

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

**ШАХМАЄВ АНТОН ЄВГЕНОВИЧ**

УДК 615.014.23:615.456.3:615.22:57.086.132

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ ЛПОСОМАЛЬНОЇ ІН'ЄКЦІЙНОЇ  
ФОРМИ УБІДЕКАРЕНОНУ, ЩО МАЄ КАРДІОПРОТЕКТОРНУ ДІЮ**

15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи  
та судова фармація

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

Харків – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі біотехнології, біофізики та аналітичної хімії Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут»

Науковий керівник:

доктор фармацевтичних наук, професор  
**КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ ЮРІЙ  
МИХАЙЛОВИЧ,**  
Національний технічний університет  
«Харківський політехнічний інститут»,  
професор кафедри біотехнології, біофізики  
та аналітичної хімії.

Офіційні опоненти:

доктор фармацевтичних наук  
**БОРЩЕВСЬКИЙ ГЕННАДІЙ ІЛЛІЧ,**  
ПАТ «Фармак, м. Київ,  
начальник лабораторії розробки технології  
фармацевтичних препаратів департаменту  
біотехнології;

доктор фармацевтичних наук, професор  
**АЛМАКАЄВА ЛЮДМИЛА  
ГРИГОРІВНА,**  
Національний фармацевтичний університет,  
м. Харків,  
завідувач науково-дослідної лабораторії  
парентеральних та оральних рідких  
лікарських засобів.

Захист відбудеться «24» листопада 2017 р. о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.02 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

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

Автореферат розісланий «\_\_» жовтня 2017 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
доктор фармацевтичних наук, професор

О.В. Посилкіна

## **ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Хвороби системи кровообігу, зокрема і серцево-судинні, посідаючи перше місце за поширеністю, спричиняють більше половини усіх випадків смерті та складають третину причин інвалідності. Вони суттєво впливають на тривалість та якість життя людини і на показники смертності. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), серед основних причин смерті населення шосту та сьому позиції займають відповідно ішемічна хвороба серця (ІХС) та цереброваскулярні хвороби. Боротьба із хворобами системи кровообігу на сучасному етапі є найважливішою проблемою.

При лікуванні серцево-судинних захворювань актуальним є застосування гідрофобних антиоксидантів, таких, як кверцетин, вітамін Е, убідекаренон (УК) тощо, для нормалізації процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та відновлення структури біологічних мембран клітин, оскільки вони відіграють головну роль у захисті основних структурних компонентів біомембран, а саме фосфоліпідів (ФЛ) та білків, що занурені у ліпідний бішар.

Відомо, що серед цілої низки антиоксидантів УК перевершує усі інші природні антиоксиданти і тому вважається найбільш перспективним для застосування у клінічній практиці. Крім того, відомо, що УК є коферментом, який синтезується в організмі людини, проте з віком його концентрація істотно знижується, що призводить до зростання ризику розвитку серцево-судинних захворювань.

Дефіцит УК в організмі можна мінімізувати, приймаючи різні препарати на його основі. Добре відомо використання УК в медичній практиці у вигляді порошків, таблеток та капсул, при цьому він впливає на ранозагоювальні, ангіопротекторні та антиоксидантні ефекти. Однак разом з тим УК застосовують рідко у значних кількостях, оскільки його біодоступність вкрай низька. У зв'язку з цим застосування УК у медичній практиці обмежено, що насамперед пов'язано з його гідрофобними властивостями. Водорозчинний УК становить безперечний інтерес для кардіології (нестабільна та стабільна стенокардія, міокардит, інфаркт міокарда (ІМ)). Збільшити біодоступність УК можна, створивши його водорозчинну ін'єкційну форму. Цього можна досягнути шляхом включення УК до наночастинок, наприклад, до ліпосоми (ЛС).

На нашу думку, включення УК до ЛС наноконтейнерів, у мембрані яких буде міститися його гідрофобна субстанція, є досить перспективним, оскільки дозволить створити водорозчинну форму УК, збільшивши тим самим його біодоступність.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут» («Дослідження фізико-хімічних властивостей наночастинок (штучних мембран – ліпосом), що містять антиоксидантні сполуки» № держреєстрації 0110U001667) та проблемної комісії «Фармація» МОЗ і НАМН України (протокол № 95 від 17.02.2016 р.).

**Мета та завдання дослідження.** Метою дисертаційного дослідження є розробка технології одержання ЛС ін'єкційної форми УК, що має кардіопротекторну дію.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- провести аналіз літератури щодо гідрофобних антиоксидантів, зокрема УК, при лікуванні серцево-судинних захворювань, а також систематизувати та узагальнити можливість використання для лікування ЛС форм препаратів, до складу яких входять гідрофобні антиоксиданти;

- провести маркетингові дослідження фармацевтичного ринку України з питання забезпечення лікарськими препаратами, що містять УК;

- на основі комплексу фізико-хімічних та біофармацевтичних досліджень обґрунтувати склад діючих та допоміжних речовин у складі ін'єкційного продукту;

- на основі фізико-хімічних та фармакотехнологічних досліджень провести вибір концентрації діючих речовин з метою створення ефективного ЛС лікарського препарату УК;

- розробити оптимальну промислову технологію ЛС лікарського препарату;

- провести біофармацевтичні, фармакологічні та фізико-хімічні дослідження розробленого препарату, визначити основні показники якості, апробувати методики якісного та кількісного аналізу компонентів, розробити проект МКЯ;

- визначити специфічну активність та біологічну нешкідливість лікарського препарату;

- дослідити вплив умов зберігання на стабільність розробленого препарату;

- розробити та апробувати у промислових умовах нормативно-технічну документацію на запропонований препарат.

*Об'єкт дослідження* – природні та синтетичні ФЛ, УК, допоміжні речовини, кріопротектори, ЛС форма УК.

*Предмет дослідження* – розробка науково обґрунтованого складу і технології ЛС форми УК; визначення оптимальної концентрації діючої та допоміжних речовин, дослідження фізико-хімічних і фармакологічних властивостей; розробка проекту технологічного регламенту виробництва та проекту МКЯ.

**Методи дослідження.** Для вирішення поставлених завдань були використані загальноприйняті фізико-хімічні (потенціометричне визначення рН, спектрофотометрія, визначення розміру наночастинок тощо), хроматографічні (тонкошарова хроматографія, високоефективна хроматографія, газова хроматографія), фармакотехнологічні, математичні (методи математичної статистики), фармакологічні та біологічні (обґрунтування концентрації УК та ліпідів, вивчення специфічної активності при ІМ та ІХС) методи, які дозволяють об'єктивно оцінити якісні показники розробленої ЛС форми УК.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Уперше на основі фармако-технологічних, фізико-хімічних, фармакологічних та мікробіологічних досліджень теоретично та експериментально був обґрунтований склад і технологія оригінальної лікарської ЛС форми УК для лікування кардіологічних захворювань.

На основі теоретичного обґрунтування та експериментальних досліджень був підібраний якісний і кількісний склад діючої та допоміжних речовин.

Уперше експериментально була обґрунтована доцільність введення до ЛС препарату, що містить гідрофобну речовину – УК, негативно зарядженого ФЛ, який дозволяє підвищити включення УК до мембрани ЛС.

Були встановлені фармакологічна активність розробленого препарату на моделі ІМ та ІХС й оптимальні умови і термін зберігання запропонованого ЛС препарату, які забезпечують його стабільність протягом 2 років.

Розроблено сучасні методики ідентифікації та кількісного визначення УК для створення проекту МКЯ. За результатами досліджень отримано 2 патенти України на корисну модель № 85306 та № 91702.

**Практичне значення отриманих результатів.** На підставі проведених досліджень було розроблено та запропоновано для практичної медицини оригінальний ЛС препарат, що містить УК, зокрема для кардіології при лікуванні ІХС та ІМ.

Розроблено проект технологічного регламенту для виробництва ЛС форми УК, а також проект МКЯ, що містить опис методик контролю якості вказаного препарату. Визначено критичні параметри технологічного процесу та здійснено його апаратне оформлення, що відображено у відповідному технологічному регламенті.

Технологію виробництва та методики контролю якості лікарського препарату апробовано в умовах промислового виробництва ТОВ «Наномедтех» (акт впровадження від 18.01.2016 р.), а також ПАО «Фармак» (акт впровадження від 16.03.2016 р.).

Фрагменти роботи впроваджено у науково-педагогічний процес: кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії «Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут» (акт впровадження від 04.05.2016 р.); кафедри органічного синтезу і нанотехнологій Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут» (акт впровадження від 18.11.2016 р.); кафедри онкології та дитячої онкології Харківської медичної академії післядипломної освіти (акт впровадження від 14.03.2017 р.); у виробничий процес підприємства «Фармсинтез» при розробці ліпосомальних лікарських препаратів ін'єкційної форми та очних крапель (акт впровадження від 26.12.2016 р.); у науково-дослідний процес ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» при розробці та апробації методів контролю якості ін'єкційної форми ліпосомальних лікарських препаратів (акт впровадження від 10.01.2017 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійно завершеною науковою роботою. Здобувачем особисто проведено аналіз та узагальнення літературних даних з досліджуваної проблеми. Проведено експериментальні дослідження з вибору типу основного мембраноутворювального ФЛ для конструювання ЛС, визначено метод включення УК до ЛС, залежність включення УК від структури використовуваних ФЛ та умов технології, а також проведено фармакологічні дослідження на моделях ІХС та ІМ на експериментальних тваринах – щурах. За допомогою фізико-хімічних та біологічних методів експериментально було обґрунтовано та розроблено склад ЛС форми УК під умовною назвою «Ліпосомальна форма убідекаренону, ліофілізат для ін'єкцій у флаконах». Результати було проаналізовано, систематизовано та статистично оброблено. Дисертантом розроблено методи ідентифікації та кількісного визначення речовин, що входять до складу ЛС форми УК. Усі наукові узагальнення, положення, результати, висновки та рекомендації, що викладено в дисертації, отримано автором самостійно.

