапазоні 400–560 нм [98 – 102].

Визначення неінкапсульованого цитохрому C (C_{free}). Проводили методом гель–хроматографії на рідинному хроматографі Shimadzu (Японія) [98 – 103].

Умови хроматографування: хроматографічна колонка Tricorn (GE Healthcare, Швеція) заповнена сорбентом superose 12; рухома фаза – 4,515 г/л KH_2PO_4 , pH 6,0 (за допомогою 2М NaOH); швидкість рухомої фази – 0,5 мл/хв; детектування при довжині хвилі 409 нм; температура колонки – 25°C.

Ступінь інкапсуляції (EE) обчислювали за формулою:

$$EE\% = [(C_{\text{total}} - C_{\text{free}}) / C_{\text{total}}] \cdot 100.$$

Кількісне визначення фосфоліпідного складу та їх домішок

Визначення проводили на рідинному хроматографі Shimadzu LC20 (Японія) [99, 101, 104]. Як стандарт ФЛ використовували розчини стандартів ФХ, ДПФГ, ЛФХ. Приготовлені зразки Cyt-LS і стандарти ФЛ розчиняли в суміші хлороформ : метанол : вода (74 : 23 : 3).

Розчини почергово хроматографували за таких умов: колонка PerfectChrom 100 Diol 0,125 м · 4 мм, 5μm, температура колонки – 55 °С, детектор ELSD Sedere SEDEX 85 (Франція), об'єм проби – 20 мкл. Рухома фаза: А) 1341,6 г гексану, 334,1 г пропанолу, 39,4 г оцтової кислоти, 1,45 г триетиламіну; В) 663,5 г 2–пропанолу, 140,0 г води, 15,8 г оцтової кислоти, 0,58 г триетиламіну (табл. 2.1.).

Таблиця 2.1

Програма градієнта

Час, хв	Швидкість рухомої фази, мл/хв	фаза А, % об.	фаза В, % об.
0	1,0	95	5
5,0	1,0	80	20
8,5	1,0	60	40
15,0	1,0	0	100
17,5	1,0	0	100
17,6	1,0	95	5
21,0	1,0	95	5
22,0	2,0	95	5
27,0	2,0	95	5
29,0	1,0	95	5

Вміст ФХ, ДПФГ та ЛФХ у випробовуваному розчині (мг/мл) розраховували за відповідними калібрувальними прямими розчинів стандартів ФЛ [99, 101, 104].

2.5 Методи проведення мікробіологічних та фармакологічних досліджень

Стерильність

Випробування на стерильність проводили методом мембранної фільтрації закритого типу Steritest.

Емульсію Cyt-LS фільтрують крізь два мембранні фільтри, попередньо зволожені водою. Після закінчення фільтрації кожний фільтр відмивають однією порцією (по 100 мл стерильної води). Одну ємність заповнюють тіогліколевим поживним середовищем, другу – соєво-казеїновим поживним середовищем. Посіви в тіогліколевому середовищі інкубують при температурі (30–35)°C. Посіви в соєво–казеїновому середовищі інкубують при температурі (20–25)°C.

Усі посіви інкубують протягом 14 діб. При візуальному спостереженні не має бути зростання мікроорганізмів [101].

Вивчення специфічної активності Cyt-LS in vivo на моделі ураження рогівки

Дослідження специфічної активності Cyt-LS проводили на моделі проникного поранення рогівки ока порівняно з неліпосомальною формою цитохрому С (очні краплі цитохрому С виробництва «Самсон–Мед»).

Рогівку травмували шляхом нанесення поранення лезом скальпеля в оптичній зоні лівого ока кроля. Після моделювання патології та відбору тварин були сформовані досліджувані групи: 8 груп по 10 тварин. Дослідження стану поверхневих структур ока проводили за допомогою огляду переднього відділу ока щілинною лампою. Оцінка стану поверхневих структур ока проводилася до нанесення ушкодження і потім – щодня протягом 10 днів [99, 105].

Критеріями оцінки специфічної фармакологічної активності досліджуваного препарату були інфільтрація рогівки та випіт фібрину.

Дослідження проводились на базі ЗАТ «Санкт–Петербурзький інститут фармації», РФ.

Вивчення специфічної активності Cyt-LS in vivo на моделі світлової катаракти у кролів

Світлову катаракту моделювали за допомогою загального опромінення тварин поліхромним світлом у діапазоні довжин хвиль 350–1150 нм (щільність потоку світлової енергії – 30 мВт/см², напруга – 220 В, потужність – 750 Вт) дуговою ртутно–вольфрамовою лампою типу ДРВ–750 протягом 26 тижнів у режимі світлового дня протягом 9 годин.

24 тварини були порівню розділені на 3 групи: 1 група – контроль (інстиляції фізіологічного розчину), 2 – контроль (інстиляції препарату порівняння Офтан Катахром) та 3 – дослідна (інстиляції Cyt-LS). Інстиляції препаратів (тричі на день) починали з 21–го тижня після відтворення моделі та продовжували 6 тижнів.

На 27 тижні дослідження та після завершення 6–тижневого лікування тварин виводили з експерименту в стані глибокого наркозу (1 мл 10 % розчину тіопенталу натрію на 1 кг маси) методом повітряної емболії. Енуклеацію очей та гомогенізацію кришталика проводили на льоду при температурі 0–5 °С.

Забір вологи передньої камери проводили до початку експерименту, після 20 тижнів світлового впливу і на 27 тижні після завершення інстиляцій досліджуваних препаратів під місцевою анестезією (2 % алкаїн) через парацентез за допомогою інсулінового шприца об'ємом 0,1 мл.

Критеріями оцінки специфічної фармакологічної активності досліджуваного препарату були: клінічні ознаки призупинення помутніння кришталика, вплив на ферментативну систему кришталика та водянистої вологи, еластометричні характеристики очей кролів [106, 107].

Дослідження проводились на базі ДУ «Інституту очних хвороб і тканинної терапії імені В. П. Філатова НАМН України», м. Одеса.

Вивчення специфічної активності in vitro

На спектрофотометрі Shimadzu UV1800 (Японія) порівнювали УФ-спектри поглинання відновленої й окисненої форм розчину Cyt-LS порівняно з розчином субстанції цитохрому С і в ділянці 190-600 нм.

Відновлену форму цитохрому С отримували шляхом додавання натрію дитіоніту у водні розчини Cyt-LS та субстанції цитохрому С. Після чого цитохром С окиснювали, додаючи в ті самі розчини фериціанід калію [101].

2.6 Статистична обробка результатів дослідження

Для всіх даних була застосована описова статистика – дані перевірені на нормальність розподілу. Частина експериментальних даних була подана в балах і аналізувалася із застосуванням непараметричних методів описової статистики. Визначали медіану та квартильний розмах. Міжгрупові відмінності були проаналізовані непараметричним методом – за критерієм Манна–Уїтні для залежних і незалежних змінних для множинних порівнянь. Рівень значущості відмінностей склав 0,05. Статистичний аналіз виконувався за допомогою програмного забезпечення Statistica (StatSoft, США) та Excel (Microsoft, США).

Висновки до розділу 2

1. Обґрунтована загальна концепція досліджень. За рекомендаціями та вимогами ДФУ, FDA, ЕМА розроблений план досліджень, необхідний для пошуку оптимального складу та розробки технології очних крапель Cyt-LS.
2. Проведена характеристика діючої та допоміжних речовин, проаналізовані вимоги до якості очних крапель Cyt-LS.
3. Здійснений вибір методів дослідження, необхідних для фармацевтичної розробки та оцінки якості очних крапель Cyt-LS відповідно до вимог ДФУ.

Результати досліджень за даним розділом наведено у таких публікаціях:

1. Katsai O., Ruban O. Preparation And Characterization Of Liposomal Delivery System Of Natural Heme Protein. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. P. 418–425. (Особистий внесок: розробка методів отримання та характеристики ліпосомальної форми цитохрому С, експериментальне дослідження впливу технологічних параметрів на ключові показники якості (розмір часток, домішки, стерильність), дослідження специфічної активності *in vitro*; оформлення та підготовка статті до друку).
2. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopol'skyi Y. M. "Quality-by-design" approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C. *Pharmakeftiki*. 2018. T. 30. №. 2. С. 76-87. (Особистий внесок: розробка підходу QbD при виборі лікарської форми ліпосомальної форми цитохрому С, дослідження впливу типу, концентрації кріопротектора, та параметрів ліофілізації на критичні показники якості; оформлення та підготовка статті до друку).
3. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopol'skyi Y. M. Preparation and *in-vivo* evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. *Die Pharmazie-An International*

Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017. Т. 72. №. 12. С. 736–740. (Особистий внесок: розробка технології отримання, методів контролю та вивчення стабільності отриманих зразків ліпосомальної форми цитохрому С, оформлення та підготовка статті до друку).

4. Katsai O., Ruban O., Krasnopolskyi Y. Влияние состава липосом на степень инкапсуляции и размер частиц при создании липосомальной формы цитохрома С. *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. 2017. №. 4 (8). С. 32–36. (Особистий внесок: експериментальне дослідження впливу складу ліпосом на ступінь інкапсуляції та розмір часток, оформлення та підготовка статті до друку).

5. Пилипенко Д. М., Кацай А. Г., Прохоров В. В. и др. Исследование антиаритмической активности липосомальной формы цитохрома С. *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. 2017. №. 3 (7). С. 51–57. (Особистий внесок: отримання зразків ліпосомального цитохрому С, фіз.–хім характеристика отриманих зразків).

6. Кацай О. Г., Прохоров В. В., Грігор'єва Г. С., Краснопольський Ю.М. Розробка та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах. *Фармацевтичний журнал*. 2016. № 5 С. 69–75 (Особистий внесок: розробка та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах, оформлення та підготовка статті до друку).

7. Кацай А. Г., Рубан Е. А. Определение фосфолипидного состава липосом с цитохромом С методом ВЭЖХ. *Современные аспекты создания экстенпоральных алопатических, гомеопатических и косметических лекарственных средств* : I Междунар. науч.-практ. интернет-конф., 3-4 марта 2017 г. Харьков, 2017. Вип. 2. С. 98. (Особистий внесок: розробка визначення фосфоліпідного складу ліпосом з цитохромом С, оформлення та підготовка статті до друку).

8. Спосіб отримання фармакологічно активної ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та ліпосомальна композиція, отримана таким способом :

пат. 118583 України / Григор'єва Г. С., Кацай О. Г., Краснопольський Ю. М., Прохоров В. В., Хромов О. С., Пасєчнікова Н. В., Добреля Н. В. № а 201610776 ; заявл. 27.10.2016 ; опубл. 11.02.2019, Бюл. № 3. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, опис заявки, участь у підготовці патентної формули).

9. Способ получения липосомальной формы цитохрома С : пат. 22183 РФ / Шоболов Д. Л., Краснопольский Ю. М., Ульянов А. М., Натыкан А. А., Тарасов В. В., Балабаньян В. Ю., Швец В. И., Кацай А. Г. ; Евразийское патентное ведомство № 201201592 ; заявл. 24.12.2012 ; опубл. 30.11.2015. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, написання опису заявки, участь у підготовці патентної формули).

10. Method of producing of pharmacologically active liposomal composition containing cytochrome c, and liposomal composition obtained by this method : pat. 2018/0116957 A1 US / Grygor'ieva G. S., Katsai O. H., Krasnopskyi Y. M., Prokhorov V. V., Khromov O. S., Pasyechnikova N. V., Dobrelia N. V. № а 201610776 ; appl. 25.10.2017 ; publ. 03.05.2018. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, опис заявки, участь у підготовці патентної формули).

РОЗДІЛ 3

ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ ЦИТОХРОМУ С

3.1 Дослідження фізико–хімічних і технологічних властивостей діючої речовини та фосфоліпідів

Першим етапом наших досліджень було визначення відповідності субстанції цитохрому С вимогам якості до субстанції, що використовується при фармацевтичній розробці як діюча речовин. Визначення фізико–хімічних характеристик діючої речовин на етапі, що передує вибору складу, впливає на подальший вибір допоміжних речовин препарату.

3.1.1 Цитохром С

У розробці потенційного ЛЗ використовувалась субстанція цитохрому С виробництва «Farmasino pharmaceuticals (Jiangsu) Co., ltd.», Китай.

Для здійснення вхідного контролю відповідно до [80, 95, 96] та специфікації виробника нами була розроблена специфікація на діючу речовину цитохром С. До специфікації на діючу речовину включені такі показники: опис, розчинність, рН, ідентифікація методами ВЕРХ та абсорбційної спектрофотометрії у видимій ділянці спектра, прозорість розчину, чистота, залізо, вода, бактеріальні ендотоксини, мікробіологічна чистота, кількісне визначення.

Згідно з розробленим проєктом специфікації були досліджені фізико–хімічні та мікробіологічні показники субстанції, що використовується. Результати дослідження наведені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

**Дослідження фізико–хімічних та мікробіологічних показників субстанції
цитохрому С**

Farmasino pharmaceuticals (Jiangsu) Co., ltd., Китай Lot 151026		
Показник	Вимоги НД	Результат
Опис	Аморфний порошок темно–червоного кольору	Відповідає
Розчинність	Помірно розчинний у воді <i>P</i>	Відповідає
Ідентифікація	Спектр поглинання розчину В субстанції цитохрому С в ділянці від 250 до 600 нм повинен мати максимуми поглинань при довжинах хвиль (408 ± 2) та (530 ± 2) нм	Відповідає
1)	Спектр поглинання розчину В субстанції цитохрому С у відновленій формі в області від 250 до 600 нм повинен мати максимуми поглинань при довжинах хвиль (415 ± 2) , (520 ± 2) та (550 ± 2) нм	Відповідає
2)		
3)	На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основний пік із таким самим часом утримування, що й основний пік на хроматограмі стандартного розчину	Відповідає
pH	Від 5,0 до 7,0	6,4
Прозорість розчину	Розчин А субстанції цитохрому С має бути прозорим	Відповідає
Чистота	Мають виконуватися співвідношення: 1) $\frac{A_{550}^{red}}{A_{550}^{ox}} \geq 3$ 2) $\frac{A_{550}^{red}}{A_{520}^{ox}} \geq 1,7$ 3) $\frac{A_{550}^{red}}{A_{280}^{ox}} \geq 1$	$\frac{A_{550}^{red}}{A_{550}^{ox}} \geq 3,17$ $\frac{A_{550}^{red}}{A_{520}^{ox}} \geq 2,9$ $\frac{A_{550}^{red}}{A_{280}^{ox}} \geq 1,23$
Залізо	Не менше 0,40 % і не більше 0,46 %.	0,44 %
Вода	Не більше 10 %	6,78 %
Бактеріальні ендотоксини	Не більше 5,0 ЕО/мг	Відповідає
Мікробіологічна чистота	Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – не більше 10^3 КУО/г; (ТУМС) – не більше 10^2 КУО/г. Толерантних до жовчі грамнегативних бактерій – не більше 10^2 КУО/г Не допускається наявність бактерій сімейства <i>Escherihia coli</i> в 1 г Не допускається наявність <i>Salmonella</i> в 10 г Не допускається наявність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г	Відповідає
Кількісне визначення	Не менше 97,0 % і не більше 103,0 % цитохрому С у перерахунку на суху речовину	99,8 %

Другим етапом дослідження було визначення фізико–хімічних характеристик ФЛ, що будуть використовуватись при розробці Cyt-LS.

3.1.2 Фосфатидилхолін яєчний

Для виробництва Cyt-LS використовувалась субстанція ФХ яєчний (Lipoid E PC S), виробництва «Lipoid GmbH», Німеччина. Відповідно до Настанови 42–3.2:2004 [95], вимог ДФУ [80], USP [97] та специфікації виробника на субстанцію ФХ яєчний була розроблена специфікація вхідного контролю.

До специфікації були включені такі показники: опис, розчинність, ідентифікація, прозорість розчину, забарвлення розчину, родинні ФЛ, супутні домішки, DL- α -токоферол, вода, перекисне число, йодне число, важкі метали, залишкові органічні розчинники, бактеріальні ендотоксини, мікробіологічна чистота, кількісне визначення.

Згідно з розробленим проектом специфікації були досліджені фізико–хімічні та мікробіологічні показники субстанції, що використовувалась. Результати дослідження наведені в табл. 3.2. Як стандарт ФХ яєчного був використаний ФХ Lipoid E PC RS, виробництва «Lipoid GmbH», Німеччина.

Таблиця 3.2

Дослідження фізико–хімічних та мікробіологічних показників субстанції ФХ

Lipoid GmbH, Німеччина Lot 199377		
Показник	Вимоги НД	Результат
1	2	3
Опис	Пористі тверді агрегати від білого до світло-жовтого кольору	Відповідає
Розчинність	Диспергується водою з утворенням емульсії, легко розчиняється в <i>етанолі (96 %)</i> <i>P</i> та <i>хлороформі P</i>	Витримує
Ідентифікація	R_f основної плями на хроматограмі випробовуваного розчину має відповідати R_f плями на хроматографі стандартного розчину	Відповідає
Прозорість розчину	2 % розчин субстанції в <i>етанолі (96 %)</i> <i>P</i> має бути прозорим	Витримує
Кольоровість розчину	2 % розчину субстанції в <i>етанолі (96%)</i> <i>P</i> має бути безбарвним у порівнянні з <i>етанолом (96 %)</i> <i>P</i> або забарвлений не більш інтенсивно, ніж еталон В ₉	Витримує

Продовження табл. 3.2

1	2	3
Родинні фосфоліпіди: Фосфатидилетаноламін Лізофосфатиділхолін Сфінгомієлін	Не більше 0,1 % Не більше 1,0 % Не більше 1,0 %	< 0,1 % < 0,8 % < 0,8 %
Супутні домішки: Тригліцериди Холестерол Вільні жирні кислоти	Не більше 0,5 % Не більше 0,5 % Не більше 0,2 %	< 0,3 % < 0,3 % < 0,05 %
DL- α -токоферол	0,1–0,2 %	0,14 %
Вода	Не більше 2,0 %	1,09 %
Залишкові органічні розчинники	Етанол – не більше 0,2 % Ацетон – не більше 200 ppm	< 0,2 % < 200 ppm
Перекисне число	Не більше 3.0 мЕкв.О ₂ /кг	1,5 мЕкв.О ₂ /кг
Йодне число	54–65	60
Важкі метали	Не більше 10 ppm	Витримує
Бактеріальні ендотоксини	Не більше 6 ЕО/г	<1,2 ЕО/г Згідно із сертифікатом виробника
Мікробіологічна чистота	Загальне число аеробних мікроорганізмів: (ТАМС) – не більше 10 ³ КУО/г (ТУМС) – не більше 10 ² КУО/г	<10 <10
Кількісне визначення: 1. Фосфор 2. Фосфатидилхолін яєчний	Не менше 3,8 % і не більше 4,0 % у перерахунку на суху речовину Не менше 96,0 % і не більше 102,0 % у перерахунку на основну речовину	3,9 % 97,6 %

3.1.3 Дипальмітоїлфосфатидилгліцерол ДПФГ

Для виробництва Cyt-LS використовувалась субстанція ДПФГ (Lipoid PG 16:0/16:0), виробництва «Lipoid GmbH», Німеччина. Відповідно до Настанови 42–3.2:2004 [95], вимог ДФУ [80], USP [97] та специфікації виробника на субстанцію ДПФГ була розроблена специфікація вхідного контролю.

До специфікації були включені такі показники: опис, розчинність, ідентифікація, прозорість розчину, кольоровість розчину, родинні фосфоліпіди, супутні домішки, вода, натрій, кальцій, важкі метали, залишкові органічні

розчинники, бактеріальні ендотоксини, мікробіологічна чистота, кількісне визначення (фосфор, ДПФГ).

Згідно з розробленим проєктом специфікації були досліджені фізико–хімічні та мікробіологічні показники субстанції, що використовувалась. Результати дослідження наведені в табл. 3.3. Як стандарт ДПФГ був використаний ДПФГ Lipoid PG 16:16 RS, виробництва «Lipoid GmbH», Німеччина.

Таблиця 3.3

**Дослідження фізико–хімічних та мікробіологічних показників субстанції
ДПФГ**

Показника	Вимоги НД	Результат
1	2	3
Опис	Порошок білого кольору з характерним запахом	Відповідає
Розчинність	Легко розчиняється у суміші <i>хлороформ Р – метанол Р – вода Р</i> (73 : 23 : 3)	Відповідає
Ідентифікація	R _f основної плями на хроматограмі випробуваного розчину має відповідати R _f плями на хроматограмі стандартного розчину	R _f = 0,35
Прозорість розчину	0,5 % розчин субстанції в суміші <i>хлороформ Р – метанол Р</i> (3 : 1) має бути прозорим	Відповідає
Родинні фосфоліпіди: Фосфатидилхолін Лізофосфатидилгліцерол Фосфатидна кислота	Не більше 0,5 % Не більше 0,5 % Не більше 0,5 %	< 0,1 %, відповідає < 0,2 %, відповідає < 0,5 %, відповідає
Супутні домішки: Вільна пальмітинова кислота Неідентифіковані супутні компоненти	Не більше 0,3 % Не більше 0,5 %	< 0,1 %, відповідає < 0,1 %, відповідає
Вода	Не більше 2 %	1,37 %, відповідає
Натрій	Не менше 3,1 % і не більше 3,3 %	3,2 %
Кальцій	Не більше 250 ppm	відповідає

1	2	3
Важкі метали	Не більше 10 ppm	< 10 ppm відповідає
Залишкові органічні розчинники	Гексан – не більше 200 ppm 2–пропанол – не більше 200 ppm	Гексан – 3,3 ppm 2–пропанол – 4,6 ppm
Бактеріальні ендотоксини	Не більше 0,3 ЕО/мг	Відповідає
Мікробіологічна чистота	Загальне число аеробних мікроорганізмів: (ТАМС) – не більше 10^3 КУО/г; (ТУМС) – не більше 10^2 КУО/г	Відповідає
Кількісне визначення: 1. Фосфор 2. DPPG–Na	Не менше 4,1 % і не більше 4,3 % у перерахунку на суху речовину Не менше 98,5 % у перерахунку на суху речовину	4,18 % 99,98 %

Отже наведені у табл. 3.1– 3.3, дозволяють використовувати діючу речовину та обрані ФЛ у подальшій фармацевтичній розробці очних крапель Сут-LS.

3.2 Розробка способу отримання та визначення оптимального складу ліпосомального цитохрому С

Згідно з вимогами FDA «Guidance for industry Liposome Drug Products» [31], ЕМА [33] та монографії ДФУ 2.0 [32] критичними показниками якості (CQAs) ЛС продукту будуть ступінь інкапсуляції АФІ, розмір часток і морфологія ЛС наночасток. Тому при розробці оптимального складу передусім оцінювали вплив компонентів на ці показники якості. Саме вони значною мірою визначають фармакокінетику ЛС форм порівняно з вільною формою АФІ. Нашим завданням було визначення способу отримання ЛС та оптимального складу, що

забезпечують максимальний ступінь інкапсуляції цитохрому С при збереженні часток у нанодіапазоні.

Із даних літератури відомо декілька способів отримання Cyt-LS. У запропонованій авторами ЛС композиції, що містить соєвий ФХ, холестерин і стеариламін, ступінь інкапсуляції цитохрому С склав 35-38 % [108]. Ступінь інкапсуляції цитохрому С в ЛС, до яких входять лецитин, холестерол та суміш кислих ФЛ, склав 55-60 % [109]. ЛС, що містять суміш негативно заряджених ФЛ (ФХ, фосфатидилетаноламін, цереброзиди, сульфатцереброзиди, сфінгоміолін), забезпечували ступінь інкапсуляції 70-85 % [110]. Інкапсуляція в ЛС композиції ФХ, холестерину та PEG склала 50 % [153].

Як вже зазначалось, сьогодні відомі різні варіанти включення АФІ до ЛС: інкапсуляція у внутрішній об'єм наночасток; інкапсуляція у гідрофобну частину бішару; адсорбція на поверхні ліпосом та інкапсуляція за рахунок хімічного зв'язування з компонентами бішару.

Добре відома здатність цитохрому С утворювати комплекси з аніонними фосфоліпідами в біологічних мембранах [111, 112], що є визначальним фактором у білок-ліпідній взаємодії цитохрому С. Тому запропоновано використовувати у складі наночасток аніонний ФЛ–ДПФГ. Як мембраноутворювальний ліпід використовується основний компонент мембран еукаріотів – ФХ. Зазначені ФЛ входять до складу багатьох ЛЗ [24, 155, 156].

Так, наразі ДПФГ входить до складу таких препаратів, як Derosut, DepoDur, Exparel, «Pacira Pharmaceuticals Inc.», США. ФХ включено до складу таких препаратів, як: Ліпін, Ліпофлакон, Ліолів (Фармстандарт–Біолік, Україна); Фосфоглів (Фармстандарт, РФ), Ессенціале (Sanofi Aventis, Франція) та ін.

З огляду на фізико–хімічні властивості запропонованих ФЛ та діючої речовини запропоновано уводили цитохром С до ЛС під час гідратації ліпідної плівки розчином цитохрому С з метою усунення негативного впливу органічних розчинників на АФІ.

Спосіб отримання Cyt-LS у цьому разі буде полягати: в отриманні плівки ФЛ; гідратації ФЛ плівки в розчині цитохрому С для отримання емульсії MLV; в гомогенізації під високим тиском емульсії MLV до отримання SUV.

Отримання плівки ФЛ відбувається шляхом одержання розчину ФЛ в органічних розчинниках (етанол, метанол, хлороформ) з подальшим утворенням плівки на роторному випаровувачі. Для розчинення ФЛ було обрано суміш хлороформ : етанол – 5 : 1 (згідно з літературними даними саме в цій суміші розчинення ДПФГ має бути повним [157]). Після чого розчин ліпідів піддавався фільтрації Pall розміром 0,45 та 0,22 мкм, що витримують обробку органічними розчинниками. Необхідно зазначити, що ФЛ, отримані з природної сировини, підвищують ризик бактеріальної контамінації. Тому для зниження такого ризику цілком обґрунтовано використання попередньо фільтрованих органічних розчинів ФЛ.

Ліпідну плівку отримували, випаровуючи розчинник із розчину ФЛ на роторному випаровувачі при постійному перемішуванні при температурі 40-43°C до повного видалення органічного розчинника. Такі параметри випаровування дають можливість швидко видалити розчинник, в результаті чого утворюється тонка фосфоліпідна плівка.

Після повного видалення розчинника фосфоліпідну плівку гідратували у стерильному буферному розчині цитохрому С для одержання емульсії MLV. Гідратацію ФЛ плівки проводили при температурі 38-44 °C (температура вище температури фазового переходу ФЛ, що використовуються). Для попередження процесів окиснення ФЛ процес одержання MLV емульсії проходив в атмосфері азоту.

Далі методикою отримання Cyt-LS у вигляді SUV була обрана гомогенізація, завдяки її перевагам над іншими (озвучування, заморожування–розморожування, екструзія), які виражаються у: стандартності складу SUV, високій продуктивності, мінімальному окисненні та гідролізі ФЛ, збереженні та

стабільності ЛС, реальній можливості постійного контролю за температурою і тиском. Обраний режим гомогенізації може дозволити отримати ЛС стандартного складу, основна маса яких представлена наночастками розміром не більше 200 нм. Крім фармакологічних властивостей, такий розмір ЛС буде також визначати можливість проведення процесу стерилізуючої фільтрації.

3.2.1 Вибір буферного розчину для складу очних крапель цитохрому С

Із метою стабілізації АФІ та ЛС, що містяться у водних розчинах, застосовуються регулятори рН. Для ЛС-ЛЗ, що містять натуральні ФЛ, широко застосовуються фосфатні буферні розчини [24, 103, 132].

Оптимальним значенням рН для очних крапель є 7,4, що відповідає рН слізної рідини. Якщо діючі речовини препарату при такому значенні рН не стабільні або погано розчиняються, то значення рН може відрізнятися від оптимального і має знаходитися у межах від 3,5 до 8,5 [133].

Для розробки складу нами був використаний фосфатний сольовий буфер, що не виявляє ніяких токсичних властивостей та широко використовується при виробництві лікарських препаратів. Вибір фосфатного буферу з рН 6,8 був обумовлений властивостями ФЛ емульсій, що виявляють стабільність у діапазоні рН 6,0 – 9,0 [134], властивостями Сут–С, оптимальний рівень рН розчину складає 5,0-7,0, і близькістю значення рН до рівня слізної рідини. Для одержання буферної суміші використовували солі калію дигідрофосфату та динатрію фосфату дигідрат. Буферні розчини готували згідно з ДФУ (4.1.3).

3.2.2 Вплив складу ліпосом на рівень інкапсуляції та розмір часток при створенні ліпосомальної форми цитохрому С

Із метою вибору оптимального співвідношення ФЛ одержували зразки ЛС, що містили ФХ та ДПФГ у таких співвідношеннях (ФХ ДПФГ) : 5,0 : 1,0; 4,0 : 1,0; 3,6 : 1,0; 2,4 : 1,0; 1,20 : 1,0; 0,6 : 1,0.

ДПФГ та ФХ розчиняли в суміші хлороформ : етанол (5 : 1) Отриману суміш упарювали на роторному випаровувачі BUCHI Rotavapor R215 (Швейцарія) до отримання ліпідної плівки. ФЛ плівку гідратували стерильним буферним розчином з цитохромом С та рН 6,8 при співвідношенні цитохром С : ФЛ – 1 : 16 відповідно на орбітальному шейкері ІКА werke (Німеччина) до утворення гомогенної емульсії MLV. Вибір співвідношення цитохром С : ФЛ головним чином був обумовлений, з одного боку, складністю стерилізуючої фільтрації високих концентрації ФЛ, а з іншого – бажаною концентрацією цитохрому С у кінцевому продукті.

Далі отриману емульсію MLV гомогенізували на гомогенізаторі високого тиску Microfluidizer M110P до отримання малих SUV із середнім розміром часток у діапазоні від 100 до 200 нм.

Залежність значень середнього розміру та ступеня інкапсуляції цитохрому С від співвідношення ФЛ наведено в табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Залежність середнього розміру та ступеня інкапсуляції цитохрому С від співвідношення фосфоліпідів

Співвідношення ФХ : ДПФГ	5,0 : 1,0	4,0 : 1,0	3,6 : 1,0	2,4 : 1,0	1,20 : 1,0	1,0 : 0,6
Середній розмір наночасток (серед $\pm$ КВ, n = 3)	138,2 нм – 92,1 %, 37,8 нм – 7,9%	133,2 нм – 93,1 %, 47,8 нм – 6,9%	147,2 нм – 90,1 %, 30,8 нм – 9,9%	138,2 нм – 92,1 %, 37,8 нм – 7,9%	132,6 нм – 93,1 %, 47,8 нм – 6,9 %	130,2 нм – 87,1 %, 47,8 нм – 12,9%
Ступінь інкапсуляції (серед $\pm$ КВ, n = 3)	68,78 %	81,58 %	89,88 %	94,88	95,88 %	71,5 %

Результати фізико-хімічних досліджень свідчать про те, що оптимальним співвідношенням є ФХ : ДПФГ (1,2–4,0 : 1). Збільшення співвідношення до 5 : 1, як і зменшення 1,0 : 0,6 значно знижує включення цитохрому С у ЛС (68,78 та 71,5 % відповідно) при збереженні часток в нанодіапазоні до 200 нм. Після проведення дослідження запропоновано співвідношення ФХ : ДПФГ (1,20 : 1,0), що забезпечує максимальну інкапсуляцію цитохрому С [98].

3.2.3 Дослідження технологічних режимів отримання ліпосомального цитохрому С

Процес гомогенізації досліджували на зразках Сут-LS зі складом, що забезпечує максимальну інкапсуляцію цитохрому С.

Оптимальний температурний режим гомогенізації утримували в межах 38–44 °С. По–перше, такий температурний інтервал знаходиться вище температури фазового переходу ФЛ, що використовуються, а по–друге, максимально можливо наближений до температурних значень, при яких цитохром С знаходиться в біологічних системах. Крім того, основний компонент ЛС – природні ФЛ – також є досить чутливим до підвищення температури, при якій може спостерігатися зростання продуктів деградації (ЛФХ та ВЖК). Для вибору оптимального тиску були проведені дослідження процесу гомогенізації при 400, 500, 800, 900, 1000, 1200 bar. Кількість циклів та максимальна температура гомогенізації наведені у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

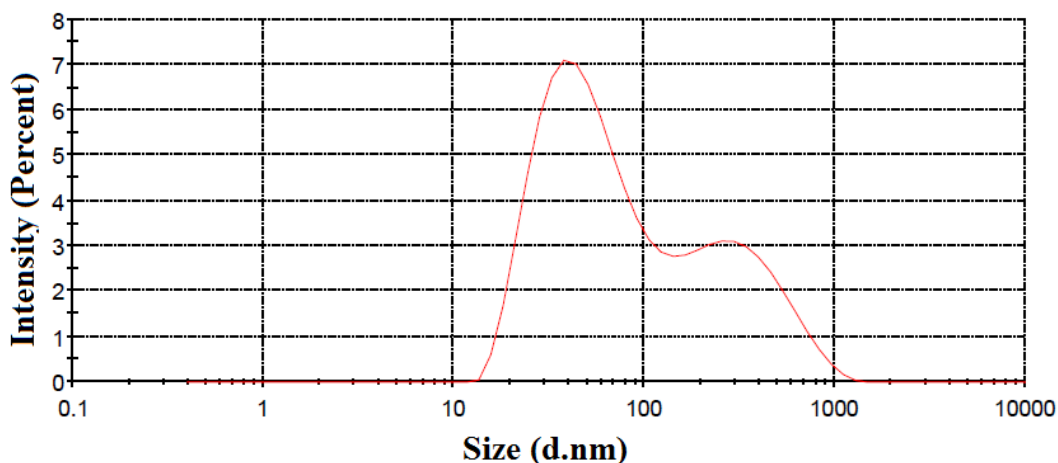
Дослідження оптимального рівня тиску процесу гомогенізації

Тиск, bar	Кількість циклів	Максимальна температура
400	15	44,5
500	7	43
800	5	43
900	5	44,1
1000	5	44,5
1200	4	46,7

Вибір оптимального тиску, з одного боку, був обумовлений отриманням мінімальної кількості циклів гомогенізації, необхідних для досягнення розміру основної маси ЛС до 200 нм, що дозволяє провести стерилізуючу фільтрацію. З іншого боку, вибір оптимального рівня тиску не повинен був допустити перевищення обраного температурного режиму в гомогенізаторі.

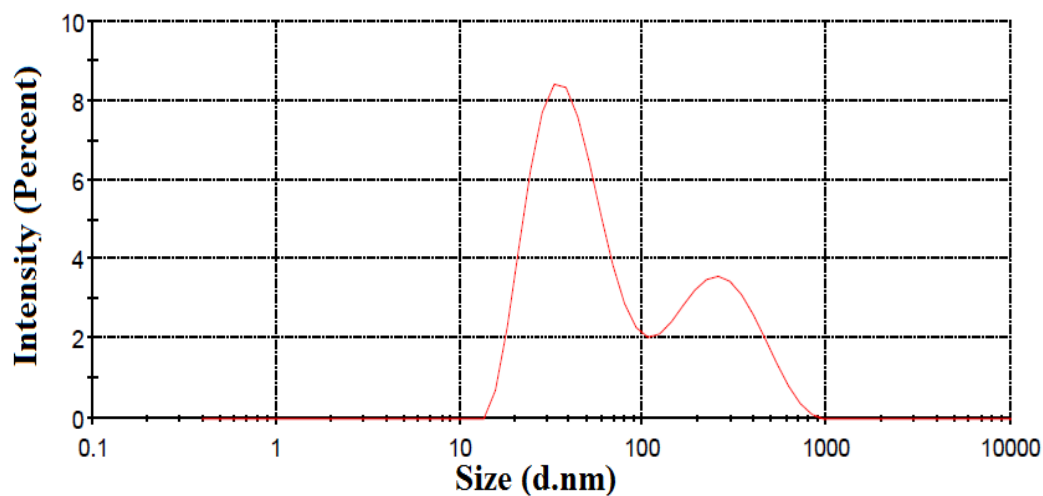
Розміри часток під час гомогенізації контролювали за допомогою методу DLS на Malvern zetasizer nano S (UK) (рис 3.1).

