

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Круглов Євген Михайлович

УДК 615.014.2:615.453.6:615.214.24

ДИСЕРТАЦІЯ

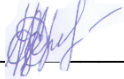
**Розробка технології та стандартизація ліпосомальної форми
очних крапель репаративної дії на основі пептидного комплексу**

226 – Фармація, промислова 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


_____ Є. М. Круглов

Науковий керівник Буряк Марина Валеріївна, кандидат фармацевтичних наук,
доцент

Харків – 2025

АНОТАЦІЯ

Круглов Є. М. Розробка технології та стандартизація ліпосомальної форми очних крапель репаративної дії на основі пептидного комплексу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2025.

Дисертація присвячена розробці складу і технології одержання ліпосомальної форми очних крапель із репаративною та протизапальною дією на основі пептидного комплексу зі шкіри свиней.

Перший розділ присвячений аналізу сучасних принципів лікування очних захворювань. Проведені дослідження висвітлили роль регуляторних пептидів у лікуванні порушень біохімічних та регенеративних процесів. У наведеному аналізі вказано, що пептиди є потужними регуляторами біологічних процесів, проаналізовано їх використання як лікарських засобів (ЛЗ).

Проведено аналіз можливих шляхів доставлення терапевтичних білків в очі. Розкрито необхідність ефективної біодоступності в оці різних терапевтичних білків, пов'язаної із проблемою через наявність багатьох очних бар'єрів. Розглянуто сучасні підходи щодо поліпшення біодоступності пептидів.

Наведено роль ліпосом як системи доставляння ліків у разі захворювань переднього і заднього сегментів ока та ефективність застосування ліпосомальної лікарської форми (ЛФ) для розроблення очних лікарських засобів.

Показано актуальність та доцільність створення ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу з дермального шару шкіри свиней. Проведено аналіз ринку ЛЗ України, які застосовуються в офтальмології як стимулятори регенерації рогівки ока.

У розділі 2 визначено загальну методологію, складено план дослідницьких робіт з вибору й обґрунтування складу, технології, контролю якості ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу.

Наведено об'єкти дослідження – активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ) та допоміжні речовини, які були використані під час отримання ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу.

Підібрано методи досліджень, які дозволять отримати повні та достовірні результати.

У розділі 3 наведено результати експериментальних досліджень з обґрунтування складу та розробки оптимальної дослідно-промислової технології виробництва ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу.

З урахуванням фізико-хімічних характеристик АФІ та допоміжних речовин і вплив концентрацій допоміжних речовин на критичні показники якості розчину ЛЗ, а також регуляторних вимог для цієї ЛФ (краплі очні) розроблено цільовий профіль якості та визначено критичні показники якості продукту.

Проведено первинну оцінку ризиків показників АФІ та варіабельності формуляції. З метою визначення варіабельності для подальшого дослідження було проведено оцінку ризиків, яка містила попередні знання, досвід з відповідними лікарськими формами та аналіз інформації про лікарські речовини. Ці чинники було переглянуто під час розроблення процесу.

Враховуючи ризики для оцінки варіабельності формуляції, обрано кількісний склад допоміжних речовин, який забезпечує відповідність вимогам цільового профілю якості продукту.

Як АФІ ЛЗ було обрано концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней (виробництва «АТ Фармак», Україна) та фосфатидилхолін із соєвих бобів з урахуванням вимог ДФУ та ЄФ до офтальмологічних ЛЗ. Кількісний вміст концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свині та фосфотидилхоліну соєвих бобів обрано за результатами доклінічних досліджень препарату.

З метою оптимізації технологічного процесу отримання АФІ визначено метод та параметри концентрування екстракту депротейнізованого дермального шару шкіри свиней. Установлено оптимальний метод концентрацій випарювання на ротаційному випарювачі та параметри процесу за температури $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$ і тиску 20 мПа.

Для здійснення вхідного контролю була розроблена специфікація на АФІ.

Концентрацію фосфатидилхоліну із соєвих бобів визначали емпіричним методом для гарантування інкапсуляції пептидів дермального шару шкіри свиней в ліпосомальну форму. Для визначення відсотка інкапсуляції пептидів депротейнізованого дермального шару шкіри свиней у ліпосому було застосовано трансмісійну електронну мікроскопію (ТЕМ) та Ромбнівську мікроскопію, метод динамічного світлорозсіювання, метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Установлено концентрацію фосфатидилхоліну із соєвих бобів 100 мг/мл, за якої відбувається 100% інкапсуляція пептидів дермального шару шкіри свиней до складу ліпосоми.

Розмір частинок емульсії, достатній для отримання ліпосомального ЛЗ у формі очних крапель, визначався емпірично. Для розчину фосфотидилхоліну соєвих бобів різного розміру проводилась інкапсуляція білка депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та контролювався ступінь інкапсуляції білка. Установлено, що повна інкапсуляція білка депротейнізованого дермального шару шкіри свиней в 1 л розчині ліпосом за робочого тиску диспергатора 20000 PSI за 20 хв відбувається в розчинах ліпосом з розміром 120-140 нм і менше.

Стабільність зразків приготованої ліпосомальної емульсії за різних параметрів процесу гомогенізації визначали з допомогою дисперсійного аналізатора LUMiSizer (LUM GmbH, Berlin, Germany). За результатами вивчення стабільності емульсії визначено оптимальний метод та параметри диспергування.

Розроблено технологію отримання готового ЛЗ ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу, яка складається із інкапсуляції білкового

концентрату в ліпосоми, очищення допоміжних речовин, коригування рН, стерильної фільтрації ліпосомальної емульсії, розливання у флакони.

На підставі аналізу ризиків технологічного процесу були ідентифіковані потенційні ризики для критичних показників якості ЛЗ та розроблено дизайн експериментів. Експериментальними дослідженнями встановлено методи керування параметрами процесу та контролю в його ході, що знижують певні ризики до прийнятного рівня. На основі статистичного моделювання була розроблена технологія ліпосомальних очних крапель. Установлені оптимальні параметри технологічних стадій виробничого процесу.

На технологічній стадії «Отримання розчину ліпосом» встановлено критерії для розміру частинок розробленого ЛЗ: перший пік не більше 100, другий - не більше 400 нм.

На технологічній стадії «Інкапсуляція концентрату білка в ліпосоми» встановлено, що повна інкапсуляція білка депротейнізованого дермального шару шкіри свиней в 1 л розчині ліпосом за робочого тиску диспергатора 20000 PSI за 20 хв відбувається в розчинах ліпосом з розміром 120-140 нм і менше.

На технологічній стадії «Розчинення допоміжних речовин» встановлено швидкість і час перемішування для повного розчинення допоміжних речовин.

На технологічній стадії «Доведення рН розчину» на підставі попереднього досвіду з використанням розчину натрію гідроксиду та кислоти хлористоводневої для коригування рН, використаний 1 М розчин натрію гідроксиду та розчин кислоти хлористоводневої розведений.

Під час вибору методу стерилізації ЛЗ визначено стерилізацію фільтрацією крізь фільтр 0,22 мкм. Під час розроблення стадії «Фільтрація розчину» було проведено вибір стерилізувального фільтра й обраний такий, що мав кращу пропускну здатність. Для обраного фільтра було підтверджено стерилізаційну здатність та сумісність із ЛЗ.

На стадії «Наповнення флаконів» за результатами трьох валідаційних серій було доведено, що використання стандартних параметрів процесу в умовах цеху відповідає встановленим вимогам.

У розділі 4 наведено дослідження з розроблення методик контролю показників якості готової ЛФ – ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу. Визначено їх фізико-хімічні, мікробіологічні та фармакотехнологічні показники. На підставі регуляторних вимог складено проєкт МКЯ.

Розроблено та валідовано методику кількісного визначення фосфатидилхоліну в ЛЗ методом ВЕРХ.

Розроблено методику кількісного визначення пептидів у ЛЗ методом ВЕРХ. Методика валідована за показниками: «специфічність», «правильність», «прецизійність, внутрішньолабораторна точність», «лінійність», «стабільність розчинів у часі», «ступінь вилучення», «робасність», «межа кількісного визначення», «межа детектування».

Розроблено методику визначення домішок у ЛЗ методом ВЕРХ. Методика валідована за показниками: «специфічність», «прецизійність, внутрішньолабораторна точність», «лінійність», «ступінь вилучення», «робасність».

Проведено вивчення стабільності зразків ЛЗ, одержаних в умовах дослідно-промислового виробництва АТ «Фармак». Запропоновано термін зберігання за температури 2-8 °C – 24 місяці.

У розділі 5 наведено результати вивчення нешкідливості (гостра токсичність, субхронічна токсичність, місцевоподразлива дія) та специфічної фармакологічної активності (первинна фармакодинаміка – репаративна та протизапальна дія) ЛЗ – ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу виробництва АТ «Фармак», що пройшов доклінічні випробування в ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції» (ДП «ДНЦЛЗ», Харків).

Розроблений ЛЗ (краплі очні) на моделі дозованого лужного опіку рогівки виявляє репаративну та протизапальну активність, прискорюючи процес природної епітелізації рогівки, перешкоджаючи збільшенню висоти та товщини її переднього епітелію, знижуючи стромальне помутніння та запалення.

У цілому результати оцінки безпеки ЛЗ – ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу (АТ «Фармак», Україна) – дозволяють рекомендувати його для отримання дозволу на проведення клінічних досліджень.

Ключові слова: ліпосоми, емульсія, самоорганізована емульсійна система, очні лікарські засоби, стерильність, фармацевтична розробка, технологія, валідація, стерилізувальна фільтрація, аналіз, ураження рогівки.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

Статті у наукових виданнях, які внесені до міжнародних наукометричних баз

1. Kruglov E., Yarnykh T., Borshchevsky G., Rukhmakova O. Development of the technology of a liposomal form of eye drops based on a peptide complex. *Acta Poloniae pharmaceutica*. 2021. Vol. 78(2). P. 237-242. **(Scopus)** DOI: [10.32383/appdr/135087](https://doi.org/10.32383/appdr/135087) (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).

Статті у фахових наукових виданнях

2. Круглов Є. М., Борщевський Г. І. Оптимізація методу концентрування екстракту біологічно активних речовин із дермального шару шкіри свиней. *Український журнал військової медицини*. 2022. № 3(1). С. 87-92. DOI: [10.46847/ujmm.2022.1\(3\)-087](https://doi.org/10.46847/ujmm.2022.1(3)-087) (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; особистий внесок Г. І. Борщевського: формулювання цілей та завдань дослідження, формулювання висновків).

3. Kruglov E., Borshchevsky G. The use of modern QbD approaches in the pharmaceutical development of technology of liposomal eye drops. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2022. № (1). P. 28–32. DOI: [10.5281/zenodo.6350205](https://doi.org/10.5281/zenodo.6350205) (Особистий внесок здобувача:

аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; особистий внесок Г. І. Борщевського: формулювання цілей та завдань дослідження, формулювання висновків).

4. Круглов Є. М., Борщевський Г. І. Особливості процесу фільтрації ліпосомальної емульсії для виготовлення очних крапель на основі пептидного комплексу. *Вісник фармації*. 2023. № 1(105). С. 19-22. DOI :10.24959/nphj.23.102 (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; особистий внесок Г. І. Борщевського: формулювання цілей та завдань дослідження, формулювання висновків).

Патенти

5. Спосіб одержання композиції протизапальної та регенеруючої дії : пат. № 152253 Україна / Гой А. М., Круглов Є. М., Борщевський Г. І. № u 2022 00080 ; заявл. 10.01.2022 ; опубл. 12.01.2023, Бюл. № 2. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1718248/> (Особистий внесок здобувача: брав участь у патентному пошуку, одержанні лікарського засобу).

Тези доповідей

6. Kruglov I., Omelchenko I., Diakun K., Chayka L., Borschevskiy G., Yarnykh T. Eye drops with reparative action based on low molecular weight peptide complex. *Science and society* : 15th International conference, Hamilton, Canada, November 8, 2019. Hamilton, 2019. P. 223-225.

7. Круглов Є., Ярних Т., Борщевський Г. Актуальність створення ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу з дермального шару шкіри свиней. *Society and science. problems and prospects* : Proceedings of the III International Scientific and Practical Conference, London, England, January 25–28, 2022. London, 2022. P. 420-423.

8. Круглов Є. М., Ярних Т. Г., Борщевський Г. І. Підтвердження стерилізуючої здатності фільтра стерильної фільтрації ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології* : матеріали III Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 24 берез. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 236-238.

9. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Використання оптичної Раманівської спектроскопії для встановлення включення пептидного комплексу у ліпосоми. *Scientific progress: innovations, achievements and prospects* : Proceedings of VIII International Scientific and Practical Conference, Munich, Germany, 1-3 May 2023. P. 84-86.

10. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Дослідження стабільності ліпосомального препарату на основі пептидного комплексу з шкіри свині у формі очних крапель. *Innovations and prospects in modern science* : Proceedings of V International Scientific and Practical Conference, Stockholm, Sweden, 8-10 May 2023. P. 80-82.

11. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Валідація методики кількісного визначення ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу із шкіри свині. *European scientific congress* : Proceedings of V International Scientific and Practical Conference, Madrid, Spain 12-14 June 2023. Madrid, 2023. P. 68-70.

12. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Оптимізація технології виготовлення стабільної ліпосомальної форми за допомогою прискореного дисперсійного аналізу аналітичним центрифугуванням. *Modern problems of science, education and society* : Proceedings of IV International Scientific and Practical Conference, Kyiv, Ukraine, 19-21 June 2023. Kyiv, 2023. P. 143-146.

13. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Оптимізація процесу стерильної фільтрації ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу *Theoretical foundations of scientists and modern opinions regarding the implementation of modern trends* : Proceedings of the XXV International Scientific and Practical Conference, San Francisco, USA, June 27–30, 2023. P. 309-311.

ANNOTATION

Kruglov E. M. Development of technology and standardization of liposomal form of eye drops of reparative action based on a peptide complex. – Qualifying scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 “Pharmacy, industrial pharmacy” (22 – Health care). – National Pharmaceutical University, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2025.

The dissertation is devoted The dissertation is devoted to the development of the composition and technology for obtaining a liposomal form of eye drops with reparative and anti-inflammatory effects based on a peptide complex from pig skin .

The first section is devoted to the analysis of modern principles of treatment of eye diseases. The conducted studies highlighted the role of regulatory peptides in the treatment of disorders of biochemical and regenerative processes. The analysis indicated that peptides are powerful regulators of biological processes, and their use as drugs (Drugs) was analyzed.

The analysis of possible routes of delivery of therapeutic proteins to the eye was conducted. The need for effective bioavailability in the eye of various therapeutic proteins was revealed, due to the problem of the presence of multiple ocular barriers. Modern approaches to improving the bioavailability of peptides were considered .

of liposomes as a drug delivery system in diseases of the anterior and posterior segments of the eye and the effectiveness of using liposomal dosage forms (LPs) for the development of ophthalmic drugs are presented .

The relevance and feasibility of creating liposomal eye drops based on a peptide complex from the dermal layer of pig skin is shown. An analysis of the Ukrainian drug market used in ophthalmology as stimulators of corneal regeneration is conducted.

Section 2 defines the general methodology and develops a research plan for the selection and justification of the composition, technology, and quality control of liposomal eye drops based on a peptide complex.

The objects of the study are presented - active pharmaceutical ingredients (API) and excipients that were used in the production of liposomal eye drops based on a peptide complex.

Research methods have been selected that will allow obtaining complete and reliable results.

Section 3 presents the results of experimental studies to substantiate the composition and develop an optimal pilot-industrial technology for the production of liposomal eye drops based on a peptide complex.

Taking into account the physicochemical characteristics of the API and excipients and the influence of excipient concentrations on the critical quality indicators of the drug solution, as well as regulatory requirements for this drug product (eye drops), a target quality profile was developed and critical product quality indicators were determined.

An initial risk assessment of the API parameters and formulation variability was conducted . In order to identify variability for further investigation, a risk assessment was conducted that included prior knowledge, experience with relevant dosage forms, and analysis of drug substance information. These factors were reviewed during process development.

Taking into account the risks for assessing formulation variability , a quantitative composition of excipients was selected that ensures compliance with the requirements of the target product quality profile.

Deproteinized concentrate was chosen as the API of the drug. of the dermal layer of pig skin (produced by "JSC Farmak ", Ukraine) and phosphatidylcholine from soybeans, taking into account the requirements of the State Federal University and the European Federation for ophthalmic drugs . The quantitative content of the deproteinized concentrate dermal layer of pig skin and soybean phosphotidylcholine were selected based on the results of preclinical studies of the drug.

In order to optimize the technological process of obtaining API, the method and parameters of concentration of the deproteinized extract were determined. of the dermal layer of pig skin. The optimal method of evaporation concentrations on a rotary evaporator and process parameters at a temperature of (30 ± 2) °C and a pressure of 20 mPa were established .

A specification for API was developed to implement incoming control.

The concentration of soybean phosphatidylcholine was determined empirically to ensure the encapsulation of porcine dermal peptides into liposomal form. To determine the percentage of encapsulation of deproteinized peptides, of the dermal layer of pig skin in liposomes were applied transmission electron microscopy (TEM) and Romvni microscopy, dynamic light scattering method, high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The concentration of phosphatidylcholine from soybeans was set to 100 mg/ml, at which 100% encapsulation of peptides of the dermal layer of pig skin into the composition of liposomes occurs .

The emulsion particle size sufficient to obtain liposomal drug in the form of eye drops was determined empirically. For a solution of soybean phosphatidylcholine of different sizes, encapsulation of deproteinized protein was carried out. dermal layer of pig skin and the degree of protein encapsulation was monitored . It was found that complete protein encapsulation of deproteinized of the dermal layer of pig skin in 1 liter of liposome solution at a dispersant operating pressure of 20,000 PSI in 20 min occurs in liposome solutions with a size of 120-140 nm and less.

The stability of the prepared liposomal emulsion samples under different homogenization process parameters was determined using a LUMiSizer dispersion analyzer (LUM GmbH , Berlin , Germany). Based on the results of the emulsion stability study, the optimal dispersion method and parameters were determined.

A technology has been developed for obtaining a finished drug of liposomal eye drops based on a peptide complex, which consists of encapsulation of protein concentrate in liposomes , purification of excipients, pH adjustment , sterile filtration of the liposomal emulsion, and filling into vials.

Based on the risk analysis of the technological process, potential risks for critical quality indicators of the drug were identified and an experimental design was developed. Experimental studies established methods for controlling process parameters and monitoring during its course, which reduce certain risks to an acceptable level. Based on statistical modeling, the technology of liposomal eye drops was developed. The optimal parameters of the technological stages of the production process were established.

At the technological stage "Obtaining a liposome solution ", criteria for the particle size of the developed drug are established: the first peak is no more than 100, the second - no more than 400 nm.

At the technological stage " Encapsulation" protein concentrate in liposomes » it was found that complete encapsulation deproteinized protein of the dermal layer of pig skin in 1 liter of liposome solution at a dispersant operating pressure of 20,000 PSI in 20 min occurs in liposome solutions with a size of 120-140 nm and less.

At the technological stage "Dissolution of excipients", the mixing speed and time are set for complete dissolution of excipients.

At the technological stage "Adjusting the pH of the solution", based on previous experience with using a solution of sodium hydroxide and hydrochloric acid to adjust the pH , a 1 M solution of sodium hydroxide and a diluted solution of hydrochloric acid were used.

When choosing a method for sterilization of drugs, sterilization by filtration through a 0.22 μm filter was determined . During the development of the “Solution Filtration” stage, a sterilizing filter was selected and the one with the best throughput was selected . The sterilization ability and compatibility with drugs were confirmed for the selected filter.

At the “Filling Vials” stage, the results of three validation series proved that the use of standard process parameters in the workshop meets the established requirements.

Section 4 presents research on the development of methods for controlling the quality of finished LF - liposomal eye drops based on a peptide complex. Their

physicochemical, microbiological and pharmacotechnological indicators were determined. Based on regulatory requirements, a draft QMS was drawn up.

A method for the quantitative determination of phosphatidylcholine in drugs by HPLC has been developed and validated .

A method for quantitative determination of peptides in drugs by HPLC has been developed. The method has been validated according to the following indicators: "specificity", "correctness", "precision, intralaboratory accuracy", "linearity", "stability of solutions over time", "extraction rate", " robustness ", "limit of quantification", "limit of detection".

A method for determining impurities in drugs by HPLC has been developed. The method has been validated according to the following indicators: "specificity", "precision, intralaboratory accuracy", "linearity", "extraction rate", " robustness ".

Farmak " was studied . The proposed storage period at a temperature of 2-8 °C is 24 months.

Section 5 presents the results of the study of the safety (acute toxicity, subchronic toxicity, local irritant effect) and specific pharmacological activity (primary pharmacodynamics – reparative and anti-inflammatory effect) of the drug – liposomal eye drops based on a peptide complex produced by JSC “ Farmak ”, which underwent preclinical testing at the State Enterprise “State Scientific Center of Medicines and Medical Products” (SE “SSCMLZ”, Kharkiv).

The developed drug (eye drops) on the model of dosed alkaline corneal burn exhibits reparative and anti-inflammatory activity, accelerating the process of natural corneal epithelialization , preventing an increase in the height and thickness of its anterior epithelium, and reducing stromal opacification and inflammation.

Overall, the results of the safety assessment of the drug – liposomal eye drops based on a peptide complex (JSC “ Farmak ”, Ukraine) – allow us to recommend it for obtaining permission to conduct clinical trials.

Keywords: liposomes , emulsion, self-assembled emulsion system, ophthalmic drugs, sterility, pharmaceutical development, technology, validation , sterilizing filtration, analysis, corneal injury.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	18
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ ПРИНЦИПИ ФАРМАКОТЕРАПІЇ ОЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ. ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ, ЩО СТИМУЛЮЮТЬ ПРОЦЕСИ РЕГЕНЕРАЦІЇ ДЛЯ МІСЦЕВОГО ЗАСТОСУВАННЯ В ОФТАЛЬМОЛОГІЇ	29
1.1 Сучасні лікарські засоби, що стимулюють процеси регенерації	29
1.2 Роль регуляторних пептидів у лікуванні захворювань	34
1.3 Очне доставлення терапевтичних білків	37
1.4 Ліпосоми як системи доставляння діючих речовин у разі захворювання переднього і заднього сегментів ока.....	43
1.5 Актуальність створення ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу з дермального шару шкіри свиней	52
1.6 Аналіз ринку лікарських засобів України, які застосовуються в офтальмології як стимулятори регенерації рогівки ока.....	56
Висновки до розділу 1	58
РОЗДІЛ 2 ОБГРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КОНЦЕПЦІЇ ДОСЛІДЖЕНЬ. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ	60
2.1 Обґрунтування загальної методології досліджень.....	60
2.2 Об'єкти досліджень: характеристика активного фармацевтичного інгредієнта та допоміжних речовин.....	62
2.3 Методи дослідження.....	70
2.3.1 Фізико-хімічні дослідження.....	70
2.3.2 Біологічні випробування.	71
2.3.3 Фармакологічні дослідження.....	71
Висновки до розділу 2	72

РОЗДІЛ 3 ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ І ТЕХНОЛОГІЇ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ.....	73
3.1 Теоритичне та експерементальне обґрунтування складу і розроблення цільового профілю, критичних показників якості, первина оцінка ризиків складу лікарського засобу «Концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та фосфатидилхолін», краплі очні	73
3.2 Дослідження фізико-хімічних і технологічних властивостей діючої речовини та фосфоліпідів	82
3.2.1 Концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней.....	82
3.2.2 Фосфатидилхолін із соєвих бобів	84
3.3 Оптимізація технології АФІ концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней.....	86
3.4 Розроблення технології ліпосомального засобу у формі очних крапель	90
3.4.1 Теоретичне та експериментальне обґрунтування способу отримання ліпосомального лікарського засобу у формі очних крапель.....	90
Висновки до розділу 3	111
РОЗДІЛ 4 РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ОЧНИХ КАРЕПЛЬ НА ОСНОВІ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСУ. ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ПРЕПАРАТУ.....	114
4.1 Розроблення методик контролю якості ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу.	114
4.1.1 Розроблення методик ідентифікації та кількісного визначення	114
4.1.2 Розроблення методики аналітичної методики на «Супровідні домішки»	134

4.1.3 Розроблення проєкту МКЯ на ліпосомальні краплі очні на основі пептидного комплексу.....	143
4.2 Вивчення стабільності ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу в процесі зберігання.....	144
Висновки до розділу 4	148
РОЗДІЛ 5 БІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ОЧНИХ КРАПЕЛЬ.....	
5.1 Обговорення результатів доклінічного вивчення ефективності та безпеки ліпосомальних очних крапель	149
5.1.1 Вивчення гострої токсичності лікарського засобу.....	149
5.1.2 Вивчення субхронічної токсичності лікарського засобу.....	151
5.1.3 Дослідження морфоструктури внутрішніх органів і тканин експериментальних тварин.....	152
5.2 Вивчення місцевоподразливої дії лікарського засобу та дослі- дження специфічної фармакологічної активності. Вивчення місцевоподразли- вої дії лікарського засобу	155
Висновки до розділу 5	156
ВИСНОВКИ.....	157
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	159
ДОДАТКИ.....	180

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АС – аутологічна сироватка

АТФ – аденозинтрифосфат

АТХ (АТС) – анатомо-терапевтично-хімічна класифікація

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

БАР – біологічно активні речовини

ВЕРХ – вискоєфективна рідинна хроматографія

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ВОТ – внутрішньоочний тиск

ВПГ – вірус простого герпесу

ГОб – гематоофтальмологічний бар'єр

ГХ – газова хроматографія

ДЗ ДНЦЛЗ – Дослідний завод Державного наукового центру лікарських засобів і медичної продукції

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДП «ДНЦЛЗ» – ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції»

ДФУ – Державна фармакопея України

ЄФ – Європейська фармакопея

ІХС – ішемічна хвороба серця

КПЯ – критичні показники якості

КУО – колонієутворювальні одиниці

ЛЗ – лікарський засіб

ЛФ – лікарська форма

МБЧ – мікробіологічна чистота

МКЯ – методики контролю якості

МПА – медроксипрогестерону ацетат

НФаУ – Національний фармацевтичний університет

ПАТ – приватне акціонерне товариство

ПЕГ – поліетиленгліколь
РНК – рибонуклеїнова кислота
РСЗ – робочий стандартний зразок
СДЕ – стійкий дефект епітелію
ТШХ – тонкошарова хроматографія
УФ – ультрафіолет
ХСО – хвороба сухого ока
ЦМВ – цитомегаловірус
ЦНС – центральна нервова система
ЦПЯП – ціловий профіль якості продукту
ШКТ – шлунково-кишковий тракт
ШС – штучні слъози
АТС – Anatomical Therapeutic Chemical
CAS – реєстраційний номер хімічних сполук
СМА – критичні показники якості матеріалів
СРР – критичні параметри процесу
СQA – критичні показники якості
CS – стратегія контролю
DS – проектування простору дизайну
EGF – епідермальний фактор росту
ЕМА – Європейське медичне агентство
FDA – Food and Drug Administration (Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США)
НРМС – гіпромелоза
HSP47 – білок теплового шоку 47
ICH – Міжнародна рада з гармонізації технічних вимог до лікарських засобів
PDGF – тромбоцитарний фактор росту
PRGF – плазма, збагачена факторами росту
PRP – збагачена тромбоцитами плазма
QbD – якість під час розроблення

QTPP – профіль якісних характеристик лікарського засобу

RSD – стандартне квадратичне відхилення

siRNA – коротка інтерферувальна рибонуклеїнова кислота

TEM – трансмісійна електронна мікроскопія

TGF – трансформувальний фактор росту

USP – Фармакопея США

USP RS – референтний стандартний зразок, Фармакопея США

VEGF – судинний ендотеліальний фактор росту

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Захворювання і травми рогівки ока посідають значне місце в офтальмології, мають високу питому вагу в етіології слабкого зору і сліпоти. За даними деяких авторів, травми й опіки рогівки становлять 68-70 % всіх пошкоджень і поранень ока. Тяжкі запальні захворювання рогівки, травми й опіки очей призводять до розвитку виразок і перфорацій рогівки, завершуються формуванням більма, грубих рубцевих змін рогівки і кон'юнктиви та істотним зниженням зору. Пошкодження рогівки може також відбуватися внаслідок кератолітичних і запальних процесів, що викликані інфекцією, або внаслідок рубцювання і неоваскуляризації, пов'язаних з процесом репарації.

Серйозною медичною і соціальною проблемою є опіки очей. Незважаючи на удосконалювання методів консервативного і хірургічного лікування, 40 % постраждалих стають інвалідами. З-поміж них переважно люди молодого працездатного віку. Сучасні методи консервативного лікування опікової хвороби очей дозволяють знизити відсоток ускладнень і збільшити частоту успішного результату терапії опікової травми ока. Однак загальноприйняте консервативне лікування опіків очей не завжди виявляється ефективним. Безуспішність розроблених патогенетично орієнтованих методів лікування часто пов'язана з порушенням репаративно-регенеративних процесів, які можуть супроводжуватись такими ускладненнями, як рецидивна ерозія, виразка рогівки тощо.

У разі захворювань рогової оболонки ока з порушенням цілості її поверхні, травм і опіків очей необхідно прискорення її регенерації та поліпшення обмінних процесів. У комплексному лікуванні уражень рогівки велике значення має використання препаратів тваринного і рослинного походження, що сприяють стимуляції регенерації та містять біологічно активні речовини (БАР), вітаміни, ферменти, мікроелементи тощо.

Вищезазначене свідчить про актуальність проблеми і необхідність розробки нових препаратів багатопланової дії, що одночасно виконують завдання

стимуляції регенерації, захисту уражених тканин ока від несприятливих факторів зовнішнього середовища, відновлення порушених функцій слізної рідини.

В останні десятиліття спостерігається бурхливий розвиток молекулярної біології та біохімії, які вивчають склад, функції, механізми утворення та елімінації біологічно активних пептидів. Біологічні рідини і тканини організму, що містять набір пептидів, які утворюються з функціонально активних високомолекулярних білків шляхом тканинспецифічного ферментативного гідролізу, утворюють пептидний «фон» або «пептидний пул», що відіграє важливу роль у підтриманні гомеостазу (тканинної біохімічної рівноваги) і регуляції багатьох життєво важливих процесів самого загального характеру, наприклад, зростання, диференціація і відновлення клітин. Характерно, що такий вплив реалізується всім комплексом специфічних пептидних молекул.

У літературі широко описано використання препаратів, що містять регуляторні пептиди, які мають унікальну сукупність фізіологічних властивостей на основі екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів свиней і поросят.

На фармацевтичному ринку країни є невелика кількість ЛЗ тваринного походження, що виготовлені на основі пептидних комплексів, які містяться у шкірі свиней. Наявність у шкірі свиней різних хімічних сполук органічної та неорганічної природи: нуклеотидів, гліколіпідів, амінокислот, олігопептидів, електролітів, мікроелементів, вуглеводів, ліпідів і продуктів їх обміну, зумовлює активність ЛЗ тваринного походження. Біохімічний склад шкіри свиней надзвичайно різноманітний, але особливий інтерес викликає присутність широкого спектра амінокислот, колагену, структурних білків, а також інших БАР, зокрема поліпептидного епідермального фактора росту.

Отже, створення препаратів на основі низькомолекулярних пептидів, що виділені зі шкіри свиней, інкорпоровані в ліпосоми і мають специфічну репаративну та протизапальну активність, є актуальним напрямом сучасної медицини і фармації.

Офтальмологічні захворювання досить важко піддаються лікуванню. Очні форми ЛЗ мають бути безпечними, гіпоалергенними і стерильними. На частку топічних форм припадає 90% всіх зареєстрованих ЛЗ. Оновлення слізної рідини, носослізний дренаж, рогівковий епітелій і гематоофтальмічний бар'єр знижують локальну біодоступність ЛЗ та час його перебування на поверхні ока у разі топічного застосування. Тільки 5-10% ЛЗ проникають крізь рогівковий бар'єр. Створення лікарських препаратів на основі наночастинок є одним з перспективних напрямів сучасної нанобіотехнології.

Добре відома низка наноструктур, використовуваних як носії лікарських препаратів: полімерні наночастинки, ліпосоми, нанодисперсії з олії і води, циклодекстрини, наночастинки металів тощо. Вони мають безліч переваг: подовжують час перебування ЛЗ на поверхні рогівки, пролонгують його вивільнення і збільшують біодоступність.

Щоб уникнути проблем з поганою біодоступністю та побічними ефектами, були вивчені різні системи доставляння ліків для лікування офтальмологічних захворювань, включаючи наноматеріали на основі полімерів і ліпідів. Найбільш вивченими наноносіями за офтальмологічних захворювань є ліпосоми, які мають переваги біосумісності і біорозкладання. Деякі ліпосомальні препарати вже використовуються в клінічних випробуваннях лікування захворювань очей. Різні шляхи доставляння і склади були розроблені для оптимізації доставлення ліпосомальних ліків у передній або задній сегмент ока шляхом зміни поверхневого заряду або ліпідної композиції.

Усі ці властивості дозволяють стверджувати, що використання ліпосом як носія депротейнізованого дермального шару шкіри свиней для ранозагоювального препарату забезпечить найкращу біодоступність.

Отже, перспективи створення ЛЗ на основі концентрату екстракту депротейнізованого дермального шару шкіри свиней зі специфічною репаративною та протизапальною активністю визначили тему і мету нашого дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану інноваційного

розвитку АТ «Фармак» 2015-2030 рр. та науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету, зокрема наукової тематики кафедри аптечної технології ліків за темою «Розробка складу, технології та біофармацевтичні дослідження лікарських засобів на основі природної та синтетичної сировини» (шифр держреєстрації 0114U000945 зареєстрований у 2014 р. та перереєстрований у 2024 р.).

Мета і завдання дослідження

Розроблення та стандартизація ліпосомальної форми очних крапель із репаративною та протизапальною дією на основі пептидного комплексу.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- проаналізувати сучасний стан розвитку ліпосомальних препаратів, вивчити перспективну сировину тваринного походження для створення ЛП, методи досліджень і способи отримання ліпосом, нормативні документи інших країн щодо їх стандартизації;
- обґрунтувати загальну концепцію та методи досліджень, визначити методологію створення ліпосомальних препаратів на основі сировини тваринного походження (шкіри свиней) у формі очних крапель;
- теоретично та експериментально обґрунтувати склад ЛЗ у формі очних крапель на основі депротейнізованого концентрату екстракту з дермального шару шкіри свиней;
- обґрунтувати спосіб отримання ліпосом, дослідити процес фільтрації та визначити критичні параметри технології розробленого препарату, розробити промислову технологію ЛЗ у формі ліпосомальних очних крапель;
- провести фізико-хімічні дослідження препарату, розробити методики контролю якості (МКЯ) їх основних показників і вмісту АФІ та провести їх валідацію, визначити фактори, що впливають на стабільність розробленого ЛЗ у формі очних крапель й установити термін їх придатності;
- розробити технологічні інструкції (протоколи виготовлення серій, інструкції з пакування, виробничу рецептуру, МКЯ) та апробувати й упровадити розроблення ЛЗ у промислове виробництво ПАТ «Фармак»;

- узагальнити дані біологічних досліджень ЛЗ у формі очних крапель.

Об'єкт дослідження. Фармацевтична розробка самоорганізованої емульсійної системи доставки депротейнізованого пептидного комплексу із епідермального шару шкіри свиней та фосфоліпідів у формі очних крапель, дослідження технологічного процесу ліпідно-пептидного самоорганізованого емульговального комплексу та його стандартизація.

Предмет дослідження. Наукове обґрунтування складу і технології ліпосомальних очних крапель. Визначення способу отримання ліпосом, концентрації АФІ і допоміжних речовин, дослідження фармакотехнологічних, фізико-хімічних властивостей, розроблення методик постадійного контролю технології, стандартизації і вивчення стабільності препаратів.

Методи дослідження

Для розроблення та вивчення властивостей ЛЗ було використано методи, які широко застосовуються у фармацевтичній практиці: органолептичні (зовнішній вигляд); технологічні; фізичні та фізико-хімічні; біохімічні, мікробіологічні та біологічні (обґрунтування концентрації діючих речовин, визначення специфічної активності). Якісний і кількісний аналіз діючих речовин здійснювали з допомогою методів ВЕРХ і екстракційної спектрофотометрії.

Експериментальні дані були оброблені з допомогою методів математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше проведене комплексне дослідження з розробки ліпосомального комплексу з депротейнізованого шару шкіри свиней та фосфатидилхоліном соєвих бобів з використанням сучасних методів дослідження, обрані підходи до обґрунтування складу та оцінки ризиків шляхом «якість через розробку». Оптимізована технологія концентрування депротейнізованого шару шкіри свиней. Розроблено основні методики кількісного визначення діючих речовин очних крапель та супутніх домішок і проведена їх валідація, розроблено проєкт МКЯ. Проведені дослідження створюють теоретико-прикладну базу для подальшої розробки лікарських засобів репаративної та протизапальної дії у формі

очних крапель та удосконалення фармацевтичної допомоги хворим на офтальмологічні захворювання в Україні.

Визначено умови зберігання і терміни придатності розробленого ЛЗ, які забезпечують стабільність упродовж зберігання і використання.

Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель № 152253 від 11.01.2023 «Спосіб одержання композиції протизапальної та регенеруючої дії».

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено та введено у виробництво АТ «Фармак» новий препарат для офтальмологічної практики у формі очних крапель зі специфічною репаративною та протизапальною дією на основі удосконаленого пептидного комплексу..

Напрацьовано досліджувану серію з метою проведення доклінічних випробувань (токсикологічних досліджень, дослідження специфічної активності) та вивчення стабільності ЛЗ.

У результаті проведених досліджень безпечності, ефективності та стійкості було доведено перспективність упровадження в медичну практику нового способу одержання лікарського засобу із специфічною репаративною дією, що може бути використаний для терапії механічних травм рогівки і кон'юнктиви для прискорення процесу їх загоєння в післяопераційний період; для лікування хімічних, термічних і променевих опіків рогівки, виразок і дистрофії рогівки різного генезу тощо.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною завершеною науковою працею. Разом з науковим керівником було визначено мету та основні задачі досліджень, розроблено методичні підходи, на основі яких обрано методи виконання практичної частини дисертаційної роботи.

Особисто автором проаналізовано та узагальнено дані сучасних наукових джерел з досліджуваної проблеми. На підставі теоретичних даних та експериментальних досліджень розроблено склад і технологію та методики контролю якості ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу,

вивчено їх фізико-хімічні властивості. Статистично оброблено, проаналізовано і систематизовано результати експериментальних досліджень. Розроблено проєкт технологічного регламенту на виробництво ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу, а також проєкт МКЯ.

Узагальнено результати мікробіологічних досліджень, які було проведено на базі ПАТ «Фармак».

З наукових праць, опублікованих у співавторстві, у дисертації наведені лише ті положення, розробки та рекомендації, що є результатом особистих досліджень автора.

Співавторами наукових праць є науковці, спільно з якими проведені дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Визначення мети та завдань, обговорення результатів дослідження, формулювання висновків проведено разом з науковим керівником.

Персональний внесок дисертанта в усіх опублікованих працях зі співавторами (Т. Г. Ярних, Г. І. Борщевським, О. А. Рухмаковою, П. О. Безденежних, К. О. Дякун, І. О. Омельченка, Л. А. Чайки) вказано за текстом дисертації.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на: Міжнародній науково-практичній конференції «Science and society : 15th International conference» (Гамільтон, Канада, 2019); Міжнародній науково-практичній конференції «Society and science. Problems and prospects : Proceedings of the III International Scientific and Practical Conference» (Лондон, Велика Британія, 2022); Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (м. Харків, Україна, 2023); Міжнародній науково-практичній конференції «Scientific progress: innovations, achievements and prospects» (Мюнхен, Німеччина, 2023); Міжнародній науково-практичній конференції «Innovations and prospects in modern science» (Стокгольм, Швеція, 2023); Міжнародній науково-практичній конференції «European scientific congress» (Мадрид, Іспанія, 2023); Міжнародній науково-практичній конференції «Modern problems of science,

education and society» (м. Київ, Україна, 2023); Міжнародній науково-практичній конференції «Theoretical foundations of scientists and modern opinions regarding the implementation of modern trends : Proceedings of the XXV International Scientific and Practical Conference» (Сан-Франциско, США, 2023).

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 195 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, огляду літератури, 4 розділів експериментальної частини, висновків, 3 додатків і списку використаних джерел. Обсяг основного тексту – 158 сторінок. Робота ілюстрована 59 таблицями та 21 рисунками. Список використаних джерел містить 206 найменування, з них 34 кирилицею та 171 латиницею.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ ПРИНЦИПИ ФАРМАКОТЕРАПІЇ ОЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ. ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ, ЩО СТИМУЛЮЮТЬ ПРОЦЕСИ РЕГЕНЕРАЦІЇ ДЛЯ МІСЦЕВОГО ЗАСТОСУВАННЯ В ОФТАЛЬМОЛОГІЇ

1.1 Сучасні лікарські засоби, що стимулюють процеси регенерації

Регенерація тканин і органів відбувається в усьому тваринному світі, і це явище, зрозуміло, захоплювало наукову уяву протягом сотень років [1]. Існують значні відмінності в здатності до регенерації як між видами (наприклад, амфібії проти ссавців), так і між органами (наприклад, печінка проти нирок). Дослідження цих відмінностей запропонувало уявлення про механістичну основу регенерації та зменшений або явно відсутній регенеративний потенціал у певних системах, включаючи багато тканин людини [2-6]. У цьому сценарії велика увага, зосереджена на регенеративній медицині, зрозуміла, враховуючи потенціал відновлення або заміни старих, відсутніх, пошкоджених або хворих клітин, тканин і органів. Власне, технології регенеративної медицини розроблені спеціально для цього. Складність ендогенної регенерації, відносно обмежена здатність ссавців до регенерації та величезна нестача донорських органів у поєднанні зі, здавалося б, постійно продовжуваною тривалістю життя людей створили величезний попит на регенеративну медицину.

Коли з'являється нестача життєздатної тканини, як у багатьох випадках травматичного ушкодження та вроджених і набутих станів, ступінь дисфункції кінцевого органа може бути настільки великим, що перевищує ендогенну регенеративну здатність органа чи тканини. У цьому сценарії будь-які ендогенні механізми відновлення вимагатимуть набагато більшого посилення.

Можливо, важливість біології розвитку (і, звичайно, ендогенної регенерації) для регенеративної фармакології була очевидною із самого початку. Тобто хімічні процеси керують найбільш фундаментальними аспектами

формування та росту тканин і органів (тобто морфогенезу), а також регенерації. Наслідки цього для регенеративної фармакології зрозумілі, оскільки позаклітинні сигнальні молекули, відомі як морфогени, модулюють долю, рух і організацію клітин під час морфогенезу як у ембріонів, так і в дорослих [7-13]. Передача сигналів катехіну, ретиноева кислота та багато інших, як відомо, сприяють морфогенезу через ретельно організовану серію подій. На активність цих факторів впливають їхні відповідні профілі дифузії, ефективні градієнти концентрації та співвідношення концентраційної відповіді, а також їхня потенційна модуляція/гасіння позаклітинним матриксом та іншими компонентами позаклітинного середовища. Тобто вимоги до розподілу морфогенів для нормального формування та розвитку тканин свідчать про те, що будуть потрібні нові технології доставляння ліків, щоб гарантувати ефективне модулювання градієнтів морфогенів для лікувальної терапії. Звичайно, це забезпечує ще один важливий зв'язок із регенеративною фармакологією (розроблення системи доставляння ліків).