Розроблено проект МКЯ та проект технологічного промислового регламенту на виробництво ЛС форми УК. Наукові роботи опубліковано у співавторстві з Ю. М. Краснопольським, Т. В. Горбач, І. В. Волчик, В. І. Швецем, А. Л. Кацаєм, В. В. Прохоровим, А. В. Стадніченком, В. Ю. Балабаньяном. Особистий внесок автора в

опублікованих зі співавторами працях полягає у плануванні та проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні одержаних результатів і підготовці матеріалів до друку.

Співавторами наукових праць дисертанта захищені такі дисертації: В. І. Швець «Дослідження в області складноестерних гліцеринфосфатидів і глікозилдигліцеридів», Москва, 1973; Т. В. Горбач «Динаміка стану регуляторних систем (моноамінів, простагландинів, циклічних нуклеотидів) та енергозабезпеченості головного мозку та серця щурів», Харків, 1990; І. В. Волчик «Застосування методів *in vitro* на етапах доклінічного вивчення лікарських засобів», Харків, 2006; А. В. Стадніченко «Стандартизація методик якості та розробка технології ліпосомальних форм антрациклінових антибіотиків», Харків, 2009; В. Ю. Балабаньян «Фармакологічні та фармацевтичні аспекти створення нанорозмірних форм факторів росту нервової тканини, феназепаму та паклітакселу», Москва, 2015.

Постановка мети та завдань, обговорення результатів проведені разом із науковим керівником.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи викладені та обговорені на: XX Міжнародній науково-практичній конференції «Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я» (Харків, 2012); XI Всеросійській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Отечественные противоопухолевые препараты (экспериментальная онкология)» (Нижній Новгород, 2012); Міжнародній дослідницькій та практичній конференції «Nanotechnology and nanomaterials» (Буковель, 2013), I Міжнародній науково-практичній конференції «Хімія, біо- та нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості» (Шолкіно, 2013); II Міжнародній науково-практичній конференції «Хімія, біо- та нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості» (Харків, 2014).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць, зокрема: 7 статей у фахових виданнях, з них 2 статті у закордонних виданнях, які входять до міжнародних наукометричних баз; 5 тез доповідей; отримано 2 патенти України на корисну модель (№ 91702, № 85306).

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 225 сторінках друкованого тексту, основний зміст роботи – на 172 сторінках, складається зі вступу, п'яти розділів, загальних висновків, списку використаних літературних джерел та додатків. Робота ілюстрована 34 таблицями та 27 рисунками. Список використаної літератури містить 169 джерел, з них 99 кирилицею і 70 латиницею.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі наведено актуальність теми, мету, основні завдання дослідження, наукову новизну, практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача та апробацію результатів дисертації.

У першому розділі «**Сучасний стан виробництва ліпосомальних препаратів, що містять гідрофобні антиоксиданти та препарати убідекаренону**» (огляд літератури) наведено характеристику УК як антиоксиданту. Проаналізовано лікування УК серцево-судинних захворювань та показано, що ця сполука є ефективною при лікуванні хронічної серцевої недостатності, гострої та хронічної

ІХС. Проведено маркетингові дослідження фармацевтичного ринку України з питання забезпечення лікарськими препаратами, що містять УК, та показано, що на фармацевтичному ринку домінують імпортовані препарати, причому представлені вони в основному твердою формою (таблетки, капсули). Терапевтичний ефект УК виявляється при його пероральному прийомі протягом тривалого часу в значних кількостях, що пов'язано насамперед з його низькою біодоступністю. Обґрунтовано доцільність розробки ЛС ін'єкційної форми вітчизняного лікарського засобу на основі УК, що має кардіопротекторну дію. Наведено характеристику лікарських засобів на основі ЛС наночастинок, що містять гідрофобні антиоксиданти, їх основну фармакологічну дію та форму випуску. Розглянуто технологічні аспекти одержання ЛС препаратів.

У другому розділі «Обґрунтування загальної концепції та методів досліджень» наведено характеристику діючих і допоміжних речовин, описано загальну методологію проведення досліджень. Визначено методи досліджень для створення ін'єкційного ЛС препарату, а також методики ідентифікації та кількісного визначення діючих і допоміжних речовин.

У третьому розділі «Обґрунтування складу ліпосомальної форми убідекаренону» наведено результати досліджень з вибору типу основного мембраноутворювального ліпіда для створення ЛС, буферного розчину для технології одержання ЛС та включення лікарської субстанції УК до ЛС, крім того, наведено жирнокислотний склад природних ФЛ, що використовувалися у роботі.

Для вивчення впливу типу фосфатидилхоліну (ФХ) на властивості ЛС було розроблено модельні ЛС, до складу яких вводили природні та синтетичні ФХ, що найбільш часто використовують при розробці та виробництві ЛС препаратів. Було складено модельні основи, що містять різні типи ФЛ, які були використані нами при одержанні ЛС зразків. Основним етапом, що ушкоджує структуру ліпідів, є процес гомогенізації при високому тиску, що супроводжується підвищенням температури, аерацією водної емульсії ліпіда, використанням тиску до  $1,2 \cdot 10^8$  Па. Вивчено вплив указаних факторів на фізико-хімічні та біологічні властивості ФЛ. У роботі використовували ФХ у концентрації від 10 до 30 мг/мл. Свідомо використовувалися екстремальні умови гомогенізації ліпідних емульсій: температура гомогенізації від 40 до 50 °С підтримувалася протягом 10 циклів при  $1,2 \cdot 10^8$  Па (табл. 1).

Дані, наведені в табл. 1, дозволяють використовувати у подальшій роботі вказані ліпіди за винятком ФХ-нів, що виділені з насіння сої та соняшнику.

Таблиця 1

### Вивчення впливу гомогенізації на властивості ФЛ

Тип ФЛ	Концентрація ФЛ в емульсії, мг/мл	Індекс окисненості, початковий/після обробки	Стабільність емульсії ЛС у рідкому вигляді	Гемолітична активність емульсії in vitro, початкова/ після обробки
1	2	3	4	5
ФХя	10-30	0,19/0,25	2 години	Відсутня
ФХс	10-30	0,35/0,48	2 години	+

1	2	3	4	5
ФХсоняшнику	10-30	0,5/0,68	Нестабільна	++
ДПФХ	10-30	0,15/0,17	2 години	Відсутня
ДМФХ	10-30	0,12/0,14	2 години	Відсутня
ФХя+ДМФХ (1:1)	10-30	0,16/0,19	2 години	Відсутня
ФХя+ДПФХ (1:1)	10-30	0,18/0,2	2 години	Відсутня
ДПФХ+ДМФХ (1:1)	10-30	0,14/0,14	2 години	Відсутня

Примітка: ++ – 25 % гемоліз; +- початкова стадія гемолізу.

При їх вивченні виявлено прояв гемолітичних властивостей, причому гемолітичну активність мали зразки як після гомогенізації, так і емульсії, одержані без гомогенізації з вихідного ФХ сої та соняшнику. Можливо, це пов'язано з високим вмістом лізоформ – до 8,7%. Крім того, рослинні ФХ мають високий індекс окисненості (І.О.), що свідчить про окиснення жирних кислот ФЛ. Враховуючи складність стерилізуючої фільтрації одержаних емульсій із концентрацією ФЛ 20 та 30 мг/мл крізь фільтрувальний матеріал з розміром пор 0,22 мкм, обрали концентрацію ФЛ 10 мг/мл, яка характеризувалася кращою швидкістю фільтрації та низькою сорбцією на фільтрі.

У наступній групі експериментів вивчено включення УК до ЛС емульсії з ФХ-нів. Для одержання ЛС використовували встановлене співвідношення ФЛ : УК 9 : 1 (табл. 2).

Таблиця 2

### Залежність включення УК від структури ФХ, що використовували в роботі

Тип ФЛ	Включення УК до ЛС, %	І.О.	Стабільність емульсії ЛС у рідкому вигляді	Гемолітична активність емульсії in vitro після обробки
ФХя	64,0±3,6	0,225±0,015	2 години	Відсутня
ДПФХ	67,4±6,8	0,185±0,013	1,5 години	Відсутня
ДМФХ	65,7±5,7	0,17±0,02	1 година	Відсутня
ФХя+ДМФХ (1:1)	63,5±5,2	0,252±0,018	2 години	Відсутня
ФХя+ДПФХ (1:1)	67,2±6,0	0,260±0,02	2 години	Відсутня
ДПФХ+ДМФХ (1:1)	66,0±7,1	0,153±0,017	1 година	Відсутня

Примітка. Наведено середні значення при n = 5.

Результати проведених досліджень показали, що синтетичні ФХ-ни



утворюють менш стабільні ЛС емульсії у порівнянні з ФХя, що може бути обумовлено більш високою температурою фазового переходу синтетичних ліпідів. Це, зі свого боку, припускає використання температури вище 50 °С, що вкрай небажано у технологічному процесі, оскільки призводить до нестабільності ФХя і зниження включення УК. Ступінь включення УК до ЛС різного складу при встановлених режимах практично однаковий. Величина І.О. збільшується до 0,22 (при вихідному 0,19), що дещо менше, ніж у раніше отриманих дослідах (табл. 1). Це може бути пов'язано з антиоксидантними властивостями УК. Враховуючи, що синтетичні ФХ дорожчі, ніж природні, а також те, що робота з ними потребує більш високих температур при розчиненні та гомогенізації, як мембраноутворювальний ліпід був обраний ФХя.