Size Distribution by Intensity



a.

Size Distribution by Intensity



b.

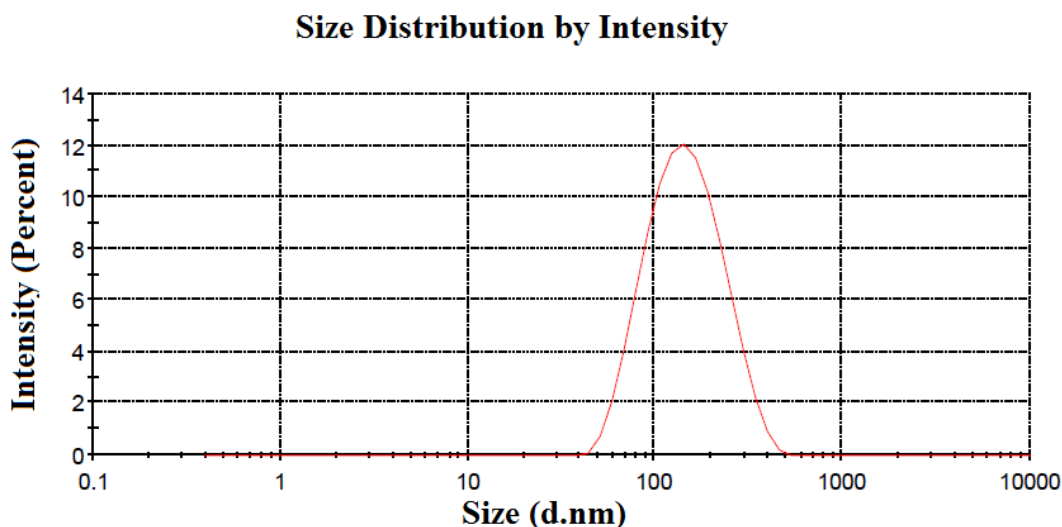


Рис. 3.1 Контроль розміру часток під час гомогенізації: а) Cyt-LS після двох циклів гомогенізації, б) Cyt-LS після трьох циклів гомогенізації, с) Cyt-LS після фінального (п'ятого) циклу гомогенізації

Так, експериментально було обрано рівень тиску в межах 800 bar, що дозволяє проводити процес гомогенізації впродовж 5 циклів і не перевищувати зазначені температурні межі.

Після проведення гомогенізації Cyt-LS підтвердження гомогенності проводили за низкою параметрів, включаючи ступінь інкапсуляції, вміст ліпідного складу, оцінки поверхневого заряду та розміру часток.

Для визначення ступеня інкапсуляції були запропоновані методики визначення загальної концентрації цитохрому С та концентрації неінкапсульованого цитохрому С.

Загальну концентрацію цитохрому С у Cyt-LS (C_{total}) визначали спектрофотометричним методом, використовуючи УФ-спектр поглинання розведеної емульсії Cyt-LS у діапазоні 400–560 нм (рис 3.2) $C_{\text{total}} = 0,67$ мг/мл.

Визначення неінкапсульованого цитохрому С (C_{free}) проводили методом гель–хроматографії [102].

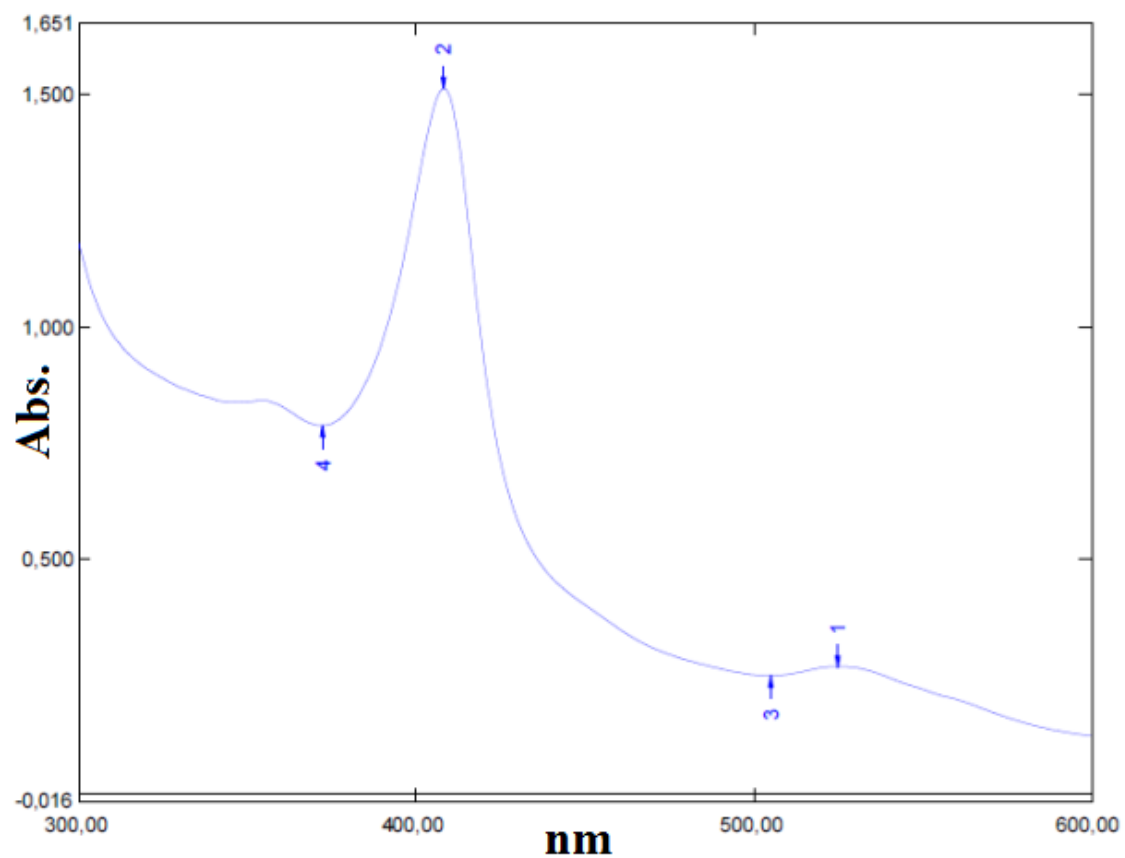


Рис. 3.2 УФ–спектр поглинання Cyt-LS

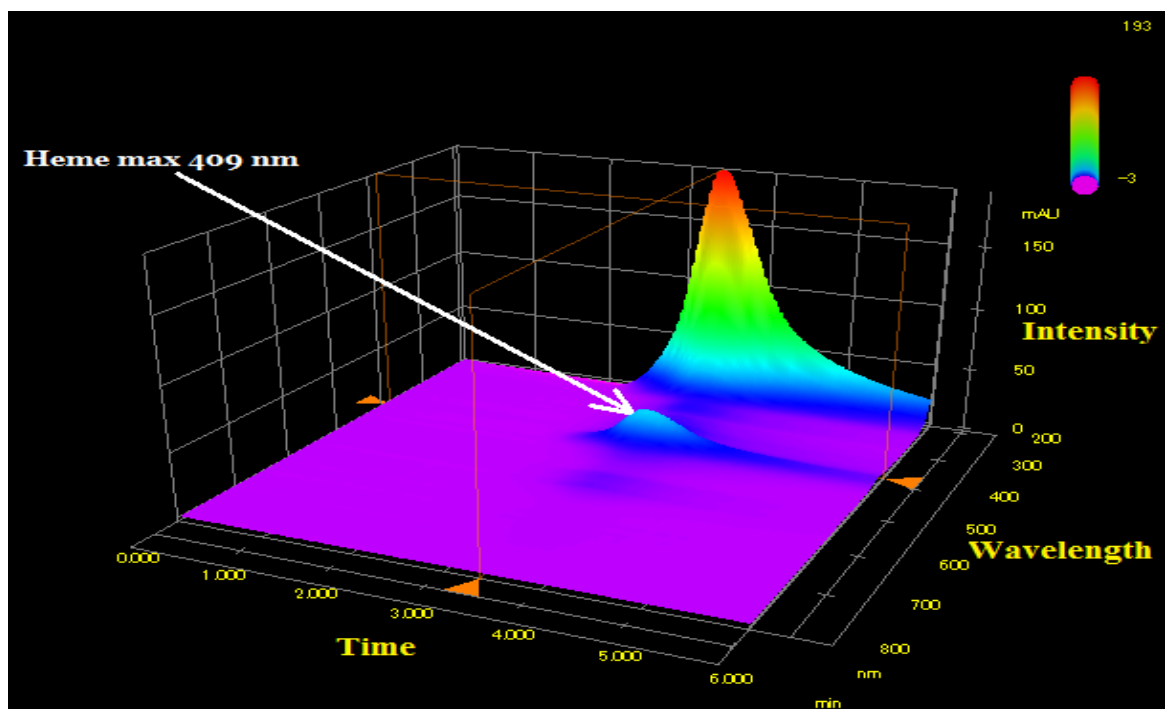


Рис. 3.3 3D Хроматограма розчину стандарту цитохрому С (non-liposomal)

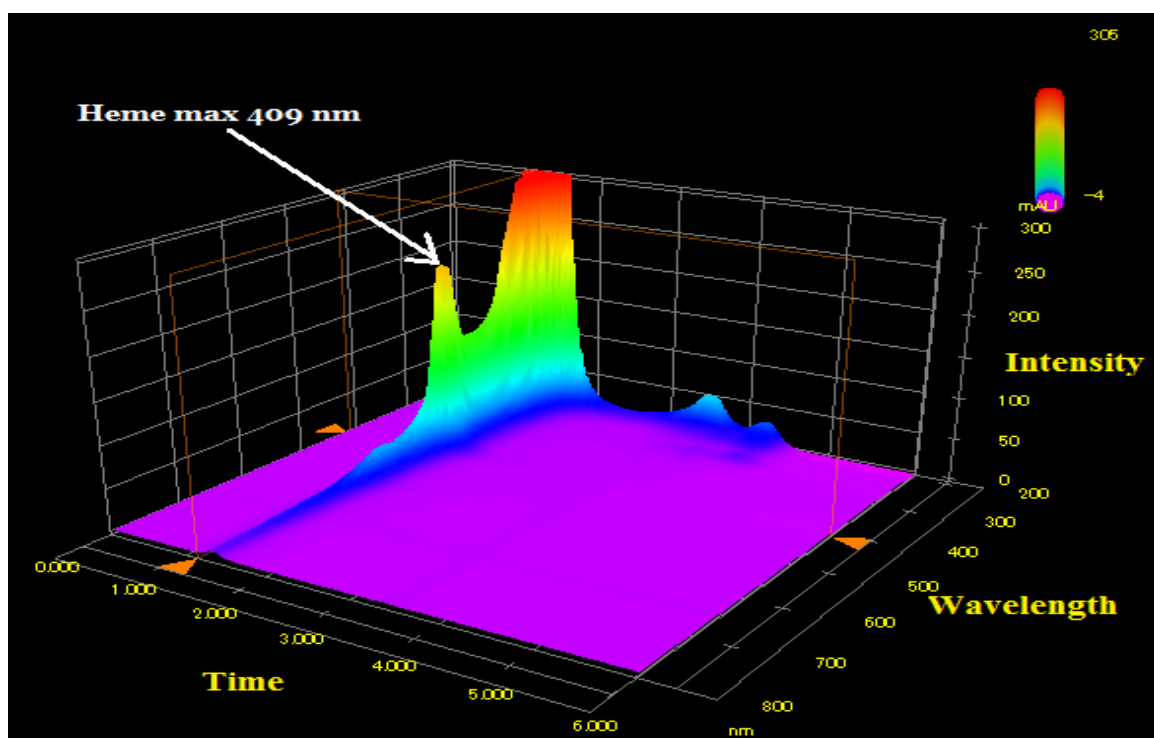


Рис. 3.4 3D хроматограма Cyt-LS

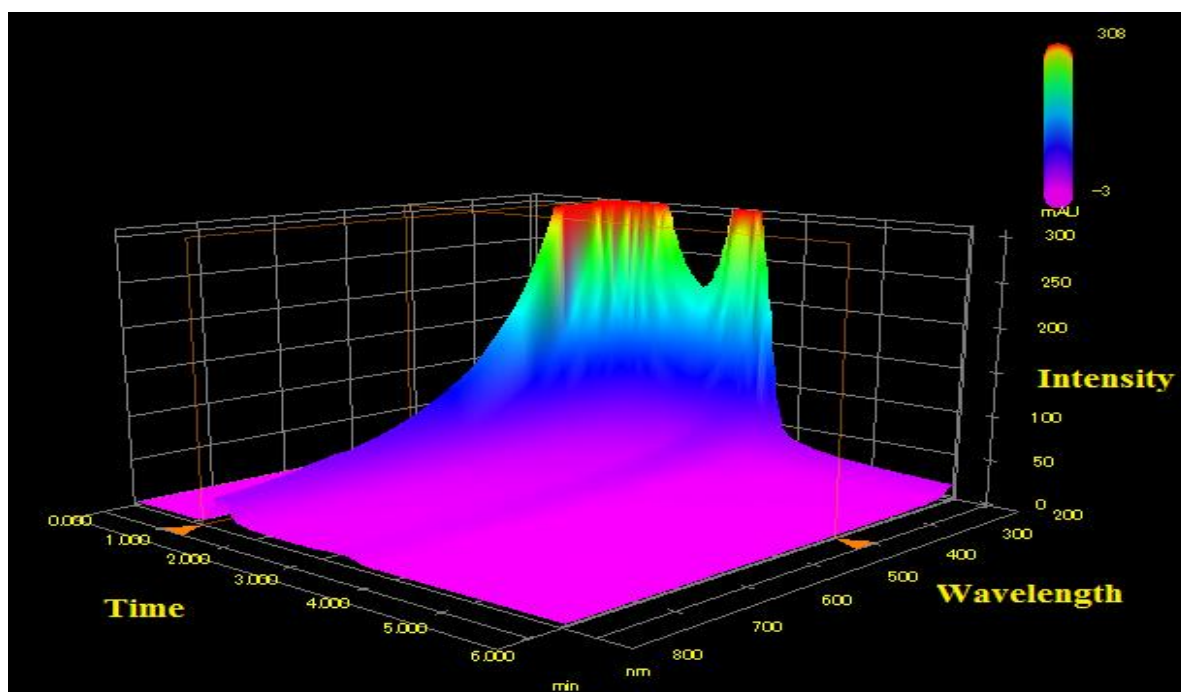


Рис. 3.5 3D хроматограма placebo Cyt-LS (без цитохрому C)

Як видно з рис 3.3–3.5, основні піки на хроматограмах Cyt-LS та неліпосомального цитохрому С мають різні часи утримування. Характерний максимум УФ-спектра в ділянці 400–410 нм спостерігається на 3D-хроматограмах піків розчину стандарту цитохрому С (200–800 нм) та Cyt-LS (200–800 нм), що підтверджує включення цитохрому С у ЛС.

У результаті дослідження отримані Cyt-LS із концентрацією 0,67 мг/мл цитохрому С, ступенем інкапсуляції цитохрому С 95,8 % та середнім розміром часток 156,6 нм; із вмістом ЛФХ – 0,60 % та ВЖК – 0,40% (від суми ліпідів), що свідчить про стабільність компонентів у процесі гомогенізації [101].

Контроль і підтвердження морфології наночасток також має ключове значення для ефективного клінічного застосування ліпосомальних препаратів. Наразі існує низка методів візуалізації для оцінки морфології ЛС та інших наночасток, причому кожен з них має свої переваги і недоліки, які слід враховувати при інтерпретації даних. Одним із таких методів візуалізації ЛС наночасток є метод сканувальної електронної мікроскопії Scanning Electron Microscopy [101, 113], SEM із використанням STEM детектора, який дозволяє проводити дослідження в режимі сканування з детекцією сигналу, який пройшов через зразок.

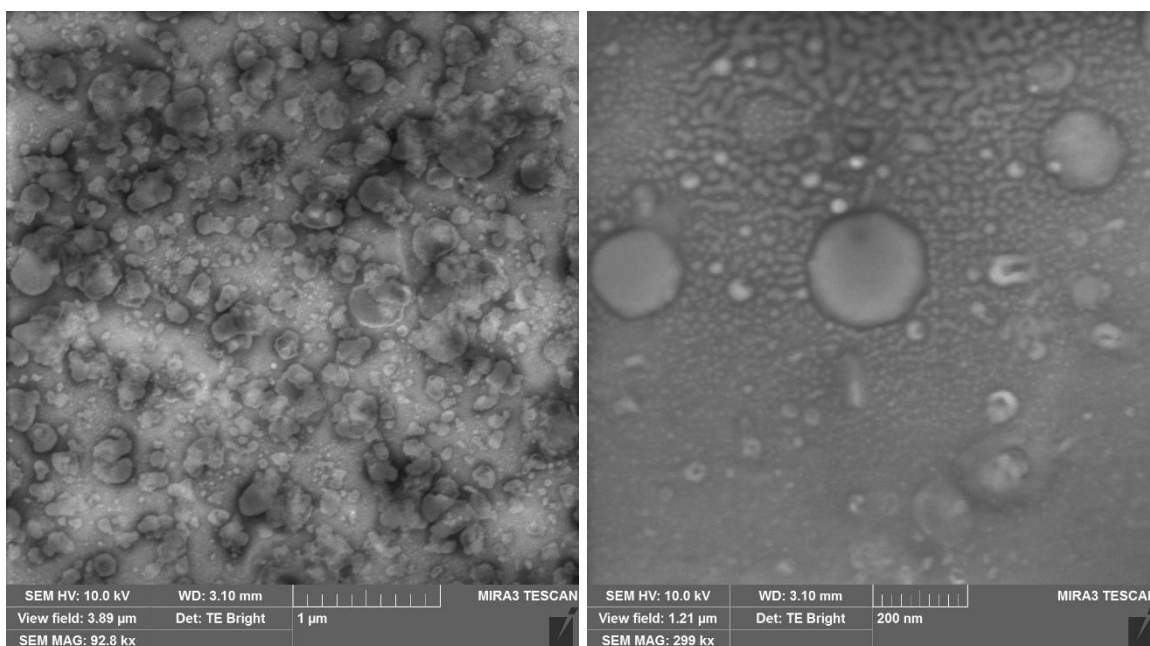


Рис. 3.6 SEM зображення Cyt-LS

Результати дослідження наведені на рис 3.6. На отриманих зображеннях ЛС мають середній розмір близько 200 нм, що також підтверджує визначення розміру часток методом DLS.

3.3 Визначення умов стерилізації ліпосомального цитохрому С

Потенційно використовувати Cyt-LS в клінічній практиці планується у формі очних крапель, обов'язковою вимогою до яких є стерильність.

Для забезпечення отримання стерильних ЛС існує можливість отримання ЛС в асептичних умовах, проведення термічної стерилізації або стерилізуючої фільтрації. У першому випадку потрібно буде забезпечити проведення всіх технологічних операцій з отримання ЛС у стерильних умовах, починаючи з етапу отримання ФЛ плівки та її гідратації стерильним буферним розчином цитохрому С, що, зі свого боку, потягне за собою досить істотні витрати з реалізації цієї схеми отримання ЛС на практиці [114].

Проведення термічної стерилізації буде вимагати обробки ЛС при 112–121⁰С протягом 10–30 хв, що може негативно впливати на фосфоліпідний склад ЛС та їх стабільність, АФІ, включені в ЛС, та ступінь інкапсуляції (витікання інкапсульованого вмісту) [115]. У випадку Cyt-LS це негативно вплине на природні ФЛ та біологічноактивний протеїн (цитохром С), які є досить чутливими до нагрівання при високих температурах.

Тому, найбільш раціональним є використання методу стерилізуючої фільтрації, що являє собою процес фільтрації ЛС крізь фільтри з розміром пор 0,22 мкм під тиском або з використанням вакууму. Цей спосіб стерилізації придатний для термолабільних АФІ (наприклад гемопротеїнів), оскільки він не передбачає нагрівання або умов, які можуть призвести до утворення продуктів деградації чи «витоку» вмісту ЛС, або умов пов'язаних з іншими методами стерилізації. Одним із недоліків цієї методики є обмеження розміру ЛС, придатних для фільтрації. Середній діаметр ЛС має бути близько 200 нм для проходження наночасток крізь мембрану фільтра з розміром пор 0,22 мкм. Однак це обмеження можна вважати незначним у виробництві ЛС-ЛЗ, оскільки, наприклад, розмір везикул (<500 нм) рекомендується для виробництва парентеральних ліпідних емульсій [116, 117]. Також слід зазначити, що фізична та хімічна складність ЛС-ЛЗ створює додаткові проблеми для проведення процесу стерилізуючої фільтрації. Компоненти ЛС можуть взаємодіяти з фільтрувальною матрицею або, маючи у своєму складі наночастки з розміром, що перевищує 0,22 мкм, забивати її. Поряд з цим стерилізуюча фільтрація дозволяє проводити стандартизацію ЛС [118, 119].

Нами була проведена оцінка ефективності стерилізуючої фільтрації. Отриманий зразок Cyt-LS в об'ємі 1 л, фільтрували через мембранні фільтри Pall (США) 0,22 мкм. Після стерилізуючої фільтрації був проведений контроль основних показників якості ЛС продукту. Результати порівняння наведені в табл.

3.6. Також була проведена оцінка стерильності отриманого продукту методом мембранного посіву.

Таблиця 3.6

Контроль основних показників якості Cyt-LS до і після стерилізуючої фільтрації

Показник	Cyt-LS до фільтрації (серед $\pm$ KB, n = 3)	Cyt-LS після фільтрації (серед $\pm$ KB, n = 3)
Інкапсуляція, %	95,8	95,8
Середній розмір часток, нм	156,6	157,3
Дзета потенціал, mV	-57	-57
Осмолярність, мОсмоль/кг	330	330
pH	6,95	6,91
ЛФХ, %	0,60	0,59
Вільні жирні кислоти, %	0,4	0,39
Cyt C, мг/мл	0,672	0,674
ФХ, мг/мл	6,05	6,01
ДПФГ, мг/мл	5,08	5,0
Стерильність	—	Стерильний

Отже, результати свідчать, що отримані Cyt-LS піддаються стерилізуючій фільтрації зі збереженням основних фізико-хімічних властивостей, що підтверджує розмір отриманих часток. Це відкриває шлях потенційному використанню Cyt-LS у клінічній практиці як стерильного ЛЗ.

3.4 Обґрунтування вибору допоміжних речовин при розробці ліпосомальної форми цитохрому С

Як відомо, у водних розчинах ЛС можуть виявлятися небажані явища, наприклад, агрегація і гідроліз ФЛ. У якості альтернативи водним розчинам ЛС може розглядатися ліофілізат ЛС для приготування очних крапель або інших лікарських форм, що потенційно може розширити сферу застосування Cyt-LS.

Ліофілізація зазвичай використовується для збільшення терміну придатності ЛС-ЛЗ шляхом їх збереження в ліофільно висушеному стані. Це дозволяє зберігати ЛС при більш низьких температурах, ніж водні ЛС емульсії, що, зі свого боку мінімізує такі небажані явища як агрегація та гідроліз ФЛ, що є основними компонентами ЛС мембрани [120].

Тому на наступному етапі досліджень була проведена розробка й оптимізація технології отримання ліофільно висушеного ліпосомального цитохрому С (FD–Cyt-LS) із використанням підходу Quality by Design (QbD) і порівняння стабільності водної ЛС емульсії та її ліофілізату.

QbD – це системний підхід до розробки лікарських препаратів, заснований на чітко визначених цілях щодо отримання лікарського препарату, розуміння процесу його виготовлення і стратегії контролю на основі надійних наукових даних та оцінки ризиків, пов'язаних з якістю. У методичних вказівках «Фармацевтична розробка» концепція QbD представлена удосконаленням підходом до фармацевтичної розробки [121].

Фармацевтична розробка QbD спрямована на виявлення характеристик, які мають вирішальне значення для якості кінцевого продукту та визначення того, як можна змінювати критичні параметри процесу, щоб послідовно виробляти продукт з необхідними характеристиками. У разі ліофілізованих ЛС необхідно вибрати оптимальний склад і технологічні параметри, щоб захистити цілість ЛС мембрани під час ліофілізації та подбати про безпеку протягом усього терміну зберігання.

3.4.1 Дослідження процесу ліофілізації Cyt-LS

Як попередній крок QbD була виконана ідентифікація критичних показників якості (CQAs).

Потенціал факторів ризику процесу ліофілізації, які можуть вплинути на якість продукту, був ідентифікований за допомогою аналізу діаграми Ішикави (рис. 3.7).

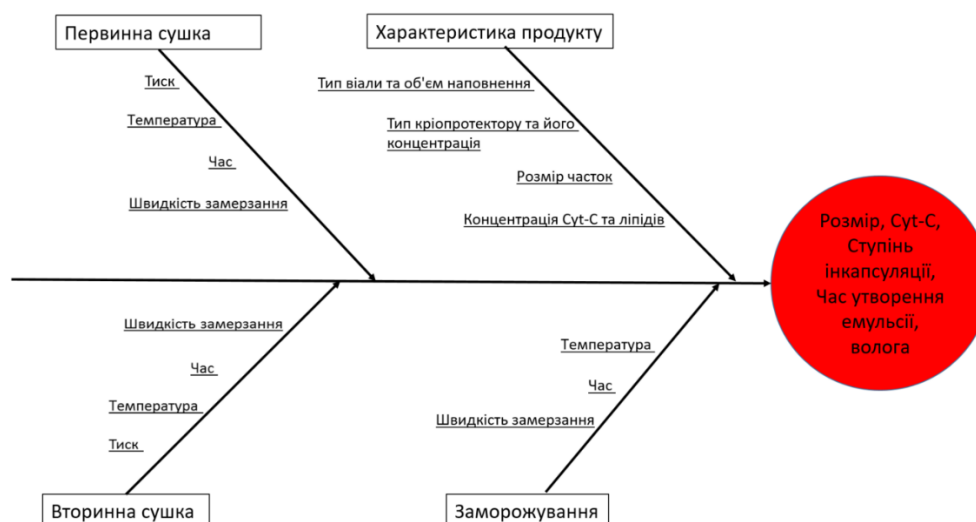


Рис. 3.7 Діаграма Ішикави

У дослідженні були обрані кілька CQAs для ліофілізованих ЛС: розмір часток, ступінь інкапсуляції, час утворення емульсії і залишкова вологість у ліофілізаті. Згідно з вимогами ICH Q8 ці властивості мають бути у відповідних межах для забезпечення бажаної якості продукту.

Оптимальний розмір для ЛС везикул зазвичай знаходиться в межах 10-200 нм. Однак розмір часток свіжоприготованих ЛС може збільшуватися під час ліофілізації через злиття/агрегацію везикул та неправильний вибір режиму ліофілізації. Зі свого боку, зміна розміру Cyt-LS може стати причиною витоку інкапсульованої речовини та зміни одного з найбільш важливих CQA ліофілізованої ЛС композиції – ступеня інкапсуляції, що в результаті може призвести до істотної зміни фармакологічних властивостей Cyt-LS. Тому зміна цих параметрів після ліофілізації має ретельно контролюватися [122, 123]. Для

збереження прийняттого ступеня інкапсуляції та розміру часток до складу ЛС емульсії як допоміжну речовину додають кріопротектор.

Серед великої кількості класів кріопротекторів (спиртів (гліцерин, манніт), амідів (диметилацетамід), оксидів (ДМСО)) для ліофілізації ЛС найчастіше використовуються вуглеводи (трегалоза та лактоза) у різноманітних концентраціях [100, 124 – 127]. Тому саме ці кріопротектори були обрані для вивчення технології ліофілізації Cyt-LS.

Отже, наступним етапом наших досліджень був вибір кріопротектора, його вмісту і технологічного режиму ліофілізації.

Залишкова вологість – один із ключових показників якості ліофілізованих ЛС. З одного боку, знижений вміст води є бажаним для поліпшення стабільності, з іншого – зайве видалення води з ЛС може призвести до зниження ступеня інкапсуляції [127], зміни розміру ЛС часток і до низької здатності утворювати гомогенні емульсії. Найбільш важливим фактором, що впливає на залишковий вміст води, встановлений за аналізом ризиків, буде технологія ліофілізації, а саме вибір режиму вторинного сушіння і стадій видалення залишкової води з ЛС [128].

Ще одним важливим фактором є час утворення емульсії, за який ліофілізат буде утворювати однорідну наносистему зі стійкими розмірами. Ці показники якості були включені в експериментальний дизайн досліджень.

Експериментальний дизайн (DoE) використовувався на наступному етапі як інструмент QbD для вивчення факторів ризику. Змінні фактори експериментальної схеми наведені в табл. 3.7. як незалежні фактори були обрані: X_1 = кріопротектор лактоза та його концентрація, %; X_2 = кріопротектор трегалоза та його концентрація, %; X_3 = температура вторинного сушіння, °C.

Як відгуки на зміни незалежних факторів були обрані показники якості ліофілізованих ЛС: Y_1 = розмір ЛС, нм; Y_2 = ступінь інкапсуляції, %; Y_3 = час утворення емульсії, хв.; Y_4 = вміст води, %.

Матриця планування експерименту наведена в табл. 3.8.

Таблиця 3.7

Фактори, їх рівні та відгуки, що досліджувались у процесі оптимізації

Фактори	Рівень		
	низький (-1)	середній (0)	високий (+1)
Незалежні фактори			
X ₁ = кріопротектор лактоза, %	5	6	7
X ₂ = кріопротектор трегалоза, %	5	6	7
X ₃ = температура вторинного сушіння, °C	20	30	35
Відгуки на незалежні фактори (CQAs)			
Y ₁ = розмір ЛС, нм			
Y ₂ = ступінь інкапсуляції, %			
Y ₃ = час утворення емульсії, хв			
Y ₄ = вміст води, %			

Таблиця 3.8

Матриця експерименту

Код	X ₁ , %	X ₂ , %	X ₃ , °C
1	5	—	20
2	5	—	30
3	5	—	35
4	6	—	20
5	6	—	30
6	6	—	35
7	7	—	20
8	7	—	30
9	7	—	35
10	—	5	20
11	—	5	30
12	—	5	35
13	—	6	20
14	—	6	30
15	—	6	35
16	—	7	20
17	—	7	30
18	—	7	35
19	6	—	30
20	—	6	30

Згідно із запропонованою схемою, була приготовлена MLV емульсія Cyt-LS з встановленим оптимальним ФЛ складом та співвідношенням ліпід – цитохром С. Цю емульсію гомогенізували до отримання ULV, після чого отримана емульсія була розділена на 20 проб. Далі, відповідно до умов експериментального дизайну (табл. 3.7), в отримані проби додавали розчини кріопротекторів до вибраних концентрацій.

Отримані проби профільтрували через мембранний фільтр 0,22 мкм, а потім розлили по 3 мл у флакони для ліофілізації прозорі для ЛЗ, з трубки скляної (10 мл) виробництва Shandong pharmaceutical Glass Co., ltd (Китай).

Рідкі Cyt-LS були охарактеризовані за показниками: розмір часток, концентрація цитохрому С та ступень інкапсуляції. Результати вимірювань наведено в табл. 3.9.

Таблиця 3.9

Показники якості рідких Cyt-LS (до ліофілізації)

код	Розмір часток, нм	Ступінь інкапсуляції, %	Кількість Cyt-С, %
1	2	3	4
1	135 nm – 90% 50 nm – 10%	≥ 95%	100,1
2	144 nm – 100%	≥ 95%	100,2
3	131 nm – 93% 44 nm – 7%	≥ 95%	100,2
4	130 nm – 91% 55 nm – 9%	≥ 95%	100,0
5	133 nm – 93% 46 nm – 7%	≥ 95%	100,3
6	130 nm – 90% 54 nm – 10%	≥ 95%	100,5
7	130 nm – 89% 55 nm – 11%	≥ 95%	100,6
8	135 nm – 90% 51 nm – 10%	≥ 95%	100,1

Продовження табл. 3.9

1	2	3	4
9	130 nm – 89% 55 nm – 11%	$\geq 95\%$	100,1
10	133 nm – 94% 57 nm – 6%	$\geq 95\%$	100,0
11	131 nm – 88% 50 nm – 12%	$\geq 95\%$	100,3
12	131 nm – 90% 50 nm – 10%	$\geq 95\%$	100,2
13	137 nm – 95% 45 nm – 5%	$\geq 95\%$	100,2
14	135 nm – 94% 58 nm – 6%	$\geq 95\%$	100,3
15	138 nm – 87% 45 nm – 13%	$\geq 95\%$	100,4
16	131 nm – 95% 58 nm – 5%	$\geq 95\%$	100,4
17	136 nm – 92% 44 nm – 8%	$\geq 95\%$	100,2
18	138 nm – 97% 45 nm – 3%	$\geq 95\%$	100,0
19	135 nm – 94% 44 nm – 6%	$\geq 95\%$	100,0
20	139 nm – 90% 45 nm – 10%	$\geq 95\%$	100,0

Флакони з Cyt-LS закривались пробками для ліофілізації виробництва Stomil sanok S.A. (Польща) та попередньо заморожувалися до температури мінус 30 °С. Далі проводили процедуру ліофілізації. Флакони із замороженим продуктом поміщали в камеру ліофільного сушіння з температурою полки –35 °С при атмосферному тиску (близько 1000 mBar) протягом 240 хв. Сублімацію води ініціювали шляхом зменшення тиску до 0,1 mBar і підвищення температури до – 20 °С протягом наступних 10 год, після чого обрана температура і тиск підтримувалися 330 хв. Потім для видалення поглиненої води з продукту було виконано вторинне сушіння. При цьому температура полки в кілька етапів

піднімалася до обраних в DoE значень, у кінці вторинного сушіння знижували тиск до 0,001 mBar, продукт досушували ще протягом 90 хв при тій же температурі. Програма ліофілізації зображена на рис. 3.8.

