

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доцента кафедри технології ліків і біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кандидата фармацевтичних наук, Струс Оксани Євгенівни на дисертаційну роботу Кацяя Олексія Григоровича «Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для лікування офтальмологічних захворювань», подану до спеціалізованої вченої ради ДФ 64.605.001 при Національному фармацевтичному університеті, що утворена наказом МОН № 1064 від 18.08.2020 р. для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація».

Актуальність теми. Створення нових високоефективних лікарських засобів (ЛЗ), в основі яких лежать наночастки різноманітної структури, які здатні забезпечувати спрямованість дії та підвищення біодоступності активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) є перспективним напрямком у практичній медицині та фармації.

Слід зазначити, що системи доставки АФІ для системного та місцевого застосування в офтальмологічній практиці мають ряд обмежень через труднощі досягнення оптимальної концентрації ліків завдяки захисним механізмам очей. Фармацевтична розробка нових систем доставки ліків (drug delivery system) повинна бути спрямована на тривалу та контрольовану доставку ліків, досягнення адресної доставки до клітини-мішені та мінімізації несприятливих наслідків. Очікується, що саме ці підходи забезпечать максимальну терапевтичну користь з мінімальними побічними ефектами.

Серед таких систем доставки ліків саме ЛС широко вивчаються останнім часом як потенційні ЛЗ в офтальмології, що мають цілу низку переваг: неімуногенність, малотоксичність, легка біодеградація в організмі;

за певних умов можуть зливатися з фосфоліпідами (ФЛ) клітинних мембран та доставляти свій вміст усередину клітин.

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.).

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше на основі фізико-хімічних, мікробіологічних, фармакотехнологічних та фармакологічних досліджень була науково обґрунтовано та експериментально опрацьовано склад діючої та допоміжних речовин, що забезпечує отримання Cyt-LS із високим ступенем інкапсуляції цитохрому С, і технологію виробництва Cyt-LS у формі ліофілізату для приготування очних крапель.

Досліджено технологічні параметри технології виробництва, що дають можливість проводити процес стерилізуючої фільтрації; 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 полягає у тому, що для терапії офтальмологічних захворювань було розроблено та запропоновано оригінальний ЛЗ «Цитохром С ліпосомальний, ліофілізат для приготування очних крапель». Розроблено проект технологічного регламенту для виробництва Cyt-LS, а також проект МКЯ, що містить опис методик контролю якості вказаного препарату. Технологію виробництва та методики контролю якості лікарського препарату апробовано в умовах промислового виробництва ТОВ «Наномедтех» (акт впровадження від 20.07.2017 р.).

Фрагменти дисертаційної роботи упроваджено в освітньо–науковий процес кафедр технології ліків ряду вищих навчальних закладів України, що підтверджується актами впровадження.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Основні наукові положення, висновки і рекомендації, дисертант підтверджує шляхом експериментальних досліджень. Дослідження виконані на високому науковому рівні і з використанням сучасних рекомендацій та вимог ДФУ, FDA, ЕМА.

Обґрунтуванням наукових положень можна вважати результати фармакологічних і мікробіологічних досліджень, а також успішну апробацію технології та методів контролю якості у виробництві.

Дисертант застосовує статистичну обробку отриманих цифрових даних з використанням загально прийнятих і надійних методів їхньої статистичної обробки. Валідація розроблених методик за рядом показників наочно демонструє відтворюваність отриманих результатів та отримання лікарського препарату, що відповідає специфікаціям і визначеним показникам якості.

Використання процесно-аналітичної технології (PAT), підходу «якість шляхом розробки» (QbD) та принципів управління ризиками для якості (QRM) при фармацевтичній розробці та виробництві лікарських препаратів показали, що відповідне поєднання контролю в процесі виробництва разом із своєчасним моніторингом та перевіркою попередньо встановлених показників матеріалів забезпечують більшу гарантію якості препаратів, ніж самі випробування готової продукції.

Висновки експериментально обґрунтовані, чітко та коректно викладені. Достовірність результатів досліджень, отриманих автором, з урахуванням вище викладеного не викликає сумнівів.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях. 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. Опубліковані результати досліджень достатньо повно відображають зміст дисертаційної роботи.

Основні положення дисертаційної роботи викладені та обговорені на науково-практичних конференціях різного рівня. Автореферат дисертації за структурою і за змістом відповідає основним положенням роботи.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота Кацає О.Г. представлена на 217 сторінках. Робота складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), експериментальних досліджень (розділи 2–5), загальних висновків, списку використаних джерел, додатків. Обсяг основного тексту складає 169 сторінок. Робота містить 38 рисунків та 47 таблиць. Список використаної літератури налічує 164 найменування, з них 61 вітчизняних та 103 іноземних.

У першому розділі «Ліпосомальні лікарські засоби та сучасні проблеми їх розробки (огляд літератури)» проведено узагальнення даних

літератури щодо застосування цитохрому С в офтальмології, розглянуто етіопатогенетичні аспекти запальних захворювань ока, 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 та обґрунтовано доцільність уведення цитохрому С у комплексі з фосфоліпідами з метою підвищення ефективності використання цитохрому С в офтальмології.