**Четвертий розділ «Розробка технології одержання ліпосомальної форми емульсії убідекаренону»** присвячено розробці технології одержання ЛС ін'єкційної форми УК та вибору критичних параметрів його виробництва.

Першим етапом технологічних досліджень у запропонованій схемі є одержання ліпідної плівки. Враховуючи, що УК практично не розчиняється у воді – його розчиняють в етанолі, проводять стерилізуючу фільтрацію та змішують зі стерильним етанольним розчином ФХя. У роботі використовували співвідношення УК : ФХя від 1:10 до 3:10. Одержували плівку ФХя з УК.

На наступному етапі одержану плівку ліпіда із субстанцією УК емульгували у водному розчині з метою одержання мультиламелярних везикул. Температура у процесі ресуспендування має бути вище температури фазового переходу ліпідів. При одержанні везикул вивчено вплив низки факторів: температури, величини рН, іонної сили розчинів (буферні суміші різної молярної концентрації або вода для ін'єкцій), концентрацію ліпідів та співвідношення ліпід : УК. Розмір везикул, що утворюються, визначається також інтенсивністю та часом перемішування. Для запобігання процесів окиснення ліпідів у складі ЛС одержану емульсію насичують азотом. Критерієм оцінки придатності технологічних параметрів було одержання гомогенної стабільної емульсії, яка не розшаровувалася протягом 2 годин.

Гомогенізацію проводили шляхом екструзії на устатковині «Microfluidics-110Y» при показниках тиску  $8,1 \cdot 10^7$ - $1,01 \cdot 10^8$  Па та при температурному режимі 38-43 °С (рис. 1). Критичними параметрами при гомогенізації є температура, тиск у гомогенізаторі, кількість проведених циклів. У результаті проведених досліджень отримали такі дані (наведено середній розмір ЛС після кожного циклу). При тиску  $8,1 \cdot 10^7$  Па: 1 цикл – 1000 нм; 2 цикл – 640 нм; 3 цикл – 350 нм; 4 цикл – 240 нм; 5 цикл – 150 нм; 6 цикл – 160 нм; 7 цикл – 180 нм. При тиску  $1,01 \cdot 10^8$  Па: 1 цикл – 960 нм; 2 цикл – 600 нм; 3 цикл – 310 нм; 4 цикл – 200 нм; 5 цикл – 120 нм; 6 цикл – 145 нм; 7 цикл – 180 нм.

Показано, що для досягнення розміру 150 нм необхідно провести 5 циклів гомогенізації при тиску  $8,1 \cdot 10^7$  Па. Причому подальше продовження процесу гомогенізації емульсії призводить не тільки до збільшення розміру наночастинок, а й до зниження включення УК (6 цикл).

І.О. одержаних ЛС за використовуваним способом не перевищує 0,30-0,33. Вихідний показник І.О. ФХя не більше ніж 0,23-0,25.

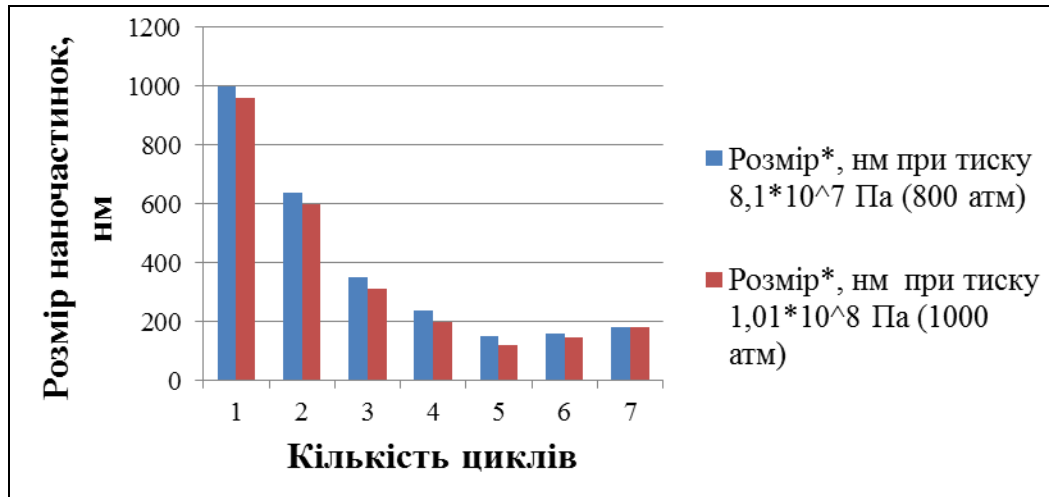


Рис. 1 Залежність розміру ЛС від тиску та кількості циклів (\* – наведено середній розмір ЛС)

Тобто наведені технологічні режими дозволяють одержувати ЛС стандартного складу, основна маса яких до ліофілізації представлена частинками з розміром 120-160 нм (80-90% усіх ЛС). Крім того, у складі ЛС кількість ЛФХ залишалася на рівні субстанції ФХя, що було встановлено методом ВЕРХ і ТШХ.

Встановлено, що ступінь включення УК у бішар ЛС складає від 48 до 65 %. Для підвищення включення УК у бішар ЛС нами запропоновано використати негативно заряджений ліпід дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (ДПФГ). Крім того, проведено дослідження з вивчення впливу розміру ЛС та їх заряду на ступінь включення субстанції. Встановлено, що на стабільність ЛС та включення у бішар УК впливає величина рН, температура проведення технологічного процесу, заряд та розмір ЛС (табл. 3). Самостійне значення має також стабільність самого лікарського засобу – УК, що включається до ЛС.

Таблиця 3

### Залежність фізико-хімічних властивостей ЛС, що містять УК, від умов одержання

Характеристика одержання ліпосом	УК : ФХ 1 : 10	УК : ФХ 2 : 10	УК : ФХ : ДПФГ 1 : 10 : 1	УК : ФХ : ДПФГ 1 : 10 : 2
1	2	3	4	5
Включення УК до ЛС (8,1•10 <sup>7</sup> Па, 5 циклів, 38-43 °С) мг/мл	0,65±0,025	0,64±0,03	0,86±0,041*	0,84±0,035*
Розмір ЛС з УК, (8,1•10 <sup>7</sup> Па, 5 циклів, 38-43 °С), нм*	150,5±32,5	164±38,3	128,7±39,8	122±25,5

1	2	3	4	5
Включення УК до ЛС ( $8,1 \cdot 10^7$ Па, 5 циклів, 45-48 °С) мг/мл	0,60±0,026	0,56±0,025	0,70±0,033	0,73±0,035
Розмір ЛС з УК ( $8,1 \cdot 10^7$ Па, 5 циклів, 45-48 °С), нм*	145,5±35,2	136,5±14,8	120,7±32,4	112±41,4
І.О. ( $8,1 \cdot 10^7$ Па, 5 циклів, 38-43 °С)	0,232±0,017	0,239±0,015	0,243±0,02	0,256±0,021
І.О. ( $8,1 \cdot 10^7$ Па, 5 циклів, 45-48 °С)	0,36±0,037**	0,351±0,026**	0,383±0,018**	0,392±0,034**

Примітка: \* –  $p < 0,05$  достовірність між вмістом включеного УК до ЛС, що містить ДПФГ, і ЛС без ДПФГ; \*\* –  $p < 0,05$  достовірність між І.О. при застосуванні температури 45-48 та 38-43 °С;  $n = 5$  (у всіх групах експерименту).

Встановлено, що включення у ліпідний бішар УК при використанні співвідношень УК : ФХ (1:10) та УК : ФХ (2:10) не відрізнялося, що свідчить про максимальну насиченість антиоксидантом мембрани ЛС. У результаті проведених експериментів нами виявлено, що включення ДПФГ до складу ЛС дозволяє збільшити включення УК до ЛС на 30%. Крім того, ДПФГ забезпечує збільшення швидкості фільтрації емульсії крізь пори мембран з розміром 0,22 мкм. Оптимальна кількість циклів, що дозволяє одержати ЛС у нанодіапазоні, становить не більше ніж 5. При цьому одержані наночастинки мають розмір до 180 нм (до ліофілізації), що дозволяє проводити попередню та стерилізуючу фільтрацію крізь низку мембран з фінішним фільтром 0,22 мкм. Також встановлено, що збільшення кількості циклів призводить до збільшення розмірів ЛС і зменшення кількості включеного у мембрану УК. Після проведення низки експериментів при різних температурних режимах визначена температура гомогенізації емульсії – 38-43 °С, при якій І.О. практично не відрізняється від І.О. вихідної суміші ліпідів. Підвищення температури до 45-48 °С призводить до підвищення І.О. ліпідів практично у два рази.

Після одержання наноемульсії УК та визначення основних параметрів екструзії проведено вивчення кількості основної речовини та домішок для кожного компонента зразка. УК контролювали методом ВЕРХ, ФЛ – методом ТШХ. Отримані дані наведені в табл. 4.

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що оптимальними умовами для одержання гомогенної стабільної емульсії є співвідношення УК : ФХ : ДПФГ 1 : 10 : 1 за температури 38-43 °С, рН емульсії 6,4-7,4. Емульсія, одержана при вказаних параметрах, була стабільна і не розшаровувалася протягом 2 – 2,5 годин. Методом ВЕРХ було встановлено, що на етапі одержання ліпідної плівки УК не пошкоджується, про що свідчить відсутність збільшення домішок.