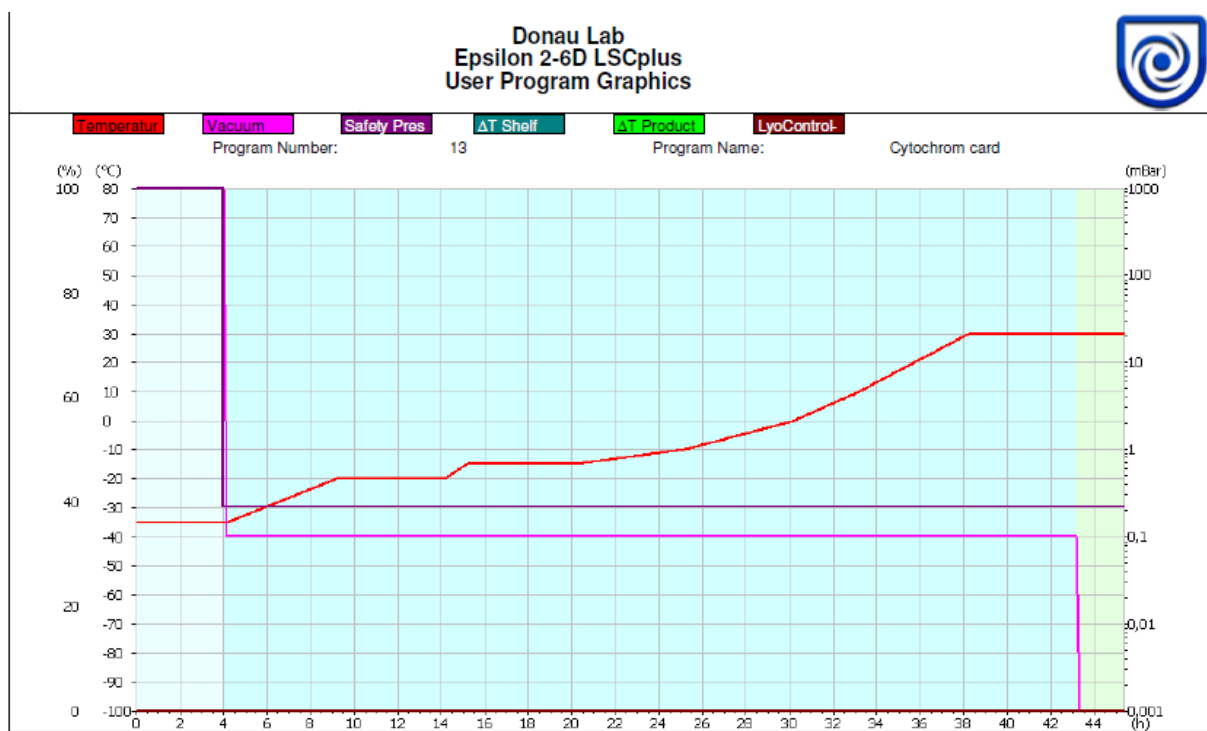


Рис. 3.8 Програма ліофілізації Cyt-LS

FD–Cyt-LS були охарактеризовані за показниками розміру часток, ступеня інкапсуляції, часу утворення емульсії та вологості. Результати досліджень експериментального дизайну наведено в табл. 3.10.

Таблиця 3.10

Показники якості ліофільно висушених Cyt-LS

Код	Розмір часток, нм	Ступінь інкапсуляції, %	Час утворення емульсії, хв	Вологість, %
1	220 nm – 100%	93,3	4	4,0
4	170 nm – 100%	≥ 95%	4	3,9

Продовження табл. 3.10

Код	Розмір часток, нм	Ступінь інкапсуляції, %	Час утворення емульсії, хв	Вологість, %
7	164 nm – 100%	≥ 95%	4	3,9
10	200 nm – 99% 670 nm – 1%	92 %	4	4,0
13	188 nm – 100%	≥95%	4	4,0
16	170 nm – 100%	≥95%	4	3,9
2	215 nm – 95% 1800 nm – 5%	93,5	4	1,5
5	165 nm – 100%	≥ 95%	3	1,5
8	165 nm – 100%	≥95%	4	1,6
11	205 nm – 97% 1750 nm – 3%	91 %	4	1,6
14	194 nm – 100%	≥95%	4	1,5
17	170 nm – 100%	≥95%	4	1,6
3	220 nm – 88% 2500 nm – 12%	93,1	10	0,5
6	175 nm – 99% 1044 nm – 1%	≥ 95%	9	0,6
9	166 nm – 98% 1055 nm – 2%	≥ 95%	9	0,5
12	220 nm – 92% 2035 nm – 8%	92 %	8	0,6
15	220 nm – 98% 1055 nm – 2%	≥95%	8	0,5
18	187 nm – 96% 1055 nm – 4%	≥95%	8	0,6
19	168 nm – 100%	≥ 95%	3	1,5
20	200 nm – 100	≥95%	4	1,5

Як видно з результатів дослідження експериментального дизайну, істотний вплив на розмір часток після ліофілізації чинить температура вторинного сушіння. При цьому зміна параметра вторинного сушіння не привела до істотних змін ступеня інкапсуляції. Так, установлено, що при температурі вторинного сушіння 20 °С ліофілізати демонстрували кращі результати збереження

початкових розмірів, тоді як при температурі 35⁰С ці результати виявилися найгіршими незалежно від типу кріопротектору та його концентрації. Така сама залежність спостерігається при впливі температури вторинної сушки на час утворення стабільної емульсії. Ймовірно, така ситуація може бути пов'язана із зайвим видаленням води, необхідної для збереження структури ліпідного бішару. Також варто відзначити, що при виборі температури вторинного сушіння 20 ⁰С середня залишкова вологість у ліофілізаті склала близько 4,0%. Це, вочевидь, може негативно відобразитися на зберіганні ліофілізатів, тому вибір такого значення є неприйнятним для використання в технології.

У результаті найкращим значенням температури вторинного сушіння можна вважати –30 ⁰С. При цій температурі вміст залишкової вологи знаходиться в обраних межах – не більше 5 %.

Результати дослідження демонструють, що менші Low (–1) концентрації кріопротекторів, незалежно від їх типу, мали гірші показники ступеня інкапсуляції та розміри часток. Тоді, як у зразках з концентраціями кріопротекторів Medium (0), High (+1) зниження ступеня інкапсуляції не спостерігалось. У зразках із трегалозою Medium (0) і High (+1) спостерігалось трохи більше збільшення розмірів часток, ніж у зразках з лактозою в аналогічних концентраціях. Зразки з концентрацією лактози 6 % мали кращі результати за показниками часу утворення емульсії.

Отже, як оптимальний кріопротектор була обрана лактоза в концентрації 6 %.

3.4.3 Порівняння стабільності рідкої емульсії та ліофілізату Cyt-LS

Спираючись на результати виконаних експериментів, проводили порівняння стабільності водної емульсії та ліофілізату Cyt-LS. Була приготовлена емульсія Cyt-LS з оптимальним фосфоліпідним складом, співвідношенням ліпід

: цитохром С, типом і концентрацією кріопротектора. Отримані Cyt-LS розливали в скляні флакони по 10 мл. Розливання та закупорювання флаконів провели в асептичних умовах в атмосфері інертного газу. Одну частину флаконів залишили в рідкому стані в захищеному від світла місці при температурі $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (умови зберігання у побутовому холодильнику). Обрані температурні умови відповідають умовам зберігання відомих рідких ЛС-ЛЗ [129].

Іншу частину флаконів ліофілізували за встановленою в результаті виконаних експериментів програмою ліофілізації. Отримані FD-Cyt-LS також залишили на зберігання в захищеному від світла місці при температурі мінус 15°C . Обрані температурні умови відповідають умовам зберігання відомим ліофільно висушених ЛС-ЛЗ [130, 131].

Результати стабільності рідких LS-Cyt та FD-LS-Cyt з однаковим складом наведені в табл. 3.11 та 3.12.

Таблиця 3.11

Дослідження стійкості рідких LS-Cyt при зберіганні (5 ± 3) $^{\circ}\text{C}$

Показник	Термін зберігання, міс				
	0	1	3	6	12
Інкапсуляція, %	95,8	95,0	95,5	95,0	95,0
Середній розмір часток, нм	168	180	188	195	215
pH	6,95	6,81	6,80	6,77	6,65
ЛФХ, %	0,60	0,75	0,88	1,45	2,95
ВЖК, %	0,4	0,42	0,5	0,58	0,81
Cyt C, %	100,1	99,8	99,5	99,4	99,2
ФХ, %	99,8	99,4	99,1	98,5	98,3
ДПФГ, %	100,2	100,0	99,9	99,4	99,1

Таблиця 3.12

Дослідження стабільності ліофільно висушених LS–Cyt мінус 15 °С

Показник	Термін зберігання, міс				
	0	1	3	6	12
Інкапсуляція, %	95,8	95,4	95,5	95,0	95,6
Середній розмір часток, нм	168	163	164	163	169
pH	6,97	6,95	6,92	6,95	6,88
ЛФХ, %	0,60	0,63	0,64	0,64	0,68
ВЖК	0,4	0,4	0,43	0,45	0,46
Cyt C, %	100,1	99,8	99,8	99,8	99,6
ФХ, %	99,8	99,5	99,7	99,4	99,4
ВЖК, %	100,2	100,2	100,2	100,2	100,1
Волога, %	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6

Із наведених даних видно, що у водної емульсії LS–Cyt протягом 12 місяців спостерігається зростання продуктів деградації: ВЖК та ЛФХ на 202,5 і 409,7% відповідно порівнянно з вихідними значеннями, а також зниження вмісту ФХ та ДПФГ на 1,5 і 1,0% відповідно.

Одночасно з цим істотних змін у складі зразків FD–LS–Cyt не виявлено. Вміст продуктів деградації (ЛФХ та ВЖК) є стабільним протягом періоду спостережень і знаходиться на початковому рівні, що свідчить про збереження FD–LS–Cyt протягом 1 року в обраних умовах зберігання, на відміну від рідких розчинів. Крім того, протягом усього терміну ліофілізати зберігали зовнішній вигляд, час утворення та стійкість емульсії (не більше 5 хв, має бути стійкою не менше 10 хв).

3.5 Технологічний процес одержання препарату

У результаті проведених досліджень був розроблений ЛС-ЛЗ, що містить цитохром С, у формі ліофілізату для приготування очних крапель. Склад

запропонованого препарату наведено у табл. 3.13. В одному флаконі міститься 2,025 мг Cyt–С як діюча речовина.

Таблиця 3.13

Склад на 1 флакон

<i>Діюча речовина</i>	
Цитохром С, у перерахунку на суху речовину	2,025 мг
<i>Фосфоліпідні компоненти:</i>	
Фосфатидилхолін яєчний, у перерахунку на суху речовину	18 мг
Дипальмітоїлфосфатидилгліцерол, у перерахунку на суху речовину	15 мг
<i>Допоміжні речовини:</i>	
Лактоза моногідрат	180 мг
Калію дигідрофосфат	2,34 мг
Динатрію гідрофосфат безводний	2,44 мг

У процесі розробки складу препарату FD–Cyt-LS вивчалися технологічні параметри, що забезпечують належну технологію одержання препарату «Ліпосомальний цитохром С, ліофілізат для приготування очних крапель». На основі даних, що були отримані при розробці лабораторної технології, запропоновано апаратурну і технологічну схеми виробництва FD–Cyt-LS.

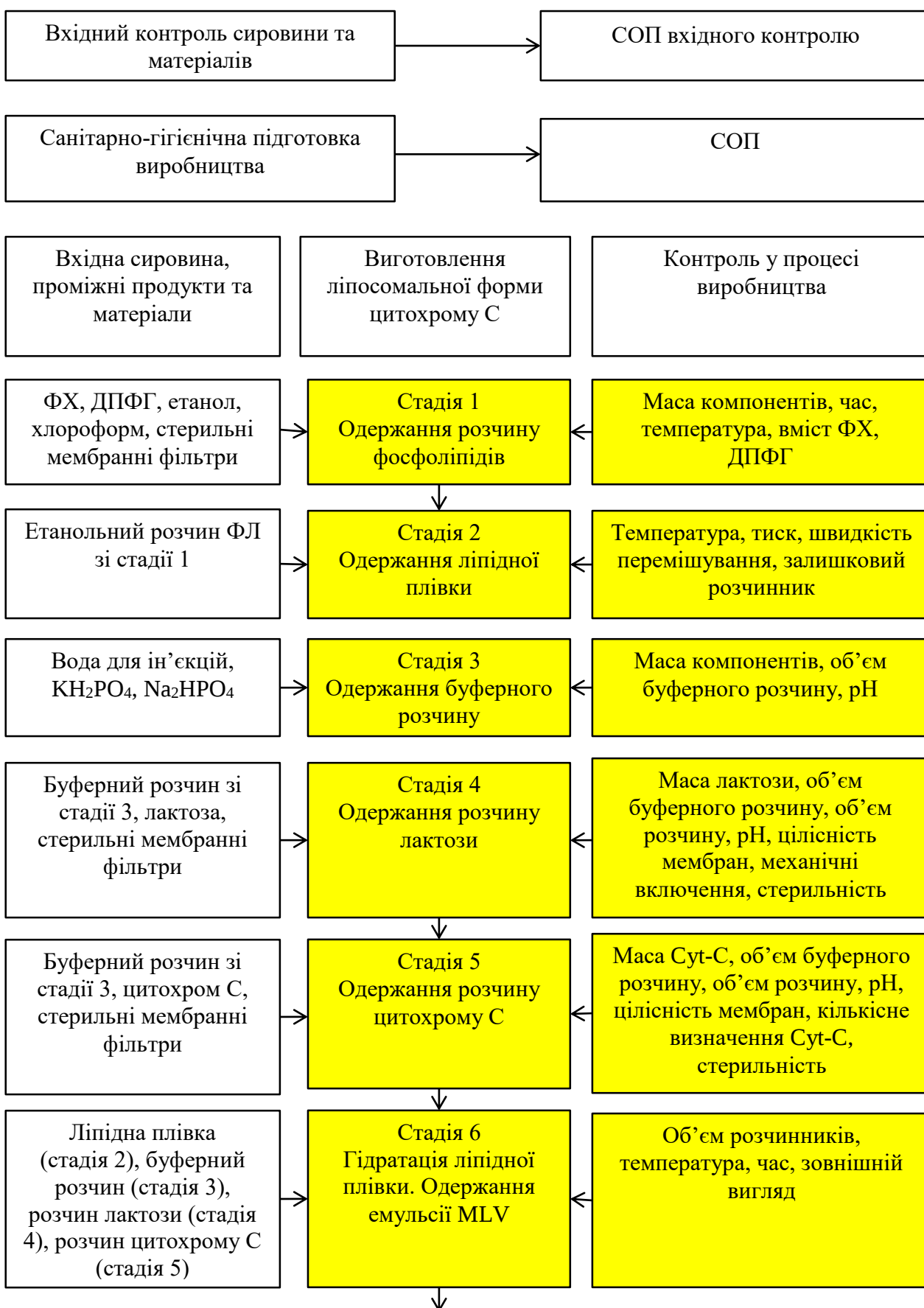
Запропонована нами технологічна схема отримання Cyt-LS містить такі стадії:

- 1– одержання розчину фосфоліпідів;
- 2– одержання ліпідної плівки;
- 3– одержання буферного розчину;
- 4– одержання розчину лактози;
- 5– одержання розчину Cyt–С;
- 6– гідратація ліпідної плівки, одержання емульсії MLV;
- 7– гомогенізація, одержання емульсії ULV;

- 8– стерилізуюча фільтрація емульсії;
- 9– розливання Cyt-LS у флакони;
- 10– ліофілізація та герметизація, отримання FD–Cyt-LS;
- 11– маркування, фасування, пакування флаконів із FD–Cyt-LS.

Контроль якості за МКЯ.

Технологічна схема виробництва Cyt-LS наведена на рис. 3.9.



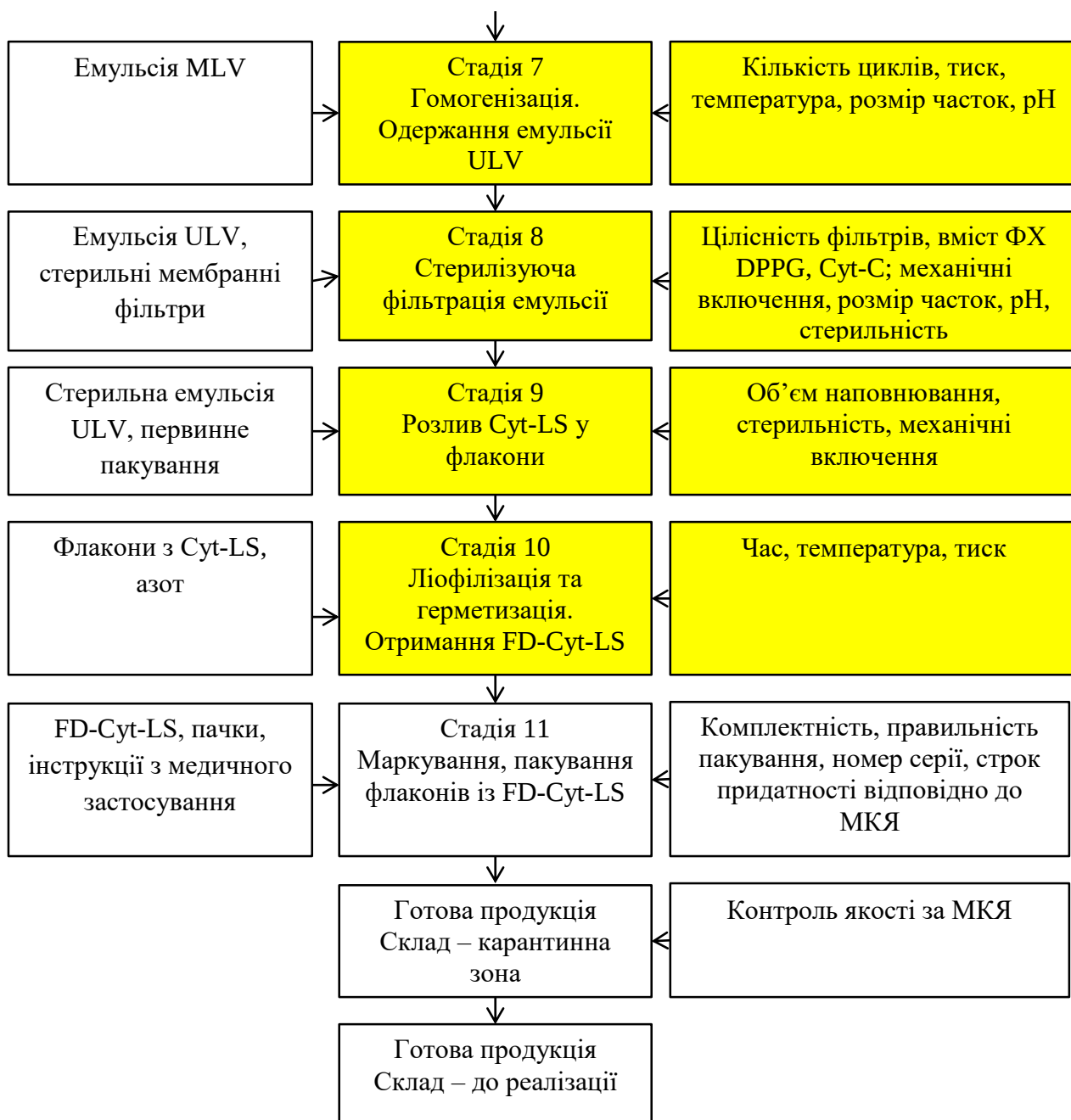


Рис. 3.9 Технологічна схема виробництва.

Із рис 3.9 видно, що технологічний процес починається з вхідного контролю сировини та матеріалів і підготовки виробництва відповідно до СОП «Санітарна підготовка виробництва готових лікарських засобів».

Стадія 1. Одержання розчину фосфоліпідів. Експериментальне дослідження показало, що оптимальним розчинником для ФЛ є суміш хлороформ : етанол (5 : 1), при якому ДПФГ повністю розчиняється. Отриманий розчин ФЛ для зниження ризику бактеріальної контамінації піддавався фільтрації крізь фільтри Pall розміром 0,45 та 0,22 мкм, що витримують обробку органічними розчинниками.

Стадія 2. Одержання ліпідної плівки. Одержаний стерильний розчин ФЛ переносять у колбу вакуумного роторного випарювача Buchi Rotavapor R215 (Швейцарія). Під час випарювання контролюють такі значення: температура, тиск та кількість обертів. Випарювання проводять при температурі 40–43 °C при постійному перемішуванні (55 об/хв) до повного видалення розчинника та одержання тонкої ліпідної плівки на стінках колби. Після закінчення випарювання отримана ліпідна плівка обробляється стерильним інертним азотом протягом 30 хвилин.

Стадія 3. Одержання буферного розчину. Готують фосфатний буферний розчин. При цьому проводять перерахунок вмісту основної речовини та вологи солей, що використовуються, на 100 % речовину. Для зниження ризику бактеріальної та механічної контамінації отриманий буферний розчин фільтрують крізь фільтри Pall suppor 0,22 мкм. Контролюють значення рН, об'єм буферного розчину. Отриманий буферний розчин використовується далі як для одержання емульсії, так і для подальшого проведення технологічного процесу (обробка обладнання).

Стадія 4. Одержання розчину лактози. Наважку лактози (у перерахунку на 100 % речовину) розчиняють у буферному розчині, отриманому на стадії 3. Для зниження ризику бактеріальної та механічної контамінації отриманий розчин лактози фільтрують крізь фільтри Pall suppor 0,22 мкм. Контролюється наважка лактози, об'єм буферного розчину, загальний об'єм розчину, рН, цілісність мембран, механічні включення, стерильність.

Стадія 5. Одержання розчину цитохрому С. Наважку цитохрому С (у перерахунку на 100 % речовину) розчиняють у буферному розчині, отриманому на стадії 3. Для зниження ризику бактеріальної та механічної контамінації отриманий розчин цитохрому С фільтрують крізь фільтри Pall suppor 0,22 мкм. Контролюється наважка цитохрому С, об'єм буферного розчину, рН, цілісність мембран, кількісне визначення цитохрому С, стерильність.

Стадія 6. Гідратація ліпідної плівки. Одержання емульсії MLV. До колби з ліпідною плівкою, що була одержана на стадії 2, додають розчин цитохрому С, розчин лактози та буферний розчин. Далі плівку гідратують до одержання емульсії MLV на орбітальному шейкері IKA Werke KS 501 (Німеччина). Під час гідратації контролюють об'єм розчинників, час перемішування, зовнішній вигляд емульсії іа температуру (38-44 °C).

Стадія 7. Гомогенізація. Одержання емульсії ULV. Гомогенізацію отриманої емульсії MLV проводять на гомогенізаторі високого тиску Microfluidizer M110P до одержання емульсії ULV Cyt-LS. Контролюють кількість циклів гомогенізації, тиск, температуру, розмір часток та рН.

Стадія 8. Стерилізуюча фільтрація емульсії Cyt-LS. Перед наповненням флаконів отриману емульсію ULV піддають стерилізуючій фільтрації крізь мембрани з розмірами пор 0,22 мкм, що проходить у зоні ламінарного потоку повітря. Як фільтрувальний елемент використовують стерильний мембранний фільтр Pall suppor із розміром пор 0,22 мкм. Контролюють цілісність фільтрів, вміст ФХ DPPG, цитохрому С, механічні включення, розмір часток, рН, стерильність.

Стадія 9. Розливання Cyt-LS. Отриману емульсію ULV розливають за допомогою дозувального пристрою – перистальтичного насоса (Master Flex) – у приміщенні класу чистоти В у зоні А при увімкненому ламінарі. Розливають у попередньо простерилізовані флакони, які перекривають підготовленими

стерильними пробками для ліофілізації. Контролюють об'єм наповнювання, стерильність, механічні включення.

Стадія 10. Ліофілізація та герметизація. Отримання FD–Cyt-LS. Ліофілізацію проводять на сублімаційній устатковині Martin Christ Epsilon 2-6-D LSCPlus. Після закінчення програми ліофілізації до камери сублімаційної устатковини подають азот і закривають кришками флакони з FD–Cyt-LS, після чого їх обкатують алюмінієвими ковпачками. Під час проведення ліофілізації контролюють час, температуру, тиск.

Стадія 11. Маркування, пакування флаконів із FD–Cyt-LS. Флакони маркують ідентифікаційною етикеткою із зазначенням найменування препарату, номера серії, дати виробництва. Контролюють комплектність, правильність пакування, номер серії, строк придатності відповідно до МКЯ.

Далі проводять контроль якості отриманого препарату відповідно до вимог МКЯ. Потім готову продукцію передають на склад готової продукції із сертифікатом якості ВКЯ.

Висновки до розділу 3

1. Проведено дослідження фізико–хімічних і технологічних показників діючої речовини та фосфоліпідів. Розроблено специфікації вхідного контролю на діючу речовину та фосфоліпиди, що відповідають вимогам ДФУ до субстанцій для фармацевтичного застосування та специфікацій виробників.

2. Оцінено вплив складу ліпосом на рівень інкапсуляції та розмір часток при створенні ліпосомальної форми цитохрому С. За результатами досліджень запропоновано співвідношення ФХ : ДПФГ (1,20 : 1,0), яке забезпечує максимальну інкапсуляцію цитохрому С.

3. При дослідженні режимів гомогенізації та отриманні ULV Cyt-LS експериментально обґрунтовано рівень тиску гомогенізації у 800 bar, що дозволяє проводити процес упродовж 5 циклів до отримання наночасток із середнім розміром ≤ 220 нм та і перевищувати оптимальний температурний режим 38–44 °С.

4. Проведено оцінку ефективності стерилізуючої фільтрації. Отримані Cyt-LS піддаються стерилізуючій фільтрації зі збереженням основних фізико–хімічних властивостей, що підтверджує розмір отриманих ЛС часток. Це відкриває шлях потенційному використанню Cyt-LS у клінічній практиці як стерильного ЛЗ.

5. Обґрунтовано доцільність проведення ліофілізації та досліджено за допомогою підходу QbD процес ліофілізації Cyt-LS, оцінено вплив кріопротекторів і температури вторинного сушіння на якість FD–LS–Cyt. Оптимальним кріопротектором обрана лактоза в концентрації 6 %. Установлено температуру вторинного сушіння 30 °С, при цій температурі результати збереження початкових нанорозмірів та вмісту залишкової вологи були кращі, а також ці зразки дали кращі результати за показниками часу утворення емульсії.

6. Досліджено фізико-хімічні, морфологічні та мікробіологічні показники отриманих LS-Cyt та FD-LS-Cyt. Проведено порівняння стабільності водної емульсії LS-Cyt із FD-LS-Cyt протягом 12 місяців. У водній емульсії LS-Cyt спостерігалось зростання продуктів деградації: ВЖК та ЛФХ на 202,5 і 409,7% відповідно порівняно з вихідними значеннями, а також зниження вмісту ФХ та ДПФГ на 1,5 і 1,0% відповідно. Водночас істотних змін у складі FD-LS-Cyt зразків не виявлено.

7. Запропоновано склад FD-LS-Cyt, що містить на 1 фл: 2,025 мг Cyt-C; 18 мг ФХ яєчного; 15 мг ДПФГ; 180 мг лактози моногідрату; 2,34 мг калію дигідрофосфату і 2,44 мг динатрію гідрофосфату б/в.

8. Обґрунтовано та розроблено оптимальну промислову технологію одержання Cyt-LS. Загалом показано, що усі технологічні операції не викликають до суттєвих змін фізико-хімічних характеристик основних компонентів (Cyt-C, ФЛ) під час одержання FD-LS-Cyt.

Результати досліджень за даним розділом наведено у таких публікаціях:

1. Katsai O., Ruban O. Preparation And Characterization Of Liposomal Delivery System Of Natural Heme Protein. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. P. 418–425. (Особистий внесок: розробка методів отримання та характеристикації ліпосомальної форми цитохрому С, експериментальне дослідження впливу технологічних параметрів на ключові показники якості (розмір часток, домішки, стерильність), дослідження специфічної активності *in vitro*, оформлення та підготовка статті до друку).

2. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopol'skyi Y. M. "Quality-by-design" approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C. *Pharmakeftiki*. 2018. T. 30. №. 2. С. 76–87. (Особистий внесок: розробка підходу QbD при виборі лікарської форми ліпосомальної форми цитохрому С, дослідження впливу типу, концентрації кріопротектора, та параметрів ліофілізації на критичні показники якості; оформлення та підготовка статті до друку).

3. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopol'skyi Y. M. Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. T. 72, № 12. С. 736-740. (Особистий внесок: розробка технології отримання, методів контролю та вивчення стабільності отриманих зразків ліпосомальної форми цитохрому С, оформлення та підготовка статті до друку). (**Scopus/Web of science**).

4. Кацай А. Г., Рубан Е. А., Краснополюский Ю. М., Влияние состава липосом на степень инкапсуляции размер частиц при создании липосомальной формы цитохрома С. *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. 2017. № 4 (8). С. 32-36. (Особистий внесок: експериментальне дослідження впливу складу ліпосом на ступінь інкапсуляції та розмір часток; оформлення та підготовка статті до друку).

5. Пилипенко Д. М., Кацай А. Г., Прохоров В. В., Конахович Н. Ф., Григорьева А. С., Краснополяский Ю. М. Исследование антиаритмической активности липосомальной формы цитохрома С. *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. 2017. № 3 (7). С. 51-57. (Особистий внесок: отримання зразків ліпосомального цитохрому С, фіз.-хім. характеристика отриманих зразків).

6. Спосіб отримання фармакологічно активної ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та ліпосомальна композиція, отримана таким способом : пат. 118583 України / Григор'єва Г. С., Кацай О. Г., Краснополяський Ю. М., Прохоров В. В., Хромов О. С., Пасєчнікова Н. В., Добреля Н. В. № а 201610776 ; заявл. 27.10.2016 ; опубл. 11.02.2019, Бюл. № 3. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, опис заявки, участь у підготовці патентної формули).

7. Способ получения липосомальной формы цитохрома С : пат. 22183 РФ / Шоболов Д. Л., Краснополяский Ю. М., Ульянов А. М., Натыкан А. А., Тарасов В. В., Балабаньян В. Ю., Швец В. И., Кацай А. Г. ; Евразийское патентное ведомство № 201201592 ; заявл. 24.12.2012 ; опубл. 30.11.2015. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, написання опису заявки, участь у підготовці патентної формули).

8. Method of producing of pharmacologically active liposomal composition containing cytochrome c, and liposomal composition obtained by this method : pat. 2018/0116957 A1 US / Grygor'ieva G. S., Katsai O. H., Krasnopol'skyi Y. M., Prokhorov V. V., Khromov O. S., Pasyechnikova N. V., Dobrelia N. V. № а 201610776 ; appl. 25.10.2017 ; publ. 03.05.2018. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, опис заявки, участь у підготовці патентної формули).

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ ПРЕПАРАТУ

4.1 Характеристика ліпосомального цитохрому С та розробка специфікації на ліофілізований продукт

Відповідно до рекомендацій FDA «Guidance for industry Liposome Drug Products», ЕМА, вимог ДФУ 2.0, викладених у загальних статтях на лікарські форми «Ліпосомальні лікарські засоби N», «Очні лікарські засоби» і вимог Настанови 42–3.2:2004 «Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності» [31 – 33, 95] нами був розроблений проєкт МКЯ на готову лікарську форму Cyt-LS.

Специфікація (табл. 4.1) містить такі показники: опис, ідентифікація, час утворення емульсії, рН, домішки, втрата в масі при висушуванні, однорідність маси для одного флакона, механічні включення, розмір та розподіл часток за розмірами, залишкові органічні розчинники, стерильність, осмолярність, кількісне визначення Cyt–С та ФЛ, ступінь інкапсуляції АФІ (Cyt–С).

Специфікація на Cyt-LS

Показник	Вимоги НД	Методи контролю
1	2	3
Опис	Аморфна маса світло-червоного кольору з характерним запахом	п.1 МКЯ
Ідентифікація ДПФГ	На хроматограмі випробовуваного розчину, отриманій при виконанні тесту «кількісне визначення фосфоліпідів» час утримання піка, що відповідає ДПФГ, відповідає часу утримання основного піка розчину стандарту ДПФГ.	п. 2 МКЯ ДФУ, 2.2.25 п. 2 МКЯ ДФУ, 2.2.29
Фосфатидилхолін яєчний	На хроматограмі випробовуваного розчину отриманій при виконанні тесту «кількісне визначення фосфоліпідів» час утримання піка, що відповідає ФХ відповідає часу утримання основного піка розчину стандарту ФХ	
Час утворення та стійкість емульсії	Час утворення емульсії – не більше 5 хв, має бути стійкою не менше 10 хв	п. 3 МКЯ
pH	Від 6,0 до 7,5	п. 4 МКЯ ДФУ 2.2.3
Домішки	Лізофосфатидилхолін – не більше 3,0 % Вільні жирні кислоти – не більше 2,0 %	п. 5 МКЯ ДФУ, 2.2.27
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 4 %	п. 6 МКЯ ДФУ 2.2.32
Однорідність маси для одного флакону	$18/20 \leq \pm 10\%$; $0/20 \geq \pm 20\%$	п. 7 МКЯ ДФУ 2.9.5
Механічні включення: невидимі частки	Не більше 6000 часток розміром ≥ 10 мкм у флаконі Не більше 600 часток розміром ≥ 25 мкм у флаконі	п. 8 МКЯ ДФУ 2.9.19
Розмір та розподілення часток за розмірами	Середній діаметр наночасток має бути ≤ 500 нм	п. 9 МКЯ USP <729> Method I—Light Scattering Method

Продовження табл. 4.1

1	2	3
Залишкові органічні розчинники	Етанол – не більше 1000 ppm (0,1 %) Хлороформ – не більше 500 ppm (0,05 %)	п. 10 МКЯ ДФУ 2.4.24
Стерильність	Повинен бути стерильним	п. 11 МКЯ ДФУ 2.6.1
Осмоляльність	Від 300 мОсмоль/кг до 400 мОсмоль/кг	п. 12 МКЯ ДФУ 2.2.35
Кількісне визначення: Цитохром с, мг Фосфатидилхолін яєчний, мг ДПФГ, мг	Від 1,823 до 2,227 мг у флаконі, у перерахунку на суху речовину Від 16,2 до 19,8 мг у флаконі Від 13,5 до 16,5 мг у флаконі	п. 13 МКЯ ДФУ 2.2.25, 2.2.29
Ступінь інкапсуляції діючої речовини	Частка вільного цитохрому С (неінкапсульованого) має становити не більше 10 % від загального вмісту цитохрому С у продукті.	п. 14 МКЯ ДФУ, 2.2.29

Обґрунтування специфікацій.

Опис. Аморфна маса світло–червоного кольору з характерним запахом, притаманним яєчним ФЛ.

Ідентифікація. Для діючої речовини – цитохрому С – ідентифікацію проводять, знімаючи УФ-спектр поглинання випробовуваного розчину в діапазоні 400–600 нм. УФ-спектр випробовуваного розчину має відповідати спектру поглинання розчину стандарту цитохрому С. Як стандарт цитохрому С використовували цитохром С $\geq 99,0\%$ з серця коня SDS–PAGE виробництва «BioUltra» (США).

Для ліпідних компонентів ДПФГ та ФХ ідентифікацію проводять за допомогою ВЕРХ. На хроматограмах випробовуваного розчину, отриманих при виконанні тесту «кількісне визначення фосфоліпідів», час утримування піка, що відповідає ДПФГ та ФХ, відповідає часу утримування основного піка розчину стандарту ДПФГ та ФХ.

Час утворення та стійкість емульсії. FD–Cyt-LS являє собою засіб для утворення емульсії для очних крапель. Емульсія, яка утворюється після розчинення, має бути деякий час стійка та гомогенна. Відпрацьовування часу утворення та стійкості емульсії було на стадії фармацевтичної розробки (розділ 3.4, табл. 3.10, Обґрунтування вибору допоміжних речовин при розробці ліпосомальної форми Cyt–C). Час утворення емульсії – не більше 5 хв, має бути стійкою не менше 10 хв.

pH. На основі експериментальних даних (розділ 3.4 Обґрунтування вибору допоміжних речовин) при фармацевтичній розробці використовували фосфатний буфер із pH 6.8. Тому до проєкту МКЯ на препарат уведений показник pH, інтервал визначення якого знаходиться в межах від 6,0 до 7,5. Дані, отримані при дослідженні стабільності FD–Cyt-LS, свідчать про те, що значення pH в обраних умовах зберігання не перевищують обрані межі значень. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ, 2.2.3.

Сторонні домішки. Відповідно до вимог до розробки специфікації на ЛС-ЛЗ сторонні домішки характеризують ступінь деградації основної речовини під час виробництва та зберігання препарату.