Установлено переваги та перспективи застосування ліпосом як нанорозмірних систем доставки ліків у сучасній офтальмологічній практиці; розглянуто основні способи отримання та сучасні вимоги до розробки, виробництва та контролю ліпосомальних лікарських засобів.

У **другому розділі** «Об'єкти та методи досліджень» обґрунтовано загальну концепцію фармацевтичної розробки очних крапель ліпосомального цитохрому С відповідно до сучасних рекомендацій та вимог ДФУ, FDA, ЕМА; наведено характеристику діючої речовини, фосфоліпідів та допоміжних речовин (компонентів буферного розчину, кріопротекторів), здійснено вибір методів дослідження та оцінки якості очних крапель ліпосомального цитохрому С відповідно до вимог ДФУ.

У **третьому розділі** «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.

Розроблено специфікації вхідного контролю на діючу речовину та фосфоліпіди, що відповідають вимогам ДФУ до субстанцій для фармацевтичного застосування та специфікацій виробників

За результатами досліджень оцінено вплив складу ліпосом на рівень інкапсуляції та розмір часток при створенні ліпосомальної форми цитохрому

С та запропоновано співвідношення ФХ : ДПФГ (1,20 : 1,0), яке забезпечує максимальну інкапсуляцію цитохрому С.

Експериментально був обґрунтований рівень тиску гомогенізації при отриманні уніламельярних везикул ліпосомального цитохрому С у 800 bar, що дозволяє проводити процес протягом 5 циклів гомогенізації до отримання наночасток із середнім розміром ≤ 220 нм і не перевищувати оптимальний температурний режим 38-44 °С.

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 (оптимальним обрано лактозу в концентрації 6 %) і температури вторинного сушіння (оптимальною обрано 30⁰С) на якість ліофільно висушеного ліпосомального цитохрому С: 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 LS-Cyt та ліофільно висушеної форми ліпосомального цитохрому С FD-LS-Cyt. Проведено порівняння їх стабільності протягом 12 місяців і встановлено, що 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 зразків FD-LS-Cyt при випробовуванні стабільності не було виявлено.

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.

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.

У четвертому розділі «Розробка методик контролю показників якості у препараті» представлено дослідження з розробки методик контролю показників якості ліофільно-висушеного ліпосомального цитохрому С. Складено проєкт МКЯ із урахуванням рекомендацій FDA, вимог ДФУ 2.0 («Ліпосомальні лікарські засоби N», «Очні лікарські засоби»), настанови 42-3.2:2004 «Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування на критерії прийнятності». Розроблено методику, що дозволяє визначати ступінь інкапсуляції цитохрому С, і проводити ідентифікацію складу ліпосомального цитохрому С. Розроблено методику кількісного визначення фосфатидилхоліну та дипальмітоїлфосфатидилгліцеролу в препараті методом ВЕРХ, методику кількісного визначення цитохрому С у препараті методом УФ-спектрометрії. Проведено валідацію розроблених методик за рядом показників. Проведено вивчення стабільності зразків ліофільно висушеного ліпосомального цитохрому С та запропоновано термін зберігання при температурі мінус $(15 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ – 18 місяців.

У п'ятому розділі «Мікробіологічні та фармакологічні дослідження препарату» наведено результати дослідження специфічної активності ліофільно-висушеного ліпосомального цитохрому С *in vivo* на моделі ураження рогівки кролів, які проводили на базі ЗАТ «Санкт-Петербурзький інститут фармації» і на моделі світлової катаракти кролів – на базі ДУ «Інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України», (м. Одеса) та дослідження *in vitro*.

Було встановлено, що застосування очних крапель ліпосомального цитохрому С було більш ефективним, ніж застосування неліпосомального цитохрому С, стосовно процесів запалення та регенерації, а також продемонстровано, що ліпосомальний цитохром С виявляв вищу антикатарактальну профілактично-лікувальну дію, ніж препарат порівняння.

За результатами оцінки реакційної здатності *in vitro* встановлено, що цитохром С у ліпосомальній формі зберігає здатність приймати та віддавати електрони, як і розчин неліпосомальної форми цитохрому С.

Зауваження щодо змісту і оформлення дисертації, завершеність дисертації в цілому. При рецензуванні роботи виникли деякі зауваження та пропозиції:

1. Важливим етапом досліджень є визначення терміну зберігання лікарського засобу, за час якого показники якості ЛЗ відповідатимуть вимогам, закладеним у МКЯ. Тому, можливо доцільно було б пояснити чому оцінку стабільності важливо проводити під час фармацевтичної розробки.

2. У роботі було б доцільно більш детально розкрити апаратурне оснащення виробничого процесу.

3. Також бажано б було пояснити вибір методів біологічного контролю при розробці специфікації МКЯ.

4. У роботі зустрічаються невдалі вирази та описки.

У цілому робота викладена грамотно і добре ілюстрована рисунками, таблицями, та оформлена згідно до вимог. Наведені зауваження є несуттєвими і не зменшують теоретичної та практичної цінності дисертаційної роботи.

Відповідність дисертації вимогам «Порядку присудження наукових ступенів». Дисертаційна робота Кацаєв Олексія Григоровича на тему: «Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для лікування офтальмологічних захворювань», на здобуття наукового ступеня доктора філософії є завершеною науковою працею. За актуальністю обраної теми, науковою новизною, обсягом виконаних досліджень, достовірністю