Після обробки за температури 38-43 °С та рН емульсії 6,4-7,4 вміст домішок не перевищує їх кількості у специфікації на субстанцію (табл. 4).

Таблиця 4

### Характеристика компонентів ЛС УК при проведенні технологічного процесу

Стадії технології	Вміст компонентів при технологічному процесі				
	ФХ, %	ЛФХ, %	І.О.	ДПФГ, %	УК, мг/мл / домішки, %
Вихідні компоненти в етанолі	90,2	0,55	0,145	10,10	1,02 / 0,40
Після концентрування у вакуумі	89,75	0,55	0,150	9,90	0,96 / 0,41
Після гомогенізації: 5 циклів за $8,1 \cdot 10^7$ Па	90,3	0,60	0,195	9,90	1,0 / 0,43
Після гомогенізації: 7 циклів за $1,2 \cdot 10^8$ Па	89,8	0,65	0,210	9,70	0,96 / 0,45
Після ліофілізації: 5 циклів за $8,1 \cdot 10^7$ Па	90,34	0,60	0,203	9,89	1,0 / 0,43
Після ліофілізації: 7 циклів за $1,2 \cdot 10^8$ Па	89,1	0,65	0,205	9,85	1,01 / 0,48

Примітка. Вміст загальних домішок у субстанції УК – 0,40%; вміст ЛФХ у субстанції ФХя – 0,55 %.

Досліджено способи фільтрації та фільтрувальний матеріал. Після формування ЛС, що містять лікарський препарат, виникає необхідність розділення суміші, яка складається з «вільного» препарату та «навантажених» ЛС. Найчастіше використовуваний метод являє собою попередню фільтрацію крізь низку фільтрів з розміром пор 1,2, 0,8, 0,45 мкм та стерилізуючу фільтрацію крізь мембрану з розміром пор 0,22 мкм. Необхідно зазначити, що фільтрація дозволяє також проводити стандартизацію ЛС препаратів.

Для встановлення взаємного впливу ЛС емульсії УК і фільтрувальних матеріалів та попередження можливих змін фізико-хімічних властивостей ЛС емульсії нами проведено вивчення фільтрувальних матеріалів, які використовуються у виробництві парентеральних лікарських препаратів: фільтрувальні мембрани на основі целюлози, нейлону та поліетерсульфону. При виборі фільтрувального матеріалу враховувалася як його характеристика, так і властивості ЛС емульсії (рН, розмір частинок, концентрація компонентів та їх співвідношення). Використовували

мембрани на основі целюлози (Millipore, США), нейлону (Pall, Німеччина) та поліетерсульфону (Pall «Supor», Німеччина) з розміром пор 1,2, 0,8, 0,4, 0,22 мкм.

Встановлено, що після попередньої фільтрації крізь низку фільтрів з розміром пор 1,2, 0,8, 0,4 мкм та стерилізуючої фільтрації крізь мембрани з розміром пор 0,22 мкм не виявлено характеристик, пов'язаних із погіршенням якості зразків препарату. Досягнуто необхідний рівень очищення від механічних включень та стерильність емульсії. Однак при використанні фільтрів з поліетерсульфону мають місце менші втрати діючих речовин та велика швидкість фільтрації. Тому була уведена низка фільтрів для попередньої фільтрації (1,2, 0,8, 0,45 мкм) та стерилізуючої фільтрації – 0,22 мкм для відділення «вільного» УК та одержання стерильної емульсії ЛС.

Відомо, що лікарські ін'єкційні препарати можна виробляти як у рідкій формі, так і у формі ліофілізату. При ліофілізації ЛС препаратів кращі результати отримані при використанні сполук вуглеводної природи – цукрів як кріопротекторів. Вивчено вплив уведення цукрів у ліпідну емульсію на ступінь включення УК до ліпідної мембрани. Використано три кріопротектори: лактозу, трегалозу, цукрозу, які найбільш часто використовуються при ліофілізації наноструктур, зокрема ЛС. Основним критерієм вибору кріопротектора є збереження стабільності розміру ЛС при регідратації перед ін'єкційним уведенням. У результаті проведених досліджень ми відмовилися від використання цукрози як кріопротектора у зв'язку з нестабільністю ліпосом, що виявлялося у зменшенні кількості включеного УК у порівнянні з лактозою і трегалозою. Незважаючи на близькі результати включення УК у ліпосоми, одержані при використанні лактози і трегалози, ми відмовилися від подальшого застосування трегалози, оскільки трегалоза, на відміну від лактози, не описана у фармакопеях України та Європи.

Для визначення оптимальної концентрації лактози у препараті були проведені дослідження, в яких додавання розчину лактози до складу емульсії ЛС проводили між 3 та 4 циклами гомогенізації до кінцевої концентрації цукру 20, 40, 60 та 80 мг/мл (рис. 2).

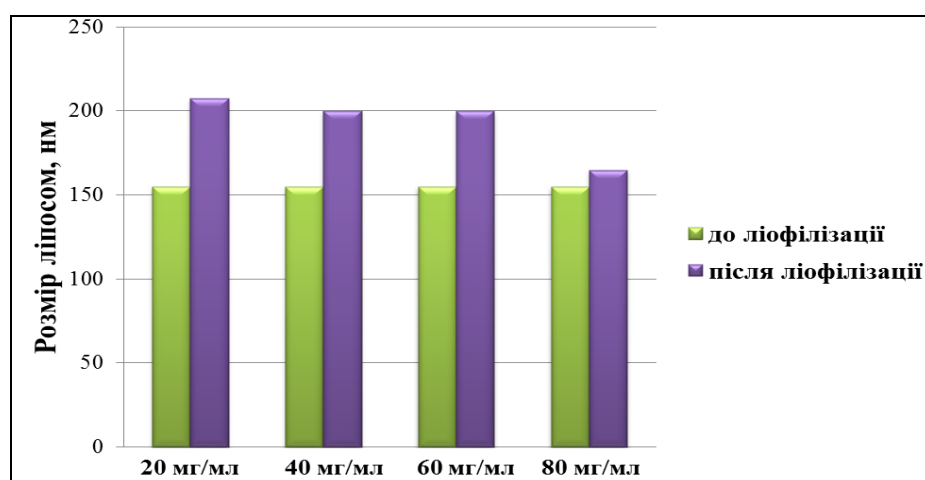


Рис. 2. Вплив концентрації лактози на розміри ЛС до та після ліофілізації

Встановлено, що використання різних концентрацій лактози приводить до одержання близьких за розміром ЛС (до ліофілізації). Тоді як, після проведення процесу ліофілізації препаратів збереження розмірів наночастинок у нанодіапазоні спостерігається тільки за кінцевої концентрації лактози 80 мг/мл.

Досліджено режими ліофілізації ЛС з УК. Для розробки режиму сублімаційного висушування спочатку було вивчено вплив швидкості та часу заморожування на якість препарату. Для цього препарат ЛС з УК заморожували, використовуючи способи швидкого та повільного заморожування. Результати наведені в табл. 5.

Таблиця 5

### Вплив способу заморожування на якість препарату

Режим заморожування	Об'єм наповнення, мл	Опис	pH	Розмір наночастинок, нм	Залишкова вологість, %	Розчинність
Швидкий (16,5 годин)	20	Суша маса світло-жовтого кольору з лимонним відтінком	6,75	Не більш ніж 200	4,1	Відповідає
Повільний (23 години)	20	Суша маса світло-жовтого кольору з лимонним відтінком	6,9	Не більш ніж 200	2,9	Відповідає

Встановлено, що спосіб заморожування не впливає на основні показники якості препарату. Тобто можна зробити висновок про можливість використання для ЛС препарату УК як швидкого, так і повільного способу заморожування. Для економії електроенергії та часу було вирішено використовувати у подальшій роботі швидке заморожування ЛС препарату УК.

З метою оптимізації технологічного процесу ліофілізації та одержання якісного ЛС препарату УК вивчали вплив швидкості і тривалості процесу ліофілізації та досушування. Ліофілізацію препарату проводили, використовуючи такі режими:

*Режим 1.* Полиці витримували за температури  $-(35-40)^{\circ}\text{C}$  та мінімального тиску в камері (4,0-6,0) Па протягом 6 год, далі їх нагрівали: до  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $5^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $-10^{\circ}\text{C}$  ( $4^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $0^{\circ}\text{C}$  ( $4^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $+10^{\circ}\text{C}$  ( $4^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $+20^{\circ}\text{C}$  ( $4^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $+30^{\circ}\text{C}$  ( $4^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ). При  $+30^{\circ}\text{C}$  (мінімальний тиск у камері 4,0 Па) витримували за цієї температури протягом 8 год. Ліофілізація тривала 35,5 год.

*Режим 2.* Полиці витримували за температури  $-(35-40)^{\circ}\text{C}$  та мінімального тиску в камері (4,0-6,0) Па протягом 8 год, далі їх нагрівали до  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $3^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $-10^{\circ}\text{C}$  ( $3^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $0^{\circ}\text{C}$  ( $3^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $+10^{\circ}\text{C}$  ( $3^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $+20^{\circ}\text{C}$  ( $3^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ), до  $+30^{\circ}\text{C}$  ( $3^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ). При  $+30^{\circ}\text{C}$  (мінімальний тиск у камері 4,0 Па) витримували за цієї температури протягом 10 год. Ліофілізація тривала 46,5 год.