ЛЗ, які мають здатність стимулювати процеси регенерації тканин, класифікують відповідно до локалізації їх дії, а саме на загальноклітинні (універсальні) та тканинноспецифічні.

До універсальних ЛЗ регенерації, які діють на будь-яку тканину, що відновлюється, належать стероїдні та нестероїдні анаболіки; вітаміни пластичного обміну; коректори тканинного обміну – ЛЗ, які поліпшують трофіку і процеси регенерації тканин: гемодериват із крові телят депротейнізований, екстракт депротейнізованого гемодіалізату з крові телят, глікозаміногліканопептидний комплекс, глюкозамін, цитохром С; біогенні стимулятори: соки алое, каланхое, завись плаценти, склоподібне тіло; ЛЗ, які містять отруту бджіл та продукти їх життєдіяльності, прополіс тощо); антиоксиданти: кислота аскорбінова, рутин, токоферолу ацетат, ретинолу ацетат; олійний розчин, що містить вітаміни А, Е, К₃ та бета-каротин; тіотриазолін, гемодериват з крові телят депротейнізований.

До тканинноспецифічних належать ЛЗ з різним механізмом дії, які об'єднані в підгрупи за селективністю дії на ту чи іншу тканину або систему

органів; ЛЗ, що відновлюють утворення формених елементів крові в кістковому мозку (натрію дезоксирибонуклеїнат, метилоксиметилурацил та ін.); ЛЗ, що стимулюють та відновлюють процеси у хрящовій тканині: ергокальциферол, кислота аскорбінова, токоферолу ацетат; препарати кальцію, фосфору, фтору та ін.; ЛЗ, які мають здатність підсилювати регенеративні процеси в кістковій тканині: хондроїтину сульфат, хондроїтину фосфат, осеїнгідроксіапатитний комплекс, глюкозамін, кислота гіалуронова та ін.; ЛЗ, які виявляють регенеративну дію відносно нейронів – концентрат церебраліну та ін.; ЛЗ, які регулюють регенерацію судин головного мозку (порушень мозкового кровообігу) – вінпоцетин та ін.; ЛЗ, що впливають на систему згортання крові та фібриноліз – мазь гепатромбін та гепаринова. Однією із найпоказовіших є група ЛЗ, які стимулюють регенерацію та репарацію слизової оболонки ШКТ і сприяють прискоренню процесу загоєння ерозивно-виразкових дефектів: вісмуту субцитрат, даларгін, ромашка лікарська та ін.; велика група ЛЗ, які впливають на регенерацію та репарацію шкіри (мазі левоміцетин + сульфадиметоксин + метилурацил + тримекаїн; метилурацил + хлорамфенікол; гель, що містить цибулі екстракт рідкий + гепарину натрій + алантоїну; мазь цинку гіалуронат; мазь на основі мірамістину; олійний розчин, що містить вітамін А, Е, К₃ та бета-каротин; мазь на основі лінетолу, метилурацилова, альтанова, календули, живокоста, ромашки, а також настоянка прополісу, софори японської, соки алое, каланхое, подорожника, гель мірамістин + пантенол та ін.) [7-13].

Загальний механізм репаративної дії: посилення біосинтезу пуринових та піримідинових основ, РНК, ДНК, білка, фосфоліпідів, функціональних та ферментативних клітинних елементів. Процес біосинтезу білків та фосфоліпідів характеризується високою енергоємністю, його стимуляція потребує поліпшення окисного фосфорилування, утилізації кисню та глюкози, сприяння накопиченню макроергічних фосфатів (гемодериват із крові телят депротейнізований, екстракт депротейнізованого гемодіалізату з крові телят та ін.); для стимуляції синтезу глікозаміногліканів та колагену хряща (глікозаміногліканопептидний комплекс, глюкозамін та ін.), заповнення дефіциту ендогенного

глюкозаміну, який необхідний для біосинтезу протеогліканів та гіалуронової кислоти (глюкозамін), стимулювання окисно-відновних реакцій (цитохром С). Крім того, гальмування вільнорадикальних реакцій та ліберачії лізосомальних ферментів, посилення місцевого синтезу простагландинів, здатних покращувати мікроциркуляцію в слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту (ШКТ) (ЛЗ, які стимулюють регенерацію та репарацію слизової оболонки ШКТ) [14, 15].

Фармакодинаміка. Репаративну дію виявляють усі ЛЗ, що належать до цієї групи. Репаранти виявляють також анаболічну дію (метилоксиметилурацил, тіотриазолін), стимулюють метаболічні процеси (соки алое, каланхое, запись плаценти, склоподібне тіло, натрію нуклеоспермат). Мають протизапальну (метилоксиметилурацил, прополіс, мазі цинку гіалуронат, календули, обліпихи, шипшини, ромашки, настоянка софори японської, соки алое, каланхое), антиоксидантну (вітаміни С, А, Е, Р, мазі обліпихи, шипшини, тіотриазолін, гемодериват із крові телят депротейнізований), антигіпоксичну (вітаміни РР, Е, А, тіотриазолін, гемодериват із крові телят депротейнізований), мембраностабілізуювальну (тіотриазолін, екстракт депротейнізованого гемодіалізату із крові телят, мазі календули, обліпихи), антибактеріальну (вісмуту субцитрат, цинку гіалуронат, прополіс, полівінокс, сік каланхое, мазі календули, ромашки, настоянка софори японської та ін.), ранозагоювальну (ЛЗ, які впливають на регенерацію та репарацію шкіри). Виявляють дію, що стимулює синтез лейкоцитів (метилоксиметилурацил, натрію дезоксирибонуклеїнат), антикоагулянтну (відновлюють баланс згортальної та протизгортальної систем крові, поліпшують локальну мікроциркуляцію та трофіку шкіри – гель на основі гепарину, мазь гепаринова), гепатопротекторну (тіотриазолін, прополіс), кардіопротекторну (тіотриазолін), цитопротекторну (екстракт депротейнізованого гемодіалізату з крові телят, цитохром С), хондропротекторну (гемодериват із крові телят депротейнізований, екстракт депротейнізованого гемодіалізату з крові телят, глікозаміногліканопептидний комплекс, глюкозамін),

кровоспинну (настоянка софори японської) дію. Сприяють відновленню процесів у хрящовій тканині (вітаміни D, C, E, препарати кальцію, фосфору та фтору, хондроїтину сульфат, хондроїтину фосфат, осеїнгідроксіапатитний комплекс, глюкозамін та ін.), поліпшенню мозкового кровообігу (коректори порушень мозкового кровообігу – вінпоцетин та ін.). Володіють ноотропною (ноотропи – концентрат церебралізину та ін.), гастропротекторною (вісмуту субцитрат, мізопростол та ін.), в'язучою (вісмуту субцитрат, даларгін тощо), протисвербіжною (настоянка календули), імуностимулювальною (натрію дезоксирибонуклеїнат, олія шипшини, соки алое та каланхое, завись плаценти, скловидне тіло), жовчогінною (тіотриазолін, олія шипшини) дією [15, 16].

Показання до застосування. ЛЗ, які містять репаративний компонент дії, використовують для лікування таких захворювань, як: остеопороз, хронічні інфекції, травми, опіки (анаболічні стероїди); виразка шлунка та дванадцятипалої кишки, гіперацидний гастрит (нестероїдні анаболіки); рани, що не загоюються, опіки, гіпотрофія, обмороження, анемія, лейкоїзм, променева хвороба, кон'юнктивіт і кератит (вітамін B₂); цукровий діабет, екзема, дерматит, трофічні виразки (вітамін B₅, декспантенол); атеросклероз, ішемічна хвороба серця (ІХС), рани, що довго не загоюються (вітамін РР), порушення мозкового та периферійного кровообігу, трофічні виразки (гемодериват із крові телят депротейнізований, екстракт депротейнізованого гемодіалізату з крові телят); остеоартроз, остеохондроз (глікозаміногліканопептидний комплекс, глюкозамін); рани, опіки, запальні захворювання порожнини рота, горла й токсичні ураження печінки, ерозивні ураження ШКТ (прополіс та ін.); ураження шкіри: обмороження, опіки, рани, іхтіоз, фолікулярний дискератоз, старечий кератоз, туберкульоз шкіри, деякі форми екземи, псоріаз, запальні та ерозивно-виразкові ураження кишечника, цироз печінки, хронічний гастрит тощо (вітамін А); анемія (стимулятори гемопоезу, вітамін Р); комплексна терапія анемії, атеросклерозу, ІХС, дерматиту, псоріазу (вітамін Е); остеоартроз, рахіт, консолідація кісток (вітаміни D, Е, С); остеопороз, переломи кісток (церебралецитин,

кальцію глюконат та ін.); остеоартроз, остеохондроз (хондроїтину сульфат, хондроїтину фосфат, осейнгідроксіапатитний комплекс, гіалуронова кислота, глюкозамін); ІХС, гіпоксія, порушення мозкового та периферійного кровообігу, дихальна недостатність, трофічні виразки (цитохром С, гемодериват із крові телят депротейнізований, глікозаміногліканопептидний комплекс); черепно-мозкові травми, інсульт, атеросклероз (концентрат церебrolізину); лікування сітківки ока (комплекс поліпептидів + гліцин); профілактика та лікування гострих і хронічних порушень мозкового кровообігу, черепно-мозкових травм, мігрені (вінпоцетин та ін.). Репаранти тканиннспецифічні для місцевого застосування (мазь левоміцетин + сульфадиметоксин + метилурацил + тримекаїн; метилурацил + хлорамфенікол; мірамістин та ін.) необхідні для лікування пацієнтів з ранами, опіками, обмороженнями, пролежнями, виразками, трофічними виразками [15-17].

1.2 Роль регуляторних пептидів у лікуванні захворювань

Останні десятиліття увагу вчених провідних країн світу привертають дослідження ролі пептидів у регуляції основних функцій організму, зокрема й на молекулярному рівні [14-17]. У зв'язку з цим у світовій фармацевтиці з'явилося багато нових препаратів пептидної природи.

Ці препарати привертають увагу своїм природним походженням, високою ефективністю, можливістю використання у малих дозах, відсутністю побічних реакцій.

Існує понад 7000 визнаних природних пептидів, які беруть активну участь у широкому діапазоні таких біологічних дій, як нейротрансмісія, гормональні функції, активність факторів росту, антимікробна активність та імуномодуляція [18-21]. Терапія на основі пептидів виявляє значну ефективність у лікуванні різних захворювань, включаючи гормональну недостатність, аутоімунні розлади, інфекції, діабет і різні види раку [21-23]. Ці терапевтичні засоби є вибірковими та специфічними щодо рецепторів клітинної поверхні, що пов'язані

з G-білком, або іонні канали, які, зі свого боку, стимулюють їх внутрішньоклітинні ефекти [24, 25]. Менший розмір терапевтичних засобів на основі пептидів дозволяє їм глибше проникати в такі тканини, як шкіра, кишечник тощо, порівняно з іншими більшими біомолекулами, наприклад, антитілами, що допомагає їм швидше проникати в кров [26-28]. Вони мають низьку імуногенність і високу цільову специфічність порівняно з малими молекулами ліків [29].

Малі молекули націлені лише на 2-5% геному людини, але пептиди є більш селективними щодо конкретних білкових мішеней [30-34]. Крім того, пептиди мають відносно нижчу вартість виробництва, ніж рекомбінантні білки та антитіла [35, 36], мають нижчу швидкість накопичення в тканинах [37]. Останнім часом на ринок вийшли кілька препаратів на основі пептидів, які демонструють ефективність проти алергійних захворювань, інфекційних захворювань, аутоімунних захворювань, фіброзу, астми тощо [38-42].

Великий інтерес становить вивчення впливу пептидів на стовбурові клітини з метою збільшення ресурсу організму до генетично запрограмованої межі життя [43, 44]. З-поміж таких препаратів важливе місце посідають ЛЗ на основі пептидних комплексів, виділених з органів і тканин тварин.

Одним з відомих ефективних ЛЗ на фармацевтичному ринку є Румалон (S.C. ROMPHARM Company, S.R.L., Румунія). Препарат містить глікозамінний глікан-пептидний комплекс, виділений з хрящів та кісткового мозку телят. Цей засіб впливає на порушений обмін речовин у хрящовій гіалі нової тканини; посилює біосинтез сульфатованих мукополісахаридів, стимулює регенерацію суглобового хряща та гальмує катаболічні процеси у хрящовій тканині [45].

Також добре відомий ЛЗ Раверон (Robapharm, Швейцарія). Цей препарат стандартизовано як поліпептидний екстракт з передміхурової залози великої рогатої худоби. Раверон виявляє нормалізувальну дію на функцію передміхурової залози, покращує уродинаміку і стимулює гладкі м'язи сечового міхура за різних патологій сечостатевої системи [46].

Великою увагою в медичній практиці користується ЛЗ Актовегін (Takeda Austria, GmbH, Австрія). Цей препарат є очищеним від білка поліпептидним екстрактом із крові телят; стимулює енергетичні процеси в клітинах, підвищує засвоєння глюкози і кисню тканинами, що поліпшує кровообіг і регенерацію тканин [47].

Відомий ЛЗ Солкосерил (Legacy Pharmaceuticals Switzerland, GmbH, Швейцарія), який близький до Актовегіну з фармакологічної дії. Препарат являє собою депротейнізований діалізат з крові телят, що містить широкий спектр низькомолекулярних компонентів з молекулярною масою до 10 кДа (зокрема глікопротеїди, нуклеозиди та нуклеотиди, амінокислоти, олігопептиди). Солкосерил стимулює регенерацію тканин, поліпшує транспорт кисню та глюкози до клітин, підвищує синтез АТФ у клітинах, стимулює проліферацію фібробластів та синтез колагену в ендотелії судин [48, 49].

Протягом тривалого часу в медичній практиці у нашій країні використовується ЛЗ Церебролізін (EVER Neuro Pharma GmbH, Австрія). Церебролізін виділено з головного мозку свиней та містить низькомолекулярні біологічно активні нейропептиди, які проникають крізь гематоенцефалічний бар'єр і регулюють функції нейронів головного мозку.

Препарат нормалізує метаболізм і чинить органоспецифічну дію на клітини головного мозку в умовах гіпоксії та ішемії, поліпшує внутрішньоклітинний синтез білка в головному мозку у разі його старіння.

Церебролізін належить до ноотропних засобів і чинить нормалізувальний вплив за порушення когнітивних функцій, поліпшує процеси запам'ятовування [50].

Відомий ЛЗ Тимостимулін (TP-1 Serono, Швейцарія), що являє собою екстракт, який містить комплекс поліпептидів або мусу великої рогатої худоби. Тимостимулін сприяє збільшенню кількості та підвищенню активності Т-лімфоцитів в умовах їх дефіциту (первинні та вторинні імунодефіцити) [51].

1.3 Очне доставлення терапевтичних білків

Ідеальні терапевтичні системи доставляння білка в очі повинні забезпечувати стабільне доставлення інкапсульованих білків, тривале вивільнення, підтримку ефективних концентрацій у цільових тканинах і мінімальну інвазивність з низьким системним впливом. Звичайною практикою є комбінування таких технологій, як ін'єкційні гідрогелі, що містять нано- або мікрочастинки, ліпосоми або наночастинки, що містять терапевтичні білки, покриті біоадгезивними полімерами [52, 53]. Переваги тривалого доставлення терапевтичних білкових композицій полягають у поліпшеному комплаєнсі пацієнта, прихильності до тривалої терапії та місцевого доставлення з меншою кількістю побічних ефектів і зменшенням дозування та частоти дозування [54].

На сьогодні велика увага приділяється розробленню більш ефективного неінвазивного тривалого доставлення ліків для лікування очних захворювань переднього і заднього сегментів ока.

Досягнення ефективної біодоступності в очах різних терапевтичних білків залишається проблемою через наявність багатьох очних бар'єрів (рис. 1.1). Крім того, такі захворювання, як вікова дегенерація жовтої плями, діабетична ретинопатія та цитомегаловірусний (ЦМВ) ретиніт потребують доставлення терапевтичних білків до задньої частини ока. Тут статичні (різні шари рогівки, склери та сітківки, включаючи гематоофтальмологічний (ГОВ) та гематоретинальні), динамічні (хоріоїдальний і кон'юнктивальний кровотік, лімфатичний кліренс і розрідження сліз) бар'єри й ефлюксні насоси разом становлять значну проблему для доставлення ліків до заднього сегмента ока [55].

Виведення терапевтичних білків з організму відбувається подібно до молекул ендогенних пептидів, тобто ферментативне розщеплення з печінки, нирок, крові та тонкої кишки, хоча ті, що виявляють ферментативну резистентність, можуть бути еліміновані через печінку або нирки на основі їх ліпофільності. Лише менше 1% терапевтичних білків з молекулярною масою > 4000 Да

виявляють небажану імунну відповідь після введення, що призвело до невдачі деяких клінічних випробувань [56].

З основних бар'єрів, присутніх в оці, які перешкоджають очному доставленню терапевтичних засобів, є статичні та динамічні бар'єри. Статичні бар'єри містять різні шари рогівки, склери та сітківки, а також ГОБ, тоді як динамічні бар'єри містять слізну плівку, хоріоїдальний і кон'юнктивальний кровотік та лімфатичний кліренс, що перешкоджають руху молекул ліків із передньої частини очної кулі до задніх тканин [56, 57]. Висока селективність бар'єрів сітківки обмежує рух препаратів, що вводяться місцево, до заднього сегмента. Крім того, системно введені препарати мають подолати очні бар'єри крові, щоб досягти сітківки. Використання системного шляху доставлення для лікування очей має кілька обмежень, пов'язаних із потребою у високих дозах через системний метаболізм і погану проникність крізь ГОБ. Крім того, вплив на нецільові органи може викликати системну токсичність і серйозні побічні ефекти [57].

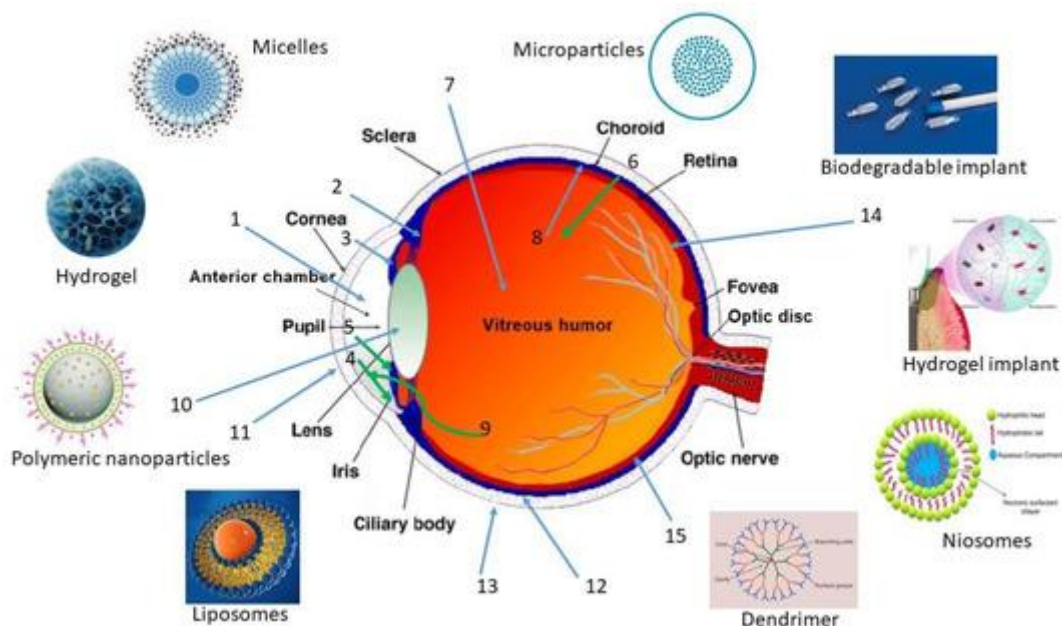


Рис. 1.1 Схематичне зображення різних підходів до складу та шляхів введення в тканини ока: 1) транскорнеальне проникнення в передню камеру; 2) некорнеальне проникнення препарату крізь кон'юнктиву до склери в передню сечову оболонку; 3) розподіл препарату в передню камеру з крові крізь

ГОВ; 4) виведення препарату з передньої камери водянистою вологою до трабекулярної сітки і канал Шлемма; 5) елімінація препарату з водянистої вологи в системний кровообіг крізь гематоенцефалічний бар'єр; 6) розподіл препарату з крові в задній сегмент крізь гематоретинальний бар'єр; 7) інтравітреальний шлях; 8) елімінація ліків зі склоподібного тіла через задній шлях крізь гематогенний бар'єр сітківки; 9) елімінація препарату зі склоподібного тіла через передній шлях до задньої камери; 10) внутрішньокамерний шлях; 11) інтрастромальний шлях; 12) субкон'юнктивальний шлях; 13) субтеноновий шлях; 14) супрахориоїдальний шлях; 15) субретинальний шлях

Місцевий шлях є кращим для доставлення ліків у передню камеру ока для лікування катаракти, сухого ока, а також запальних та інфекційних захворювань рогівки та кон'юнктиви [57]. Місцевий шлях доставлення в око зазвичай не використовується для доставлення терапевтичних білків до тканин сітківки через наявність очних бар'єрів; лише <5% інстильованої дози потрапляє крізь передній сегмент до заднього через слізну плівку та рогівку (епітелій, ендотелій і строму) до передньої камери ока [52, 53, 54, 58, 59].

Ступінь поглинання молекул препарату з поверхні рогівки дуже обмежений такими різними фізіологічними бар'єрами, як:

1. Епітелій рогівки, який вибірково пригнічує дифузію таких гідрофільних і високомолекулярних молекул, як білки та пептиди, парацелюлярним шляхом і вибірково запобігає транспорту іонів. Проникність макромолекул дуже обмежена наявністю тісних контактів рогівки та ліпофільною природою епітелію рогівки.

2. Ендотелій, який відповідає за гідратацію рогівки.

3. Внутрішня строма, яка має гідрофільну природу та перешкоджає проникненню більшої кількості ліпофільних молекул.

Ці бар'єри захищають очі від проникнення токсичних речовин і патогенних речовин і підтримують гомеостаз. Крім того, завдяки високій швидкості зсуву, обороту сльози та її розрідженню більшість (>95%) інстильованої дози виводиться через носослізну протоку у ШКТ, що призводить до інших системних побічних ефектів. Ферменти у циліарному тілі розкладають препарат із

водянистої вологи, проникність рогівки також обмежена залежно від розміру молекули, поверхневого заряду та гідрофільності ліків [60]. Великі та гідрофільні препарати показали погану проникність порівняно з малими та ліпофільними пептидами зі щільного з'єднання епітелію рогівки (близько 2 нм) [60]. Позитивно заряджені молекули можуть легко проходити крізь рогівку оком шляхом зв'язування з негативно зарядженою мембраною рогівки [61].

Ліпофільні препарати розподіляються до тканин рогівки через транскорнеальний шлях (тобто рогівка > водяниста волога = райдужка = циліарне тіло > передня частина склери > кришталик), тоді як гідрофільні препарати мають тенденцію рухатися до задньої камери шляхом кон'юнктива – склера. Великі молекулярні препарати, які показують погану проникність рогівки, минають шлях проникнення в епітелій рогівки та піддаються некорнеальному поглинанню [61]. Ліпофільні пептиди з молекулярним розміром >700 Да виявляють хорошу проникність мембрани [62, 63].

Очне доставлення білкових терапевтичних засобів в око залежить від кількох факторів: проникність мембрани, елімінація з ока, нецільове зв'язування та деградація протеолітичними ферментами. Проникність мембрани та очна елімінація тісно залежать від їх розміру, поверхневого заряду, гідрофільності та ліпофільності [64]. Однак складність очних тканин у визначенні параметрів очної фармакокінетики є основною перешкодою для розробки ефективної системи доставляння терапевтичних білків через наявність різноманітних очних бар'єрів.

Колагенові волокна з гідрофільної стромы також обмежують проникнення терапевтичних білків, яке зазвичай відбувається через піноцитоз або ендоцитоз (механізм активного транспорту) [65, 66]. Щільні контакти, наявні в рогівці, склері та сітківці, значно перешкоджають дифузії гідрофільних великих макромолекул [67, 68]. Міцні з'єднання в епітелії кон'юнктиви зазвичай ширші, ніж в епітелії рогівки, але все ще не здатні забезпечити проникнення великих молекул [67, 68].

Склоподібне тіло – це високов'язкий гель, схожий на рідину, що складається з 98-99% мас./об. вмісту води, солей, цукрів, мережі фібрил колагену II типу з гіалуронаном, глікозаміногліканом і широким спектром білків, розташованих у задній частині тіла сегмента очного яблука [69]. Ліки, що вводяться інтравітреально, матимуть прямий доступ до порожнини склоподібного тіла та сітківки ока, може знадобитися кілька годин, щоб вони дифундували по всьому склоподібному тілу. Кліренс макромолекул зі склоподібної порожнини відбувається дуже повільно через перешкоду пігменту епітелію сітківки, тоді як дифузія зі склоподібного тіла до сітківки обмежується внутрішньою граничною мембраною [69]. Оскільки задіяно кілька таких інших факторів, як початкова доза, об'єм розподілу та швидкість виведення [71, 72], це також залежить від розміру, поверхневого заряду та характеристик уведених макромолекул [73-76]. Склоподібне тіло може дозволити дифузію невеликих аніонних макромолекул, обмежуючи більший розмір, або катіонних макромолекул, які демонструють недифузійну кінетику та профіль розподілу. Молекули можуть бути еліміновані через передній та/або задній шляхи, на що впливають головним чином об'єм розподілу та період напіввиведення [72].

Велика кількість таких захворювань, як увеїт, цитомегаловірусний ретиніт, а також ретиніт і проліферативна вітреоретинопатія, впливають на очну фармакокінетику різних місцевоінстильованих молекул та їх композицій. Хвороби викликають певні фізіологічні зміни в стромі рогівки, яка складається з колагену та води, що призводить до поганої біодоступності гідрофобних молекул [77]. Грибковий кератит, що спричиняє хронічне запалення тканин рогівки, призводить до поганої проникності ЛЗ [78]. Щоб вирішити цю проблему, ліки вводять із носієм/емульсією, щоб уникнути випаровування обмежених природних сліз у пацієнтів із сухим оком, використовують іонофорезну техніку для проникнення іонізованих молекул у тканини ока.

З різних шляхів окулярного доставлення терапевтичних білків через наносії є місцевий, періокулярний, супрахоріоїдальний та інтравітреальний

шляхи. Ін'єкційні полімерні наночастинки відіграють значну роль у доставленні терапевтичних білків інтравітреальним шляхом. Більш ефективне і тривале інгібування неоваскуляризації рогівки спостерігалось за допомогою наночастинок, уведених інтравітреально, порівняно з іншими пептидами [79, 80, 81]. Ефективне інгібування неоваскуляризації рогівки може бути наслідком поліпшених фармакокінетичних властивостей, включаючи подовжений час утримування, утворення нанорозмірних депо у склопакеті та уникнення ферментативної деградації [79, 80].

Параметром, який визначає стабільність, розмір частинок, заряд поверхні або дзета-потенціал наночастинок, є склад наночастинок, тобто ліпідний або полімерний. Крім того, цей параметр впливає не лише на інтравітреальному рівні, але також місцево та субретинально. До того ж використання лігандів важливо перед створенням ін'єкційних наноносіїв для доставлення терапевтичних білків до тканин ока (рис. 1.2).

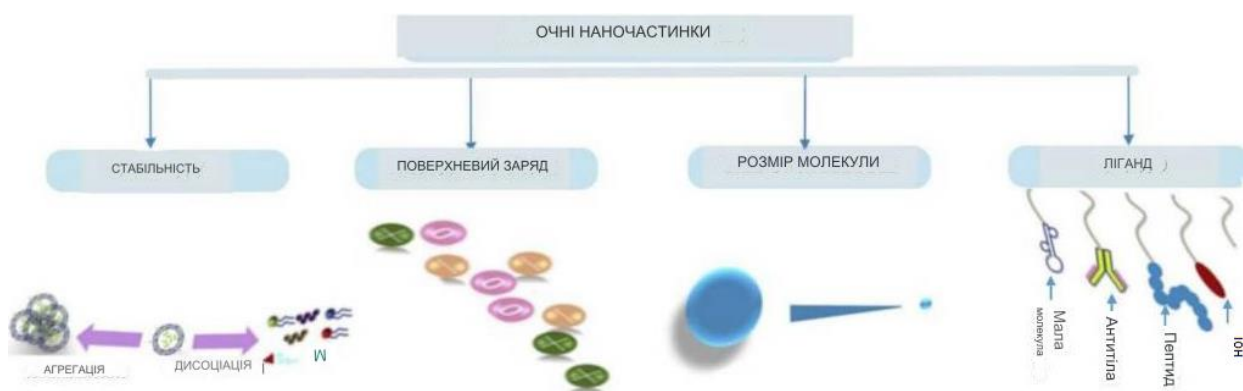


Рис. 1.2 Характеристики очних наночастинок, які впливають на їх внутрішньоочний розподіл та елімінацію

Дослідження, пов'язане з розподілом наночастинок в очній тканині з різними модифікаціями поверхні (позитивні, негативні та пегільовані заряди) з використанням склоподібного тіла великої рогатої худоби *ex vivo*, було проведено і показало, що частинки розміром понад 1000 нм можна використовувати для тривалого вивільнення препаратів для сітківки ока завдяки повільніше очищення від склоподібного тіла [82]. Крім того, спостерігалися високі

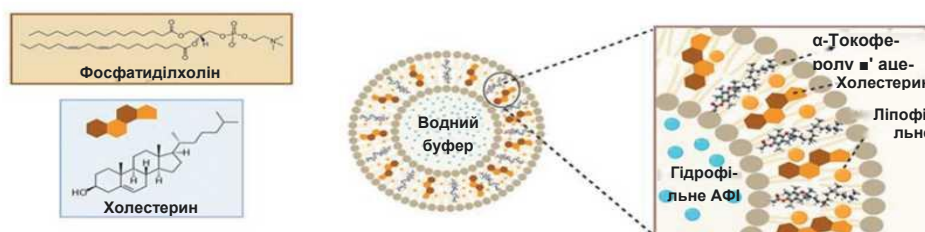
та утруднені рухи негативно заряджених і пегільованих частинок, а також гранична рухливість позитивно заряджених наночастинок. Позитивно заряджені частинки розміром близько 200 нм показали незначну рухливість порівняно з негативно або пегільованими частинками розміром 500-1000 нм. На рухливість позитивно заряджених частинок також впливала присутність негативно зарядженої гіалуронової кислоти у склоподібному тілі [83].

1.4 Ліпосоми як системи доставляння діючих речовин у разі захворювання переднього і заднього сегментів ока

Ліпосоми були широко вивчені для місцевого введення в очі завдяки їхнім властивостям біологічного розкладання та біосумісності і їх здатність бути носієм ліків. Крім того, як згадувалося раніше, обидва гідрофільний і ліпофільний препарати можуть бути захоплені. Ліпосоми сприяють проникненню ліків у внутрішньоочні тканини, вступаючи в тісний контакт з поверхнею рогівки та кон'юнктиви, що й показало особливу актуальність для препаратів з високою молекулярною масою, погано розчинних препаратів або з низькими коефіцієнтами розподілу [84, 85].

Ліпосоми здатні взаємодіяти з клітинами (рис. 1.3) і вивільняти захоплену активну речовину, полегшуючи надходження ліків різними механізмами.

Основна структура ліпо-



Класифікація ліпосом

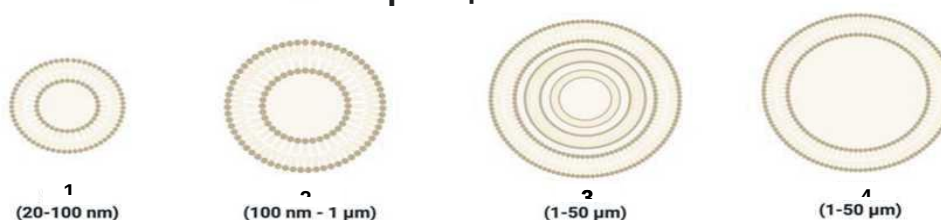


Рис 1.3 Основна структура ліпосом і класифікація за кількістю шарів: малі одношарові везикули (SUV), великі одношарові везикули (LUV), багатошарові везикули (MLV) і гігантські одношарові везикули (GUV)

З-поміж них найбільше використовуються специфічна або неспецифічна адсорбція на поверхні клітин, злиття з мембраною, обмін ліпідів шляхом обміну, опосередкованого білками перенесення, або ендоцитоз. Коли відбувається ендоцитоз ліпосом, ендосома може розірватися та вивільнити вміст у цитоплазмі клітини або досягти лізосоми, де вони деградує (рис. 1.4) [86, 87-89].

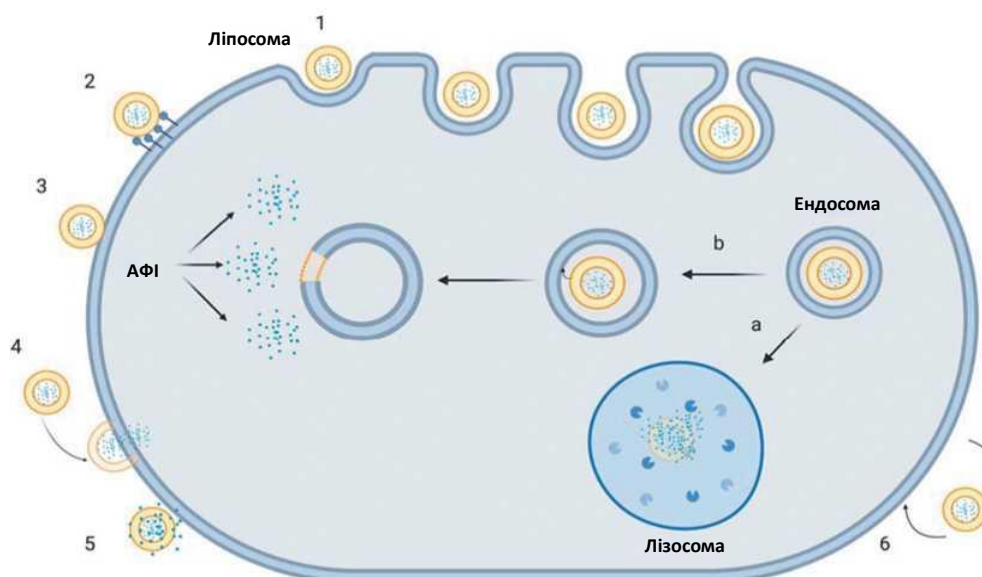


Рис. 1.4 Механізми взаємодії ліпосом і клітин

Багато авторів вивчали переваги ліпосомальних композицій для офтальмологічного застосування активних речовин, знижуючи їх потенційну токсичність і збільшуючи їх проникнення та біодоступність порівняно з вільним препаратом.

Ліпосоми є надзвичайно універсальними системами, здатними вловлювати широкий спектр речовин, таких, як гідрофільні, гідрофобні або такі біотехнологічні продукти, як антитіла, генетичний матеріал або білки. Варто зазначити, що захоплення речовин різної природи в ліпосоми може посприяти

цікавій стратегії підвищення стабільності потенційних терапевтичних препаратів, які в розчині можуть піддаватись гідролітичним або протеолітичним процесам, а також ферментативній деградації [90].

Ліпосоми можуть проникати в клітини шляхом ендоцитозу (1) і транспортуватися до лізосоми (а) або вивільнятися в цитоплазму після дестабілізації ендосоми. Ліпосоми також можуть адсорбуватися клітинами специфічно (2) або неспецифічно (3). Ліпосоми можуть проникати в клітину після злиття мембрани ліпосоми з мембраною клітини, сприяючи надходженню препарату в цитозоль (4). Ліпосоми, коли вони адсорбуються, можуть бути дестабілізовані та вивільняти ліки, які проникають у клітину шляхом мікропіноцитозу (5). Нарешті, ліпосоми можуть проникати в клітину шляхом обміну своїх ліпідних компонентів з ліпідами з мембрани (6).

Багато авторів вивчали переваги ліпосомальних композицій для офтальмологічного застосування активних речовин, знижуючи їх потенційну токсичність і збільшуючи їх проникнення та біодоступність порівняно з вільним препаратом.

Ліпосоми є надзвичайно універсальними системами, здатними вловлювати широкий спектр речовин, таких, як гідрофільні, гідрофобні або такі біотехнологічні продукти, як антитіла, генетичний матеріал або білки. Варто зазначити, що захоплення речовин різної природи в ліпосоми може посприяти цікавій стратегії підвищення стабільності потенційних терапевтичних препаратів, які в розчині можуть піддаватись гідролітичним або протеолітичним процесам, а також ферментативній деградації [90].

Хоча інкапсуляція є загальним терміном для пояснення інтерналізації або поглинання лікарської речовини в ліпосомах, ефективність захоплення є найбільш прийнятною, оскільки вона може стосуватися прилипання лікарської речовини до поверхні, захоплення в подвійних шарах або внесення у водне ядро ліпосом [91]. Наприклад, ці властивості були використані для захоплення антибіотиків, зниження їх токсичності та підвищення ефективності.

Водорозчинні та середньорозчинні антибіотики ванкоміцин, тейкопланін і рифампін були успішно інкапсульовані в ліпосоми, досягнувши високої ефективності інкапсуляції для тейкопланіну і рифампіну, 82,7 і 84,1% відповідно, з допомогою методу випаровування з оберненою фазою [92]. Наприклад, тобраміцин є одним із найвідоміших і використовуваних місцевих антибіотиків, який був успішно захоплений ліпосомами. Фактично, об'єм 0,4 мл «мега» ліпосомальної дисперсії (10-100 мкм), що містить захоплений тобраміцин (35 мг/мл), уведений кроликам у вигляді одноразової дози, продемонстрував вищу або співмірну ефективність порівняно з кроликами, які отримували повторні дози інстиляції щогодини [93, 94].

Ліпосоми вивчали як засоби доставлення у разі очних інфекцій завдяки їхнім властивостям. Вони як транспортний засіб, який потребує менших доз, підвищує свою ефективність, запобігає системному впливу та знижує стійкість до антибіотиків [87, 95]. Ципрофлоксацин – фторхінолон – ефективний проти грампозитивних і грамнегативних бактерій. Крім того, 1 мг/мл ципрофлоксацину, інкапсульованого в ліпосомах, забезпечує контрольоване вивільнення препарату *in vitro* протягом 24 годин на відміну від розчину препарату в тій же концентрації, який показав 92,62% вивільнення препарату лише за 2 години [96]. Про цю його здатність раніше повідомлялося в інших дослідженнях [97]. В іншому дослідженні *in vivo* після місцевого застосування 50 мкл різних композицій на кролях було отримано принаймні в 3 рази більшу біодоступність ліпосомальних композицій із дозами 107,63-114,52 мкг ципрофлоксацину порівняно з дозою 150 мкг. Крім того, вищі концентрації ципрофлоксацину виявлені у водянистій волозі. Тут ліпосомальна композиція досягла найвищого рівня, отримана концентрація у водянистій волозі становила 3,87 мкг/мл порівняно з концентрацією 2,68 мкг/мл [98]. Ліпосоми азитроміцину також продемонстрували збільшення проникності рогівки, підвищивши коефіцієнт проникності з $(4,43 \pm 0,27)$ см/с у розчині до $(8,92 \pm 0,56)$ см/с для ліпосомної композиції. З іншого боку, на моделі сухого ока щура після місцевої інстиляції

протягом 7 днів 3 рази на день 20 мкл очних крапель спостерігалось поліпшення симптомів збільшення часу розщеплення сльози і показника фарбування флуоресцеїном ($P < 0,01$) у результаті застосування ліпосом азитроміцину порівняно з референтним препаратом у концентрації 10 мг/мл азитроміцину [99].

Місцеве лікування вірусних очних інфекцій, таких як вірус простого герпесу (ВПГ) або вторинного кератиту простого герпесу, також було поліпшено завдяки використанню ліпосом [100, 101]. У дослідженні на кролях порівнювали ліпосоми ганцикловіру (1 мг/мл) з розчином ганцикловіру (1 мг/мл) після місцевого закапування 50 мкл. Результати показали більшу проникність рогівки, що дало уявний коефіцієнт проникності в 3,9 рази вище, ніж у розчині препарату, і збільшення поглинання, площа під кривою концентрації у водянистій волозі була в 1,7 рази вище [102]. Повідомлялося, що ліпосоми дистаміцину А, які використовуються для лікування вірусу простого герпесу (ВПГ), стійкого до ацикловіру, мають таку саму протівірусну здатність, як і дистаміцин у розчині, і менш цитотоксичні для епітеліальних клітин рогівки кроля (48-годинна життєздатність ліпосомної композиції становила 80% проти 60% розчину препарату).

Крім того, кількість препарату, виявленого в тканинах рогівки через 30 хвилин після закапування 50 мкл очних крапель (0,05 мг дистаміцину) у кролів, була більшою для ліпосомної форми, ніж для розчину, що становило $(2028 \pm 0,063)$ нг/мг і $(1579 \pm 0,087)$ нг/мг відповідно [103].

Стосовно грибкового кератиту деякі автори проводили дослідження з ліпосомальними протигрибковими препаратами [104, 105]. Дослідження на 40 кролях із *Candida albicans* показало, що застосування 50 мкл місцевих ліпосом, наповнених флуконазолом (2 мг/мл) значно поліпшило загоєння порівняно з такою ж концентрацією розчину флуконазолу, досягнувши повного загоєння через 3 тижні у 86,4% випадків порівняно з 50% у кролів, яким вводили розчин флуконазолу. Краплі вводили перші 3 дні з частотою 4 рази на добу, а в подальшому з частотою 3 рази на добу [106]. З іншого боку, було проведено

клінічне дослідження з 11 пацієнтами з кератитом, викликаним *Candida albicans*. Пацієнтам вводили 2 мг/мл ліпосомальної форми флуконазолу 3 рази на день. Середній діаметр виразок у пацієнтів зменшився з 5,5 мм до 1,3 мм після 1 місяця лікування, що свідчило про збільшення швидкості одужання та зменшення частоти введення ліпосом флуконазолу [107]. Варто зазначити, що розроблений ліпосомальний колірій амфотерицину В 0,5%, який використовується у терапії грибкових інфекцій поверхні ока в лікарнях, дав гарний результат [108].

