

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО
ПРИМЕНЕНИЯ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Бурдаев Николай Игоревич

**Разработка и исследование лекарственной формы гефитиниба для
парентерального применения**

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств
3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук, профессор
Бунятян Наталья Дмитриевна

доктор фармацевтических наук
Шпрах Зоя Сергеевна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Рецептор эпидермального фактора роста как мишень для лекарственных средств для лечения немелкоклеточного рака легкого	13
1.2 Гефитиниб – ингибитор EGFR первого поколения	14
1.3 Наноструктурированные лекарственные формы гефитиниба	17
1.4 Липосомы как средство направленного транспорта лекарственных средств и современные методы их получения	30
1.4.1 Липосомы гефитиниба.....	35
1.5 Методы контроля качества липосом	37
1.5.1 Качественное и количественное определение липидов липосомальной оболочки.....	38
1.5.2 Количественное определение эффективности включения действующего вещества ...	41
1.5.3 Определение морфологии липосом.....	44
1.5.4 Изучение высвобождения инкапсулированного действующего вещества	48
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	52
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	54
2.1 Объект исследования, вспомогательные вещества, материалы и оборудование	54
2.2 Методы исследования.....	58
2.3 Дизайн исследования	61
.....	62
ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГЕФИТИНИБА.....	63
3.1 Выбор оптимального состава липосом гефитиниба	63
3.2 Разработка технологии получения липосомальной дисперсии гефитиниба	68
3.2.1 Получение дисперсии мультиламеллярных везикул.....	68
3.2.2 Получение малых однослойных везикул.....	70
3.2.3 Исследование стабильности дисперсии однослойных везикул гефитиниба.....	73
3.3 Разработка технологии получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гефитиниба	74
3.3.1 Выбор криопротектора для лиофилизации.....	75
3.3.2 Получение лиофильно высушенного лекарственного средства.....	77
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	82
ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГЕФИТИНИБА.....	84

4.1 Разработка методики количественного определения гефитиниба	84
4.2 Валидация методики количественного определения гефитиниба в липосомальной лекарственной форме	92
4.3 Определение однородности дозирования гефитиниба в лиофилизированной липосомальной лекарственной форме	97
4.4 Определение эффективности включения гефитиниба в липосомы	98
4.4.1 Определение включения гефитиниба в мультиламеллярные везикулы	98
4.4.2 Определение эффективности включения гефитиниба в малые однослойные везикулы	100
4.4.3 Эффективность включения гефитиниба в лиофилизированной липосомальной лекарственной форме	102
4.5 Исследование высвобождения гефитиниба из лиофилизированной липосомальной лекарственной формы <i>in vitro</i>	103
4.6 Изучение действия липосомальной лекарственной формы на выживаемость опухолевых клеток.....	108
4.7 Стандартизация лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гефитиниба и разработка спецификации нормативного документа по качеству готового продукта	109
4.8 Результаты исследования стабильности разработанного лекарственного средства	117
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	120
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	126
ПРИЛОЖЕНИЕ А	155
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	156
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	158
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	159

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) рак легкого является одним из самых распространенных злокачественных новообразований – ежегодно в мире регистрируют до 1,8 млн новых случаев. Кроме того, рак легкого является ведущей причиной смертности: в России от этого онкологического заболевания ежегодно умирает около 60 тысяч больных. Согласно статистическим данным 85–90% всех случаев рака легкого составляет немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Лекарственное лечение НМРЛ на сегодняшний день остается серьезной проблемой, особенно для пациентов с запущенными формами заболевания и пациентов старшего возраста.

При раке легкого часто выявляют изменения основных клеточных сигнальных и регуляторных путей вследствие гиперэкспрессии или генных мутаций. Поэтому для лечения рака легкого в настоящее время широко применяются таргетные препараты, прежде всего ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), который гиперэкспрессируется у 40-80% пациентов с НМРЛ. Ингибиторы тирозинкиназы EGFR блокируют пути передачи сигнала, участвующие в пролиферации и дифференцировке опухолевых клеток.

Первым представителем класса лекарственных средств (ЛС), действующих на тирозинкиназу EGFR, стал гефитиниб – низкомолекулярный селективный обратимый ингибитор тирозинкиназы EGFR, который блокирует фосфорилирование и активацию EGFR опухолевых клеток. Гефитиниб (ГФТ) применяют при распространенном или метастатическом НМРЛ. В практической онкологии используют таблетки ГФТ, покрытые оболочкой, 250 мг под торговым наименованием Иресса (АстраЗенека, Великобритания). Однако применение препарата ограничено низкой растворимостью ГФТ в воде и его медленной абсорбцией в желудочно-кишечном тракте при пероральном применении. Биодоступность препарата не превышает 60%, зависит от pH желудочно-

кишечного тракта и характеризуется большой индивидуальной изменчивостью. Высокое сродство ГФТ к белкам плазмы человека лимитирует его концентрацию в опухолевых тканях и, соответственно, терапевтическую эффективность. Кроме того, необходимость перорального приема высоких доз ГФТ вызывает выраженные побочные эффекты.

Таким образом, разработка лекарственной формы ГФТ, способной улучшить биофармацевтические характеристики лекарственного препарата, востребованного на фармацевтическом рынке, имеет высокую актуальность.

Степень разработанности темы

Для повышения биодоступности и избирательности действия ГФТ и уменьшения его воздействия на нормальные ткани попытки создания лекарственных форм (ЛФ) с контролируемым высвобождением и наноструктурированных ЛФ предпринимались рядом зарубежных исследователей (X. Zhou, 2012; J. Di, 2017; Y. Hu, 2020). В России липосомальные лекарственные формы (ЛЛФ) противоопухолевых соединений, в том числе лиофилизированные (ЛЛФ-лио) разрабатывались под руководством проф. Н.А. Оборотовой (2012, 2018), Е.Л. Водовозовой (2017, 2023) и др. Уникальные технологии получения ЛЛФ и сложные физико-химические свойства предъявляют особые требования к их качеству. Изучению аналитических характеристик липосом посвящены работы зарубежных (W.Chen, 2017; More M.P., 2020; S. Rohilla, 2022) и отечественных ученых (М.В. Дмитриева, 2018; И.М. Ле Дейген, 2020, 2023; Е.И. Каленикова, 2020, 2021; Биткина Т.А., 2022).

В данной работе представлены результаты технологических и аналитических исследований по разработке ЛЛФ-лио гефитиниба и методов ее аналитических исследований и контроля качества.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – разработка ЛЛФ-лио гефитиниба для парентерального применения и методов ее аналитических исследований и контроля качества.

Для достижения поставленной цели следовало решить следующие **задачи**:

1. На основании химико-фармацевтических и технологических исследований определить оптимальный состав стерически стабилизированной ЛЛФ гефитиниба.
2. Обосновать и разработать технологию (способ) получения ЛЛФ для парентерального введения, устойчивой при хранении.
3. Изучить физико-химические характеристики дисперсий мульти- и моноламеллярных липосом гефитиниба и ЛЛФ-лио.
4. Экспериментально обосновать показатели и нормы качества готового продукта – ЛЛФ-лио ГФТ.
5. Разработать и валидировать методики для контроля качества липосом ГФТ; изучить эффективность включения (ЭВ) ГФТ в липосомы и оценить характер его высвобождения из липосом.
6. Разработать лабораторный регламент (ЛР) получения ЛЛФ-лио.
7. Разработать спецификацию нормативного документа (НД) по качеству ЛЛФ-лио гефитиниба.

Научная новизна

Впервые:

- выбран оптимальный состав стерически стабилизированной ЛЛФ гефитиниба и обоснована технология ее получения, базирующаяся на модификации метода гидратации тонкой пленки;
- разработана технология получения инъекционной ЛЛФ гефитинаба, стабильной при хранении, с использованием лиофилизации;

- исследованы физико-химические характеристики дисперсий мульти- и моноламеллярных липосом; исследованы свойства полученного липосомального ЛС (размер липосомальных частиц и их распределение по размеру, заряд поверхности липосом) и определены критичные показатели для его качества, такие как количественное содержание инкапсулированного/неинкапсулированного действующего вещества (ДВ) и общее количество ДВ;
- разработаны и валидированы аналитические методики для исследований и контроля качества липосом ГФТ – количественного определения ГФТ и ЭВ гефитиниба в липосомы на различных стадиях технологического процесса (ТП), высвобождения ГФТ из липосом и определения остаточных органических растворителей (ООР) в ЛЛФ-лио и проведена стандартизация разработанного ЛС;
- подтверждена стабильность ЛЛФ-лио гефитиниба;
- обоснованы и разработаны лабораторный регламент получения ЛЛФ-лио гефитиниба и нормативный документ по качеству.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в обосновании возможности создания новой ЛЛФ гефитиниба, улучшающей биофармацевтические характеристики ЛС, в разработке и валидации аналитических методик контроля качества и стандартизации ЛЛФ-лио. Получены практические данные по биофармацевтическим и технологическим свойствам гефитиниба и ЛЛФ, оценена стабильность полупродукта и готового ЛС. Предложенные аналитические методики количественного определения и ЭВ гефитиниба в липосомальные частицы, высвобождения ГФТ из липосом, определения ООР могут использоваться в исследованиях ЛЛФ других противоопухолевых соединений. Экспериментально обоснованы критические показатели качества ЛЛФ гефитиниба. Показано, что полученные липосомы

соответствуют основным требованиям, предъявляемым к ЛС для парентерального применения. Разработана спецификация НД по качеству ЛЛФ-лио гефитиниба. Результаты представляют собой данные ранней фармацевтической разработки и являются основой для дальнейшего масштабирования, оптимизации и изучения свойств ЛЛФ.

Получен Акт апробации и внедрения аналитических методик контроля качества ЛС «Гефитиниб, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций, 2 мг» на производственной площадке ООО «ИИХР» (Акт внедрения № б/н от 16.11.2023 г.).

Материалы исследования апробированы и используются при разработке лабораторной технологии получения ЛЛФ противоопухолевых субстанций и методик их аналитических исследований в Научно-исследовательском институте экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России (Акт внедрения № б/н от 24.11.2023 г.).

Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертации внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Акт внедрения № б/н от 23.11.2023 г.).

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования представляют труды отечественных и зарубежных исследователей (G. Gregoriadis, A.D. Bangham, А.П. Каплуна, В.И. Швеца и др.). В исследованиях руководствовались требованиями Фармакопеи ЕАЭС (Ф ЕАЭС), Государственной Фармакопеи Российской Федерации XV издания (ГФ РФ), ведущих зарубежных фармакопей, нормативно-правовыми актами РФ и ЕАЭС, а также руководствами ICH и FDA. В процессе разработки был проведен литературный и патентный поиск.

В исследованиях использовали современные технологические методы получения ЛЛФ (метод Бэнгхема, лиофилизация) и аналитические методы (УФ-спектрометрия, газо-жидкостная хроматография (ГЖХ), метод динамического светорассеяния (ДСР), МТТ-тест для определения цитотоксической активности. При выполнении работы использованы методы документального анализа; статистические методы анализа и обработки результатов. Экспериментальные исследования выполнены на сертифицированном оборудовании: установка сублимационной сушки Edwards Minifast DO.2, Ero Electronic S.p.A., Италия), дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern, Великобритания), газовый хроматограф Agilent 6890N (Agilent Inc., США), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия) и др.

Объекты исследования – противоопухолевое ЛС гефитиниб и модель ЛЛФ для парентерального применения на его основе.

Предмет исследования – технологический процесс получения и ЛЛФ-лио гефитиниба, аналитические методики контроля качества ЛЛФ гефитиниба.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Результаты выбора оптимального состава стерически стабилизированной ЛЛФ-лио гефитиниба на основании технологических и химико-фармацевтических исследований.
2. Технология получения ЛЛФ для парентерального введения, устойчивой при хранении.
3. Результаты исследования физико-химических свойств дисперсий мульти- и моноламеллярных липосом и ЛЛФ-лио гефитиниба.
4. Показатели качества готового продукта – ЛЛФ-лио гефитиниба.
5. Валидированные методики для контроля качества и аналитических исследований ЛЛФ-лио гефитиниба; результаты изучения ЭВ гефитиниба в липосомы и его высвобождения из липосом.
6. Лабораторный регламент получения ЛЛФ-лио гефитиниба.