*Режим 3.* Полиці витримували за температури  $-(35-40)^{\circ}\text{C}$  та мінімального тиску в камері (4,0-6,0) Па протягом 12 год, далі їх нагрівали до  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $3^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $-10^{\circ}\text{C}$  ( $2^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $0^{\circ}\text{C}$  ( $2^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $+10^{\circ}\text{C}$  ( $2^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $+20^{\circ}\text{C}$  ( $2^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $+30^{\circ}\text{C}$  ( $2^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ). При  $+30^{\circ}\text{C}$  (мінімальний тиск у камері 4,0 Па) витримували за цієї температури протягом 12 год. Ліофілізація тривала 61,5 год. Графік температури полиць та препарату відповідно до режиму № 3 наведено на рис. 3.

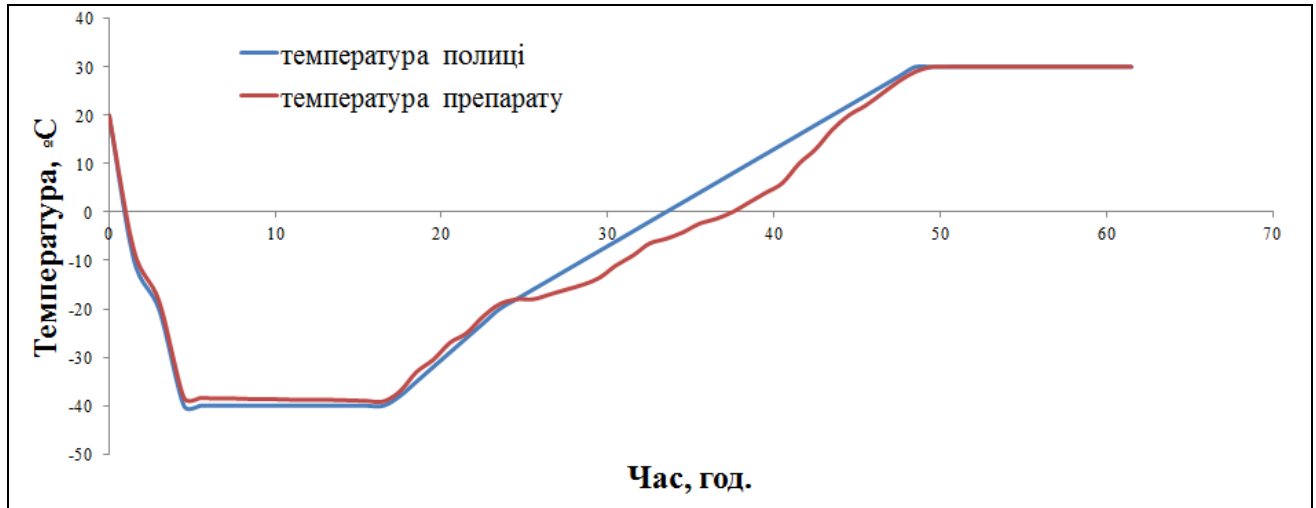


Рис. 3 Температура полиць та препарату при ліофілізації ЛС УК відповідно до режиму № 3.

*Режим 4.* Полиці витримували за температури  $-(35-40)^{\circ}\text{C}$  та мінімального тиску в камері (4,0-6,0) Па протягом 14 год, далі їх нагрівали до  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $1,5^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $-10^{\circ}\text{C}$  ( $1,5^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $0^{\circ}\text{C}$  ( $1,5^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $+10^{\circ}\text{C}$  ( $1,5^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $+20^{\circ}\text{C}$  ( $1,5^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ); до  $+30^{\circ}\text{C}$  ( $1,5^{\circ}\text{C}/\text{год}$ ). При  $+30^{\circ}\text{C}$  (мінімальний тиск у камері 4,0 Па) витримували за цієї температури протягом 12 год. Ліофілізація тривала 76,5 год.

Після завершення процесу ліофілізації вакуум у сублімаційній камері гасили стерильним азотом, який пропускали крізь фільтр з розміром пор  $0,22\ \mu\text{m}$  і за допомогою напівавтоматичної системи герметизували флакони. Флакони з препаратом вивантажували та обкатували алюмінієвими ковпачками (LK-27) на напівавтоматі для обкатування флаконів (тип HV -510 Vauch-Strobel).

Якість препарату оцінювали згідно з показниками якості, закладеними у проекті МКЯ: опис, втрата за масою при висушуванні, розмір наночастинок, розчинність, рН.

Дані, одержані при ліофілізації ЛС препарату УК, наведені у табл. 6.

Виходячи з наведених даних, обрано режим сушіння № 3, оскільки лише при цьому режимі виходить продукт відповідної якості згідно із заданими параметрами проекту МКЯ. Режим сушіння № 4 теж демонструє добрі результати, але вимагає більшого часу сушіння, тобто більших затрат електроенергії. Встановлено, що оптимальним для сушіння є об'єм препарату 20 мл.

Отже, у результаті проведених досліджень уперше запропонована технологічна схема одержання ЛС ін'єкційної форми УК. При цьому в 1 мл емульсії міститься 1 мг УК, 10 мг ФХя, 1 мг ДПФГ та 80 мг лактози.

## Вплив режиму ліофілізації на якість препарату

№ режиму сушіння	Об'єм наповнення, мл	Опис	pH	Розмір наночастинок, нм	Втрата за масою при висушуванні, %	Розчинність
1	20	Відповідає	6,85	200-250	3,5	Не відповідає
	25	Суха маса у неоформленій таблетці	6,75	200-270	7,2	Не відповідає
2	20	Відповідає	6,9	180-240	3,0	Не відповідає
	25	Суха маса у неоформленій таблетці	6,7	200-260	6,8	Не відповідає
3	<b>20</b>	<b>Відповідає</b>	<b>6,8</b>	<b>Менш ніж 200</b>	<b>2,6</b>	<b>Відповідає</b>
	25	Відповідає	6,7	200-230	5,0	Не відповідає
4	20	Відповідає	6,85	Менш ніж 200	2,5	Відповідає
	25	Відповідає	6,8	200-225	4,7	Не відповідає

Слід зазначити, що до ліофілізації включення УК до ЛС становило 83-87 %, розмір ЛС – 130-180 нм, проте після процесу ліофілізації включення УК до ЛС становило 82-86 %, розмір ЛС – 140-190 нм.

Технологічна схема виробництва наведена на рис. 4.

У п'ятому розділі «Методи контролю якості розробленого препарату» розроблено специфікацію на ліофілізований препарат. Специфікація на препарат розроблена згідно з вимогами ДФУ до лікарських препаратів для парентерального застосування і містить такі показники: опис, ідентифікація, час утворення емульсії, pH, сторонні домішки, втрата за масою при висушуванні, однорідність дозування, механічні включення, стерильність, аномальна токсичність, пірогенність, визначення сторонніх домішок, кількісне визначення УК та ФЛ, розподіл ЛС за розміром.

Проведено фармакологічні дослідження активності ЛС форми УК. У роботі був використаний зразок такого складу в 1 мл: ФХ, ДПФГ, УК, лактоза. Фармакологічні дослідження було проведено на 2 моделях – ІМ та ІХС.

Модель 1. Моделювання ІМ проводили шляхом однократного внутрішньочеревного уведення 0,25 мл 0,18% розчину гідрохлориду адреналіну. Препарат вводили: а) однократно за 30 хв до початку експерименту в дозі 10 мг/кг, внутрішньовенно; б) щодня протягом 5 днів після моделювання в дозі 10 мг/кг, внутрішньовенно.