Були проведені численні дослідження препаратів для місцевого застосування, здатних знижувати внутрішньоочний тиск за допомогою ліпосом. Бринзоламід, інгібітор карбоангідрази, був охарактеризований і протестований *in vitro* та *in vivo* порівняно із суспензією препарату з концентрацією в десять разів вищою (0,1 і 1% відповідно). Дослідження транскорнеальної проникності за допомогою дифузійної камери Франца показало підвищення проникності порівняно з комерційною суспензією бринзоламиду, що призвело до більшої у 6 разів проникності для ліпосом ($2,58 \pm 0,04$ у ліпосомах проти $0,35 \pm 0,01$ у суспензії). Крім того, дослідження *in vivo* на кролях показали, що одна місцева інстиляція 50 мкл ліпосомної композиції була більш ефективною для тривалого зниження внутрішньоочного тиску (ВОТ): стійкий ефект у зниженні внутрішньоочного тиску тривав 12 годин, тоді як у композиції із суспензією не був ефективним вже через 30 хвилин [109].

Повідомляється, що великі юніламельярні везикули є цікавим способом досягнення тривалого виділення ліпофільних препаратів в оці. Гарним прикладом цього є ліпосомальна композиція, виготовлена з яєчного фосфатидилхоліну в концентрації 18 мМ (середній розмір (109 ± 18) нм), яка здатна вивільняти латанопрост за допомогою однієї субкон'юнктивальної ін'єкції кролям протягом 90 днів. Тваринам також закапували 1,5 мкг латанопросту по краплі щодня. Ліпосомальна композиція показала високий коефіцієнт навантаження ліками (94 ± 5) % і була здатна знизити ВОТ у кролів більш ніж у 2,8 рази із залишковим ефектом 50 днів [90]. Раніше повідомлялося про включення таких

в'язких полімерів, як гіпромелоза 0,3% або гіалуронова кислота 1,2% [110], для підвищення поглинання ліків та ефективності місцевих гіпотензивних ліпосомальних композицій. Окрім збільшення часу контакту препарату з оком, що сприяє збільшенню проникнення, було припущено, що ці два полімери сприяють захисту поверхні ока [111].

Тріамцінолону ацетонід, який зазвичай використовується для інтравіт-реальних ін'єкцій для терапії вітреоретинальних захворювань, кролям вводили у формі місцевих ліпосом: 50 мкл кожні 2 години 6 разів на день протягом 14 днів. Композиція 2 мг/мл досягла склоподібного тіла та сітківки. Концентрація препарату через 12 годин становила $(252,10 \pm 90,00)$ нг/г у сітківці та $(32,6 \pm 10,27)$ нг/г у склоподібному тілі [112]. У недавньому пілотному дослідженні 2 мг/мл ліпосомальної форми триамцінолону ацетоніду було протестовано на 12 пацієнтах, які страждають на рефрактерний кістозний макулярний набряк. У цьому дослідженні краплю місцевого ліпосомального складу застосовували кожні 2 години протягом 90 днів, забезпечуючи адекватну переносимість і терапевтичну активність [113].

Композиція на основі ліпосом також мала здатність інкапсулювати кортикоїд медроксипрогестерону ацетат (МПА) (0,2 мг/мл) для лікування запальних процесів очей. Протизапальний ефект був протестований *in vitro* після 60-хвилинної експозиції, що показало подальше поліпшення ефекту в епітеліальних клітинах рогівки людини, на відміну від референсного неліпосомального препарату (Medrivas®). Продукцію цитокінів після стимуляції визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Тоді як розчин МПА демонстрував лише зниження цитокіну IL-6, ліпосомальна композиція зменшувала вироблення як IL-6, так і IL-8. Поглинання ліпосом клітинами також оцінювали на кролях з використанням ліпосом кумарину-6 (C6). Через 5 хвилин епітелій рогівки показав флуоресценцію, а після 60-хвилинної експозиції також строма рогівки. Подібну ліпосомну композицію використовували для інкапсу-

ляції пептиду, отриманого з тромбоспондину. Ліпосомальний склад був протестований на моделі епітелію рогівки та кон'юнктиви *in vitro*, в результаті чого спостерігалось очевидне підвищення проникності рогівки [114].

Використання антиангіогенних і протизапальних ліпосом передбачає потенційну ефективну терапію для лікування захворювань, які вражають задній сегмент ока. Однак осадження та кристалізація є одними з головних недоліків у разі спільного інкапсулювання цих сполук. Деякі зі стратегій вирішення цих труднощів полягають у використанні різних співвідношень холестерину/лецитину або коригування рН, що допомагає збільшити навантаження активного препарату. Стосовно цього питання група дослідників Lai S. зі спів-авт. досліджували труднощі інкапсуляції ЛЗ різної полярності в ліпосомальних композиціях, оскільки два препарати, полярності яких надто відрізняються, можуть призвести до преципітації або зниження інкапсуляції [115].

Інші стратегії збільшення захоплення або інкапсуляції ліків полягають у прикріпленні ПЕГ-подібних полімерів до поверхні ліпосом, що може збільшити взаємодію між препаратом і полімерами. Тому ліпосоми використовувалися як корисні та специфічні інструменти для інкапсуляції таких імунореактивних речовин, як протипухлинні продукти, націлені на рецептори HER2/neu та CD20 [116].

Крім того, за останні кілька років катіонні ліпосоми, що містять діолеїлтриметиламоніюпропан або діолеїлтриметиламоній [117], наповнені генетичним матеріалом, привернули велику увагу, оскільки вони є корисним методом для боротьби з генетичними захворюваннями, раком або навіть для доставлення вакцин [118]. Наприклад, цікавою стратегією збільшення здатності катіонних ліпосом до завантаження ДНК-плазмід є комбінування її у відповідних співвідношеннях, які дозволяють конденсацію ДНК, та інкапсуляції разом із циклодекстринами [119], а також додавання спейсера на основі амінокислот, що вводиться між полярною головою та вуглеводневим хвостом. Ця стратегія спрямована на збільшення поглинання клітинами ліпосом, що містять плазмиду, і на зменшення ліпосомальної деградації. Згідно з цим дослідженням ліпосоми, що містять спеціалізовану групу лізину як спейсер, досягли набагато

вищих коефіцієнтів інкапсуляції (22%) і ефективності трансфекції, ніж інші. До того ж комбінація катіонних ліпосом і цих полілізинових спейсерів демонструє ефективність інкапсуляції, подібну до реагентів для трансфекції, але зниження токсичності [120].

Щодо використання ліпосом, які містять генетичний матеріал для місцевого офтальмологічного застосування, були розроблені поверхнево-інженерні ліпосоми, щоб переносити молекули короткої інтерферувальної рибонуклеїнової кислоти (siRNA) до пігментованого епітелію сітківки або регулювати експресію судинного ендотеліального фактора росту (VEGF) за вікової дегенерації жовтої плями. Ця стратегія може передбачати менш інвазивну та більш ефективну стратегію як альтернативу інтравітреальним ін'єкціям [121]. Ліпосоми SiRNA, що борються з білком теплового шоку 47 (HSP47) у поєднанні з вітаміном А, представлені як приваблива стратегія для хвороби сухого ока [122]. Важливо зауважити, що ліпосоми є дуже цікавими та привабливими системами, які дозволяють інкапсулювати та доставляти місцеві офтальмологічні субстанції, які за системного введення або з допомогою інтравітреальних ін'єкцій можуть становити ризики або спричиняти побічні ефекти [123].

Імуносупресивні препарати, наприклад, циклоспорин, такролімус або еверолімус, успішно застосовуються для лікування легких або тяжких симптомів хвороби сухого ока або для уникнення реакції «трансплантат проти господаря» після алогенних трансплантацій [124-126]. Наприклад, дослідження, опубліковане Y. Dai, продемонструвало, що ліпосоми, які несуть такі жовчні солі, як дезоксихолат натрію, таурохолат натрію та глікохолат натрію, як альтернатива холестерину, разом з такролімусом, досліджували вищі коефіцієнти транскорнеального проникнення ($29,50 \pm 5,78$, $36,24 \pm 3,51$ і $29,73 \pm 4,03$) см/с відповідно, ніж звичайні ліпосоми, завантажені одним препаратом ($8,00 \pm 2,05$) см/с [127].

Інше порівняльне дослідження між ліпосомами циклоспорину та комерційною емульсією Restasis® продемонструвало посилене проникнення рогівки та поглинання імуносупресивних ліпосом. Схоже, що стабілізація слізної плі-

вки ліпосомами може здатися цікавою та ефективною стратегією для збільшення проникнення ліків крізь шари рогівки [128]. Крім того, латанопрост також був інкапсульований до складу ліпосомальних систем для субкон'юнктивального введення для лікування очної гіпертензії у разі глаукоми. У клінічних дослідженнях ліпосоми, що містять 0,005% латанопросту, продемонстрували посилене проникнення препарату (NCT02466399) [129].

1.5 Актуальність створення ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу з дермального шару шкіри свиней

Захворювання і травми рогової оболонки посідають значне місце в офтальмології, мають високу питому вагу в етіології слабкого зору і сліпоти. За даними деяких авторів, травми й опіки рогівки становлять 68-70 % всіх пошкоджень і поранень ока. Тяжкі запальні захворювання рогівки, травми й опіки очей призводять до розвитку виразок і перфорацій рогівки, завершуються формуванням білм, грубих рубцевих змін рогівки і кон'юнктиви та істотним зниженням зору. Пошкодження рогівки може також відбуватися внаслідок кератолітичних і запальних процесів, що викликані інфекцією, або внаслідок рубцювання і неоваскуляризації, пов'язаних з процесом репарації.

У разі захворювань рогівки ока з порушенням цілості її поверхні, травм і опіків очей необхідно прискорення її регенерації та поліпшення обмінних процесів. У комплексному лікуванні уражень рогівки велике значення має використання препаратів тваринного і рослинного походження, що сприяють стимуляції регенерації та містять БАР, вітаміни, ферменти, мікроелементи тощо.

Вищезазначене свідчить про актуальність проблеми і необхідність розроблення нових препаратів багатопланової дії, що одночасно виконують завдання стимуляції регенерації, захисту уражених тканин ока від несприятливих факторів зовнішнього середовища, відновлення порушених функцій слізної рідини.

Застосування препаратів крові у разі захворювань поверхні ока вперше було введено в 1975 році для 6 пацієнтів з хімічними опіками [130]. Оскільки групою дослідників [131, 132] доведено ефективність і безпеку очних крапель з аутологічної сироватки (АС) для лікування хвороби сухого ока (ХСО) і стійкого дефекту епітелію (СДЕ) [131, 132], дослідження довели, що продукти, отримані з крові, є інноваційними терапевтичними засобами для різних захворювань поверхні ока, наприклад, ХСО [133], СДЕ [134], нейротрофічний кератит [135], рецидивна ерозія рогівки [136] та хімічні опіки [137].

АС має біохімічний склад, подібний до людської сльози [138], і містить фактори росту, включаючи епідермальний фактор росту і трансформувальний фактор росту (TGF-) β , хемокіни, фібронектин і різні поживні речовини [139].

Консенсус щодо методу підготовки ще не досягнутий [138]. Експериментальне дослідження *in vitro* показало, що збільшений час згортання 120 хв або довше, різке центрифугування (3000 г протягом 15 хв) і розведення збалансованим розчином солі на рівні 12,5-25% були оптимальними для загоєння епітелію рогівки [140]. Клінічно 20% АС найчастіше використовується, щоб узгодити концентрацію TGF- β , яка у 5 разів вища в сироватці, ніж у сльозах, щоб запобігти уповільненому загоєнню ран і помутніння рогівки, спричиненому TGF- β [132]. Проте більш високі концентрації АС (від 50 до 100%) також вважаються ефективними та безпечними [141, 142]. Рандомізоване проспективне дослідження показало, що 100% АС було більш ефективним для лікування СДЕ, синдрому Шегрена і ХСО, ніж 50% АС [143].

Рандомізовані клінічні дослідження показали, що АС був більш ефективним, ніж звичайне лікування для поліпшення як симптомів, так і ознак ХСО [144-146]. Коїта та ін. продемонстрували, що АС пригнічує апоптоз в епітелії поверхні ока, а альбумін, що міститься в АС, відновлює пошкодження поверхні ока [147]. АС перевершувала штучну сльозу у зменшенні симптомів сухого ока після рефракційної хірургії [148]. Крім того, АС може бути терапевтичним варіантом для СДЕ, резистентної до традиційного лікування [49, 150]. Schrader та ін. припустили, що АС в поєднанні із силікон-гідрогелевими контактними

лінзами може бути корисним за стійкого СДЕ [150]. Показано, що АС є ефективною у полегшенні реепітелізації трансплантата рогівки після наскрізної кератопластики [151]. Це також сприяло загоєнню епітелію рогівки у пацієнтів з нейротрофічним кератитом і аніридною кератопатією [152, 153]. Проспективне дослідження з тривалим спостереженням показало, що АС була ефективною для профілактики рецидиву у пацієнтів з рецидивною ерозією рогівки [154]. Однак огляд п'яти рандомізованих клінічних досліджень, у яких порівнювали штучні сльози (ШС) з фізіологічним розчином у пацієнтів з ХСО, показав, що жодних доказів користі не було знайдено після двох тижнів лікування, хоча можливий деякий короточасний вплив на симптоми ХСО порівняно з ШС [155]. Тобто ми також вважаємо, що для оцінки ефективності ШС необхідні подальші добре сплановані, великомасштабні рандомізовані контрольовані дослідження [155].

Відсутність консервантів і високий рівень поживних речовин в АС підвищує ризик забруднення зразка [156, 157]. Тому слід звернути увагу на ознаки інфекції у пацієнтів, які використовують АС [158]. Лагнадо та ін. [157] рекомендовано зберігати флакони зі зразками в замороженому стані за температури -20°C протягом 6 місяців, а кожен флакон слід розморожувати та використовувати лише протягом 24 годин. Проспективне рандомізоване дослідження на людях показало, що контейнери, обладнані стерилізувальним фільтром, можна використовувати до 4 тижнів без будь-якого підвищеного ризику зараження [158]. Концентрації факторів росту в 20% АС залишалися стабільними до 9 місяців за зберігання в замороженому стані за температури -20°C і до 4 тижнів за умови розморожування [159].

Препарати тромбоцитарної плазми містять велику кількість факторів росту та цитокінів [157, 160-164] і успішно використовуються в щелепно-лицевій та ортопедичній хірургії, а також у регенеративній медицині для сприяння загоєнню тканин [167]. Були розроблені такі різні препарати, як плазма, багата на фактори росту (PRGF), збагачена тромбоцитами плазма (PRP) і лізат тром-

боцитів [160]. PRGF отримують шляхом фільтрації супернатантів плазми після центрифугування цільної крові [168]. PRP – це плазма з підвищеною концентрацією тромбоцитів, отримана шляхом додаткового центрифугування цільної крові [169]. Лізат тромбоцитів збирають шляхом індукції лізису тромбоцитів і вивільнення факторів росту, включаючи тромбоцитарний фактор росту (PDGF), за допомогою PRP [170].

Кім та ін. [164] продемонстрували, що PRP перевершує ASE у лікуванні СДЕ. PRGF також може бути корисним для лікування СДЕ [165]. Показано, що PRP є ефективним для поліпшення як симптомів, так і ознак ХСО [166]. Лізат плазми може бути корисним для лікування ХСО [167, 168]. PRP також був кращим за традиційне лікування для відновлення гостроти зору та прозорості рогівки у пацієнтів із хімічним ушкодженням ока [169]. Крім того, PRP потенційно доступна як біоматеріал для реконструкції поверхні ока [170].

Незначний асортимент на фармацевтичному ринку України ЛЗ тваринного походження, виготовлених, зокрема, на основі пептидних комплексів, що містяться у шкірі свиней, зумовлює необхідність розроблення та створення таких препаратів. Наявність у шкірі свиней різних хімічних сполук органічної та неорганічної природи: нуклеотидів, гліколіпідів, амінокислот, олігопептидів, електролітів, мікроелементів, вуглеводів, ліпідів та продуктів їх обміну, зумовлює активність ЛЗ зазначеного походження [171, 172]. Хімічний склад шкіри свиней надзвичайно різноманітний, але найбільше в ній міститься мукополісахаридів, глікогену, глюкози. Офтальмологічні захворювання досить важко піддаються лікуванню; очні форми ЛЗ мають бути безпечними, гіпоалергенними і стерильними. На частку топічних форм припадає 90% всіх зареєстрованих ЛЗ. Оновлення слізної рідини, носослізний дренаж, рогівковий епітелій і гематофтальмічний бар'єр знижують локальну біодоступність ЛЗ та час його перебування на поверхні ока у разі топічного застосування [173]. Тільки 5-10% ЛЗ проникають крізь рогівковий бар'єр. Щоб уникнути проблем поганої біодоступності перспективним є створення ЛЗ на основі наночастинок. Добре відома низка наноструктур, використовуваних як носії у лікарських препаратах:

полімерні наночастинки, ліпосоми, нанодисперсії з олії і води, циклодекстрини, наночастинки металів тощо. Вони мають безліч переваг: подовжують час перебування ЛЗ на поверхні рогівки, пролонгують його вивільнення і збільшують біодоступність. Найбільш вивченими наноносіями у терапії офтальмологічних захворювань є ліпосоми, які мають переваги біосумісності і біорозкладання. Деякі ліпосомальні препарати вже використовуються в клінічних випробуваннях у терапії захворювань очей. Різні шляхи доставлення і склади були розроблені для оптимізації доставлення ліпосомальних ліків у передній або задній сегмент ока шляхом зміни поверхневого *заряду або ліпідної композиції* [173].

1.6 Аналіз ринку лікарських засобів України, які застосовуються в офтальмології як стимулятори регенерації рогівки ока

У зв'язку з вищевикладеним головною метою роботи було проведення аналізу вітчизняного фармацевтичного ринку ЛЗ стимуляції репаративних процесів ока для лікування травм та опіків рогівки.

Для аналізу маркетингових показників були досліджені препарати, що, згідно з міжнародною АТХ-класифікацією (Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification system), належать до групи S «Засоби, що діють на органи чуття»: підгрупи S01X «Інші офтальмологічні засоби». Аналіз лікарських препаратів, які застосовуються в офтальмології, проводився на основі даних Державного реєстру лікарських засобів України, електронних баз даних, інформаційно-пошукової програм [174-176].

Станом на 18.06.2023 р. асортимент зареєстрованих ЛЗ підгрупи S01X «Інші офтальмологічні засоби» як засоби стимуляції репаративних процесів ока становить 9 торгових назв, з них 5 (55,5%) ЛЗ вітчизняного виробництва та 4 (44,5%) ЛЗ закордонного виробництва (Німеччина, Швейцарія). Аналіз зареєстрованих на українському фармацевтичному ринку ЛЗ стимуляції репаративних процесів ока показав, що спостерігається домінування ЛЗ для вітчиз-

няного виробництва, представлених 4-ма фірмами-виробниками (Фармак, Фармекс Груп, Дарниця ФФ, ДЗ ДНЦЛЗ). Домінантними АФІ, які входять до складу ЛЗ, є декспантенол і таурин. Також на ринку представлені препарат з діючою речовиною тіотриазолін. Препарат на основі депротеїнізованого гемодеривату з крові телят (Bos Taurus) не постачається на ринок України через припинення дії реєстраційного посвідчення UA/15843/01/01 02.03.2022 (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Дослідження асортименту лікарських засобів стимуляції репаративних процесів ока для лікування травм та опіків рогівки

Діюча речовина	Торгова назва	Лікарська форма	Виробник	Країна
1	2	3	4	5
Декспантенол	Корнерегель	Гель очний 50 мг/г туба 5 г	Др. Герхард Манн Хем.-фарм. Фабрик ГмбХ	Німеччина
	Сікапротект	Краплі очні флакон-крапельниця 10 мл	УРСАФАРМ Арцнай-міттель ГмбХ	Німеччина
Таурин	Тауфон	Краплі очні 40 мг/мл флакон 5 мл, № 1 краплі очні 40 мг/мл флакон 10 мл, № 1	АТ «Фармак»	Україна
	ТАУФОН	Краплі очні 40 мг/мл флакон 5 мл з кришкою-крапельницею, № 3, краплі очні 40 мг/мл флакон 10 мл з кришкою-крапельницею, № 1	Фармекс Груп	Україна
	Тауфон-Дарниця	Краплі очні, розчин 40 мг/мл флакон 10 мл, № 1	Дарниця ФФ	Україна
Морфолінієва соль тіазотної кислоти	Тіотриазолін	Краплі очні 10 мг/мл флакон 5 мл	Дослідний завод «ДНЦЛЗ»	Україна
Депротеїнізованого гемодеривату з крові телят (Bos Taurus)	Солкосерил	Гель очний 4,15 мг/г по 20 г у тубі № 1	Легасі Фармасьютикалз Світселенд ГмбХ	Швейцарія

Переважна кількість лікарських форм ЛЗ стимуляції репаративних процесів ока представлена у формі очних крапель (77,8%) та гель очний (22,2%). Тобто асортимент ЛЗ для стимуляції репаративних процесів ока представлений переважно у формі очних крапель на основі хімічних речовин.

Отже, відсутність в асортименті фармацевтичного ринку України ЛЗ, що сприяють стимуляції регенерації, на основі пептидних комплексів, зумовлює необхідність розроблення і створення таких препаратів для лікування травм та опіків рогівки.

Висновки до розділу 1

1. Проведено аналіз сучасних ЛЗ, що стимулюють процеси регенерації. У наведеному аналізі доведено необхідність і ефективність застосування ЛЗ, які мають здатність стимулювати процеси регенерації тканин та їх важливість у регенеративній медицині.

2. Показана роль регуляторних пептидів у лікуванні порушень біохімічних та регенеративних процесів. У наведеному аналізі показано, що пептиди є потужними регуляторами біологічних процесів, проаналізовано їх використання як ЛЗ.

3. Проведено аналіз можливого доставляння терапевтичних білків в око. У наведеному аналізі розкрито необхідність ефективної біодоступності в оці різних терапевтичних білків, пов'язаної з проблемою через наявність багатьох очних бар'єрів.

4. Розглянуто роль ліпосом як системи доставляння ліків у терапії захворювань переднього і заднього сегментів ока. У наведеному аналізі показана необхідність і ефективність застосування ліпосомальної лікарської форми для розроблення очних ЛЗ.

5. Показано актуальність та доцільність створення ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу з дермального шару шкіри свиней.

6. Проведено аналіз ринку ЛЗ України, які застосовуються в офтальмології як стимулятори регенерації рогівки ока.

7. На підставі проведеного аналізу фармацевтичного ринку України доведено актуальність створення нового ЛЗ у формі ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу з дермального шару шкіри свиней.

Результати досліджень цього розділу наведено у таких публікаціях:

1. Круглов Є., Ярних Т., Борщевський Г. Актуальність створення ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу з дермального шару шкіри свиней. *Society and science. problems and prospects* : Proceedings of the III International Scientific and Practical Conference, London, England, January 25–28, 2022. London, 2022. P. 420-423.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КОНЦЕПЦІЇ ДОСЛІДЖЕНЬ. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ

2.1 Обґрунтування загальної методології досліджень

У цьому розділі дисертаційної роботи викладена загальна методологія досліджень, яка полягає у створенні науково-методичного підходу до обґрунтування складу і технології ліпосомальних очних крапель: теоретичне та експериментальне обґрунтування способу отримання ліпосом, концентрації діючих і допоміжних речовин; дослідження фармакотехнологічних, фізико-хімічних властивостей; розроблення методик постадійного контролю технології, стандартизації і вивчення стабільності, біологічних досліджень препарату.

За рекомендаціями Food and Drug Administration (Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США) (FDA) «Guidance for industry Liposome Drug Products», Європейського медичного агентства (ЕМА) ліпосоми в основному складаються з діючої речовини та ліпиду. Крім того, ліпосомальні препарати містять такі наповнювачі, як регулятори рН і стабілізатори, як ті, що містяться у звичайних ін'єкціях. Наступні властивості якості є особливо важливими для визначення властивостей ліпосомальних ЛЗ: компоненти ліпосоми; кількість активної речовини та кожного ліпиду; молярне відношення або масовий відсоток ліпиду (включаючи функціональний ліпід) до діючої речовини.

Необхідно визначити якість, а також доклінічні та клінічні профілі, необхідні для досягнення мети використання ліпосомної композиції та відповідності запланованому використанню ліпосомального ЛЗ. Дослідження розробки має бути проведено для того, щоб встановити, що дизайн ЛЗ (включаючи лікарську форму та рецептуру), показники якості, виробництво, система закупорювання контейнера відповідають меті, зазначеній у реєстраційній заявці.

Ліпосомальні ЛЗ можуть містити ліпосоми без інкапсульованої діючої речовини або мати дегенеровані молекули в певні концентрації. Ліпосомальні

ЛЗ не слід визнавати як сукупність однієї ліпосоми. Тому розроблення його рецептури та оцінку якісних характеристик слід виконувати як цілого ЛЗ, також слід встановити відповідні діапазони для забезпечення бажаної якості продукту, враховуючи доклінічні та клінічні дані відповідних серій. Крім того, ліпосомальні ЛЗ є фармацевтично складними і лише тестування кінцевого продукту іноді недостатньо для визначення якості. Отже, рекомендовано відповідне фармацевтичне розроблення має бути на основі концепції якості під час розроблення (Quality by Design (QbD)), як зазначено в настановах Q8(R2) і Q11 Міжнародної ради з гармонізації технічних вимог до лікарських засобів (ICH).

У керівництві ICH Q8 «Фармацевтична розробка» вона визначається як системний підхід до розроблення, який починається із заздалегідь визначеної мети і фокусує увагу на розумінні продукту та процесу, а також на керуванні процесом, що базується на надійних наукових даних та управлінні ризиками з якості. Відповідно до цієї методології фармацевтична розробка має містити, як мінімум, такі елементи та фази:

- визначення профілю якісних характеристик лікарського засобу (QTPP);
- виявлення потенційно критичних якісних ознак лікарського препарату (критичні показники якості – CQA);
- визначення критичних параметрів процесу (CPP);
- визначення характеристик АФІ, допоміжних речовин (критичних показників якості матеріалів – CMA);
- проєктування простору дизайну (DS) та його оптимізація, визначення стратегії контролю (CS) та поліпшення.

З урахуванням вищевикладеного нами було розроблено концепцію досліджень:

- теоретично та експериментально обґрунтувати склад багатокомпонентного ЛЗ у формі ліпосомальних очних крапель на основі депротейнізованого концентрату екстракту з дермального шару шкіри свиней;

- обґрунтувати спосіб отримання ліпосом, дослідити процес фільтрації та визначити критичні параметри технології розробленого препарату;
- розробити промислову технологію ЛЗ у формі очних крапель;
- провести фізико-хімічні дослідження отриманого засобу, розробити проєкт МКЯ для основних показників і вмісту АФІ та провести їх валідацію методик;
- визначити чинники, що впливають на стабільність розроблених ЛЗ у формі ліпосомальних очних крапель, й установити терміни їх придатності;
- розробити технологічні інструкції (протоколи виготовлення серій, інструкції з пакування, виробничу рецептуру, МКЯ) та апробувати й упровадити розроблений ЛЗ у промислове виробництво ПАТ «Фармак»;
- провести фармакологічні дослідження очних крапель на основі пептидного комплексу, отриманого з епідермального шару шкіри свиней.

2.2 Об'єкти досліджень: характеристика АФІ та допоміжних речовин

Концентрат екстракту депротейнізованого дермального шару шкіри свиней - є прозорою рідиною жовтуватого кольору, має рН 4,0 – 5,5.

Містить: пептидів – не менше 1,5 мг/мл, вуглеводів – не менше 0,2 мг/мл та сухого залишку – не менше 3%. Легко розчиняється у воді.

Молекулярна маса – не більше 10 кДа.

Якісний склад АФІ представлено низько-молекулярним комплексом фізіологічно активних речовин (пептиди, фосфоліпіди, вуглеводи, вільні амінокислоти, мікроелементи).

Характеристика пептидів та амінокислот (вільних та сумарних):

загальний азот – не менше 0,08%

загальний білок – не менше 1,5 мг/мл;

молекулярно-масовий розподіл:

Більше 6000 Дал

Не більше 5 %

Більше 3000 Дал

Від 10 до 15 %

Більше 1000 Дал, менше 3000 Дал Від 88 до 83 %
 Менше 1000 Дал Не більше 3 %
 амінокислотний склад (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

**Амінокислотний склад концентрату депротейнізованого
 дермального шару шкіри свиней**

ASP	SER	GLU	GLY	HIS	NH ₃	ARG	THR	ALA	PRO	CYS	TYR	VAL	MET	LYS	ILE	LEU	Phe
3,13%	7,42%	4,88%	16,93%	6,58%	0,00%	9,71%	5,84%	11,87%	6,22%	0,13%	5,43%	4,30%	1,40%	4,33%	2,01%	5,35%	4,46%

Стабільність та умови зберігання концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней вивчались за різних температурних режимів ($+5 \pm 3$)°C, ($+25 \pm 2$)°C у контейнері з того самого матеріалу, що і готовий концентрат для подальшого використання.

Після проведення аналізів концентрат аналізувався кожні три місяці протягом першого року, кожні шість місяців протягом другого року і один раз наприкінці третього року.

Результати досліджень стабільності свідчать, що концентрат є стабільним протягом 24 місяців.

Фосфатидилхолін із соєвих бобів – гліцерофосфоліпід естерифікований у позиціях 1 і 2 жирними кислотами й у позиції 3 фосфахоліном.

У разі використання «sn» номенклатури для позначення стереохімії гліцерин містить такі сполуки, як фосфатидилхолін, молекула зображується в проєкції Фішера з другою гідроксильною групою (естерифікованою жирною кислотою) зліва від центрального хірального вуглецю. Атоми вуглецю пронумеровані 1, 2 і 3 зверху донизу, як показано нижче:

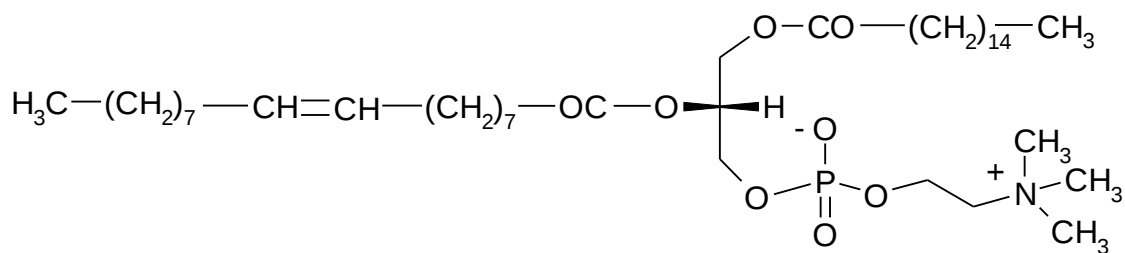


Рис. 2.1 Структурна формула фосфатидилхоліну

Молекулярна маса – 784 г/моль* (на основі олеоїллінолеоїлгліцерин-фосфохоліну): * – залежить від складу жирних кислот, наведено нижче (% від загальної кількості жирних кислот):

Пальмітинова кислота – 12-17 %

Стеаринова кислота – 2-5 %

Олеїнова кислота – 7-12 %

Ліноленова кислота – 59-70 %

Ліноленова кислота – 5-8 %

Фізико-хімічні властивості фосфатидилхоліну з соєвих бобів представлено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Фізико-хімічні властивості фосфатидилхоліну з соєвих бобів

Колір	Світло-жовтий
Органолептичні властивості (запах)	Спецефічний
Консистенція	Грубодисперсні агломерати
Розчинність (5% розчин)	
Вода очищена	Диспергується*
Етанол 96 %	Легко розчинний
Хлоровані вуглеводні	Легко розчинний
Парафін	Легко розчинний

Примітка* – прозорий на основі води розчин може бути отриманий спеціальними процедурами.

Хімічний склад фосфатидилхоліну із соєвих бобів (г у 100 г) наведено в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Хімічний склад фосфатидилхоліну із соєвих бобів

Показник	Специфікація
Фосфатидилхолін (на безводну речовину)	Не менше 94,0
Інші природні компоненти, присутні в лецитині соєвих бобів	
N-Ацетил-фосфатидилетаноламін	Не більше 0,2
Фосфатидилетаноламін	Не більше 0,2
Фосфатидилінозитол	Не більше 0,1
Лізофосфатидилхолін	Не більше 2,0
Неполярні ліпіди	Не більше 2,0
Тригліцериди	Не більше 1,0
Вільні жирні кислоти	Не більше 0,3
DL- α -токоферол	0,2

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

Субстанцію використовують як основний мембраноутворювальний ліпід.

Для розроблення ЛЗ використовували такі допоміжні речовини (табл. 2.4)

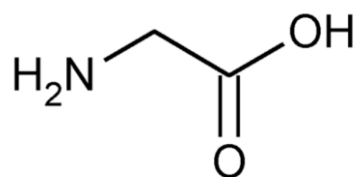
Допоміжні речовини лікарського засобу та їх функціональне призначення

Допоміжна речовина	Функціональне призначення
Гліцин кристалічний (ЕФ)	Стабілізатор
Динатрію едетат (ДФУ)	Антимікробний стабілізатор
Натрію хлорид (ДФУ)	Осмотичний компонент
Кислота хлористоводнева (ДФУ)	Регулятор рН
Натрію гідроксид (ДФУ)	Регулятор рН
Вода для ін'єкцій (ДФУ)	Розчинник-дисперсійна фаза

Допоміжні речовини, що використовуються для виробництва ЛЗ, відповідають вимогам монографій ДФУ 2.0 та Європейської фармакопеї та розроблених специфікацій підприємства за вхідним контролем.

Гліцин кристалічний

Структурна формула:



Молекулярна формула: C₂H₅NO₂

Молекулярна маса: 75.1

CAS номер: [56-40-6]

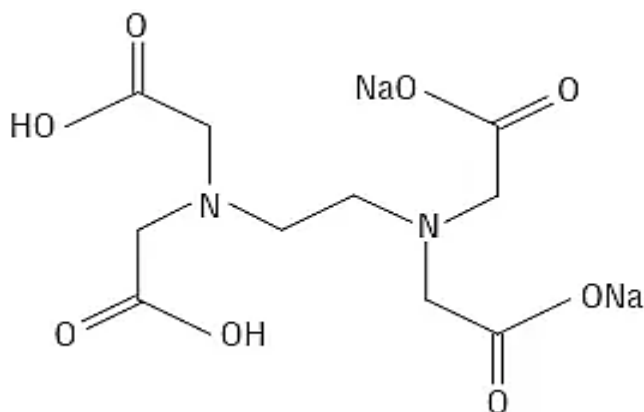
Загальні властивості: гліцин входить до складу білків рослинного і тваринного походження. У рідинах і тканинах гліцин може перебувати у вільному стані. Складова деяких БАР (напр., глутатіону), антибіотиків, нейропептидів. Міститься у складі муреїну клітинних стінок бактерій. В організмі гліцин може використовуватися для синтезу різних сполук: гему, замінних амінокислот,

пуринів, креатину, гіпурової кислоти, парних жовчних кислот та ін. Білий кристалічний порошок, легко розчиняється у воді, мало розчиняється у 96% спирті, практично не розчиняється в ефірі. $T_{пл} - 232-236\text{ }^{\circ}\text{C}$, із розкладанням. Зберігають у щільно закупореному контейнері.

Гліцин кристалічний використовують як стабілізатор.

Динатрію едетат

Структурна формула:



Молекулярна формула: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$

Молекулярна маса: 336,2

CAS номер: [139-33-3]

Загальні властивості: білий гігроскопічний кристалічний порошок без запаху, кислий на смак. Одержують за взаємодії едетової кислоти з натрію гідроксидом. Продукт реакції має такі властивості: рН 4,3–4,7 (1% розчин у воді, звільненої від двоокису вуглецю); депресія $T_{\text{замерз.}} - 0,14\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1% водний розчин); $T_{\text{пл}} = 252\text{ }^{\circ}\text{C}$ (розкладається); показник заломлення $n_{20D} = 1,33$ (1% водний розчин); питома вага – 1,004 (1% водний розчин); кінематична в'язкість – 1,03 мм²/с (1% водний розчин); під час нагрівання до 120 °С втрачає кристалізаційну воду. Розчиняється у воді (1:11); погано розчиняється в етанолі (95%); практично не розчиняється у хлороформі та етері. Несумісний із сильними окисниками, сильними основами, іонами та домішками металів. Поводить себе як слабка кислота: з карбонатів витісняє двоокис вуглецю, від

взаємодії з металами утворює водень; з лужноземельними та важкими металами утворює стабільні водорозчинні комплекси (хелати), стабільність яких залежить від іона металу та pH середовища.

Динатрію едетат використовують як антиоксидант, стабілізатор, антимікробний стабілізатор.

Натрію хлорид

Хімічна назва: Sodium chloride

Структурна формула:



Молекулярна формула: NaCl

Молекулярна маса: 58,44

CAS номер: [7647-14-5]

Загальні властивості: білий кристалічний порошок, або безбарвні кристали, або білі крупинки із солоним смаком; містить NaCl у межах 99,0–100,5%. Кристалічна решітка має гранецентровану кубічну структуру. Чистий натрію хлорид малогігроскопічний, але за наявності домішок його гігроскопічність значно підвищується. Трапляється в природі у вигляді мінералу галіту (кам'яна сіль). Твердий натрію хлорид не містить кристалізаційної води, хоча за температури нижче 0 °C сіль може кристалізуватися у дигідрат. Має такі властивості: pH 6,7–7,3 (насичений водний розчин); $T_{\text{кип.}}$ – 1413 °C; густина – 2,17 г/см³ (1,20 г/см³ для насиченого водного розчину); щільність (in bulk) – 0,93 г/см³, щільність (справжня) – 1,09 г/см³.

Натрію хлорид використовують як осмотичний компонент.

Натрію гідроксид

Структурна формула:



Молекулярна формула: NaOH

Молекулярна маса: 40,00

CAS номер: [1310-73-2]

Загальні властивості: твердий та ламкий з кристалічним зломом; у воді і під дією кисню швидко абсорбує вуглекислий газ та воду. $\text{pH} \approx 12,0$ (0,05% водний розчин); $\text{pH} \approx 13,0$ (0,5% водний розчин); $\text{pH} \approx 14,0$ (5% водний розчин); $T_{\text{пл}} - 318\text{ }^{\circ}\text{C}$; практично не розчиняється в етері, за $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ розчиняється у гліцерині, 95% етиловому спирті (1:7,2), метанолі (1:4,2), воді за $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1:0,9), за $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1:0,3).

Натрію гідроксид використовують як коректор pH .

Кислота хлористоводнева

HCl

Молекулярна формула: HCl

Молекулярна маса: 36,458

CAS номер: [7647-01-0]

Загальні властивості: сильна кислота безбарвна в'язка рідина з різким різким запахом. Його виразний запах легко розпізнається в лабораторіях. HCl використовується в обробленні шкіри та виробництві желатину. Більшість фізичних властивостей HCl, таких, як густина, pH , температура плавлення та температура кипіння, залежать від її молярної концентрації.

Гідрохлориста кислоту використовують як коректор pH .

Вода для ін'єкцій

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

2.3 Методи дослідження

Під час виконання роботи були використані сучасні фізико-хімічні, біофармацевтичні, технологічні, мікробіологічні та фармакологічні методи досліджень.

2.3.1 Фізико-хімічні дослідження

Рідинна хроматографія (ДФУ 2.0, п. 2.2.29).

Ексклюзивна хроматографія (ДФУ 2.0, п. 2.2.30).

Методи хроматографічного розділення (ДФУ 2.0, п. 2.2.46).

Визначення середньої маси (ДФУ 2.0, п. 2.9.5).

Осмоляльність (ДФУ 2.0, п. 2.2.35).

Інфрачервона спектроскопія (ДФУ 2.0, п. 2.2.24).

Динамічне світлорозсіювання (USP 729)

Розмір частинок визначали за монографією у Фармакопеї США (USP 729). Випробування виконували на Zetasizer Nano методом динамічного світлорозсіювання. Зразок приготовленого розчину препарату поміщали у вимірвальну кювету приладу і вимірювали розмір частинок.

Сканувальна електронна мікроскопія

Для морфологічного дослідження ліпосом зразки центрифугували з допомогою центрифужних пробірок із селективним фільтром (Nano Sept 10k Omega, Pall) за 10000 об/хв протягом 15 хв. Зразки ліпосом, відокремлені на фільтрах, розміщували на столах і давали висохнути в ексікаторі. Згодом зразки покривали шаром провідного матеріалу (покриття 25 нм, використовувався сплав Au/Pd). Морфологію спостерігали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа (Hitachi S-4800, Hitachi Ltd., Японія).

Раманівська мікроскопія

Спектри комбінаційного розсіювання були отримані за допомогою конфокального раманівського мікроскопа WITec, Inc. (Ульм, Німеччина) моделі

CRM 2000. Збудження (приблизно 30 мВт за 488 нм) забезпечується 8Ar-іонним лазером з повітряним охолодженням (Melles Griot, модель 532). Збуджувальне лазерне випромінювання подається на мікроскоп Zeiss через одномодове оптичне волокно, яке залежить від довжини хвилі. Лазерний промінь, що падає, колімується з допомогою ахроматичної лінзи та проходить крізь голографічний смуговий фільтр, перш ніж фокусується на зразку через об'єктив мікроскопа.

Аналітичне центрифугування

Аналітичне центрифугування ліпосомальної емульсії. Стабільність зразків приготованої ліпосомальної емульсії за різних параметрів процесу гомогенізації визначали з допомогою дисперсійного аналізатора LUMiSizer (LUM GmbH, Німеччина), проводили аналіз за 37 °С упродовж 4 год, відповідно через 30 с за швидкості 3000 об/хв ($1000 \times g$).

Оброблення експериментальних даних проводили за допомогою методів математичної статистики згідно з вимогами ДФУ з використанням прикладної комп'ютерної програми Microsoft Excel 2016.

2.3.2 Біологічні випробування

Стерильність (ДФУ 2.0 п 2.6.1).

2.3.3 Фармакологічні дослідження

Розроблена лікарська форма ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу виробництва АТ «Фармак» пройшла доклінічні випробування в ДП «ДНЦЛЗ» (Харків), де було проведено експериментальне вивчення нешкідливості (гостра токсичність, субхронічна токсичність, місцевоподразлива дія) та специфічної фармакологічної активності (первинна фармакодинаміка – репаративна та протизапальна дія).

Висновки до розділу 2

1. Визначено загальну методологію, складено план дослідних робіт з вибору й обґрунтування складу, технології, контролю якості ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу.
2. Наведено об'єкти дослідження – АФІ та допоміжні речовини, які були використані для отримання ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу.
3. Підібрано методи досліджень, які дозволять отримати повні та достовірні результати.

РОЗДІЛ 3

ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ І ТЕХНОЛОГІЇ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ

3.1 Обґрунтування складу і розробка елементів стратегії "Якість шляхом розробки" лікарського засобу

Актуальність розробки ЛЗ обумовлена тим, що пошкодження структури рогівки ока, які призводять до порушення її цілості та прозорості, що спричинено різними етіопатогенетичними факторами (опіки, травми, запальні захворювання, дистрофії) й у 25.8% випадків призводить до інвалідності [204]. З метою усунення уражень рогівки та виникнення ускладнень використовують ЛЗ – стимулятори регенерації рогівки.