Особливе значення мають домішки ФЛ. Продукти гідролізу (лізофосфоліпіди) є токсичними, тому мають контролюватися. Крім того, ЛФХ має виражені гемолітичні властивості. Згідно з USP Egg Phospholipids та Lipid Injectable Emulsion [97, 117] допускається вміст ЛФХ не більше 3% та 2% ВЖК. Дані, отримані при дослідженні стабільності FD–Cyt-LS, свідчать про те, що кількість ЛФХ та ВЖК в обраних умовах зберігання не перевищують обрані межі значень.

Втрата маси при висушуванні. Готовий препарат Cyt-LS – це висушена аморфна маса, якість якої при зберіганні залежить, зокрема, і від кількості води у ліофілізаті. Тому це важливий показник якості готової форми препарату. Втрата

маси при висушуванні має бути не більше 4 %. Дослідження проводять згідно з ДФУ 2.2.32.

Однорідність маси для одного флакона. Згідно з вимогами ДФУ 2.9.5 маса лікарського засобу для парентерального застосування в первинній упаковці має бути в межах норми для забезпечення необхідного об'єму при заборі препарату шприцом після розведення – $18/20 \leq \pm 10\%$; $0/20 \geq \pm 20\%$.

Механічні включення. Згідно з вимогами ДФУ 2.9.19 (метод 1) проводять випробування препарату на механічні включення. Видимі механічні включення мають бути відсутні. Нормування невидимих часток зазначено з урахуванням їх розміру: часток розміром >10 мкм – не більше 6000, розміром > 25 мкм – не більше 600 в одному контейнері.

Розмір та розподіл часток за розмірами. Згідно з вимогами ДФУ до ліпосомальних препаратів необхідно проводити вивчення форми та розподілу часток за розмірами. Для контролю цих показників зазвичай використовують мікроскопію, лазерну дифракцію та динамічне світлорозсіювання. Найбільш відповідним для контролю наночасток з діаметром 10–500 нм є метод динамічного світлорозсіювання.

Згідно з вимогами USP Globule Size Distribution in Lipid Injectable Emulsion <729> Method I—Light Scattering Method [135] середній діаметр ЛС має бути ≤ 500 нм. Дані, отримані при дослідженні стабільності FD–Cyt-LS, свідчать про те, що середній показник розміру часток, отриманий методом динамічного світлорозсіювання в обраних умовах зберігання, не перевищував обрані межі значень і залишався ≤ 220 нм.

Морфологію Cyt-LS методами сканувальної електронної мікроскопії та підтвердження розмірів здатністю Cyt-LS піддаватися стерилізуючій фільтрації зі збереженням основних фізико–хімічних властивостей було вивчено на стадії розробки складу і технології ЛС форми п.3.2–3.3

Залишкові органічні розчинники. У процесі виробництва використовуються органічні розчинники (хлороформ та етанол). Відповідно до вимог статті ДФУ 2.4.24 «Ідентифікація та контроль залишкових кількостей органічних розчинників» був установлений гранично допустимий вміст: етанол – не більше 1000 ppm (0,1 %), хлороформ – не більше 500 ppm (0,05 %).

Визначення проводять методом газової хроматографії відповідно до вимог ДФУ 5.4 та 2.4.24.

Стерильність. Препарат, що являє собою ліофілізат для приготування очних крапель, має бути стерильний.

Випробування проводять згідно з ДФУ 2.6.1. Препарат в умовах випробувань не має антимікробної дії.

Випробування методом мембранної фільтрації закритого типу Steritest.

Підготовка зразка: вміст 20 флаконів препарату розчиняють за допомогою стериделютера в 100 мл стерильної води, перемішують протягом 2 хв до утворення розчину. Увесь вміст флаконів фільтрують крізь два мембранні фільтри, попередньо зволожені водою. Після закінчення фільтрації кожен фільтр відмивають однією порцією (по 100 мл стерильної води). Один контейнер заповнюють тіогліколевим поживним середовищем, другий – соєво–казеїновим.

Посіви в тіогліколевому середовищі інкубують при температурі (30–35)°C; посіви у соєво–казеїновому середовищі – при температурі (20–25) °C.

Усі посіви інкубують протягом 14 діб. При візуальному спостереженні не має бути зростання мікроорганізмів.

Осмолярність. Згідно з вимогами ДФУ ізотонічність очних крапель повинна бути на рівні ізотонічності слюзової рідини, відповідно до 0,9 % розчину натрію хлориду. Допускається виробництво розчинів, осмолярність (осмолярність) яких знаходиться в межах осмолярності (осмолярності) 0,6 – 2 % розчину натрію хлориду. Виходячи з цього встановлено значення

показника осмолярності від до 400 мОсмоль/кг. Випробування проводять згідно з ДФУ 2.2.35.

Кількісне визначення. У проєкті МКЯ контролюється вміст діючої речовини – цитохрому С – у флаконі. Від 1,823 до 2,227 мг у флаконі у перерахунку на суху речовину. Випробування проводять згідно з ДФУ 2.2.25.

Кількісно контролюють вміст ліпідних компонентів препарату. Вміст ФХ від 16,2 до 19,8 мг у флаконі, ДПФГ – від 13,5 до 16,5 мг у флаконі.

Випробування проводять згідно з ДФУ 2.2.29.

Ступінь інкапсуляції діючої речовини. Згідно з вимогами статті ДФУ «Ліпосомальні лікарські засоби» [32] визначають ступінь інкапсуляції діючої речовини (цитохром С). Визначення проводять методом гель–хроматографії згідно з ДФУ 2.2.29. На основі даних, отриманих при фармрозробці, був установлений граничний вміст неінкапсульованого цитохрому С. Частка вільного цитохрому С (неінкапсульованого) має становити не більше 10 % від загального вмісту цитохрому С у продукті.

4.2 Розробка та валідація методики визначення ступеню інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах

Згідно з вимогами FDA «Guidance for industry Liposome Drug Products» [31], ЕМА та монографії ДФУ 2.0 [32] одним із ключових Critical quality attributes (CQAs) ліпосомального продукту буде ступінь інкапсуляції активної речовини, що визначає ефективність ЛС форми порівняно з вільною формою АФІ. Визначення ступеня інкапсуляції АФІ в ЛС використовують для контролю як критичних технологічних стадій виробництва ЛС препаратів, так і готової лікарської форми та оцінювання стабільності ЛС.

Основними сучасними методиками визначення ступеня інкапсуляції гідрофільних субстанцій є ультрафільтрація, центрифугування, хроматографічне розділення ліпосом і невключеної речовини [17, 136, 137].

На нашу думку, найбільш ефективним методом оцінювання ступеня інкапсуляції гідрофільних субстанцій є метод хроматографічного розділення з використанням обладнання для рідинної хроматографії, що дає змогу об'єднати процедуру поділу та кількісного визначення невключеної речовини, суттєво стандартизує методику та дає можливість автоматизувати процес визначення.

Для розроблення методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С використовували методику гель-хроматографії на рідинному хроматографі Nexera Shimadzu (Японія), хроматографічну колонку Tricorn (GE Healthcare, Швейцарія), заповнену сорбентом superose 12. Умови хроматографування: рухома фаза – 4,515 г/л KH_2PO_4 ; pH – 6,0 (за допомогою 2 М NaOH); швидкість рухомої фази – 0,5 мл/хв; детектування при довжині хвилі – 409 нм; температура колонки – 25 °С. Як стандарт активної субстанції використовували субстанцію цитохрому С, а також отримані емульсії плацебо Cyt-LS з розміром наночасток 126 нм [102].

Методика, що валідуються, за типом найбільш схожа з методиками граничного визначення домішок, оскільки в описаному способі одержання Cyt-LS було визначено норму інкапсуляції не менше 90 %. Тобто, граничний вміст невключеного цитохрому С не може перевищувати 10 %. Валідацію методики здійснювали відповідно до рекомендацій [138] за показниками специфічність, межа виявлення й оцінка робастності.

Для аналізу використовували отримані ЛС емульсії. Зразки хроматографували без розведення. Відсутність стадії пробопідготовки підвищує точність методики та скорочує загальний час аналізу.

Специфічність. Із метою підтвердження специфічності методики проводили порівняння хроматограм: плацебо, Cyt-LS і розчину стандарту цитохрому С (рис 4.1 та 4.2).

Як видно на рис 4.1 та 4.2, плацебо ЛС – відсутні піки з часом утримування піка цитохрому С на хроматограмі розчину стандарту цитохрому С. Так само на хроматограмі плацебо ЛС відсутні максимуми поглинання в областях 400 – 410 нм і 520 – 560 нм. Характерні максимуми УФ-спектра поглинання в ділянках 400–410 і 520–560 нм спостерігаються на хроматограмах розчину стандарту цитохрому С та Cyt-LS.

Так була підтверджена специфічність методики.

Межа виявлення. Для визначення межі виявлення були проаналізовані 6 розчинів з різною концентрацією цитохрому С в діапазоні від 0,00675 (1%) до 0,0675 мг/мл (10%) (по 3 паралельних визначення).

Час утримування вільного цитохрому С (t_R) – 3,54 хв. Відносне стандартне відхилення – 0,05 %

Була побудована калібрувальна пряма і розраховані її параметри (рис. 4.3).

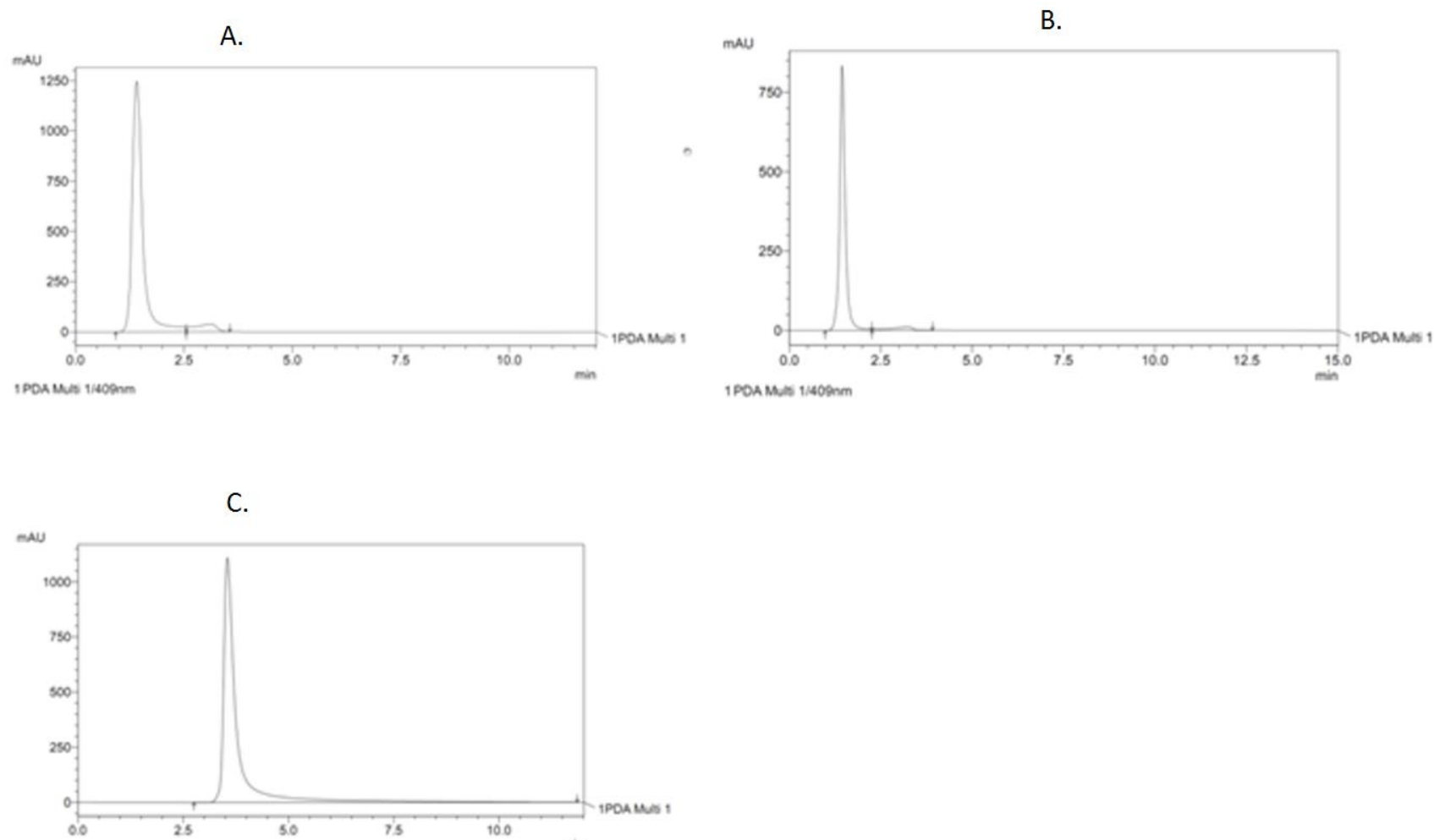


Рис 4.1 Хроматограми розчинів 409 нм: А) хроматограма плацебо, 409 нм; В) хроматограма ЛС з інкапсульованим цитохромом С, 409 нм; С) хроматограма розчину стандарту цитохрому С, 409 нм

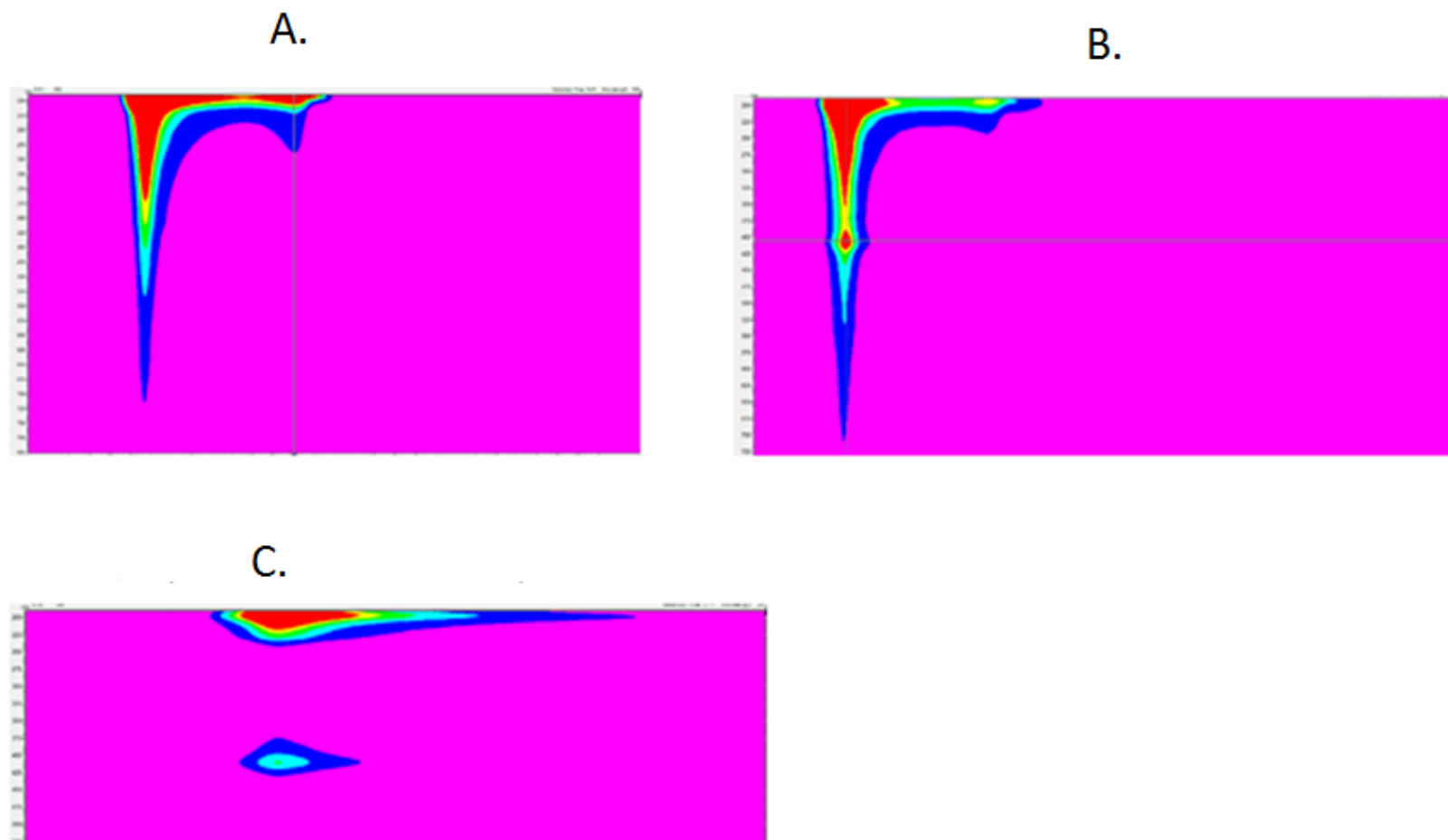


Рис. 4.2 Хроматограми розчинів 200–800 нм А) хроматограма плацебо, 200–800 нм В) хроматограма ЛС з інкапсульованим цитохромом С, 200–800 нм. С) хроматограма розчину стандарту цитохрому С, 200–800 нм

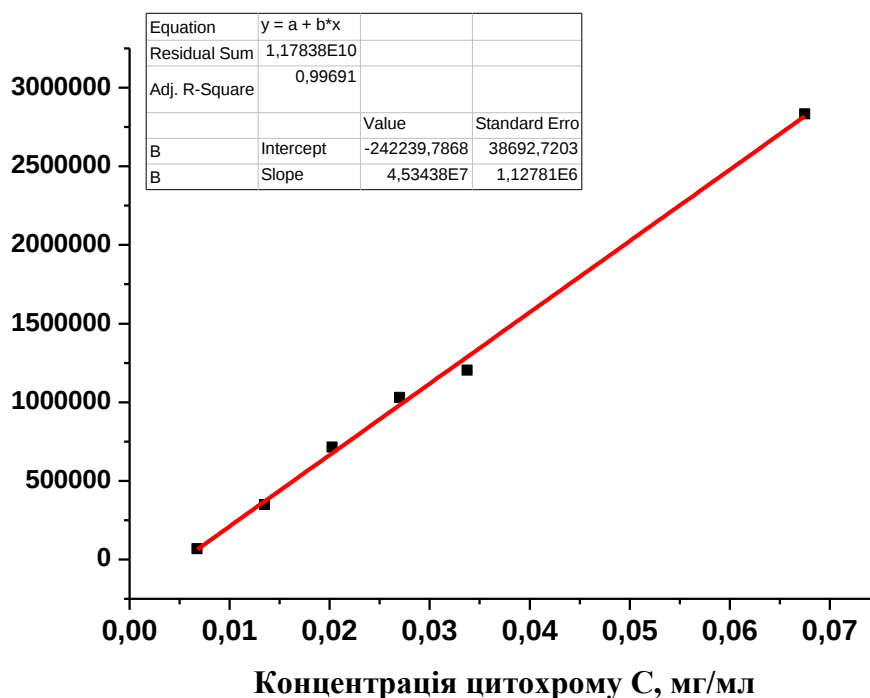


Рис. 4.3 Параметри калібрувальної прямої

Межу виявлення обчислювали за формулою:

$$MB = \frac{3,3 \cdot s}{b} = \frac{3,3 \cdot 38692,7}{45343832,4} = 0,0028 \text{ мг/мл}; \quad (4,1)$$

де: s – стандартне відхилення сигналу, $s = 38692,7$;

b – тангенс кута нахилу калібрувальної прямої, $b = 45343832,4$.

Отже, межа виявлення вільного цитохрому С в препараті становить 0,0028 мг / мл (0,4%).

Робасність. Для перевірки стійкості методики ВЕРХ був досліджений вплив зміни температури колонки і варіації швидкості рухомої фази.

Як критичний параметр оцінювали зміну величини часу утримування t_R . Результати наведені в табл. 4.2 та 4.3.

Таблиця 4.2

Зміна температури колонки

Речовина	Час утримування (t_R), хв				
	25 °C	27 °C	30 °C	33 °C	35 °C
Цитохром С	3,64	3,63	3,62	3,62	3,63

Таблиця 4.3

Варіації швидкості рухомої фази

Речовина	Час утримування (t_R), хв		
	0,9 мл/хв	1,0 мл/хв	1,1 мл/хв
Цитохром С	4,02	3,62	3,30

Дані, наведені в табл. 4.2 та 4.3, свідчать, що невеликі зміни швидкості рухомої фази і температури колонки незначно впливають на одержані хроматографічні дані.

Результати дослідження валідаційних параметрів наведені в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Валідаційні параметри

Параметр	Результат
Вміст вільного цитохрому С, %	Вміст вільного цитохрому С, не має перевищувати 10%
Специфічність	Методика специфічна
Межа виявлення, мг/мл	0,0028 мг/мл (0,4 %)
Робасність	Методика стійка

Отже, була розроблена методика, що дозволяє визначати ступінь інкапсуляції цитохрому С в ЛС, і проводити ідентифікацію складу Cyt-LS. Методика валідована за показниками «специфічність», «межа виявлення» та «робасність» відповідно до рекомендованих критеріїв. Методика може використовуватися в контролі якості готової форми Cyt-LS, і в контрольних точках під час технологічного процесу.

4.3 Розробка та валідація методики кількісного визначення фосфатидилхоліну та дипальмітоїлфосфатидилгліцеролу в препараті Cyt-LS

Серед необхідних випробувань, специфічних для ЛС препаратів, є визначення ФЛ складу. Для випробувань допускається застосування хроматографічних методів: тонкошарової, газової та рідинної хроматографії, а також різних спектрометричних методів: абсорбційної спектрометрії в ІЧ, УФ- та видимих ділянках, масспектрометрії, рентгенофлуоресцентної спектрометрії та ін.

Нами розроблена методика визначення ФЛ складу ЛС методом ВЕРХ для визначення ДПФГ та ФХ, ФЛ, що містяться у Cyt-LS [104].

Визначення проводили на рідинному хроматографі Shimadzu LC20 (Японія).

Як стандарти ФЛ використовували розчини Lipoid E PC RS і Lipod PG 16: 0/16: 0 RS. Приготовлені Cyt-LS, стандарти ФЛ, розчиняли у суміші хлороформ : метанол : вода (74 : 23 : 3). Розчини по чергово хроматографували за таких умов: колонка PerfectChrom 100 Diol 0,125 м · 4 мм, 5µm, температура колонки – 55 °С, детектор ELSD Sedere SEDEX 85 (Франція), об'єм проби – 20 мкл.

Рухома фаза А: змішують 1341,6 г n-гексану Р, 334,1 г 2-пропанолу Р, 39,4 г кислоти оцтової льодяної Р і 1,45 г (2,0 мл) триетиламіну Р.

Рухома фаза В: змішують 663,5 г 2-пропанолу Р, 140,0 г води Р, 15,8 г кислоти оцтової льодяної Р і 0,58 г триетиламіну Р.

Гradient:

Час, хв	Потік, мл/хв	Рухома фаза А (% об.)	Рухома фаза В (% об.)
0	1,0	95	5
5,0	1,0	80	20
8,5	1,0	60	40
15,0	1,0	0	100
17,5	1,0	0	100
17,6	1,0	95	5
21,0	1,0	95	5
22,0	2,0	95	5
27,0	2,0	95	5
29,0	1,0	95	5

Вміст ФХ та ДПФГ визначають за відповідними калібрувальними прямими розчинів ФХ та ДПФГ [104].

Для валідації методики, згідно з вимогами [138], підготували 9 розчинів з діапазоном вмісту ФХ та ДПФГ 80–120 % від заявленого (18 мг/флакон ФХ, 15 мг/флакон ДПФГ, у перерахунку на суху речовину). А також розчин плацебо, що містив відповідну Cyt-LS кількість цитохрому С, лактози та не містив ФЛ.

Прогноз повної невизначеності методики наведено в табл.4.5.

Для підтвердження коректності методики при її відтворенні в іншій лабораторії необхідний прогноз повної невизначеності методики. Максимально допустима повна відносна невизначеність методики аналізу (Δ_{AS} (%)) пов'язана із симетричними допусками вмісту ($\pm B$ %) аналізованої речовини:

$$\Delta_{AS} \leq \max \Delta_{AS} = \frac{B_H - B_L}{2} \times 0.32 \quad (4.2)$$

Допустимі межі вмісту ФХ та ДПФГ у розчиннику складають ± 10 %:

$$\max \Delta_{AS} = 3,2 \% \quad (4.3)$$

Повна невизначеність результатів випробування складається із невизначеності пробопідготовки Δ_{SP} та невизначеності кінцевої аналітичної процедури Δ_{FAO} :

$$\Delta_{AS} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} \quad (4.4)$$

Невизначеність кінцевої аналітичної процедури для рідинного хроматографа складає $\Delta_{FAO} = 0,70$ %.

Таблиця 4.5

Невизначеність пробопідготовки

Операція пробопідготовки	Джерело невизначеності	Рівень	Абсолютна похибка	Представлення	Невизначеність
Розчин порівняння					
Зважування	Аналітичні ваги	6300	0,2	маса	0,2 мг/100 мг·100 % = 0,2 %
Доведення до об'єму	Мірна колба (клас А)	100	0,04	мл	0,12 %
Взяття аліквоти	Градуйована піпетка (клас А)	10	0,057	мл	0,57 %
Доведення до об'єму	Мірна колба (клас А)	25	0,058	мл	0,23 %
Досліджуваний розчин					
Зважування	аналітичні ваги	6300	0,2	маса	0,2 мг/219 мг·100 % = 0,091 %
Доведення до об'єму	мірна колба (клас А)	50	0,06	мл	0,17 %
Загальна невизначеність пробопідготовки Δ_{SP}	$\Delta_{SP} = \sqrt{0.2^2 + 0.12^2 + 0.57^2 + 0.23^2 + 0.091^2 + 0.17^2} = 0.685\%$				

Як видно з табл. 4.5, найбільшу невизначеність 0,57% у пробопідготовку вносить взяття аліквоти градуйованою піпеткою об'ємом 10 мл:

$$\Delta_{AS} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{0.685^2 + 0.70^2} = 0.979\% \quad (4.5)$$

$$\Delta_{AS} = 0.979\% \leq \max \Delta_{AS} = 3.2\% \quad (4.6)$$

Прогнозована повна невизначеність аналітичної методики для тесту «Кількісне визначення» дорівнює $\Delta_{AS} = 0,979\%$, що не більше критичного значення $\Delta_{AS_{теор}} = 3,2\%$ для допусків вмісту $\pm 10,0\%$, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Специфічність

Для оцінки специфічності виконано перевірку незначущості впливу буферних розчинів, рухомої фази та впливу плацебо. Результати наведені у табл. 4.6.

Таблиця 4.6

Результати перевірки специфічності

Компоненти	Час утримування піків, хв.		Число теоретичних тарілок піків		Фактор симетрії піків	
	DPPG–Na	фосфатидилхоліну	DPPG–Na	фосфотидилхоліну	DPPG–Na	фосфотидилхоліну
Розчинник	–	–	–	–	–	–
Плацебо	–	–	–	–	–	–
Стандартний розчин фосфатидилхоліну	–	10,290	–	105380	–	0,765
Стандартний розчин DPPG–Na	8,017	–	194951	–	1,312	–
Моделльний розчин фосфатидилхоліну та DPPG–Na	8,031	10,314	210216	109072	1,349	0,780

Показана відсутність інтерференції піків фосфатидилхоліну та DPPG–Na, які визначаються за методикою, з піками будь-якого з компонентів плацебо, розчинника та рухомої фази.

На рис. 4.4 – 4.8 показана відсутність інтерференції піків ФХ та ДПФГ, які визначаються за методикою, з піками будь-якого з компонентів плацебо, розчинника та рухомої фази

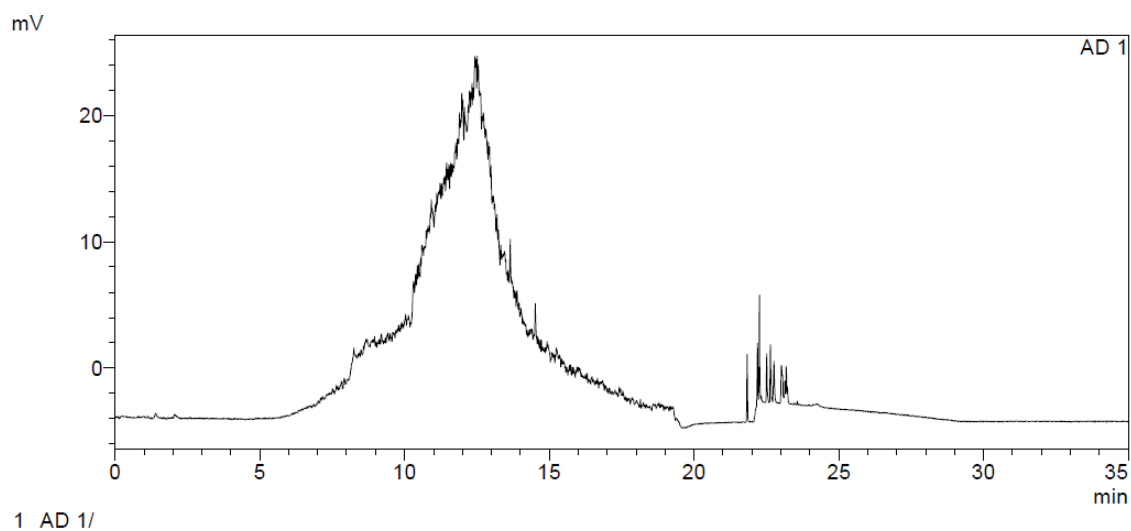


Рис. 4.4 Хроматограма розчинника

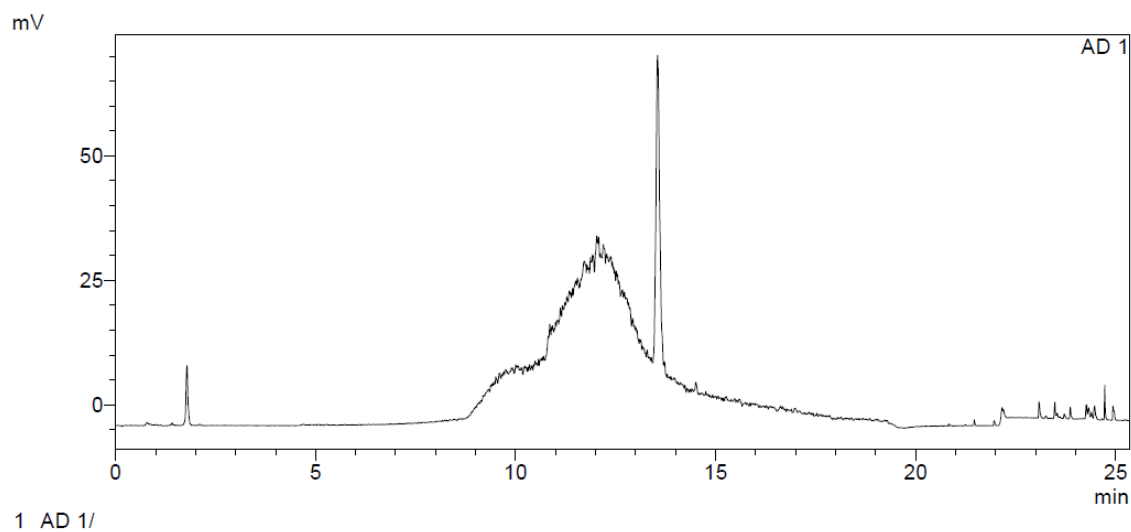


Рис. 4.5 Хроматограма плацебо

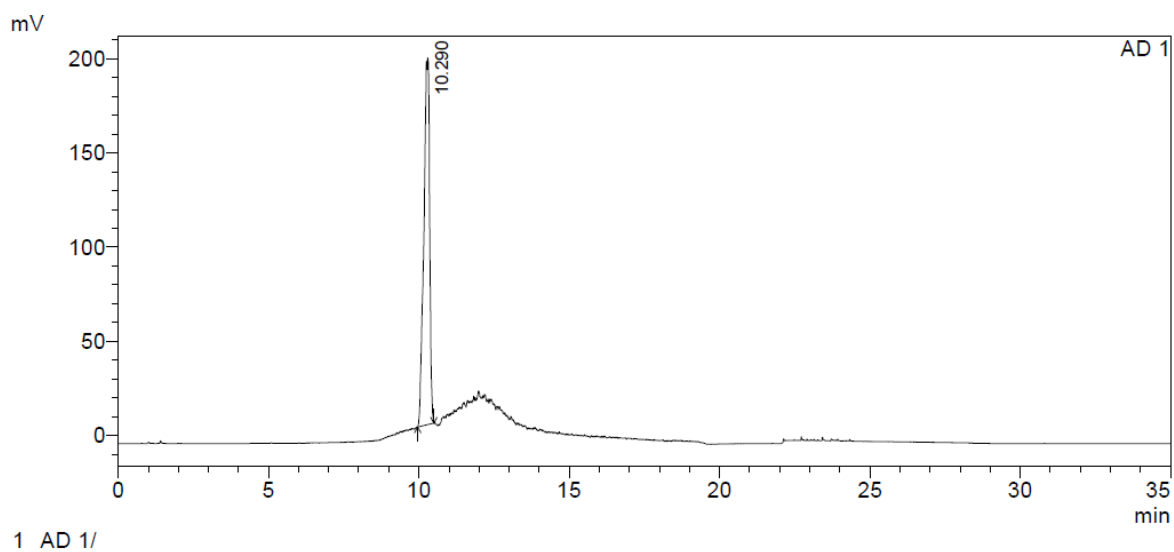


Рис. 4.6 Хроматограма розчину стандарту ФХ

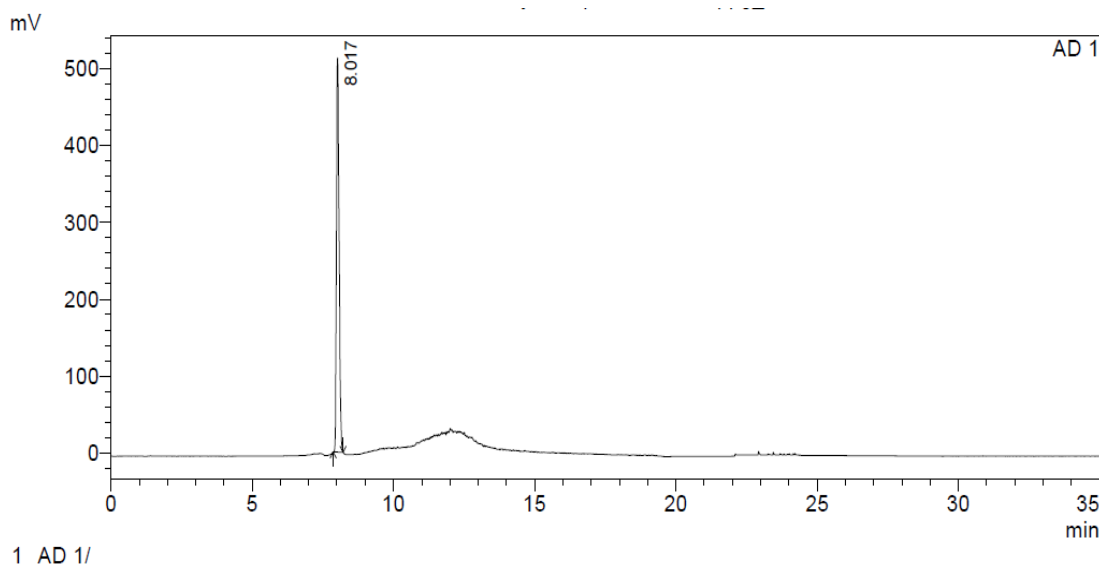


Рис. 4.7 Хроматограма розчину стандарту ДПФГ

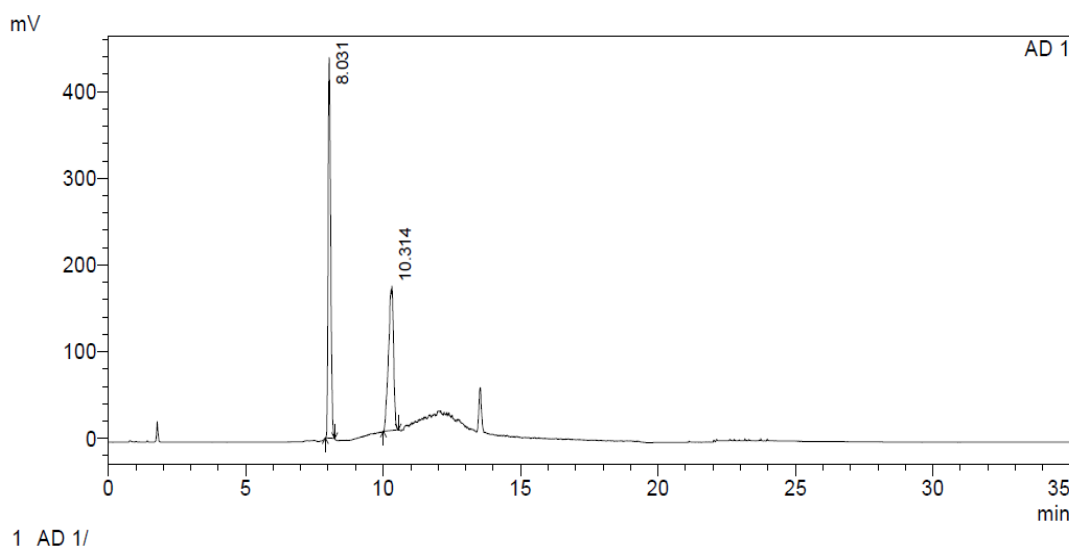


Рис. 4.8 Хроматограма модельного розчину ФХ та ДПФГ

Отже, методики кількісного визначення ФХ та ДПФГ у препараті Сут–LS специфічні.