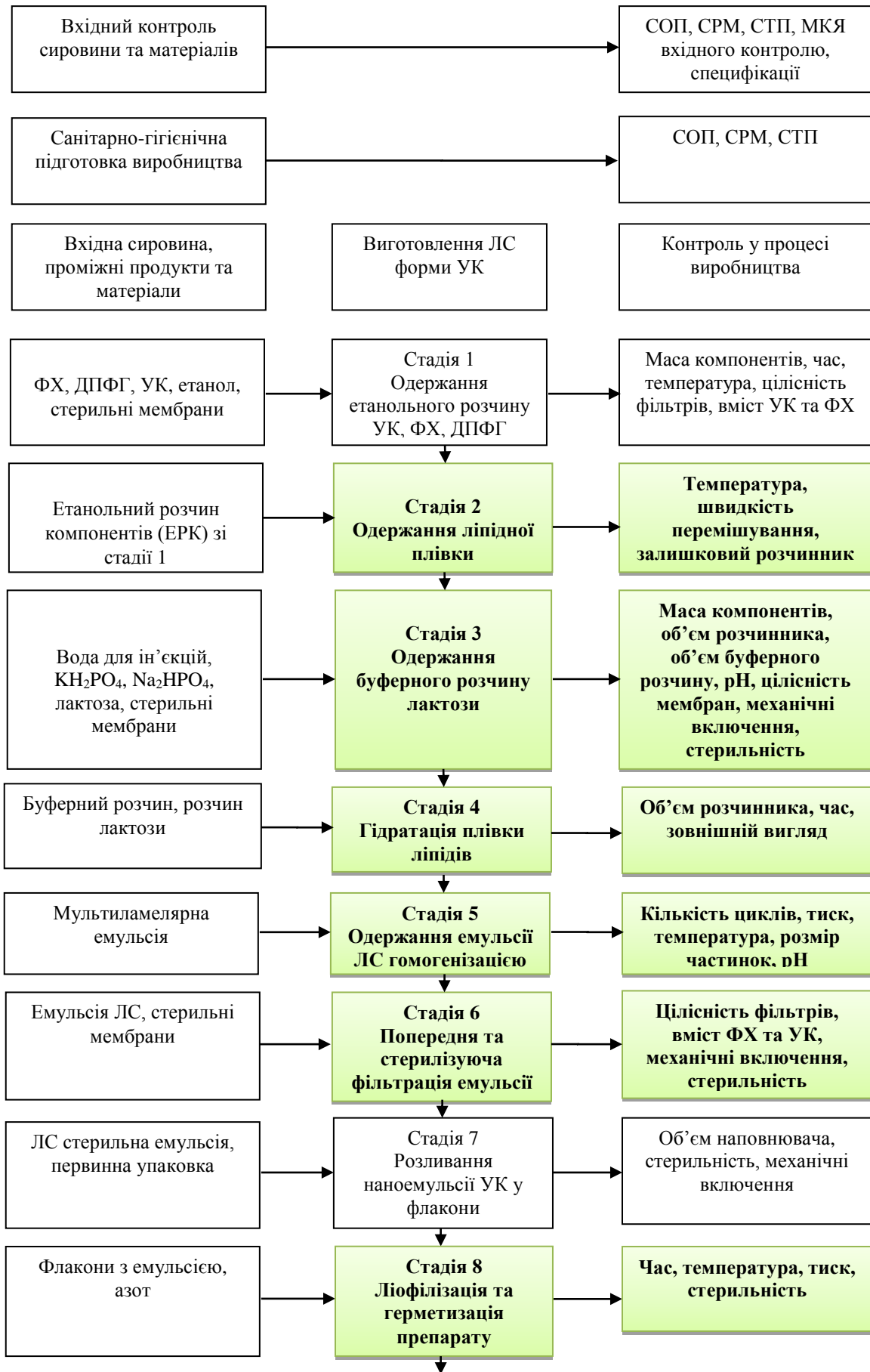


Рис. 4 Технологічна схема виробництва ЛС препарату (початок)

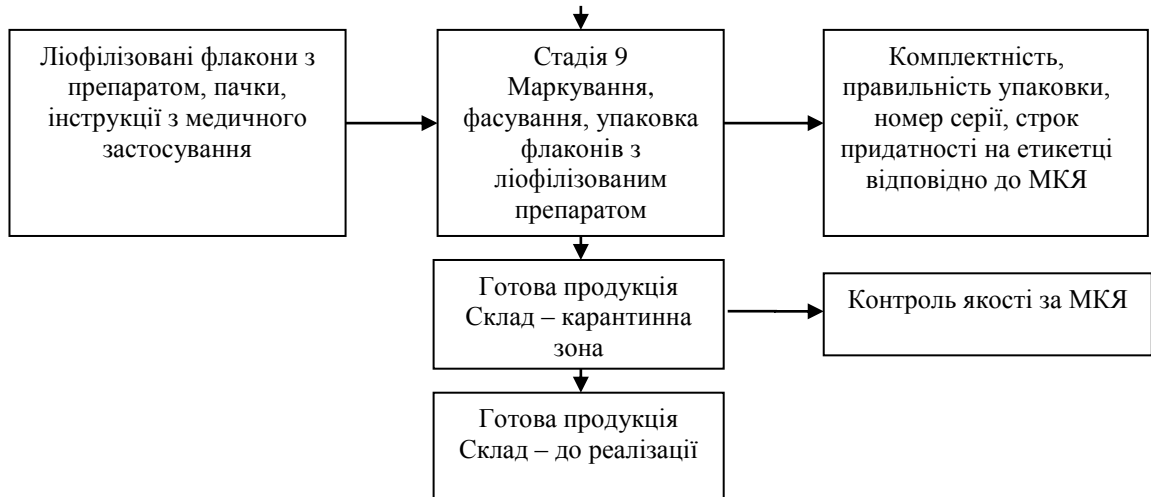


Рис. 4 Технологічна схема виробництва ЛС препарату (закінчення)

Модель 2. Моделювання ІХС проводили при щоденному уведенні підшкірно (протягом 7 днів) 0,1 мл 0,1% розчину гідрохлориду адреналіну та 1 мл 2,5% емульсії ацетату гідрокортизону. Препарат вводили: а) однократно за 30 хв до початку експерименту в дозі 10 мг/кг, внутрішньовенно; б) щодня протягом 5 днів після моделювання у дозі 10 мг/кг, внутрішньовенно.

ПОЛ оцінювали за вмістом ТБК – активних продуктів – малонового діальдегіду (МДА) та дієнових кон'югатів (ДК). Активність антиоксидантної системи (ААС) оцінювали за загальною антиоксидантною активністю (ЗАА). Також визначали вміст ізопростану-8 – маркера окисного стресу (табл. 7-10).

Таблиця 7

### Результати дослідження антиоксидантної активності ЛС форми УК на моделі інфаркту міокарда (сироватка крові)

Група	ДК, мкмоль/л	МДА, мкмоль/л	Ізопростан-8, нг/мл	ЗАА (%)
Контроль (n=8)	52,34±2,02	2,45±0,21	5,42±0,34	57,48±3,11
Інфаркт (n=8)	92,14±6,34 p<0,001	6,59±0,32 p<0,001	12,58±1,02 p<0,001	45,38±2,18 p<0,001
Уведення препарату, 5 днів (n=8)	60,48±3,11 p<0,05 p <sub>1</sub> <0,001	3,00±0,25 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,001	5,00±0,37 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,001	60,49±3,02 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,001
Уведення плацебо, 5 днів (n=8)	86,64±1,72 p <sub>1</sub> <0,001	5,05±0,23 p <sub>1</sub> <0,001	9,12±0,28 p <sub>1</sub> <0,001	50,78±3,06 p <sub>1</sub> <0,001
Однократне уведення препарату (n=8)	81,25±3,11 p <sub>1</sub> <0,01	5,42±0,32 p <sub>1</sub> <0,02	7,48±0,66 p <sub>1</sub> <0,01	59,32±2,11 p <sub>1</sub> <0,02
Однократне уведення плацебо (n=6)	90,04±2,0 p <sub>1</sub> <0,01	6,15±0,18 p <sub>1</sub> <0,01	10,92±0,30 p <sub>1</sub> <0,01	48,28±2,89 p <sub>1</sub> <0,01

Примітка: p – достовірність відмінностей із контролем; p<sub>1</sub> – достовірність відмінностей з інфарктом; ЗАА виражена у відсотках (%) інгібування; 50% інгібування – 1 од. активності.

Встановлено, що кардіопротекторний засіб на основі УК сприятливо впливає на ТБК-активні продукти (ДК, МДА, ізопропан-8), які є маркерами ПОЛ і свідчать про інтенсивність перебігу інфаркту міокарда. Так, після уведення препарату на моделі ІМ кількість ДК знизилася майже у 1,5 разу, кількість МДА – у 2 рази, кількість ізопропану-8 – у 2,5 рази, загальна антиоксидантна активність підвищилася в 1,3 разу.

Таблиця 8

**Результати дослідження антиоксидантної активності ЛС форми УК на моделі інфаркту міокарда (серцевий м'яз)**

Група	ДК, мкмоль/г білка	МДА, мкмоль/г білка	ЗАА (%)
Контроль (n=8)	1,72±0,11	0,325±0,008	63,28±3,12
Інфаркт (n=8)	4,79±0,21 p<0,001	0,589±0,031 p<0,001	57,48±2,34 p<0,001
Уведення препарату, 5 днів (n=8)	2,05±0,18 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,01	0,402±0,021 p<0,05 p <sub>1</sub> <0,01	76,49±2,64 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,01
Уведення плацебо 5 днів (n=6)	4,36±0,11 p <sub>1</sub> <0,001	0,555±0,02 p <sub>1</sub> <0,001	59,0±1,38 p <sub>1</sub> <0,001
Однократне уведення (n=8)	3,89±0,28 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,02	0,419±0,021 p<0,02 p <sub>1</sub> <0,01	69,45±3,64 p<0,05 p <sub>1</sub> <0,01
Однократне уведення плацебо (n=6)	4,50±0,31 p <sub>1</sub> <0,01	0,580±0,03 p <sub>1</sub> <0,01	62,3±2,14 p <sub>1</sub> <0,01

Примітка: p – достовірність відмінностей із контролем; p<sub>1</sub> – достовірність відмінностей з інфарктом.

Таблиця 9

**Результати дослідження антиоксидантної активності ЛС форми УК на моделі ІХС (сироватка крові)**

Група	ДК, мкмоль/л	МДА, мкмоль/л	Ізопропан-8, нг/мл	ЗАА, %
Контрольна група (n=8)	52,34±2,02	2,45±0,21	5,42±0,34	57,48±3,11
ІХС (n=8)	76,48±3,05 p<0,001	4,93±0,31 p<0,001	9,78±0,55 p<0,001	44,85±2,11 p<0,001
Уведення препарату 5 днів (n=8)	61,22±4,17 p<0,01 p <sub>1</sub> <0,001	3,37±0,28 p<0,01 p <sub>1</sub> <0,02	6,00±0,34 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,01	52,88±1,84 p<0,05 p <sub>1</sub> <0,01

Примітка: p – достовірність відмінностей із контролем; p<sub>1</sub> – достовірність відмінностей з інфарктом.

Встановлено, що уведення протягом п'яти днів ЛС УК дозволяє знизити кількість ДК у 1,2 рази, МДА – у 1,5 разу та підвищити ЗАА в 1,2 разу порівняно з ІХС.