Відповідно до класифікації ВООЗ «Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification index» ЛЗ ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу внесений розробником до групи S01X A – Органи почуттів. Лікарські засоби, які застосовуються в офтальмології.

Передбачуваний механізм дії ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу обумовлений фармакологічними ефектами його діючих компонентів:

- концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней прискорює репаративні та регенеративні процеси у пошкоджених клітинах і тканинах; підтримує та відновлює енергетичний метаболізм та окисне фосфорилювання; забезпечує високоенергетичними фосфатами клітин, що виникають унаслідок патологічного процесу за умов дефіциту харчування; підвищує утилізацію кисню клітинами тканин (зокрема споживання кисню мітохондріями); покращує анаеробне дихання та стимулює транспорт глюкози в клітини в умо-

вах гіпоксії або метаболічного виснаження; стимулює проліферацію та міграцію клітин; має мембраностабілізуювальний та цитопротекторний ефект; має імуномодулювальну дію;

- Фосфатидилхолін має мембраностабілізуювальний ефект; підвищує плинність мембран, унаслідок чого нормалізується їхня проникність; гальмує синтез прозапальних цитокінів; пригнічує процеси перекисного окиснення ліпідів, підвищує активність антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази та каталази; підвищує метаболічний та енергетичний потенціал клітин; підвищує активність колагенази; прискорює процес регенерації клітин; нормалізує ліпідний обмін. АФІ також виступає як основний компонент, тропний до фосфоліпідних мембран клітин.

У процесі розроблення складу ЛЗ вивчалися фізико-хімічні характеристики АФІ та допоміжних речовин та вплив концентрацій допоміжних речовин на критичні показники якості розчину ЛЗ (рН, осмоляльність, розмір частинок тощо), також враховувалися регуляторні вимоги для цієї лікарської форми (краплі очні) [177-178].

Згідно підходу «Якість шляхом розробки» першим етапом наших досліджень стало встановлення коцептуальних показників якості для забезпечення бажаних характеристик кінцевого продукту.

У табл. 3.1 наведено цільовий профіль якості ЛЗ очні краплі з пептидним комплексом епідермального шару шкіри свиней.

Таблиця 3.1

Цільовий профіль якості продукту очні краплі з пептидним комплексом епідермального шару шкіри свиней

Елемент ЦПКП	Ціль	Обґрунтування
1	2	3
Лікарська форма	Краплі очні	Вимоги ДФУ та ЕФ для офтальмологічних лікарських засобів

Продовж. табл. 3.1

1	2	3
Доза	1 мл містить 0,07 мг пептидів та 100 мг фосфатидилхоліну	Результати доклінічних досліджень
Стабільність	Зберігання протягом 2 років за температури 2-8°C	Результати дослідження стабільності
Показники якості ЛЗ	Опис	Вимоги ДФУ та Європейської фармакопеї, ЕМА та ІСН настанов з якості
	Ідентифікація	
	pH	
	Об'єм вмісту контейнера	
	Осмоляльність	
	Розмір частинок	
	Домішки	
	Стерильність	
	Кількісне визначення	
Система упаковки	Флакон поліетиленовий, крапельниця із системою фільтрації	Система упаковки, що забезпечує строк зберігання ЛЗ та дози, а також стерильності під час всього терміну використання ЛЗ
Альтернативний метод використання	Відсутній	Не передбачено

У табл. 3.2 наведено характеристики якості та зазначено, які показники було класифіковано як критичні показники якості (КПЯ), для очні краплі з пептидним комплексом епідермального шару шкіри свиней.

Критичні показники якості лікарського засобу
очні краплі з пептидним комплексом епідермального шару шкіри свиней

Показник якості ЛЗ	Ціль	КПЯ	Обґрунтування
1	2	3	4
Опис	Емульсія жовтого кольору	Ні	Колір та опис розчину не мають прямого впливу на безпеку та ефективність
Ідентифікація	Позитивна для діючих речовин	Ні*	Незважаючи на те, що ідентифікація має вирішальне значення для безпечності та ефективності, цей КПК можна ефективно контролювати за допомогою системи управління якістю, що і контролюватиметься під час випуску ЛЗ. Формуляція та варіабельність процесу не впливають на ідентифікацію
pH	Від 5,0 до 6,0	Так*	Варіабельність показника поза межами може вплинути на безпеку для пацієнта і стабільність ЛЗ. Контролюють у процесі виробництва, під час випуску і зберігання ЛЗ
Осмоляльність	250–360 мОсм/кг	Так*	Варіабельність показника впливає на безпеку пацієнта. Залежить від кількості розчинених речовин. Контролюють у процесі виробництва
Розмір частинок	Перший пік не більше 100 нм, другий пік не більше 400 нм	Так*	Варіабельність показника поза межами може вплинути на безпеку для пацієнта та стабільність ЛЗ. Контролюють у процесі виробництва, під час випуску та зберігання ЛЗ

1	2	3	4
Супутні домішки	Лізофосфатидилхолін – не більше 2% Пептиди понад 6 кДа – не більше 5% Пептиди менше 1 кДа – не більше 3%	Так	Межа продуктів деградації АФІ має вирішальне значення для безпечності ЛЗ. Тому цей показник критичний
Стерильність	Має бути стерильним	Так	За багаторазового використання існує ризик порушення стерильності ЛЗ, що впливатиме на безпеку пацієнта
Кількісне визначення АФІ	Пептиди – від 80 до 120% від номінального значення Фосфатидилхолін – від 90 до 110% від номінального значення	Так	Варіабельність кількісного визначення впливає на безпеку або ефективність для пацієнта. Тому цей параметр критичний

Примітка. * – формуляція та варіабельність процесу мало ймовірно вплинуть на КПЯ. Тобто КПЯ не будуть досліджені та детально представлені у подальших оцінках ризиків у фармацевтичній розробці. Проте ці КПЯ залишаються в цільових параметрах ЦПКП та забезпечуються розробкою продукту, процесу та стратегії контролю.

Фармацевтичне розроблення складу включало первинну оцінку ризиків показників АФІ та варіабельності формуляції.

Для визначення варіабельності для подальшого дослідження було проведено оцінку ризиків. Ця оцінка містила попередні знання та досвід з відповідними лікарськими формами, а також аналіз інформації про лікарські речовини. Оскільки кінцевий виробничий процес не був створений на момент оцінки ризиків, зміни, які можуть бути пом'якшені за рахунок коригування процесу виробництва, були оцінені як нижчий ризик. Ці чинники було переглянуто під час розроблення процесу. У процесі оцінювання ризику кількісні фактори

були внесені до табл. 3.3-3.5 та поділені на три категорії (високий, середній та низький).

Первинну оцінку ризиків показників якості лікарських речовин наведено у табл. 3.3 та 3.4, варіабельність формуляції – у табл. 3.5.

Таблиця 3.3

**Первинна оцінка ризиків показників лікарської речовини
концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней**

Критичні показники якості ЛЗ	Показники лікарської речовини					
	гігроскопічність	розчинність	вміст вологи	залишкові розчинники	домішки	хімічна стабільність
Кількісне визначення АФІ	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Високий
Супутні домішки	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Високий
Стерильність	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький

Таблиця 3.4

**Первинна оцінка ризиків показників лікарської речовини
«Фосфатидилхолін соєвих бобів»**

Критичні показники якості ЛЗ	Показники лікарської речовини					
	гігроскопічність	розчинність	вміст вологи	залишкові розчинники	домішки	хімічна стабільність
Кількісне визначення АФІ	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Високий
Супутні домішки	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Високий
Стерильність	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький

Первинна оцінка ризиків варіабельності формуляції

Критичні показники якості ЛЗ	Варіабельність формуляції							
	концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свині	фосфатидилхоліну соєвих бобів	динатрію едетат	гліцин кристалічний	натрію хлорид	кислота соляна 0,1М	натрію гідроксид 0,1 М	вода для ін'єкцій
Кількісний вміст АФІ	Високий	Високий	Середній	Середній	Низький	Високий	Високий	Середній
Домішки	Високий	Високий	Середній	Середній	Низький	Високий	Високий	Низький
Стерильність	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький	Низький

Враховуючи ризики для оцінки варіабельності формуляції, обрано кількісний склад допоміжних речовин, який забезпечує відповідність вимогам цільового профілю якості продукту.

АФІ ЛЗ було обрано з урахуванням вимог ДФУ та ЕФ до офтальмологічних ЛЗ. Кількісний вміст концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свині та фосфотидилхоліну соєвих бобів встановлено за результатами доклінічних досліджень ЛЗ.

Вибір допоміжних речовин

Враховуючи ризики для оцінки варіабельності формуляції (табл. 3.6), обрано кількісний склад допоміжних речовин, який забезпечує відповідність вимогам цільового профілю якості продукту.

Динатрію едетат. Його вміст у розробленому ЛЗ становить 0,05 мг/мл. Достатність речовини у ЛЗ підтверджує результати дослідження довгострокової стабільності.

Кристалічний гліцин. Його вміст у розробленому ЛЗ становить 0,14 мг/мл. Достатність речовини у ЛЗ підтверджує результати дослідження довгострокової стабільності.

Натрію хлорид. Кількість натрію хлориду як осмотичного агенту забезпечує осмоляльність готового ЛЗ у межах 250-360 мОсмоль/кг (відповідно до вимог ДФУ та ЄФ до офтальмологічних ЛЗ).

Таблиця 3.6

Вибір вмісту натрію хлориду в лікарському засобі очні краплі з пептидним комплексом епідермального шару шкіри свиней

Вміст хлориду натрію, мг/мл	Осмоляльність, мОсм/кг	Вимоги ДФУ
0	0,03	250-360
4,50	196	
7,45	298	
9,0	357	

Кислоту хлористоводневу і натрію гідроксид використовують в ЛЗ як компоненти для регулювання рН, який лежить у діапазоні від 5,0 до 6,0 на момент випуску готового ЛЗ. Правильність обраного діапазона рН підтверджується вивченням довгострокової стабільності ЛЗ, а також відповідає вимогам ДФУ для офтальмологічних ЛЗ. 0,1 М концентрація забезпечує надійний показник рН.

Вода для ін'єкцій. Вибрана кількість води для ін'єкцій ЛЗ забезпечує концентрації АФІ та допоміжних речовин, які були встановлені вище.

Отже, на підставі проведених досліджень було обрано оптимальний склад ЛЗ очні краплі з пептидним комплексом епідермального шару шкіри свиней (табл. 3.7).

Склад лікарського засобу

очні краплі з пептидним комплексом епідермального шару шкіри свиней

Речовина	Кількість на 1 мл	Нормативна документація	Функціональна властивість речовини
Концентрат депротеї- нізованого дермаль- ного шару шкіри сви- ней (у перерахунку на пептиди)	0,07 мг	Проект СП	Діюча речовина
Фосфатидилхолін со- євих бобів (Ліпоїд С100)	100 мг	ЄФ*	Діюча речовина
Гліцин кристалічний	0,14 мг	ЄФ*	Стабілізатор
Натрію хлорид	7,45 мг	ЄФ*	Осмотичний ком- понент
Динатрію едетат	0,05 мг	ЄФ*	Антиоксидант, стабілізатор
Розчин кислото хло- ристоводнева 0,1 М	до рН 5,0-6,0	Проект СП	Компонент для коригування рН
Натрію гідроксид 0,1 М	до рН 5,0-6,0	Проект СП	Компонент для коригування рН
Вода для ін'єкцій	до 1 мл	ЄФ*	Розчинник

Примітка: * – чинне видання.

3.2 Дослідження фізико-хімічних і технологічних властивостей АФІ

Наступним етапом досліджень було визначення відповідності показників якості АФІ вимогам, що відповідає цільовому профілю якості та первинній оцінці ризиків показників лікарської речовини під час фармацевтичної розробки. Визначення фізико-хімічних характеристик АФІ на етапі, що передує вибору складу, впливає на подальший вибір допоміжних речовин ЛЗ.

3.2.1 Дослідження фізико-хімічних і технологічних властивостей концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней

У розробленні потенційного ЛЗ використовувалась АФІ «Концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней» виробництва «АТ Фармак» (Україна). Для здійснення входного контролю була розроблена специфікація на діючу речовину – Концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней.

До специфікації на діючу речовину внесено такі показники: опис, ідентифікація, рН, відносна густина, сухий залишок, важкі метали, загальний азот, рН, вміст вуглеводів, вміст фосфору, загальний білок, супровідні домішки, мікробіологічна чистота, кількісне визначення, пептиди, біологічна активність. Згідно з розробленим проектом специфікації були досліджені фізико-хімічні та мікробіологічні показники АФІ. Результати дослідження наведені в табл. 3.8.

Таблиця 3.8

Дослідження фізико-хімічних та мікробіологічних показників АФІ Концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней

Показник	Вимоги НД	Результат
1	2	3
Опис	Прозора рідина жовтого кольору	Відповідає
Ідентифікація Пептиди	Має витримувати випробування, як зазначено у розділі «Супровідні домішки»	Відповідає

1	2	3
Вуглеводи	Має витримувати випробування, як зазначено у розділі «Вміст вуглеводів»	Відповідає
Пептидне картування	Хроматографічний профіль випробовуваного розчину має співпадати з хроматографічним профілем розчину порівняння РСЗ	Відповідає
Відносна густина	Не менше 1,000	1,002
Сухий залишок	Не менше 2 %	4,3%
Важкі метали	Не більше 0,01 % (100 ppm)	Відповідає
Загальний азот	Не менше 0,08 %	0,25%
pH	Від 4,0 до 5,5	5,0
Вміст вуглеводів	Не менше 0,3 мг в 1 мл АФІ	0,49 мг/мл
Вміст фосфору	Не менше 0,2 мг в 1 мл АФІ	0,405 мг/мл
Загальний білок	Не менше 1,5 мг в 1 мл АФІ	2,89 мг/мл
<i>Супровідні домішки:</i>		
Пептиди більше 6000 Да	Не більше 5 %	3,8 %
Пептиди менше 1000 Да	Не більше 3 %	1,5 %
Мікробіологічна чистота	Критерій прийнятності: загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) 10^2 КУО/мл; загальне число дріжджових і пліснявих грибів (ТУМС) 10^1 КУО/мл; відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 мл; відсутність <i>Escherichia coli</i> в 1 мл; відсутність <i>Salmonella</i> в 10 мл; грамнегативних бактерій, толерантних до жовчі 10^2 КУО / мл	Відповідає
Кількісне визначення Пептиди	Не менше 20,0 мг в 1 мл АФІ	238,8 мг/мл
Біологічна активність	Має витримувати вимоги	Відповідає

Результати дослідження показали, що вказана АФІ потребує подальшого доопрацювання для використання в технології очних крапель. Тому, необхідно оптимізувати технологію її отримання на стадії концентрації.

3.2.2 Дослідження фізико-хімічних і технологічних властивостей фосфатидилхолін із соєвих бобів

Для виробництва використовувалась АФІ «Фосфатидилхолін із соєвих бобів». Відповідно до Настанови 42–3.2:2004 [177], вимог ДФУ [178], USP [179] та специфікації виробника на АФІ «Фосфатидилхолін із соєвих бобів» розроблена специфікація вхідного контролю.

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

Згідно з розробленим проєктом специфікації були досліджені фізико-хімічні та мікробіологічні показники АФІ, що використовувались.

Результати дослідження наведені в табл. 3.9.

Як стандарт фосфатидилхолін із соєвих бобів був використаний робочий стандартний зразок фосфатидилхоліну з соєвих бобів 100%

Таблиця 3.9

Дослідження фізико-хімічних та мікробіологічних показників АФІ фосфатидилхоліну із соєвих бобів

Показник	Вимоги НД	Результат
1	2	3
Опис	Заморожені жироподібні агрегати від світло-жовтого до жовтого кольору	Відповідає
Розчинність	Розчинний у 96 % етанолі Р, хлороформі Р, не розчинний у воді Р	Відповідає

Продовж. табл. 3.9

1	2	3
Ідентифікація	Величина (Rf) та розмір основної плями на хроматограмі випробовуваного розчину мають співпадати з величиною (Rf) та розміром основної плями на хроматограмі розчину порівняння	Відповідає
Прозорість розчину	Розчин S має бути прозорим	Відповідає
Кольоровість розчину	Забарвлення розчину S має бути не інтенсивнішим за еталон Y ₂	Відповідає
**Фосфор	Від 3,7 % до 4,0 %	3,9%
**Неполярні ліпіди	Не більше 3,0 %	1,1%
***DL-α-токоферол	Від 0,15 до 0,25 %	0,22%
Вода	Не більше 2,0 %	0,5%
**Етанол 96%	Не більше 0,2 %	0,1%
Перекисне число	Не більше 3	0.0
Йодне число	Від 97 до 107	105
Супровідні домішки лізофосфатидилхолін N-ацил-фосфатидил- етаноламін	Не більше 3,0 %, Не більше 0,5 %	0,5% Менше межі визначення
Важкі метали	Не більше 0,001 % (10 ppm)	Менше межі визначення
**Сульфатна зола	Не більше 2,0 %	0,4%
Бактеріальні Ендотоксини	Граничний вміст бактеріальних ендотоксинів у АФІ становить 6 МО в 1 г	Відповідає
Мікробіологічна чистота	Критерій прийнятності: – загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) 10 ³ КУО /г; – загальне число дріжджових і пліснявих грибів (ТУМС) 10 ² КУО /г. Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г; відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г; відсутність <i>Salmonella</i> в 10 г;	Відповідає

1	2	3
	не більше 10^2 КУО грамнегативних бактерій толерантних до жовчі в 1 г	
Кількісне визначення: фосфатидилхолін	Не менше 94,0 %, в перерахунку на безводну речовину	98,6%

3.3. Оптимізація технології АФІ концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней

Приготування екстракту дермального шару шкіри свиней проходило за такими технологічними стадіями: екстракція дермального шару шкіри свиней; фільтрація екстракту дермального шару шкіри свиней; ультрафільтрація екстракту дермального шару шкіри свиней. Для оптимізації технологічної стадії концентрування екстракту депротейнізованого дермального шару шкіри свиней використовували методи випарювання під вакуумом у реакторі, на ротційному випарювачі та методом ліофільного сушіння. Під час проведення досліджень було враховано той факт, що підвищення температурних умов концентрації очищеного екстракту в разі нагрівання та витримання протягом 48 год за кімнатної температури основний цільовий маркер пептидного комплексу – епідермальний фактор росту залишається стабільним.

Метод випарювання під вакуумом у реакторі здійснювали шляхом випарювання, імітуючи умови в реакторі, а саме: 500 мл екстракту в скляному реакторі об'ємом 500 мл до 10 мл під зниженим тиском 20 мПа на водяній бані з температурою $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$ та постійним перемішуванням на магнітній мішалці.

Метод випарювання на ротаційному випарювачі за двох режимів температури нагрівання розчинувлював наступні етапи: випарювали 500 мл екстракту в колбі об'ємом 2000 мл до 10 мл на плівково-ротаційному випарювачі Rotavapor 215 виробництва «Buchi» (Швейцарія) за температури водяної бані (30 ± 2) та (40 ± 2) °C і тиску 20 мПа.

Метод ліофільного сушіння складався з ряду технологічних стадій: до фільтрату екстракту депротейнізованого дермального шару шкіри свиней додавали стабілізатор гліцин (10% від загального білка) та перемішували за кімнатної температури 2-8°C протягом 2 год. По 50 мл розчину ультрафільтрату екстракту депротейнізованого дермального шару шкіри свиней з гліцином розливали у контейнери в стерильних умовах. Контейнери з концентратом заморожували декількома циклами за -45 °C протягом 5 год та ліофілізували.

Режим ліофільного висушування ультрафільтрату екстракту депротейнізованого дермального шару шкіри свиней включав:

1. Охолодження суміші до температури 5 °C.
2. Установлення на плиту (попередньо охолоджену) в приладі для ліофільного сушіння.
3. Заморожування. Охолодження до -45 °C. Швидкість охолодження 10 °C/год.
4. Первине сушіння. Нагрівання до -10°C. Швидкість нагріву – 20 °C/год. Вакуум – 0,04 мБар. Інкубація в зазначених умовах – 23 год.
5. Вторине сушіння. Нагрівання до 20 °C. Швидкість нагріву – 40 °C/год. Вакуум – 0,01 мБар. Інкубація в зазначених умовах – 28 год.
6. Закупорювання контейнерів в атмосфері азоту. Тиск – 760 + 50 mbar.

Результати кількісного визначення загального білка в зразках концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней за різних умов випарювання наведено в табл. 3.10.

Як видно, випарювання екстракту дермального шару шкіри свиней не відбувалося, тому аналіз загального білка не проводили. У разі використання

методу випарювання на роторному випарювачі було встановлено, що найбільший вміст загального білка (2,50 мг/мл) в екстракті утворюється за температури водяної бані (30 ± 2) °C.

У разі випарювання на роторному випарювачі з температурою бані (40 ± 2) °C спостерігали зменшення вмісту білка в екстракті до 1,81 мг/мл. Хоча час випарювання в цьому разі зменшується на 17%, втрати білка збільшуються на 27,6%. Окрім цього, з підвищенням температури спостерігалось утворення видимих частинок в об'ємі концентрату, що свідчить про деструкцію білка. Така втрата білка неприпустима, оскільки призведе до збільшення маси концентрату під час приготування ЛЗ у формі очних крапель.

Таблиця 3.10

**Результати кількісного визначення загального білка
та молекулярної маси**

Зразок	Час випарювання, год	Загальний білок, мг/мл (не менше 1,5 мг/мл)	Гель-хроматографія			
			час утримання, хв	площа піку	висота піку	розрахункова молекулярна маса, Дал
1	2	3	4	5	6	7
Метод випарювання на роторному випарювачі (випарювання з неповної колби за температури водяної бані (30 ± 2) °C)	10	2,50	7.917	75263	30089	62550,4061
Метод випарювання на роторному випарювачі (випарювання з неповної колби за температури водяної бані (40 ± 2) °C, підвищення температури на 10 °C)	8,3	1,81	8.279	77181	30856	59815,3841

1	2	3	4			
Метод випарювання під вакуумом у реакторі (випарювання з повної колби за температури водяної бані (30 ± 2) °C)	12,0	Випарювання не відбувалося, аналіз не проводили	Випарювання не відбувалося, аналіз не проводили			
Ліофільна сушка	56,0	Для ліофілізату 89,5% (мг/мг)	7.982	76115	30119	62190,7485

У разі використання методу ліофільного сушіння було встановлено, що вміст загального білка в ліофілізованому порошку становить 89,5% (мг/мг) та за встановленим молекулярно масовим розподілом відповідає концентратам, отриманим методом випарювання. Час концентрування методом ліофільного сушіння (56 год) значно перевищує час концентрування методом випарювання і є більш технологічно складним.

Отже, концентрування екстракту депротейнізованого дермального шару шкіри свиней необхідно проводити за параметрами методу випарювання на роторному випарювачі за температури (30 ± 2) °C і тиску 20 мПа. Відсутність процесу деструкції білка під час експерименту в отриманому концентраті було підтверджено методом гель-проникної хроматографії з ідентифікацією основного піка білка з часом утримування, що відповідає молекулярній масі, еквівалентній 5,9-6,2 кДа, та порівнянням зі зразком, отриманим методом ліофільного сушіння.

3.4 Розробка технології ліпосомального лікарського засобу у формі очних крапель та критичних параметрів виробництва

3.4.1 Теоретичне та експериментальне обґрунтування способу отримання ліпосомального лікарського засобу у формі очних крапель

Під час фармацевтичної розробки ЛЗ було виготовлено модельні зразки з різною концентрацією фосфатидилхоліну із соєвих бобів (табл. 3.11), що виробляли за однакових умов.

Для визначення відсотка інкапсуляції пептидів депротейнізованого дермального шару шкіри свиней у ліпосому отриманих зразків було застосовано трансмісійну електронну мікроскопію та Романівську мікроскопію (рис. 3.1 та 3.2).

Таблиця 3.11

Модельні зразки для вибору концентрації фосфатидилхоліну із соєвих бобів

Компонент	Зразок 0 (плацебо)	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Депротейнізований дермальний шару шкіри свиней (у перерахунку на пептиди)	0 мг/мл	1,5 мг/мл	1,5 мг/мл	1,5 мг/мл
Фосфатидилхолін (ліпоїд C100)	100,0 мг/мл	80 мг/мл	90 мг/мл	100 мг/мл
Кислота хлористоводнева розведена	до рН 5,0-6,0	до рН 5,0-6,0	до рН 5,0-6,0	до рН 5,0-6,0
Натрію гідроксид	до рН 5,0-6,0	до рН 5,0-6,0	до рН 5,0-6,0	до рН 5,0-6,0
Вода для ін'єкції	до 1 мл	до 1 мл	до 1 мл	до 1 мл

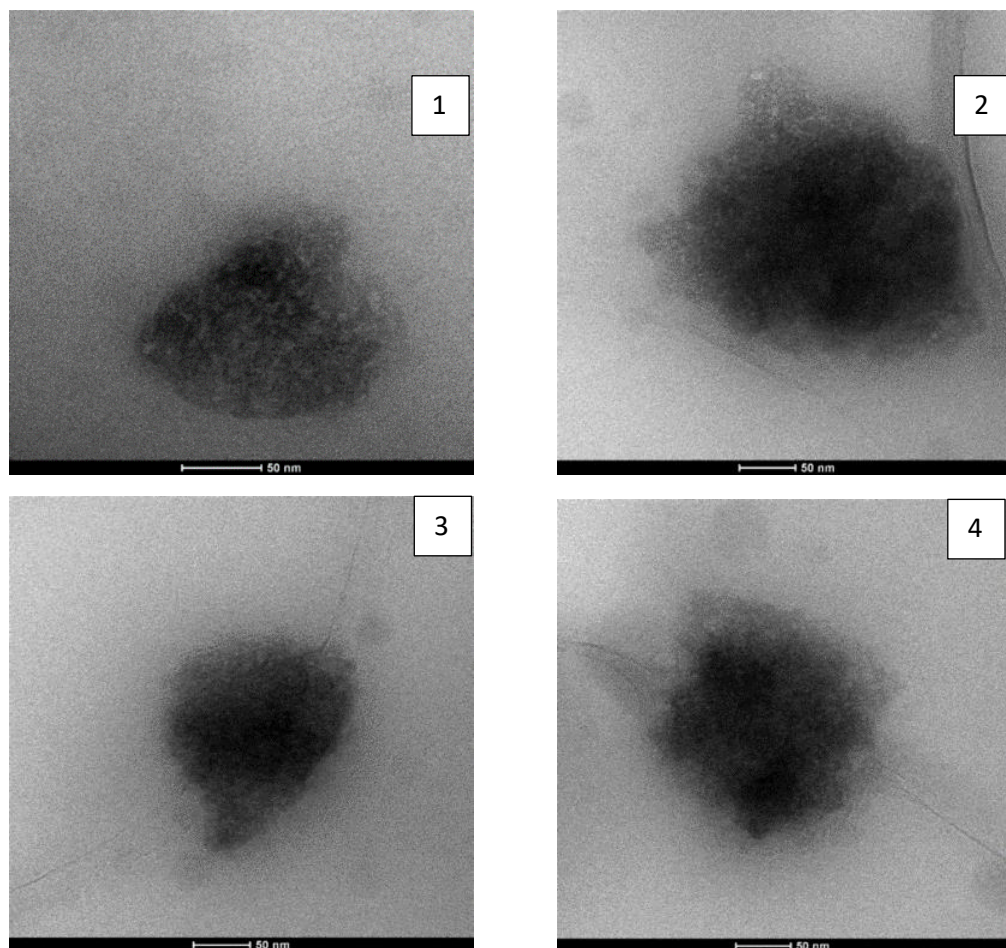


Рис. 3.1 Трансмісійна електронна мікроскопія зображення ліпосоми зразка № 0 (плацебо) (1), ліпосоми зразка № 1 (2), ліпосоми зразка № 2 (3), ліпосоми зразка № 3 (4)

Як видно з рис. 3.1, метод трансмісійної електронної мікроскопії не дав можливості відрізнити інкапсульовані пептиди дермального шару шкіри свиней у ліпосомальну форму. Також цей метод не дозволяє відрізнити ліпосоми плацебо (без додавання та інкапсульювання пептидів дермального шару шкіри свиней) від ліпосом з інкапсульованими пептидами.

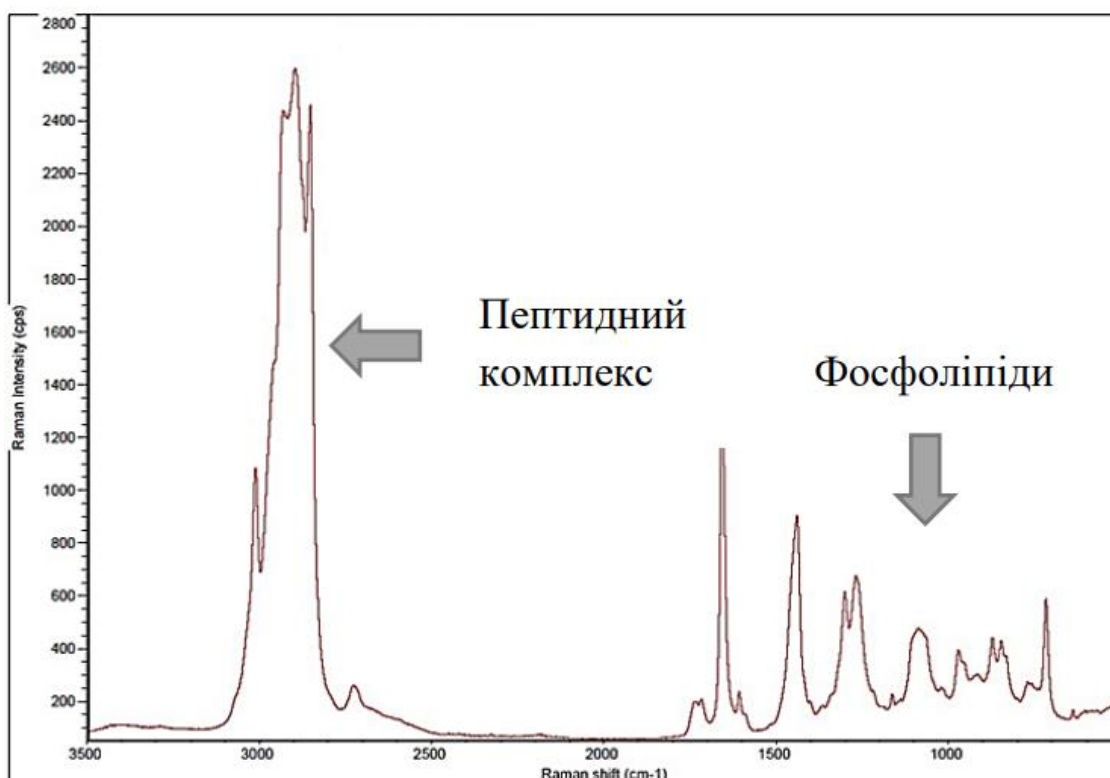


Рис. 3.2 Спектр комбінаційного розсіювання оптично захопленої ліпосоми, що містить депротейнізований пептидний комплекс зі шкіри свині

На рис. 3.2 наведено отриманий спектр комбінаційного розсіювання оптично захопленої ліпосоми, що містить депротейнізований пептидний комплекс зі шкіри свині. Піки Рамана за $3150\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ та $1850\text{--}1414\text{ cm}^{-1}$, що вказують на присутність фосфоліпідів з ліпосом і молекул пептидного комплексу.

Для подальших робіт з метою визначення відсотка інкапсуляції пептидів депротейнізованого дермального шару шкіри свиней у ліпосому отриманих зразків було застосовано метод динамічного світлорозсіювання (рис. 3.3).

Як видно з рис. 3.3, метод динамічного світлорозсіювання дає можливість відрізнити інкапсульовані пептиди дермального шару шкіри свиней у ліпосому від плацебо, але цей метод не дає можливості визначити відсоток інкапсуляції пептидів у ліпосомальну форму.

Для визначення відсотка інкапсуляції пептидів у ліпосому отримані модельні зразки 0-3 були проаналізовані методом ВЕРХ, отримані результати наведено в табл. 3.12.

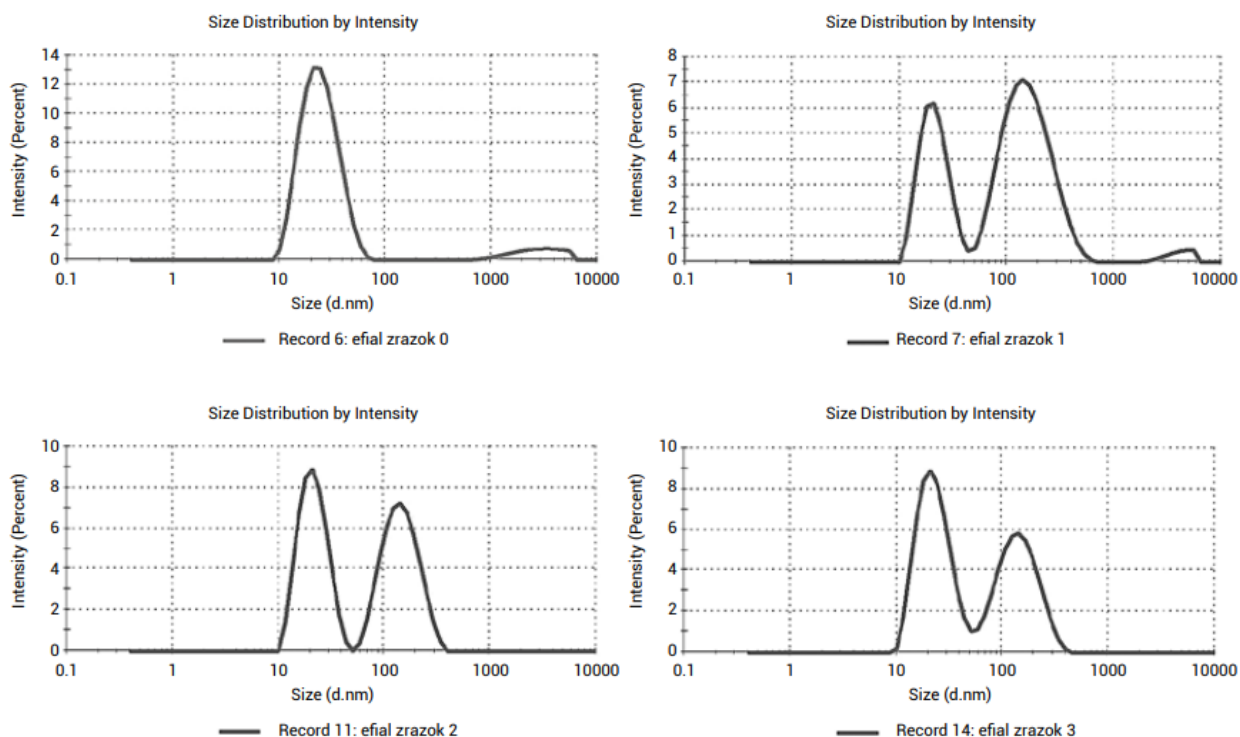


Рис. 3.3 Результати дослідження методом динамічного світлорозсіювання зразка № 0 (плацебо), зразка № 1, зразка № 2, зразка № 3

Таблиця 3.12

**Результати визначення інкапсулювання пептидів дермального шару
зі шкіри свиней в модельних зразках для вибору концентрації
фосфатидилхоліну із соєвих бобів**

Показник	Зразок 0 (плацебо)	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Кількість інкапсульованих пептидів дермального шару шкіри свиней, %	0,0	84,3	96,7	100,0

Як видно з табл. 3.3, у зразку № 3, де концентрація фосфатидилхоліну із соєвих бобів становить 100 мг/мл, відбувається 100% інкапсулювання пептидів дермального шару шкіри свиней до складу ліпосоми.

Отже, кількість фосфатидилхоліну із соєвих бобів у розробленому ЛЗ становить 100 мг/мл.

Розмір частинок емульсії достатній для отримання ліпосомального ЛЗ у формі очних крапель визначався емпірично: для ліпосом різного розміру проводилось інкапсулювання білка депротейнізованого дермального шару шкіри свиней і контролювався його відсоток (табл. 3.13).

Таблиця 3.13

Результати інкапсулювання білка депротейнізованого дермального шару зі шкіри свиней з використанням ліпосом різного розміру

Розмір ліпосом в розчині, нм	Відсоток інкапсулювання, %
250-300	72,3
160-180	88,1
140-160	92,7
120-140	100,0
100-120	99,8
80-100	100,0

Як видно з табл. 3.13, повне інкапсулювання білка депротейнізованого дермального шару шкіри свиней в 1 л розчині ліпосом за робочого тиску диспергатора 20000 PSI за 20 хв відбувається в розчинах ліпосом з розміром 120-140 нм і менше. Оскільки для отримання ліпосом меншого розміру необхідно проводити диспергування протягом більш тривалого часу найоптимальнішим з технологічного погляду є розчин з розміром ліпосом 120-140 нм для отримання ліпосомального ЛЗ у формі очних крапель.

Стабільність зразків приготованої ліпосомальної емульсії за різних параметрів процесу гомогенізації визначали з допомогою дисперсійного аналізатора LUMiSizer (LUM GmbH, Berlin, Німеччина), проводили аналіз за 37 °C упродовж 4 год, відповідно через 30 с за 3000 об/хв (1000 × g).

На рис. 3.4 зображено результати, отримані для емульсії 5000, 10 000, 20 000 psi / 345, 690, 1380 бар після одного проходу через процесор Microfluidizer, що показують зміну профілів як функцію часу та простору. Верхня

частина зразка, а, отже, межа розділу повітря і рідини лежить на 110 мм (виміряно від центру обертання), а нижня частина зразка – на 130 мм. Перший зроблений профіль показано червоним кольором. Усі подальші вимірювання показані у вигляді ліній із червоно-зеленим градієнтом з повним зеленим, що вказує на останнє виконане вимірювання.

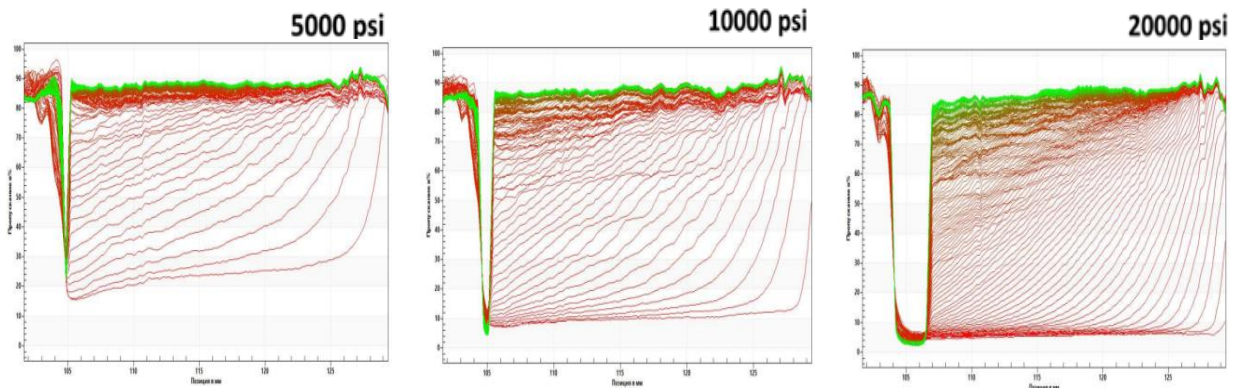


Рис. 3.4 Результати, отримані для емульсії 5000, 10 000, 20 000 psi / 345, 690, 1380 бар після одного проходу через процесор Microfluidizer

Стабільність емульсії (тобто тенденцію до поділу) можна кількісно визначити співвідношенням загального об'єму рідкої фази, відокремленої після заданого часу центрифугування, до об'єму всієї проби (рис. 3.5). Межа розділу ліпідний шар – вода для цієї ліпосомальної емульсії не була чіткою під час процесу розшарування, через 30 хв межа фази перемістилася від дна зразка до положення 130 мм. Застосування вищих зсувних зусиль до емульсії за рахунок підвищення тиску гомогенізації приводить до значного підвищення стабільності емульсії. За нижчого тиску гомогенізації (5000 фунтів на квадратний дюйм або 345 бар) збільшення кількості циклів приводило до поступового отримання більш стабільних емульсій. За 10 000 фунтів на квадратний дюйм (690 бар) лише перші два цикли продемонстрували значне підвищення стабільності емульсії, а додаткові цикли мали лише незначний ефект. За найвищого прик-

ладеного тиску 20 000 psi для цієї ліпосомальної емульсії ефективніше збільшити тиск гомогенізації, на відміну від кількості циклів, щоб досягти найвищої стабільності стосовно ліпідного шару.

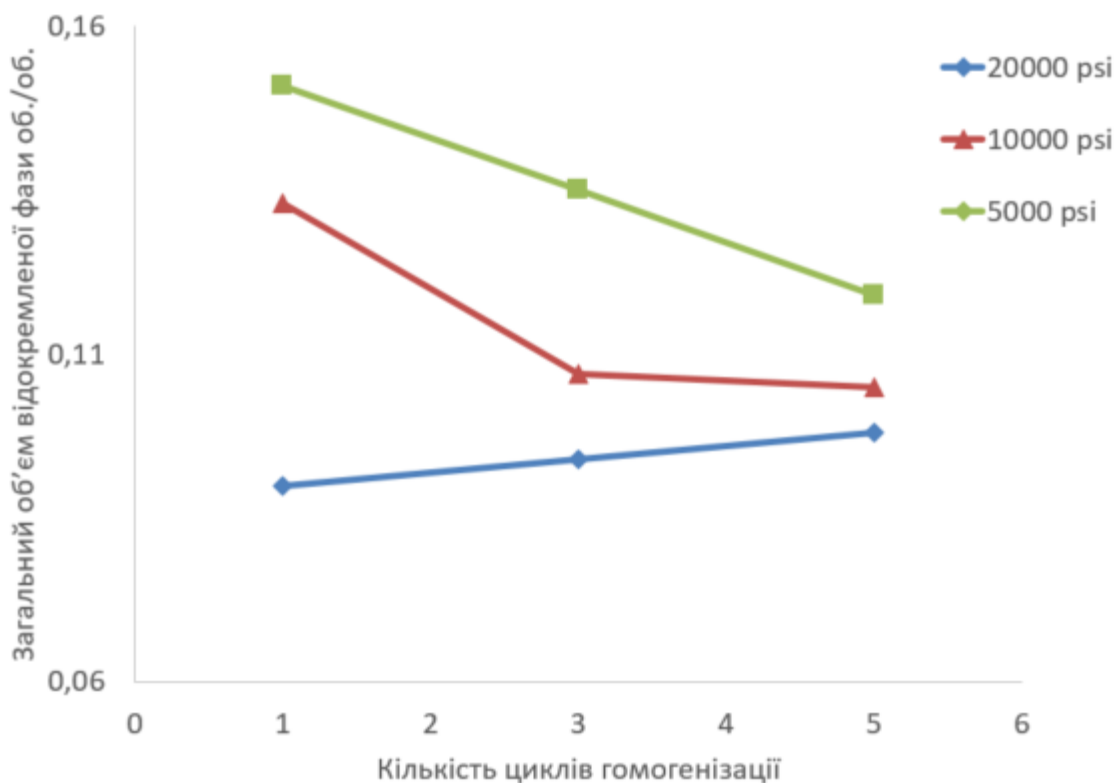


Рис. 3.5 Визначення впливу кількості циклів з відношенням загального об'єму рідкої фази, відокремленої після заданого часу центрифугування, до об'єму всієї проби

Розроблення технологічного процесу приготування ЛЗ базувалося на попередньому досвіді виготовлення ЛЗ у формі водних розчинів (очні краплі, назальні розчини, розчини для ін'єкцій, сиропи, спреї). Використано дані про фізико-хімічні характеристики АФІ та допоміжних речовин, що входять до складу ЛЗ.