7. Спецификация НД по качеству ЛЛФ-лио гефитиниба.

Степень достоверности результатов

Достоверность и объективность результатов работы подтверждается большим объемом экспериментальных исследований, проведенных на современном поверенном оборудовании с использованием высокочувствительных методов и программного обеспечения. Достоверность полученных результатов подтверждена статистической обработкой данных. Разработанные методики валидированы в соответствии с требованиями ГФ РФ. Проведен анализ достаточного объема отечественных и зарубежных литературных источников. Общие выводы отражают полученные результаты исследований и соответствуют поставленной цели и задачам.

Апробация результатов

Основные положения и результаты работы представлены на Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (11-13 апреля 2023, г. Москва), XVII Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (20-21 апреля 2023, г. Москва). Апробация результатов диссертации состоялась на объединенной научно-методической конференции кафедр фармации, фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, химии, фармацевтической технологии, промышленной фармации, фармакологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и сотрудников ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (протокол №1 от 11.01.2024 г.).

Личный вклад автора

Автором самостоятельно осуществлен выбор актуального научного направления исследований, поставлены цели и определены задачи диссертационного исследования; разработан дизайн исследования, определены необходимые экспериментальные исследования в рамках выполнения поставленных задач. Диссертантом лично проведен выбор состава и разработана технология получения инновационной ЛЛФ гевитиниба, разработаны и валидированы аналитические методики и проведены исследования химико-фармацевтических и фармацевтико-технологических характеристик полученного ЛС. Автором проведен анализ и статистическая обработка полученных результатов, сформулированы основные выводы научного исследования и рекомендации по его дальнейшему развитию. Полученные автором научные результаты изложены и обобщены в виде научных статей, диссертации и автореферата.

Соответствие паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств, а именно пунктам 2, 3, и специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пунктам 2, 3.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертация выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и является фрагментом исследования по комплексной теме «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01.2.012.61653).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 6 работ, в том числе 2 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий РУДН/Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 2 статьи в издании, индексируемом в международной базе Scopus; 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 160 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, экспериментальной части, общих выводов, списка литературы, включающего 224 источника, в том числе 200 зарубежных, и приложений. Работа проиллюстрирована 21 рисунком и 31 таблицей.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Рак легкого – одна из самых распространенных форм злокачественных новообразований, которой в России ежегодно заболевают более 60 тыс. человек, при этом рак легкого является основной причиной смерти у мужчин [22; 155]. Около 85–90 % всех случаев рака легкого составляет НМРЛ [213].

Лечение пациентов с НМРЛ представляет одну из наиболее сложных проблем в клинической онкологии и, в основном, заключается в хирургическом (на ранних (I-II) стадиях) или лекарственном лечении [153].

До недавнего времени химиотерапия первой линии у больных НМРЛ базировалась на применении комбинаций на основе производных платины. Это позволило увеличить эффективность лечения, которая, однако, лимитировалась серьезными побочными эффектами цитотоксических препаратов [204].

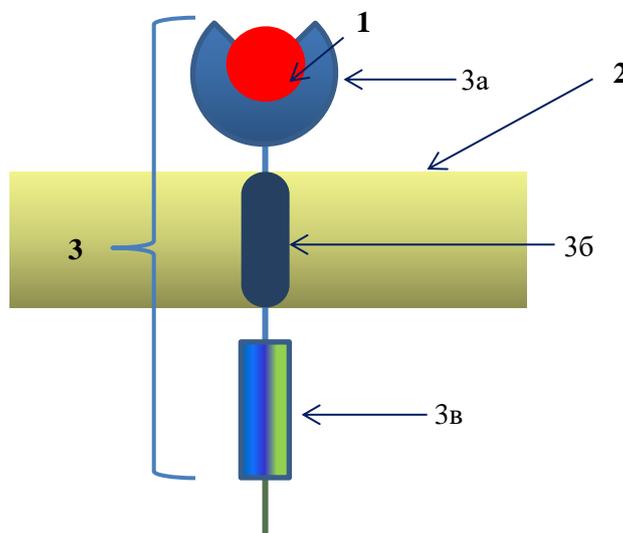
Революцию в терапии НМРЛ произвела разработка и клинические исследования лекарственных средств (ЛС), нацеленных на EGFR [15; 80].

1.1 Рецептор эпидермального фактора роста как мишень для лекарственных средств для лечения немелкоклеточного рака легкого

EGFR представляет собой трансмембранный белок, который является членом семейства рецепторов тирозинкиназ ErbB [107; 209]. EGFR состоит из трех субъединиц: первая — внеклеточный EGF-связывающий домен, второй — трансмембранный гидрофобный домен, а третий — внутриклеточный (цитоплазматический) тирозинкиназный домен, в свою очередь включающий две субъединицы: домен протеинтирозинкиназы (РТК) и домен С-концевого фосфорилирования (Рисунок 1) [11; 125].

EGFR при его активации индуцирует дифференцировку и пролиферацию клеток посредством связывания одного из своих лигандов. При связывании рецептор-лиганд на поверхности клетки происходит активация тирозинкиназы во внутриклеточном домене рецептора и фосфорилирование ряда внутриклеточных

субстратов, которые активируют сигнальные пути, определяющие процессы синтеза ДНК, пролиферации и дифференцировки клеток и экспрессию ряда онкогенов [32].



1 – EGF, 2 – клеточная мембрана; 3 – EGFR: 3а – внеклеточный EGF-связывающий домен, 3б – трансмембранный домен, 3в – внутриклеточный (цитоплазматический) тирозинкиназный домен

Рисунок 1 – Структура EGFR (адаптировано из [101])

Мутации гена EGFR вызывают изменения его строения и функций и нарушают нижестоящие сигнальные механизмы, что приводит к бесконтрольному делению опухолевых клеток [99].

Для лечения пациентов, несущих мутации гена EGFR, наиболее эффективны ЛС – ингибиторы EGFR [40].

1.2 Гефитиниб – ингибитор EGFR первого поколения

История применения таргетных препаратов для лечения НМРЛ началась с клинических исследований низкомолекулярного ингибитора EGFR гефитиниба, который одобрен для лечения НМРЛ в 2003 году [86]. В 2015 году FDA уточнило показания к применению ГФТ и одобрило препарат для лечения метастатического НМРЛ у пациентов с мутацией EGFR [84].

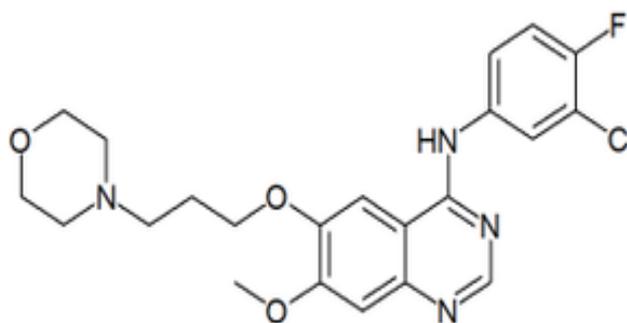


Рисунок 2 – Гефитиниб [7]

Химическое название – N-(3-Хлор-4-фторфенил)-7-метокси-6-(3-(4-морфолин)пропокси)-4-хиназолинамин

Эмпирическая формула – $C_{22}H_{24}ClFN_4O_3$

Молекулярная масса – 447

Гефитиниб – производное анилинхиназолина – селективный ингибитор EGFR-тирозинкиназы первого поколения, который блокирует фосфорилирование и активацию EGFR опухолевых клеток (Рисунок 2) [96; 97].

В литературе представлено несколько методов синтеза ГФТ [49], среди которых наиболее опциональным является метод, предложенный S.K. Kang с коллегами [172].

Основные физико-химические свойства ГФТ подробно описаны в *ГЛАВЕ 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ*.

Гефинитиб (ZD1839) – ингибитор активности тирозинкиназы EGFR, способный связываться с внутриклеточным доменом рецептора. ГФТ предотвращает димеризацию рецептора с другими EGFR человека и аутофосфорилирование внутриклеточного тирозинкиназного домена, что блокирует активацию нижестоящей передачи сигналов. Кроме того, блокируя EGFR, ГФТ индуцирует арест клеточного цикла в фазе G1 ряда культур опухолевых клеток человека [55; 198; 211].

In vitro ингибирующее действие ГФТ продемонстрировано на широком спектре опухолевых клеток человека, экспрессирующих функциональные EGFR, включая рак простаты, рак молочной железы, рак матки, рак толстой кишки и НМРЛ. Так, ГФТ ингибировал аутофосфорилирование EGFR, выделенного из

клеток аденокарциномы вульвы A431, с IC50 0,023 – 0,079 нмоль/л. D. Kitagawa с соавторами показали, что для проявления ингибирующей активности в отношении других 310 изученных тирозинкиназ требовались концентрации ГФТ в 100 и более раз выше (IC50 от 0,40 до 510 нмоль/л) [25], а D. Brehmer выявил, что ГФТ способен ингибировать серин/треонинкиназы RICK и GAK (IC50 = 50 и 90 нмоль/л соответственно) [48]. МТТ-тестом показана активность ГФТ в отношении чувствительных и резистентных клеточных линий НМРЛ РС9, А549, Н522 и других и установлены значения IC50 в диапазоне от 4 до 42 мкМ [195].

In vivo у мышей-nude, несущих ксенографты рака толстой кишки GEO, наблюдали дозозависимое ингибирование роста опухоли при применении ГФТ в режиме монотерапии – торможение роста опухоли (ТРО, %) достигло 100 % при применении ГФТ в дозе 5 мг/день, при этом у животных, получавших ГФТ, наблюдали увеличение продолжительности жизни. Введение ГФТ в дозе 2,5 мг/день вызывало примерно ТРО=50 % через 4 недели лечения, доза хорошо переносилась. Комбинированное введение ГФТ и максимально переносимых доз паклитаксела, топотекана или ралтитеркседа в течение 4 недель мышам-nude с ксенографтами GEO приводило к существенному торможению роста опухоли; режимы хорошо переносились и не ассоциировались с неожиданной или чрезмерной токсичностью. Тем не менее, вскоре после прекращения лечения опухоли GEO возобновили прежнюю скорость роста. Увеличение продолжительности жизни было наиболее выраженным у животных, получавших паклитаксел и ГФТ [89].

Рандомизированные *клинические исследования* продемонстрировали ответ опухолей на лечение и уменьшение симптомов заболевания, что послужило основанием для регистрации гефитиниба FDA для лечения пациентов с распространенным и метастатическим НМРЛ [86]. Следует отметить, что в исследованиях включали пациентов без предварительной оценки молекулярно-генетических характеристик опухоли [2]. В последующих клинических исследованиях показан более выраженный противоопухолевый эффект у пациентов с мутацией в структуре гена EGFR [74].

На фармацевтическом рынке ГФТ представлен оригинальным лекарственным препаратом Иресса® (Астра Зенека ЮК Лимитед, Великобритания) и рядом воспроизведенных препаратов [21]. Иресса® – круглые двояковыпуклые таблетки покрытые оболочкой 250 мг, с надписью “IRESSA 250” на одной стороне и разделительной меткой – на другой.

Препарат присутствует на российском рынке более 10 лет и подтвердил свою эффективность не только в многочисленных клинических исследованиях, но и в реальной клинической практике: Ирессу® применяют в качестве терапии первой линии для лечения пациентов с НМРЛ с наличием мутаций тирозинкиназного домена EGFR.

Однако эффективность терапии ограничена медленной абсорбцией ГФТ в желудочно-кишечном тракте при пероральном применении [167], поскольку биодоступность ГФТ составляет около 60 %, зависит от pH желудочно-кишечного тракта и характеризуется большой индивидуальной изменчивостью у онкологических больных [96; 113]. Препарат вызывает целый ряд побочных реакций, таких как диарея, тошнота и рвота [224].