Правильність, діапазон застосування, збіжність

Для оцінки правильності, діапазону застосування методики виконували перевірку ступеня відповідності між відомою первинною кількістю речовини в розчині та її кількістю, встановленою згідно з валідованою методикою.

Відповідно до вимог ДФУ діапазон застосування у координатах Y_i від X_i буде (80–120) % для кількісного визначення. Для визначення правильності,

діапазону застосування методики використовували модельні розчини із концентрацією ФЛ 80–120 % від номінальної концентрації з кроком 5 %.

Критерії прийнятності:

- 1) збіжність – вимоги до довірчого інтервалу;
- 2) правильність – критерій статистичної незначущості, критерій практичної незначущості.

Оцінка правильності наведена у табл. 4.7

Таблиця 4.7

Оцінка правильності та діапазону застосування

	Введено у % до концентрації розчину порівняння ФХ	Введено у % до концентрації розчину порівняння ДПФГ	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння ФХ	Знайдено у % до введеного ФХ	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння ДПФГ	Знайдено у % до введеного ДПФГ
1	2	3	4	5	6	7
МР	$X = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\%$	$X = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\%$	$Y = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%$	$Z = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$	$Y = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%$	$Z = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
lin80	80,00	80,00	80,11	100,14	79,99	99,99
lin85	85,00	85,00	86,01	101,19	85,03	100,04
lin90	90,00	90,00	90,36	100,4	90,04	100,04
lin95	98,00	98,00	98,24	100,24	98,2	100,2
lin 100	100,00	100,00	100,55	100,55	100,54	100,54
lin105	105,00%	105,00%	105,60%	100,57	105,25	100,24
lin110	110,00%	110,00%	110,70%	100,64	110,88	100,8
lin115	115,00%	115,00%	115,86%	100,75	115,9	100,78
lin120	120,00%	120,00%	121,00%	100,83	119,5	99,58

Таблиця 4.8

ФХ. Збіжність

Значення $\bar{Z}$, %	100,59%
Відносне стандартне відхилення SD_z , %	0,318%
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z = t(95\%, g-1) * SD_z = 1,860 * s_z$	0,592%
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{AS}	3,2%
Систематична похибка $\delta = \bar{Z} - 100 $	0,59%
Критерій незначущості систематичної похибки 1) $\delta \leq \Delta_z / 3 = 0.197$ 2) якщо не виконується 1), то $\delta \leq \max \Delta_{AS} * 0,32 = 1,02$	Не виконується Виконується
Загальний висновок	Методика коректна

ДПФГ. Збіжність

Значення $\bar{Z}$, %	100,25%
Відносне стандартне відхилення SD_z , %	0,4%
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z = t(95\%, g-1) * SD_z = 1,860 * s_z$	0,744%
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{AS}	3,2%
Систематична похибка $\delta = \bar{Z} - 100 $	0,25%
Критерій незначущості систематичної похибки 1) $\delta \leq \Delta_z / 3 = 0.248$ 2) якщо не виконується 1), то $\delta \leq \max \Delta_{AS} * 0,32 = 1,02$	Не виконується Виконується
Загальний висновок	Методика коректна

Збіжність

Для оцінки правильності та прецизійності використовували співвідношення «знайдено : введено», у відсотках, $(Z_i) : Z_i = Y_i / X_i \cdot 100 \%$ в нормалізованих координатах. Точність оцінювали на основі аналізу зразка з відомою концентрацією та порівняння вимірюваної величини з справжнім значенням вмісту ФХ та ДПФГ, що входить до складу модельної суміші.

Для оцінки збіжності використовували односторонній довірчий інтервал Δ_{AS} , який не повинен перевищувати максимально допустиму невизначеність випробування:

ФХ

$$\Delta_z = SD_z * t(95\%, g-1) = 0.318\% * 1.860 \leq \max \Delta_{AS} \quad (4.7)$$

Оскільки $\Delta_z = 0,592 \% < \max \Delta_{AS} = 3.2 \%$, методика характеризується достатньою збіжністю на всьому діапазоні концентрацій.

ДПФГ

$$\Delta_z = SD_z * t(95\%, g-1) = 0.4\% * 1.860 \leq \max \Delta_{AS} \quad (4.8)$$

Оскільки $\Delta Z = 0,744 \% < \max \Delta_{AS} = 3.2 \%$, методика характеризується достатньою збіжністю в усьому діапазоні концентрацій.

Правильність

Для оцінки правильності визначали ступінь відповідності між відомим істинним значенням та значенням, отриманим за цією методикою.

Критерій статистичної незначущості

ΦX

Якщо $n = 9$, то методика не задовольняє критерій 1, оскільки величина $\delta \% = 0,59\% > 0,197 \%$, проте незначуще відрізняється від нуля, тобто критерій практичної незначущості $\delta \% = 0,59 \% < 0,32 * \max \Delta_{As} = 1,02 \%$ (задовольняє критерій 2).

ДПФГ

Якщо $n = 9$, то методика не задовольняє критерій 1, оскільки величина $\delta \% = 0,25\% > 0,248 \%$, проте незначуще відрізняється від нуля, тобто критерій практичної незначущості $\delta \% = 0,25 \% < 0,32 * \max \Delta_{As} = 1,02 \%$ (задовольняє критерій 2).

Отже, методика кількісного визначення ФХ та ДПФГ в Сут-LS методом ВЕРХ правильна на всьому діапазоні застосування.

Внутрішньолабораторна прецизійність

Дослідження проводили на 5 модельних розчинах з вмістом діючої речовини, близьким до номінальної концентрації (табл. 4.10 – 4.15)

Фосфатидилхолін

Таблиця 4.10

Результати вимірювання модельних розчинів ФХ першим аналітиком

Номер модельного розчину	Уведено у % до концентрації розчину порівняння	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння	Знайдено у % до уведеного
МР	$X = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\%$	$Y = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%$	$Z = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
АС1	100,5	100,9	100,4
АС2	100,45	100,01	99,56
АС3	100,00	100,45	100,45
АС4	100,00	100,15	100,15
АС5	99,75	100,01	100,26

Таблиця 4.11

Результати вимірювання модельних розчинів ФХ другим аналітиком

Номер модельного розчину	Уведено у % до концентрації розчину порівняння	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння	Знайдено у % до уведеного
МР	$X = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\%$	$Y = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%$	$Z = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
АС1	100,5	100,0	99,5
АС2	100,45	100,81	100,36
АС3	100,00	101,05	101,05
АС4	100,00	100,75	100,75
АС5	99,75	100,51	100,76

Таблиця 4.12

Результати перевірки внутрішньолaborаторної точності визначення ФХ

№ розчину	Величини Zi	
	дослід 1	дослід 2
1	100,4	99,5
2	99,56	100,36
3	100,45	101,05
4	100,15	100,75
5	100,26	100,76
$\bar{Z}$	100,164%	100,484%
Об'єднане середнє $Z_{intra}, \%$	100,324%	
S_z	0,358%	0,602%
$RSD_{intra} \bar{Z}$	0,497%	
Δ_{intra}	0,393%	

Величина Δ_{intra} не має перевищувати максимально допустиму невизначеність методики, тобто:

$$\Delta_{intra} = t[95\%, (n * m - 1)] * RSD_{intra} / \sqrt{5} = 1.761 * RSD_{intra} / \sqrt{5} = 0.79 * RSD_{intra} \leq \max \Delta_{AS} \quad (4.9)$$

$$\Delta_{intra} = 0.393\% \leq \max \Delta_{AS} = 3,2\% \quad (4.10)$$

Отже, методика визначення фосфатидилхоліну характеризується високою внутрішньолaborаторною точністю в усьому діапазоні концентрацій, близькому до номінальної концентрації фосфатидилхоліну.

ДПФГ

Таблиця 4.13

Результати вимірювання модельних розчинів ДПФГ першим аналітиком

Номер модельного розчину	Уведено у % до концентрації розчину порівняння	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння	Знайдено у % до уведеного
МР	$X = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\%$	$Y = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%$	$Z = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
АС1	100,23	100,97	100,74
АС2	100,25	100,77	100,52
АС3	100,05	100,95	100,9
АС4	100,80	100,91	100,11
АС5	100,89	99,95	99,07

Таблиця 4.14

Результати вимірювання модельних розчинів ДПФГ другим аналітиком

Номер модельного розчину	Уведено у % до концентрації розчину порівняння	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння	Знайдено у % до уведеного
МР	$X = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\%$	$Y = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%$	$Z = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
АС1	100,23	100,50	100,26
АС2	100,25	100,61	100,36
АС3	100,05	100,23	100,18
АС4	100,80	100,15	99,36
АС5	100,89	100,11	99,23

Таблиця 4.15

Результати перевірки внутрішньолaborаторної точності визначення ДПФГ

№ розчину	Величини Zi	
	дослід 1	дослід 2
1	100,74	100,26
2	100,52	100,36
3	100,9	100,18
4	100,11	99,36
5	99,07	99,23
$\bar{Z}$	100,27%	99,88%
Об'єднане середнє Z_{intra} , %	100,08%	
S_z	0,732%	0,538%
$RSD_{intra} \bar{Z}$	0,64%	
Δ_{intra}	0,506%	

Величина Δ_{intra} не має перевищувати максимально допустиму невизначеність методики, тобто:

$$\Delta_{\text{intra}} = t[95\%, (n * m - 1)] * RSD_{\text{intra}} / \sqrt{5} = 1.761 * RSD_{\text{intra}} / \sqrt{5} = 0.79 * RSD_{\text{intra}} \leq \max \Delta_{\text{AS}} \quad (4.11)$$

$$\Delta_{\text{intra}} = 0.506\% \leq \max \Delta_{\text{AS}} = 3,2\% \quad (4.12)$$

Отже, методика визначення ДПФГ характеризується високою внутрішньолабораторною точністю в усьому діапазоні концентрацій, близькому до номінальної концентрації ДПФГ.

Таблиця 4.16

Стабільність розчинів із часом

Компонент	t, хв					Середнє	RSD _t , %	Δ_t , %	max δ , %
	60	120	180	240	360				
Фосфатидилхолін	2607821	2605520	2607543	2606932	2602487	2606061	0,084	0.179	1,02
DPPG–Na	3356624	3357548	3355546	3358978	3352974	3356334	0,067	0.143	

$$\max \delta = 1,02$$

Оскільки $\Delta t = t(95\%, (nt-1)) * RSD_t = 2.13 * RSD_t < \max \delta = 1,02$, методика стабільна у часі.

Робастність

Для перевірки робастності методики ВЕРХ слід дослідити стабільність розчинів у часі, вплив рН рухомої фази, вплив суб'єктивного фактора (різні аналітики), температуру колонки, швидкість рухомої фази.

Стабільність розчинів у часі підтверджується результатами дослідження (табл. 4.16).

Оскільки при приготуванні розчинів та рухомої фази не використовуються буферні розчини, площі піків у межах $\pm 10\%$ не залежать від кислотності розчину.

Вплив суб'єктивного фактора не підтверджується результатами дослідження в ході визначення внутрішньолабораторної прецизійності.

Температура колонки в межах ± 10 % значно не впливає на результати випробування. Проте швидкість рухомої фази значно впливає на площі піків та число теоретичних тарілок. Тому рекомендовано дотримуватись вказаної в методиці швидкості рухомої фази (табл. 4.17).

Таблиця 4.17

Визначення робасності

Параметри робасності	Межі	Параметри піку фосфатидилхоліну на хроматограмі розчину стандартного зразку			Параметри піка DPPG–Na на хроматограмі модельного розчину		
		площа	симетрія	число теоретичних тарілок	площа	симетрія	число теоретичних тарілок
Температура колонки	52 °C	2604498	0,767	105298	3355369	1,29	194237
	58 °C	2604999	0,764	105088	3356994	1,31	194997
	RSD, %	0,014	0,277	0,141	0,34	1,09	0,28
Швидкість рухомої фази	0,9 мл/хв	2612791	0,767	105315	3324587	1,29	194237
	1,1 мл/хв	2475487	0,771	102074	3118547	1,32	190854
	RSD, %	3,82	0,368	2,21	4,52	1,62	1,24

Узагальнені валідаційні параметри наведені у табл. 4.18

Таблиця 4.18

Узагальнені валідаційні параметри

Параметр		Результат
Специфічність		Методика специфічна
Правильність або точність	ФХ	Критерій 1) $\delta \% = 0,59\% \geq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = 0,197\%$ Критерій 2) $\% = 0,59\% \leq 1,02$
	ДПФГ	Критерій 1) $\delta \% = 0,25\% \geq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = 0,248\%$ Критерій 2) $\delta \% = 0,25\% \leq 1,02 \%$
Збіжність	ФХ	$\Delta_z = 0,592\% < \max \Delta_{AS} = 3,2 \%$
	ДПФГ	$\Delta_z = 0,744 \% < \max \Delta_{AS} = 3,2 \%$
Внутрішньолабораторна прецизійність	ФХ	$\Delta_{int ra} = 0,393\% \leq \max \Delta_{AS} = 3,2\%$
	ДПФГ	$\Delta_{int ra} = 0,506\% \leq \max \Delta_{AS} = 3,2\%$
Стабільність розчинів у часі	ФХ	$\Delta_t = 0,179 < \max \delta = 1,02 \%$
	ДПФГ	$\Delta_t = 0,143 < \max \delta = 1,02 \%$
Робасність	ФХ	Температура колонки не впливає; швидкість рухомої фази впливає
	ДПФГ	

Отже, валідована методика кількісного визначення ФХ та ДПФГ у препараті Cyt-LS методом ВЕРХ придатна для подальшого використання.

4.4 Розробка та валідація методики кількісного визначення цитохрому С у препараті Cyt-LS

Нами розроблена методика кількісного визначення цитохрому С в Cyt-LS методом УФ–спектрометрії (ДФУ 2.2.25).

Вміст цитохрому С визначають за трьома паралельними визначеннями.

Вміст одного флакона розчиняють у 3 мл води для ін'єкцій, перемішують та витримують на водяній бані при температурі 35 °С упродовж 30 хвилин. Відбирають 2 мл, поміщають у мірну колбу ємністю 5 мл та доводять об'єм розчину до мітки водою для ін'єкцій.

До отриманого розчину додають 10 мг натрію дитіоніту, перемішують протягом 30 секунд та вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину при довжині хвилі 550 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи воду високоочищену як компенсаційного розчину.

Вміст цитохрому С у флаконі (X, мг) розраховують за формулою:

$$X, \% = \frac{A_{550} \cdot 12300 \cdot 5 \cdot 3}{27700 \cdot 2}, \quad (4.13)$$

A_{550} – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 550 нм;

12300 – молекулярна маса цитохрому С;

27700 – молярний показник поглинання цитохрому С при довжині хвилі 550 нм.

Вміст цитохрому С має бути від 1,823 до 2,227 мг у флаконі.

Приготування модельних сумішей

Близько 67,5 мг цитохрому С, у перерахунку на абсолютно суху речовину (точна наважка), розчинили в 100 мл розчину плацебо.

Готували 9 розчинів з діапазоном вмісту цитохрому С 80–120 % від заявленого (2,025 мг/флакон).

Розчини стандартних зразків досліджуваних речовин аналізуються згідно із наведеною методикою.

Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності методики при її відтворенні в іншій лабораторії необхідний прогноз повної невизначеності методики.

Максимально допустима повна відносна невизначеність методики аналізу ($\Delta_{AS} (\%)$) пов'язана із симетричними допусками вмісту ($\pm B \%$) аналізованої речовини:

$$\Delta_{AS} \leq \max \Delta_{AS} = \frac{B_H - B_L}{2} \times 0.32, \quad (4.14)$$

Допустимі межі вмісту бензалконію хлориду в розчиннику складають $\pm 10 \%$:

$$\max \Delta_{AS} = 3,2 \% \quad (4.15)$$

Повна невизначеність результатів випробування складається із невизначеності пробопідготовки Δ_{SP} та невизначеності кінцевої аналітичної процедури Δ_{FAO} :

$$\Delta_{AS} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} \quad (4.16)$$

Як видно з табл. 4.19, найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносить взяття аліквоти мірною піпеткою об'ємом 2 мл.

Таблиця 4.19

Невизначеність пробопідготовки

Операція пробопідготовки	Джерело невизначеності	Рівень	Абсолютна похибка	Представлення	Невизначеність
Розчин порівняння					
Доведення до об'єму	Піпетка Мора (клас А)	3	0,08	мл	0,4 %
Взяття аліквоти	Піпетка Мора (клас А)	2	0,007	мл	0,5 %
Доведення до об'єму	Мірна колба (клас А)	10	0,05	мл	0,5 %

Загальна невизначеність пробопідготовки Δ_{SP} :

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0,4^2 + 0,5^2 + 0,5^2} = 0,81\%$$

Невизначеність кінцевої аналітичної процедури для спектрофотометра складає $\Delta_{FAO} = 0,52\%$.

$$\Delta_{AS} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{0,81^2 + 0,52^2} = 0,96\% \quad , \quad (4.17)$$

$$\Delta_{AS} = 0,96 \leq \max \Delta_{AS} = 3,2, \quad (4.18)$$

Прогнозована повна невизначеність аналітичної методики дорівнює $\Delta_{AS} = 0,96\%$, що не більше критичного значення $\Delta_{AS\text{теор}} = 3,2\%$ для допусків вмісту $\pm 10,0\%$, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Специфічність

Для оцінки специфічності виконана перевірка незначущості фонового поглинання та впливу плацебо (рис. 4.9–4.11). Підтвердженням специфічності для рішення поставленого завдання був доказ того, що відносна систематична похибка ($\delta_{\text{noise}} (\%)$), яка вноситься допоміжними речовинами ($\delta_{\text{exc}} (\%)$) і продуктами розкладу або домішками ($\delta_{\text{imp}} (\%)$) у визначення аналізованої речовини, є незначущою в порівняно з максимально допустимою невизначеністю аналізу ($\Delta_{AS} (\%)$).

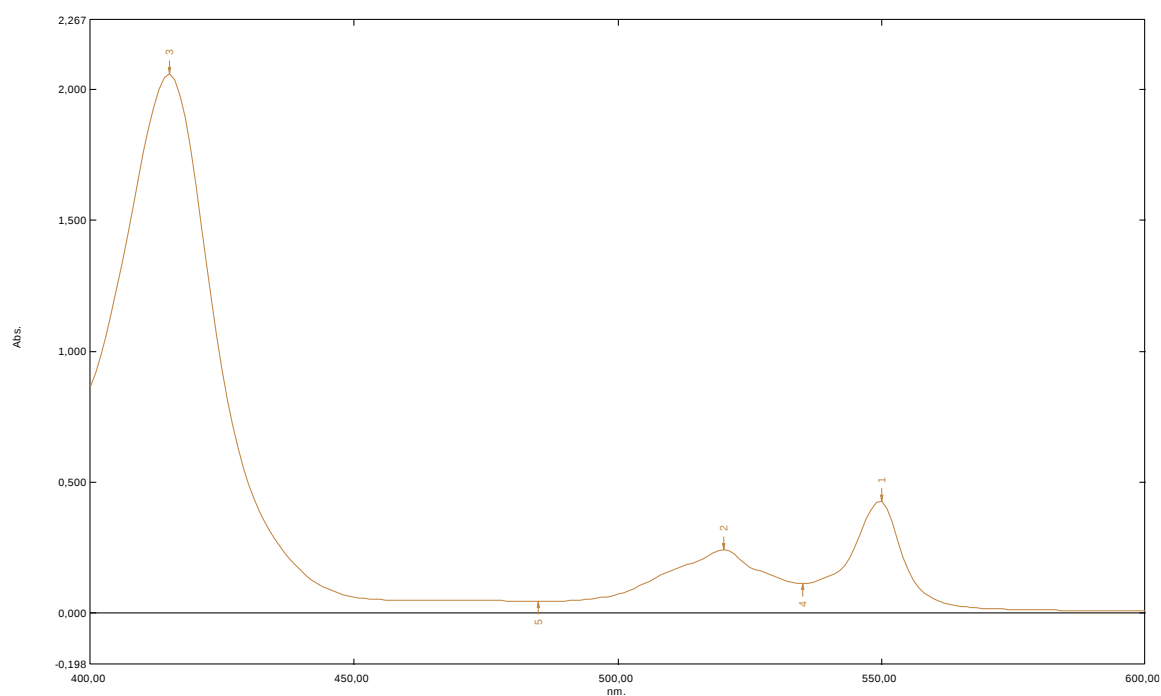


Рис 4.9 Спектр розчину випробовуваного розчину Cyt-LS

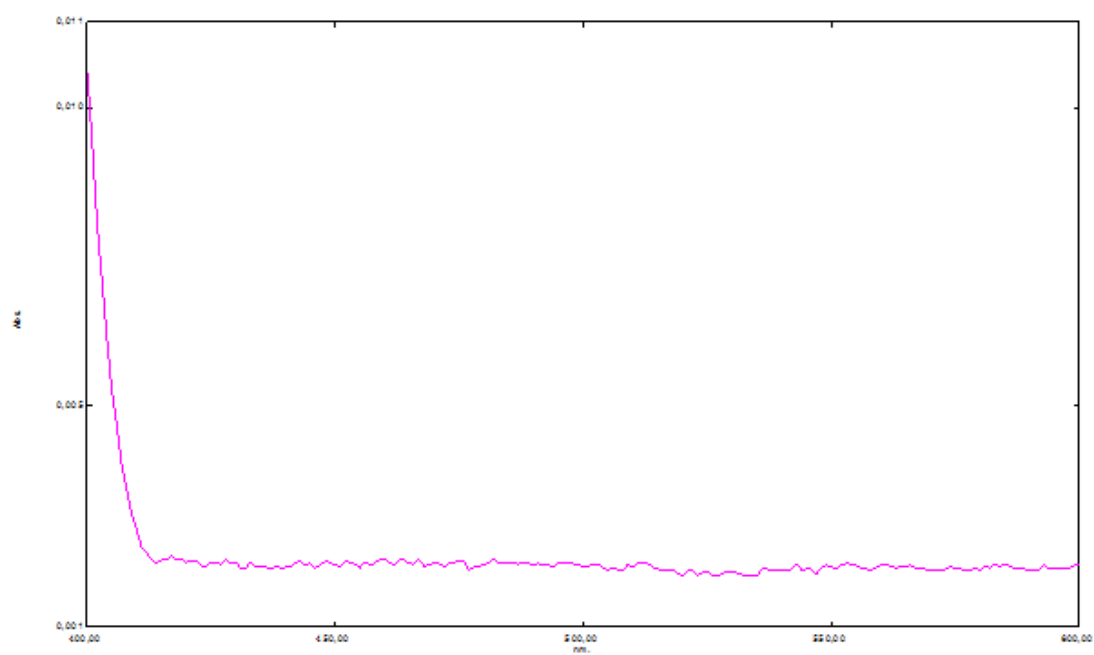


Рис. 4.10 Спектр фонового поглинання бланка

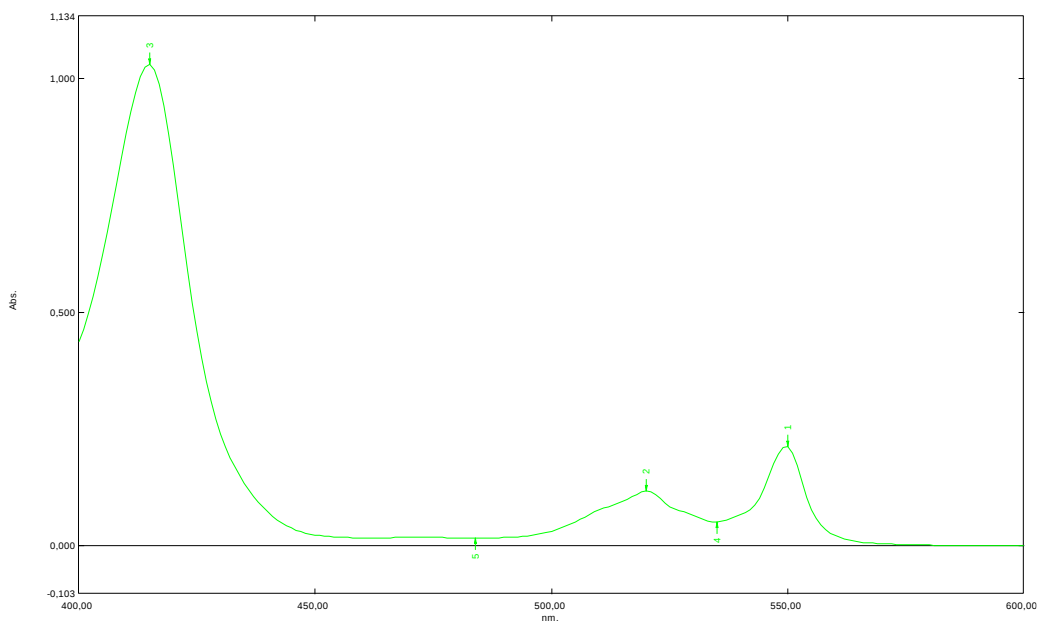


Рис 4.11. Спектр поглинання стандартного розчину цитохрому С

Результати перевірки специфічності наведені у табл. 4.20

Таблиця 4.20

Результати перевірки специфічності

Досліджуваний розчин	Вимір. 1	Вимір. 2	Вимір. 3	Вимір. 4	Вимір. 5	Середнє значення
Розчин плацебо	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Розчин порівняння	0,455	0,455	0,455	0,455	0,455	0,455

Внесок плацебо в сумарне поглинання (δ_{exc}):

$$\delta_{exc}(\%) = \frac{0,002}{0,455} \cdot 100 = 0,44 \%, \quad (4.19)$$

Вклад домішок або продуктів розкладу цитохрому С, за специфікацією на робочий стандартний, зразок складає 0 %.

$$\delta_{noise}(\%) = \frac{100 \cdot \sum_{i=1}^k A_{Imp,i}}{A_{St}} = \delta_{exc} + \delta_{imp} \leq 0,32 \cdot \max \Delta_{AS} = \max \delta \quad (4.20)$$

$$\max \delta = 0,32 \cdot \max \Delta_{AS} = 0,32 \cdot 3,0 \% = 0,96 \%.$$

За рівнянням отримано:

$$\delta_{noise}(\%) = \frac{0,002}{0,455} \cdot 100 + \delta_{imp} = 0,44 \% + 0 \% = 0,44 \%$$

$$\delta_{noise}(\%) = 0,44 \% \leq \max \delta = 0,96 \%$$

Як видно, $0,44 \leq 0,96 \%$, тобто фонове поглинання є незначним, отже, методика характеризується достатньою специфічністю.

Отже, методика кількісного визначення цитохрому С в Cyt-LS, краплі очні, ліофілізат для емульсії, методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ– та видимій ділянках спектра є специфічною.

Правильність, лінійність, діапазон застосування, збіжність

Для оцінки правильності, лінійності, діапазону застосування методики виконували перевірку ступеня відповідності між відомою первинною кількістю речовини в розчині та її кількістю, встановленою згідно з валідованою методикою.

Відповідно до вимог ДФУ діапазон застосування в координатах Y_i від X_i буде (80–120) % для кількісного визначення. Для визначення правильності, лінійності, діапазону застосування методики використовували модельні розчини із концентрацією цитохрому С 80–120 % від номінальної концентрації з кроком 5 %.

Критерії прийнятності

1) лінійна залежність – критерій статистичної незначущості, критерій практичної незначущості, вимоги до стандартного відхилення, вимоги до коефіцієнта кореляції;

2) збіжність – вимоги до довірчого інтервалу;

3) правильність – критерій статистичної незначущості, критерій практичної незначущості.

Лінійність

Залишкове стандартне відхилення: довірчий інтервал розбіжності точок навколо прямої $Y_i = b \cdot X_i + a$ дорівнює $t(95\%, g-2) \cdot RSD_o$ та є довірчим інтервалом невизначеності методики аналізу (Δ_{AS}).

Оскільки $g = 9$ (число розчинів, використаних для побудови лінійної залежності), вимоги до залишкового стандартного відхилення точок навколо прямої:

$$\max S_o = 1,69\%$$

$$\max S_o = 1,69\% \geq SDz = 1,45\%.$$

Коефіцієнт кореляції: загальний коефіцієнт кореляції R_c (r) при критичних мінімальних значеннях коефіцієнта кореляції для 9 точок і допусків вмісту $\pm 10\%$:

$$r_{\min} = 0,99236$$

Вільний член, статистична та практична незначущість: відрізок, відкладений на осі ординат (вільний член прямої – a), характеризує систематичну похибку при аналізі методом стандарту.

1. Статистично незначуще відрізняється від нуля: величина a повинна бути менше довірчого інтервалу своєї невизначеності, тобто ($g=9$):

$$|a| \leq t(95\%, g-2) \cdot s_b = 1,895 \cdot s_a = 1,895 \cdot 0,019497 = 0,037;$$

2. Практично незначуще відрізняється від нуля: величина a є практично незначущою для вирішення поставленої задачі та застосовується якщо не виконується критерій статистичної незначимості:

$$|a| \leq \max_a = 5,1\%$$

Розрахунок параметрів лінійної залежності $Y_i = b \cdot X_i + a$ для цитохрому С був проведений методом найменших квадратів. Результати наведені в табл. 4.21.

Таблиця 4.21

**Метрологічні характеристики лінійної залежності розраховані методом
найменших квадратів**

Величина	Значення	Критичні значення для допусків (80–120) %, число точок $g = 9$	Висновок
b	1,045394	—	—
s_b	0,014494	—	—
a	–0,05297	1) $\leq 1,895 \cdot s_a = 0,037$, 2) якщо не виконується 1), то $\leq 5,1$	Виконується
s_a	0,019497	—	—
s_r	0,038324	$\leq 3,2$	Виконується
r	0,994799	$\geq 0,99236$	Виконується

Залежність уведених та знайдених концентрацій зображена в графічному вигляді на рис. 4.12.

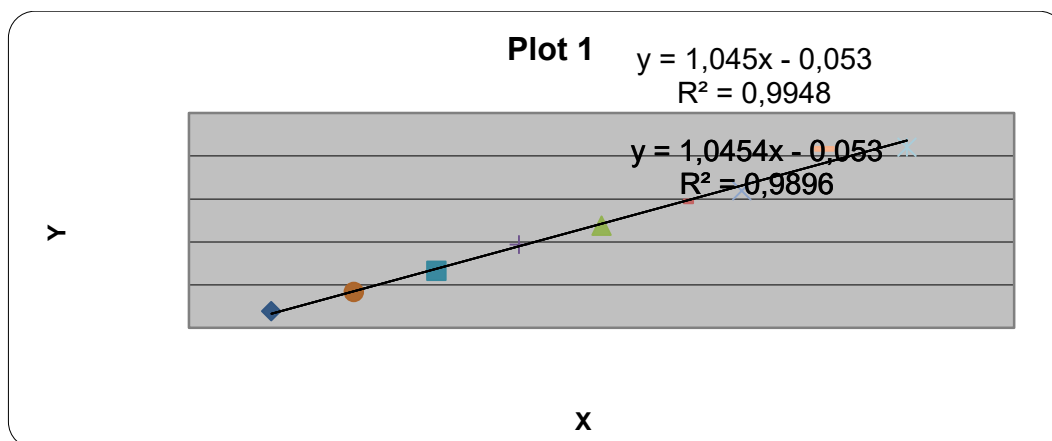


Рис. 4.12 Лінійна залежність оптичної густини від концентрації цитохрому С у нормалізованих координатах

Таблиця 4.22

Результати аналізу модельних сумішей та їх статистична обробка

Номер модельного розчину	Наважка цитохром у С, мг	Уведено у % до концентрації розчину порівняння	Середнє значення оптичної густини	Відносне значення оптичної густини, %	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння	Знайдено у % до введеного
1	2	3	4	5	6	7
MP	m ₀	$X = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\%$	D ₁ –D ₂	RA	$Y = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%$	$Z = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
lin80	1,6	80,00	0,854960	79,89	78,87	98,59
lin85	1,7	85,00	0,903200	82,33	83,32	98,02
lin90	1,8	90,00	0,957000	85,09	88,28	98,09
lin95	1,9	95,00	1,022660	88,72	94,34	99,31
lin100	2,0	100,00	1,070780	90,85	98,78	98,78
lin105	2,1	105,00	1,131980	93,89	104,43	99,45
lin110	2,17	108,50	1,158130	94,14	106,84	98,47
lin115	2,3	115,00	1,264110	99,83	116,61	101,40
lin120	2,4	120,00	1,268370	100,00	117,01	97,51

Таблиця 4.23

Загальні висновки

Значення $\bar{Z}$, %	99,13%
Відносне стандартне відхилення SD _z , %	1,45%
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z = t(95\%, g-1) \cdot SD_z = 1,860 \cdot s_z$	3,09%
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{AS}	1,02%
Систематична похибка $\delta = \bar{Z} - 100 $	0,87%
Критерій незначущості систематичної похибки 1) $\delta \leq \Delta_z / 3 = 1,03$ 2) якщо не виконується 1), то $\delta \leq 1,02$	Виконується Виконується
Загальний висновок	Методика коректна

Висновок: лінійність методики підтверджується в усьому діапазоні концентрацій (80–120 %).

Межа виявлення (МВ) та межа кількісного визначення (МКВ)

$MB = 3,3 \cdot s_a / b = 3,3 \cdot 0,019497 / 1,045394 = 0,061 \%$ до концентрації розчину порівняння;

$МКВ = 10 \cdot s_a / b = 10 \cdot 0,019497 / 1,045394 = 0,186 \%$ до концентрації розчину порівняння.