**Результати дослідження антиоксидантної активності ЛС форми УК на моделі ІХС (серцевий м'яз)**

Група	ДК, мкмоль/г білка	МДА, мкмоль/г білка	ЗАА, %
Контроль (n=8)	1,78±0,12	0,325±0,008	63,23±3,11
ІХС (n=8)	3,47±0,18 p<0,001	0,489±0,007 p<0,01	53,23±2,77 p<0,01
Уведення препарату 5 днів, (n=8)	2,03±0,11 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,01	0,332±0,008 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,01	65,33±4,13 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,01

Примітка: p – достовірність відмінностей із контролем; p<sub>1</sub> – достовірність відмінностей з інфарктом.

Встановлено, що розроблений кардіоротекторний засіб має виражений антиоксидантний та мембранопротекторний ефект, який знижує кількість ТБК-активних продуктів ПОЛ і підвищує загальну антиоксидантну активність.

### ВИСНОВКИ

Уперше теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено склад і розроблено технологію одержання та методики контролю якості вітчизняного ліпосомального ін'єкційного препарату, що має кардіопротекторну дію.

1. Проаналізовано та узагальнено сучасні дані літератури щодо ролі гідрофобних антиоксидантів, зокрема убідекаренону, при лікуванні серцево-судинних захворювань, механізму їхньої дії та фармакологічних властивостей. Обґрунтовано одержання лікарської форми убідекаренону, включеного до наночастинок – ліпосом.

2. За результатами маркетингового дослідження ринку України фармацевтичних препаратів, що містять убідекаренон, встановлено доцільність створення ліпосомального ін'єкційного препарату, що має кардіопротекторну дію.

3. Виходячи з комплексу фізико-хімічних та біофармацевтичних характеристик діючої речовини убідекаренону, проведено вибір допоміжних речовин для створення ліпосомальної форми антиоксиданту убідекаренону. Визначено методи дослідження, необхідні для розробки та контролю ін'єкційного лікарського засобу відповідно до вимог ДФУ.

4. На основі фізико-хімічних і фармакотехнологічних досліджень проведено вибір концентрації діючих речовин з метою створення ефективного ліпосомального лікарського препарату убідекаренону. Встановлено, що оптимальною концентрацією мембраноутворювального ліпіда – ячного фосфатидилхоліну – є 10 мг/мл, а концентрацією діючої речовини – убідекаренону – є 1 мг/мл. Встановлено, що введення у бішар ліпосоми негативно зарядженого фосфоліпіда дипальмітоїлфосфатидилгліцерину в концентрації 1 мг/мл підвищує включення убідекаренону в наночастинок – ліпосоми, а також підвищує стабільність ліпосомальної емульсії.

5. Обґрунтовано та розроблено оптимальну промислову технологію одержання ліпосомальної форми убідекаренону. Встановлено, що для досягнення розміру ліпосом 130-180 нм необхідно провести 5 циклів гомогенізації за тиску  $8,1 \cdot 10^7$  Па і за температури 38-43 °С. Крім того, встановлено, що технологічні операції, включаючи гомогенізацію за високого тиску, стерилізуючу фільтрацію та ліофілізацію, не приводять до змін фізико-хімічних характеристик компонентів препарату, що свідчить про стабільність усіх компонентів препарату на різних стадіях технологічного процесу. Запропоновано обґрунтовану технологію швидкого заморожування та ліофілізації ліпосомальної наноемульсії убідекаренону та встановлено раціональну концентрацію кріопротектора лактози у складі лікарської форми убідекаренону – 80 мг/мл, яка дозволяє зберегти ліпосоми у нанорозмірі 140-190 нм.

6. Проведено біофармацевтичні, фармакологічні та фізико-хімічні дослідження розробленого препарату, визначено основні показники якості, апробовано методики якісного та кількісного аналізу компонентів, розроблено проект МКЯ та специфікацію на препарат відповідно до вимог ДФУ щодо лікарських препаратів для парентерального застосування.

7. Визначено специфічну активність розробленого лікарського препарату на моделях інфаркту міокарда та ішемічної хвороби серця у щурів. Встановлено, що уведення препарату протягом п'яти днів після моделювання інфаркту міокарда та ішемічної хвороби серця приводить до нормалізації ТБК-активних продуктів – малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів, а також підвищує загальну антиоксидантну активність у щурів. Підтверджено раціональну концентрацію убідекаренону та фосфатидилхоліну у складі ліпосомальної форми.

8. Досліджено вплив умов зберігання на стабільність розробленого препарату. Встановлено, що препарат є стабільним при зберіганні за температури від -10 до -20 °С протягом 2 років, а показники його якості відповідають встановленим вимогам.

9. За результатами досліджень розроблено проекти технологічних промислових регламентів на виробництво запропонованого препарату та проект МКЯ, проведено їх апробацію в умовах ВАТ «НаноМедТех» і ПАТ «Фармак», одержано патенти України на корисну модель.

10. Фрагменти дисертаційної роботи впроваджено у навчальний процес низки вищих навчальних закладів України III-IV рівнів акредитації, а також у виробничий процес підприємства «Фармсинтез» при розробці ліпосомальних лікарських препаратів та у науково-дослідний процес ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» при розробці та апробації методів контролю якості ліпосомальних лікарських препаратів.

## **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

### **Статті у фахових виданнях**

1. Шахмаєв А. Є, Волчик І. В., Краснопольський Ю. М., Швець В. І. Ліпосомальні наночастинки, як носії лікарських препаратів. *Фармаком.* 2011. № 3.

С. 88-96 (**Особистий внесок: проведення аналізу складу ліпосомальних препаратів, а також технології їх одержання, підготовка статті до друку**).

2. Шахмаєв А. Є., Краснопольський Ю. М., Волчик І. В., Швець В. І. Технологічні принципи одержання ліпосомальних лікарських препаратів. *Український біофармацевтичний журнал*. 2012. Т. 21, № 4. С. 4-14 (**Особистий внесок: проведення аналізу основних технологічних принципів одержання ліпосомальних препаратів, аналізу ефективності різноманітних способів одержання, написання статті**).

3. Шахмаєв А. Є., Біда Д. С., Волчик І. В., Краснопольський Ю. М., Швець В. І. Дослідження впливу технологічних параметрів на властивості ліпосомальних наночастинок. *Фармаком*. 2012. № 1/2. С. 82-87 (**Особистий внесок: проведення дослідження впливу на розмір ліпосом режимів обробки тиском, кількості циклів гомогенізації, температури проведення процесу гомогенізації, визначення індексу окисненості, оптичної густини одержаних ліпосом, підготовка статті до друку**).

4. Шахмаєв А. Є., Волчик І. В., Краснопольський Ю. М. Дослідження фармакологічної активності препарату, що містить гідрофобні біологічно активні компоненти. *Український біофармацевтичний журнал*. 2013. Т. 26, № 3. С. 40-43 (**Особистий внесок: проведення аналізу ліпосомальних препаратів, що містять гідрофобні антиоксиданти, узагальнення залежності розміру ліпосом від технології одержання та складу зразків, написання статті**).

5. Шахмаєв А. Є., Горбач Т. В., Волчик І. В., Краснопольський Ю. М. Створення ліпосомальної форми гідрофобного антиоксиданту убіхінону *Фармаком*. 2014. № 3. С. 27-36 (**Особистий внесок: дослідження впливу фосфоліпідного складу, режимів ліофілізації, вмісту кріопротекторів та технологічних режимів на властивості ліпосомального убідекаренону, написання статті**).

#### Статті у закордонних наукометричних виданнях

6. Shakhmaiev A. E., Gorbach T. V., Bobritskaya L. A., Krasnopolsky Yu. M. Preparation and cardioprotective effect analysis of liposomal coenzyme Q10. *The Pharma Innovation*. 2015. V. 9, No. 4. p.p. 22-26 (**Особистий внесок: переклад статті на англійську мову, розробка технології одержання ліпосомальної форми убідекаренону, написання статті**).

7. Шахмаєв А. Е., Кацай А. Л., Прохоров В. В., Стадниченко А. В., Балабаньян В. Ю., Краснопольський Ю. М., Швець В. И. Исследование методов включения лекарственных субстанций в липосомальные наночастицы. *Ремедиум*. 2015. Т. 226, № 12. С. 56-59 (**Особистий внесок: дослідження методу включення убідекаренону до ліпосом – метод ліпідної плівки, оформлення матеріалу**).

#### Статті в інших наукових журналах

8. Шахмаєв А. Є., Краснопольський Ю. М. Одержання ліпосомальних форм гідрофобних антиоксидантів. *Вісник Національного технічного університету «ХПИ»*. 2012. № 66. С. 141 – 157 (**Особистий внесок: проведення аналізу**

ліпосомальних препаратів, що містять гідрофобні антиоксиданти, узагальнення залежності розміру ліпосом від технології одержання і складу зразків, написання статті).

### Патенти

9. Шахмаєв А. Є., Краснопольський Ю. М., Конахович Н. Ф., Григор'єва Г. С. Гепатопротекторний засіб на основі природних фосфоліпідів: пат. 85306 Україна. № u 201307940; заявл. 21.06.2013; опубл. 11.11.2013, Бюл. № 21 (**Особистий внесок: планування та проведення патентного пошуку, участь у проведенні експериментальної частини, написання опису заявки, участь у підготовці формули корисної моделі, подання матеріалів заявки до Укрпатенту**).

10. Шахмаєв А. Є., Горбач Т. В., Краснопольський Ю. М. Спосіб одержання кардіопротекторного засобу на основі ліпосомальних наночастинок: пат. 91702 Україна, № u 201401941; заявл. 26.02.2014; опубл. 10.07.2014, Бюл. № 13 (**Особистий внесок: проведення експериментальної частини, написання тексту заявки, подання матеріалів заявки до Укрпатенту**).