Кроме того, поскольку Иресса® в качестве вспомогательного вещества содержит 163,5 мг лактозы (как моногидрата), препарат нельзя применять у пациентов с редкими наследственными проблемами непереносимости галактозы, общей недостаточностью лактазы или нарушением всасывания глюкозы-галактозы.

1.3 Наноструктурированные лекарственные формы гефитиниба

Для повышения биодоступности и избирательности действия ГФТ и уменьшения его воздействия на нормальные ткани многими исследователями предприняты попытки создания лекарственных форм ГФТ с контролируемым высвобождением. В научной литературе описан целый ряд таких лекарственных форм и методов их получения [119; 151]:

- наночастицы [60; 120], в том числе полимерные [66; 103];

- твердые дисперсии (ТД) [91; 159], включая микрочастицы, полученные при распылительной сушке ТД [160];
- липосомы [78; 161; 175; 190];
- мицеллы, образованные ПЭГирированным иммуностимулирующим наноносителем [61];
- микросферы ГФТ [63; 73] и полиуретановые пены, содержащие микросферы ГФТ [82];
- твердые липидные наночастицы [126; 158; 176];
- наноструктурированные липидные носители (НЛН) [148; 149; 189; 200];
- наносуспензии [106; 178];
- наноэмульсии [90; 194].

Основные характеристики наноструктурированных ЛФ ГФТ, описанных в научной литературе, представлены в Таблице 1.

V. Jeannot с коллегами получали большие однородные полимерные наночастицы ГФТ сферической формы размером около 30 нм методом замещения растворителя (нанопреципитации), описанным в [208]. Наночастицы медленно высвобождали ГФТ, что приводило к торможению роста клеток A549, H358 и H322 в культурах *in vitro*. Внутрилегочное введение полученных полимерных наночастиц ГФТ *in vivo* позволяло избежать возможной гепатотоксичности и продемонстрировало более сильное торможение роста опухолей легкого по сравнению со свободным ГФТ [120].

Для создания системы ЛС-полимер для последовательной доставки ГФТ и Доксорубицина (Докс) для лечения рака молочной железы Z. Zhou также использовал метод нанопреципитации.

Таблица 1 – Наноструктурированные лекарственные формы gefitinib

Состав	Характеристика				Литературная ссылка
	Размер частиц, нм	Индекс полидисперсности	Эффективность включения, %	ζ-потенциал, мВ	
1	2	3	4	5	6
Наночастицы					
Сополимер гиалуронана и поли(γ-бензил-L-глутамата)	30/300				[120]; [208]
Дох-конъюгированный поли(1-лактид)-блок-полиэтиленгликоль	30-40		Около 90		[60]
Растворимый крахмал сшитый с NaTPP, полисорбат 80, натрия триполифосфат	76	0,943	93,7		[98]
Хитозан, NaTPP, трегалоза (криопротектор)	79,4	0,349	82,05		[103]
Полоксамер 407/PLGA, хитозан, конъюгированный с фолиевой кислотой, карбоксиметил β-глюкан	255,4±4,5	0,25±0,09	95,57±1,33	+3,75±1,85	[159]
<i>Твердые дисперсии</i>					
Поли(ε-капролактон)-поли(этиленгликоль)-поли(ε-капролактон), синтезированный авторами	17,2	0,15	92,2	-21,8	[159]
Хитозан, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилциклодекстрин, янтарная кислота, витамин E TPGS и полисорбат-80	4,76 мкм		98,37		[160]
Наносуспензия					
Eudragit® RL100, поливиниловый спирт PVA (Мм 13000), поливинилпирролидон PVP K30 (Мм 40000)	248,2	0,391	87,74	-5,62	[178]
Полисорбат 80, олигомер (дендритный липопептид на основе L-глутаминовой кислоты), синтезированный авторами	337,1		60,67	-23,8	[106]
Твердые липидные наночастицы					
Плюроник® F127, лецитин, ПЭГ-2000, стеариновая кислота, холестерин, глюкозамин, маннит/лактоза как криопротектор	187,23±14,08	0,28±0,02	97,31±0,23 %	-15,53±0,47	[176]
Новый липид Lipoid S PC-3, полوكсамер 407	178 ± 10	0,270	>92	-25,2	[158]

Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Наноструктурированные липидные носители					
Трилаурин, α -токоферол, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DSPC), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE-PEG-2000), <u>гормон, стимулирующий высвобождение лютеинизирующего гормона</u>	149.00 \pm 1.03	0.216 \pm 0.019	90.54 \pm 5.48 %	-15,2	[148]
Стеариновая кислота, кунжутное масло, натрия лаурилсульфат, полисорбат-80	74.06 \pm 9.73	0.339 \pm 0.029	99.76 \pm 0.015	- 42,7	[149]
Наноэмульсия					
Олеиновая кислота, полисорбат 80, ПЭГ400	55,25 \pm 0,45		99.88 \pm 0.12	-38,18	[193]
ГФТ-фосфолипид-90G, капроил 90, этоксиdigликоль (Transcutol HP), полисорбат 80	165.6 \pm 0.98	0,269 \pm 0.54		- 34.9 \pm 2.9	[90]
Мицеллы					
PEG5k-Fmoc-NLG919	191,8				[61]
Микросферы					
PLGA	59 мкм		70		[73]
PLLA	2.48 мкм		94,91		[63]
Полиуретановая пена, содержащая микросферы ГФТ					
PLGA сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты, полиуретан	50–100 мкм		От 86 – 99		[82]
Нанопузырьки					
β -циклодекстрин, PEG-2000				85	[62]
Нанолисты					
Графит (нанолисты оксида графена)	238	0,287	78	-33,3	[156]
Липосомы					
Лецитин, Хол	190	0,248	60,3	-8,91	[95]
Соевый лецитин, Хол	69,8 \pm 2,6	0,35 \pm 0,04		-9,7 \pm 0,73	[56]

Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Соевый лецитин, Хол, mPEG2000-DSPE, гидроксипропил- β -циклодекстрин	155,4 \pm 14,9	0,047 \pm 0,026	85,5 \pm 1,2	-17,9 \pm 1,8	[161]
DSPC, холестерин, DSPE-PEG2000-малеимид, модифицированный альфа-спиральным клеточно-проникающим пептидом	147	0,10	86,7	-3,4	[78]
DSPE, DSPE-PEG-2000 и Хол			86,7		[69]
Соевый лецитин, Хол, хитозан, полисорбат 80	132,7 \pm 4,56	0,378	88,46 \pm 0,97	23,7 \pm 0,03	[190]
Соевый лецитин, Хол, полисорбат 80 (модифицированный состав)	99,88	0,378	88,91 \pm 0,67	-7,68	[175]

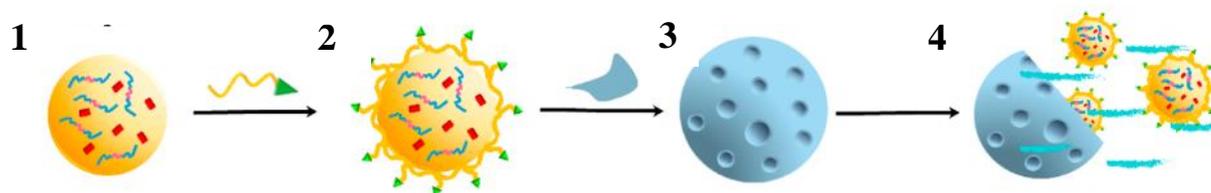
Источник: составлено автором

При этом комплекс ГФТ+диолеоилфосфатидная кислота (DOPA) инкапсулировали в наночастицу Докс-конъюгированного с поли(1-лактид)-блок-полиэтиленгликолем (PLA-b-PEG). Эффективность включения ГФТ составила около 90 %. Система наночастиц продемонстрировала последовательное высвобождение ГФТ и Докс, а противоопухолевая активность полученной системы на клеточной линии аденокарциномы легкого A549 была в 3 раза выше по сравнению с контрольной группой, в которой исследовали конъюгат Докс-PLA-PEG. Высокое накопление системы наночастиц в опухоли подтверждено *in vivo* с помощью неинвазивной флуоресцентной визуализации [60].

H. Amin с коллегами для получения наночастиц, нагруженных ГФТ, использовал растворимый крахмал, сшитый с натрия триполифосфатом (NaTPP), и полисорбат 80 и метод нанопреципитации «для превращения плохо растворимого, плохо всасываемого, высокотоксичного ГФТ в более водорастворимый, более всасываемый, а также более безопасный и эффективный противоопухолевый препарат» [98]. Авторами показано, что наночастицы ГФТ различного состава (с различным соотношением крахмала, натрия триполифосфата и полисорбата 80) имеют более высокий % высвобождения – от 62 до 99 % через 60 мин по сравнению со свободным ГФТ – 40 за тот же период. Чрезвычайно важно, что клетки аденокарциномы легкого A542 захватывают более чем в два раза больше ГФТ из наночастиц ($3,976 \pm 0,14$ мкг/мл), по сравнению с чистым ГФТ ($1,777 \pm 0,1$ мкг/мл).

Исследователи под руководством *M. Gupta* использовали метод ионного гелеобразования для получения полимерных наночастиц, нагруженных ГФТ, изменяя концентрацию хитозана и концентрацию и объем NaTPP. При лиофилизации полученных частиц в качестве криопротектора применяли трегалозу. Оптимальные характеристики получены для состава, рассчитанного с применением математических моделей и полученного с использованием 0,1 % хитозана и 8 мл 0,4 % NaTPP (Таблица 1). Высвобождение ГФТ из наночастиц в фосфатном буфере pH 6,8 составило 40,8 % в течение 24 часов [103].

В [66] представлены результаты одной из последних разработок наночастиц ГФТ. Авторы разработали мультифункциональную систему для адресной доставки ГФТ в опухоль легкого: на первом этапе методом выпаривания растворителя из двойной эмульсии получали наночастицы на основе полуксамера 407/PLGA, нагруженные ГФТ. На следующей стадии полученные наночастицы покрывали хитозаном, конъюгированным с фолиевой кислотой, и полученные наночастицы затем инкапсулировали в микрокапсулы из карбоксиметил β -глюкана (Рисунок 3). Полученные частицы имели диаметр около 255 нм, индекс полидисперсности (polydispersity index, PDI) $0,25 \pm 0,09$, ζ -потенциал +3,75 мВ, а эффективность включения ГФТ превысила 95 % (Таблица 1). Установлено, что после гидратации система быстро диссоциирует на первичные частицы. Исследование *in vitro* показало, что система пролонгированно высвобождает ГФТ в зависимости от pH и индуцирует более высокий цитотоксический эффект по сравнению со свободным ГФТ. IC50 в клетках аденокарциномы легкого A549 была в 3,82 раза ниже, чем для свободного ГФТ [66].



1 – наночастицы ГФТ/П407/PLGA; 2– наночастицы, покрытые хитозаном, конъюгированным с фолиевой кислотой; 3 – микрокапсулы карбоксиметил β -глюкана, содержащие наночастицы, полученные на этапе 2; 4 – результат гидратации

Рисунок 3 – Схема получения мультифункциональной системы
(адаптировано из [66])

Одной из наиболее успешных стратегий повышения растворимости и высвобождения ЛС, мало растворимых в воде, является метод ТД [122]. ТД ГФТ могут быть получены различными способами – сверхвысокочастотное облучение, метод сплавления (традиционный метод), метод испарения растворителя и др. [91; 159; 160]. Частицы, полученные методом ТД, имеют ряд преимуществ в качестве

носителей для доставки ЛС, включая уменьшение размера частиц на молекулярном уровне, увеличение пористости, улучшение смачиваемости и преобразование кристаллической формы ЛС в аморфные формы [122]. Благодаря относительной простоте, низкой стоимости и возможности масштабирования широкое распространение приобрела распылительная сушка ТД. В общем виде технологический процесс распылительной сушки ТД можно представить в виде следующей последовательности операций: исследуемое ЛС диспергируют в растворе с использованием различных полимеров, растворителей и соразтворителей. Затем жидкую композицию распыляют и впрыскивают в сушильную камеру, где капли высушиваются нагретым воздухом. Этот процесс можно оптимизировать и использовать для получения ТД различных составов [217].