Величини МВ та МКВ значно менше нижньої межі діапазону концентрацій (90 %) і не можуть впливати на точність випробування.

Збіжність

Для оцінки правильності та збіжності використовували результати, отримані при вивченні лінійності. Для оцінки правильності та прецизійності використовували співвідношення «знайдено : введено», у відсотках (Z_i): $Z_i = Y_i / X_i \cdot 100 \%$ у нормалізованих координатах. Точність оцінювали на основі аналізу зразка з відомою концентрацією та порівняння вимірюваної величини з істинним значенням вмісту цитохрому С, що входить до складу модельної суміші.

Для оцінки збіжності використовували односторонній довірчий інтервал Δ_{AS} , який не має перевищувати максимально допустиму невизначеність випробування:

$$\Delta_Z = SD_Z \cdot t(95\%, g - 1) \leq \max \Delta_{AS}, \quad (4.21)$$

Оскільки $\Delta_Z = 3,09 \%$ < $\max \Delta_{AS} = 3,2 \%$, методика характеризується достатньою збіжністю в усьому діапазоні концентрацій.

Правильність

Для оцінки правильності визначали ступінь відповідності між відомим істинним значенням та значенням, отриманим за цією методикою.

Критерій статистичної незначущості

Якщо $n = 9$, то методика задовольняє критерій 1, оскільки величина $\delta \% = 0,87 \% < \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_Z}{3} = \frac{3,09}{3} = 1,03 \%$, та незначно відрізняється від нуля, тобто критерій практичної незначущості $\delta \% = 0,87 \% < 1,02\%$ (задовільняє

критерій 2). Тобто, методика кількісного визначення цитохрому С у Сyt-LS методом УФ правильна в усьому діапазоні застосування.

Прецизійність, внутрішньолабораторна точність

Дослідження проводили різні аналітики на 5 модельних розчинах із вмістом цитохрому С близьким до номінальної концентрації табл. 4.24– 4.26

Таблиця 4.24

Результати вимірювання модельних розчинів першим аналітиком

Номер модельного розчину	Наважка цитохром у С, мг	Уведено у % до концентрації розчину порівняння	Середнє значення оптичної густини	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння	Знайдено у % до уведеного
МР	m_0	$X = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\%$	$D_1 - D_2$	$Y = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%$	$Z = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
АС1	2,0	100,00	1,07117	98,82	98,82
АС2	2,0	100,00	1,06869	98,59	98,59
АС3	2,0	100,00	1,08324	99,93	99,93
АС4	2,0	100,00	1,07587	99,25	99,25
АС5	2,0	100,00	1,07527	99,19	99,19

Таблиця 4.25

Результати вимірювання модельних розчинів другим аналітиком

Номер модельного розчину	Наважка цитохром у С, мг	Введено у % до концентрації розчину порівняння	Середнє значення оптичної густини	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння	Знайдено у % до введенного
МР	m_0	$X = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\%$	$D_1 - D_2$	$Y = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%$	$Z = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
АС1	2,0	100,00	1,07321	99,00	99,00
АС2	2,0	100,00	1,07320	99,00	99,00
АС3	2,0	100,00	1,08174	99,79	99,79
АС4	2,0	100,00	1,08547	100,13	100,13
АС5	2,0	100,00	1,07303	98,99	98,99

Таблиця 4.26

Результати перевірки внутрішньолабораторної точності

№ розчину	Величини Zi	
	дослід 1	дослід 2
1	98,82%	99,00%
2	98,59%	99,00%
3	99,93%	99,79%
4	99,25%	100,13%
5	99,19%	98,99%
$\bar{Z}$	99,15%	99,38%
Об'єднане середнє Z_{intra} , %	99,27%	
S_z	0,51%	0,54%
$RSD_{intra} \bar{Z}$	0,51%	
Δ_{intra}	0,40%	

Величина Δ_{intra} не має перевищувати максимально допустиму невизначеність методики, тобто:

$$\Delta_{intra} = t[95\%, (n * m - 1)] * RSD_{intra} / \sqrt{5} = 1.761 * RSD_{intra} / \sqrt{5} = 0.79 * RSD_{intra} \leq \max \Delta_{AS} \quad (4.22)$$

$$\Delta_{intra} = 0.40\% \leq \max \Delta_{AS} = 3,2\%.$$

Отже, методика характеризується високою внутрішньолабораторною точністю в усьому діапазоні концентрацій, близькому до номінальної концентрації.

Стабільність розчинів із часом

У методиці визначення кількісного вмісту цитохрому С не вказаний час, через який вимірюється оптична густина, тому проводили перевірку її стійкості з часом із проміжком 15 хв протягом 2 год. Результати вимірювання наведені у табл. 4.27

Таблиця 4.27

Стабільність модельних розчинів із часом

	t, хв						Середнє	RSD _t , %	Δ_t , %	max δ , %
	10	15	30	60	90	120				
A	1,07496	1,07465	1,07535	1,07453	1,07444	1,07446	1,0747317	0,03	0,07	1,02

$$\max \delta = 1,02$$

Оскільки $\Delta_t = t(95\%, (n_t - 1)) * RSD_t = 2,13 * RSD_t < \max \delta = 1,02$, методика стабільна у часі.

Робасність

Для перевірки робасності для методики СФ слід дослідити стабільність розчинів у часі, вплив рН, вплив суб'єктивного фактора (різні аналітики).

Стабільність розчинів у часі підтверджується результатами дослідження в табл. 4.27.

Оскільки при приготуванні розчинів не використовуються буферні розчини, оптична густина в межах $\pm 10\%$ не залежить від кислотності розчину.

Вплив суб'єктивного фактора не підтверджується результатами дослідження в ході визначення внутрішньолaborаторної прецизійності.

Таблиця 4.28

Узагальнені валідаційні параметри

Параметр	Результат
Специфічність	Методика специфічна
Незначущість фонового поглинання	Є незначущим
Правильність	$\delta \% = 0,87 \% < 1,03\%$ (задовольняє критерій 1) $\delta \% = 0,87 \% < 1,02\%$ (задовольняє критерій 2)
Збіжність	$\Delta Z = 2,75 \% < \max \Delta_{AS} = 3,2 \%$
Внутрішньо лабораторна прецизійність	$\Delta_{int ra} = 0.40\% \leq \max \Delta_{AS} = 3,2\%$
Лінійність	Коефіцієнт кореляції $r = 0,9948$ Лінійне рівняння: $Y_i = 1,045 X_i - 0,053$
Стабільність розчинів у часі	$\Delta_t < \max \delta = 1,02 \%$
Робасність	На результати випробування не впливають умови його проведення
Межа кількісного визначення	0,186 %
Межа детектування	0,061 %

Як видно з табл 4.28, валідована методика кількісного визначення цитохрому С в Cyt-LS методом УФ–спектрометрії придатна для подальшого використання.

4.5 Вивчення показників якості та стабільності розробленого препарату

Використання Cyt-LS як ЛЗ для офтальмологічного застосування можливе за умови збереження їх стабільності протягом терміну зберігання. Відповідно до рекомендацій [31, 32] вивчали стабільність зразків Cyt-LS, одержаних в умовах дослідно–промислового виробництва. Зразки Cyt-LS вивчали на трьох серіях відповідно до рекомендацій [139]. Cyt-LS зберігали протягом 24 місяців у захищеному від світла місці при температурі -15 ± 2 °C, у прозорих флаконах для ліофілізації з трубки скляної (10 мл) виробництва «Shandong pharmaceutical Glass Co., ltd» (Китай), закупорених гумовими пробками для ліофілізації та обкатаних медичними алюмінієвими ковпачками.

У табл. 4.29 наведені результати вивчення стабільності зразків досліджуваного препарату.

Таблиця 4.29

Вивчення стабільності зразків Cyt-LS

№ серії	Термін зберігання	Опис	Ідентифікація	Час утворення та стійкість емульсії	pH	Домішки	Втрата в масі при висушуванні	Однорідність маси для одного флакону	Механічні включення : невидимі частки	Розмір та розподілення часток за розмірами	Залишкові органічні розчинники	Осмоляльність	Стерильність	Цитохром с, мг	Фосфати дилхолін яєчний, мг	ДПФГ, мг	Ступінь інкапсуляції діючої речовини
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Вимоги МКЯ																	
		Аморфна маса світло – червоного кольору з характерним запахом	Цитохром С ДПФГ Фосфати дилхолін яєчний	≤5 хв, має бути стійкою не менше 10 хв	6,0 – 7,5	ЛФХ – не більше 3 %; Вільні жирні кислоти – не більше 2.0 %.	≤4 %	18/20 ≤ ±10%; 0/20 ≥ ±20%	Не більше 6000 часток розміром ≥ 10 мкм у флаконі Не більше 600 часток розміром ≥ 25 мкм у флаконі	Середній діаметр наночасток повинен бути ≤500 нм	Етанол – не більше 1000 ppm (0,1 %) Хлороформ – не більше 500 ppm (0,05 %)	Від 300 мОсмоль /кг до 400 мОсмоль /кг	Має бути стерильним	Від 1,823 мг до 2,227 мг у флаконі,	Від 16,2 мг до 19,8 мг у флаконі	Від 13,5 мг до 16,5 мг у флаконі	Частка вільного цитохрому С (неінкапсульованого) повинна становити не більше, ніж 10 % від загального вмісту цитохрому С у продукті
010717	0	Відп.	Відп.	Відп.	6.95	Відп.	1.5	Відп.	Відп.	≤220	Відп.	330	Відп.	2.015	18,3	15.1	≤ 10
	1	Відп.	Відп.	Відп.	6.85	Відп.	1.55	Відп.	Відп.	≤220	—	331	—	2.025	18.3	15.2	≤ 10
	3	Відп.	Відп.	Відп.	6.85	Відп.	1.5	Відп.	Відп.	≤220	—	332	—	2.015	18.2	15.1	≤ 10
	6	Відп.	Відп.	Відп.	6.80	Відп.	1.55	Відп.	Відп.	≤220	—	330	—	2.025	18.2	15.1	≤ 10
	12	Відп.	Відп.	Відп.	6.75	Відп.	1.55	Відп.	Відп.	≤220	—	330	—	1.995	18.0	15.05	≤ 10
	18	Відп.	Відп.	Відп.	6.80	Відп.	1.55	Відп.	Відп.	≤220	—	331	—	2.051	18.0	15.0	≤ 10
	24	Відп.	Відп.	Відп.	6.75	Відп.	1.51	Відп.	Відп.	≤220.	—	332	Відп.	2.000	18.0	14.95	≤ 10

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
020717	0	Відп.	Відп.	Відп.	6.90	Відп.	1.54	Відп.	Відп.	≤220	Відп.	329	Відп.	2.05	18,0	14.9	≤ 10
	1	Відп.	Відп.	Відп.	6.90	Відп.	1.45	Відп.	Відп.	≤220	—	330	—	2.025	18.0	14.8	≤ 10
	3	Відп.	Відп.	Відп.	6.88	Відп.	1.52	Відп.	Відп.	≤220	—	328	—	2.05	18.0	14.6	≤ 10
	6	Відп.	Відп.	Відп.	6.85	Відп.	1.51	Відп.	Відп.	≤220	—	329	—	2.05	17.5	14.9	≤ 10
	12	Відп.	Відп.	Відп.	6.85	Відп.	1.52	Відп.	Відп.	≤220	—	331	—	2.00	17.6	14.9	≤ 10
	18	Відп.	Відп.	Відп.	6.85	Відп.	1.50	Відп.	Відп.	≤220	—	332	—	1.95	17.5	14.9	≤ 10
	24	Відп.	Відп.	Відп.	6.80	Відп.	1.45	Відп.	Відп.	≤220.	—	327	Відп.	1.97	17.7	14.8	≤ 10
030717	0	Відп.	Відп.	Відп.	6.93	Відп.	1.44	Відп.	Відп.	≤220	Відп.	325	Відп.	1.98	18.1	15.4	≤ 10
	1	Відп.	Відп.	Відп.	6.95	Відп.	1.43	Відп.	Відп.	≤220	—	325	—	1.98	18.2	15.3	≤ 10
	3	Відп.	Відп.	Відп.	6.80	Відп.	1.44	Відп.	Відп.	≤220	—	333	—	1.95	18.1	15.2	≤ 10
	6	Відп.	Відп.	Відп.	6.82	Відп.	1.47	Відп.	Відп.	≤220	—	327	—	1.98	18.1	15.4	≤ 10
	12	Відп.	Відп.	Відп.	6.80	Відп.	1.44	Відп.	Відп.	≤220	—	328	—	1.95	18.1	15.3	≤ 10
	18	Відп.	Відп.	Відп.	6.81	Відп.	1.47	Відп.	Відп.	≤220	—	330	—	1.94	17.9	15.1	≤ 10
	24	Відп.	Відп.	Відп.	6.75	Відп.	1.45	Відп.	Відп.	≤220	—	333	Відп.	1.92	17.7	15.0	≤ 10

Як видно з табл. 4.29, суттєвих змін у складі зразків Сут-LS не було виявлено, препарат є стабільним. Запропонований термін зберігання при температурі – 15 ± 2 °C – 18 місяців.

Висновки до розділу 4

1. Розроблено методику, що дозволяє визначати ступінь інкапсуляції цитохрому С у ЛС і проводити ідентифікацію складу Cyt-LS. Методика валідована за показниками «специфічність», «межа виявлення» та «робасність» відповідно до рекомендованих критеріїв. Методика може використовуватися в контролі якості готової форми Cyt-LS і контрольних точках під час технологічного процесу.

2. Розроблено методику кількісного визначення ФХ та ДПФГ у препараті Cyt-LS методом ВЕРХ. Методика валідована за показниками «специфічність», «правильність або точність», «збіжність» «внутрішньолaboratorна прецизійність», «стабільність розчинів у часі» та «робасність» і може використовуватися у контролі якості готової форми Cyt-LS, та контрольних точках під час технологічного процесу.

3. Розроблено методику кількісного визначення цитохрому С у препараті Cyt-LS методом УФ–спектрометрії. Методика валідована за такими показниками: «специфічність», «незначущість фонового поглинання», «правильність», «збіжність», «внутрішньолaboratorна прецизійність», «лінійність», «стабільність розчинів у часі», «робасність», «межа кількісного визначення», «межа детектування». Тобто методика може використовуватися в контролі якості готової форми Cyt-LS і контрольних точках під час технологічного процесу.

4. Розроблений проєкт МКЯ на готову лікарську форму FD–Cyt-LS. Проєкт відповідає рекомендаціям FDA «Guidance for industry Liposome Drug Products», ЕМА, вимогам ДФУ 2.0, викладеним у загальних статтях на лікарські форми «Ліпосомальні лікарські засоби N», «Очні лікарські засоби», та вимогам Настанови 42–3.2:2004 «Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування на критерії прийнятності».

5. Проведено вивчення стабільності зразків FD–Cyt-LS, одержаних в умовах дослідно–промислового виробництва. Запропонований термін зберігання при температурі – 15 ± 2 °C – 18 місяців.

Результати досліджень за даним розділом наведено у таких публікаціях:

1. Katsai O., Ruban O. Preparation And Characterization Of Liposomal Delivery System Of Natural Heme Protein // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. P. 418-425. (Особистий внесок: розробка методів отримання та характеризації ліпосомальної форми цитохрому С; експериментальне дослідження впливу технологічних параметрів на ключові показники якості (розмір часток, домішки, стерильність); дослідження специфічної активності in–vitro; оформлення та підготовка статті до друку).

2. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopol'skyi Y. M. "Quality-by-design" approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C. *Pharmakeftiki*. 2018. T. 30, № 2. С. 76-87. (Особистий внесок: розробка підходу QbD при виборі лікарської форми ліпосомальної форми цитохрому С, дослідження впливу типу, концентрації кріопротектора, та параметрів ліофілізації на критичні показники якості, оформлення та підготовка статті до друку).

3. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopol'skyi Y. M. Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. T. 72, № 12. С. 736-740. (Особистий внесок: розробка технології отримання, методів контролю та вивчення стабільності отриманих зразків ліпосомальної форми цитохрому С, оформлення та підготовка статті до друку).

4. Кацай А. Г., Рубан Е. А., Краснопольский Ю. М., Влияние состава липосом на степень инкапсуляции размер частиц при создании липосомальной формы цитохрома С. *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. 2017. № 4 (8). С. 32-

36. (Особистий внесок: експериментальне дослідження впливу складу ліпосом на ступінь інкапсуляції та розмір часток; оформлення та підготовка статті до друку).

5. Кацай О. Г., Прохоров В. В., Грігор'єва Г. С., Краснопольський Ю. М. Розробка та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах. *Фармацевтичний журнал*. 2016. № 5. С. 69–75. (Особистий внесок: розробка та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах, оформлення та підготовка статті до друку).

6. Кацай А. Г., Рубан Е. А. Определение фосфолипидного состава липосом с цитохромом С методом ВЭЖХ. *Современные аспекты создания экстенпоральных алопатических, гомеопатических и косметических лекарственных средств* : I Междунар. науч.-практ. интернет-конф., 3-4 марта 2017 г. Харьков, 2017. Вип. 2. С. 98.

РОЗДІЛ 5

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРЕПАРАТУ

5.1 Дослідження специфічної активності *in vivo* на моделі ураження рогівки

Для оцінки специфічної фармакологічної активності Cyt-LS була запропонована експериментальна модель проникного поранення рогівки ока кролів. Підставою вибору цієї моделі стала точність, відтворюваність моделювання травми, простота опису динаміки процесів, велика кількість параметрів оцінки та близькість патології, що моделюється, до клінічних випадків у людини. Дослідження проводились на базі ЗАТ «Санкт–Петербургський інститут фармації», РФ.

Метою дослідження було встановлення ефективності багаторазового введення препарату Cyt-LS порівнянно з неліпосомальною формою цитохрому С у трьох експериментальних дозах на моделі проникного ураження рогівки ока кроля.

У дослідженні специфічної активності як тест–системи використані кролики–самки лінії Радянська шиншила. Вибір цих тварин підтверджений літературними даними про подібні дослідження специфічної фармакологічної активності [140]. Тварин утримували в стандартних умовах віварію ДУ «Санкт–Петербургський інститут фармації» [141 – 144].

Рогівку травмували шляхом нанесення поранення лезом скальпеля в оптичній зоні лівого ока кролика. Операція проводилася під місцевою анестезією [145].

Після моделювання патології та відбору тварин були сформовані досліджувані групи за схемою, наведеною в табл 5.1.

Таблиця 5.1

Характеристика груп

№ групи	Кількість тварин, стать	Препарат	Добова доза, мг/кріль	Добовий об'єм розчину, мл	Уведення препарату	Дата закінчення
1	10, самки	Інтактна Допоміжний розчин	0	0,6	10 днів	11 день
2	10, самки	Контрольна Допоміжний розчин *	0	0,6		
3	10, самки	Cyt-LS	1,2	0,6		
4	10, самки		0,8	0,4		
5	10, самки		0,4	0,2		
6	10, самки	Cyt-C (неліпосомальний)	1,2	0,6		
7	10, самки		0,8	0,4		
8	10, самки		0,4	0,2		

Примітка: * – розчин, який містить усі допоміжні речовини, але не містить цитохрому С.

Дослідження стану поверхневих структур ока проводили за допомогою огляду переднього відділу ока щілинною лампою. Оцінка стану поверхневих структур ока проводилася до нанесення ушкодження і потім – щодня протягом 10 днів.

Були оцінені такі показники модельованої патології: діастаз, є / немає; відновлення передньої камери ока, є / немає; епітелізація, бали; інфільтрація рогівки, бали; компактний рубець, є / немає; неоваскуляризація, є / немає; випіт фібрину, бали.

Динаміку процесу ураження оцінювали за допомогою флуоресцеїнової проби щодня протягом 11 діб (з 1 по 11). Наявність діастазу відзначали при неповному змиканні країв рогівки у верхній частині каналу ураження.

Відновлення передньої камери вивчали порівняно з її параметрами в інтактних тварин.

Для усіх даних була застосована описова статистика: дані перевірені на нормальність розподілу. Більша частина даних була представлена в балах та аналізувалася із застосуванням непараметричних методів описової

статистики. Визначали медіану та квартильний розмах. Міжгрупові відмінності були проаналізовані непараметричними методами: використовували критерій Манна–Уїтні для залежних та незалежних змінних для множинних порівнянь. Відмінності визначені при 0,05 рівні значущості. Статистичний аналіз виконувався за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0 (StatSoft, USA).

Результати досліджень. У перший день у групі тварин, які отримали Cyt-LS у найвищій дозі (1,2 мг/тв), спостерігалася найменша вираженість випоту фібрину в передню камеру ока. При застосуванні випробовуваного об'єкта в дозі 1,2 мг/тв відразу після поранення рогівки випіт фібрину в передню камеру ока відбувався тільки у 20 % тварин (у контрольній групі випіт фібрину в першу добу після індукції спостерігався у 70 % тварин). Утворення фібрину в групі, що одержувала Cyt-LS у дозі 1,2 мг/тв, відбувалося тільки через 2–4 години після поранення, тоді як у контрольній групі невелику кількість фібрину було відзначено вже через годину після поранення.

Слід зазначити, що випіт фібрину в передню камеру є частим ускладненням після рубцювання рогівки, що приводить до повільного відновлення зорових функцій та офтальмогіпертензії [146, 147]. Крім того, фібринові згустки в процесі запалення часто прикріплюються до передньої капсули кришталика (рис. 5.1), чим можуть викликати її пошкодження і, як наслідок, його набряк і помутніння. Тобто, здатність препарату впливати на частоту та вираженість виникнення симптому випоту фібрину є суттєвим фактором при виборі препарату для лікування травми рогівки.

У всіх дослідних тварин було відзначено розвиток і посилення місцевої запальної реакції, що виявлялася збільшенням кількості та щільності фібрину в передній камері ока та розвитку набряку й інфільтрації рогівки. Найбільший ефект від застосування випробовуваного об'єкта був відзначений вже на другий день після індукції патології (табл. 5.2).

Виразність клінічних ознак ураження рогівки на 2 день після індукції патології

№ гр.	Опис	Доза, мг/тв	Інфільтрація	Випіт фібрину
			бали, Median $\pm$ QR	
1	Інтактна	0	—	—
2	Контрольна	0	$2,5 \pm 2,0$	$2,0 \pm 2,0$
3	Cyt-LS	1,2	$1,0 \pm 1,0$	$1,0 \pm 1,0$
4		0,8	$1,5 \pm 1,0$	$1,5 \pm 1,0$
5		0,4	$2,0 \pm 1,0$	$2,0 \pm 1,0$
6	Cyt C (неліпосомаль- ний)	1,2	$1,5 \pm 1,0$	$1,5 \pm 1,0$
7		0,8	$1,5 \pm 1,0$	$1,5 \pm 1,0$
8		0,4	$2,0 \pm 2,0$	$2,0 \pm 1,0$

Так, у групах, які отримували цитохром С (неліпосомальний) та Cyt-LS у найвищих дозах, спостерігалася значно менша вираженість випоту фібрину та інфільтрації рогівки, ніж у контрольній групі тварин. Разом з тим, слід зазначити, що на ці симптоми найбільше впливало застосування Cyt-LS (рис 5.2).

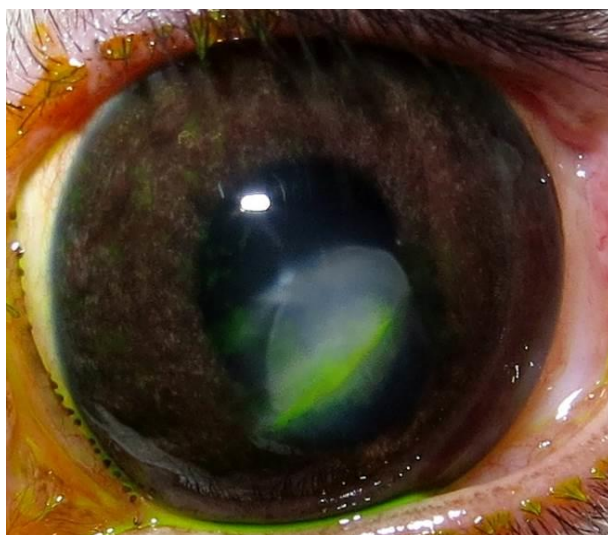


Рис 5.1 Інфільтрація та випіт фібрину у тварини контрольної групи на 2-й день після ураження рогівки

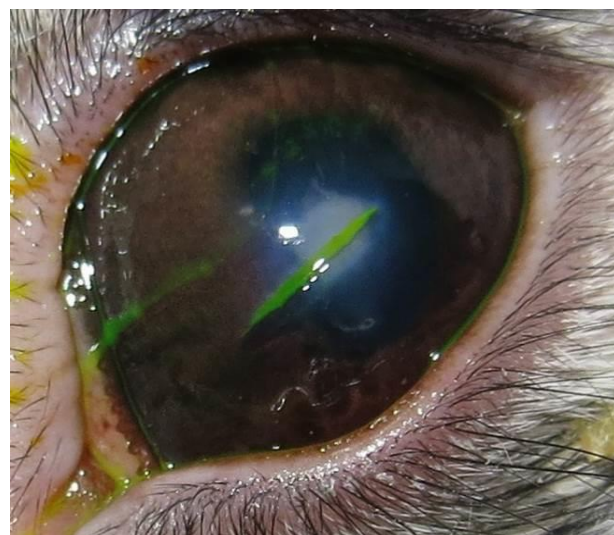


Рис 5.2 Інфільтрація та випіт фібрину у тварини, що отримувала LS-Cyt у дозі 1,2 мг/тв, на 2-й день після ураження

На 2-й день у тварин, які отримували Cyt-LS і цитохром С у найвищій дозі, відзначали також початок процесу епітелізації. У контрольній групі епітелізація рани на 2-й день не спостерігалася.

Застосування Cyt-LS у всіх досліджуваних дозах приводило до зниження інфільтрації, щільності та розмірів фібринового згустка в 1,5–2 рази порівнянно з контрольною групою. При застосуванні стандартного об'єкта, найбільший ефект був відзначений у дозі 1,2 мг/тв.

На третій день після поранення набряк та інфільтрація рогівки слабшали у всіх досліджуваних групах. Також у всіх групах було відзначено зниження щільності та площі фібринового згустка в передній камері ока.

У групах, які отримували Cyt-LS, зниження проявів симптомів, описаних вище, відбувалося більш виражено, ніж у контрольній групі тварин і групі, що одержувала Cyt С.

Із 4-го по 9-й дні дослідження процеси інфільтрації, епітелізації та кількість фібрину в передній камері ока змінювалися поступово і до 10-го дня в контрольній групі тварин спостерігався початок рубцювання, разом з тим процеси інфільтрації та епітелізації були також яскраво вираженими (табл. 5.2). Кількість і щільність фібринового згустка в передній камері ока контрольних тварин практично не змінювалися порівнянно із 3-м днем дослідження (рис. 5.3).

У групах тварин, які отримували випробовуваний об'єкт, клінічна картина виглядала інакше (рис 5.4).

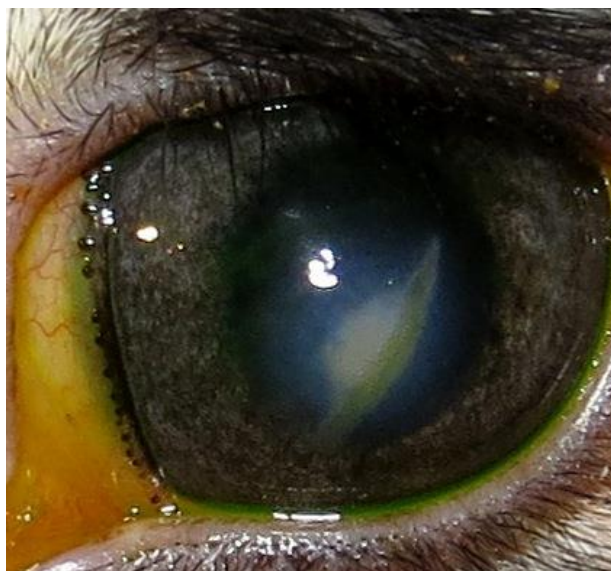


Рис 5.3 Клінічний стан ока тварини контрольної групи через 10 днів після ураження рогівки



Рис 5.4 Клінічний стан ока тварини, яка отримувала LS-Cyt у дозі 1,2 мг/тв, через 10 днів після ураження рогівки

Епітелізація пошкодженої тканини також була більш вираженою при застосуванні Cyt-LS. Найбільше загоєння рани було відзначено в групах, які отримували Cyt-LS у максимальній дозі.

Про якість та швидкість реконструкції рубцевої тканини судили за кількістю випадків формування компактного рубця до кінця терміну спостереження в кожній групі. Слід зазначити, що утворення м'якого компактного рубця відбувалося у більшості тварин, які отримували Cyt-LS. У групі тварин, які отримували Cyt-LS у найвищій дозі, формування компактного рубця відзначали в усіх дослідних тварин.

У дослідженні була доведена ефективність препаратів цитохрому С при проникній травмі рогівки. Ефективність препаратів виявлялася в зниженні клінічної вираженості запальної реакції тканини, посиленні процесів регенерації, що виражаються в прискоренні епітелізації рани та утворенні компактного рубця, а також у зниженні запальної інфільтрації фібринового згустка в передній камері ока та відсутності проростання рубця новоутвореними судинами.

При застосуванні препаратів цитохрому С в обох лікарських формах була відзначена дозозалежність.

За результатами дослідження було доведено, що застосування очних крапель Сут-LS було більш ефективним, ніж застосування цитохрому С щодо процесів запалення та регенерації [99].

5.2 Дослідження специфічної активності *in vivo* на моделі світлової катаракти кролів

Виходячи з відомого спектра фармакологічних властивостей цитохрому С – діючої речовини препарату порівняння «Офтан Катахром», і враховуючи показання до його медичного застосування як засобу, який стимулює відновні процеси в усіх тканинах очного яблука, активізує процеси обміну речовин у тканинах кришталика та захищає його клітини від ушкоджувальної дії вільних радикалів, вивчали специфічну фармакологічну активність очних крапель LS–Сут на моделі світлової катаракти у кролів. Дослідження проводились на базі ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України», м.Одеса, Україна.

Метою дослідження було визначення специфічної активності препарату, що розроблявся. Критеріями оцінки специфічної активності досліджуваного препарату служили клінічні ознаки помутніння кришталика та вплив на його ферментативну систему.

Вибір біохімічних показників був обумовлений метою дослідження і наявними можливостями.

Досліди проведені на 24 статевозрілих здорових кролях породи Шиншила, обох статей, масою 3,8–6,5 кг, віком 1,5–2 роки. Тварин утримували в умовах віварію ДУ «ІГБіТТ ім. В. П. Філатова НАМН України» в індивідуальних клітках при температурі 20–25°C, вологості не більше 50%, природному світловому режимі «день–ніч», на стандартному харчовому раціоні. Відбір тварин і формування експериментальних груп проводили

методом випадкових чисел. Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакета статистичного аналізу електронних таблиць Excel. Розраховували середнє значення показників ($\bar{x}$) і стандартне відхилення (σ_x) чи середньої похибки. Вірогідність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стюдента. Вірогідність одержаних результатів оцінювали на рівні значущості не менше 95% ($P \leq 0,05$) [148,149].

Світлову катаракту моделювали за допомогою загального опромінення тварин поліхромним світлом у діапазоні довжин хвиль 350–1150 нм (щільність потоку світлової енергії – 30 мВт/см², напруга – 220 В, потужність – 750 Вт) дуговою ртутно–вольфрамовою лампою типу ДРВ–750 протягом 26 тижнів у режимі світлового дня протягом 9 годин [150]. Хронічне опромінення тварин поліхромним світлом викликає розвиток помутніння кришталика з тривалим латентним періодом, що характеризується повільним дозріванням і клінічними ознаками, характерними для вікової ядерної катаракти людини [151].

24 тварини були порівну розділені на 3 групи: 1 група–контроль (інстиляції фізіологічного розчину); 2 – контроль (інстиляції «Офтан Катахром»); 3– дослідна (інстиляції Cyt-LS). Інстиляції препаратів (тричі на день) починали з 21–го тижня після відтворення моделі та продовжували протягом 6 тижнів.

На 27 тижні дослідження і завершення 6–тижневого лікування тварин виводили з експерименту в стані глибокого наркозу (1 мл 10 % розчину тіопенталу натрію на 1 кг маси) методом повітряної емболії. Енуклеацію очей та гомогенізацію кришталика проводили на льоду при температурі 0–5°C. У кришталику визначали активність ферментів і деяких продуктів ПОЛ (ЛДГ, КФ, каталаза, ДК, МДА – за допомогою методів спектрофотометрії [106, 107].

ЛДГ – гліколітичний фермент, оборотно каталізує окиснення лактату в піруват при одночасному відновленні окисленого нікотинамідаденіндинуклеотиду НАД у НАДН. Останній відновлює в

присутності N–метилфеназонійметілсульфату йоднітротетразолієвий фіолетовий у червоний формазан. Швидкість зменшення вмісту НАДН, реєстрована за зниженням оптичної щільності при довжині хвилі 340 нм, прямо пропорційна активності ЛДГ [158].

КФ – лізосомальна кисла гідролаза, визначення проводили методом виявлення концентрації вільного органічного компонента субстрату паранітрофенілфосфату, який утворюється в результаті дії ферменту [159].

Каталаза – фермент класу оксиредуктаз. В основі методу визначення активності каталази лежить її здатність розкласти молекули перекису водню на кисень і воду. Невитрачений перекис утворює із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс з максимумом поглинання при довжині хвилі 410 нм [160]. Стрес, викликаний дією світла високої інтенсивності, призводить до зниження активності каталази [161 – 163].

ДК – проміжний продукт ПОЛ, визначався за поглинанням ліпідним екстрактом монохроматичного світлового потоку в УФ ділянці спектра з максимумом поглинання при довжині хвилі при 230 нм [159].

МДА – кінцевий продукт ПОЛ. В основі методу визначення лежить здатність МДА при високій температурі в кислому середовищі реагувати з 2–тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс, з максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм [164].

Результати досліджень

У всіх кролів до початку експерименту стан кришталиків був охарактеризований як нормальний. Після 20 тижнів впливу світла високої інтенсивності практично в усіх кролів спостерігались зміни у кришталиках: наявність множинних дрібних вакуолей переважно в задньокапсулярних шарах кришталика та поодиноких дрібних вакуолей в інших анатомічних зонах кришталика, огрубіння заднього шва, розширення його меж, що сумарно характеризується як 2–га стадія катарактального процесу.

Дослідження продуктів ПОЛ у кришталику після 26 тижневого моделювання світлової катаракти виявили в обох групах (Cyt-LS та препарат порівняння) достовірне зниження вмісту МДА та ДК порівняно з контролем (табл. 5.3.)

Таблиця 5.3

Вплив препаратів Cyt-LS та препарату порівняння на біохімічні показники ПОЛ у кришталику в умовах моделювання світлової катаракти

Групи	Стат. обробка	Досліджувані показники, n = 16				
		МДА, нмоль/мл	ДК, нмоль/мл	Каталаза, мккат/мл	ЛДГ, мккат/л	КФ, нкат/л
Контроль (фізичний розчин)	М	13,8	3,2	26,0	16,2	25,10
	± m	0,49	0,07	0,57	0,43	0,80
	P	—	—	—	—	—
	%	100	100	100	100	100
Препарат порівняння	М	11,5	2,7	29,9	14,6	21,8
	± m	0,37	0,07	0,30	0,46	0,36
	P1	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	%	83,3%	84,3%	115%	90,1 %	86,8%
Cyt-LS	М	10,8	2,8	31,1	14,1	20,0
	± m	0,30	0,1	0,3	0,48	0,6
	P1	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	P2	<0,05	<0,05	<0,01	>0,05	<0,05
	%	78,2%	77,5%	119,6%	87 %	79,9%

Примітка: % – зміни до контролю; P1 – рівень значущості відмінностей по відношенню до контролю; P2 – рівень значущості відмінностей по відношенню до групи препарату порівняння.