В процесі розроблення технологічного процесу було враховано:

1. Компоненти ЛЗ (крім фосфатидилхоліну) легко розчиняються у воді.

2. Концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней має добру стабільність в діапазоні рН від 4,0 до 6,0.

3. Усі компоненти ЛЗ сумісні і не викликають руйнування один одного.

Враховуючи те, що очні краплі являють собою водну емульсію АФІ та допоміжних речовин, для дослідження процесу виробництва були передбачені такі стадії:

1. Приготування емульсії ліпосом.
2. Отримання лікарського засобу.
3. Фільтрування.
4. Наповнення флаконів (пакування).

Стадія «Приготування емульсії ліпосом» складається з таких технологічних операцій: розчинення фосфатидилхоліну, отримання суспензії ліпосом розміром 120-140 нм.

Стадія «Отримання лікарського засобу» складається з таких технологічних операцій: інкапсуляція білкового концентрату в ліпосоми, розчинення допоміжних речовин, коригування рН. Виробничий процес розроблено на основі можливостей технологічного обладнання ПАТ «Фармак» (м. Київ).

Розроблення технології відбувалося на лабораторному рівні з подальшим відтворенням (масштабуванням) оптимальної технології в цехових умовах. Схема технологічного процесу отримання ліпосомальних очних крапель наведена на рис. 3.6.

*Вихідна сировина, проміжна
продукція та матеріали зі
складу*

*Контроль у процесі
виробництва*

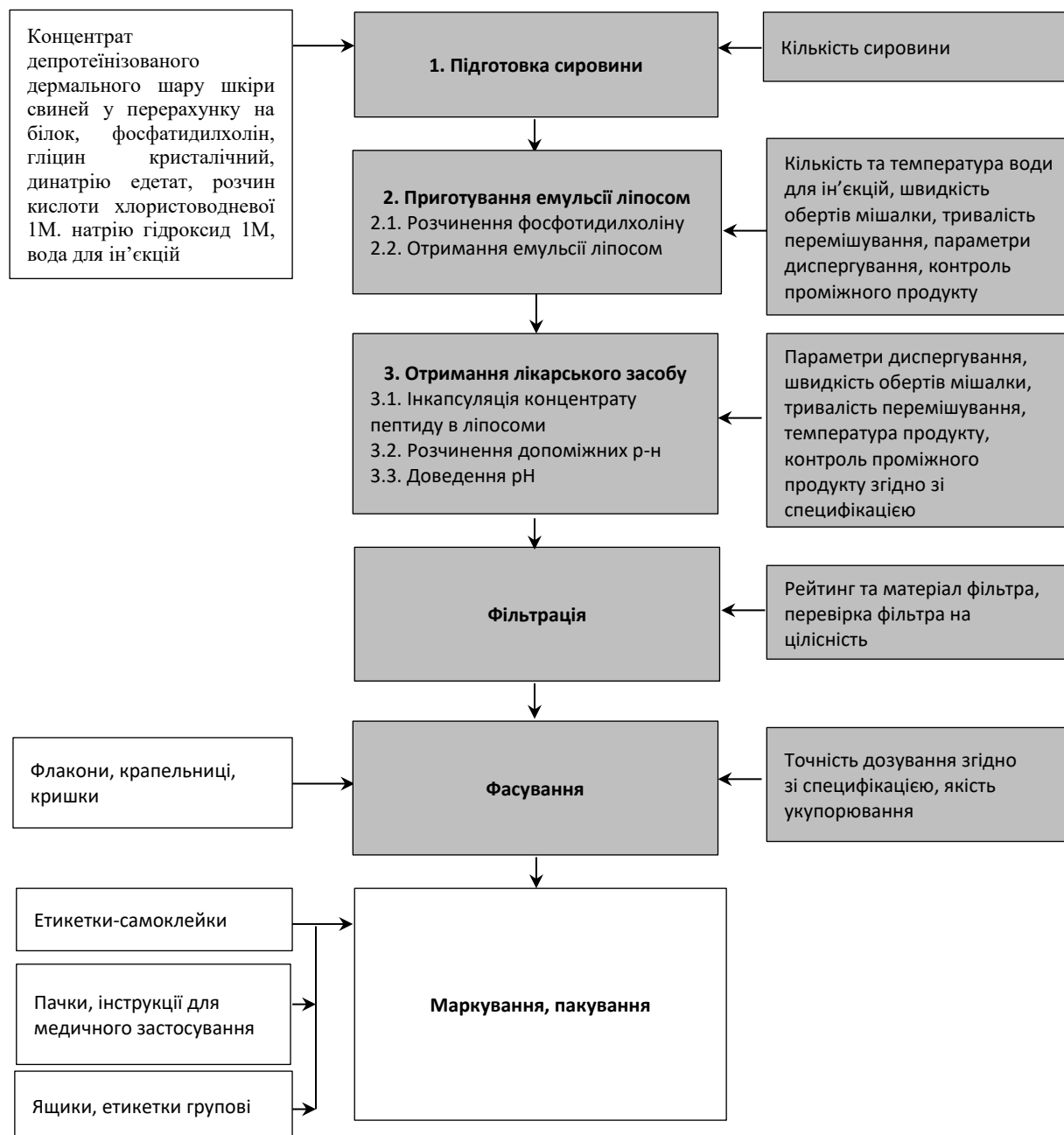


Рис. 3.6 Схематичне зображення технологічного процесу отримання ліпосомальних очних крапель

На підставі аналізу ризиків технологічного процесу було визначено операції, які можуть вплинути на якість продукції. Первинна оцінка наведена нижче (табл. 3.14).

Первинна оцінка ризиків розробки виробничого процесу

Критичні показники якості ГЛЗ	Операції									
	Приготування розчину: розчинення фосфатидилхоліну	Приготування розчину: диспергування фосфатидилхоліну	Приготування розчину: розчинення депротейнізованого концентрату дермального шару шкіри свиней	Приготування розчину: диспергування депротейнізованого дермального шару шкіри свиней	Приготування розчину: розчинення хлориду натрію.	Приготування розчину: розчинення кристалічного гліцерину	Приготування розчину: додавання гідроксиду натрію 0,1М	Приготування розчину: додавання соляної кислоти 0,1М	Фільтрація розчину	Наповнення флаконів
Кількісний вміст АФІ	низький	високий	низький	високий	низький	низький	низький	низький	високий	високий
Домішки	низький	середній	низький	середній	низький	низький	середній	середній	високий	високий
Стерильність	низький	низький	низький	низький	низький	низький	низький	низький	середній	середній

Розроблення стадій приготування розчину

1. Диспергування фосфатидилхоліну із соєвих бобів

На підставі аналізу ризиків на цій стадії був ідентифікований потенційний ризик диспергування фосфатидилхоліну із соєвих бобів для показників «кількісне визначення» та «домішки». Але шляхом керування параметрами процесу та контролю під час процесу ризик може бути знижений до прийнятного рівня.

Процес диспергування вивчений емпірично та взаємодії між параметрами проаналізовано. Ключові фактори, які беруть участь у цій операції розчинення, були вивчені для оцінки ризику. Усі можливі фактори були ідентифіковані, проаналізовані та оцінені. Більшість факторів були або некритичними, або контрольованими під час процесу.

На підставі статистичного моделювання (табл. 3.15, табл. 3.16) було зроблено гнучку та надійну виробничу операцію. Певні оптимальні параметри процесу наведено у табл. 3.17.

Таблиця 3.15

**Дизайн встановлення оптимальних значень параметрів
процесу диспергування фосфотидилхоліну із соєвих бобів**

Фактор: Змінний параметр		Рівні		
		-1 (низький)	0 (середній)	+1 (високий)
A	Тиск під час диспергування, PSI	15000	20000	25000
B	Час диспергування, хв/л	10	15	20
Відгук		Мета		Критерії прийнятності
Y1	Диспергування фосфотидилхоліну із соєвих бобів	Контроль розміру частинок		Відповідність визначеному критерію

Таблиця 3.16

Результат визначення оптимальних значень процесу диспергування фосфотидилхоліну соєвих бобів

№ експерименту	Фактор: Змінний параметр		Відгук
	A	B	Y1
	PSI	хв/л	Відповідність визначеному критерію
1	15000	10	Не відповідає
2	15000	20	Відповідає
3	25000	15	Відповідає
4	15000	15	Відповідає
5	20000	15	Відповідає
6	25000	10	Не відповідає
7	25000	20	Відповідає
8	20000	20	Відповідає
9	20000	10	Не відповідає

Таблиця 3.17

**Параметри процесу диспергування фосфатидилхоліну
із соєвих бобів**

Параметри процесу	Критичність параметра	Стратегія контролю
Тип диспергатора	Критичний	Диспергатор високого тиску
Вимоги до додавання	Критичний	Відповідно до рецептури
Тиск під час диспергування, PSI	Критичний	20000 PSI
Час диспергування, хв/л	Критичний	15-20 хв/л

2. Диспергування концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней

На підставі аналізу ризиків на цій стадії було ідентифіковано потенційний ризик диспергування депротейнізованого дермального шару шкіри свиней для показника «кількісне визначення» та «домішки». Але шляхом керування параметрами процесу та контролю під час процесу ризик може бути знижений до прийняттого рівня.

Процес диспергування вивчений емпірично та проаналізовано взаємодії між параметрами. Ключові фактори, які беруть участь у цій операції розчинення, були вивчені для оцінки ризику. Усі можливі фактори були ідентифіковані, проаналізовані та оцінені. Більшість факторів були або некритичними, або контрольованими під час процесу.

На підставі статистичного моделювання (табл. 3.18 та 3.19) було розроблено гнучку та надійну виробничу операцію. Певні оптимальні параметри процесу наведено у табл. 3.20.

Таблиця 3.18

**Дизайн визначення оптимальних значень параметрів процесу
диспергування концентрату депротейнізованого дермального
шару шкіри свиней**

Фактор: Змінний параметр		Рівні		
		-1 (низький)	0 (середній)	+1 (високий)
A	Тиск при диспергуванні, PSI	15000	20000	25000
B	Час диспергування, хв/л	10	15	20
Відгук		Мета		Критерії прийнятності
Y1	Диспергування концентрату	Контроль інкапсуляції		Відповідність визначеному критерію

Таблиця 3.19

**Результат визначення оптимальних значень
процесу диспергування**

№ експе- рименту	Фактор: Змінний параметр		Відгук
	A	B	Y1
	PSI	хв/л	Відповідність визначеному критерію
1	15000	10	Не відповідає
2	15000	20	Відповідає
3	25000	15	Відповідає
4	15000	15	Відповідає
5	20000	15	Відповідає
6	25000	10	Не відповідає
7	25000	20	Відповідає
8	20000	20	Відповідає
9	20000	10	Не відповідає

Таблиця 3.20

**Параметри процесу диспергування концентрату
депротейнізованого дермального шару шкіри свиней**

Параметри процесу	Критичність параметра	Стратегія контролю
Тип диспергатора	Критичний	Диспергатор високого тиску
Вимоги до додавання	Критичний	Відповідно до рецептури
Тиск під час диспергування, PSI	Критичний	20000 PSI
Час диспергування, хв/л	Критичний	15-20 хв/л

3. Додавання розчину кислоти хлористоводневої 0,1М

На підставі аналізу ризиків на цій стадії було ідентифіковано потенційний ризик для показника домішки. Але шляхом керування параметрами процесу та контролю під час процесу ризик може бути знижений до прийняттого рівня. Це дослідження було зосереджено на оцінці критичності параметрів процесу складу. На підставі попереднього досвіду з використанням соляної кислоти для коригування рН слід використовувати розведену до концентрації 0,1 моль/л кислоту хлористоводневу. Додавання 0,1М кислоту хлористоводневу проводили за стандартних параметрів у цехових умовах (табл. 3.21).

Таблиця 3.21

Параметри процесу додавання розчину кислоти хлористоводневої 0,1М

Параметри процесу	Критичність параметра	Стратегія контролю
Тип реактора	Критичний	Реактор вертикальний з оболонкою та магнітною мішалкою
Вимоги до додавання	Критичний	Згідно з рецептурою
Швидкість оборотів мішалки	Критичний	40-80 %
Час перемішування	Критичний	5-10 хв

4. Додавання розчину натрію гідроксиду 0,1М

На підставі аналізу ризиків на цій стадії було ідентифіковано потенційний ризик для показника домішки. Але шляхом керування параметрами процесу та контролю під час процесу ризик може бути знижений до прийнятного рівня. Це дослідження було зосереджено на оцінці критичності параметрів процесу складу.

На підставі попереднього досвіду з використанням гідроксиду натрію для коригування рН слід використовувати розведений до концентрації 0,1 моль/л натрію гідроксид. Додавання 0,1М гідроксиду натрію проводили за стандартних параметрів у виробничих умовах (табл. 3.22).

Таблиця 3.22

Параметри процесу додавання гідроксиду натрію 0,1М

Параметри процесу	Критичність параметру	Стратегія контролю
Тип реактора	Критичний	Реактор вертикальний з оболонкою та магнітною мішалкою
Вимоги до додавання	Критичний	Згідно з рецептурою
Швидкість оборотів мішалки	Критичний	40-80 %
Час перемішування	Критичний	5-10 хв

5. Вибір режиму стерилізації

Для дослідження режимів стерилізації була приготована ліпосомальна емульсія ЛЗ, частину якої було стерильно відфільтровано крізь стерилізувальний фільтр із поліетерсульфоновою мембраною рейтингом 0,8/0,2 мкм Sartopore 2, виробництва фірми «Sartorius» (Німеччина). Приготовану ліпосомальну емульсію стерильно відфільтровану та нестерильну частини розливали окремо в асептичних умовах у скляні флакони по 5 мл, укупорювали гумовими пробками та алюмінієвими ковпачками в струмі азоту. Контейнери з нестерильною емульсією розділили на 3 рівні партії по 200 флаконів кожна.

Відфільтровану частину не піддавали термічній стерилізації, оскільки вона стерилізована фільтрацією крізь стерилізаційний фільтр з розміром пор 0,2 мкм. Флакони з нестерильною 1-ою партією стерилізували за температури 121 °C протягом 15 хв, 2-гу партію піддавали стерилізації за 110 °C протягом 30 хв. 3-тя партія була залишена без стерилізації для контролю показників якості перед стерилізацією. Результати контролю згідно зі специфікацією проєкту МКЯ (готовий продукт) наведено у табл. 3.23.

Таблиця 3.23

Результати досліджень з вибору методу стерилізації ЛЗ

Показники якості	Вимоги специфікації	Вихідні показники якості	Режим стерилізації		
			121 °C, 15 хв	110 °C, 30 хв	Стерилізаційна фільтрація
Опис	Емульсія жовтого кольору	Відповідає	Не відповідає	Відповідає	Відповідає
pH	Від 4,0 до 6,0	5,1	4,3	4,9	5,1
Осмоляльність	Від 250 до 360 мОсмоль/кг	310	425	367	310
Розмір часток перший пік другий пік	Не більше 100 нм Не більше 400 нм	28 174	180 690	147 650	28 174
Супровідні домішки					
Пептиди		1	16	6	1
більше 6000 Да	Не більше 5%	1,4	33	11	1,4
менше 1000 Да	Не більше 3%	0,2	38	16	0,2
Фосфатидилхолін	Не більше 10 мг/мл				
Кількісне визначення пептиди	Від 0,056 до 0,084 мг/мл	0,072	0,012	0,032	0,072
фосфатидилхолін	Від 80 до 110 мг/мл	100	56	74	100
Стерильність	Має бути стерильним	—	Відповідає	Відповідає	Відповідає

У зразках ЛЗ, які піддавалися стерилізації за температури 121 °C (партія 1) і 110 °C (партія 2), в емульсії спостерігаються видимі механічні домішки, що не відповідає вимогам специфікації за показником Опис. Аналіз домішок у зразках цих двох серій показав перевищення меж для них. А збільшення піридоксину та дезокіпіридоксину, що свідчить про наявність гідролітичних і окисних процесів у розчині за підвищеної температури.

Отже, зразки серій 2 і 3, які було термічно простерилізовано, мають відхилення від специфікації за показниками «Опис», «Осмолярність», «Розмір частинок», «Супровідні домішки» та «Кількісне визначення». Тому термічна стерилізація не може бути використана для стерилізації ЛЗ. Після стерилізаційної фільтрації ЛЗ відповідав вимогам специфікації за всіма показниками. Тому рекомендовано як спосіб стерилізації використовувати стерилізаційну фільтрацію розчину крізь мембрани з розміром пор 0,2 мкм та наповнення стерильних флаконів ліпосомальною емульсією в асептичних умовах.

6. Визначення впливу фільтра на готовий лікарський засіб

Для вибору матеріалу фільтру було досліджено фільтри Ultipor N66 0,2 мкм (матеріал мембрани нейлон) виробництва Pall, Fluorodyne II 0,2 мкм (матеріал мембрани полівіліден фторид) виробництва Pall, Supor EX 0,2 мкм (матеріал мембрани поліефірсульфону) виробництва Pall, Sartopore 2 0,2 мкм (матеріал мембрани поліефірсульфону) виробництва Sartorius.

Приготований розчин ЛЗ пропускався крізь досліджувані фільтри, контролювались сорбція АФІ на мембрані. Отримані результати наведені в табл. 3.24.

Таблиця 3.24

Результати дослідження фільтрів для лікарського засобу очні краплі на основі пептидного комплексу

Марка стерилізаційної мембрани (виробник)	Матеріал	Кількісне визначення, пептиди, мг/мл		Кількісне визначення, фосфатидилхолін, мг/мл	
		до фільтрації	після фільтрації	до фільтрації	після фільтрації
Supor® (Pall)	Поліетерсульфон	0,073	0,072	103,2	103,4
Sartopore 2® (Sartorius)	Поліетерсульфон	0,073	0,073	103,2	103,1
Ultipor® N66 (Pall)	Нейлон	0,073	0,071	103,2	103,2
Fluorodyne II ® (Pall)	Полівініліден- фторид	0,073	0,072	103,2	103,1

Як видно з табл. 3.24, усі досліджені фільтри не мають сорбційних властивостей. За отриманими результатами було визначено оптимальні марки стерилізаційних мембран і показано, що шляхом збільшення перепаду тиску об'ємна пропускна здатність була значно поліпшена більш ніж у 18 разів (від 0,7 до 4,1 бар), а в іншому експерименті – більш ніж у 10 разів (від 0,3 до 2,1 бар). Крім того, була показана користь використання вищого перепаду тиску на фільтрацію ліпосом крізь різні стерилізаційні мембрани. Результати досліджень наведено в табл. 3.25.

Таблиця 3.25

Результати дослідження процесу фільтрації ЛЗ

Марка стерилізаційної мембрани (виробник)	Матеріал	Перепад тиску на мембрані (P), Бар	Об'ємна пропускна здатність ($\tilde{V}$), л/(хв×см ²)		Початковий опір мембрани, (R ^{заг}), 10 ¹⁰ ×м ⁻¹
			T10%	T90%	
Supor® (Pall)	Поліетерсульфон	0,3	0,28	0,21	29
		2,1	2,72	2,22	59
Sartopore 2® (Sartorius)	Поліетерсульфон	0,3	0,31	0,24	27
		2,1	3,74	2,58	43
Ultipor® N66 (Pall)	Нейлон	0,7	0,15	0,05	59
		4,1	1,62	0,9	72
Fluorodyne II ® (Pall)	Полівініліден-фторид	0,7	0,17	0,06	56
		4,1	1,44	1,16	75

Отримані значення початкового опору мембрани показали, що за геометричними властивостями (розмір пор, пористість і рельєф поверхні) і властивостями матеріалу, мембрани марок Supor® (Pall) та Sartopore 2® (Sartorius) мають меншу здатність до блокування мембрани під час фільтрації та до забезпечення ресурсу фільтрації за рахунок більшої пропускної здатності, ніж

мембрани марок Ultipor® N66 (Pall) та Fluorodyne II ® (Pall). Процес фільтрації слід проводити із використанням більш високого перепаду тиску, що збільшує продуктивність процесу за рахунок більшої пропускної здатності мембрани.

Обраний фільтр Sartopore 2 було досліджено на речовини, що екстрагуються та вимиваються (Extractables & Leachables, ICH Q3E) методом ВЕРХ із мас-спектрометричним детектором, результати наведено в табл. 3.26.

Таблиця 3.26

Результати дослідження речовини, що екстрагуються та вимиваються (Extractables & Leachables, ICH Q3E) методом вискоефективної рідини хроматографії із мас-спектрометричним детектором

Зразки	Молекулярна маса визначених речовин	Висновок
1	2	3
Етанольний екстракт фільтра Sartopore 2	302, 416	Визначено дві речовини, що екстрагуються етанолом з матеріалу фільтра з молекулярною масою 302, 416
Водний екстракт фільтра Sartopore 2	156, 302, 416	Визначено три речовини, що екстрагуються водою з матеріалу фільтра з молекулярною масою 156, 302, 416
Екстрагент – етанол 96 %	416	Визначено наявність домішки з молекулярною масою 416 в екстрагенті – етанол
Екстрагент – вода для ін'єкцій	відсутні	В екстрагенті – вода для ін'єкцій екстрагованих речовин з фільтра не виявлено

1	2	3
ЛЗ після фільтрації крізь фільтр Sartopore 2	відсутні	У ЛЗ після фільтрації крізь фільтр Sartopore 2 екстрагованих речовин з фільтра не виявлено

Дослідження показали, що у разі фільтрації ЛЗ крізь досліджуваний фільтр, вимивання речовин, що екстрагуються з матеріалу фільтра, відсутнє. Обраний фільтр Sartopore 2 сумісний із ЛЗ.

Для встановлення стерилізаційної здатності обраної марки фільтра було проведено тест на здатність утримувати бактерії. Перед проведенням тесту на здатність утримувати бактерії проводили перевірний тест для тест-культури бактерій *Brevundimonas diminuta* для того, щоб оцінити ступінь бактерицидності ЛЗ.

Для дослідження було взято стерилізаційний фільтр фірми «Sartorius» Sartopore 2 (0.45/0.2 μm) – поліефірсульфон, вибраний у попередніх дослідженнях.

На першій стадії досліджень було встановлено, що ЛЗ не виявляє бактерицидного ефекту, включаючи і бактерії *Brevundimonas diminuta*.

Тому для досліджень Bacterial Challenge Study було заплановано провести навантаження фільтра розчином і після цього провести повторне навантаження фільтра культурою *Brevundimonas diminuta* в концентрації не менше 107 КУО / cm^2 матеріалу фільтру.

Перед проведенням дослідження стерилізаційний фільтр було перевірено на цілість на установці Sartocheck®, виробництва Sartorius (Німеччина). У дослідженнях було враховано, що промисловий об'єм приготованої ліпосомальної суспензії ЛЗ під час напрацювання серії готового ЛЗ промислового масштабу проходить фільтрацію за 25-30 хв, тому приготовану ліпосомальну суспензію ЛЗ було циклічно прокачано за допомогою перистальтичного

насоса протягом 60 хв (найгірший випадок для забезпечення контакту фільтрувальної мембрани фільтра з досліджуванним розчином). На наступному етапі фільтр було навантажено культурою *Brevundimonas diminuta* в концентрації не менше 107 КУО/см² матеріалу фільтра. Після фільтрації профільтрований розчин було оцінено щодо наявності росту *Brevundimonas diminuta* на аналітичному фільтрі (контроль повторювали тричі із застосуванням позитивного контролю додатково).

У табл. 3.27 наведено результати дослідження стерилізаційної здатності фільтра.

Таблиця 3.27

Результати дослідження стерилізаційної здатності фільтра

№ і тип випробування	Тест-Фільтр			Тест на цілість фільтра (Точка бульбашки) psi		Концентрація тест-мікроорганізму		Наявність/відсутність росту <i>Brevundimonas diminuta</i> на аналітичному фільтрі
	виробник	тип	площа, см ²	до фільтрації	після фільтрації	КУО/фільтр	КУО/см ²	
1 (позитивний контроль)	Domnic Hunter	Prorog PES поліефірсульфид 0.45 μm	17,34	25.0	25.1	85,0 × 10 ⁸	4,9 × 10 ⁸	Ріст наявний
2 (дослід)	Sartorius	Sartopore 2 поліефірсульфид 0.45/0.2 μm	500	68.0	68.0	24,5 × 10 ¹⁰	4,9 × 10 ⁸	Ріст відсутній
3 (дослід)	Sartorius	Sartopore 2 поліефірсульфид 0.45/0.2 μm	500	68.4	68.5	24,5 × 10 ¹⁰	4,9 × 10 ⁸	Ріст відсутній
4 (дослід)	Sartorius	Sartopore 2 поліефірсульфид 0.45/0.2 μm	500	70.0	70.0	24,5 × 10 ¹⁰	4,9 × 10 ⁸	Ріст відсутній

Результат випробування відповідає акцепторному критерію: відсутність росту *Brevundimonas diminuta* в досліджуваних зразках; наявність росту *Brevundimonas diminuta* в позитивному контролі.

Підтверджено стерилізаційну здатність фільтра Sartopore 2 поліетерсульфон 0.45/0.2 μm для ЛЗ ліпосомальні очні краплі.

Розроблення стадії наповнення флаконів

На основі аналізу ризиків на цій стадії були ідентифіковані потенційні ризики для показників «Домішки» та «кількісне визначення». За результатами трьох валідаційних серій було доведено, що використання стандартних параметрів процесу в умовах цеху відповідає встановленим вимогам.

Висновки до розділу 3

1. Обґрунтовано якісний та кількісний склад АФІ у готовій лікарській формі – очних краплях на основі пептидного комплексу, отриманого з епідермального шару шкіри свиней.

2. Розроблено технологію отримання ліпосомальної форми очних крапель на основі пептидного комплексу з епідермального шару шкіри свиней. За допомогою фізико-хімічних досліджень доведено повноту інкапсулювання АФІ в ліпосоми.

3. На підставі комплексу досліджень обґрунтовано вибір допоміжних речовин у готовій лікарській формі.

4. Розроблено промислову технологію отримання ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу, виділеного з епідермального шару шкіри свиней.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено у таких публікаціях:

1. Kruglov E., Yarnykh T., Borshchevsky G., Rukhmakova O. Development of the technology of a liposomal form of eye drops based on a peptide complex. *Acta Poloniae pharmaceutica*. 2021. Vol. 78(2). P. 237-242.
2. Круглов Є. М., Борщевський Г. І. Оптимізація методу концентрування екстракту біологічно активних речовин із дермального шару шкіри свиней. *Український журнал військової медицини*. 2022. № 3(1). С. 87-92.
3. Kruglov E., Borshchevsky G. The use of modern QbD approaches in the pharmaceutical development of technology of liposomal eye drops. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2022. № (1). P. 28–32.
4. Круглов Є. М., Борщевський Г. І. Особливості процесу фільтрації ліпосомальної емульсії для виготовлення очних крапель на основі пептидного комплексу. *Вісник фармації*. 2023. № 1(105). С. 19-22.
5. Kruglov I., Omelchenko I., Diakun K., Chayka L., Borschevskiy G., Yarnykh T. Eye drops with reparative action based on low molecular weight peptide complex. *Science and society : 15th International conference*, Hamilton, Canada, November 8, 2019. Hamilton, 2019. P. 223-225.
6. Круглов Є., Ярних Т., Борщевський Г. Актуальність створення ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу з дермального шару шкіри свиней. *Society and science. problems and prospects : Proceedings of the III International Scientific and Practical Conference*, London, England, January 25–28, 2022. London, 2022. P. 420-423
7. Круглов Є. М., Ярних Т. Г., Борщевський Г. І. Підтвердження стерилізуючої здатності фільтра стерильної фільтрації ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології : матеріали III міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 24 берез. 2023 р.* Харків : НФаУ, 2023. С. 236-238.
8. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Використання оптичної Раманівської спектроскопії для встановлення включення пептидного комплексу у ліпосоми. *Scientific progress: innovations, achievements and prospects :*

Proceedings of VIII International Scientific and Practical Conference, Munich, Germany, 1-3 May 2023. P. 84-86.

9. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Оптимізація технології виготовлення стабільної ліпосомальної форми за допомогою прискореного дисперсійного аналізу аналітичним центрифугуванням. *Modern problems of science, education and society* : Proceedings of IV International Scientific and Practical Conference, Kyiv, Ukraine, 19-21 June 2023. Kyiv, 2023. P. 143-146.

10. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Оптимізація процесу стерильної фільтрації ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу *Theoretical foundations of scientists and modern opinions regarding the implementation of modern trends* : Proceedings of the XXV International Scientific and Practical Conference, San Francisco, USA, June 27–30, 2023. P. 309-311.

11. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Дослідження стабільності ліпосомального препарату на основі пептидного комплексу з шкіри свині у формі очних крапель. *Innovations and prospects in modern science* : Proceedings of V International Scientific and Practical Conference, Stockholm, Sweden, 8-10 May 2023. P. 80-82.

12. Спосіб одержання композиції протизапальної та регенеруючої дії : пат. № 152253 Україна / Гой А. М., Круглов Є. М., Борщевський Г. І. № и 2022 00080 ; заявл. 10.01.2022 ; опубл. 12.01.2023, Бюл. № 2. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1718248/>

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ОЧНИХ КРАПЕЛЬ НА ОСНОВІ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСУ. ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ПРЕПАРАТУ

4.1 Розроблення методик контролю якості ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу

Серед необхідних випробувань, специфічних для ліпосомальних препаратів, є визначення у складі ЛЗ фосфатидилхоліну та пептидного комплексу та їх домішок. Для випробувань допускається застосування хроматографічних методів рідинної хроматографії, а також спектрометричних методів: в УФ- та вілянках [180-188]

4.1.1 Розроблення методик ідентифікації та кількісного визначення АФІ

Одним з актуальних завдань сучасного фармацевтичного виробництва лікарських засобів, зокрема ліпосомальних препаратів, є забезпечення стандартизації та сертифікації наноматеріалів. Відомо, що фосфоліпідний склад ліпосом істотно впливає на їх властивості, і вимагає проведення ретельного фізико-хімічного аналізу, який особливо важливий на стадії внутрішньозаводського постадійного контролю [149].

Ліпосомальні лікарські засоби мають витримувати необхідні випробування на діючі речовини, та суміжні домішки.

Фосфатидилхолін

Ідентифікація:

Час утримування основного піка на хроматограмі випробуваного розчину, отриманий у розділі «Кількісне визначення. Фосфатидилхолін», має співпадати з часом утримування піка фосфатидилхоліну на хроматограмі розчину порівняння з точністю $\pm 2 \%$.

Кількісне визначення:

Визначення проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ, 2.2.29).

Випробовуваний розчин. 1,0 мл препарату переносять у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять метанолом Р до позначки.

Розчин порівняння. Робочі стандартні гігроскопічні зразки фірми «Lipoid GmbH», Німеччина. Перед випробуванням у робочому стандартному зразку (РСЗ) визначають вміст води за (ДФУ п.2.5.12). Для аналізу використовують 50 мг стандарту.

100,0 мг фосфатидилхоліну (РСЗ фірми «Lipoid GmbH», Німеччина або USP RS) і 10,0 мг лізофосфатидилхоліну (РСЗ фірми «Lipoid GmbH», Німеччина або USP RS) переносять у мірну колбу місткістю 100 мл і додають 40 мл метанолу Р. За температури $(20 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ вміст колби перемішують до повного розчинення та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ детектором за таких умов:

- колонка сталева розміром $250 \times 4,6$ мм, заповнена сорбентом Kromasil Si з розміром часток 5 мкм або аналогічна, яка витримує вимоги придатності хроматографічної системи;

- рухома фаза: ізопропанол – н-гексан – вода Р (67:16,5:16), дегазують з допомогою ультразвуку, термін придатності 1 місяць;

- швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв;

- детектування за довжини хвилі 205 нм;

- температура колонки – $40 ^\circ\text{C}$;

- об'єм інжекції – 50 мкл.

Хроматографують розчин порівняння та випробовуваний розчин.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо:

- кількість теоретичних тарілок, розрахована за піком фосфатидилхоліну, становить не менше 2000 з хроматограм розчину порівняння;

- відносне стандартне відхилення, розраховане для 5 площ піка фосфатидилхоліну на хроматограмі розчину порівняння, не перевищує 2,0 %;

– коефіцієнт розділення між піками фосфатидилхоліну та лізофосфатидилхоліну має бути не менше 4,0.

Вміст фосфатидилхоліну в 1 мл препарату (X_1), в міліграмах, розраховують за формулою:

$$X_1 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot P}{S_0 \cdot 100 \cdot V_1 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot V_1 \cdot 100}, \quad (4.1)$$

де: S_0 – середнє значення площі піка фосфатидилхоліну на хроматограмі розчину порівняння;

S_1 – середнє значення площі піка фосфатидилхоліну відповідно на хроматограмі випробовуваного розчину;

m_0 – наважка фосфатидилхоліну, використаного для приготування розчину порівняння, у мг;

V_1 – об'єм препарату, використаного для приготування випробовуваного розчину, у мілілітрах;

P_0 – вміст основної речовини у фосфатидилхоліні, використаного для приготування розчину порівняння, у відсотках;

W_0 – вміст води в стандартному зразку фосфатидилхоліну, використаного для приготування розчину порівняння, у відсотках.

Вміст фосфатидилхоліну в 1 мл препарату має бути:

– на момент випуску – від 90.0 до 110.0 мг;

– на кінець терміну придатності – від 80.0 до 110.0 мг.

Валідація методики:

Для оцінки метрологічних характеристик методики попередньо були розраховані критерії прийнятності відповідно до вимог ДФУ [178, 189-203], представлені в табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Критерії прийнятності метрологічних характеристик методики

Критерії прийнятності метрологічних характеристик	Величина критичних значень, %
Максимально допустима повна невизначеність методики – $\max \Delta_{As}$	2,26
Максимальна невизначеність у пробопідготовці – $\max \Delta_{Sp}$	0,512
Критичне значення стандартного відхилення – RSD_0	1,17
Індекс кореляції – R_c	0,99739352
Критичне практично незначне значення вільного члена – a	1,7822328

Придатність методики оцінювали за такими параметрами:

1. Ідентифікація.
2. Робасність.
3. Лінійність, точність і правильність.
4. Внутрішньолабораторна точність.

Специфічність

Результати хроматографування розчину плацебо наведено в табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Результати хроматографування розчину плацебо

Площа піка фосфатидилхоліну з хроматограми розчину порівняння, $S_{сер.}$	7037868
Площа піків домішок з хроматограм розчину плацебо, час утримування яких співпадає з часом утримування фосфатидилхоліну з хроматограми розчину порівняння, $S_{пл.сер.}$	0

Площа піків домішок з хроматограм розчину плацебо, час утримування яких співпадає з часом утримування фосфатидилхоліну з хроматограми розчину порівняння у % від площі піка фосфатидилхоліну з хроматограми розчину порівняння	0
Вимоги, %	0,512 %

Оцінка результатів:

На хроматограмі розчину плацебо площа піків, час утримування яких співпадає з часом утримування піка фосфатидилхоліну на хроматограмі розчину порівняння, не перевищує **0.512%** від площі піка фосфатидилхоліну на хроматограмі розчину порівняння. Рисинку 4.1, 4.2 наведено хроматограми розчинів.

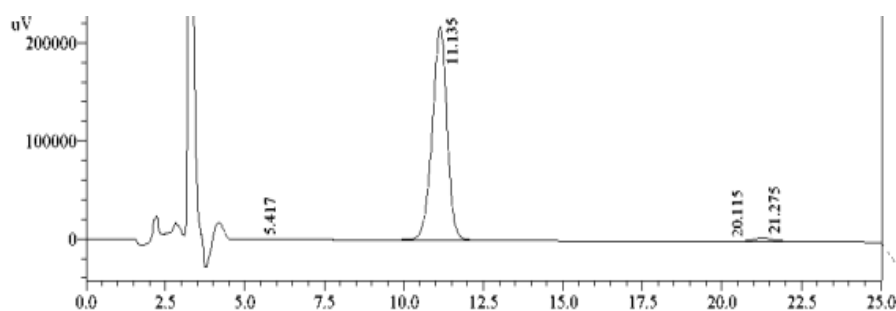


Рис. 4.1. Хроматограма розчину порівняння.

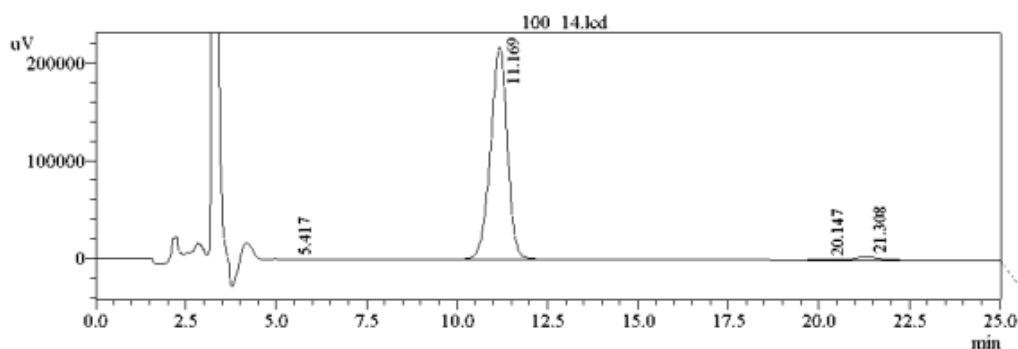


Рис. 4.2. Хроматограма розчину фосфатидилхоліну.

Висновки: результати експерименту відповідають вимогам.

Результати хроматографування розчину плацебо, який піддавали стресовому впливу, наведено в табл. 4.3.

**Результати хроматографування розчину плацебо,
який піддавали стресовому впливу**

Площа піку фосфатидилхоліну з хроматограми розчину порівняння, $S_{\text{сер.}}$		7037868
Площа піків домішок з хроматограм розчину плацебо, який піддали стресовому впливу, час утримування яких співпадає з часом утримування фосфатидилхоліну з хроматограми розчину порівняння, $S_{\text{пл.сер.}}$	УФ випромінювання	4416
	високої температури	1884
	окиснення	3619
Площа піків домішок з хроматограм розчину плацебо, який піддали стресовому впливу, час утримування яких співпадає з часом утримування фосфатидилхоліну з хроматограми розчину порівняння у % від площі піка фосфатидилхоліну з хроматограми розчину порівняння, %	УФ випромінювання	0,062
	високої температури	0,026
	окиснення	0,051
Вимоги, %		$\leq 0,512 \%$

Оцінка результатів:

На хроматограмі розчину плацебо площа піків, час утримування яких співпадає з часом утримування піка фосфатидилхоліну на хроматограмі розчину порівняння не перевищує **0.512%**.

Висновки: результати експерименту відповідають вимогам.

Робасність

Результати перевірки стійкості наведено в табл. 4.4.

Результати перевірки стійкості

№	Гексан	Температура колонки	Введено / знайдено для фосфатидилхоліну X, %	Різниця введено / знайдено для фосфатидилхоліну від 100% у %
1	+	+	100,14	0,14
2	+	-	99,3	0,7
3	-	+	98,78	1,22
4	-	-	101,2	1,2
			99,85	0,15

Оцінка результатів:

Різниця між одержаним значенням введено / знайдено вмісту фосфатидилхоліну для модельних розчинів відрізняється від 100 % не більше ніж на 2.26 %.

Висновки: Робасність методики підтверджена.

Лінійність

Значення дисперсій наведено в табл. 4.5.

Таблиця 4.5

Значення дисперсій досліджуваних розчинів

Досліджувані розчини	Назва	Середнє A_i	C_i	RSD_i
1	2	3	4	5
1	76.84	5560364,5	41,07	0,6794
2	81.05	5789368	43,31	0,2135
3	84.21	6041154,5	45	0,10744
4	90.53	6422612,5	48,38	0,2567

Продовж. табл. 4.5

1	2	3	4	5
5	94.74	6686292,5	50,63	0,09208
6	100.43	7069643	53,44	0,004461
7	105.26	7349348,5	56,25	0,004686
8	109.47	7758063	58,5	0,0015859
9	115.79	8125080	61,88	0,08908
10	126.3	9089134,5	67,5	0,08516

Рівноточність RSD_j за модифікованим критерієм Бартлетта:

Процентна точка m (таблична): 21,52.

Критерій Бартлетта: 38,95.

Висновок: дисперсії відрізняються значуще, вибірки нерівноточні.

Student(95, 1, 11) = 1,7956

Вимоги до максимально допустимого RSD_p: 1,78.

Розрахункове значення об'єднаного стандартного відхилення RSD_p – 0,24.

Висновок: Вимоги до збіжності змін витримуються.

Таблиця 4.6

Значення дисперсії розчину порівняння

Розчин порівняння	Середнє A_{St}	C_{St}	RSD _{St}
reference	7038995	53,21	0,0045807774

Таблиця 4.7

Таблиця для приведених значень

Досліджу- вані розчини	Назва	Середнє A_i	C_i	A_{ir}	C_{ir}	RSD _i	$A_{ir} / C_{ir} \times 100$	$S_y \times t$
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	76.84	5560364,5	41,07	78,993727	77,18474	0,6794	102,34371	1,1977545
2	81.05	5789368	43,31	82,247082	81,394475	0,2135	101,0475	1,047637

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	84.21	6041154,5	45	85,824106	84,570569	0,10744	101,48224	0,94406355
4	90.53	6422612,5	48,38	91,243317	90,922759	0,2567	100,35256	0,77626404
5	94.74	6686292,5	50,63	94,989306	95,151287	0,09208	99,829764	0,70853
6	100.43	7069643	53,44	100,4354	100,43225	0,004461	100,00314	0,6922562
7	105.26	7349348,5	56,25	104,40906	105,71321	0,004686	98,76633	0,75538486
8	109.47	7758063	58,5	110,21549	109,94174	0,0015859	100,249	0,85211468
9	115.79	8125080	61,88	115,42955	116,29393	0,08908	99,256725	1,0475088
10	126.3	9089134,5	67,5	129,12546	126,85585	0,08516	101,78912	1,4422721

Графік залежності приведених значень $A_r = a + b \times C_r$ наведено на рис. 4.3.