Научной группой *C. Godugu* методом распылительной сушки ТД получены модели ЛФ ГФТ, включавшие в состав хитозан, гидроксипропилметилцеллюлозу (Hydroxypropylmethylcellulose, НРМС), гидроксипропилциклодекстрин (Hydroxypropyl β -cyclodextrin, НР β -CD), янтарную кислоту, витамин Е ТPGS и полисорбат-80. Методом электронной микроскопии показано, что полученные микрочастицы имели размер от 1 до 10 мкм (средний размер частиц – 4,76 мкм), эффективность включения ГФТ составила 98,37 %. На культуре клеток эпидермоидной аденокарциномы легкого А431 полученная модель ЛФ продемонстрировала дозависимую и времязависимую цитотоксичность, эквивалентную свободному ГФТ. В исследованиях пероральной биодоступности *in vivo* модель ЛФ проявила увеличение пероральной абсорбции в 9,1 раз по сравнению со свободным ГФТ, при этом размер опухоли уменьшился в 1,5 раза [160].

Принято считать, что модификация сильной гидрофобности и плохой биодоступности ГФТ может не только усилить его противоопухолевое действие, но и уменьшить побочные эффекты. В исследовании [159] авторы синтезировали поли(ϵ -капролактон)-поли(этиленгликоль)-поли(ϵ -капролактон) (РСЕС) и методом ТД получали наночастицы, содержащие ГФТ, которые лиофилизировали. Частицы

оптимального состава были монодисперсными ($PDI = 0,150$), имели сферическую форму и размер около 17 нм, ζ -потенциал составлял -21 мВ, содержание ГФТ и эффективность включения составляли более 9 % и 92%, соответственно. Лиофилизат легко регилратировался, но ГФТ высвобождался из наночастиц медленно (около 80 % ГФТ в течение 5 дней без взрывного эффекта). Результаты изучения цитотоксичности показали, что ингибирование роста клеток аденокарциномы легкого А549, вызванное свободным ГФТ и нанокапсулами, зависело от дозы и времени – IC_{50} составило 29,03 и 37,8 мкг/мл через 24 часа для свободного и инкапсулированного ГФТ, соответственно. В опытах *in vivo* нанокапсулы усиливали противоопухолевое действие, уменьшали побочные эффекты и значительно увеличивали продолжительность жизни экспериментальных животных по сравнению со свободным ГФТ.

В настоящее время все большее внимание привлекают твердые липидные наночастицы (ТЛН, *solid lipid nanoparticles, SLN*), поскольку ЛС на их основе обладают высокой биосовместимостью и меньшей токсичностью, и благодаря лучшему клеточному захвату – более выраженным цитотоксическим эффектом [126].

N. Satari с коллегами разработали ЛФ для ингаляции, содержащую ТЛН гевитиниба, конъюгированные с глюкозамином (ГФТ-ТЛН). ГФТ-ТЛН получали методом диффузии растворителя в среде сложной эмульсии типа вода-масло-масло с последующим выпариванием растворителя. Основные характеристики ГФТ-ТЛН приведены в Таблице 1. *In vitro* ГФТ-ТЛН продемонстрировали высокий противоопухолевый эффект на культуре клеток аденокарциномы легкого А549 по сравнению со свободным ГФТ. Кроме того, показаны подходящие аэродинамические свойства полученных микрочастиц – среднемассовый аэродинамический диаметр 4,48 мкм, доля мелких частиц составила 44,41 % [176].

Индийские исследователи получили ГФТ-ТЛН на основе нового липида *Lipoid S PC-3*, представляющего собой гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин, и сурфактанта (полосамера 407), используя модифицированный метод горячей гомогенизации (Таблица 1). Высвобождение

ГФТ *in vitro* имело взрывной характер на первоначальном этапе (25 % ГФТ высвобождалось в течение 2 часов) с последующим постепенным равномерным высвобождением (>90%) в течение 72 часов. Изучение цитотоксичности ГФТ-ТЛН на культуре клеток рака молочной железы человека MCF-7 *in vitro* показало более высокую противоопухолевую активность по сравнению со свободным ГФТ (65% и 90% жизнеспособных клеток, соответственно). Исследования распределения ГФТ в тканях *in vivo* продемонстрировали очень высокую концентрацию ЛС ($28\,930 \pm 91$ нг) и меньшую концентрацию в головном мозге (7042 ± 62 нг) ($p < 0,05$). ГФТ-ТЛН были стабильны в условиях ускоренного старения ($40 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5$ % относительной влажности) и при хранении в холодильной камере ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) в течение 3 месяцев [158].

Наноструктурированные липидные носители (НЛН) представляют собой систему, в которой часть твердых липидов заменена маслом. Такая неструктурированная, менее упорядоченная липидная матрица может улучшать эффективность загрузки ЛС и препятствовать их выщелачиванию и окислению во время хранения. При комнатной температуре и температуре тела НЛН существуют в виде твердой липидной матрицы [200]. НЛН подходят для контролируемой доставки ЛС, улучшают растворимость гидрофобных субстанций, а за счет модификации поверхности НЛН можно достичь специфического таргетирования и преодолеть лекарственную устойчивость при химиотерапии НМРЛ [189].

J. Majumder и *T. Minko* получили ГФТ-НЛН методом ультразвукового диспергирования, используя трилаурин в качестве твердого липида, α -токоферол как жидкий липид, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DSPC) как эмульгатор и полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE-PEG-2000) в качестве сурфактанта и гормон, стимулирующий высвобождение лютеинизирующего гормона как нацеливающий фрагмент. Характеристики полученных ГФТ-НЛН Эффективность включения ГФТ превышала 90 % ($90,54 \pm 5,48$ %) и практически не изменялась в течение 2 месяцев. ГФТ-НЛН продемонстрировали 5-10-кратное повышение противоопухолевой активности *in*

in vitro на ряде культур клеток рака легкого человека A549, PC-9, PC-9GR и H-1975 по сравнению со свободным ГФТ [148].

ГФТ-НЛН, полученные методом горячей гомогенизации, включали два липида – твердый (стеариновую кислоту) и жидкий (кунжутное масло) и два сурфактанта (полисорбат 80 и/или лаурилсульфат натрия). Средний размер частиц таких НЛН составил $74,06 \text{ нм} \pm 9,73 \text{ нм}$, PDI – 0,339, ζ -потенциал – 42,7 мВ, а эффективность включения $99,76 \pm 0,015 \%$ (Таблица 1). Исследование *in vitro* в МТТ-тесте на клетках рака толстой кишки НСТ 116 показало, что цитотоксичность ГФТ-НЛН в 4,5 раза выше по сравнению с свободным ГФТ (IC₅₀ 4,642 мкМ и 20,88 мкМ, соответственно) [149].

Наносуспензию ГФТ получали, используя Eudragit® RL100, поливиниловый спирт PVA (Мм 13000) и поливинилпирролидон PVP K30 (Мм 40000), методом выпаривания растворителя применяя гомогенизацию и обработку ультразвуком [178]. Применение подхода Качество посредством дизайна позволило получить оптимизированную модель ЛФ с включением ГФТ более 80% (Таблица 1). Исследование методом атомно-силовой спектроскопии показало сферическую форму полученных частиц наносуспензии. Но, несмотря на то, что биодоступность ГФТ в наносуспензии была в 1,8 раза выше, чем для дисперсии свободного ГФТ, ЛС не продемонстрировало цитотоксичности на культуре почки африканской зеленой мартышки *in vitro* [178].

N. Hegde и K. Juve также получали наносуспензии ГФТ методом выпаривания растворителя, используя в качестве ВВ полисорбат 80 и олигомер (дендритный липопептид на основе L-глутаминовой кислоты), синтезированный авторами [106]. При этом получали термодинамически стабильную наносуспензию с фармацевтико-технологическими характеристиками, представленными в Таблице 1. Дополнительные исследования показали, что при pH 6,8 и pH 7,4 за 3 часа высвобождается более 40 % ГФТ в отличие от 5 % – из дисперсии свободного ГФТ. Дополнительно на клеточных линиях аденокарциномы легкого A549, карциномы шейки матки SiHa и глиобластомы U87 показана биосовместимость и нереактогенность синтезированного олигомера [106].

Используя метод спонтанного эмульгирования, *S.K. Savale* получил наноэмульсию ГФТ. Наноэмульсия включала олеиновую кислоту как масляную фазу, полисорбат 80 в качестве сурфактанта и ПЭГ400 в качестве сурфактанта и стабилизатора. Размер частиц полученной наноэмульсии составил $55,25 \pm 0,45$ нм, а ζ -потенциал $-38,18$ мВ; содержание ГФТ превышало 99% (Таблица 1) [194].

В исследовании, описанном в [90], реализована стратегия получения двухкомпонентного препарата: сначала методом выпаривания растворителя получали комплекс ГФТ-фосфолипид-90G, продемонстрировавший при pH 1,2 улучшенное высвобождение ГФТ за счет комплексообразования. Затем комплекс включали в наноэмульсию, состоящую из капроила 90 (масло), этоксидигликоля (Transcutol HP) и полисорбата 80 (поверхностно-активные вещества, ПАВ). Состав был оптимизирован с использованием программного обеспечения Vox-Behnken design и охарактеризован *in vitro* (Таблица 1). Исследование высвобождения ГФТ *in vitro* при pH 7,4 показало, что в течение 8 ч из наноэмульсии высвобождается около 60 % ГФТ, затем в течение 24 часов наблюдали замедленное высвобождение ЛС из наноэмульсии.

Международная группа исследователей из Китая и Италии исследовала противоопухолевую активность мицелл, образованных иммуностимулирующим наноносителем PEG5k-Fmoc-NLG919 и нагруженных ГФТ [61]. Мицеллы, средний размер которых составил 191,8 нм, получали методом гидратации тонкой пленки. Изучение противоопухолевой активности полученных мицелл на культурах клеток аденокарциномы легкого мышей Lewis (3LL) и аденокарциномы легкого человека A549 показало значительное увеличение цитотоксичности при использовании PEG5k-Fmoc-NLG919. Авторы сделали вывод, что мицеллярный ГФТ проявляет противоопухолевое действие не только за счет прямого ингибирования активности EGFR, но и за счет перестройки микроокружения опухоли и формирования более враждебного окружения, которое косвенно подавляет пролиферацию опухолевых клеток.

В качестве депо для контролируемого высвобождения ЛС широко используют полимерные микросферы. В исследовании *W. Chen* микросферы на

основе PLGA, нагруженные ГФТ, получали методом выпаривания растворителя. Средний размер микросфер составил около 59 мкм, содержание ГФТ – более 70%. Показано, что ГФТ аморфно диспергирован в матрице PLGA, а прямое молекулярное взаимодействие ГФТ и полимера при этом отсутствует из-за образования мелких частиц ГФТ, встроенных в PLGA. Методом сканирующей электронной микроскопии показано, что более крупные микросферы разлагаются быстрее, чем более мелкие, что происходит ввиду автокаталитической деградации PLGA при подкислении микрочастиц внутри ядра. При этом высвобождение ЛС определяется диффузией (на ранней стадии) и разрушением частиц (на поздней стадии) [73].

Q. Lin получал микросферы ГФТ, используя технологию сверхкритического антирастворителя (supercritical anti-solvent, SAS). Проведенные исследования показали, что ГФТ инкапсулирован в матрицу поли-L-молочной кислоты (poly (l-lactic) acid, PLLA) в полиморфной форме, отличной от субстанции ГФТ, при этом химическая структура ГФТ не изменилась после SAS. Микросферы PLLA имеют сферическую форму. Оптимальный образец микросфер, нагруженный ГФТ, имел средний диаметр частиц 2,48 мкм, что меньше размера частиц субстанции ГФТ и соответствует назначению микросфер – авторы планируют ингаляционное введение микросфер ГФТ пациентам с НМРЛ. Также в экспериментах *in vitro* установлено, что высвобождение ГФТ из микросфер происходит медленнее по сравнению с субстанцией, а цитотоксичность микросфер выше [63].