Так, у групі Cyt-LS вміст МДА знизився на 21,8 %, ДК – на 22,5 %, у групі препарату порівняння – на 16,7 і 15,7 %, відповідно. Активність каталази у групі із застосуванням Cyt-LS була на 19,6 % вище, ніж активність групи контролю, у групі з препаратом порівняння цей показник був вище на 15 %. Активність ферменту КФ в обох дослідних групах (Cyt-LS та препарат порівняння) зменшувалась на 20,1 та 13,2 % відповідно, активність ЛДГ – на 13 та 9,9 % відповідно.

Клінічні спостереження підтверджують результати оцінки біохімічних даних. У групах, де застосовувались Cyt-LS та препарат порівняння, після завершення експерименту офтальмоскопічні дослідження виявили подальший розвиток помутніння кришталика до 3-ої стадії – у 12,5 %, а у 87,5 % катарактальний процес залишився на стадії, що була зафіксована до початку лікування (2-а стадія). Поряд з цим, у контрольній групі після 26 тижнів моделювання світлової катаракти 3-я та 4-а стадії помутніння кришталика спостерігались у 50 та 50 % випадків відповідно.

Отже, застосування препарату Cyt-LS при моделюванні світлової катаракти нормалізує ензиматичні порушення у кришталику, дає захисний ефект відносно антиоксидантної системи й уповільнює процеси помутніння кришталика, тим самим виявляючи профілактично–лікувальну дію. Cyt-LS виявляє високу антикатарактальну дію. Дія препарату Cyt-LS на біохімічні показники ПОЛ (КФ, МДА, ДК, каталаза) перевищує дію препарату порівняння [106, 107].

5.3 Дослідження специфічної активності *in vitro*

Нами була оцінена реакційна здатність Cyt-LS, яка передусім розглядається як його активність у забезпеченні електроно-транспортної функції в дихальному ланцюзі мітохондрій. Дослідження специфічної активності проводили *in vitro*. Реакція з дитіонітом натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) використовується для визначення активності цитохрому С [96]. Здатність цитохрому С переходити з відновленої в окиснену форму була оцінена шляхом додавання фероціаніду калію до розчину цитохрому С у відновленій формі. Для визначення специфічної активності Cyt-LS порівнювали спектри розчину Cyt-LS, які були відновлені натрію дитіонітом та окиснені фероціанідом зі спектрами розчину неліпосомального цитохрому С відповідно у відновленій та окисненій формах (рис. 5.5, 5.6).

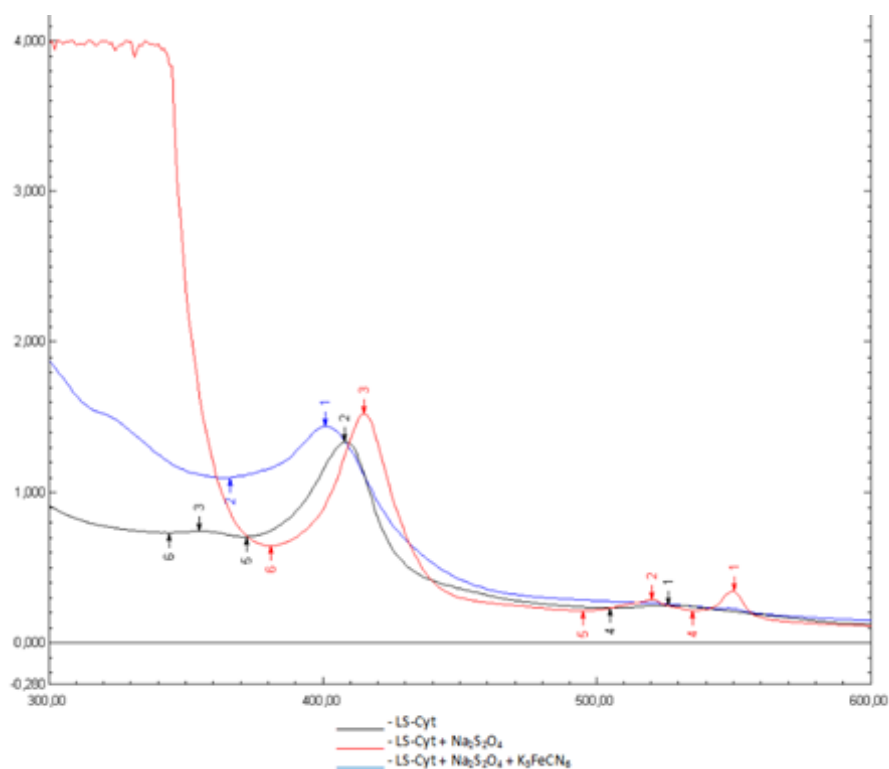


Рис. 5.5 УФ-спектр Cyt-LS

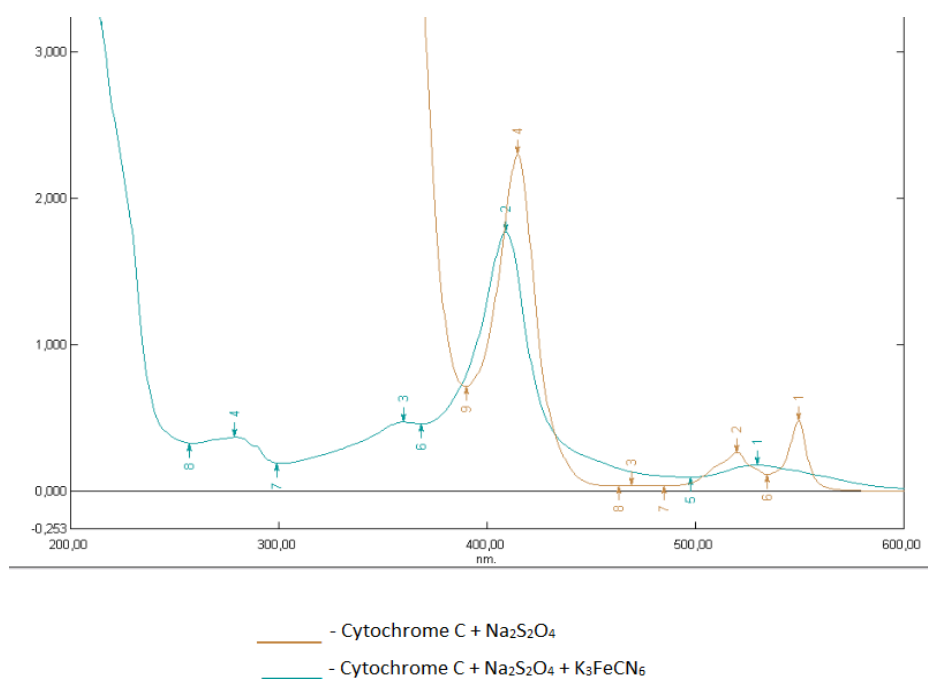


Рис. 5.6 УФ-спектр розчину Cyt-C

На УФ-спектрах розчинів LS-Cyt і Cyt-C після додавання натрію дитіоніту ідентично з'являються максимуми поглинання при 520 і 550 нм, що відповідає характерному УФ-спектру для всіх типів цитохрому у

відновленому стані [152]. Тобто, отримані УФ–спектри демонструють, що цитохром С у формі Cyt-LS зберігає здатність приймати та віддавати електрони аналогічно розчину неліпосомального цитохрому С [101].

Висновки до розділу 5

1. Проведено дослідження специфічної активності Cyt-LS на моделі ураження рогівки, в якому була доведена ефективність препаратів цитохрому С при проникній травмі рогівки. За результатами досліджень, застосування очних крапель Cyt-LS було більш ефективним ніж, застосування цитохрому С щодо процесів запалення та регенерації.

2. Проведено дослідження специфічної активності Cyt-LS на моделі світлової катаракти кролів. Застосування препарату Cyt-LS нормалізує ензиматичні порушення у кришталіку, захисний ефект відносно антиоксидантної системи та уповільнює процеси помутніння кришталіка, тим самим виявляючи високу антикатарактальну профілактично-лікувальну дію. Дія препарату Cyt-LS на біохімічні показники ПОЛ (КФ, МДА, ДК, каталаза) перевищує дію препарату порівняння.

3. Оцінена реакційна здатність Cyt-LS *in vitro*. За результатами дослідження встановлено, що Cyt-С у формі Cyt-LS зберігає здатність приймати та віддавати електрони, аналогічно розчину неліпосомального цитохрому С.

Результати досліджень за даним розділом наведено у таких публікаціях:

1. Katsai O., Ruban O. Preparation And Characterization Of Liposomal Delivery System Of Natural Heme Protein. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. P. 418–425. (Особистий внесок: розробка методів отримання та характеризації ліпосомальної форми цитохрому С, експериментальне дослідження впливу технологічних параметрів на ключові показники якості (розмір часток, домішки, стерильність), дослідження специфічної активності *in vitro*, оформлення та підготовка статті до друку).

2. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopol'skiy Y. M. Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Т. 72, № 12. С. 736-740. (Особистий внесок: розробка технології отримання, методів контролю та вивчення стабільності отриманих зразків ліпосомальної форми цитохрому С, оформлення та підготовка статті до друку).

3. Спосіб отримання фармакологічно активної ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та ліпосомальна композиція, отримана таким способом : пат. 118583 України / Григор'єва Г. С., Кацай О. Г., Краснопольський Ю. М., Прохоров В. В., Хромов О. С., Пасєчнікова Н. В., Добре́ля Н. В. № а 201610776 ; заявл. 27.10.2016 ; опубл. 11.02.2019, Бюл. № 3. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, опис заявки, участь у підготовці патентної формули).

4. Способ получения липосомальной формы цитохрома С : пат. 22183 РФ / Шоболов Д. Л., Краснопольский Ю. М., Ульянов А. М., Натыкан А. А., Тарасов В. В., Балабаньян В. Ю., Шве́ц В. И., Кацай А. Г. ; Евразийское патентное ведомство № 201201592 ; заявл. 24.12.2012 ; опубл. 30.11.2015. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у

проведенні експериментальної частини, написання опису заявки, участь у підготовці патентної формули).

5. Method of producing of pharmacologically active liposomal composition containing cytochrome c, and liposomal composition obtained by this method : pat. 2018/0116957 A1 US / Grygor'ieva G. S., Katsai O. H., Krasnopskyi Y. M., Prokhorov V. V., Khromov O. S., Pasychnikova N. V., Dobrelia N. V. № a 201610776 ; appl. 25.10.2017 ; publ. 03.05.2018. (Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, опис заявки, участь у підготовці патентної формули).

ВИСНОВКИ

Уперше теоретично обґрунтовано, підтверджено експериментальними дослідженнями склад та розроблено технологію виробництва та МКЯ на ліофілізат для приготування очних крапель «Ліпохром» для лікування офтальмологічних захворювань.

1. Розглянуто основні способи отриманн, сучасні вимоги та рекомендації щодо розробки, виробництва та контролю ЛС-ЛЗ. Установлено, що технологія промислового одержання ЛС-ЛЗ включає низку критичних показників якості. ЛС-ЛЗ мають витримувати необхідні випробування на діючі та допоміжні речовини, випробування характерні для конкретної дозованої форми, а також випробування, специфічні для ЛС.

2. Розглянуто етіопатогенетичні аспекти запальних захворювань ока та узагальнені дані літератури щодо застосування цитохрому С в офтальмологічній практиці. Обґрунтовано доцільність введення цитохрому С у комплексі з ФЛ для: відновлення термінальної ланки біологічного окиснення, підвищення енергетичного потенціалу клітини, полегшення проникнення цитохрому С крізь ліпідні ділянки біомембран, а також для підвищення його утримання в деструктивних ділянках. Що в цілому підвищить ефективність використання цитохрому С в офтальмології.

3. Проаналізовано офтальмологічні ЛС-ЛЗ на світовому фармацевтичному ринку. Проведено маркетингове дослідження фармацевтичного ринку щодо питання забезпечення офтальмологічними лікарськими препаратами, які містять цитохром С. Установлено, що ЛС-ЛЗ випускаються у різних лікарських формах та застосовуються для лікування різноманітних очних хвороб. Показана необхідність розробки виробництва сучасних оригінальних офтальмологічних препаратів, які, на відміну дженеричних форм, не лише можуть бути представлені на місцевому ринку, але й мати великий експортний потенціал.

4. Проведено дослідження фізико-хімічних і технологічних показників АФІ та ФЛ. Виходячи з комплексу характеристик діючої та допоміжних речовин визначено методи дослідження, що необхідні для розробки та контролю офтальмологічного ЛЗ відповідно до вимог ДФУ.

5. Обґрунтовано склад Cyt-LS. На підставі сучасних фізико-хімічних та біофармацевтичних досліджень установлено вплив складу ЛС на рівень інкапсуляції та розмір часток при створенні Cyt-LS. Визначено оптимальне співвідношення ФХ у ДПФГ – 1,2 : 1. Здійснено вибір допоміжних речовин. Оптимальним кріопротектором обрана лактоза в концентрації 6 %. Обґрунтовано вибір калію дигідрофосфату та динатрію фосфату дигідрату як компонентів фосфатного буфера.

6. Обґрунтовано та розроблено оптимальну промислову технологію одержання Cyt-LS. Установлено, що для досягнення розмірів основної маси ЛС до 200 нм необхідно провести 5 циклів гомогенізації при тиску 800 bar і температурі 38-44 °С. Підтверджено можливість проведення стерилізуючої фільтрації. Обґрунтовано доцільність проведення ліофілізації та за допомогою підходу QbD досліджено процес ліофілізації Cyt-LS; оцінено вплив кріопротекторів і температури вторинного сушіння на якість FD-LS-Cyt. Показано, що усі технологічні операції не викликають суттєвих змін фізико-хімічних характеристик основних компонентів (цитохрому С, ФЛ) під час одержання FD-LS-Cyt.

7. Проведено фізико-хімічні дослідження розробленого препарату, визначено основні показники якості, апробовано та валідовано методики кількісного аналізу діючої речовини та ФЛ, а також методику визначення ступеня інкапсуляції. Розроблено проєкт МКЯ на препарат відповідно до вимог ДФУ щодо ліпосомальних препаратів та очних лікарських засобів і рекомендацій FDA до контролю ЛС-ЛЗ.

8. Розроблено проєкт регламенту на виробництво запропонованого препарату, проведено апробацію в умовах ВАТ «НаноМедТех», одержано патент України на винахід.

9. Досліджено вплив умов зберігання на стабільність препарату. Запропоновано термін зберігання при температурі $(-15 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ – 18 місяців.

10. Проведено дослідження специфічної активності Cyt-LS на моделях ураження рогівки та світлової катаракти ока кролів. За результатами досліджень, застосування очних крапель Cyt-LS було більш ефективним, ніж застосування цитохрому С стосовно процесів запалення і регенерації. Також застосування препарату Cyt-LS нормалізувало ензиматичні порушення у волозі передньої камери та кришталика й уповільнювало процеси його помутніння, тим самим забезпечуючи профілактично–лікувальну дію.

11. Фрагменти дисертаційної роботи упроваджено у освітньо–науковий процес низки закладів вищої освіти України III–IV рівнів акредитації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gregoriadis G. Liposome technology. Boca Raton : CRC press, 1992. vol. 3. P. 432
2. Дудниченко А. С., Краснопольский Ю. М., Шве́ц В. И. Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике. Харьков : РА–Каравелла. 2001.
3. Григорьева А. С., Кацай А. Г., Конахович Н. Ф., Прохоров В. В., Стадниченко А. В., Шве́ц В. И., Краснопольский Ю.М. Реальная нанофармакология: 25 лет разработки и применения липосомальных лекарственных препаратов в Украине. *Фармаком*. 2016. № 1. С. 41–47.
4. Краснопольский Ю. М., Степанов А. Е., Шве́ц В. И. Липидная технологическая платформа для создания новых лекарственных форм и транспорта активных фармацевтических субстанций. *Биофармацевтический журнал*. 2011. Т. 3, № 2. С. 10–18.
5. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems / J. Li et al. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2015. Vol. 10, № 2. P. 81–98.
6. Bonde S., Nair S. Advances in liposomal drug delivery system: fascinating types and potential applications. *Int J Appl Pharm*. 2017. Vol. 9, № 3. С. 1–7.
7. Çağdaş M., Sezer A. D., Bucak S. Liposomes as potential drug carrier systems for drug delivery. *Application of nanotechnology in drug delivery*. 2014. С. 1–100.
8. Bangham A. D., Horne R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of molecular biology*. 1964. Vol. 8, № 5. P. 660–668.
9. Jesorka A., Orwar O. Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu. Rev. Anal. Chem*. 2008. Vol. 1. P. 801–832.

10. Bangham A. D., Hill M. W., Miller N. G. A. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. *Methods in membrane biology*. Springer, 1974. 68 p.
11. Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1978. Vol. 75, № 9. P. 4194–4198.
12. Batzri S., Korn E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes*. 1973. Vol. 298, № 4. P. 1015–1019.
13. Deamer D. W. Preparation and properties of ether-injection liposomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1978. Vol. 308, № 1. P. 250–258.
14. Zumbuehl O., Weder H. G. Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes*. 1981. Vol. 640, № 1. P. 252–262.
15. Технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов / А. Е. Шахмаев и др. *Український біофармацевтичний журнал*. 2012. № 4. С. 4–11.
16. Dua J. S., Rana A. C., Bhandari A. K. Liposome: methods of preparation and applications. *Int J Pharm Stud Res*. 2012. Vol. 3, № 2. P. 14–20.
17. Torchilin V. P., Weissig V. *Liposomes: a practical approach*. Oxford : Oxford Univ. Press, 2003. 384 p.
18. Costa A. P., Xu X., Burgess D. J. Freeze–anneal–thaw cycling of unilamellar liposomes: effect on encapsulation efficiency. *Pharmaceutical research*. 2014. Vol. 31, № 1. P. 97–103.
19. Llu L., Yonetani T. Preparation and characterization of liposome–encapsulated haemoglobin by a freeze–thaw method. *Journal of microencapsulation*. 1994. Vol. 11, № 4. P. 409–421.
20. Mui B., Chow L., Hope M. J. Extrusion technique to generate liposomes of defined size. *Methods in enzymology*. 2003. Vol. 367. P. 3.

21. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes / F. Olson et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes*. 1979. Vol. 557, № 1. P. 9–23.
22. Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size / A. Jahn et al. *Langmuir*. 2007. Vol. 23, № 11. P. 6289–6293.
23. Controlled vesicle self-assembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing / A. Jahn et al. *Journal of the American Chemical Society*. 2004. Vol. 126, № 9. P. 2674–2675.
24. Technologies and perspectives of liposomal drug application in clinical practice / Y. M. Krasnopolskyi et al. *Nanotechnologies in Russia*. 2017. Vol. 12, № 7–8. P. 461–470.
25. A study of oxidative stress markers when using the liposomal antioxidant complex / D. M. Pylypenko et al. *Pharmakeftiki*. 2019. Vol. 31, № 1. P. 40–47.
26. Перспективы применения в клинической практике наноразмерных форм лекарственных препаратов / Ю. М. Краснопольский и др. *Российский химический журнал*. 2012. Т. 56, № 3–4. С. 11–32.
27. Краснопольский Ю. М., Швец В. И. Технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов и их применение в клинике. *Нанотехнологии и охрана здоровья*. 2013. Т. 5, № 2. С. 10–20.
28. Barenholz Y. Amphipathic weak base loading into preformed liposomes having a transmembrane ammonium ion gradient: From the bench to approved DOXIL. *Liposome technology*. CRC Press, 2016. P. 25–50.
29. Fenske D. B., Cullis P. R. Encapsulation of drugs within liposomes by pH-gradient techniques. *Liposome Technology*. CRC Press, 2016. P. 51–74.
30. Исследование методов включения лекарственных субстанций в липосомальные наночастицы / А. Е. Шахмаев и др. *Ремедиум Журнал о рынке лекарств и медицинской техники*. 2015. № 12. С. 56–59.
31. US Food and Drug Administration et al. Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and

Bioavailability; and Labeling Documentation. Guidance for Industry. Silver Spring, 2018. 15 p.

32. Ліпосомальні препарати. Державна Фармакопея України 2.0. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Харків, 2015. С. 1036–1038.

33. EMA. Reflection Paper on the Data Requirements for Intravenous Liposomal Products Developed with Reference to an Innovator Liposomal Product. Amsterdam, 2013. P. 1–13.

34. Wadhwa S. Nanocarriers in ocular drug delivery: an update review. *Current pharmaceutical design*. 2009. Vol. 15, № 23. P. 2724–2750.

35. Geroski D. H., Edelhauser H. F. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000. Vol. 41, № 5. P. 961–964.

36. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2006. Vol. 58, № 11. P. 1131–1135.

37. Mitra, A.K. Role of Transporters in Ocular Drug Delivery System. *Pharm Res*. 2009 Vol. 26, № 5. P. 1192–1196.

38. Mishra G. P. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *Journal of drug delivery*. 2011. Vol. 2011. P. 1–14.

39. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update / R. Agarwal et al. *Drug delivery*. 2016. Vol. 23, № 4. P. 1075–1091.

40. Liposome–cell interactions A study of the interactions of liposomes containing entrapped anti–cancer drugs with the EMT6, S49 and AE1 (transport–deficient) cell lines / T. M. Allen et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes*. 1981. Vol. 643, № 2. C. 346–362.

41. Lipowsky R. Generic interactions of flexible membranes. *Handbook of biological physics*. 1995. Vol. 1. P. 521–602.

42. Knoll G. Fusion of liposomes with the plasma membrane of epithelial cells: fate of incorporated lipids as followed by freeze fracture and autoradiography of plastic sections. *The Journal of cell biology*. 1988. Vol. 107, № 6. P. 2511–2521.

43. Wojewodzka J., Pazdzior G., Langner M. A method to evaluate the effect of liposome lipid composition on its interaction with the erythrocyte plasma membrane. *Chemistry and physics of lipids*. 2005. Vol. 135, № 2. P. 181–187.
44. Murthy G. V. S. Current status of cataract blindness and Vision 2020: the right to sight initiative in India. *Indian journal of ophthalmology*. 2008. Vol. 56, № 6. P. 489.
45. Gupta V. B., Rajagopala M., Ravishankar B. Etiopathogenesis of cataract: an appraisal. *Indian journal of ophthalmology*. 2014. Vol. 62, № 2. P. 103.
46. The oxidative stress in cataract patients / J. Kaur et al. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2012. Vol. 6, № 10. P. 1629.
47. Современные аспекты патогенеза возрастной катаракты человека : обзор литературы / Н. В. Корсакова и др. *Офтальмохирургия*. 2012. № 2. С. 82–85.
48. Брагин Е. В. Обзор факторов риска развития старческой катаракты. *Анализ риска здоровью*. 2018. № 1. С. 22–24.
49. Хаппе В. Офтальмология. Москва: МЕДпресс–информ, 2005. 352 с.
50. Whitcher J. P., Srinivasan M., Upadhyay M. P. Corneal blindness: a global perspective. *Bulletin of the world health organization*. 2001. Vol. 79. С. 214–221.
51. Гундорова Р. А. Повреждения органа зрения. Вопросы, требующие дальнейших разработок. *Вестник офтальмологии*. 2006. Т. 122, № 1. С. 24–26.
52. Курбанова Н. Ф. Клинические особенности больных с травмой глаза в условиях специализированного отделения. *Вестник офтальмологии*. 2003. Т. 119, № 3. С. 41–43.
53. Профилактика осложнений при повреждениях органа зрения / О. Б. Ченцова и др. *Альманах клинической медицины*. 1998. № 1. С. 364–371.
54. Babizhayev M. A., Yegorov Y. E. Reactive oxygen species and the aging eye: specific role of metabolically active mitochondria in maintaining lens function and in the initiation of the oxidation–induced maturity onset cataract—a

novel platform of mitochondria-targeted antioxidants with broad therapeutic potential for redox regulation and detoxification of oxidants in eye diseases. *American journal of therapeutics*. 2016. Vol. 23, № 1. С. 98–117.

55. Ho M. C. Senile cataracts and oxidative stress. *Journal of clinical gerontology and geriatrics*. 2010. Т. 1, № 1. С. 17–21.

56. Оганезова Ж. Г. Применение препарата Каталин в лечении возрастной катаракты. *РМЖ. Клиническая офтальмология*. 2013. Т. 14, № 2. С. 74–77.

57. Офтан Катахром / Компендиум URL: <https://compendium.com.ua/info/11758/oftan-sup-sup-katakhrom/> (дата обращения: 08.07.2020).

58. Keilin D. The history of cell respiration and cytochrome. Cambridge: Cambridge University Press, 1966. 436 p

59. Pereverzev M. O. Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans*. 2003. Vol. 31. (6). 1312–1315.

60. Оценка влияния препарата «Цитохром С» на восстановление зрительных функций у больных с помутнениями роговицы после перенесённых кератитов / В. О. Соколов и др. *Офтальмологические ведомости*. 2017. Т. 10. № 2. С. 79–86.

61. Егорова Е. В. Ультразвуковая терапия и инстилляциии противокатарактальных препаратов в комплексном лечении больных с возрастной катарактой. *Вестник Самарского государственного университета*. 2006. № 6–2. С. 233–238.

62. Сравнительная эффективность глазных капель цитохрома С при экспериментальном повреждении глаз / Д. Ю. Ивкин и др. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019. Т. 8, № 1. С. 78–84.

63. Полунин Г. С. Эффективность медикаментозного лечения различных видов катаракт. *Консилиум медиком. Офтальмология*. 2001. Т. 3, № 12. С. 9–11.

64. Гусаревич О. Г., Фурсова А. Ж., Колосова Н. Г. Изучение влияния офтала катахрома на развитие макулярной дегенерации сетчатки. *Клиническая офтальмология*. 2003. Т. 4, № 4. С.186–189.
65. Mayer H., König H. Objective evaluation of cataract development under treatment with cytochrome C, sodium succinate, adenosine, nicotinamide and sorbitol. *Fortschritte der Ophthalmologie: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. 1987. Vol. 84, № 3. С. 261.
66. Кривцова И. М., Алексеева Н. Н. Цитохром С – фосфолипидный комплекс (получение и изучение в эксперименте). Цитохром С и его клиническое применение / Ленингр. НИИ гематологии и переливания крови. Ленинград, 1990. С. 74–76.
67. Zhang J. Freeze-dried liposomes as potential carriers for ocular administration of cytochrome c against selenite cataract formation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009. Vol. 61, № 9. С. 1171–1178.
68. Спосіб одержання ліпосомального цитохрому С : пат. 44318 України. № u200905288 ; заявл. 27.05.2009 ; опубл. 25.09.2009, Бюл. № 18.
69. Липосомальная везикула с цитохромом С : пат 2110990 РФ. № 94027343/14; заявл. 14.07.1994 ; опубл. 20.05.1998.
70. Brian G., Taylor H. Cataract blindness: challenges for the 21st century. *Bulletin of the World Health Organization*. 2001. Vol. 79. С. 249–256.
71. Whitcher J. P., Srinivasan M., Upadhyay M. P. Corneal blindness: a global perspective. *Bulletin of the world health organization*. 2001. Vol. 79. С. 214–221.
72. Global Ophthalmology Drugs Market to 2023. New York : GBI Research: 2017. 132 p.
73. Медведев И. Б., Беликова Е. И., Сямичев М. П. Фотодинамическая терапия с визудином в лечении хориоидальной неоваскуляризации при осложненной близорукости. *Вестник офтальмологии*. 2007. Т. 123, № 6. С. 23–26.

74. Измайлов А. С., Балашевич Л. И. Фотодинамическая терапия с визудином: критерии успеха лечения. *Вестник офтальмологии*. 2007. Т. 123, № 6. С. 17–21.
75. Ліпофлавон / Компендіум URL: <https://compendium.com.ua/info/169237/lipoflavon/> (дата звернення 13.11.2019).
76. Петруня А. М., Фарук И. С. А. Эффективность липофлавона в комплексном лечении больных травматическими кератитами. *Офтальмологический журнал*. 2006. Т. 2, № 3. С. 102–104.
77. Ярошева Н. А. Применение флавоноида–кверцетина в лечении больных диабетической ретинопатией. *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології*. 2014. № 1. С. 273–280.
78. Пасечникова Н. В., Горшкова Р. А. Клинико–биохимическое обоснование применения препарата «Липофлавон» у больных возрастной катарактой после операции экстракции катаракты и имплантации продуктов перекисного окисления. *Украинский медицинский альманах*. 2006. Т. 9, № 1. С. 219–221.
79. Додаток 6 до наказу Міністерства охорони здоров'я України від 06.12.2017 № 1542. URL: https://moz.gov.ua/uploads/0/2506-dn_20171206_1542_dod.pdf (дата звернення 13.11.2019).
80. Субстанції для фармацевтичного застосування. Державна фармакопея України 2.0. Харків : ДП «Науково–експертний центр». 2015. С. 1055.
81. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–е вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2014. Т. 2. С. 724.
82. Tafani M. Cytochrome c release upon Fas receptor activation depends on translocation of full-length bid and the induction of the mitochondrial permeability transition. *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, № 12. P. 10073–10082.

83. Margoliash E. Primary structure and evolution of cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1963. Vol. 50, № 4. P. 672.
84. Bowman S. E. J., Bren K. L. The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment. *Natural product reports*. 2008. Vol. 25, № 6. P. 1118–1130.
85. Phosphatidylcholine and related lipids / The lipid web URL: <https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=lipids/complex/pc/index.htm>. (Date of access: 13.08.2020).
86. Phosphatidylcholne (Egg, Chiken) / PubChem Database URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/99344046> (Date of access: 15.09.2019).
87. Mashaghi A. Hydration strongly affects the molecular and electronic structure of membrane phospholipids. *The Journal of chemical physics*. 2012. Vol. 136, № 11. P. 03B611.
88. 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol), sodium salt. / PubChem Database URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/46891827> (Date of access: 15.09.2019).
89. Blaurock A. E., McIntosh T. J. Structure of the crystalline bilayer in the subgel phase of dipalmitoylphosphatidylglycerol. *Biochemistry*. 1986. Vol. 25, № 2. P. 299–305.
90. Лактоза моногідрат. Державна фармакопея України 2.0. Харків : ДП «Науково-експертний центр», 2015. С. 385.
91. Trehalose dihydrate. / PubChem Database URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trehalose-dihydrate> (Date of access: 15.09.2019).
92. Калію дигідрофосфат. Державна фармакопея України 2.0. Харків : ДП «Науково-експертний центр», 2015. С. 329.

93. Disodium hydrogen phosphate / PubChem Database. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Disodium-hydrogen-phosphate> (Date of access: 15.09.2019).
94. Вода для ін'єкцій. Державна фармакопея України 2.0. Харків : ДП «Науково-експертний центр», 2015. С. 125.
95. Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності : Настанова якості МОЗУ 42–3.2:2004 / В. Георгієвський та ін. Київ, 2004. С. 38 с.
96. Cytochrome C for injection / State Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of Китай. Beijing: Pharmacopoeia Chemical Industry Press, 1997. 1234 p.
97. Egg phospholipids. United States Pharmacopeia USP NF 30. North Bethesda. The United States Pharmacopeial Convention, 2012. P 1789–1790.
98. Кацай А. Г., Рубан Е. А., Краснопольский Ю. М., Влияние состава липосом на степень инкапсуляции размер частиц при создании липосомальной формы цитохрома С. *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. 2017. № 4 (8). С. 32–36.
99. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopolskyi Y. M. Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. *Die Pharmazie—An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 72, № 12. P. 736–740.
100. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopolskyi Y. M. "Quality-by-design" approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C. *Pharmakeftiki*. 2018. Vol. 30, № 2. P. 76–87.
101. Katsai O., Ruban O. Preparation And Characterization Of Liposomal Delivery System Of Natural Heme Protein. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. Vol 11 (4). P. 418–425.
102. Розробка та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах / О. Г. Кацай та ін. *Фармацевтичний журнал*. 2016. № 5. С. 69–75.

103. Исследование антиаритмической активности липосомальной формы цитохрома С / Д. М. Пилипенко и др. *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. 2017. № 3 (7). С. 51–57.
104. Кацай А. Г., Рубан Е. А. Определение фосфолипидного состава липосом с цитохромом С методом ВЭЖХ. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології* : I Междунар. науч.–практ. интернет–конф. «Современные аспекты создания экстенпоральных алопатических, гомеопатических и косметических лекарственных средств». Харків, 2017. Вип. 2. С. 98.
105. Способ получения липосомальной формы цитохрома С : пат. 22183 РФ / Евразийское патентное ведомство № 201201592 ; заявл. 24.12.2012 ; опубл. 30.11.2015.
106. Спосіб отримання фармакологічно активної ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та ліпосомальна композиція, отримана таким способом : пат. 118583 України. № а 201610776 ; заявл. 27.10.2016 ; опубл. 11.02.2019, Бюл. № 3
107. Method of producing of pharmacologically active liposomal composition containing cytochrome c, and liposomal composition obtained by this method : pat. 2018/0116957 A1 US № а 201610776 ; appl. 25.10.2017 ; publ. 03.05.2018.
108. Zhang J. Freeze-dried liposomes as potential carriers for ocular administration of cytochrome c against selenite cataract formation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009. Vol. 61, № 9. С. 1171–1178.
109. Липосомальная везикула с цитохромом С : пат 2110990 РФ. № 94027343/14 ; заявл. 14.07.1994 ; опубл. 20.05.1998.
110. Спосіб одержання ліпосомального цитохрому С: пат. 44318 України. № u200905288 ; заявл. 27.05.2009 ; опубл. 25.09.2009, Бюл. № 18.
111. Gorbenko G. P., Molotkovsky J. G., Kinnunen P. K. J. Cytochrome c interaction with cardiolipin/phosphatidylcholine model membranes: effect of cardiolipin protonation. *Biophysical journal*. 2006. Vol. 90, № 11. Р. 4093–4103.

112. Mohn E. S. Interactions of cytochrome c with n-acylated phosphatidylethanolamine lipids. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2014. Vol. 118, № 37. P. 8287–8292.
113. Perrie Y. Environmental scanning electron microscopy offers real-time morphological analysis of liposomes and niosomes. *Journal of liposome research*. 2007. Vol. 17, № 1. P. 27–37.
114. Wagner A., Vorauer-Uhl K. Liposome technology for industrial purposes. *Journal of drug delivery*. 2011. Vol. 2011. P. 1–9.
115. Zuidam N. J., Lee S. S. L., Crommelin D. J. A. Sterilization of liposomes by heat treatment. *Pharmaceutical research*. 1993. Vol. 10, № 11. P. 1591–1596.
116. Toh M. R., Chiu G. N. C. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013. Vol. 8, № 2. P. 88–95.
117. Driscoll D. F. Lipid injectable emulsions: 2006. *Nutrition in clinical practice*. 2006. Vol. 21, № 4. P. 381–386.
118. Goldbach P. Sterile filtration of liposomes: retention of encapsulated carboxyfluorescein. *International journal of pharmaceutics*. 1995. Vol. 117, № 2. P. 225–230.
119. Folmsbee M., Moussourakis M. Sterilizing filtration of liposome and related lipid-containing solutions: enhancing successful filter qualification. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2012. Vol. 66, № 2. P. 161–167.
120. Shulkin P. M. Lyophilized liposomes: a new method for long-term vesicular storage. *Journal of microencapsulation*. 1984. Vol. 1, № 1. P. 73–80.
121. Guideline I. C. H. H. T. Pharmaceutical development Q8. *Current Step*. 2005. Vol. 4. P. 11.
122. Crowe J. H., Crowe L. M. Factors affecting the stability of dry liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1988. Vol. 939, № 2. P. 327–334.