### Тези доповідей

11. Шахмаєв А. Є., Краснопольський Ю. М. Ліпосоми – перспективні носії лікарських препаратів. *Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я*: матеріали ХХ міжнародної наук.-практ. конф., м. Харків, 15-17 травня 2012 р. Х., 2012. С. 321.

12. Краснопольський Ю. М., Степанов А. Е., Швець В. І., Шахмаєв А. Е. Липосомальные препараты для вспомогательной терапии в онкологии. *Отечественные противоопухолевые препараты (экспериментальная онкология)*: материалы XI Всерос. науч.–практ. конф. с междунар. участием, г. Нижний Новгород, 31 мая – 1 июня 2012 г. Н. Н., 2012. С. 29.

13. Шахмаєв А. Е., Краснопольський Ю. М. Разработка технологии получения липосомальных наночастиц, содержащих убихинон. *Химия, био- и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности*: материалы I Междунар. науч.-практ. конф., пгт Щёлкино, 10 – 13 июня 2013 г., Щёлкино, 2013. С. 214.

14. Shakhmaiev A. E., Krasnopolsky Yu. M. Liposomal nanoparticles containing hydrophobic antioxidants. *Nanotechnology and nanomaterials (Nano – 2013)*: international research and practice conference, Bukovel, 25 August – 1 September, 2013 B., 2013. p.386.

15. Кацай А. Г., Прохоров В. В., Стадниченко А. В., Шахмаєв А. Е., Краснопольський Ю. М., Швець В. І. 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*: материалы II Междунар. науч.-практ. конф., г. Харьков, 8-10 декабря 2014 г. Х., 2014. С. 208-211.

### АНОТАЦІЯ

**Шахмаєв А. Є. Розробка технології одержання ліпосомальної ін'єкційної форми убідекаренону, що має кардіопротекторну дію. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація. – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2017.

Уперше на основі фармакотехнологічних, фізико-хімічних, фармакологічних та мікробіологічних досліджень теоретично та експериментально обґрунтовано склад і технологію оригінальної лікарської ліпосомальної форми убідекаренону для лікування кардіологічних захворювань. На основі теоретичного обґрунтування та експериментальних досліджень встановлено якісний і кількісний склад діючої та допоміжних речовин. Уперше експериментально обґрунтовано доцільність введення до ліпосомального препарату, що містить гідрофобну речовину – убідекаренон, негативно заряджених фосфоліпідів, які дозволяють збільшити включення убідекаренону до мембрани ліпосом. Вивчено оптимальні технологічні параметри одержання ліпосомальної ін'єкційної форми убідекаренону, а саме: кількість циклів при гомогенізації, значення температури, тиску, етап введення кріопротектора, режим ліофілізації. Встановлено фармакологічну активність розробленого препарату на моделі інфаркту міокарда та ішемічної хвороби серця. Розроблено сучасні методики ідентифікації та кількісного визначення убідекаренону для створення проекту МКЯ. Розроблено специфікацію на ліофілізований препарат. Специфікацію на препарат розроблено відповідно до вимог ДФУ до лікарських препаратів для парентерального застосування. Визначено оптимальні умови зберігання, що забезпечують стабільність препарату протягом 2 років.

*Ключові слова:* убідекаренон, ліпосоми, фосфатидилхолін, кріопротектор, лактоза, дипальмітоїлфосфатидилгліцерин, технологічні параметри, ліофілізація, індекс окисненості.

## АННОТАЦИЯ

**Шахмаев А. Е. Разработка технологии получения липосомальной инъекционной формы убидекаренона, обладающего кардиопротекторным действием.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.01 – технология лекарств, организация фармацевтического дела и судебная фармация. – Национальный фармацевтический университет, МЗ Украины, Харьков 2017.

Впервые на основе фармакотехнологических, физико-химических, фармакологических и микробиологических исследований теоретически и экспериментально были обоснованы состав и технология оригинальной лекарственной липосомальной формы убидекаренона для лечения кардиологических заболеваний, в частности для лечения ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда. На основе теоретического обоснования и экспериментальных исследований был подобран качественный и количественный состав действующих и вспомогательных веществ.

Проведены экспериментальные исследования по выбору типа основного мембранообразующего фосфолипида для конструирования липосом. Использовали



фосфатидихолины яичного желтка, сои, подсолнечника и фосфатидилхолины, полученные синтетическим путем (дипальмитоилфосфатидилхолин, димиристоилфосфатидилхолин), а также их смеси в различных концентрациях. В ходе исследований было установлено, что фосфатидилхолины из растительных источников (сои и подсолнечника) имеют высокий индекс окисления как до обработки в гомогенизаторе, так и после, что свидетельствует об окислении жирнокислотного состава фосфолипидов. Кроме того, данные образцы проявляли гемолитические свойства. Также было установлено, что синтетические фосфатидилхолины образуют менее стабильные липосомальные эмульсии по сравнению с яичным фосфатидилхолином. Таким образом, в качестве основного мембранообразующего липида был выбран яичный фосфатидилхолин.

Определена зависимость включения убидекаренона от структуры используемых фосфолипидов и условий технологии. Показано, что включение в липосомы отрицательно заряженного фосфолипида – дипальмитоилфосфатидилглицерина позволяет увеличить включение убидекаренона в липосомы на 30%. Кроме того, дипальмитоилфосфатидилглицерин увеличивает скорость фильтрации эмульсии липосом через мембраны с размером пор 0,22 мкм. Оптимальное количество циклов, которое позволяет получить липосомы в нанодиапазоне, составляет не более 5 при давлении в гомогенизаторе  $8,1 \cdot 10^7$  Па. При этом полученные наночастицы имеют размер до 180 нм (до лиофилизации).

В результате проведенных исследований определены тип и оптимальная концентрация криопротектора в разработанном препарате. Показано, что различные концентрации лактозы приводят к получению близких по размеру липосом (до лиофилизации). В то же время после проведения процесса лиофилизации препарата сохранение размеров наночастиц в нанодиапазоне наблюдается только при конечной концентрации лактозы 80 мг/мл.

На основании проведенных исследований предложена обоснованная технология быстрого замораживания и лиофилизации липосомальной наноэмульсии убидекаренона. При этом получены липосомы стандартного состава, основная масса которых представлена частицами с размером 140-190 нм (80-90% всех липосом) после лиофилизации.

Разработан проект технологического регламента для производства липосомальной формы убидекаренона, а также проект МКК, содержащий описание методик контроля качества указанного препарата. Определены критические параметры технологического процесса и осуществлено его аппаратное оформление, что отражено в соответствующем технологическом регламенте.

Была установлена фармакологическая активность разработанного препарата на модели инфаркта миокарда и ишемической болезни сердца на экспериментальных животных – крысах. Были изучены оптимальные условия и сроки хранения разработанного липосомального препарата, которые обеспечивают его стабильность в течение 2 лет хранения.

*Ключевые слова: убидекаренон, липосомы, фосфатидилхолин, криопротектор, лактоза, дипальмитоилфосфатидилглицерин, лиофилизация, индекс окисленности.*

## ANNOTATION

**Shakhmaiev A. E. Development of the technology for obtaining of the liposomal injectable form of ubidecarenone, having a cardioprotective action.** – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The dissertation for a candidate of pharmaceutical sciences degree in speciality 15.00.01 “Drug technology, organization of pharmacy and judicial pharmacy”. – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2017.

For the first time, the composition and technology of original dosage liposomal form of ubidecarenone for the treatment of cardiac diseases has been theoretically and experimentally substantiated based on pharmaco-technological, physico-chemical, pharmacological and microbiological studies. On the ground of theoretical substantiation and experimental studies, a qualitative and quantitative composition of the active substance and excipients was determined. The expediency of introducing into the liposomal preparation, which contain a hydrophobic substance – ubidecarenone, of negatively charged phospholipids, which allow to increase incorporation of ubidecarenone to the liposome membrane, has been experimentally proved for the first time. Optimal technological parameters for obtaining of the liposomal injectable form of ubidecarenone have been studied, namely: the number of cycles during homogenization, the value of temperature, pressure, the stage of introducing of the cryoprotectant, the lyophilization mode. Pharmacological activity of the developed preparation has been established in the model of myocardial infarction and ischemic heart disease. Modern techniques of identification and quantification of ubidecarenone have been developed to create the QCM-project. For the lyophilized preparation the specification has been developed. The specification for the preparation has been developed in accordance with the requirements of State Pharmacopoeia of Ukraine for medicinal preparations for parenteral use. Optimal storage conditions ensuring stability of the preparation for 2 years have been determined.

*Key words: ubidecarenone, liposomes, phosphatidylcholine, cryoprotectant, lactose, dipalmitoylphosphatidylglycerol, technological parameters, lyophilization, oxidation index.*

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія  
ДК – дієнові кон'югати  
ДМФХ – диміристоїлфосфатидилхолін  
ДПФХ – дипальмітоїлфосфатидилхолін  
ДПФГ – дипальмітоїлфосфатидигліцерин  
ДФУ – Державна фармакопея України  
І.О. – індекс окисненості  
ІМ – інфаркт міокарда  
ІХС – ішемічна хвороба серця  
ЛС – ліпосоми  
ЛФХ – лізофосфатидилхолін  
МДА – малоновий діальдегід  
МКЯ – методи контролю якості  
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів  
ТШХ – тонкошарова хроматографія  
УК – убідекаренон  
ФЛ – фосфоліпіди  
ФХ – фосфатидилхолін  
ФХя – яєчний фосфатидилхолін  
ФХс – соєвий фосфатидилхолін