W. Chen с коллегами включал PLGA-микросферы, содержащие ГФТ, в полимерные (полиуретановые) пены, которые предназначены для лекарственного покрытия стентов для паллиативного лечения бронхотрахеального рака. Высвобождение ГФТ из такого покрытия может замедлить повторный рост опухоли в бронхиальном просвете. Пены, наполненные микросферами ГФТ-PLGA, показали полное высвобождение ГФТ в течение 4 месяцев, что совпадало со временем разложения PLGA-микросфер в полиуретане [82].

В недавней работе *D. Desai* и *P. Shende* описали способ получения и определили характеристики нанопузырьков, содержащих ГФТ. Нанопузырьки

получали путем загрузки кислорода в комплекс включения на основе β -циклодекстрина. Показано, что включение ГФТ в пегилированные и неpegилированные нанопузырьки составляет около 85%, а кислорода – 2,8 мг/л и 6,9 мг/л, соответственно. На культуре клеток аденокарциномы легкого A549 методом проточной цитометрии показан синергический эффект ГФТ и кислорода, при этом количество апоптотических клеток возросло в 35,2% до 73,6% [62].

Индийские ученые *M.P. More* и *P.K. Deshmukh* использовали пассивную загрузку при получении нанолитов оксида графена, включающих ГФТ: под воздействием ультразвуковых импульсов получали нанокристаллы ГФТ, которые осаждались на поверхности и между нанолитами оксида графена благодаря ароматическому $\pi - \pi^*$ стэкинг-взаимодействию. Характеристики полученных частиц приведены в Таблице 1. Исследование показало, что нанолиты оксида графена высвобождают нанокристаллы ГФТ – до 92,5% в течение 8 ч, что в два раза быстрее по сравнению с высвобождением субстанции ГФТ [156].

1.4 Липосомы как средство направленного транспорта лекарственных средств и современные методы их получения

Чаще всего для защиты ЛС от деградации *in vivo*, для контролируемого высвобождения активного вещества и модификации биораспределения, для направленного транспорта активных ингредиентов, повышения биодоступности и снижения нежелательных побочных эффектов используют липосомы [51, 52, 53, 88, 89].

Липосомы представляют собой липидные везикулы, способные инкапсулировать гидрофильные и гидрофобные ингредиенты и обладающие свойствами нацеливания, замедленного высвобождения, хорошей клеточной аффинностью и биосовместимостью [58; 59; 186].

Спустя почти полвека после первоначального открытия липосом в качестве перспективного липидного фармацевтического носителя глобальный рынок липосомальной доставки лекарств резко вырос: ежегодные темпы роста рынка

составляют 13,2%, а к 2027 году он оценивается примерно в 6 993 млн долларов США [218].

Классификации, структуре и основным структурным компонентам липосомальных ЛС посвящен ряд обзорных статей как зарубежных, так и отечественных авторов [3; 10; 33; 114; 134; 140; 188; 199; 214].

Липосомы могут быть получены традиционными методами, такими как метод Бэнгхема (конвекционный метод или метод гидратации тонкой пленки), метод удаления детергента, метод впрыска (инъекции) растворителя, метод обратно-фазового выпаривания (выпаривания с обращением фаз) и др. [6; 12].

Данные методы просты в исполнении, однако технологический процесс получения липосом достаточно сложно масштабировать и контролировать, а недостаточная воспроизводимость результатов приводит к неоднородности между сериями, что затрудняет эффективное использование разработанных липосомальных ЛС при переходе к их клиническому применению [10; 134, 141; 184].

Традиционные методы липосом подробно описаны в большом количестве научных публикаций [34; 43; 81; 100; 136; 137; 143; 174; 196; 223] и широко используются как в научно-исследовательских работах, так и при производстве коммерческих липосомальных препаратов [3; 10; 218].

Как сказано выше, к основным недостаткам традиционных методов получения липосом относятся трудность масштабирования процесса и низкая эффективность инкапсуляции лекарственных веществ. Кроме того, традиционные методы обычно не подходят для получения липосом, включающих биомолекулы, которые могут подвергаться структурным или функциональным изменениям при воздействии детергентов, органических растворителей, процессов гомогенизации или обработки ультразвуком и др. [3; 10; 184].

Преодолеть перечисленные недостатки позволяет использование современных методов получения липосом, например, методы, основанные на микрофлюидных технологиях (микрофлюидика), подробно описанные в [104; 138; 150; 184].

Микрофлюидные технологии получения липосом предполагают пропускание раствора фосфолипидов в органическом растворителе через микрофлюидные каналы, которые представляют собой стеклянные капилляры с диаметром отверстий от 5 до 500 мкм, в водную среду под высоким давлением. Липосомы образуются в результате локальной диффузии фосфолипидов в воду [221].

Ключевым преимуществом микрофлюидных технологий является возможность получения монодисперсных везикул. Поскольку микрофлюидика предполагает использование небольших объемов жидкостей и их точный контроль, это снижает стоимость реагентов, повышает производительность технологического процесса и улучшает аналитические характеристики получаемых везикул [221].

Методы микрофлюидики характеризуются ламинарным потоком и диффузионным массопереносом, что позволяет оценивать как размер, так и ламеллярность во время образования везикул. Использование микрофлюидных систем позволяет точно контролировать такие параметры, как температура, осмолярность, pH и др., что обеспечивает высокий уровень контроля технологического процесса в целом. Кроме того, микрофлюидика позволяет осуществлять непрерывное производство липосом, масштабировать процесс за счет использования нескольких параллельных реакторов и отличается высокой воспроизводимостью и удобством использования, несмотря на громоздкость и сложность некоторых методов [184]. Очевидным преимуществом микрофлюидных систем является возможность удалять органическую фазу из конечных везикул. Микрофлюидные методы, которые можно использовать при получении липосом, включают гидродинамическое фокусирование, импульсный выброс, гидратацию капель льда, перенос капель эмульсии и др. [104; 138; 184; 221].

В методе **гидродинамического фокусирования** центральный поток липидов, растворенных в спирте, соединяется с двумя боковыми потоками водных растворов в одном микроканале. Везикулы, сформировавшиеся с помощью данного метода, являются монодисперсными и, в зависимости от скорости потока водной фазы

относительно липидной фазы, имеют диаметр 50-150 нм. Также на размер липосом и распределение по размерам влияют состав липидов и их концентрация [130].

Неоспоримым достоинством данного метода является возможность его применения для непрерывного производства везикул, а также простота масштабирования за счет использования параллельных микрореакторов [154]. К недостаткам метода можно отнести большую вероятность того, что полученные липосомы могут содержать спирт, что отрицательно сказывается на устойчивости мембран [26].

Импульсный выброс представляет собой технику, напоминающую выдувание мыльных пузырей через петлю. С помощью микрофорсунки водный раствор распыляется небольшими струями на плоскую липидную мембрану, при этом импульс водного раствора растягивает липидную мембрану, образуя везикулу [123]. Размер получаемых везикул можно настраивать, изменяя время распыления водного раствора. При повторении процесса можно получить большое количество монодисперсных гигантских однослойных везикул (ГОВ) (300-600 мкм) с одновременным формированием небольшого количества более мелких «сателлитных везикул».

Основным преимуществом импульсного выброса является непосредственная инкапсуляция материалов, включенных в водный раствор, в формируемые везикулы, что позволяет с высокой эффективностью вводить в липосомы клетки, хромосомы, наночастицы и мембранные белки. Однако формирование липосом данным методом представляет собой сложную технологическую задачу, требующую специальных инженерных инструментов, навыков и выполнения трудоемких экспериментальных этапов, что ограничивает его широкое применение [154].

Метод *переноса капель эмульсии* описан исследователями [54]: эмульсию «вода в масле», полученную перемешиванием водного раствора и суспензии липидов, повторно переносят в водную фазу. Для перекрытия липидного слоя капли эмульсии вытягивают второй монослой с поверхности раздела масло–вода, что приводит к образованию ГОВ. При последующей обработке ГОВ

микрофлюидным методом, например, методом гидродинамического фокусирования потока, можно получить монодисперсные ГОВ. Такая возможность сочетания метода переноса капель эмульсии и микрофлюидной обработки для получения монодисперсной эмульсии является основным преимуществом метода.

Для получения олиголамеллярных или мультиламеллярных гигантских везикул размером от 4 до 20 мкм S. Sugiura и соавт. использовали метод *гидратации замороженных капель* [162]. Ламеллярность полученных везикул и эффективность включения зависят от соотношения липид/капли воды и от состава внешней водной фазы. Для измельчения гигантских липосом их экструдировали через поликарбонатные мембраны, получая БОВ диаметром около 100 нм, что приводило к значительному снижению включения действующего вещества в липосомы, что ограничивает применение метода [75].

Другие микрофлюидные методы получения липосом. Временный вывод мембраны, впервые описанный S. Ota и соавт., включает специальную обработку липидного бислоя с образованием везикул: водный раствор с одной стороны мембраны нагревают, используя лазер, что вызывает вздутие и формирование пузырька, который отрывается с образованием липосомы [165]. Основным преимуществом данного метода является его полная интеграция с микрофлюидным оборудованием, позволяющая получать монодисперсные однослойные липосомы, а также возможность регулирования размера частиц. Поскольку внутренняя и внешняя водные фазы разделены двухслойной липидной мембраной, достигается высокая эффективность включения активных веществ в липосому [46].

Липосомы также получают с помощью микрофлюидного микромиксера, в котором происходит смешивание потоков (водной фазы и раствора липидов в этаноле) в микроканалах. Зигзагообразные («елочкой») узоры на дне канала значительно повышают эффективность смешивания, которую можно варьировать асимметрией «елочек» и их количеством на единицу площади. I.V. Zhigaltsev и соавт. первыми использовали данный метод для получения наноразмерных липосом липидных наночастиц размером до 20 нм, которые эффективно включали

и удерживали Докс [46]. Согласно результатам нескольких исследований, формирование липосом при использовании данного метода главным образом зависит от композиции липидов и параметров перемешивания потоков, прежде всего их скорости и количества циклов [163].

К сожалению, большинство микрофлюидных подходов требуют использования дорогостоящих фосфолипидов, а технологический процесс включает применение токсичных реактивов. Другим существенным недостатком микрофлюидных устройств является относительно небольшая производительность при получении наноматериалов [77; 138; 185].

1.4.1 Липосомы gefitiniba

Как видно из данных, представленных в Таблице 1, самую многочисленную группу наноструктурированных лекарственных форм ГФТ представляют липосомы.

Hu Y. с коллегами получили липосомы ГФТ методом гидратации тонкой пленки и определяли следующие характеристики: размер частиц, ζ -потенциал и PDI. Размер липосом составил 190 нм, что несколько больше, чем средний размер ненагруженных липосом (170 нм). Исследования показали, что поверхностные ζ -потенциалы ненагруженных липосом и липосом ГФТ были отрицательными и составляли $-15,55$ мВ и $-8,91$ мВ, соответственно. Индекс PDI равный 0,248 указывает на однородное распределение липосом по размерам (Таблица 1). Исследования *in vitro* показали, что липосомы ГФТ могут эффективно тормозить пролиферацию, миграцию и инвазию клеток аденокарциномы легкого человека A549 и индуцировать апоптоз, а также блокировать опухолевые клетки в фазе G0/G1 [95].