123. Hays L. M. Factors affecting leakage of trapped solutes from phospholipid vesicles during thermotropic phase transition. *Cryobiology*. 2001. Vol. 42, № 2. P. 88–102.
124. Nounou M. M. Influence of different sugar cryoprotectants on the stability and physico–chemical characteristics of freeze–dried 5–fluorouracil plurilamellar vesicles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005. Vol. 13, № 4. P. 133–142.
125. Woodle M. C., Lasic D. D. Sterically stabilized liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Reviews on Biomembranes*. 1992. Vol. 1113, № 2. C. 171–199.
126. Crommelin D. J. A., Van Bommel E. M. G. Stability of liposomes on storage: freeze dried, frozen or as an aqueous dispersion. *Pharmaceutical research*. 1984. Vol. 1, № 4. P. 159–163.
127. Stadnichenko O. V., Krasnopolsky Y. M., Yarnykh T. G. The study of liophilization parameters in the liposomal irinotecan development. *Вісник фармації*. 2017. № 4. P. 45–49.
128. Mourya V. K. Quality by Design: Impact of Product Variables and Their Interaction on the Particle Size in Lyophilization of Sodium Fluoride. *Soft Nanoscience Letters*. 2016. Vol. 6, № 01. P. 1.
129. Келикс / Нормативно–директивні документи МОЗ України. URL: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=5326> (дата звернення 13.11.2019).
130. Ліпофлавон / Нормативно–директивні документи МОЗ України. URL: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=37935> (дата звернення 13.11.2019).
131. Ліолів–біолік / Нормативно–директивні документи МОЗ України. URL: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=38156> (дата звернення 13.11.2019).
132. Краснопольский Ю. М., Дудниченко А. С., Швец В. И. Фармацевтическая биотехнология: бионанотехнология в фармации и медицине. Харьков : НТУ "ХПИ", 2011. 228 с.

133. Очні лікарські засоби. Державна фармакопея України 2.0. Державне підприємство «науково–експертний центр». Харків, 2015. С. 1108–1112.
134. Lipid Injectable Emulsion. United States Pharmacopeia USP NF 30. North Bethesda / The United States Pharmacopeial Convention. North Bethesda, 2012. P. 3694–3695.
135. Globule Size Distribution in Lipid Injectable Emulsion. United States Pharmacopeia USP NF 30. North Bethesda. The United States Pharmacopeial Convention, 2012. Chapter 729
136. Betageri G. V., Jenkins S. A., Parsons D. L. Liposome Drug Delivery Systems. Lancaster: Technomic Publishing Co, 1993. P. 47–64.
137. Lundahl P. Chromatographic approaches to liposomes, proteoliposomes and biomembrane vesicles. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1999. Vol. 722, № 1–2. P. 103–120.
138. Guideline I. C. H. H. T. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) / Proceedings of the International Conference on Harmonization. Geneva, 2005. 252 p.
139. Guideline I. C. H. H. T. Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2) / Proceedings of the International Conference on Harmonization. Geneva, 2003. 112 p.
140. Samoylov A. N., Perova N. V. Study of the application of 0.3% Piyavit solution with corneal injuries in the experiment. *Clin Ophthalmol*. 2005. Vol. 1. P. 41–42.
141. Приказ М. Р. Ф. от 23.08. 2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики" / Справочная правовая система «Консультант Плюс». URL: <http://base.consultant.ru>. – 2010. (дата обращения: 04.02.2019)
142. Clark J. D. The 1996 guide for the care and use of laboratory animals. *ILAR journal*. 1997. Vol. 38, № 1. P. 41–48.
143. National Research Council et al. Guide for the care and use of laboratory animals. – National Academies Press, 2010.

144. Kilkenny C. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS biology*. 2010. Vol. 8, № 6. P. 1–5.
145. Kanyukov V. N., Stadnikov A. A., Trubina O. M. Experimental modeling of traumatic damage of the cornea. *Vestnik of OSU*. 2014. № 12 (173). P. 156–159.
146. Siatiri H. Intracameral tissue plasminogen activator to prevent severe fibrinous effusion after congenital cataract surgery. *British journal of ophthalmology*. 2005. Vol. 89, № 11. P. 1458–1461.
147. Бойко Э. В. Методы клинического применения рекомбинантной проурокиназы в офтальмологической практике. *РМЖ. Клиническая офтальмология*. 2017. Т. 17, № 2. С. 00–00.
148. Реброва О. Ю. Минцер О. П. Методы обработки медицинской информации. Киев : Вища шк., 1991. 271с
149. Гланц С. Медико–биологическая статистика. Москва : Практика, 1999. 459 с.
150. Спосіб моделювання променевої катаракти: пат. 20178 України. № 4712831/SU ; заявл. 03.07.1989 ; опубл. 25.12.1997, Бюл. № 6.
151. Метелицына И. П. Сравнительная характеристика развития помутнений хрусталика при разных способах моделирования катаракты. *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології*. 2000. Вып. 3 (29). С. 221–233.
152. Dyson H. J., Egelman E. H. Biophysical techniques for structural characterization of macromolecules. Amsterdam: Elsevier, 2012. 617 p.
153. Kajimoto K. Liposome microencapsulation for the surface modification and improved entrapment of cytochrome c for targeted delivery. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2018. Vol. 95, № 1. P. 101–109.
154. Bowman S. E. J., Bren K. L. The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment. *Natural product reports*. 2008. Vol. 25, № 6. P. 1118–1130.

155. Bulbake U. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*. 2017. Vol. 9, № 2. P. 12.
156. Kaess K., Fahr A. Liposomes as solubilizers for lipophilic parenteral drugs: transfer of drug and lipid marker to plasma proteins. *European journal of lipid science and technology*. 2014. Vol. 116, № 9. P. 1137–1144.
157. Funakoshi Y. Lipid nanoparticles with no surfactant improve oral absorption rate of poorly water-soluble drug. *International journal of pharmaceutics*. 2013. Vol. 451, № 1–2. P. 92–94.
158. Інструкція до набору реактивів для визначення загальної активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) (кінетичний УФ-метод) : ТУ У 24.4–24607793–017–2003 / ТОВ НВП Філісіт–Діагностика. URL: <http://felicit.com.ua/wp-content/uploads/2018/11/%D0%9B%D0%94%D0%93.pdf> (дата звернення 19.11.2019).
159. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск : Интерпрессервис, 2000. Т. 2. С. 71–79.
160. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*. 1988. № 1. С. 16–19.
161. Tsanko Gechev, Hilde Willekens, Mark Van Montagu, Dirk Inzé, W.i.m. Van Camp, Valentina Toneva, Ivan Minkov, Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology*. 2003 Vol. 160, № 5. P. 509–515
162. Мирошниченко О.С. Биогенез, физиологическая роль исвойства каталазы. *Biopolymers and Cell*. 1992. Т. 8, № 6. С. 3–25.
163. Аль-Саиди Сами, Сухина И. В. Состояние энзиматической антиоксидантной системы в тканях глаз при моделировании экспериментальной катаракты. *Офтальмологічний журнал*. 2009. № 4. С. 58–62.

164. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегда с помощью тиобарбитуровой кислоты / Современные методы в биохимии. Москва : Медицина, 1977. С. 66–68.

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА

Статті (Scopus / web of science)

1. Katsai O., Ruban O. Preparation And Characterization Of Liposomal Delivery System Of Natural Heme Protein // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. P. 418–425. (Особистий внесок: розробка методів отримання та характеризації ліпосомальної форми цитохрому С; експериментальне дослідження впливу технологічних параметрів на ключові показники якості (розмір часток, домішки, стерильність); дослідження специфічної активності in-vitro; оформлення та підготовка статті до друку).

2. Pylypenko Daria M., Gorbach Tatiana V, Katsai Oleksii G., et al. A study of oxidative stress markers when using the liposomal antioxidant complex // *Pharmakeftiki*. – 2019. – Т. 31. – №. 1. – С. 40–47. (Особистий внесок: отримання ліпосомальних форм кверцетина та убіхінону, методом ліпідної плівки; фіз.-хім характеризація отриманих зразків).

3. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopolskyi Y. M. "Quality-by-design" approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C // *Pharmakeftiki*. – 2018. – Т. 30. – №. 2. – С. 76–87. (Особистий внесок: розробка підходу QbD при виборі лікарської форми ліпосомальної форми цитохрому С; Дослідження впливу типу, концентрації кріопротектору, та параметрів ліофілізації на критичні показники якості; оформлення та підготовка статті до друку).

4. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopolskyi Y. M. Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes // *Die Pharmazie—An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Т. 72. – №. 12. – С. 736–740. (Особистий внесок: розробка технології отримання, методів контролю та вивчення стабільності отриманих зразків ліпосомальної форми цитохрому С; оформлення та підготовка статті до друку).

5. Krasnopol'skiy, Y.M., Grigor'eva, A.S., Katsai, A.G. et al. Technologies and perspectives of liposomal drug application in clinical practice //Nanotechnologies in Russia. – 2017. – Т. 12. – №. 7–8. – С. 461–470. *(Особистий внесок: експериментальна розробка технології отримання ліпосомальних форм цитохрому С – метод хімічного зв'язку; ріфабутину та доцетакселу – метод ліпідної плівки; розробка методів контролю та стандартизація лікарських форм).*

Статті у фахових виданнях

6. Katsai O., Ruban O., Krasnopol'skiy Y. Влияние состава липосом на степень инкапсуляции и размер частиц при создании липосомальной формы цитохрома С //ScienceRise. Pharmaceutical Science. – 2017. – №. 4 (8). – С. 32–36. *(Особистий внесок: експериментальне дослідження впливу складу липосом на ступень інкапсуляції та розмір часток; оформлення та підготовка статті до друку).*

7. Пилипенко Д. М., Кацай А. Г., Прохоров В. В., и др. Исследование антиаритмической активности липосомальной формы цитохрома С //ScienceRise. Pharmaceutical Science. – 2017. – №. 3 (7). – С. 51–57. *(Особистий внесок: отримання зразків ліпосомального цитохрому С; фіз.-хім характеристика отриманих зразків).*

8. Григорьева А.С., Кацай А.Г., Конахович Н.Ф., и др. Реальная нанофармакология: 25 лет разработки и применения липосомальных лекарственных препаратов в Украине // Фармаком – 2016. – №1 – С. 41–47. *(Особистий внесок: участь у розробці технологічної платформи отримання ліпосомальних препаратів; проведення аналізу основних методів включення лікарських субстанцій до ліпосом; розробка методів контролю та стандартизація лікарських форм фармацевтичних субстанцій (цитохром С, оксалиплатин, доцетаксел).*

9. Кацай О.Г., Прохоров В.В, Грігор'єва Г.С., Краснопольський Ю.М. Розробка та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С

у ліпосомах // Фармацевтичний журнал – 2016. – № 5 – С. 69 – 75 (*Особистий внесок: проведення розробки та валідації методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах; оформлення та підготовка статті до друку*).

10. Шахмаев А.Е., Кацай А.Г., Прохоров В.В., и др. Исследование методов включения лекарственных субстанций в липосомальные наночастицы. // Ремедиум Журнал о рынке лекарств и медицинской техники – 2015. – №12. – С. 56–59. (*Особистий внесок: експериментальне дослідження методів включення до ліпосом цитохрому С, оксаліплатину – метод хімічного зв'язку; кверцетину та доцетакселу – метод ліпідної плівки*).

Патенти

11. Патент UA № 118583 Григор'єва Г. С.; Кацай О.Г.; Краснопольський Ю.М; Прохоров В.В.; Хромов О.С.; Пасєчнікова Н.В.; Добреля Н.В.

Спосіб отримання фармакологічно активної ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та ліпосомальна композиція, отримана таким способом // Патент України № 118583. 2019. Бюл. № 3 (*Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, написання опису заявки, участь у підготовці патентної формули*).

12. Патент ЕАПО № 022183. Шоболов Д.В., Краснопольский Ю.М., Ульянов А.М., Натыкан А. А., Тарасов В.В., Балабаньян В.Ю., Шве́ц В.И., Кацай А.Г. Способ получения липосомальной формы цитохрома С. // Евразийское патентное ведомство № 022183 В1 – Заявл. 2012.12.24; Опубл. 2015.11.30 (*Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, написання опису заявки, участь у підготовці патентної формули*).

13. Patent US 2018/0116957 A1 Grygor'ieva Ganna S, Katsai Oleksii H, Krasnopolskyi Yurii M, Prokhorov Vitalii V, Khromov Oleksandr S, Pasychnikova Nataliya V, Dobrelia Natalia V. Method of producing of pharmacologically active

liposomal composition containing cytochrome c, and liposomal composition obtained by this method. // USPTO № 2018/0116957 A1 – Pub. Date: May 3, 2018 (*Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, написання опису заявки, участь у підготовці патентної формули*).

Тези доповідей

14 Пилипенко Д.М., Кацай О.Г. Дослідження кардіологічної дії ліпосомальної форми цитохрому С. // Збірник тез VI міжнародної науково–практичної конференції, присвяченої до 120–річчя НУБіП України. (14–16 листопада 2017 року). – Київ, 2017. – С.140–141

15. Григор'єва Г.С., Конахович Н.Ф., Прохоров В.В., Кацай О.Г. Реальна нанофармакологія: розробка та медичне застосування ліпосомальних препаратів в Україні. // Збірник тез доповідей V національного з'їзду фармакологів України. (18–20 жовтня 2017) – Запоріжжя, 2017 – С.30.

16. Кацай О.Г., Рубан О.А., Краснопольський Ю.М. Валив складу липосом на ступень інкапсуляції та розмір часток при фармацевтичній розробці ліпосомальної форми цитохрому С. // Матеріали 40–вої ювілейної науково–практичної конференції молодих вчених НМАПО імені П.Л.Шупика з міжнародною участю, присвяченої Дню науки. «Інновації в медицині: досягнення молодих вчених» (18.05.17). – Київ, 2017 – С.103 – 104.

17. Кацай А.Г., Рубан Е.А. Определение фосфолипидного состава липосом с цитохромом С методом ВЭЖХ. // I Международная научно–практическая интернет–конференция «Современные аспекты создания экстенпоральных алопатических, гомеопатических и косметических лекарственных средств», Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології збірник наукових праць. НФаУ. – ХАРКІВ, 2017 – Випуск 2, С 98

18. Кацай О.Г., Прохоров В.В., Рубан О.А., Краснопольський Ю.М. Вплив складу фосфоліпідів на інкапсуляцію активного інгредієнту в

ліпосомах. // Науково–технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів Матеріали VI науково–практичної конференції з міжнародною участю (10–11 листопада 2016 р). – Тернопіль, 2016.

19. Григорьева А.С., Кацай А.Г., Конахович Н.Ф., Прохоров В.В., Стадниченко А.В., Краснополяский Ю.М., Шве́ц В.И. Нанофармакология – перспективное направление фармацевтической науки и промышленности. // Химия, био– и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности. Сборник материалов IV международной научно–практической конференции. (17–18 октября 2016 г). –Харьков 2016

20. Кацай А.Г., Прохоров В.В., Краснополяский Ю.М. Разработка и валидация методики определения степени инкапсуляции цитохрома С в липосомы. // Мат. VIII національного з'їзду фармацевтів. – Харків 2016, С. 191.

21. Кацай А.Г., Прохоров В.В., Стадниченко А.В., Шахмаев А.Е., Краснополяский Ю.М., Шве́ц В.И // Химия, био–и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности. Сб. материалов II–й международной научно–практической конференции. – Харьков 2014 г

Продовж. Додатку А

Апробація результатів дисертації

1. VI міжнародна науково–практична конференція, присвячена 120–річчю НУБіП України. (Київ, 14–16 листопада 2017 року, форма участі – публікація тез).
2. V національний з'їзд фармакологів України. (Запоріжжя, 18–20 жовтня 2017, форма участі – публікація тез)
3. 40–ва ювілейна науково–практична конференція молодих вчених НМАПО імені П.Л.Шупика з міжнародною участю, присвяченої Дню науки. «Інновації в медицині: досягнення молодих вчених» (Київ 18.05.17, форма участі – публікація тез)
4. I Международная научно–практическая интернет–конференция «Современные аспекты создания экстенпоральных алопатических, гомеопатических и косметических лекарственных средств», Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології НФаУ. (ХАРКІВ, 2017, форма участі – публікація тез)
5. VI науково–практична конференція з міжнародною участю «Науково–технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 10–11 листопада 2016 р, форма участі – публікація тез)
6. IV международной научно–практической конференции «Нанофармакология – перспективное направление фармацевтической науки и промышленности». (Харьков 17–18 октября 2016 г, форма участі – публікація тез).
7. VIII національний з'їзд фармацевтів. – (Харків 2016, форма участі – публікація тез)
8. II–й международна научно–практической конференция «Химия, био– и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности». – (Харьков 2014 г, форма участі – публікація тез).

Додаток Б



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118583** (13) **C2**

(51) МПК

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/44 (2017.01)

A61K 38/41 (2006.01)

A61P 27/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 10776	(72) Винахідник(и):	Григор'єва Ганна Савівна (UA), Кацай Олексій Григорович (UA), Краснопольський Юрій Михайлович (UA), Прохоров Віталій Валентинович (UA), Хромов Олександр Станіславович (UA), Пасечнікова Наталія Володимирівна (UA), Добреля Наталія Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	27.10.2016	(73) Власник(и):	ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "НАНОМЕДТРАСТ", вул. Старокиївська, буд. 26, м. Київ, 04116, Україна (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.02.2019	(74) Представник:	Боровик Петро Антонович, реєстр. №166
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.05.2018, Бюл.№ 9	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	EA 022183 C2 UA 111762 C2 RU 2 110 990 C1 Zhang J., Guan P., Wang T. et al. Freeze- dried liposomes as potential carriers for ocular administration of cytochrome c against selenite cataract formation // J. Pharmacy and Pharmacology, 2009. – V. 61. – №9. – P. 1171-1178.
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.02.2019, Бюл.№ 3		

UA 118583 C2

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ КОМПОЗИЦІЇ, ЩО МІСТИТЬ ЦИТОХРОМ C, ТА ЛІПОСОМАЛЬНА КОМПОЗИЦІЯ, ОТРИМАНА ТАКИМ СПОСОБОМ

(57) Реферат:

Винахід належить до фармацевтики та стосується способу отримання ліпосомальної композиції, що містить цитохром C, та отриманої цим способом фармакологічно активної ліпосомальної композиції, яка може використовуватись як засіб поліфункціональної фармакотерапії, зокрема, в офтальмології, гематології та кардіології.

Спосіб отримання ліпосомальної композиції, що містить цитохром C, включає створення суміші розчинів ліпідів в органічних розчинниках, її висушування у вакуумі та емульгування у водному середовищі, що містить цитохром C, додавання кріопротектора, гомогенізацію емульсії, фільтрацію та ліофільне висушування, згідно із винаходом, як ліпіди використовують фосфатидилхолін яєчний або соевий у суміші із одним або двома іншими ліпідами, вибраними із групи дипальмітоїлфосфатидилгліцерину, дипальмітоїлфосфатидилхоліну, дистеароїлфосфатидилхоліну, дифосфатидилгліцерину, фосфатидилгліцерину,

Продовж. Додатку Б



Додаток В



US 20180116957A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication**
GRYGOR'IEVA et al.(10) **Pub. No.: US 2018/0116957 A1**(43) **Pub. Date: May 3, 2018**(54) **METHOD OF PRODUCING OF
PHARMACOLOGICALLY ACTIVE
LIPOSOMAL COMPOSITION CONTAINING
CYTOCHROME C, AND LIPOSOMAL
COMPOSITION OBTAINED BY THIS
METHOD**(71) Applicant: **TOVARISTVO Z OBMEZHENOU
VIDPOVIDALNISTU
"NANOMEDTRAST", Kyiv (UA)**(72) Inventors: **Ganna S. GRYGOR'IEVA, Kyiv
(UA); Oleksii H. KATSAI, Kharkiv
(UA); Yurii M. KRASNOPOLSKYI,
Kharkiv (UA); Vitalii V.
PROKHOROV, Kharkiv (UA);
Oleksandr S. KHROMOV, Kyiv
(UA); Nataliya V.
PASYECHNIKOVA, Kyiv (UA);
Natalia V. DOBRELIA, Kyiv (UA)**(21) Appl. No.: **15/793,184**(22) Filed: **Oct. 25, 2017**(30) **Foreign Application Priority Data**

Oct. 27, 2016 (UA) A201610776

Publication Classification(51) **Int. Cl.**
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 38/41 (2006.01)
A61K 47/54 (2006.01)(52) **U.S. Cl.**
CPC **A61K 9/127** (2013.01); **A61K 47/544**
(2017.08); **A61K 38/415** (2013.01)(57) **ABSTRACT**

This invention relates to pharmaceuticals and a method of producing of liposomal composition containing cytochrome c and the pharmacologically active liposomal composition obtained by this method, which can be used as a means of

polyfunctional pharmacotherapy, especially for ophthalmology, hematology and cardiology.

A method of producing of liposomal composition containing cytochrome c, the method includes preparing mixture of solutions of lipids in an organic solvents, drying in vacuum the mixture and emulsifying it in aqueous medium containing cytochrome c, adding of cryoprotectant, homogenization of the emulsion, filtration and freeze-drying, and according to the invention the lipids are egg or soybean phosphatidylcholine with one or two of lipids from the group consisting of dipalmitoylphosphatidylglycerol, dipalmitoylphosphatidylcholine, distearoylphosphatidylcholine, diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol or dioleoyloxypropyl trimethylammonium, whereas the ratio of phosphatidylcholine to other lipids is 0.3-2.0:1, thereby to prepare the mixture of solutions of lipids, phosphatidylcholine is dissolved in ethyl alcohol, and other lipids—in chloroform and a volume ratio in a mixture of solutions of ethyl alcohol:chloroform is 1:1.5-2.5, emulsification is performed at a weight ratio of cytochrome c to lipids of 1:11.4-18.5 adding a cryoprotectant solution to the aqueous medium, and the cryoprotectant is selected from lactose, trehalose, sucrose oligosaccharides, wherein the said solution contains 60-80% of total cryoprotectant, and homogenization with step-by-step increasing pressure from 300 to 800 atm, after its completion a solution of selected cryoprotectant is added to emulsion, wherein solution contains 40-20% of total cryoprotectant, and the weight ratio of lipids mixture to cryoprotectant is 1:5.5-7.2.

It is claimed a liposomal composition containing cytochrome c, lipids and cryoprotectant, which is performed according to the method above, and the composition includes egg or soybean phosphatidylcholine in mixture with one or two of lipids from the group consisting of dipalmitoylphosphatidylglycerol, dipalmitoylphosphatidylcholine, distearoylphosphatidylcholine, diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol or dioleoyloxypropyl trimethylammonium, and cryoprotectant is selected from lactose, trehalose, sucrose oligosaccharides, wherein the weight ratio of cytochrome c:phosphatidylcholine:other lipids:cryoprotectant is 1:2.9-8.6:4.3-15.7:78.6-102.8 and percentage content ratio is (0.81-1.06):(3.03-8.26):(4.13-9.88):(78.67-83.30)% respectively.

Додаток Г

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **022183**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2015.11.30

(21) Номер заявки
201201592

(22) Дата подачи заявки
2012.12.24

(51) Int. Cl. **A61K 9/127** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/44 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЦИТОХРОМА С**

(43) **2014.06.30**

(96) **2012000269 (RU) 2012.12.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВ" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Шоболов Дмитрий Львович (RU),
Краснопольский Юрий Михайлович
(UA), Ульянов Андрей Михайлович,
Натыкан Алексей Андреевич, Тарасов
Вадим Владимирович, Балабаньян
Вадим Юрьевич, Швец Виталий
Иванович (RU), Кацай Алексей
Григорьевич (UA)**

(74) Представитель:
Ермакова Е.А. (RU)

(56) **US-A1-20040156888**

**ZHANG J. и др. Freeze-dried liposomes
as potential carriers for ocular administration of
cytochrome c against selenite cataract formation,
J. Pharm Pharmacol, 2009, September, 61
(9): 1171-1178 (реферат) [он-лайн] [найден
01.07.2013]. Найден в PubMed, PMID: 19703366
US-A-5817334
WO-A1-2011019410**

(57) Изобретение относится к фармацевтике и касается способа получения липосомального средства с фармакологическим действием, которое содержит в составе физиологически активное вещество - Цитохром С. Способ предусматривает высушивание смеси липидов, ее эмульгирование в водной среде, содержащей Цитохром С, гомогенизацию, добавление в процессе гомогенизации криопротектора при перемешивании до полного растворения и стерилизующую фильтрацию. Результатом является стандартность и стабильность полученного препарата содержащих Цитохром С липосом (размер липосом представлен в узком диапазоне), высокая инкапсуляция Цитохрома С в липосомы (не менее 90%), стабильность липосом в процессе хранения.

022183 B1

022183 B1

Додаток Д

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Національного медичного
університету імені О. О. Богомольця,
д. мед. н., проф. Земсков С.В.



2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для лікування офтальмологічних захворювань.

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. Виконавці: асп. О.Г. Кацай, д. фарм. н., проф. О.А. Рубан.

3. **Джерела інформації:**

3.1 Katsai, O., Ruban, O. (2019). Preparation and characterization of liposomal delivery system of natural heme protein. International Journal of Applied Pharmaceutics, 11(4), 418-425. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i4.32080>

3.2 Oleksii G. Katsai, Olena A. Ruban, Yuriy M. Krasnopol'skyi. (2018) «Quality-by-Design» approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C. Pharmakeftiki, 30 (2), 76-87.

3.3 Katsai, O.G., Ruban, O.A., Krasnopol'skyi, Y.M. (2017). Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 72(12), 736-740. DOI: 10.1691/ph.2017.7072

3. **Ким і коли впроваджено:**

Кафедра аптечної та промислової технології ліків; з жовтня 2019 р.

4. **Впроваджено:**

У навчальний процес кафедри аптечної та промислової технології ліків Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (лекційний курс, курсові роботи) при вивченні теми з промислової технології лікарських засобів: «Очні лікарські засоби» згідно протоколу № 5 засідання кафедри від «21» жовтня 2019 р. Термін впровадження: 2019 рік.

5. **Ефективність впровадження:**

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено у навчальний процес кафедри.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедри аптечної
та промислової технології ліків, д. фарм. н.

Ж. М. Полова



ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
Національний технічний університет
«Харківський політехнічний університет»
 д.т.н., проф., Марченко А.П.
 «22» 10 2019 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для лікування офтальмологічних захворювань.

(назва пропозиції для впровадження)

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. Виконавці: асп. О.Г. Кацай, д. фарм. н., проф. О.А. Рубан.

3. **Джерела інформації:**

3.1 Katsai, O.G., Ruban, O.A., Krasnopol'skyi, Y.M. (2017). Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 72(12), 736-740. DOI: 10.1691/ph.2017.7072

3.2 Katsai, O., Ruban, O., Krasnopol'skyi, Y. (2017). Влияние состава липосом на степень инкапсуляции и размер частиц при создании липосомальной формы цитохрома С. ScienceRise. Pharmaceutical Science, (4 (8)), 32-36. DOI: 10.15587/2519-4852.2017.109003

3.3 Oleksii G. Katsai, Olena A. Ruban, Yuriy M. Krasnopol'skyi. (2018) «Quality-by-Design» approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C. Pharmakeftiki, 30 (2), 76-87.

3. **Ким і коли впроваджено:**

Кафедра біотехнології, біофізики та аналітичної хімії Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут»; з жовтня 2019р.

4. **Впроваджено:**

У навчальний процес кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут» (лекційний курс, курсові роботи) по дисциплінам «фармацевтична біотехнологія» та «біотехнологія фармособстанцій та біопрепаратів» результати досліджень використані у матеріалах лекцій, практичних занять та лабораторних робіт згідно протоколу № 3 засідання кафедри від «21» 10 2019 р. Термін впровадження: 2019 рік.

5. **Ефективність впровадження:**

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено у навчальний процес кафедри.

Відповідальна за впровадження

Зав. кафедри біотехнології,
 біофізики та аналітичної хімії
 НТУ «ХПІ»

Огурцов

д.ф.-м.н., проф. О.М. Огурцов

Кр



ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з науково-педагогічної роботи
Харківського національного
фармацевтичного університету
д.б.н., проф. Загайко А.Л
«___» _____ 2019 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для лікування офтальмологічних захворювань.

(назва пропозиції для впровадження)

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. Виконавці: асп. О.Г. Кацай, д. фарм. н., проф. О.А. Рубан.

3. **Джерела інформації:**

3.1 Katsai, O., Ruban, O. (2019). Preparation and characterization of liposomal delivery system of natural heme protein. International Journal of Applied Pharmaceutics, 11(4), 418-425. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i4.32080>

3.2 Oleksii G. Katsai, Olena A. Ruban, Yuriy M. Krasnopol'skyi. (2018) «Quality-by-Design» approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C. Pharmakeftiki, 30 (2), 76-87.

3.3 Katsai, O.G., Ruban, O.A., Krasnopol'skyi, Y.M. (2017). Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 72(12), 736-740. DOI: 10.1691/ph.2017.7072

3. **Ким і коли впроваджено:**

Кафедра технології ліків харківського Національного Фармацевтичного Університету; з Вересня 2019 р.

4. **Впроваджено:**

У навчальний процес кафедри технології ліків Національного Фармацевтичного Університету (лекційний курс, курсові роботи) при вивченні теми з промислової технології лікарських засобів: «Очні лікарські засоби» згідно протоколу № 3 засідання кафедри від «6» 09 2019 р. Термін впровадження: 2019 рік.

5. **Ефективність впровадження:**

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено у навчальний процес кафедри.

Відповідальна за впровадження

к.ф.н., доц. Буряк М.В.

Зав. кафедри технології ліків
Національного Фармацевтичного
Університету

д.ф.н., проф. Ярних Т.Г.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Запорізького державного медичного
університету,

д.м.н., професор. Візір В.А.
201__ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Назва пропозиції для впровадження: Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для лікування офтальмологічних захворювань.

(назва пропозиції для впровадження)

Ким запропоновано, адреса, виконавці:

Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

Автори: Кацай О.Г., проф. Рубан О.А.

(установа-розробник, адреса, П.І.Б. авторів)

Джерела інформації:

1. Katsai O., Ruban O. Preparation and characterization of liposomal delivery system of natural heme pronein. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. Vol. 11 (4). P. 418–425.
2. Katsai Oleksii G., Ruban Olena A., Krasnopol'skyi Yuriy M. «Quality-by-Design» approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C. *Pharmakeftiki*. 2018. Vol. 30 (2). P. 76–87.
3. Katsai O. G., Ruban O. A., Krasnopol'skyi Y. M. Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 72 (12). P. 736–740.

(назва, рік видання, вихідні дані тощо)

Впроваджено: У навчальний процес кафедри технології ліків згідно протоколу № 10 засідання кафедри від « 15 » жовтня 2019 р.

Термін впровадження: 2019 рік

Ефективність впровадження: Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено у навчальний процес кафедри.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри технології ліків,
доктор фармацевтичних наук, професор

В.В.Гладишев



ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної роботи
Вищого державного навчального закладу
України "Буковинський державний
медичний університет",

доцент І.В. Геруш

« » 2019 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для лікування офтальмологічних захворювань.

(назва пропозиції для впровадження)

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. Виконавці: асп. О.Г. Кацай, д. фарм. н., проф. О.А. Рубан.

3. **Джерела інформації:**

3.1. Katsai, O.G., Ruban, O.A., Krasnopol'skyi, Y.M. (2017). Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 72(12), 736-740. DOI: 10.1691/ph.2017.7072

3.2. Oleksii G. Katsai, Olena A. Ruban, Yuriy M. Krasnopol'skyi. (2018) «Quality-by-Design» approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C. Pharmakeftiki, 30 (2), 76-87.

3.3 Katsai, O., Ruban, O. (2019). Preparation and characterization of liposomal delivery system of natural heme protein. International Journal of Applied Pharmaceutics, 11(4), 418-425. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i4.32080>

3. **Ким і коли впроваджено:**

Кафедра фармації Вищого державного навчального закладу України "Буковинський державний медичний університет" (БДМУ), 2019-2020 н. р.

4. **Впроваджено:**

У навчальний процес кафедри фармації Вищого державного навчального закладу України "Буковинський державний медичний університет" (лекційний курс, практичні заняття) при вивченні теми з технології ліків (модуль 3. Заводська технологія ліків. Виробництво екстракційних препаратів та препаратів для парентерального застосування, офтальмології і оториноларингології): «Промислове виробництво очних, вушних та назальних лікарських форм» згідно протоколу № 1 засідання кафедри від «30» 08 2019 р.

Ефективність впровадження:

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено у навчальний процес кафедри фармації БДМУ.

Відповідальна за впровадження

Завідувач кафедри фармації,
ВДНЗ України "Буковинський державний
медичний університет"
к.фарм.н, доцент

О.В. Геруш

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Перший проректор
 з науково-педагогічної роботи
 Львівського національного
 медичного університету
 імені Данила Галицького
 чл.кор. НАМН України



" " "

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження:

Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для лікування офтальмологічних захворювань.

2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:

Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
 Виконавці: асп. О.Г. Кацай, д. фарм. н., проф. О.А. Рубан.

3. Джерела інформації:

3.1. Katsai, O.G., Ruban, O.A., Krasnopol'skyi, Y.M. (2017). Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 72(12), 736-740. DOI: 10.1691/ph.2017.7072

3.2. Oleksii G. Katsai, Olena A. Ruban, Yuriy M. Krasnopol'skyi. (2018) «Quality-by-Design» approach to the development of a dosage form for the liposomal delivery system of cytochrome C. Pharmakeftiki, 30 (2), 76-87.

3.3 Katsai, O., Ruban, O. (2019). Preparation and characterization of liposomal delivery system of natural heme protein. International Journal of Applied Pharmaceutics, 11(4), 418-425. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i4.32080>

4. Ким і коли впроваджено:

Кафедра технології ліків і біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; з 12.02. 2019 р.

5. Форма впровадження:

У навчальний процес кафедри технології ліків і біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького при вивченні теми з промислової технології лікарських засобів «Очні лікарські засоби».

6. Ефективність впровадження:

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено у навчальний процес кафедри.

Відповідальні за впровадження:

Доцент кафедри технології ліків і біофармації
 Львівського національного медичного
 університету імені Данила Галицького

К.Ф.Ващенко

Зав.кафедри технології ліків і біофармації
 Львівського національного медичного
 університету імені Данила Галицького, доцент

С.Б.Білоус



ЗАТВЕРДЖУЮ:

Генеральний директор ТОВ «Наномедтех»

к.т.н. Парнета І.М.

«20» 07 2017 р.

АКТ

апробації технології одержання ліпосомальної форми цитохрому С.

Цей акт складено в тому, що на ТОВ «Наномедтех» у період з 1 червня по 20 липня 2017 р. проведена робота по апробації промислової технології виробництва препарату ліпосомальної форми цитохрому С по проектам регламенту виробництва та МКЯ. Було напрацьовано три серії.

В результаті апробації встановлено повну відтворюваність технології одержання ліпосомального препарату у виробничих умовах, а виготовлені зразки препарату відповідають вимогам розробленого проекту методів контролю якості на даний препарат.

Завідувач лабораторії
ліпосомальних препаратів

Хомутський С.В.

Хімік-аналітик

Гоч Н.В.

Аспірант кафедри «заводської
технології ліків» НФаУ

Кацай О.Г.