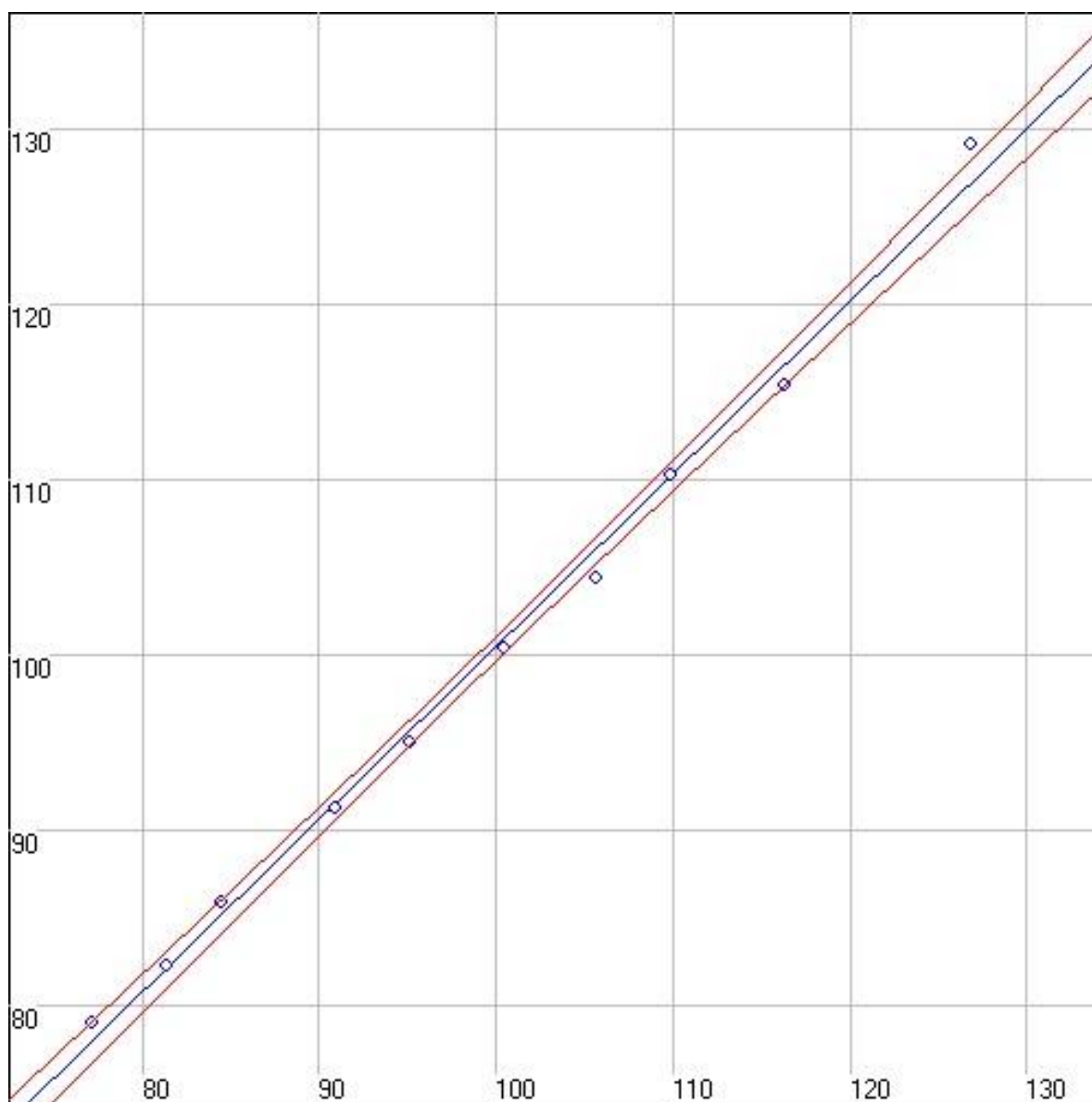


Рис. 4.3 Графік залежності приведених значень $A_r = a + b \times C_r$

Параметри лінійності і критерії (для приведених значень) наведено в табл. 4.8.

Таблиця 4.8

Параметри лінійності і критерії (для приведених значень)

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновки
b	0,98647327			
Sb	0,024332006			
a	1,7822328	<= 4,5250169	<= 4,6143567	Витримуються за першим критерієм
Sa	2,4334589			
RSD ₀	1,1709119			
RSD ₀ /b	1,1869677	<= 1,7208927		Витримуються
RSD _y	16,228022			
r	0,99739352	> 0,99436138		Витримуються

Student(95, 1, 8) = 1,8595.

Висновок: Вимоги до лінійності витримуються.

Точність і правильність

Результати дослідження наведено в табл. 4.9.

Таблиця 4.9

Таблиця для приведених значень

Досліджувані розчини	Назва	Середнє A _i	C _i	A _{ir}	C _{ir}	d _i
1	76.84	5560364,5	41,07	78,993727	77,18474	102,34371
2	81.05	5789368	43,31	82,247082	81,394475	101,0475
3	84.21	6041154,5	45	85,824106	84,570569	101,48224
4	90.53	6422612,5	48,38	91,243317	90,922759	100,35256
5	94.74	6686292,5	50,63	94,989306	95,151287	99,829764
6	100.43	7069643	53,44	100,4354	100,43225	100,00314
7	105.26	7349348,5	56,25	104,40906	105,71321	98,76633
8	109.47	7758063	58,5	110,21549	109,94174	100,249
9	115.79	8125080	61,88	115,42955	116,29393	99,256725
10	126.3	9089134,5	67,5	129,12546	126,85585	101,78912

Таблиця 4.10

Параметри точності і правильності

Показник	Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновки
Точність	Δ_d	2,1146052	$\leq 3,2$		Витримуються
Правильність	$ d_{\text{сер.}} - 100 $	$ 0,33309663 $	$\leq 0,66869689$	$\leq 1,0112$	Витримуються за першим критерієм

$$S_{d,r} (\%) = 1,1535679.$$

$$\text{Student}(95, 1, 9) = 1,8331.$$

Висновок: вимоги до точності витримуються. Вимоги до правильності витримуються за першим критерієм.

Таблиця 4.11

МВ / МКВ

Межа визначення	Межа кількісного визначення
МВ = 7,40048	МКВ = 24,66827

Внутрішня лабораторна точність

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо виконані вимоги до придатності хроматографічної системи.

Таблиця 4.12

Різниця між середнім значенням результатів аналізу на хроматограмах випробовуваного розчину препарату, який аналізували в різні дні

№ аналізу	Середнє значення, %	Різниця середніх значень	Вимоги
1	101.01	1.38	2.26
2	99.63		

Оцінка результатів:

Різниця між середнім значенням результатів аналізу на хроматограмах випробовуваного розчину препарату, який аналізують у різні дні (Δ_{AC}), не відрізняється більш ніж на 2,26%.

Двома різними аналітиками в різні дні проаналізовано 3 модельні розчини з номінальною концентрацією фосфатидилхоліну. Розраховано концентрацію для кожного розчину ваговим методом, знайдено концентрацію відносно піка стандарту фосфатидилхоліну, розраховано стандартне відхилення відносної концентрації. Дані занесено в табл. 4.13.

Таблиця 4.13

Стандартне відхилення відносної концентрації

Аналітик /день	Вміст фосфатидилхоліну, %
1-й аналітик, 1-й день	101.01
	101.63
2-й аналітик, 2-й день	102.12
	102.06
	102.05
Середнє	101.77
RSD(%)	0,46

$$\Delta X = t(95\%;3) \times S_x (\%) = 2.5706 \times 0.46 = 1.18$$

Повинна виконуватись вимога: $\Delta X \leq \Delta_{As}$ $1.18 \leq 1.6$.

Висновки: результати експерименту відповідають пропонованим вимогам. Внутрішньолaborаторна точність підтверджена.

Придатність системи

Хроматографують розчин порівняння. Хроматографічна система вважається придатною, якщо:

- кількість теоретичних тарілок, розрахована за піком фосфатидилхоліну, становить не менше 2000;
- відносне стандартне відхилення, розраховане для 5 площ піка фосфатидилхоліну на хроматограмі розчину порівняння, не перевищує 2,0 %;

– коефіцієнт розділення між піками фосфатидилхоліну та лізофосфатидилхоліну має бути не менше 4,0.

Висновок: запропонований аналітичний метод визначення вмісту фосфатидилхоліну, специфічний, лінійний точний і правильний у діапазоні концентрацій діючої речовини 76-126%.

Пептиди

Ідентифікація:

Ультрафіолетовий спектр поглинання випробуваного розчину, що описано в розділі «Кількісне визначення. Пептиди», в дільніці від 230 до 320 нм повинен відповідати спектру розчину порівняння.

Кількісне визначення:

Визначення проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ, 2.2.29, 2.2.46).

Випробовуваний розчин. 20,0 мл препарату поміщають у ділильну лійку та додають 20,0 мл 96 % спирту Р. Утворений розчин струшують, додають 20,0 мл хлороформу Р та екстрагують до чіткого розділення фаз з однорідним забарвленням.

Екстракцію повторюють двічі по 20,0 мл хлороформу Р, щоразу зливають нижню водну фракцію. Після чого проводять екстракцію 20,0 мл діетилового ефіру Р. Отриману нижню водну фракцію поміщають у круглодонну колбу і упарюють за зниженого тиску до сухого залишку за температури водяної бані не вище 40 °С.

Сухий залишок розчиняють у 25,0 мл води Р.

Розчини порівняння. Близько 30,0 мг концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней (РСЗ ПАТ «Фармак») розчиняють у воді Р і доводять тим же розчинником до об'єму 25,0 мл. 20 мл отриманого розчину поміщають у ділильну лійку та додають 20,0 мл 96 % спирту Р. Утворений розчин струшують, додають 20,0 мл хлороформу Р та екстрагують до чіткого розділення фаз з однорідним забарвленням.

Екстракцію повторюють двічі по 20,0 мл хлороформу Р, щоразу зливають нижню водну фракцію. Після чого проводять екстракцію 20,0 мл діетилового ефіру Р. Отриману нижню водну фракцію поміщають у круглодонну колбу і упарюють за зниженого тиску до сухого залишку за температури водяної бані не вище 40 °С.

Сухий залишок розчиняють у 20 мл води Р.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі за таких умов:

- хроматографічна колонка Zorbax SB-C18 розміром 150 × 4,6 мм, із розміром частинок 5 мкм або аналогічна;
- хроматографічна передколонка Zorbax XDB-C18 розміром 12.5 × 4,6 мм, із розміром частинок 5 мкм або аналогічна;
- детектор УФ-спектрофотометричний за довжини хвилі 254 нм;
- температура колонки – 30 °С;
- швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв;
- об'єм проби, що вводиться – 50 мкл;
- рухома фаза А – вода Р;
- рухома фаза В – метанол Р;
- програма градієнта (табл. 4.14).

Таблиця 4.14

Програма градієнта

Час, хв	А, %	В, %
0	100	0
3	100	0
5	50	50
20	50	50
21	100	0
30	100	0

Інтегрування піків проводять до базової лінії.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо:

– відносне стандартне відхилення суми площ піків пептидів на хроматограмі розчину порівняння за результатами 3 інжекцій становить не більше 4,0%;

Вміст пептидів (X_1) в 1 мл препарату, в міліграмах, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot P_0 \cdot (100 - W_0)}{S_0 \cdot 25 \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P_0 \cdot (100 - W_0)}{S_0 \cdot 200000}, \quad (4.2)$$

де: S_1 – середня площа суми піків, що відповідає пептидам, на хроматограмі випробовуваного розчину;

S_0 – середня площа суми піків, що відповідає пептидам, на хроматограмі розчину порівняння;

m_0 – маса наважки концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней, що використали для приготування розчину порівняння, у міліграмах;

P_0 – вміст основної речовини в СЗ концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней, використаного для приготування розчину порівняння, у відсотках;

W_0 – вміст води в концентраті депротейнізованого дермального шару шкіри свиней, що використали для приготування розчину порівняння, у відсотках;

Вміст пептидів в 1 мл препарату має становити

– на момент випуску – не менше 1,5 мг/мл;

– протягом терміну придатності – не менше 1,3 мг/мл.

Валідація методики:

Для оцінки метрологічних характеристик методики попередньо були розраховані критерії прийнятності відповідно до вимог ДФУ [178, 189-203], які наведено в табл. 4.15.

Таблиця 4.15

Критерії прийнятності метрологічних характеристик методики

Критерії прийнятності метрологічних характеристик	Величина критичних значень, %
Максимально допустима повна невизначеність методики – $\max \Delta_{As}$	6,4
Максимальна невизначеність у пробопідготовці – $\max \Delta_{Sp}$	9,1
Критичне значення стандартного відхилення – RSD_0	8
Індекс кореляції – R_c	0.999
Критичне практично незначне значення вільного члена – a	5

Валідаційні характеристики: правильність, прецизійність, внутрішньо-лабораторна точність, специфічність, лінійність, діапазон застосування, ступінь вилучення, робасність.

Діапазон застосування

Валідацію методики було проведено у діапазоні концентрацій від 60 до 300%.

Специфічність

Для перевірки специфічності було використано розчин плацебо (без пептидів) та розчин бланку (вода очищена Р) (рис. 4.4, 4.5).

Сума площ піків пептидів на хроматограмі розчину плацебо не має перевищувати 0,1 % площі піків пептидів на хроматограмі розчину порівняння.

Результати специфічності наведено в табл. 4.16.

Результати специфічності

Досліджуваний розчин	Результат валидації
Сума площ піків на хроматограмі розчину плацебо, відмінних від піків з хроматограми розчину бланку	0
Сума площ піків пептидів на хроматограмі розчину порівняння	3003604
Вимоги, не більше 0,1 %	0 %

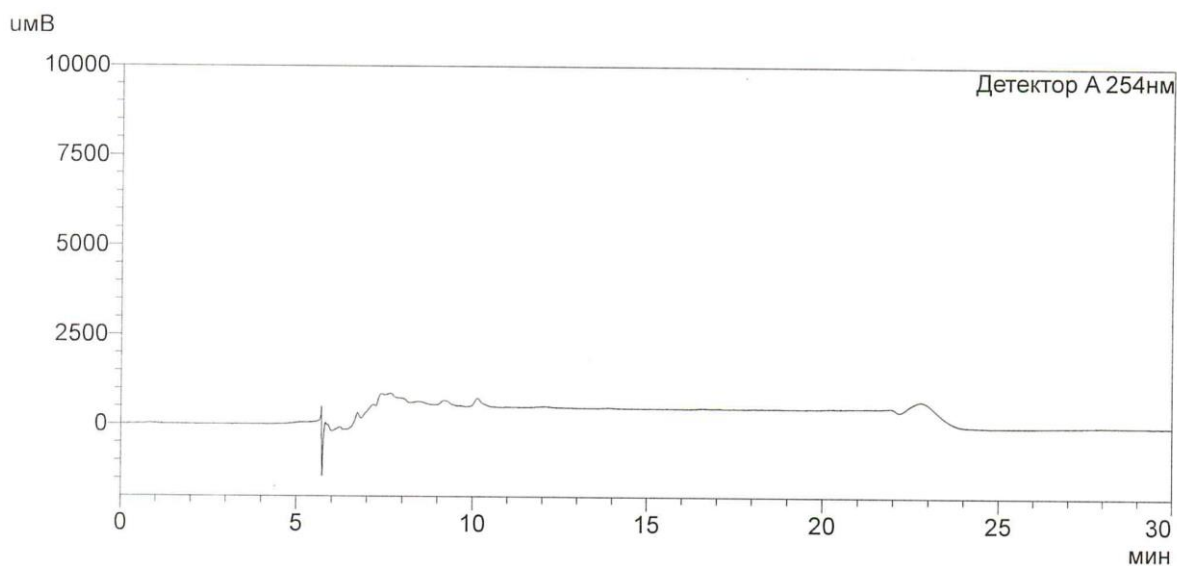


Рис. 4.4 Хроматограма розчину бланку

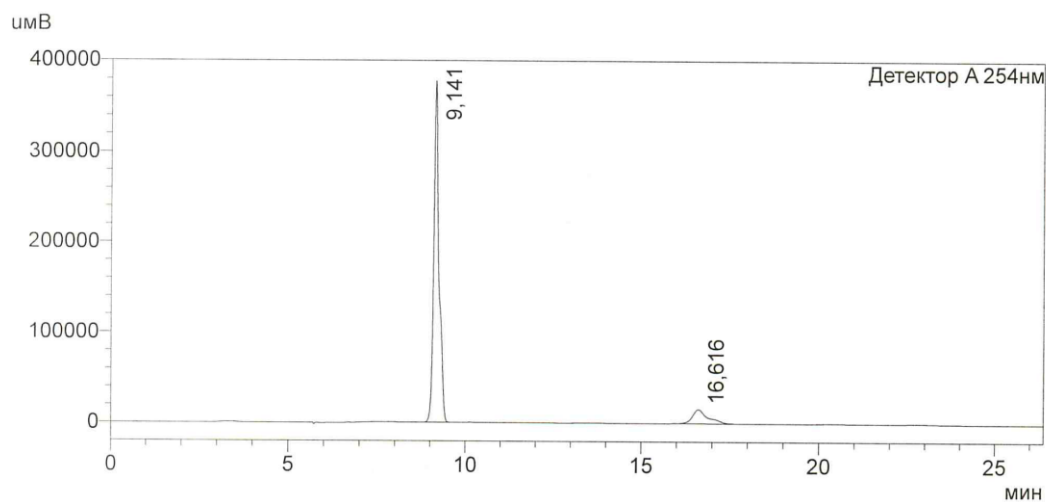


Рис. 4.5 Хроматограма розчину плацебо

Ступінь вилучення

Ступінь вилучення було перевірено на розчині плацебо з додаванням відомої концентрації пептидів. Випробування було проведено на концентраціях 50, 100 та 150 % у трьох повтореннях кожної концентрації.

Паралельно було перевірено ступінь вилучення розчину порівняння.

Результати ступеня вилучення субстанції наведено у табл. 4.17.

Таблиця 4.17

Результати ступеню вилучення субстанції

Концентрація пептидів, %	Знайдений вміст пептидів, мг/мл	Розрахунковий вміст пептидів, мг/мл	Ступінь вилучення, %
50 %	0,0265	0,03725	71,20 %
50 %	0,0260		69,84 %
50 %	0,0272		73,03 %
100 %	0,0526	0,0743	70,84 %
100 %	0,0517		69,56 %
100 %	0,0547		73,62 %
150 %	0,0793	0,1115	71,10 %
150 %	0,0823		73,84 %
150 %	0,0815		73,06 %
Середнє значення ступеня вилучення			71,79 %
RSD			2,14 %

Результати ступеня вилучення, розраховані для розчину порівняння, наведено у табл. 4.18.

Висновок: ступінь вилучення субстанції практично однаковий як для випробовуваного розчину так і для розчину порівняння.

Прецизійність, внутрішньолaboratorна точність

Критерії прийнятності. Двома різними аналітиками в одній лабораторії в різні дні на різному обладнанні проаналізовано по 3 зразки препарату. Розраховано вміст пептидів кожного зразку, розраховано стандартне відхилення відносної концентрації. Дані занесені в табл. 4.19.

Таблиця 4.18

Результати ступеня вилучення, розраховані для розчину порівняння

Концентрація пептидів, %	Середнє значення суми площ піків пептидів розчину порівняння після екстракції	Середнє значення суми площ піків пептидів розчину порівняння до екстракції	Ступінь вилучення, %
Розчин порівняння 1	2343491	3230428	73,16 %
Розчин порівняння 2	2013855	2953273	68,28 %
Розчин порівняння 3	2160698	2949575	73,16 %
Середнє значення ступеня вилучення розчину порівняння			71,53 %
RSD			3,22 %

Прецизійність, внутрішньолабораторна точність

Критерії прийнятності. Двома різними аналітиками в одній лабораторії в різні дні на різному обладнанні проаналізовано по 3 зразки препарату. Розраховано вміст пептидів кожного зразку, розраховано стандартне відхилення відносної концентрації. Дані занесені в табл. 4.19.

Таблиця 4.19

Вміст пептидів та стандартне відхилення відносної концентрації

Випробування	Вміст пептидів	
	Значення першого аналітика, у мг/мл	Значення другого аналітика, у мг/мл
1	1,517	1,553
2	1,545	1,516
3	1,518	1,511
Середнє	1,527	1,526
RSD(%)	0,87 %	1,22 %

Різниця між середнім значенням вмісту пептидів між двома аналітиками складає 1,05 % і не відрізняється більш ніж на 9,1 %.

Висновки: результати експерименту відповідають вимогам. Внутрішньолабораторна прецизійність підтверджена.

Робасність

Стійкість хроматографічної системи до невеликих, заданих аналітиком, змін в умовах аналізу (температура термостатування колонки, швидкість рухомої фази, об'єм інжекції, зміна концентрації рухомої фази В).

Робасність методики досліджена в автоматичному режимі за допомогою програми Avtorobast.

Опис процесу:

- температуру варіюють у межах 30 °С: від 5 до 10 °С;
- швидкість рухомої фази варіюють у межах $1,0 \pm 0,1$ мл/хв;
- об'єм інжекції варіюють у межах 50 ± 1 мкл;
- концентрація рухомої фази В у межах 50 %: від 40 до 60 %.

Оцінка результатів:

Зміна температури колонки призводить до зміни часу утримування піків пептидів. Зменшення температури колонки призводить до збільшення часу утримування піків пептидів на колонці, тоді як збільшення температури колонки призводить до зменшення часу утримування.

Зміна швидкості рухомої фази призводить до зміни часу утримування. Зменшення швидкості рухомої фази призводить до збільшення часу утримування піків пептидів на колонці, тоді як зменшення швидкості потоку практично не впливає на зміну часу утримування.

Зміна об'єму інжекції практично не впливає ні на час утримування пептидів, ні на ефективність хроматографічної колонки.

Зміна концентрації рухомої фази В призводить до значних змін. Зменшення концентрації метанолу в градієнті призводить до збільшення часу утримування піків пептидів, тоді як збільшення концентрації призводить до значного зменшення часу утримування піків пептидів.

Отже, за результатами дослідження робастності методу, найбільший вплив має зміна концентрації метанолу, недопустимо підвищення концентрації метанолу.

Підсумки з валідації методики кількісного визначення вмісту пептидів наведено в табл. 4.20.

Таблиця 4.20

**Підсумкова таблиця з валідації методики кількісного
визначення вмісту пептидів**

Валідаційна характеристика	Критерій прийнятності	Результат	Відповідність
Правильність	Середній ступінь вилучення від 91,0 до 109,0 %	Від 96,47 до 104,55 %	Відповідає
Прецизійність, внутрішньолaborаторна точність	$RSD \leq 8,0 \%$ $\Delta, \% \leq 9,1 \%$	1,22 % 1,05 %	Відповідає
Специфічність	Сума площ піків пептидів на хроматограмі розчину плацебо не має перевищувати 0,1 % площі піків пептидів на хроматограмі розчину порівняння	0	Відповідає
Лінійність	$R \geq 0.999$ $ a \leq 5,0 \%$	0,99979 2,9793 %	Відповідає

Висновки: методика кількісного визначення вмісту пептидів відповідає критеріям прийнятності, є відтворюваною і може використовуватись як рутинний метод.

4.1.2 Розроблення методики аналітичної методики на «Супровідні домішки»

Методика

Визначення проводять методом ексклюзійної хроматографії (ДФУ*, 2.2.30).

Розчини використовують свіжоприготованими.

Випробовуваний розчин. 20,0 мл препарату поміщають у ділильну ліжку та додають 20,0 мл 96 % спирту Р. Утворений розчин струшують, додають

20,0 мл хлороформу Р та екстрагують до чіткого розділення фаз з однорідним забарвленням. Відкидають нижню фазу.

Екстракцію повторюють двічі, використовуючи по 20,0 мл хлороформу Р, щоразу відкидаючи нижню фазу. Після чого проводять екстракцію 20,0 мл діетилового ефіру Р.

Отриману нижню фракцію поміщають у круглодонну колбу і випарюють за зниженого тиску до сухого залишку за температури не вище 30 °С.

Сухий залишок розчиняють у 2,0 мл води Р та фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,2 мкм. До 300 мкл отриманого розчину додають 700 мкл води Р.

Розчини порівняння (а). Готують розчин десмопресину ацетату (EP CRS #D0650000, USP RS #1173202, РСЗ ПАТ «Фармак» або аналогічної якості) з концентрацією 1 мг/мл та інсуліну людського (EP CRS#I0310000 або аналогічної якості) з концентрацією 1 мг/мл в 0,01 М розчині хлористоводневої кислоти.

Розчини порівняння (b). Близько 36,0 мг натрію метилпарагідроксибензоату (РСЗ ПАТ «Фармак» або аналогічної якості) розчиняють у воді Р і доводять тим самим розчинником до об'єму 100,0 мл. 5,0 мл отриманого розчину доводять водою Р до об'єму 50,0 мл.

Фосфатний буферний розчин рН 5,5 Р. 13,61 г калію дигідрофосфату Р доводять водою Р до загального об'єму 1000,0 мл. Доводять рН 5,5 розчином 35 г/л динатрію гідрофосфату Р.

Хроматографують розчини порівняння (а), (b) та випробовуваний розчин.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі за таких умов:

– колонка з неіржавної сталі, розміром 0,30 м × 7,8 мм, заповнена силікагелем для ексклюзивної хроматографії з розміром частинок 10 мкм, діаметр пор 125 А (наприклад «Waters» № WAT201549 або аналогічної якості);

– детектування за довжини хвилі 254 нм;

– рухома фаза: фосфатний буферний розчин рН 5,5 Р;

– швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв;

- об'єм проби, що вводиться, – 50 мкл;
- температура автосамплера – 5 °C;
- час хроматографування – 40 хв.

Хроматограма наведена на рисунку 4.6.

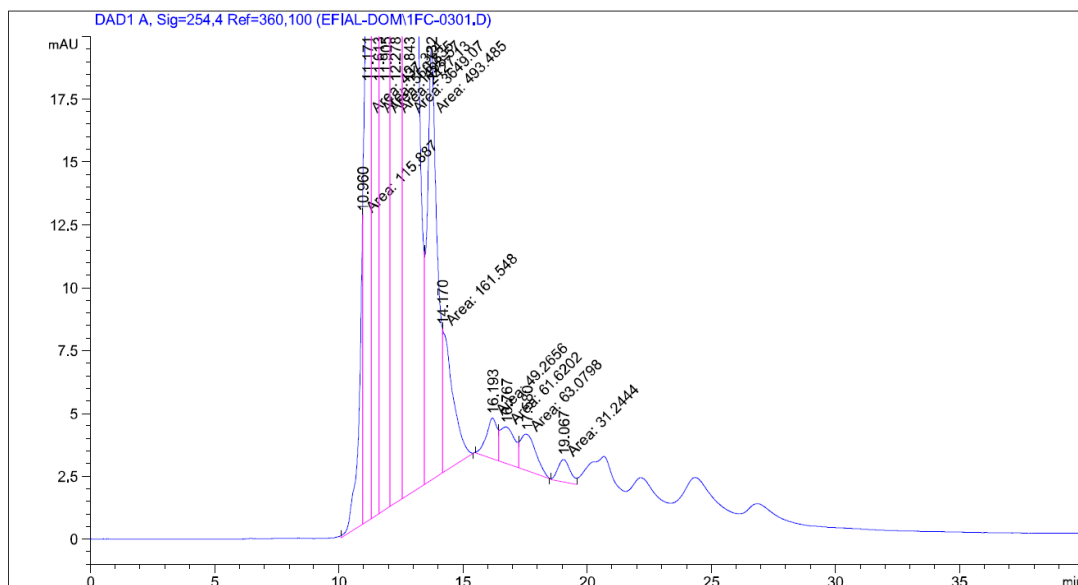


Рис. 4.6 Типова хроматограма випробовуваного розчину

Порядок виходу піків на хроматограмі розчину порівняння (а) такий:

1 – інсулін людський; 2 – десмопресину ацетат.

Перед проведенням аналізу хроматографічна колонка має бути урівноважена рухомою фазою протягом не менше ніж 2 год.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо:

- ефективність хроматографічної колонки, обчислена за піком десмопресину ацетату, має бути не менше 3000 теоретичних тарілок;
- коефіцієнт розділення: не менше 2,0 для піків інсуліну та десмопресину ацетату на хроматограмі розчину порівняння (а).

Інтегрування піків проводять, використовуючи типову хроматограму випробовуваного розчину.

Не враховують площі піків на хроматограмі випробовуваного розчину, час утримування яких більше або дорівнює часу утримування піка натрію метилпарагідроксibenзоату на хроматограмі розчину порівняння (b).

Аналізують розчини порівняння та випробовуваний розчин.

Пептиди з молекулярною масою понад 6000 Да. Сума площ піків пептидів на хроматограмі випробовуваного розчину, у відсотках, що елюються до піка інсуліну людського, має бути не більше 5 %.

Пептиди з молекулярною масою менше 1000 Да. Сума площ піків пептидів на хроматограмі випробовуваного розчину, у відсотках, час утримування яких більше часу утримування десмопресину ацетату, має бути не більше 3 %.

Валідація методики:

Для оцінки метрологічних характеристик методики попередньо були розраховані критерії прийнятності відповідно до вимог ДФУ [178, 189-203], наведені в табл. 4.21.

Таблиця 4.19

Критерії прийнятності метрологічних характеристик методики

Критерії прийнятності метрологічних характеристик	Величина критичних значень, %
Максимально допустима повна невизначеність методики – $\max \Delta_{As}$	6,4
Максимальна невизначеність у пробопідготовці – $\max \Delta_{Sp}$	9,1
Критичне значення стандартного відхилення – RSD_0	8
Індекс кореляції – R_c	0.999
Критичне практично незначне значення вільного члена – a	5

Валідаційні характеристики: правильність, прецизійність, внутрішньо-лабораторна точність, специфічність, лінійність, діапазон застосування, ступінь вилучення, робасність.

Діапазон застосування

Валідацію методики було проведено у діапазоні концентрацій від 60 до 300 %.

Специфічність

Для перевірки специфічності було використано розчин плацебо (без пептидів) та розчин бланку (вода очищена Р) (рис. 4.7, 4.8).

Сума площ піків пептидів на хроматограмі розчину плацебо не має перевищувати 0,1 % площі піків пептидів на хроматограмі розчину порівняння.

Результати специфічності наведено в табл. 4.22.

Таблиця 4.22

Результати специфічності

Досліджуваний розчин	Результат валідації
Сума площ піків на хроматограмі розчину плацебо, відмінних від піків з хроматограми розчину бланку	0
Сума площ піків пептидів на хроматограмі розчину порівняння	3003604
Вимоги, не більше 0,1 %	0 %

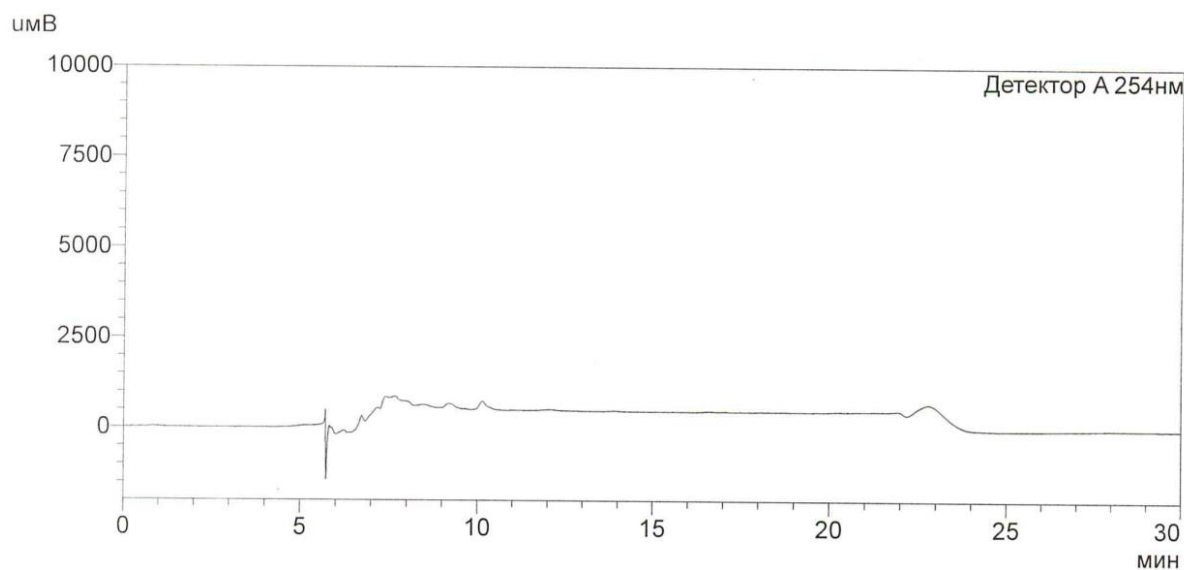


Рис. 4.7 Хроматограма розчину бланку

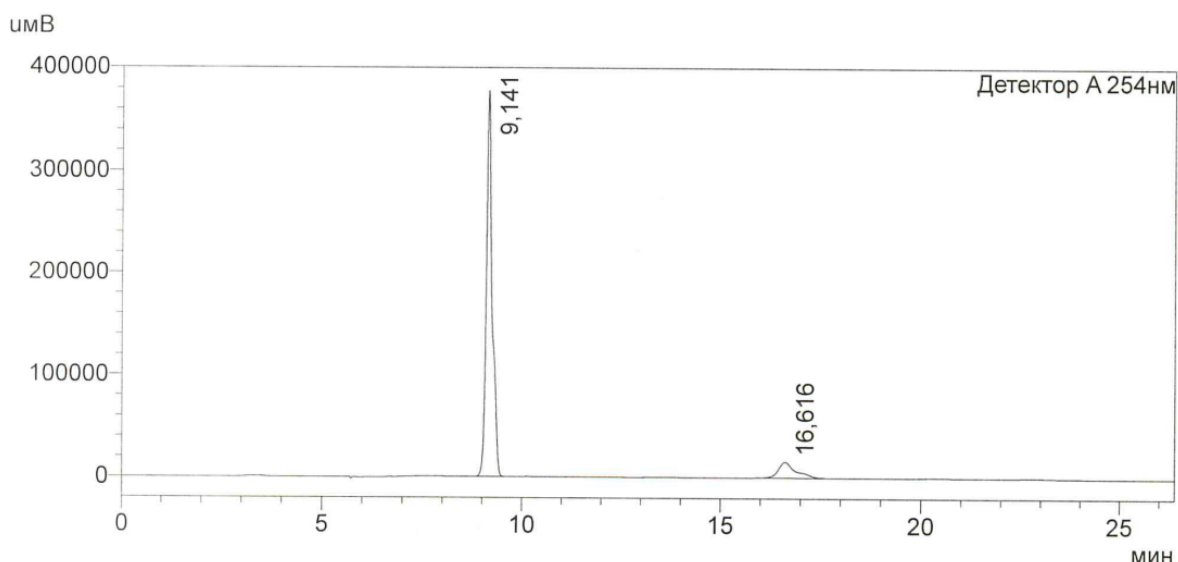


Рис. 4.8 Хроматограма розчину плацебо

Ступінь вилучення

Ступінь вилучення було перевірено на розчині плацебо з додаванням відомої концентрації пептидів. Випробування було проведено на концентраціях 50, 100 та 150 % у трьох повтореннях кожної концентрації.

Паралельно було перевірено ступінь вилучення розчину порівняння.

Результати ступеня вилучення субстанції наведено у табл. 4.23.

Таблиця 4.23

Результати ступеню вилучення субстанції

Концентрація пептидів, %	Знайдений вміст пептидів, мг/мл	Розрахунковий вміст пептидів, мг/мл	Ступінь вилучення, %
50 %	0,0265	0,03725	71,20 %
50 %	0,0260		69,84 %
50 %	0,0272		73,03 %
100 %	0,0526	0,0743	70,84 %
100 %	0,0517		69,56 %
100 %	0,0547		73,62 %
150 %	0,0793	0,1115	71,10 %
150 %	0,0823		73,84 %
150 %	0,0815		73,06 %
Середнє значення ступеня вилучення			71,79 %
RSD			2,14 %

Результати ступеня вилучення, розраховані для розчину порівняння, наведено у табл. 4.24.

Таблиця 4.24

Результати ступеня вилучення розраховане для розчину порівняння

Концентрація пептидів, %	Середнє значення суми площ піків пептидів розчину порівняння після екстракції	Середнє значення суми площ піків пептидів розчину порівняння до екстракції	Ступінь вилучення, %
Розчин порівняння 1	2343491	3230428	73,16 %
Розчин порівняння 2	2013855	2953273	68,28 %
Розчин порівняння 3	2160698	2949575	73,16 %
Середнє значення ступеня вилучення розчину порівняння			71,53 %
RSD			3,22 %

Висновок: ступінь вилучення субстанції практично однаковий як для випробовуваного розчину, так і для розчину порівняння.

Прецизійність, внутрішньолaboratorна точність

Двома різними аналітиками в одній лабораторії в різні дні на різному обладнанні проаналізовано по 3 зразки препарату. Розраховано вміст пептидів кожного зразка та стандартне відхилення відносної концентрації. Дані занесені в табл. 4.25.

Різниця між середнім значенням вмісту пептидів за двома аналітиками складає 1,05 % і не відрізняється більш ніж на 9,1 %.

Висновки: результати експерименту відповідають вимогам. Внутрішньолaboratorна прецизійність підтверджена.

Таблиця 4.25

**Вміст пептидів кожного зразка та стандартне відхилення
відносної концентрації**

Випробу- вання	Вміст пептидів, у %	
	Значення першого аналітика, мг/мл	Значення другого аналітика, мг/мл
1	2	3
1	1,517	1,553
2	1,545	1,516
3	1,518	1,511
Середнє	1,527	1,526
RSD(%)	0,87 %	1,22 %

Різниця між середнім значенням вмісту пептидів за двома аналітиками складає 1,05 % і не відрізняється більш ніж на 9,1 %.

Висновки: результати експерименту відповідають вимогам. Внутрішньолабораторна прецизійність підтверджена.

Робасність

Стійкість хроматографічної системи до невеликих, заданих аналітиком, змін в умовах аналізу (температура термостатування колонки, швидкість рухомої фази, об'єм інжекції, зміна концентрації рухомої фази В).

Робасність методики досліджена в автоматичному режимі з допомогою програми Avtorobast.

Опис процесу.

- температуру варіюють у межах 30 °C: від 5 до 10 °C;
- швидкість рухомої фази варіюють у межах $1,0 \pm 0,1$ мл/хв;
- об'єм інжекції варіюють у межах 50 ± 1 мкл;
- концентрація рухомої фази В у межах 50 %: від 40 до 60 %.

Оцінка результатів:

Зміна температури колонки призводить до зміни часу утримування піків пептидів. Зменшення температури колонки призводить до збільшення часу утримування піків пептидів на колонці, тоді як збільшення температури колонки призводить до зменшення часу утримування.

Зміна швидкості рухомої фази призводить до зміни часу утримування. Зменшення швидкості рухомої фази призводить до збільшення часу утримування піків пептидів на колонці, тоді як зменшення швидкості потоку практично не впливає на зміну часу утримування.

Зміна об'єму інжекції практично не впливає ні на час утримування пептидів, ні на ефективність хроматографічної колонки. Зміна концентрації рухомої фази В призводить до значних змін. Зменшення концентрації метанолу в градієнті призводить до збільшення часу утримування піків пептидів, тоді як збільшення концентрації призводить до значного зменшення часу утримування піків пептидів.

Отже, за результатами дослідження робастності методу, найбільший вплив має зміна концентрації метанолу, недопустимо підвищення концентрації метанолу.

Підсумки з валідації методики визначення супровідних домішок наведено в табл. 4.26.

Таблиця 4.26

**Підсумкова таблиця валідації методики визначення
супровідних домішок**

Валідаційна характеристика	Критерій прийнятності	Результат	Відповідність
Правильність	Середній ступінь вилучення від 91,0 до 109,0 %	Від 96,47 до 104,55 %	Відповідає
Прецизійність, внутрішньолабораторна точність	$RSD \leq 8,0 \%$ $\Delta, \% \leq 9,1 \%$	1,22 % 1,05 %	Відповідає
Специфічність	Сума площ піків пептидів на хроматограмі розчину плацебо не має перевищувати 0,1 % площі піків пептидів на хроматограмі розчину порівняння	0	Відповідає
Лінійність	$R \geq 0.999$ $ a \leq 5,0 \%$	0,99979 2,9793 %	Відповідає

Висновки: методика визначення супровідних домішок відповідає критеріям прийнятності, є відтворюваною і може використовуватись як рутинний метод.

4.1.3. Розроблення проєкту МКЯ на ліпосомальні краплі очні на основі пептидного комплексу

За результатами проведеної роботи було визначено показники якості та їх граничні значення, які було вписано у розроблений проєкт МКЯ на ліпосомальні краплі очні на основі пептидного комплексу. Очні краплі на основі пептидного комплексу контролювали за такими показниками, як опис, ідентифікація, рН, об'єм вмісту контейнера, осмолярність, розмір частинок, супровідні домішки, стерильність, кількісне визначення (пептиди, фосфатидилхолін) наведені у табл. 4.27.

Таблиця 4.27

Специфікація на ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу

Показник	Характеристика та допустимі норми
1	2
Опис	Емульсія жовтого кольору
Ідентифікація пептиди	Ультрафіолетовий спектр поглинання випробовуваного розчину, описаного в розділі «Кількісне визначення. Пептиди», в ділянці від 230 до 320 нм повинен відповідати спектру розчину порівняння
фосфатидилхолін	Час утримування основного піка на хроматограмі випробовуваного розчину, описаній у розділі «Кількісне визначення. Фосфатидилхолін», має співпадати з часом утримування піка фосфатидилхоліну на хроматограмі розчину порівняння з точністю $\pm 2 \%$
рН	Від 4,0 до 6,0
Об'єм вмісту контейнера	Не менше 5,0 мл

1	2
Осмолярність	Від 250 до 360 мОсмоль/кг
<i>Розмір частинок</i>	
Перший пік	Не більше 100 нм
Другий пік	Не більше 400 нм
<i>Супровідні домішки</i>	
лізофосфатидилхолін	Не більше 10 мг/мл
пептиди 6 кДа	Не більше 5%
пептиди менше 1 кДа	Не більше 3%
Стерильність	Має бути стерильним
<i>Кількісне визначення</i>	
пептиди	Від 0,056 до 0,084 мг/мл
фосфатидилхолін	Від 80 до 110 мг/мл

4.2. Вивчення стабільності ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу в процесі зберігання

Дослідження стабільності ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу проводили на трьох дослідно-промислових серіях 10517, 20517, 30517, виготовлених на ПАТ «Фармак». Випробування проводились в упакованні для реалізації (контейнери поліетиленові, закупорені кришкою поліетиленовою з контролем відкриття та дозуючою вставкою-крапельницею). Для визначення терміну придатності дослідження довгострокової стабільності проводили за рекомендованих умов зберігання препарату за температури від 2 до 8 °С, контрольні точки – 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 місяців. Дослідження прискореної стабільності проводили за температури (25 ± 2) °С та відносної вологості повітря (60 ± 5) %, контрольні точки – 0, 3, 6 місяців.