В исследовании T. Zhang с коллегами разработана система доставки лекарственных средств в легкие, представляющая собой липосомы для ингаляционного введения [56]. Поскольку легочные сурфактанты (комплекс поверхностно-активных веществ, выстилающих внутреннюю поверхность

легочных альвеол и бронхов), в основном, состоят из фосфолипидов, исследователи предположили, что липосомы смогут легко проникать через альвеолярный барьер и служить эффективной системой доставки ГФТ в легкие [115; 133]. То есть, ингаляция липосомального ЛС увеличит удержание и абсорбцию загруженного ГФТ в легких и улучшит его местное действие [142; 143]. Липосомы (липосомальная оболочка включала соевый лецитин и холестерин) получали методом инъекции этанола, полученные липосомы лиофилизировали, лиофилизат протирали через сито 180-меш, получая порошок для ингаляций. После регидратации получали очень маленькие (средний размер $69,8 \pm 2,6$ нм) отрицательно заряженные (ζ -потенциал $-9,7 \pm 0,73$ мВ) липосомы. Сравнительные исследования трех лекарственных форм ГФТ (таблетки, порошок для интратекальной ингаляции и липосомы для интратекальной ингаляции) показали, что липосомы для ингаляции обладают высокой биодоступностью: максимальная концентрация ГФТ в легких достигается через 1 час после введения ЛС) в других органах и тканях, например, в печени; концентрация ГФТ остается минимальной. Индуцирующее воздействие ГФТ на апоптоз уменьшалось в ряду: липосомы ГФТ интратекально > порошок ГФТ интратекально > таблетки ГФТ. Кроме того, липосомы ГФТ обладали максимальной проникающей способностью через альвеолярный барьер.

Особый интерес представляют малые однослойные пегилированные липосомы ГФТ, состоящие из DSPC, Хол и DSPE-PEG2000-малеимида, модифицированного альфа-спиральным клеточно-проникающим пептидом, полученные *K.H. Lin* (SUV-RF). Основные характеристики приведены в Таблице 1. Авторами показано, что липосомы, включающие модифицированный альфа-спиральный клеточно-проникающий пептид, способны проникать через гематоэнцефалический барьер и значительно снижают жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого PC-9 [78].

В исследовании [69] авторы получали пегилированные липосомы из DSPE, DSPE-PEG-2000 и Хол методом гидратации тонкой пленки с последующей обработкой ультразвуком. Эффективность включения ГФТ составила более 85 %.

Исследование противоопухолевой активности полученных липосом в МТТ-тесте показало, что новое ЛС тормозит пролиферацию клеток назофарингеальной карциномы дозозависимым образом.

Профессор *S. Rohilla* получал липосомы методом обратно-фазового выпаривания или модифицированным методом эмульгирования с последующим измельчением ультразвуком, используя для получения липосом соевый лецитин и холестерин [190]. Для дополнительной защиты липосомы ГФТ покрывали хитозаном. Основные характеристики таких липосом, полученных методом обратно-фазового выпаривания, приведены в Таблице 1. На клеточных культурах аденокарциномы легкого А549 и H1299 полученные липосомы продемонстрировали пониженную цитотоксичность по сравнению со свободным ГФТ, что, по всей видимости, связано с более медленным высвобождением ДВ из липосом. Позднее те же авторы оптимизировали состав и метод получения липосом с ГФТ [146] (Таблица 1) и подтвердили, что липосомы оптимизированного состава медленнее высвобождают ГФТ по сравнению с коммерческой лекарственной формой.

1.5 Методы контроля качества липосом

Природа липидов и методы приготовления липосом определяют их химические и физические характеристики [10; 24]. Анализ научной литературы и нормативных документов, касающихся разработки и контроля качества липосомальных ЛС, позволяет выделить несколько критичных показателей для качества (Critical Quality Attributes, CQAs) липосом [18; 23; 83; 87].

CQAs, представленные на Рисунке 4, включают:

- качественную и количественную оценку использованных липидов;
- количественную оценку инкапсулированного и свободного действующего вещества и общее количество действующего вещества;
- характеристику наночастиц, включая размер частиц, распределение частиц по размерам и поверхностный заряд;



Рисунок 4 – Критичные показатели качества липосом и их влияние на характеристики ЛЛП – (адаптировано из [83; 121; 177])

- результаты исследования физической и химической (деградация липидов и действующего вещества) стабильности продукта;
- результаты изучения кинетики высвобождения лекарственного средства *in vitro*.

На Рисунке 4 также обозначено влияние на фармацевтико-технологические и фармакологические характеристики липосом.

1.5.1 Качественное и количественное определение липидов липосомальной оболочки

Поскольку, фосфолипиды служат основным структурным компонентом бислоев липосом, а во время производства и хранения фосфолипиды липосом,

особенно фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилглицерин (ФГ), потенциально могут подвергаться гидролизу при воздействии избыточной влаги, тепла и света, качество и стабильность фосфолипидов определяют основные характеристики липосомальных препаратов.

Основным инструментом анализа химической структуры липидов является метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Несмотря на ограничения метода, связанные с недостаточной чувствительностью, ^{31}P -ЯМР позволяет дифференцировать типы фосфолипидов в соответствии с их уникальными сдвигами [210], а ^1H - и ^{13}C -ЯМР можно использовать для определения молекулярных структур алкильных цепей и полярных головных групп липидов, особенно для определения положения двойных связей и дифференциации изомеров. Недостатком метода является высокая стоимость оборудования [109].

Универсальным и очень чувствительным методом анализа липидов является масс-спектрометрия (МС) [132; 152], которую обычно сочетают с жидкостной хроматографией (ЖХ) и широко используют для идентификации и определения профиля липидов [180; 197], а также для изучения их стабильности.

Спектроскопию комбинационного рассеяния (СКР, рамановскую спектроскопию) достаточно редко применяют для определения липидов в липосомах [53; 193]. Например, *Ando, J.* с коллегами использовали данный метод для прямой визуализации распределения сфингомиелина, меченного рамановской активной молекулой, в липидных рафтах монослойных липосомальных мембран, а также для определения нескольких компонентов липидных мембран без использования меток [203]. СКР также использовали для оценки внутриклеточного распределения катионных липосом *in vitro* в клетках HeLa в зависимости от состава липосом [182], а в совсем недавней работе – для идентификации и физико-химической характеристики резвератрола, инкапсулированного в липосомы [187]. В [181] с помощью СКР характеризовали липосомы и оценивали их способность проникать через гематоэнцефалический барьер. При этом СКР позволила провести функционализацию липосомальной поверхности, определить эффективность

загрузки ДВ, воспроизводимость синтеза и стабильность липосом в одном анализе и с использованием небольшого количества образца.

В настоящее время для количественного анализа липидов липосом наиболее широко применяется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [112]. Сначала липосомы разрушают, используя органические растворители; после хроматографического разделения липиды обнаруживают и определяют количественно, используя различные типы детекторов, включая ультрафиолетовый (УФ), диодно-матричный, флуоресцентный, рефрактометрический, детектор заряженного аэрозоля, испарительный детектор светорассеяния [30; 38; 57; 112; 127; 129; 171; 183] или с помощью масс-спектрометрии [197]. Так, R. Singh и др. количественно определили фосфолипиды и холестерин в 6 липосомальных препаратах, в том числе, в липосомах паклитаксела и доцетаксела, Докс и митоксантрона, применив ВЭЖХ на обращенной фазе в изократическом режиме с УФ-детектором и испарительным детектором светорассеяния [183].

Гораздо реже для начального разделения и качественного анализа липидных компонентов используют тонкослойную хроматографию (ТСХ); в некоторых случаях для количественного анализа применяют ТСХ в комбинации с денситометрическим анализом или масс-спектрометрией [64; 76; 105].

Также для анализа липидов используют газовую хроматографию (ГХ) с предварительной дериватизацией анализируемых липидов до летучих сложных эфиров [131] в сочетании с различными методами обнаружения – пламенно-ионизационным детектором [222] и масс-спектрометрией с электронной ионизацией [157]. В последнее время для анализа липидов липосом также используется сверхкритическая флюидная хроматография [27].

Кроме методов, перечисленных выше, для количественного определения фосфолипидов липосом иногда используют колориметрию. В одном из традиционных подходов используют реакцию фосфора с молибдатсодержащими реагентами с получением продукта синего цвета [44; 51]. Для упрощения анализа и повышения его чувствительности разработаны методики с использованием дифенилгексатриена (ДФГ) [144]. E. London и G.W. Feligenson показали прямую

зависимость интенсивности флуоресценции ДФГ от количества фосфолипидов в пробе и продемонстрировали возможность определения липидов непосредственно в водных буферах и обнаруживать всего 0,7 нмоль фосфолипидов. Кроме того, разработаны коммерческие наборы для определения ненасыщенных фосфолипидов на основе сульфосфосванилиновой реакции [116], которые успешно использовали для количественной оценки липидов во внеклеточных везикулах [117; 164]. А для изучения перекисного окисления липидов в липопротеинах высокой плотности использовали высокопроизводительный флуорометрический/ферментативный анализ, основанный на окислении реагента Amplex Red (10-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазина) в присутствии пероксидазы [47].

1.5.2 Количественное определение эффективности включения действующего вещества

Как указано выше, липосомы представляют собой липидные везикулы, образованные концентрическими липидными слоями, и водное пространство (ядро), которые служат для инкапсуляции гидрофобных и/или гидрофильных действующих веществ, соответственно [3; 10].

Липофильные соединения могут быть загружены в липидные слои в достаточно больших количествах (до такой степени, чтобы не нарушить структуру двойного слоя), однако они быстро высвобождаются при контакте липосом с белками сыворотки крови или липидными везикулами. Водное ядро представляет собой более стабильное пространство для инкапсуляции, но добиться высокой эффективности инкапсуляции гидрофильных ДВ достаточно сложно [3; 10].

Обычно для количественной оценки включения ЛС в липосомы проводят отделение неинкапсулированного вещества от нагруженных липосом с помощью ультрафильтрации [52], ультрацентрифугирования [95, 94], диализа [36], твердофазной экстракции [214] или используя сочетание этих методов [78] и дополнительные приемы, например, деэмульгирование [69; 190]. Затем количество

свободного ДВ определяют количественно и сравнивают с теоретическим или общим количеством ДВ. Для достоверного сравнения различных составов указывают начальные концентрации материалов или начальные соотношения между ДВ и липидами, а также другими ВВ. В качестве альтернативы, если известно общее количество липидов, можно рассчитать нагрузочную способность, то есть массу или мольный процент инкапсулированного ДВ на единицу липидного компонента [72; 136; 206].

Для количественного определения эффективности включения (ЭВ) можно использовать любой валидированный метод, подходящий для количественного определения ДВ. Так, *Ни У.* для определения эффективности включения ГФТ в липосомы использовал метод прямой спектрофотометрии. При этом отделение свободного ГФТ от нагруженных липосом проводили с помощью ультрацентрифугирования в течение 1 ч при скорости вращения ротора 10000 об/мин. Общее количество ГФТ определяли после разрушения липосом при обработке 10 % раствором Тритона X-100 и рассчитывали эффективность включения ГФТ. Авторы показали, что эффективность инкапсуляции ГФТ в значительной мере зависит от соотношения лецитина и холестерина в составе липосомальной оболочки [95]. *КН. Lin* и *S. Rohilla* определяли включение ГФТ в липосомы различного состава методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 254 нм и показали инкапсуляцию более 86% ГФТ [78; 190].

Обращенно-фазовая ВЭЖХ позволяет проводить одновременное разделение и количественное определение неинкапсулированного лекарственного средства и наночастиц, содержащих ДВ [71]. *N. Itoh* с коллегами использовали монолитные колонки с силикагелем, которые имеют бипористую структуру: крупные макропоры (~2 мкм) пропускают наночастицы, а мелкие мезопоры (диаметром около 10–20 нм) являются стационарной фазой для проникновения и удержания малых молекул [29; 118].

В последующих работах эти исследователи модифицировали поверхность силикагеля различными полимерами, например, глицидилметакрилатом, 2-гидроксиэтилметакрилатом или N-винилпирролидоном, чтобы уменьшить

адсорбцию липосом на поверхности неподвижной фазы, что позволило добиться разделения свободного Докс и Доксила® в течение 3 минут [108].

Одной из проблем определения эффективности разделения свободного ДВ и нагруженных липосом методами, указанными выше, является использование высокого давления, что может нарушить структуру липосом и изменить содержание ДВ в липосомах за счет его вытекания [221].

Для определения характеристик заряженных липосом и разделения аналитов с различными соотношениями заряд–размер некоторые исследователи применяют метод капиллярного электрофореза. Преимуществами метода являются малый расход образца, быстрое и эффективное разделение и высокая степень автоматизации [92, 212]. *S.M. Ansar* с соавторами использовали капиллярный электрофорез для разделения свободного и инкапсулированного Докс в 20 мМ фосфатном буфере (рН = 6,5) с 10%-ой сахарозой в качестве фонового электролита. Свободный Докс определяли, используя калибровочную кривую, а общее количество Докс – после его высвобождения из липосом при разрушении мембраны детергентом Тритон X-100 [35].

Еще одним примером определения эффективности включения ДВ в липосомы методом капиллярного электрофореза является исследование *D. Chen* с коллегами, которые инкапсулировали олигонуклеотиды в большие нейтральные или положительно заряженные липосомы. Методика основана на том, что нейтральные липосомы не мигрируют в электрическом поле, а положительно заряженные липосомы и отрицательно заряженные олигонуклеотиды очень медленно двигаются в противоположных направлениях. Таким образом, свободные олигонуклеотиды отделяют от инкапсулированных при их миграции к аноду. Для определения общего количества олигонуклеотидов липосомы разрушали фенол-хлороформной экстракцией или детергентом Тритон X-100 [50].

T.T. Nguyen et al, используя капиллярный электрофорез, проводили полное разделение свободного цисплатина/оксалиплатина и нагруженных анионных пегилированных липосом. Детектирование платиновых соединений проводили как методом УФ-спектрометрии, так и методом масс-спектрометрии с индуктивно

связанной плазмой, позволяющим обнаруживать элементы в сложных матрицах на наномолярном уровне [65].

1.5.3 Определение морфологии липосом

Морфология липосомальных частиц (размер, характеристики поверхности, ламеллярность и гомогенность) определяет их поведение *in vivo* и требует обязательного изучения и контроля в процессе получения и хранения липосом [45].

Визуализировать морфологию можно с помощью различных микроскопических методов, основные достоинства и недостатки которых широко представлены в обзоре Robson A-L. [28]. *A. L. Bagatolli* подчеркивает, что общие сведения о размере и форме наиболее крупных везикул (ГОВ) и гомогенности образца может относительно быстро предоставить световая микроскопия [42], а для более подробного изучения морфологии липосом чаще всего используют ТЕМ [80]. Так, *Ни У.* с помощью ТЕМ подтвердил сферическую структуру полученных липосом ГФТ и отсутствие агломерации [95]. *К.Н. Lin и S. Rohilla* также использовали ТЕМ для подтверждения почти сферической формы липосом ГФТ, модифицированных альфа-спиральным клеточно-проникающим пептидом и покрытых хитозаном [78; 190].

При интерпретации результатов, полученных методом сканирующей электронной микроскопии (Scanning Electron Microscopy, SEM) необходимо учитывать структурные изменения, которые могут возникать в процессе приготовления образца для исследования, его высушивания или фиксации и/или при воздействии высокого вакуума.

Для определения изменений липосом под воздействием окружающей среды используют сканирующую электронную микроскопию в среде (Environmental Scanning Electron Microscopy, ESEM) [80].

Атомно-силовая микроскопия (atomic-force microscopy, AFM) обеспечивает максимальное разрешение и позволяет получить 3D модели липосом с деталями их морфологии, а также данные о распределении липосом по размеру, гомогенности

и стабильности. И AFM, и ТЕМ можно использовать для визуализации поверхностных модификаций липосом и определения лигандов (например, антител или полимеров), конъюгированных на поверхности липосомальной мембраны [128].

Еще одной характеристикой липосом служит их ламеллярность [10], которую можно определить с помощью ЯМР-спектроскопии на ядрах фосфора ^{31}P . Так, фосфолипиды в однослойных липосомах могут характеризоваться спектром с узкими линиями, тогда как МЛВ демонстрируют более широкие пики из-за ограниченного анизотропного молекулярного движения в нескольких липидных слоях [93; 166].

Кроме того, липидные слои можно визуализировать и подсчитывать напрямую с помощью различных методов микроскопии, включая дифференциальную интерференционную контрастную микроскопию [168] и ТЕМ [70].

Одним из критичных показателей для качества липосомальных ЛС является размер липосом [18; 23; 87], контроль которого обеспечивает предсказуемую терапевтическую направленность, доставку необходимой дозы, фармакокинетику и фармакодинамику ЛС [170].

Методы микроскопии, описанные выше, служат для определения морфологии и структуры частиц, но могут обеспечить только полуколичественный анализ распределения частиц по размерам и не способны выявить сверхмалые частицы или сверхкрупные агрегированные частицы, особенно когда их очень мало. Обычно липосомальные дисперсии содержат частицы размером <200 нм и являются монодисперсными малыми однослойными везикулами (МОВ), тогда как липосомы, восстановленные из лиофилизатов, представляют собой гетерогенную смесь липосом с широким распределением по размеру – от нм до мкм, то есть, являются полидисперсными [169].

Основным методом простого и количественного анализа распределения липосом по размерам в диапазоне диаметров от 0,5 до 1000 нм является метод динамического светорассеяния (ДСР) [9]. ДСР измеряет флуктуации рассеянного

света от частиц при броуновском движении, при этом предполагается, что частицы имеют стабильную форму и размер по отношению к разбавлениям [205]. Переменными параметрами образцов для измерений ДСР являются температура, вязкость растворителя и показатель преломления растворителя, которые должны быть определены заранее для точного расчета гидродинамических размеров частиц.

ДСР применяют для быстрого скрининга полидисперсных образцов или для контроля качества образцов с относительно низкой дисперсностью [78]. В сочетании с другими методами, например, микроскопией, ДСР может применяться и для характеристики сложных полидисперсных образцов, в том числе для контроля распределения частиц по размеру в восстановленных лиофилизированных липосомальных ЛС. *Ни У.* с коллегами использовали метод ДСР для определения размера исследуемых липосом ГФТ и показали, что размер липосом не превышает 200 нм, и согласуется с данными, полученными методом ТЕМ [95]. *S. Rohilla* методом ДСР показал, что покрытие липосом ГФТ хитозаном приводит к незначительному увеличению размера липосом [190].

В качестве альтернативы ДСР возможно использование анализа траекторий движения наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA). В данном методе наночастицы, постоянно протекающие через камеру, отслеживают по их светорассеянию и измеряют непосредственно по диффузионному поведению на уровне отдельных частиц, что одновременно дает информацию об интенсивности светорассеяния, распределении частиц по размерам и их концентрации [89; 169].

Достаточно давно для определения размера липосомальных частиц используют эксклюзионную хроматографию (Size Exclusion Chromatography, SEC) и высокоэффективную эксклюзионную хроматографию (High Performance Size Exclusion Chromatography, HPSEC). Метод позволяет физически отделить свободное растворенное ДВ от нагруженных липосом на основе различий их размеров, с одной стороны, и разделить липосомы на ряд субпопуляций, с другой стороны. Препаративную SEC, в основном, используют для очистки/фракционирования частиц, а аналитическую – для определения

распределения частиц по размерам с использованием подходящих стандартов или детекторов светорассеяния. В колонке для SEC матрица с соответствующим размером пор позволяет элюатам разного размера проникать или не проникать в частицы геля, в результате чего крупные частицы элюируются быстрее, чем их более мелкие аналоги. Это позволяет точно определить размер и распределение по размерам. Кроме того, поскольку этот метод не разрушает образцы, фракции после сбора можно использовать для различных дополнительных анализов. Потенциальные возможности традиционной SEC значительно увеличиваются при использовании системы ВЭЖХ, что позволяет в дополнение к фракционированию частиц характеризовать липосомы. Методики с использованием HPSEC лучше воспроизводятся и более эффективны в разделении и могут использоваться для анализа распределения размера липосом, исследования стабильности размера и анализа агрегации липосом [102; 139].

Поверхностный заряд липосом (дзета-потенциал, ζ -потенциал) является важным физико-химическим параметром, поскольку он определяет силу взаимодействий внутри частиц, адсорбцию противоионов и, следовательно, стабильность частиц. Известно, что наночастицы с отрицательным зарядом на поверхности плохо адсорбируются белками крови и, следовательно, ЛС (ГФТ) может успешно достигать опухоли и снижать токсичность *in vivo*.

Поверхностный заряд липосом обычно определяется головными группами фосфолипидов, которые могут включать положительно заряженные третичные амины или отрицательно заряженные карбоксилы, и чаще всего выражается дзета(ζ)-потенциалом. ζ -потенциал является стандартной характеристикой для оценки поверхности липосом и может быть рассчитан по электрофоретической подвижности частиц, измеренной с помощью фазового анализа светорассеяния [220]. ζ -потенциал липосом также может быть измерен несколькими методами, включая флуоресцентное мечение, электронный парамагнитный резонанс (electron paramagnetic resonance, EPR) и генерацию второй гармоники [110; 111; 219]. *S. Rohilla* наблюдал изменение ζ -потенциала при покрытии липосом хитозаном: первоначально липосомы имели отрицательный заряд фосфатных (PO_4^{3-}) групп из-

за ионизации карбоксильных групп фрагментов жирных кислот и соевого лецитина. Молекула хитозана несет достаточно высокий положительный заряд благодаря свободным аминогруппам $-NH_3^+$ в своей структуре и благодаря ион-ионным взаимодействиям легко притягивается к несущей противоположный заряд непокрытой липосоме. После покрытия липосомы хитозаном заряд на поверхности меняется на противоположный – положительный [190].

1.5.4 Изучение высвобождения инкапсулированного действующего вещества

Липосомы должны удерживать инкапсулированное ДВ как во время хранения ЛС, так и процессе циркуляции ЛЛФ *in vivo* до момента доставки ДВ к мишени. Высвобождение ДВ из липосом является критическим фактором и во многом определяет фармакологическую эффективность ЛФ. Для того чтобы определить доступность ЛС в процессе предварительных исследований, определить факторы, которые могут повлиять на биодоступность, оценить методы производства и для контроля качества готового ЛС проводят исследования высвобождения *in vitro* [41; 202].

Методы исследования высвобождения ДВ *in vitro* можно разделить на три группы:

- метод отбора образцов и разделения (Sample and Separate, SS),
- методы, использующие мембранную диффузию (Membrane Diffusion Techniques, DMT),
- непрерывного потока (Continuous Flow, CF). Кроме того, используются комбинированные подходы.

Подход SS является самым простым и включает инкубацию образцов в среде для высвобождения, отбор проб через определенные промежутки времени, отделение высвободившегося ДВ от наночастиц и количественное определение ДВ. Для отделения липосом от высвобождающей среды используют ультрацентрифугирование, центробежную ультрафильтрацию, ультрафильтрацию под давлением или эксклюзионную хроматографию.

Важными параметрами такого определения являются выбор физиологической среды для высвобождения и соответствующее временное окно отбора проб. Так, например, [85] рекомендует тестировать соответствующие ЛС в:

- 50% плазме крови человека при 37°C в течение 24 часов для определения стабильности липосом при кровообращении;
- для имитации высвобождения ЛС в нормальных и опухолевых тканях и клетках следует использовать различные буферы с рН (7,5, 6,5 и 5,5), соответственно, при 37°C в течение 24 ч;
- исследования при повышенных температурах (43, 47, 52 и 57°C) проводят для оценки фазовых переходов липидов; и
- для оценки состояния ДВ в липосомах применяют низкочастотный (20 кГц) ультразвук в течение 2 часов или до полного высвобождения ДВ [85].

Кроме того, рекомендуется достичь не менее 85% высвобождения инкапсулированного лекарственного средства и выйти на плато, по крайней мере, в последних трех точках отбора проб [88].