Дослідження довгострокової та прискореної стабільності проводились згідно з вимогами специфікації на ліпосомальні краплі очні на основі пептидного комплексу.

У табл. 4.28 наведено результати досліджень довгострокової стабільності, що охоплюють фізико-хімічні та фармакологічні дослідження трьох дослідно-промислових серій ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу. Досліджували такі показники якості: опис, ідентифікація, рН, об'єм вмісту контейнера, осмолярність, розмір частинок, супровідні домішки, стерильність, кількісне визначення (пептиди, фосфатидилхолін).

Таблиця 4.28

Результати дослідження довгострокової стабільності ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу

Серія	Періодичність контролю, міс	Вимоги проєкту МКЯ												
		Опис	Ідентифікація	рН	Об'єм вмісту контейнера	Осмолярність	Розмір частинок		Супровідні домішки			Стерильність	Кількісне визначення	
		Емульсія жовтого кольору	Має витримувати вимоги	Від 4,0 до 6,0 г	Не менше 5,0 мл	Від 250 до 360 мОсмоль/кг	Перший пік Не більше 100 нм	Другий пік Не більше 400 нм	Лізофосфатидилхолін	пептиди 6 кДа	пептиди менше 1 кДа	Має витримувати вимоги	Пептиди Від 0,056 до 0,084 мг/мл	фосфатидилхолін Від 80 до 110 мг/мл
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
10517	0	Відп.	Відп.	5,1	5,2	310	28	174	0,2	1,0	1,4	Відп.	0,072	100
	3	Відп.	Відп.	5,0	Н*	314	29	177	0,2	0,99	1,5	Н*	0,073	101
	6	Відп.	Відп.	5,2	Н*	307	29	173	0,2	1,0	1,5	Н*	0,073	100
	9	Відп.	Відп.	5,1	Н*	311	28	176	0,23	0,99	1,5	Н*	0,071	102
	12	Відп.	Відп.	4,9	5,2	318	28	178	0,22	1,0	1,6	Відп.	0,068	100
	18	Відп.	Відп.	4,8	Н*	309	29	179	0,26	0,98	1,4	Н*	0,064	99
	24	Відп.	Відп.	4,9	5,2	311	30	182	0,28	0,99	1,5	Відп.	0,061	100
20517	0	Відп.	Відп.	5,0	5,2	317	27	176	0,2	1,2	1,8	Відп.	0,075	102
	3	Відп.	Відп.	5,0	Н*	322	28	177	0,2	1,17	1,9	Н*	0,075	103
	6	Відп.	Відп.	5,1	Н*	324	26	173	0,2	1,1	1,7	Н*	0,074	103
	9	Відп.	Відп.	4,9	Н*	334	27	178	0,23	1,2	1,5	Н*	0,071	102
	12	Відп.	Відп.	4,8	5,2	331	28	178	0,22	1,0	1,4	Відп.	0,070	103
	18	Відп.	Відп.	4,9	Н*	335	29	179	0,26	0,99	1,4	Н*	0,067	101

	24	Відп.	Відп.	4,8	5,2	336	31	182	0,28	0,99	1,5	Відп.	0,064	102
30517	0	Відп.	Відп.	5,2	5,2	328	29	178	0,22	1,4	1,3	Відп.	0,077	101
	3	Відп.	Відп.	5,1	Н*	332	28	180	0,23	1,36	1,2	Н*	0,076	102
	6	Відп.	Відп.	5,1	Н*	337	29	182	0,23	1,38	1,6	Н*	0,078	102
	9	Відп.	Відп.	4,9	Н*	334	29	181	0,22	1,32	1,4	Н*	0,077	101
	12	Відп.	Відп.	4,9	5,2	335	30	184	0,24	1,28	1,3	Відп.	0,074	100
	18	Відп.	Відп.	5,0	Н*	338	29	183	0,27	1,22	1,3	Н*	0,072	102
	24	Відп.	Відп.	4,9	5,2	332	32	184	0,30	1,24	1,4	Відп.	0,068	101

Примітка: Н* – не проводився контроль.

З табл. 4.28 видно, що протягом 24 місяців зберігання в первинному пакуванні за температури від 2 до 8 °С три досліджувані серії ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу показали постійність складу протягом всього досліджуваного періоду. Кількісні та якісні показники якості препарату лежали у межах прийнятних норм. Отримані результати дозволяють гарантувати стабільність розробленого ЛЗ протягом двох років за умови дотримання рекомендованих умов зберігання.

Згідно з настановою МОЗ було досліджено прискорену стабільність, результати якої наведено в табл. 4.29. За даними таблиці видно, що протягом шести місяців зберігання за температури (25 ± 2) °С та відносної вологості повітря (60 ± 5) % розроблені нами ліпосомальні краплі очні на основі пептидного комплексу залишається стабільними.

Упакування забезпечило належний захист препарату від зовнішнього впливу, мікробіологічні показники не змінювались і повністю відповідали вимогам специфікації.

Результати дослідження стабільності свідчать про раціональність складу препарату та оптимальної технології виготовлення. Допоміжні речовини підібрано відповідно до технологічного призначення, фізико-хімічних і функціональних характеристик.

Таблиця 4.29

**Результати дослідження прискореної стабільності ліпосомальних
крапель очних на основі пептидного комплексу**

Серія	Вимоги проєкту МКЯ													
	Періодичність контролю, міс		Опис	Ідентифікація	pH	Об'єм вмісту контейнера	Осмолярність	Розмір частинок		Супровідні домішки		Стерильність	Кількісне визначення	
		Емульсія жовтого кольору	Має витримувати вимоги	Від 4,0 до 6,0 г	Не менше 5,0 мл	Від 250 до 360 мОсмоль/кг	Перший пік Не більше 100 нм Не більше 400 нм	Другий пік Не більше 400 нм	Лізофосфатидилхолін	пептиди 6 кДа	пептиди менше 1 кДа	Має витримувати вимоги	пептиди Від 0,056 до 0,084 мг/мл	фосфатидилхолін Від 80 до 110 мг/мл
10517	0	Відп.	Відп.	5,1	5,2	310	28	174	0,2	1,0	1,4	Відп.	0,072	100
	3	Відп.	Відп.	4,72	Н*	321	30	178	0,3	0,9	1,3	Н*	0,067	101
	6	Відп.	Відп.	4,3	5,2	335	34	181	0,5	0,88	1,1	Відп.	0,058	101
20517	0	Відп.	Відп.	5,0	5,2	317	27	176	0,2	1,2	1,8	Відп.	0,075	102
	3	Відп.	Відп.	4,6	Н*	337	30	181	0,3	1,0	1,6	Н*	0,072	101
	6	Відп.	Відп.	4,2	5,2	342	31	184	0,5	0,9	1,2	Відп.	0,064	102
30517	0	Відп.	Відп.	5,2	5,2	328	29	178	0,22	1,4	1,3	Відп.	0,077	101
	3	Відп.	Відп.	4,75	Н*	331	30	184	0,3	1,2	1,2	Н*	0,74	100
	6	Відп.	Відп.	4,3	5,2	342	31	186	0,5	1,1	0,9	Відп.	0,068	100

Примітка: Н* – не проводився контроль.

Упакування забезпечило належний захист препарату від зовнішнього впливу, мікробіологічні показники не змінювались і повністю відповідали вимогам специфікації.

Результати дослідження стабільності свідчать про раціональність складу препарату та оптимальної технології виготовлення. Допоміжні речовини підібрано відповідно до технологічного призначення, фізико-хімічних і функціональних характеристик.

Висновки до розділу 4

1. На підставі фізико-хімічних досліджень визначено основні показники якості розроблених ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу.
2. Розроблено методики ідентифікації АФІ у складі ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу.
3. Проведено дослідження зі стандартизації ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу. Розроблено і валідовано методики ідентифікації та кількісного визначення пептидів – методом ВЕРХ.
4. Досліджено стабільність ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу протягом двох років і трьох місяців під час зберігання за температури 2-8 °С у запропонованому первинному упакованні, що дало підставу встановити термін придатності – 2 роки.
5. На підставі проведених досліджень розроблено проєкт МКЯ на ЛЗ ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу.

Результати експериментальних досліджень розділу наведено в таких публікаціях:

1. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Дослідження стабільності ліпосомального препарату на основі пептидного комплексу з шкіри свині у формі очних крапель. *Innovations and prospects in modern science : Proceedings of V International Scientific and Practical Conference, Stockholm, Sweden, 8-10 May 2023. P. 80-82.*
2. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Валідація методики кількісного визначення ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу із шкіри свині. *European scientific congress : Proceedings of V International Scientific and Practical Conference, Madrid, Spain 12-14 June 2023. Madrid, 2023. P. 68-70.*

РОЗДІЛ 5

БІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ РОЗРОБЛЕНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

5.1 Обговорення результатів доклінічного вивчення ефективності та нешкідливості ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу

Доклінічне вивчення специфічної фармакологічної активності, визначення нешкідливості під час застосування та можливості розвитку віддалених наслідків є невід'ємною частиною процесу створення ЛЗ та принциповим фактором, що визначає можливість його упровадження у промислове виробництво і доцільності медичного застосування.

Розроблена лікарська форма ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу виробництва АТ «Фармак» пройшла доклінічні випробування у ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції» (ДП «ДНЦЛЗ», Харків), де було проведено експериментальне вивчення нешкідливості (гостра токсичність, субхронічна токсичність, місцевоподразлива дія).

Також було досліджено специфічну фармакологічну активність (первинна фармакодинаміка – репаративна та протизапальна дія) ЛЗ ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу виробництва АТ «Фармак».

5.1.1 Вивчення гострої токсичності лікарського засобу

Метою дослідження було вивчення токсичності ЛЗ Ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу, розробленого АТ «Фармак» (Україна) в гострому експерименті на статевонезрілих білих щурах лінії Вістар масою тіла 115-125 г при інстиляційному застосуванні в очі. Всього в експерименті використано 20 щурів різної статі (10 жіночої, 10 чоловічої). Досліджуваний

препарат вводили інстиляційно в очі однократно дрібно 0,02 мл в кожне око через 20 хв. Спостереження за тваринами проводили протягом 2-х тижнів.

Під час експерименту керувалися методичними рекомендаціями [205] та проєктом інструкції з медичного застосування ЛЗ ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу.

Після однократного застосування досліджуваного ЛЗ проявів інтоксикації не спостерігалось, ознак подразнення не відзначено.

Протягом періоду спостереження стан та поведінка всіх дослідних тварин не відрізнялася від інтактних. Загибелі тварин не спостерігалось.

Результати вивчення параметрів гострої токсичності досліджуваного ЛЗ наведено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Параметри гострої токсичності досліджуваного лікарського засобу

Лікарський засіб	Доза	Кількість тварин, загиблих/загальна		Летальність, %
		самці	самки	
Очні краплі з пептидним комплексом	дрібно 0,02 мл в кожне око через 20 хв (0,48 мл на тварину)	0/10	0/10	0

Аналіз впливу досліджуваного ЛЗ на динаміку маси тіла дослідних тварин показав, що його однократне застосування не виявляло токсичного впливу на динаміку маси тіла щурів: тварини мали статистично вірогідне збільшення маси тіла порівняно з вихідними даними.

Результати біохімічних досліджень показали, що ЛЗ не впливає на вміст загального білка, альбуміну і показник тимолової проби в сироватці крові щурів. Ці показники лужать у межах фізіологічної норми для цього виду тварин.

Патоморфологічне дослідження тварин

На підставі результатів вивчення гострої токсичності ЛЗ Ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу у разі інстиляційного застосування в очі статевонезрілим щурам у дозі дрібно 0,02 мл в кожне око через 20 хв (0,48 мл на тварину) на тварину (приблизно 4 мл/кг) за лікарською формою можна зробити висновки, що досліджуваний ЛЗ:

- не викликає загибелі тварин;
- не виявляє токсичного впливу на загальний стан, поведінку, споживання їжі та води, динаміку маси тіла щурів;
- не викликає видимих змін внутрішніх органів і не впливає на абсолютну та відносну масу внутрішніх органів щурів;
- не впливає на вміст загального білка, альбуміну та показник тимолової проби в сироватці крові щурів.

5.1.2 Вивчення субхронічної токсичності лікарського засобу

Метою дослідження було вивчення токсичності ЛЗ Ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу, розробленого ПАТ «Фармак» (Україна) у субхронічному досліді. Експеримент субхронічної токсичності проведено на статевонезрілих білих щурах лінії «Вістар» з вихідною масою тіла 105-125 г, яких було розподілено на 4 групи по 20 тварин (10 самців і 10 самок) в кожній. Всього в експерименті використано 80 щурів. Під час проведення експерименту керувалися методичними рекомендаціями [205] та проектом інструкції з медичного застосування ЛЗ Ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу.

Результати вивчення субхронічної токсичності показали, що ЛЗ Ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу у разі інстиляційного застосування в очі статевонезрілим щурам у дозах 0,04 мл на тварину та 0,12 мл на тварину протягом 1 місяця:

- не викликає загибелі тварин;
- не виявляє токсичного впливу на загальний стан, поведінку, споживання їжі та води, динаміку маси тіла експериментальних тварин;
- не впливає на показники функціонального стану ЦНС;
- не впливає на електрофізіологічну активність міокарда;
- не виявляє негативного впливу на показники периферійної крові тварин усіх експериментальних груп;
- не впливає на показники, що характеризують функціональний стан печінки та нирок тварин усіх експериментальних груп.

Результати дослідження морфоструктури органів і тканин експериментальних тварин показали, що ЛЗ Ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу у разі інстиляцій в очі щурам протягом 1 місяця:

- не змінює такий показник, як коефіцієнт маси внутрішніх органів тварин;
- не чинить кардіотоксичної, гепатотоксичної та отоксичної дії на організм експериментальних тварин;
- не викликає видимих порушень у морфофункціональному стані центрального (тимус) і периферійного (селезінка) органів імунної системи;
- не викликає перебудови в ендокринних органах і пов'язаних з цим змін характеру гормонального синтезу.

5.2 Вивчення місцевоподразливої дії лікарського засобу та дослідження специфічної фармакологічної активності.

Місцевоподразнювальну дію препарату було вивчено на статевонезрілих кролях породи Шиншила масою тіла 0,35-0,45 кг. Всього в експерименті використано 24 кроля.

Для вивчення місцевоподразнювальної дії при одноразовому застосуванні кролів було розподілено на 4 групи по 2 тварини в кожній. Тваринам першої та третьої групи інстилювали в праве око плацебо, тваринам другої та

четвертої групи – досліджуваний препарат у дозі 0,01 мл на тварину. Ліве око – контроль.

Метою досліджень було вивчення місцевоподразливої дії ЛЗ Ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу. Під час проведення експерименту керувалися методичними рекомендаціями [206].

За результатами проведених досліджень можна зробити висновок, що досліджуваний ЛЗ Ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу за одноразового та багаторазового інстиляційного застосування в очі статевонезрілим кролям не виявляє місцевоподразливої дії.

Для вивчення специфічної фармакологічної активності. Дослідження проведено на 29 статевозрілих кролях породи Шиншила (15 чоловічої статі та 14 жіночої статі), масою 2.7-3.1 кг

У досліді використовували наступні групи кролів:

- Контроль, опік, не лікування – 6 кролів, 6 очей;
- Дослідні, краплі очні – 6 кролів, 6 очей;
- Плацебо – 6 кролів, 6 очей;
- Солкосерил, офтальмологічний гель («Legacy Pharmaceuticals Switzerland GmbH», Швейцарія) – 5 кролів, 5 очей.

Специфічну фармакологічну активність ЛЗ досліджували порівняно з такими засобами:

– *ЛЗ-плацебо* – основа ЛЗ, *краплі очні*, без діючих речовин. ЛЗ-плацебо містить: гліцин кристалічний, ЕДТА, натрію хлорид, хлористоводневу кислоту, натрію гідроксид, воду для ін'єкцій.

– *Солкосерил, гель очний* («Legacy Pharmaceuticals Switzerland GmbH», Швейцарія). Його діючою речовиною є депротейнізований діалізат з крові молочних телят, що містить речовини з молекулярними масами до 5 кДа (глікопептиди, нуклеозиди та нуклеотиди, амінокислоти, олігопептиди, незамінні мікроелементи, електроліти). Містить в 1 г гелю 8.3 мг депротейнізованого гемодеривату з крові телят (Bos Taurus), стандартизованого хімічно та біологічно.

Специфічну фармакологічну активність (репаративну та протизапальну) *ЛЗ*, *ЛЗ-плацебо* та *Солкосерилу* оцінювали відповідно до методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України «Експериментальне вивчення нешкідливості та фармакологічної активності очних лікарських засобів» щодо впливу на стан структур переднього відділу ока здорових кролів у разі дозованого хімічного опіку (лужний опік) рогової оболонки ока.

Критеріями специфічної фармакологічної активності служили результати клінічних спостережень та гістологічних досліджень, до яких входили:

- У динаміці:
- зовнішній огляд ока;
- дослідження цілості рогівки: інтенсивність її помутніння, розмір дефекту рогівки, цілість епітелію рогівки (флуоресцеїновий тест);
- наявність і ступінь вираженості неоваскуляризації;
- наявність і ступінь вираженості запальної реакції кон'юнктиви (гіперемія, набряк, наявність слизового відокремлюваного);
- Після закінчення 29-денних очних інстиляцій:
- патоморфологічне дослідження структур ока та кон'юнктиви повіки.

Дозований хімічний (лужний) опік у кролів моделювали накладенням на центральну ділянку рогівки правого ока круглого штампа фільтрувального паперу діаметром 7 мм, просоченого 5% розчином NaOH з експозицією 15 с і подальшим промиванням ока стерильним фізіологічним розчином до досягнення нейтрального.

ЛЗ, *ЛЗ-плацебо* та *Солкосерил* інстилювали у нижній кон'юнктивальний мішок ока по 1 краплі (0.028 мл) 3 рази/день протягом 29 днів; перша інстиляція здійснювалася через 1 год після опікового впливу.

За даними дослідження цілості рогівки встановлено, що інстиляції очних крапель *ЛЗ* кролям з дозованим лужним опіком рогівки сприяли суттєвій епітелізації ділянки опікового дефекту та зменшення стромального помутніння з формуванням ніжного поверхневого помутніння. Максимальний фармаколо-

гічний ефект *ЛЗ* становив зниження інтенсивності помутніння ураженої ділянки рогівки – 31.0%, зменшення розміру дефекту ураженої ділянки рогівки – 35.6%, відновлення цілості рогівки – 46.7%. У разі інстиляцій *ЛЗ-плацебо* і *Солкосерил* регенерація епітелію проходила більш мляво, а у частини тварин у період 15-29 днів зареєстровано посилення деепітелізації, тобто посилення деструктивного процесу. Максимальний фармакологічний ефект на зазначені показники становив відповідно: *ЛЗ-плацебо* – 13.7, 6.8 та 40.0%; *Солкосерил* – 17.2, 0 та 36.0%.

За даними дослідження неоваскуляризації рогівки встановлено, що очні інстиляції *ЛЗ* викликали виражену неоваскуляризацію, водночас товщина кровоносних судин у період після 2-тижневих інстиляцій зменшувалася, що свідчить про запусіння судин. *ЛЗ-плацебо* не стимулював неоваскуляризацію, а *Солкосерил* її помірно активував після 2-тижневих інстиляцій.

За даними дослідження запальної реакції кон'юнктиви повіки встановлено, що інстиляції очних крапель *ЛЗ* виражено знижували запальну реакцію кон'юнктиви очей за лужного опіку; максимальний фармакологічний ефект – 85,7%. Інстиляції *ЛЗ-плацебо* та *Солкосерилу* не виявляли протизапального ефекту на кон'юнктиву повіки кролів за лужному опіку рогівки і навіть дещо посилювали такі симптоми запалення, як гіперемія та набряк кон'юнктиви.

За даними патоморфологічного дослідження, 29-добові очні інстиляції *ЛЗ* кролям з дозованим лужним опіком рогівки чинили виражений позитивний вплив на стан рогівки та кон'юнктиви повіки, сприяючи прискоренню процесу епітелізації та організації дефектів, перешкоджаючи збільшенню висоти і товщини епітелію рогівки (фармакологічний ефект – 87.7% і 87.4% відповідно), забезпечуючи проростання лімбічних судин у ділянку дефекту, знижуючи рівень запалення в кон'юнктиві повіки. Очні інстиляції *ЛЗ-плацебо* не прискорювали природне загоєння рогівки та усунення запалення кон'юнктиви повіки; *Солкосерил* виявляв помірний репаративний ефект, ступінь вираженості якого поступався дії *ЛЗ*, і не мав протизапальної активності.

У цілому розроблений ЛЗ, краплі очні, за дозованого лужного опіку рогівки виявляє репаративну та протизапальну активність, прискорюючи процес природної епітелізації рогівки, перешкоджаючи збільшенню висоти та товщини переднього епітелію рогівки та знижуючи стромальне помутніння й запалення.

Висновки до розділу 5

1. На підставі результатів вивчення гострої, субхронічної токсичності можна зробити висновки, що досліджуваний ЛЗ не викликає загибелі тварин, не чинить токсичного впливу на загальний стан та поведінку досліджуваних тварин.

2. За результатами проведених досліджень місцевоподразливої дії та зміни морфоструктури внутрішніх органів можна зробити висновки, що досліджуваний ЛЗ за одноразового та багаторазового інстиляційного застосування в очі статевонезрілим кролям не виявляє місцевоподразнювальної дії.

3. Розроблений ЛЗ, краплі очні, за дозованого лужного опіку рогівки виявляє репаративну та протизапальну активність, прискорюючи процес природної епітелізації рогівки, перешкоджаючи збільшенню висоти та товщини переднього епітелію рогівки і знижуючи стромальне помутніння та запалення.

4. У цілому результати оцінки безпеки ЛЗ очні краплі на основі пептидного комплексу, розробленого ПАТ «Фармак» (Україна), дозволяють рекомендувати його для отримання дозволу на проведення клінічних досліджень.

Результати експериментальних досліджень розділу наведено в таких публікаціях:

1. Bezdieniezhnykh N., Lykhova A., Borschevskyi H., Dyakun K., Kruglov I. In vitro assessment of the biological activity of a new regenerative agent prepared from the concentrate of deproteinized dermal layer of porcine skin / Eureka: Life Sciences. 2020. № 6. P. 12-22.

ВИСНОВКИ

1. Вперше в результаті проведених досліджень здійснено фармацевтичне розроблення науково обгрунтованого складу та технології одержання ліпосомальної форми очних крапель репаративної дії на основі пептидного комплексу.

2. Проведено аналіз сучасних ЛЗ, що стимулюють процеси регенерації. Показана роль регуляторних пептидів у лікуванні порушень біохімічних та регенеративних процесів та поліпшення їх біодоступності. Проведено аналіз можливого доставлення терапевтичних білків в очі. На підставі проведеного аналізу фармацевтичного ринку України доведено актуальність створення нового ЛЗ у формі ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу з дермального шару шкіри свиней.

3. Визначено загальну методологію, складено план дослідницьких робіт з вибору й обгрунтування складу, технології, контролю якості ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу. Наведено об'єкти дослідження – АФІ та допоміжні речовини, які були використані для отримання ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу. Підібрано методи досліджень, які дозволять отримати повні та достовірні результати.

4. Обгрунтовано якісний та кількісний склад АФІ у готовій лікарській формі – очні краплі на основі пептидного комплексу, отриманого з епідермального шару шкіри свиней. На підставі комплексу досліджень обгрунтовано вибір допоміжних речовин у готовій лікарській формі.

5. Розроблено технологію отримання ліпосомальної форми очних крапель на основі пептидного комплексу. За допомогою фізико-хімічних досліджень доведено повноту інкапсулювання АФІ в ліпосоми.

6. Розроблено промислову технологію отримання очних крапель на основі пептидного комплексу отриманого з дермального шару шкіри свиней, вивчено критичні параметри виробництва.

7. На підставі фізико-хімічних досліджень визначено основні показники якості розроблених ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу, розроблено методики ідентифікації АФІ у складі ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу.

8. Проведено дослідження зі стандартизації ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу. Розроблено і валідовано методики ідентифікації та кількісного визначення пептидів – методом ВЕРХ. Досліджено стабільність ліпосомальних крапель очних на основі пептидного комплексу протягом двох років під час зберігання за температури 2-8 °С у запропонованому первинному упакованні, що дало підставу встановити термін придатності – 2 роки. На підставі проведених досліджень розроблено проєкт МКЯ на ЛЗ ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу.

9. Розроблений ЛЗ, краплі очні, за дозованого лужного опіку рогівки виявляє репаративну та протизапальну активність, прискорюючи процес природної епітелізації рогівки, перешкоджаючи збільшенню висоти та товщини переднього епітелію рогівки і знижуючи стромальне помутніння та запалення, та не токсичні.

10. Окремі фрагменти дослідження впроваджено у навчально-наукову роботу кафедр фармацевтичного профілю закладів вищої освіти України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Nachtrab G., Poss K. D. Toward a blueprint for regeneration. *Development*. 2012. Vol. 139. P. 2639–2642. DOI: 10.1242/dev.080390.
2. Stocum D. L. Regenerative biology and medicine. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002. Vol. 2. P. 270–273.
3. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004. Vol. 5(10). P. 836–847. DOI: 10.1038/nrm1489.
4. Sánchez Alvarado A., Tsonis P. A. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet*. 2006. Vol. 7(11). P. 873–884. DOI: 10.1038/nrg1923.
5. Stocum D. L., Cameron J. A. Looking proximally and distally: 100 years of limb regeneration and beyond. *Dev Dyn*. 2011. Vol. 240(5). P. 943–968. DOI: 10.1002/dvdy.22553.
6. Baddour J. A., Sousounis K., Tsonis P. A. Organ repair and regeneration: an overview. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2012. Vol. 96(1). P. 1–29. DOI: 10.1002/bdrc.21006.
7. Wilson S. A., Becker L. A., Tinker R. H. Fifteen-month follow-up of eye movement desensitization and reprocessing (EMDR) treatment for posttraumatic stress disorder and psychological trauma. *J Consult Clin Psychol*. 1997. Vol. 65(6). P. 1047-56. DOI: 10.1037//0022-006x.65.6.1047.
8. Single cells can sense their position in a morphogen gradient / J. B. Gurdon et al. *Development*. 1999. Vol. 126(23). P. 5309-5317. DOI: 10.1242/dev.126.23.5309.
9. Gurdon J. B., Bourillot P.-Y. Morphogen gradient interpretation. *Nature*. 2001. Vol. 413(6858). P. 797-803. DOI: 10.1038/35101500.
10. Brockes J. P., Kumar A. Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008. Vol. 24. P. 525-49. DOI: 10.1146/annurev.cell-bio.24.110707.175336.
11. Wolpert L. *Developmental Biology: A Very Short Introduction*. Oxford : Oxford University Press, 2011. 112 p.

12. Rogers K. W., Schier A. F. Morphogen gradients: from generation to interpretation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011. Vol. 27. P. 377-407. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154148.
13. Bentzinger C. F., Wang Y. X., Rudnicki M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012. Vol. 4(2). P. a008342. DOI: 10.1101/cshperspect.a008342.
14. Galdiero S., Gomes P. A. C. Peptide-Based Drugs and Drug Delivery Systems. *Molecules.* 2017. Vol. 22(12). P. 2185–91. DOI: 10.3390/molecules22122185.
15. Lee A. C., Harris J. L., Khanna K. K., Hong J. H. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20(10). P. E2383. DOI: 10.3390/ijms20102383.
16. Owji H., Nezafat N., Negahdaripour M., Hajiebrahimi A., Ghasemi Y. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *Eur. J. Cell. Biol.* 2018. Vol. 97(6). P. 422–41. DOI: 10.1016/j.ejcb.2018.06.003.
17. Vanyushin B. F., Khavinson V. Kh. Short Biologically Active Peptides as Epigenetic Modulators of Gene Activity. *Epigenetics – A Different Way of Looking at Genetics* / W. Doerfler, P. Böhm (eds.). Springer International Publishing Switzerland, 2016. P. 69–90. DOI: 10.1007/978-3-319-27186-6_5.
18. Effects on GLP-1, PYY, and leptin by direct stimulation of terminal ileum and cecum in humans: implications for ileal transposition / H. Buchwald et al. *Surg Obes Relat Dis.* 2014. Vol. 10(5). P. 780–786. DOI: 10.1016/j.soard.2014.01.032.
19. Fosgerau K., Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today.* 2015. Vol. 20(1). P. 122–128. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.10.003.
20. Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: current status and future prospects / A. Padhi et al. *Tuberculosis.* 2014. Vol. 94(4). P. 363–373. DOI: 10.1016/j.tube.2014.03.011.
21. Souery W. N., Bishop C. J. Clinically advancing and promising polymer-based therapeutics. *Acta Biomater.* 2018. Vol. 67. P. 1–20. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.11.044.

22. Larché D. M., Wraith C. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat Med*. 2005. Vol. 11(S4). P. S69–S76. DOI: 10.1038/nm1226.
23. Jones A. G., Hattersley A. T. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabet Med*. 2013. Vol. 30(7). P. 803–817. DOI: 10.1111/dme.12159.
24. Fosgerau K., Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*. 2015. Vol. 20(1). P. 122–128. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.10.003.
25. Rastogi S., Shukla S., Kalaivani M., Singh G. N. Peptide-based therapeutics: quality specifications, regulatory considerations, and prospects. *Drug Discovery Today*. 2019. Vol. 24(1). P. 148–162. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.10.002.
26. Lee A. C-L., Harris J. L., Khanna K. K., Hong J.-H. A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design. *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20(10). P. 2383. DOI: 10.3390/ijms20102383.
27. Leonard J. What to know about peptides for health / Medical News Today. URL: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/326701>. (Date of access: 02.12.2024).
28. Cell-penetrating peptide sequence and modification dependent uptake and subcellular distribution of green fluorescent protein in different cell lines / S. G. Patel et al. *Sci Rep*. 2019. Vol. 9(1). P. 6298. DOI: 10.1038/s41598-019-42456-8.
29. Wagner A. M., Gran M. P., Peppas N. A. Designing the new generation of intelligent biocompatible carriers for protein and peptide delivery. *Acta Pharm Sin B*. 2018. Vol. 8(2). P. 147–164. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.01.013.
30. Cirillo D., Pentimalli F., Giordano A. Peptides or small molecules? Different approaches to develop more effective CDK inhibitors. *Curr Med Chem*. 2011. Vol. 18(19). P. 2854–2866. DOI: 10.2174/092986711796150496.
31. Hopkins A. L., Groom C. R. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discovery*. 2002. Vol. 1(9). P. 727–730. DOI: 10.1038/nrd892.

32. Lau J. L., Dunn M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem.* 2018. Vol. 26(10). P. 2700–2707. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.

33. Rask-Andersen M, Masuram S, Schiöth HB. The druggable genome: evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014. Vol. 54. P. 9–26. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-135943.

34. Vargason A. M., Anselmo A. C., Mitragotri S. The evolution of commercial drug delivery technologies. *Nature Biomedical Engineering.* 2021. Vol. 5(9). P. 951–967. DOI: 10.1038/s41551-021-00698-w.

35. A rational approach for creating peptides mimicking antibody binding / S. Sachdeva et al. *Sci Rep.* 2019. Vol. 9(1). P. 997. DOI: 10.1038/s41598-018-37201-6.

36. Trier N., Hansen P., Houen G. Peptides, antibodies, peptide antibodies and more. *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20(24). P. 6289. DOI: 10.3390/ijms20246289.

37. Compartmental Pharmacokinetics and Tissue Distribution of the Antifungal Echinocandin Lipopeptide Micafungin (FK463) in Rabbits / A. H. Groll et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001. Vol. 45(12). P. 3322–3327. DOI: 10.1128/AAC.45.12.3322-3327.2001.

38. Craik D. J., Fairlie D. P., Liras S., Price D. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des.* 2013. Vol. 81(1). P. 136–147. DOI: 10.1111/cbdd.12055.

39. Peptide impurities in commercial synthetic peptides and their implications for vaccine trial assessment / J. R. Currier et al. *Clin Vaccine Immunol.* 2008. Vol. 15(2). P. 267–276. DOI: 10.1128/CVI.00284-07.

40. A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives / A. Muheem et al. *Saudi Pharm J.* 2016. Vol. 24(4). P. 413–428. DOI: 10.1016/j.jsps.2014.06.004

41. Craik D. J., Fairlie D. P., Liras S., Price D. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des.* 2013. Vol. 81(1). P. 136–147. DOI: 10.1111/cbdd.12055.

42. Properties and formulation of oral drug delivery systems of protein and peptides / A. Semalty et al. *Indian J Pharm Sci.* 2007. Vol. 69(6). P. 741. DOI: 10.4103/0250-474X.39426.
43. Effect of short peptides on neuronal differentiation of stem cells / S. Caputi et al. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2019. Vol. 33. P. 1–12. DOI: 10.1177/2058738419828613.
44. Heterocellular molecular contacts in the mammalian stem cell niche / L. C. Ceafalan et al. *Eur. J. Cell Biol.* 2018. Vol. 97(6). P. 442–461. DOI: 10.1016/j.ejcb.2018.07.001.
45. Short peptides protect oral stem cells from ageing / B. Sinjari et al. *Stem Cell. Rev. Reports.* 2020. Vol. 16(1). P. 159–166. DOI: 10.1007/s12015-019-09921-3.
46. Skrivankova B., Julis I., Podrazky V., Trnavsky K. Effect of Rumalon (glycosaminoglycan-peptide) on the articular tissue. *Agents Actions. Suppl.* 1993. Vol. 39. P. 219–24.
47. Raveron versus placebo in the conservative treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH) / K. Bircan et al. *Int. Urol. Nephrol.* 1990. Vol. 22(4). P. 345–8.
48. Update on the Role of Actovegin in Musculoskeletal Medicine: A Review of the Past 10 Years / J. Brock et al. *Clin. J. Sport Med.* 2020. Vol. 30(1). P. 83–90. DOI: 10.1097/JSM.0000000000000566.
49. Solcoseryl, a tissue respiration stimulating agent, significantly enhances the effect of capacitively coupled electric field on the promotion of bone formation around dental implants / M. Ochi et. al. *Clin. Oral. Implants Res.* 2003. Vol. 14(3). P. 294–302. DOI: 10.1034/j.1600-0501.2003.140307.x
50. Cerebrolysin for vascular dementia / S. Cui et al. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2019. Vol. 2019(11). P. CD008900. DOI: 10.1002/14651858.CD008900.
51. Bertarelli F. Efficacy of thymostimulin. *Lancet.* 1994. Vol. 343(8890). P. 184.
52. Patel P. B., Shastri D. H., Shelat P. K., Shukla A. K. Ophthalmic drug delivery system: Challenges and approaches. *Syst. Rev. Pharm.* 2010. Vol. 1. P. 113–120.

53. Characterization of Biodegradable Microsphere-Hydrogel Ocular Drug Delivery System for Controlled and Extended Release of Ranibizumab. Transl / W. Liu et al. *Vis. Sci. Technol.* 2019. Vol. 8(1). P. 12. DOI: 10.1167/tvst.8.1.12. eCollection 2019 Jan.

54. Recent advances in ocular drug delivery systems and targeting VEGF receptors for management of ocular angiogenesis: A comprehensive review / S. Narayana et al. *Future J. Pharm. Sci.* 2021. Vol. 7(1). P. 186. DOI: 10.1186/s43094-021-00331-2.

55. Chen W., Yung B. C., Qian Z., Chen X. Improving Long-Term Subcutaneous Drug Delivery by Regulating Material-Bioenvironment Interaction. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018. Vol. 127. P. 20–34. DOI: 10.1016/j.addr.2018.01.016.

56. Approaches for Enhancing Oral Bioavailability of Peptides and Proteins / J. Renukuntla et al. *Int. J. Pharm.* 2013. Vol. 447(1-2). P. 75–93. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.02.030.

57. Faulds D., Goa K. L., Benfield P. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs.* 1993. Vol. 45(6). P. 953–1040. DOI: 10.2165/00003495-199345060-00007.

58. Brown L. R. Commercial Challenges of Protein Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2005. Vol. 2(1). P. 29–42. DOI: 10.1517/17425247.2.1.29.

59. Release of functional dexamethasone by intracellular enzymes: A modular peptide-based strategy for ocular drug delivery / M. Bhattacharya et al. *J. Control. Release.* 2020. Vol. 327. P. 584–594. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.09.005.

60. Lin J. Pharmacokinetics of Biotech Drugs: Peptides, Proteins and Monoclonal Antibodies. *Curr. Drug Metab.* 2009. Vol. 10(7). P. 661–691. DOI: 10.2174/138920009789895499.

61. Ahmed I., Patton T. F. Disposition of Timolol and Inulin in the Rabbit Eye Following Corneal versus Non-Corneal Absorption. *Int. J. Pharm.* 1987. Vol. 38(1-3). P. 9–21. DOI: 10.1016/0378-5173(87)90092-5.

62. Donovan M. D., Flynn G. L., Amidon G. L. Absorption of Polyethylene Glycols 600 Through 2000: The Molecular Weight Dependence of Gastrointestinal and Nasal Absorption. *Pharm. Res. Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* 1990. Vol. 7(8). P. 863–868. DOI: 10.1023/a:1015921101465.

63. Shen W., Matsui T. Intestinal Absorption of Small Peptides: A Review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2019. Vol. 54(6). P. 1942–1948. DOI:10.1111/ijfs.14048.

64. A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives / A. Muheem et al. *Saudi Pharm. J.* 2016. Vol. 24(4). P. 413–428. DOI: 10.1016/j.jsps.2014.06.004.

65. Leclercq B., Mejlachowicz D., Behar-Cohen F. Ocular Barriers and Their Influence on Gene Therapy Products Delivery. *Pharmaceutics* 2022. Vol. 14(5). P. 998. DOI: 10.3390/pharmaceutics14050998.

66. Diffusion of macromolecule through retina after experimental branch retinal vein occlusion and estimate of intraretinal barrier / Y. Tao et al. *Curr. Drug Metab.* 2007. Vol. 8(2). P. 151–156. DOI: 10.2174/138920007779815968.

67. Jackson T. L., Antcliff R. J., Hillenkamp J., Marshall J. Human retinal molecular weight exclusion limit and estimate of species variation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003. Vol. 44(5). P. 2141–2146. DOI: 10.1167/iovs.02-1027.

68. Hyaluronic Acid-PEG-Based Diels–Alder In Situ Forming Hydrogels for Sustained Intraocular Delivery of Bevacizumab / C. I. Blessing et al. *Biomacromolecules*. 2022. Vol. 23(7). P. 1525–7797. DOI: 10.1021/acs.biomac.2c00383.

69. Freeze-dried matrices for ocular administration of bevacizumab: A comparison between subconjunctival and intravitreal administration in rabbits / S. Burgalassi et al. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2018. Vol. 8(3). P. 461–472. DOI: 10.1007/s13346-018-0520-x.

70. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006. Vol. 58(11). P. 1131–1135. DOI: 10.1016/j.addr.2006.07.027.

71. Levison M. E., Levison J. H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 2009. Vol. 23(4). P. 791–815. DOI: 10.1016/j.idc.2009.06.008.

72. Del Amo E. M., Urtti A. Rabbit as an animal model for intravitreal pharmacokinetics: Clinical predictability and quality of the published data. *Exp. Eye. Res.* 2015. Vol. 137. P. 111–124. DOI: 10.1016/j.exer.2015.05.003.

73. The peptidomimetic Vasotide targets two retinal VEGF receptors and reduces pathological angiogenesis in murine and nonhuman primate models of retinal disease / R. L. Sidman et al. *Sci. Transl. Med.* 2015. Vol. 7. P. 309.

74. In-vitro permeation of bevacizumab through human sclera: Effect of iontophoresis application / S. Pescina et al. *J. Pharm. Pharmacol.* 2010. Vol. 62(9). P. 1189–1194. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2010.01153.x.

75. Swami R., Shahiwala A. Impact of physiochemical properties on pharmacokinetics of protein therapeutics. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetics.* 2013. Vol. 38(4). P. 231–239. DOI: 10.1007/s13318-013-0126-0.

76. Neonatal Fc receptor: From immunity to therapeutics / T. T. Kuo et al. *J. Clin. Immunol.* 2010. Vol. 30(6). P. 777–789. DOI: 10.1007/s10875-010-9468-4.

77. Gaudana R., Ananthula H. K., Parenky A., Mitra A. K. Ocular Drug Delivery. *AAPS J.* 2010. Vol. 12(3). P. 348–360. DOI: 10.1208/s12248-010-9183-3.

78. Ophthalmic drug delivery systems for the treatment of retinal diseases: Basic research to clinical applications / H. F. Edelhauser et al. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010. Vol. 51(11). P. 5403–5420. DOI: 10.1167/iovs.10-5392.

79. Sasahara K., McPhie P., Minton A. P. Effect of dextran on protein stability and conformation attributed to macromolecular crowding. *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 326(4). P. 1227–1237. DOI: 10.1016/s0022-2836(02)01443-2.

80. Sockolosky J. T., Szoka F. C. The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015. Vol. 91. P. 109–124. DOI: 10.1016/j.addr.2015.02.005.

81. Bajracharya R., Song J. G., Back S. Y., Han H. K. Recent Advancements in Non-Invasive Formulations for Protein Drug Delivery. *Comp. Struct. Biotech. J.* 2019. Vol. 17. P. 1290–1308.

82. Nanoparticle Diffusion in, and Microrheology of, the Bovine Vitreous Ex Vivo / Q. Xu et al. *J. Control. Release.* 2013. Vol. 167. P. 76–84. DOI: 10.1016/j.addr.2015.02.005.

83. Supramolecular PEGylation of biopharmaceuticals / M. J. Webber et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016. Vol. 113(50). P. 14189–14194. DOI: 10.1073/pnas.1616639113.
84. Çağdaş M., Sezer A. D., Bucak S. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. In Application of 26 J. J. LÓPEZ-CANO ET AL. *Nanotechnology in Drug Delivery*, 2014. P. 1–51. DOI:10.5772/58459.
85. Vesicular systems in ocular drug delivery : an overview / I. P. Kaur et al. *Int J Pharm.* 2004. Vol. 269(1). P.1–14. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2003.09.016.
86. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery / G. P. Mishra et al. *J Drug Deliv.* 2011. Vol. 2011. P. 863734. DOI: 10.1155/2011/863734.
87. Ebrahim S., Peyman G. A., Lee P. J. Applications of liposomes in ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 2005. Vol. 50(2). P. 167–182. DOI: 10.1016/j.survophthal.2004.12.006.
88. Torchilin V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2005. Vol. 4(2). P. 145–160. DOI: 10.1038/nrd1632.
89. Novel drug delivery systems for ocular therapy : with special reference to liposomal ocular delivery / A. Bhattacharjee et al. *Eur J Ophthalmol.* 2019. Vol. 29(1). P. 113–126. DOI: 10.1177/1120672118769776.
90. Nanomedicine for glaucoma: liposomes provide sustained release of latanoprost in the eye / J. V. Natarajan et al. *Int J Nanomedicine.* 2012. Vol. 7. P. 123–131. DOI: 10.2147/IJN.S25468.
91. Alavi M., Karimi N., Safaei M. Application of various types of liposomes in drug delivery systems. *Adv Pharm Bull.* 2017. Vol. 7(1). P. 3–9. DOI:10.15171/apb.2017.002.
92. Liposomal nanovesicles for efficient encapsulation of staphylococcal antibiotics / A. Gonzalez Gomez et al. *ACS Omega.* 2019. Vol. 4(6). P. 10866–10876. DOI: 10.1021/acsomega.9b00825.
93. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update / R. Agarwal et al. *Drug Deliv.* 2016. Vol. 23(4). P. 1075-91. DOI: 10.3109/10717544.2014.943336.

94. Tobramycin liposomes: single subconjunctival therapy of pseudomonal keratitis / K. K. Assil et al. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1991. Vol. 32(13). P. 3216–3220.
95. Ophthalmic drug delivery systems for antibiotherapy- a review / M. Dubald et al. *Pharmaceutics*. 2018. Vol. 10(1). P. 10. DOI: 10.3390/pharmaceutics10010010.
96. Mehanna M. M., Elmaradny H. A., Samaha M. W. Ciprofloxacin liposomes as vesicular reservoirs for ocular delivery: formulation, optimization, and in vitro characterization. *Drug Dev Ind Pharm*. 2009. Vol. 35(5). P. 583–593. DOI: 10.1080/03639040802468024.
97. Gels and liposomes in optimized ocular drug delivery: studies on ciprofloxacin formulations / L. Budai et al. *Int J Pharm*. 2007. Vol. 343(1–2). P. 34–40. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.04.013.
98. Design of liposomal colloidal systems for ocular delivery of ciprofloxacin / E. I. Taha et al. *Saudi Pharm J*. 2014. Vol. 22(3). P. 231–239. DOI: 10.1016/j.jsps.2013.07.003.
99. Encapsulation of azithromycin ion pair in liposome for enhancing ocular delivery and therapeutic efficacy on dry eye / T. Ren et al. *Mol Pharm*. 2018. Vol. 15(11). P. 4862–4871. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00516.
100. Characterization and in-vivo ocular absorption of liposome-encapsulated acyclovir / M. Fresta et al. *J Pharm Pharmacol*. 1999. Vol. 51(5). P. 565–576. DOI: 10.1211/0022357991772664.
101. Law S. L., Huang K. J., Chiang C. H. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery corneal penetration and absorption. *J Control Release*. 2000. Vol. 63(1–2). P. 135–140. DOI: 10.1016/s0168-3659(99)00192-3.
102. Shen Y., Preparation T. J. Ocular pharmacokinetics of ganciclovir liposomes. *Aaps J*. 2007. Vol. 9(3). P. E371.
103. Liposomes as a potential ocular delivery system of distamycin A / P. Chetoni et al. *Int J Pharm*. 2015. Vol. 492(1–2). P. 120–126. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.055.

104. Liposomal voriconazole (VOR) formulation for improved ocular delivery / F. Augusto et al. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015. Vol. 133. P. 331–338. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.06.036.

105. Rapamycin liposome gutta inhibiting fungal keratitis of rats / Z. Zhang et al. *Int J Ophthalmol*. 2019. Vol. 12(4). P. 536–541. DOI: 10.18240/ijo.2019.04.02.

106. Liposomes as an ocular delivery system of fluconazole: in-vitro studies / F. S. Habib et al. *Acta Ophthalmol*. 2010. Vol. 88(8). P. 901–904. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2009.01584.x.

107. A new long-acting liposomal topical antifungal formula: human clinical study / M. S. Abdel-Rhaman et al. *Cornea*. 2012. Vol. 31(2). P. 126–129. DOI: 10.1097/ICO.0b013e318221cf12.

108. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis : physico-chemical and formulation stability / K. Morand et al. *Int J Pharm*. 2007. Vol. 344(1–2). P. 150–153. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.04.028.

109. Liposomes as a novel ocular delivery system for brinzolamide : in vitro and in vivo studies / H. Li et al. *AAPS PharmSciTech*. 2016. Vol. 17(3). P. 710–717. DOI: 10.1208/s12249-015-0382-1.

110. Nano and microtechnologies for ophthalmic administration, an overview / R. Herrero-Vanrell et al. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2013. Vol. 23(2). P. 75–102. DOI:10.1016/S1773-2247(13)50016-5.

111. Osmoprotectants in hybrid liposome/HPMC systems as potential glaucoma treatment / M. Gómez-Ballesteros et al. *Polymers (Basel)*. 2019. Vol. 11(6). P. 929. DOI: 10.3390/polym11060929.

112. Characterization and pharmacokinetics of triamcinolone acetonide-loaded liposomes topical formulations / J. C. Altamirano-vallejo et al. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2018. Vol. 34(5). P. 416–425. DOI: 10.3390/polym11060929.

113. Novel triamcinolone acetonide-loaded liposomes topical formulation for the treatment of cystoid macular edema after cataract surgery : a pilot study / A. G. Rosa et al. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2019. Vol. 35(2). P. 106-115. DOI: 10.1089/jop.2018.0101.

114. Improved in vitro corneal delivery of a thrombospondin-1-derived peptide using a liposomal formulation / L. Soriano-Romaní et al. *Exp Eye Res.* 2018. Vol. 167. P. 118–121. DOI: 10.1016/j.exer.2017.12.002.

115. Liposomes for effective drug delivery to the ocular posterior chamber / S. Lai et al. *J Nanobiotechnology.* 2019. Vol. 17(1). P. 64. DOI: 10.1186/s12951-019-0498-7.

116. Muthu M. S., Singh S. Targeted nanomedicines: effective treatment modalities for cancer, AIDS and brain disorders. *Nanomedicine.* 2009. Vol. 4(1). P. 105–118. DOI: 10.2217/17435889.4.1.105.

117. Engineering liposomal nanoparticles for targeted gene therapy / C. Zylberberg et al. *Gene Ther.* 2017. Vol. 24(8). P. 441–452. DOI: 10.1038/gt.2017.41.

118. DNA-loaded cationic liposomes efficiently function as a vaccine against malarial proteins / Fotoran WL, et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017. Vol. 7. P. 1–10. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.08.004.

119. Evaluation of novel cationic gene based liposomes with cyclodextrin prepared by thin film hydration and microfluidic systems / H. Elsana et al. *Sci Rep.* 2019. Vol. 9(1). P. 15120. DOI: 10.1038/s41598-019-51065-4.

120. Plasmid DNA-encapsulating liposomes: effect of a spacer between the cationic head group and hydrophobic moieties of the lipids on gene expression efficiency / Y. Obata et al. *Biochim Biophys Acta.* 2009. Vol. 1788(5). P. 1148–1158. DOI: 10.1016/j.bbamem.2009.02.014.

121. Lipid-based drug delivery systems in the treatment of wet age-related macular degeneration / J. D. Du et al. *Drug Deliv Transl Res.* 2016. Vol. 6(6). P. 781–792. DOI: 10.1007/s13346-016-0299-6.

122. Ocular instillation of vitamin A–coupled liposomes containing HSP47 siRNA ameliorates dry eye syndrome in chronic GVHD / H. Ohigashi et al. *Blood Adv.* 2019. Vol. 3(7). P. 1003–1010. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018028431.

123. Progress on ocular siRNA gene-silencing therapy and drug delivery systems / J. Jiang et al. *Fundam Clin Pharmacol.* 2021. Vol. 35(1). P. 4–24. DOI: 10.1111/fcp.12561.

124. Malta J. B. et al. Treatment of ocular graft-versus-host disease with topical cyclosporine 0.05%. *Cornea*. 2010. Vol. 29(12). P. 1392–1396.
125. A clinical trial comparing the safety and efficacy of topical tacrolimus versus methylprednisolone in ocular graft-versus-host disease / T. B. Abud et al. *Physiol Behav*. 2016. Vol. 123(7). P. 1449–1457. DOI: 10.1016/j.optha.2016.02.044.
126. Prolongation of corneal allograft survival by topical application of everolimus in experimental keratoplasty / X. Q. Li et al. *Ophthalmic Res*. 2008. Vol. 40(6). P. 309–314. DOI: 10.1159/000150444.
127. Liposomes containing bile salts as novel ocular delivery systems for tacrolimus (FK506): in vitro characterization and improved corneal permeation / Y. Dai et al. *Int J Nanomedicine*. 2013. Vol. 8. P. 1921–1933. DOI: 10.2147/IJN.S44487.
128. Supercritical fluid-mediated liposomes containing cyclosporin A for the treatment of dry eye syndrome in a rabbit model: comparative study with the conventional cyclosporin A emulsion / P. R. Karn et al. *Int J Nanomedicine*. 2014. Vol. 9. P. 3791–3800. DOI: 10.2147/IJN.S65601.
129. Breaking down the Barrier: Topical Liposomes as Nanocarriers for Drug Delivery into the Posterior Segment of the Eyeball / A. Santos et al. *Role Nov. Drug Deliv. Veh. Nanobiomedicine*. IntechOpen. 2019. P. 1-36.
130. Ralph R. A., Doane M. G., Dohlman C. H. Clinical experience with a mobile ocular perfusion pump. *Archives of Ophthalmology*. 1975. Vol. 93(10). P. 1039–1043. DOI: 10.1001/archopht.1975.01010020815015.
131. Tsubota K., Goto E., Shimmura S., Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology*. 1999. Vol. 106(10). P. 1984–1989. DOI: 10.1016/S0161-6420(99)90412-8.
132. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome / K. Tsubota, et al. *British Journal of Ophthalmology*. 1999. Vol. 83(4). P. 390–395. DOI: 10.1016/S0161-6420(99)90412-8.
133. Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of dry eye syndrome / K. C. Yoon et al. *Cornea*. 2006. Vol. 25(3). P. 268–272. DOI: 10.1097/01.ico.0000183484.85636.b6.

134. Therapeutic effect of umbilical cord serum eyedrops for persistent corneal epithelial defect / K. C. Yoon et al. *Korean Journal of Ophthalmology*. 2005. Vol. 19(3). P. 174–178. DOI: 10.3341/kjo.2005.19.3.174.
135. Glasgow BJ, et al. Tear lipocalins : potential lipid scavengers for the invest. *Ophthalmol Vis Sci*. 1999. Vol. 40(13). P. 3100–3107.
136. Adsorption of human tear lipocalin to human meibomian lipid films and invest / T. J. Millar et al. *Ophthalmol Vis Sci*. 2009. Vol. 50(1). P. 140–151.
137. Gouveia S. M., Tiffany J. M. Human tear viscosity : an interactive role for proteins and lipids. *Biochim Biophys Acta*. 2005. Vol. 1753(2). P. 155–163. DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.08.023.
138. Geerling G., MacLennan S., Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004. Vol. 88(11). P. 1467–1474. DOI: 10.1136/bjo.2004.044347.
139. Yamada C., King K. E., Ness P. M. Autologous serum eyedrops: literature review and implications for transfusion medicine specialists. *Transfusion*. 2008. Vol. 48(6). P. 1245–1255. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01665.x.
140. An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops / L. Liu et al. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005. Vol. 243(7). P. 706–714. DOI: 10.1007/s00417-004-1106-5.
141. Jeng B. H., Dupps W. J. Jr Autologous serum 50% eyedrops in the treatment of persistent corneal epithelial defects. *Cornea*. 2009. Vol. 28(10). P. 1104–1108. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181a2a7f6.
142. Lekhanont K., Jongkhajornpong P., Choubtum L., Chuckpaiwong V. Topical 100% serum eye drops for treating corneal epithelial defect after ocular surgery. *Biomed Res Int*. 2013. Vol. 2013. P. 521315. DOI: 10.1155/2013/521315.
143. Cho Y. K., Huang W., Kim G. Y., Lim B. S. Comparison of autologous serum eye drops with different diluents. *Curr Eye Res*. 2013. Vol. 38(1). P. 9–17. DOI: 10.3109/02713683.2012.720340.
144. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease / B. A. Noble et al. *Br J Ophthalmol*. 2004. Vol. 88(5). P. 647–652. DOI: 10.1136/bjo.2003.026211.

145. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case-control study / T. Kojima et al. *Am J Ophthalmol.* 2005. Vol. 139(2). P. 242–246. DOI: 10.1016/j.ajo.2004.08.040.

146. Celebi A. R. C., Ulusoy C., Mirza G. E. The efficacy of autologous serum eye drops for severe dry eye syndrome: a randomized double-blind crossover study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014. Vol. 252(4). P. 619–626. DOI: 10.1007/s00417-014-2599-1.

147. Autologous serum eyedrops for the treatment of dry eye diseases / T. Kojima et al. *Cornea.* 2008. Vol. 27(Suppl.1). P. S25–S30. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31817f3a0e.

148. Noda-Tsuruya T., Asano-Kato N., Toda I., Tsubota K. Autologous serum eye drops for dry eye after LASIK. *J Refract Surg.* 2006. Vol. 22(1). P. 61–66. DOI: 10.3928/1081-597X-20060101-13.

149. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies / A. C. Poon et al. *Br J Ophthalmol.* 2001. Vol. 85(10). P. 1188-97. DOI: 10.1136/bjo.85.10.1188.

150. Schrader S., Wedel T., Moll R., Geerling G. Combination of serum eye drops with hydrogel bandage contact lenses in the treatment of persistent epithelial defects. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006. Vol. 244(10). P. 1345-9. DOI: 10.1007/s00417-006-0257-y.

151. The effect of topical autologous serum on graft re-epithelialization after penetrating keratoplasty / Y. M. Chen et al. *Am J Ophthalmol.* 2010. Vol. 150(3). P. 352-359.e2. DOI: 10.1016/j.ajo.2010.03.024.

152. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy / Y. Matsumoto et al. *Ophthalmology.* 2004. Vol. 111(6). P. 1115–1120. DOI: 10.1016/j.opthta.2003.10.019.

153. Lopez-Garcia J. S., Rivas L., Garcia-Lozano I., Murube J. Autologous serum eyedrops in the treatment of aniridic keratopathy. *Ophthalmology.* 2008. Vol. 115(2). P. 262–267. DOI: 10.1016/j.opthta.2007.03.087.

154. Long-term follow up of autologous serum treatment for recurrent corneal erosions / N. G. Ziakas et al. *Clin Exp Ophthalmol*. 2010. Vol. 38(7). P. 683–687. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2010.02304.x.

155. Autologous serum eye drops for dry eye / Q. Pan et al. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017. Vol. 2(2). P. CD009327. DOI: 10.1002/14651858.CD009327.pub3.

156. Lagnado R., King A. J., Donald F., Dua H. S. A protocol for low contamination risk of autologous serum drops in the management of ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004. Vol. 88(4). P. 464–465. DOI: 10.1136/bjo.2003.025528.

157. Lopez-Garcia J. S., Garcia-Lozano I. Use of containers with sterilizing filter in autologous serum eyedrops. *Ophthalmology*. 2012. Vol. 119(11). P. 2225–2230. DOI: 10.1016/j.opthta.2012.06.028.

158. Soni N. G., Jeng B. H. Blood-derived topical therapy for ocular surface diseases. *Br J Ophthalmol*. 2015. Vol. 100(1). P. 22–27. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-306842.

159. Stability of growth factors in autologous serum eyedrops after long-term storage / J. S. Lopez-Garcia et al. *Curr Eye Res*. 2016. Vol. 41(3). P. 292–298. DOI: 10.3109/02713683.2015.1016180.

160. Blood derived eye drops for the treatment of cornea and ocular surface diseases / G. Giannaccare et al. *Transfus Apher Sci*. 2017. Vol. 56(4). P. 595–604. DOI: 10.1016/j.transci.2017.07.023.

161. Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of neurotrophic keratitis / K. C. Yoon et al. *Ophthalmology*. 2007. Vol. 114(9). P. 1637–1642. DOI: 10.1016/j.opthta.2006.12.014.

162. Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome / K. C. Yoon et al. *Am J Ophthalmol*. 2007. Vol. 144(1). P. 86–92. DOI: 10.1016/j.ajo.2007.03.016.

163. Therapeutic effect of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of dry eye associated with graft-versus-host disease / K. C. Yoon et al. *Bone Marrow Transplant*. 2007. Vol. 39(4). P. 231–235. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705566.

164. Application of umbilical cord serum eyedrops for recurrent corneal erosions / K. C. Yoon et al. *Cornea*. 2011. Vol. 30(7). P. 744–748. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31820d850f.

165. Evaluation of umbilical cord serum therapy in acute ocular chemical burns / N. Sharma et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011. Vol. 52(2). P. 1087–1092. DOI: 10.1167/iovs.09-4170.

166. Yoon K. C., Oh H. J., Park J. W., Choi J. Application of umbilical cord serum eyedrops after laser epithelial keratomileusis. *Acta Ophthalmol*. 2013. Vol. 91(1). P. e22–e28. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2012.02538.x.

167. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft / B. H. Choi et al. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004. Vol. 33(1). P. 56–59. DOI: 10.1054/ijom.2003.0466.

168. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts / E. Anitua et al. *Exp Eye Res*. 2015. Vol. 135. P. 118–126. DOI: 10.1016/j.exer.2015.02.016.

169. The effect of subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing / S. T. Tanidir et al. *Cornea*. 2010. Vol. 29(6). P. 664–669. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181c29633.

170. Corneal epitheliotropic capacity of three different blood-derived preparations / L. Liu et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006. Vol. 47(6). P. 2438–2444. DOI: 10.1167/iovs.05-0876.

171. Ранозагоювальна дія препарату «Ефіаль»™ / Г. І. Борщевський та ін. *Фармацевтичний часопис*. 2013. № 3. С. 29-34.

172. Борщевський Г. І., Серединська Н. М. Можливість створення органопрепаратів на основі пептидних комплексів. *Фармацевтичний журнал*. 2013. № 5. С. 58-67.

173. Afouna M. I., Khattab I. S., Reddy I. K. Preparation and characterization of demeclocycline liposomal formulations and assessment of their intraocular pressurelowering effects. *Cutan Ocul Toxicol*. 2005. Vol. 24(2). P. 111–124. DOI: 10.1081/CUS-200059582.

174. Державний реєстр лікарських засобів. URL: <http://www.drlz.com.ua/> (дата звернення: 16.11.2023).

175. Мнушко, З. М. Менеджмент та маркетинг у фармації. Ч. II. Маркетинг у фармації : підруч. для студ. вищ. навч. закладів / З. М. Мнушко, Н. М. Діхтярьова; за ред. З. М. Мнушко. – 2-ге вид., доп. та перероб. Харків : Вид-во НФаУ : Золоті сторінки, 2010. 512 с.

176. Компендіум – лікарські препарати. URL: <https://compendium.com.ua/>

177. Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності : Настанова якості МОЗУ 42–3.2:2004 / В. Георгієвський та ін. Київ, 2004. С. 38 с.

178. 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.

179. Egg phospholipids / United States Pharmacopeia USP NF 30. North Bethesda. The United States Pharmacopeial Convention, 2012. P 1789–1790.

180. Сидоренко Н.П., Григоренко Т.В. Спектрофотометричний аналіз фосфатидилхоліну в біологічних зразках: розробка та валідація методики. // Медична хімія, 2021, Т. 23, №3, с. 189-195.

181. Лисенко І.Г., Бондаренко Ю.М. Застосування мас-спектрометрії для ідентифікації та кількісного визначення домішок у фосфатидилхоліні. // Вісник фармації, 2020, Т. 84, №1, с. 33-40.

182. Федоренко О.С., Кравченко Л.В. Розробка газохроматографічного методу аналізу фосфатидилхоліну та його домішок у лікарських препаратах. // Фармацевтичний журнал, 2019, Т. 71, №6, с. 22-28.

183. Захарченко П.В., Морозова К.А. Оптимізація умов екстракції та ВЕРХ-аналізу фосфатидилхоліну з рослинної сировини. // Хімія природних сполук, 2017, Т. 53, №2, с. 156-162

184. Кузьменко Л.О., Ткаченко В.В. Розробка та валідація електрофотетичної методики аналізу фосфатидилхоліну та його домішок. // Біополімери і клітина, 2016, Т. 32, №1, с. 45-52.
185. Мартиненко О.Г., Соловйова Н.М. Застосування ядерного магнітного резонансу для кількісного визначення фосфатидилхоліну в ліпідних сумішах. // Український хімічний журнал, 2015, Т. 81, №9, с. 89-95.
186. Романенко Д.С., Черненко І.В. Розробка та валідація флуориметричної методики визначення фосфатидилхоліну в біологічних рідинах. // Журнал біоорганічної хімії, 2014, Т. 42, №7, с. 1020-1026
187. Молчанов О.В., Андреева О.В. Розробка методик оцінювання рівня якості пептидних препаратів. // Технологічний вісник, 2021, №3, с. 29-35.
188. Нові В.В. Валідація методик контролю пептидних лікарських засобів. // Європейська академія наук, 2020.
189. Кравченко Л.А., Тарасенко О.О. Валідація методик виконання вимірювань у лабораторній практиці. Європейський хімічний журнал, 2021, №4, с. 23-34.
190. Герасимчук І.В., Сухоставець М.А. Визначення основних валідаційних характеристик аналітичних методик контролю якості лікарських засобів. Журнал фармацевтичних наук України, 2022, №3, с. 45-52.
191. Мироненко Л.О., Поліщук О.В. ВЕРХ-методи в аналізі фармацевтичних препаратів: валідаційні підходи. Фармацевтичний журнал, 2021, №5, с. 61-70.
192. Косенко І.П., Білоусова І.О. Валідація ВЕРХ-методу для визначення домішок у лікарських засобах. Журнал аналітичної хімії, 2023, №2, с. 33-40.
193. Омельченко А.В., Гончаренко С.В. Оцінка точності та лінійності ВЕРХ-методів згідно з ІСН Q2(R1). Лабораторна аналітика, 2020, №6, с. 15-22.
194. Петренко Ю.В., Савченко О.П. Оптимізація параметрів ВЕРХ-методик для аналізу антибактеріальних препаратів. Український біохімічний журнал, 2021, №4, с. 87-95.

195. Ткаченко Л.М., Федоренко М.О. Використання ВЕРХ у фармацевтичному аналізі: валідаційні вимоги. *Фармація і технологія ліків*, 2022, №1, с. 29-38.
196. Гаврилюк В.О., Костенко П.І. Визначення меж виявлення та кількісного визначення у ВЕРХ-методах. *Журнал фармацевтичного контролю*, 2023, №3, с. 55-64.
197. Держлікслужба України. Настанова з валідації методик аналізу лікарських засобів. Офіційний документ, Київ, 2022.
198. Бойко Л.В., Шевченко Р.О. Вплив умов хроматографії на точність ВЕРХ-аналізу антиоксидантів у лікарських формах. *Аналітична хімія та контроль якості*, 2020, №5, с. 12-20.
199. Федорчук І.А., Зінченко Н.П. Визначення впливу розчинників на параметри валідації ВЕРХ-методів. *Лабораторні дослідження*, 2021, №2, с. 41-50.
200. Литвиненко О.М., Гавриленко Т.А. Статистична обробка результатів валідації аналітичних методик. *Аналітичний контроль у фармації*, 2023, №1, с. 19-27.
201. Жукова І.В., Корнійчук О.М. Методологія валідації ВЕРХ-методів згідно з USP і Європейською фармакопеею. *Журнал фармацевтичної аналітики*, 2022, №3, с. 30-39.
202. Коваленко О.В., Іванченко Л.М. Розробка та валідація ВЕРХ-методики кількісного визначення фосфатидилхоліну в ліпідних екстрактах. // *Український біохімічний журнал*, 2023, Т. 95, №2, с. 45-52.
203. Дмитренко В.О., Олійник М.С. Валідація методики рідинної хроматографії для визначення фосфатидилхоліну в косметичних засобах. // *Журнал косметичної науки*, 2018, Т. 40, №4, с. 275-281.
204. Вплив поліпептидного препарату «Вермілат» на репаративні властивості рогової оболонки при травматичному її пошкодженні / Л. К. Воскресенська та ін. *Проблеми екології та медицини*. 2001. Т. 9, № 3-4. С. 7-11.

205. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. Київ : Авіценна, 2001. С. 74-97.

206. Доклінічне вивчення місцевоподразнювальної дії лікарських засобів: метод. рек. Київ, 2007. 58 с.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

Статті у наукових виданнях, які внесені до міжнародних
наукометричних баз

1. Kruglov E., Yarnykh T., Borshchevsky G., Rukhmakova O. Development of the technology of a liposomal form of eye drops based on a peptide complex. *Acta Poloniae pharmaceutica*. 2021. Vol. 78(2). P. 237-242. (Scopus) DOI: [10.32383/appdr/135087](https://doi.org/10.32383/appdr/135087) (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку).

Статті у фахових наукових виданнях

2. Круглов Є. М., Борщевський Г. І. Оптимізація методу концентрування екстракту біологічно активних речовин із дермального шару шкіри свиней. *Український журнал військової медицини*. 2022. № 3(1). С. 87-92. DOI:10.46847/ujmm.2022.1(3)-087 (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; особистий внесок Г. І. Борщевського: формулювання цілей та завдань дослідження, формулювання висновків).

3. Kruglov E., Borshchevsky G. The use of modern QbD approaches in the pharmaceutical development of technology of liposomal eye drops. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2022. № (1). P. 28–32. DOI: 10.5281/zenodo.6350205 (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; особистий внесок Г. І. Борщевського: формулювання цілей та завдань дослідження, формулювання висновків).

4. Круглов Є. М., Борщевський Г. І. Особливості процесу фільтрації ліпосомальної емульсії для виготовлення очних крапель на основі пептидного

комплексу. *Вісник фармації*. 2023. № 1(105). С. 19-22. DOI :10.24959/nphj.23.102 (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; особистий внесок Г. І. Борщевського: формулювання цілей та завдань дослідження, формулювання висновків).

Патенти

5. Спосіб одержання композиції протизапальної та регенеруючої дії : пат. № 152253 Україна / Гой А. М., Круглов Є. М., Борщевський Г. І. № u 2022 00080 ; заявл. 10.01.2022 ; опубл. 12.01.2023, Бюл. № 2. (Особистий внесок здобувача: брав участь у патентному пошуку, одержанні лікарського засобу).

Тези доповідей

6. Kruglov I., Omelchenko I., Diakun K., Chayka L., Borschevskiy G., Yarnykh T. Eye drops with reparative action based on low molecular weight peptide complex. *Science and society* : 15th International conference, Hamilton, Canada, November 8, 2019. Hamilton, 2019. P. 223-225.

7. Круглов Є., Ярних Т., Борщевський Г. Актуальність створення ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу з дермального шару шкіри свиней. *Society and science. problems and prospects* : Proceedings of the III International Scientific and Practical Conference, London, England, January 25–28, 2022. London, 2022. P. 420-423.

8. Круглов Є. М., Ярних Т. Г., Борщевський Г. І. Підтвердження стерилізуючої здатності фільтра стерильної фільтрації ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології* : матеріали III Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 24 берез. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 236-238.

9. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Використання оптичної Раманівської спектроскопії для встановлення включення пептидного комплексу у ліпосоми. *Scientific progress: innovations, achievements and prospects* : Proceedings of VIII International Scientific and Practical Conference, Munich, Germany, 1-3 May 2023. P. 84-86.

10. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Дослідження стабільності ліпосомального препарату на основі пептидного комплексу з шкіри свині у формі очних крапель. *Innovations and prospects in modern science* : Proceedings of V International Scientific and Practical Conference, Stockholm, Sweden, 8-10 May 2023. P. 80-82.

11. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Валідація методики кількісного визначення ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу із шкіри свині. *European scientific congress* : Proceedings of V International Scientific and Practical Conference, Madrid, Spain 12-14 June 2023. Madrid, 2023. P. 68-70.

12. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Оптимізація технології виготовлення стабільної ліпосомальної форми за допомогою прискореного дисперсійного аналізу аналітичним центрифугуванням. *Modern problems of science, education and society* : Proceedings of IV International Scientific and Practical Conference, Kyiv, Ukraine, 19-21 June 2023. Kyiv, 2023. P. 143-146.

13. Круглов Є. М., Борщевський Г. І., Ярних Т. Г. Оптимізація процесу стерильної фільтрації ліпосомальних очних крапель на основі пептидного комплексу *Theoretical foundations of scientists and modern opinions regarding the implementation of modern trends* : Proceedings of the XXV International Scientific and Practical Conference, San Francisco, USA, June 27–30, 2023. P. 309-311.

Продовж. дод. А

Апробація результатів дисертації

Основний зміст роботи викладено та обговорено на таких науково-практичних заходах різного рівня:

1. 15 Міжнародна конференція «*Science and society*» (Гамільтон, Канада, 8 листопада, 2019, форма участі – публікація тез).
2. III Міжнародна науково-практична конференція «*Society and science. problems and prospects*» (Лондон, Великобританія, 25–28 січня, 2022, форма участі – публікація тез).
3. III Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «*Проблеми та досягнення сучасної біотехнології*» (Харків, Україна, 24 березня, 2023, форма участі – публікація тез).
4. VIII науково-практична конференція «*Scientific progress: innovations, achievements and prospects*» (Мюнхен, Німеччина, 1-3 травня, 2023, форма участі – публікація тез).
5. V науково-практична конференція «*Innovations and prospects in modern science*» (Стокгольм, Швеція, 8-10 травня, 2023, форма участі – публікація тез).
6. V науково-практична конференція «*European scientific congress*» (Мадрид, Іспанія, 12-14 червня, 2023, форма участі – публікація тез);
7. IV науково-практична конференція «*Modern problems of science, education and society*» (Київ, Україна, 19-21 червня, 2023, форма участі – публікація тез);
8. XXV науково-практична конференція «*Theoretical foundations of scientists and modern opinions regarding the implementation of modern trends*» (Сан-Франциско, США, 27–30 червня, 2023, форма участі – публікація тез).

Додаток Б



(11) **152253**(19) **UA**

(51) МПК

A61K 9/127 (2006.01)**A61K 31/56 (2006.01)**(21) Номер заявки: **u 2022 00080**(22) Дата подання заявки: **10.01.2022**(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **12.01.2023**(46) Дата публікації відомостей про державну реєстрацію та номер Бюлетеня: **11.01.2023, Бюл. № 2**

(72) Винахідники:

**Гой Андрій Михайлович, UA,
Круглов Євген Михайлович,
UA,
Борщевський Геннадій Ілліч,
UA**

(73) Володілець:

**АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО
"ФАРМАК",
вул. Кирилівська, 63, м. Київ,
04080, UA**

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПОЗИЦІЇ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ТА РЕГЕНЕРУЮЧОЇ ДІЇ

(57) Формула корисної моделі:

1. Спосіб одержання фармацевтичної композиції протизапальної та регенеруючої дії на основі органотропних біорегуляторів, який включає депротейнізований концентрат екстракту з дермального шару шкіри свиней, який вводять в склад ліпосом, причому спочатку одержують депротейнізований концентрат шляхом охолодження дермального шару свинячої шкіри, подрібнення її, кислотної екстракції, ультрафільтрації та концентрації компонентів із молекулярною масою менше 5 кДа, потім одержують ліпосоми з розміром глобул 110-120 нм шляхом диспергації лецитину в воді для ін'єкцій екструзією при високому тиску, після чого в отриману суспензію ліпосом вводять депротейнізований концентрат екстракту шкіри свиней, одержаних на стадії ультрафільтрації, та проводять їх включення в ліпосоми екструзією при високому тиску, розчиняють в отриманій суспензії гліцин кристалічний, ЕДТА, натрію хлорид, кислоту хлористоводневу, натрію гідроксид і передають на стадію стерилізуючої фільтрації через стерильний фільтр з діаметром пор 0,2 мкм, асептично розливають у флакони із дозуючими пробками-крапельницями із мембраною або дозуючими пробками-крапельницями.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що суспензію ліпосом отримують шляхом рециркуляції суспензії крупних ліпосом через гомогенізатор великого тиску.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що проводять включення в ліпосоми шляхом рециркуляції суспензії крупних ліпосом через гомогенізатор великого тиску 20000 PSI.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що розчиняють в суспензії гліцин кристалічний, ЕДТА, натрію хлорид та корегують рН до 5,0-5,2 кислотою хлористоводневою та/або натрію гідроксидом.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що асептично розливають препарат у поліетиленові флакони по 5 мл та укупорюють пробками-крапельницями із мембраною або пробками-крапельницями.

(11) **152253**

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ Державна організація «Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій» (УКРНОІВІ)
Цей паперовий документ ідентичний за документарною інформацією та реквізитами електронному документу з електронним підписом уповноваженої особи Державної організації «Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій». Паперовий документ містить 2 арк., які пронумеровані та прошиті металевими люверсами. Для доступу до електронного примірника цього документа з ідентифікатором 0466100123 необхідно: 1. Перейти за посиланням https://sis.ukrpatent.org. 2. Обрати пункт меню Сервіси – Отримати оригінал документу. 3. Вказати ідентифікатор електронного примірника цього документа та натиснути «Завантажити».  Уповноважена особа УКРНОІВІ  І.Є. Матусевич 11.01.2023

Додаток В

ПУБЛІЧНЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "ФАРМАК"

Затверджую:

27.04.2019, Крамаренко О.В., Начальник ВСтаВП

27.04.2019, Костанда С.В., керівник технологічного департаменту

Протокол напрацювання дослідно-промислової
серії

до ДПА 64-00481198-056

на виробництво лікарського засобу

Концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней
+ Фосфатидилхолін

краплі очні

BRDP005078/1

Розроблено:

24.04.2019, Костюк Ю.В., Начальник дослідно-промислової ділянки

24.04.2019, Круглов Є.М., старший інженер-технолог

Узгоджено:

24.04.2019, Яковлева О.А., Начальник ЛАК ВКЯ

27.04.2019, Охотнікова Т.М., Провідний Інженер ВСтаВП

25.04.2019, Назаренко В.О., Начальник відділу підтримки виробництва

25.04.2019, Борщевський Г.І., Начальник лабораторії

24.04.2019, Щербина О.В., Старший інженер ВЗРВ



Продовж. дод. В

ПУБЛІЧНЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "ФАРМАК"

Затверджую:

24.04.2019, Крамаренко О.В., Начальник ВСтаВП

21.04.2019, Костанда С.В., керівник технологічного департаменту

Протокол пакування серії

до ДПА 64-00481198-056

на виробництво лікарського засобу

**Концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней
+ Фосфатидилхолін**

краплі очні

BRDP005081/1

Розроблено:

24.04.2019, Костюк Ю.В., Начальник дослідно-промислової дільниці

24.04.2019, Круглов Є.М., старший інженер-технолог

Узгоджено:

20.04.2019, Яковлева О.А., Начальник ЛАК ВКЯ

19.04.2019, Охотнікова Т.М., Провідний Інженер ВСтаВП

21.04.2019, Назаренко В.О., Начальник відділу підтримки виробництва

19.04.2019, Борщевський Г.І., Начальник лабораторії

19.04.2019, Щербина О.В., Старший інженер ВЗРВ



ЗАТВЕРДЖЕНО

Начальник ЛРТОП ДзБТ

Коноваленко В.А.



Заявник, країна	ПАТ «Фармак», Україна
Виробник, країна	ПАТ «Фармак», Україна

ПРОЕКТ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

**Концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри
свиней+Фосфатидилхолін краплі очні 0.05 мг/мл**

Додаток Г



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: фармацевтична розробка технології ліпосомальної форми очних крапель із репаративною та протизапальною дією на основі пептидного комплексу.

2. Установа, її адреса, виконавці: Акціонерне товариство «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, аспірант без відриву від виробництва Круглов Євген Михайлович.

3. Джерела інформації:

3.1. Eugene Kruglov, Tatyana Yarnykh, Gennady Borshchevsky, Olga Rukhmakova 2022 Development of the technology of a liposomal form of eye drops based on a peptide complex. Acta Poloniae harmaceutica (May 2021) 78(2):237-242.

3.2. Kruglov, E. and Borshchevsky, G. 2022. The use of modern QbD approaches in the pharmaceutical development of technology of liposomal eye drops. Annals of Mechnikov's Institute. 1 (Mar. 2022), 28–32.

3.3. Kruglov, E. M., & Borshchevskiy, G. I. (2022). Optimization of the method of concentration of extract of biologically active substances from the dermal layer of pig skin. Ukrainian Journal of Military Medicine, 3(1), 87-92.

4. Апробація. Проведено апробацію на промисловому виробництві препарату Ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу.

5. Термін апробації: 2019 рік.

6. Ефективність апробації: одержаний препарат пройшов дослідження на тваринах та підтвердив безпечність та специфічну фармакологічну репаративну і протизапальну активність.

Старший фахівець ЛРТФП ДзБТ АТ «Фармак»

Круглов Є.М.

Керівник Департаменту з біотехнологій АТ «Фармак»

Борщевська М.І.

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
операційний директор
АТ «Фармак»
Павлик П.М.
« 17 » грудня 2022 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

На базі АТ «Фармак» проведено дослідно-промислову апробацію та напрацювання серій для доклінічних досліджень препарату Ліпосомальні очні краплі на основі пептидного комплексу розроблено за участю відповідального старшого фахівця лабораторної розробки технологій фармацевтичних препаратів Департаменту з біотехнологій Круглова Євгена Михайловича.

Робота проведена у відповідності до планів інноваційного розвитку АТ «Фармак» та теми дисертаційної роботи «Розробка технології ліпосомальної форми очних крапель із репаративною та протизапальною дією на основі пептидного комплексу».

Старший фахівець ЛРТФП ДзБТАТ «Фармак»



Круглов Є.М.

Керівник Департаменту з біотехнологій
АТ «Фармак»



Борщевська М.І.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор
з наукової роботи та іноваций
Національного медичного
університету імені О.О. Богомольця
Дісен. н., проф. Земсков С.В.

2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Розробка технології та стандартизація ліпосомальної форми очних крапель репаративної дії на основі пептидного комплексу.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 53.; Виконавець: асп. Є.М. Круглов, к.фарм.н., доц. М.В. Буряк.
3. **Джерела інформації:**
 1. Круглов Є. М., Борщевський Г. І. Особливості процесу фільтрації ліпосомальної емульсії для виготовлення очних крапель на основі пептидного комплексу. Вісник фармації. 2023. - №1 (105). – С.19-22.
 2. Kruglov, E., Borshchevsky, G. The use of modern QbD approaches in the pharmaceutical development of technology of liposomal eye drops. Annals of Mechnikov's Institute. – 2022. - № 1. С. 28–32.
 3. Kruglov E., Yarnykh T., Borshchevsky G., Rukhmakova O. Development of the technology of a liposomal form of eye drops based on a peptide complex. Acta Poloniae harmaceutica. - 2021. – N 78(2). P. 237-242.
4. **Впроваджено:** в освітній процес на кафедрі аптечної та промислової технології ліків Національного медичного університету імені О.О. Богомольця у лекційний курс при вивченні теми «Стерильні лікарські форми», згідно протоколу № 3 від 23.01.2025 р.
5. **Термін впровадження:** 2024 - 2025 р.
6. **Ефективність впровадження:** оптимізація та удосконалення освітнього процесу. розширення інформації щодо фармацевтичної розробки, технології та стандартизації ліпосомальних лікарських форм. Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелі інформації. Результати наукових досліджень використовуються здобувачами вищої освіти у науковій роботі.

Відповідальний за впровадження:
Завідувачка кафедри аптечної та
промислової технології ліків,
д. фарм. н., проф.



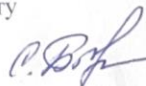
Жанна ПОЛОВА



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Розробка технології та стандартизація ліпосомальної форми очних крапель репаративної дії на основі пептидного комплексу.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 53; асп. Є.М. Круглов, к.фарм.н., доц. М.В. Буряк.
3. **Джерела інформації:**
 - 3.1. Круглов, Є. М., Борщевський, Г. І. Оптимізація методу концентрування екстракту біологічно активних речовин із дермального шару шкіри свиней. Український журнал військової медицини, 2022. № 3(1). С. 87-92.
 - 3.2. Kruglov, E., Borshchevsky, G. The use of modern QbD approaches in the pharmaceutical development of technology of liposomal eye drops. Annals of Mechnikov's Institute. 2022. № 1. С. 28–32.
4. **Впроваджено:** В освітній процес кафедри технології ліків і біофармації, зокрема у лекційний курс при вивченні дисципліни «Технологія лікарських засобів» та вибіркової дисципліни «Методологія наукових досліджень за темою магістерської роботи (технологія ліків)».
5. **Термін впровадження:** 2024/2025 н.р.
6. **Ефективність впровадження:** Запропонована технологія ліпосомальної форми очних крапель дозволить розширити асортимент очних лікарських засобів. Результати наукових досліджень впроваджено з метою вдосконалення та оптимізації навчального процесу, зокрема розширення інформації про розробку нових ліпосомальних лікарських форм.

Завідувач кафедри технології ліків і біофармації
Львівського національного медичного університету
імені Данила Галицького,
д. фарм. н., професор



Світлана БІЛОУС

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з навчальної роботи та
рекрутацій, к.філол.н., проф.
Волинського національного
університету
Ім. Лесі Українки

Юрій І. Ромик

«20» січня 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: Розробка технології та стандартизація ліпосомальної форми очних крапель репаративної дії на основі пептидного комплексу.

2. Установа, її адреса, виконавці: Національний фармацевтичний університет, кафедра аптечної технології ліків, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 53.; асп. С.М. Круглов, к.фарм.н., доц. М.В. Буряк.

3. Джерела інформації:

3.1. Круглов Є. М., Борщевський Г. І. Особливості процесу фільтрації ліпосомальної емульсії для виготовлення очних крапель на основі пептидного комплексу. Вісник фармації. 2023. №1 (105). С.19-22.

3.2. Kruglov, E., Borshchevsky, G. The use of modern QbD approaches in the pharmaceutical development of technology of liposomal eye drops. Annals of Mechnikov's Institute. 2022. № 1. С. 28–32.

3.3. Kruglov E., Yarnykh T., Borshchevsky G., Rukhmakova O. Development of the technology of a liposomal form of eye drops based on a peptide complex. Acta Poloniae Pharmaceutica. 2021. N 78(2). P. 237-242.

4. Впроваджено: в освітній процес на кафедрі фармації та фармакології Волинського національного університету імені Лесі Українки у лекційний курс при вивченні теми «Стерильні лікарські форми», згідно протоколу № 3 від 17.12.2024 р.

5. Термін впровадження: листопад 2024 р.

6. Ефективність впровадження: оптимізація та удосконалення освітнього процесу, розширення інформації щодо фармацевтичної розробки, технології та стандартизації ліпосомальних лікарських форм.

- Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелах інформації.
- Результати наукових досліджень використовуються здобувачами вищої освіти у науковій роботі.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедри фармації та фармакології
Волинського національного університету
імені Лесі Українки,
д. фарм. н., професорка



Мар'яна ФЕДОРОВСЬКА