Методический подход SS отличается простотой, однако он имеет ряд существенных недостатков: использование для осаждения липосом ультрацентрифугированием высоких центробежных сил (от 10000 до 30 000 g) в течение достаточно продолжительного времени (до нескольких часов) может привести к разрушению липосом (особенно мелких) и повышенному высвобождению инкапсулированного ДВ или агрегации наночастиц. Ультрафильтрацию обычно проводят в более мягких условиях (около 4000 g), но при этом адсорбция ДВ на разделительной мембране может привести к системным ошибкам [31; 72].

Более популярными и универсальными для изучения высвобождения ДВ из липосом *in vitro* являются методы, использующие мембранную диффузию, прежде всего, диализ [192]. В данном методе липосомальную дисперсию отделяют от высвобождающей среды, используя диализную мембрану, проницаемую для ДВ: ДВ диффундирует из липосом во внешнюю высвобождающую среду, откуда

периодически отбирают пробы для анализа; полученные данные используют для расчета профиля кинетики высвобождения. Для диализа ключевыми параметрами являются выбор диализной мембраны, определение объемных соотношений между образцом и высвобождающей средой, а также условия перемешивания. Для липосом, инкапсулирующих низкомолекулярные ДВ, отсечение диализной мембраны по молекулярной массе (Molecular Weight CutOff, MWCO) должно быть примерно в 100 раз больше, чем молекулярная масса ДВ. В противном случае небольшое увеличение MWCO мембраны приводит к увеличению скорости диффузии ДВ через мембрану. Нестабильные частицы могут агрегировать и закупоривать мембрану, особенно во время длительных измерений, или высвободившееся ДВ может адсорбироваться на мембране, что приводит к искажению профиля высвобождения ЛС [173]. Поэтому предварительно следует определить вероятность связывания наночастиц и/или ДВ с выбранной мембраной, а в течение всего эксперимента следует поддерживать условия «достаточного разбавления». Это требует, чтобы объем внутри диализного мешка был как минимум в 6–10 раз меньше, чем высвобождающая среда снаружи [202]. Для ДВ, малорастворимых в воде, в высвобождающую среду могут быть добавлены поверхностно-активные вещества или органические растворители. Так, в [78] представлены результаты изучения кинетики высвобождения ГФТ из SUV в среду, содержащую фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline, PBS) с 2 % полисорбата 80. При этом диализ проводили в условиях достаточного разбавления – объем пробы внутри диализного мешка был в 500 раз меньше, чем объем среды высвобождения. Показано, что через 1 час высвобождается $24,86 \pm 1,84\%$ ГФТ, а через 24 час количество ГФТ, высвободившегося из липосом, составляет $84,37 \pm 1,97\%$.

Ни У. определял высвобождение ГФТ из липосом, используя диализ в PBS, содержащем 30% метанола, количество высвободившегося ГФТ определяли спектрофотометрически. Результаты показали, что около 80% ГФТ высвобождается из липосом примерно через 12 часов, что значительно медленнее, чем из субстанции, где 80 % ГФТ переходило в высвобождающий раствор за 2 часа.

То есть, полученные липосомы обладали определенной стабильностью и эффектом пролонгированного высвобождения [95]. *S. Rohilla* изучал с помощью диализа кинетику высвобождения ГФТ из липосом, покрытых хитозаном, в трех различных средах – искусственном желудочном соке (содержащей 0,1 М хлористоводородную кислоту и пепсин), ацетатном буфере (рН 4,0) и искусственном кишечном соке, содержащем трипсин (рН 6,8) [190]. Показано, что высвобождение ДВ из липосом снижалось после покрытия хитозаном во всех исследованных временных точках во всех трех средах, например, через 4 ч для из липосом и липосом, покрытых хитозаном, высвободилось 30% и менее 28% ГФТ, соответственно. Это наблюдение подтверждает утверждение *Mady et al.* о защитном эффекте хитозана, который реализуется за счет адгезии гидрофильного полимера к молекуле липида [146]. По мере увеличения концентрации растворов хитозана увеличивался поверхностный заряд липосомы и толщина внешнего покрытия системы, что приводило к увеличению времени высвобождения ГФТ [190].

Недостаточное перемешивание внутри диализного мешка и/или вокруг мембраны может вызвать нарушение состояния «достаточного разбавления» среды. Для устранения данного недостатка предложен метод обратного диализа. В этом случае исследуемый липосомальный образец добавляют в большой объем высвобождающей среды при постоянном перемешивании. Через заданный промежуток времени диализный мешок извлекают и проводят определение ДВ, перешедшего внутрь диализного мешка. Метод обратного диализа позволяет легко менять высвобождающую среду для изучения профиля высвобождения ДВ в различных средах, когда его высвобождение происходит в течение длительного периода времени. При изучении профиля высвобождения липосом, высвобождающих содержимое менее чем за час, лимитирующим фактором становится проницаемость диализной мембраны.

В методе непрерывного потока (CF) используют динамическую циркуляцию высвобождающей среды через колонку, содержащую иммобилизованную ЛФ, элюент отбирают через определенные промежутки времени и контролируют количество высвободившегося ДВ. Метод часто используют с аппаратом IV USP.

В отличие от часто используемого метода SS, в научной литературе описано лишь несколько случаев применения этого метода для оценки высвобождения Докс и амфотерицина [67; 68]. Ключевым фактором метода CF является скорость потока высвобождающей фазы, которая зависит от типа помпы (перистальтическая или шприцевая), а также используемых фильтров. Известно, что низкие скорости потока вызывают медленное или неполное высвобождение из ЛЛФ. В целом доступность автоматизированного оборудования упростила рутинный отбор проб и замену сред в методе CF в закрытых (рециркуляционная среда) и открытых (нерециркуляционная среда) петлевых системах. Недостатки метода CF включают высокую стоимость оборудования и сложность его наладки, возможное засорение фильтра, адсорбцию на фильтре, а также трудности поддержания постоянной скорости потока, которые приводят к изменчивости результатов [202].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

Рак легкого остается ведущей причиной смертности от рака во всем мире. Генетическое и молекулярное профилирование НМРЛ привело к пониманию онкогенных изменений и созданию эффективных таргетных лекарственных препаратов.

Гефитиниб – низкомолекулярный ингибитор EGFR первого поколения, эффективность которого ограничена медленной абсорбцией в желудочно-кишечном тракте и низкой рН-зависимой биодоступностью при пероральном применении. Для преодоления этих недостатков необходимо создание систем доставки ГФТ, которые можно вводить внутривенно. Высокий интерес к липосомам, как к стратегии доставки ингибиторов EGFR, обусловлен их биосовместимостью, высокой степенью инкапсуляции липофильных препаратов и возможностью поверхностной модификации, например, молекулами ПЭГ. Кроме того, липосомы широко признаны регуляторными органами в качестве системы доставки лекарств.

Методы получения липосомальных частиц разнообразны и уникальны, а сложные физико-химические свойства липосом предъявляют особые требования к их аналитическим характеристикам. Важно охарактеризовать получаемые везикулы с точки зрения применения, поскольку критичные показатели качества липосомальных лекарственных средств оказывают значительное влияние на их фармацевтико-технологические и фармакологические характеристики, обеспечивают специфичность действия и воспроизводимость получения. Основываясь на механизме действия, фармакокинетике и свойствах липосом, контролируют размер частиц и распределение по размерам, морфологию, свойства поверхности, например, ζ -потенциал, эффективность загрузки ЛС, скорость высвобождения и другие.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении диссертационного исследования использовали фармацевтическую субстанцию и реактивы, которые соответствовали требованиям нормативной документации (ГОСТов, ТУ, ОФС и ФС ГФ РФ, PhEur и USP действующих изданий).

2.1 Объект исследования, вспомогательные вещества, материалы и оборудование

Гефитиниб – порошок белого цвета, мало растворимый в воде при рН 1 и практически нерастворимый при рН выше 7, при этом растворимость резко снижается между рН 4 и рН 6. ГФТ легко растворим в ледяной уксусной кислоте, диметилформамиде (ДМФА) и диметилсульфоксиде (ДМСО) – 89 мг/мл при 25°C, растворим в пиридине, умеренно растворим в тетрагидрофуране и мало растворим в метаноле (20 мг/мл), этаноле (4 мг/мл), этилацетате, изопропаноле, ацетонитриле.

ГФТ умеренно растворим в водных буферах. При необходимости для максимальной растворимости в водных буферах ГФТ сначала растворяют в ДМСО, а затем разбавляют выбранным водным буфером – при этом растворимость ГФТ составляет примерно 0,5 мг/мл в растворе ДМСО : PBS (рН 7,2 – 7,4) 1:1. Раствор ГФТ в водных буферах используют свежеприготовленным.

В исследованиях использовали фармацевтическую субстанцию ГФТ, предоставленную MSN Laboratories Private Limited, Индия – содержание действующего вещества 100,51%.

Спецификация на АФС гефитиниб приведена в Таблице 2.

Таблица 2 – Спецификация на фармацевтическую субстанцию гефитиниб

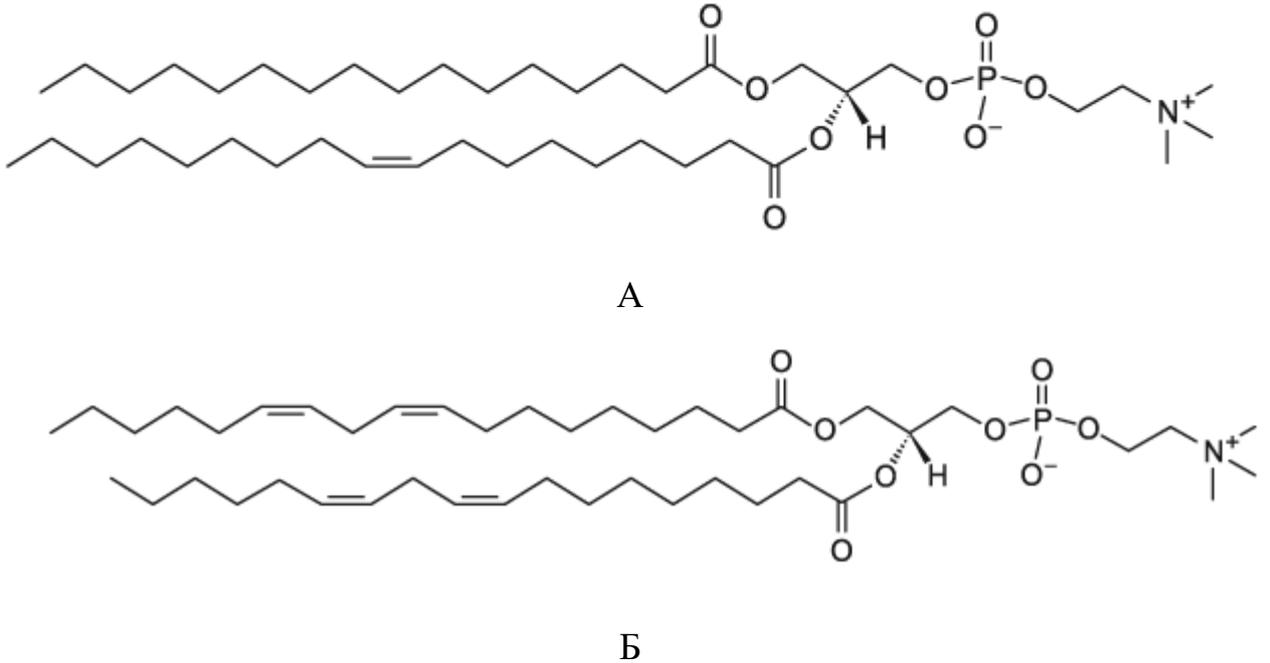
Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Кристаллический порошок белого или почти белого цвета
Растворимость	Методика производителя	Растворим в диметилсульфоксиде
Подлинность	ИК –спектроскопия,	ИК-спектр поглощения образца соответствует ИК-спектру поглощения стандарта гефитиниба
	ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО гефитиниба (раздел «Количественное определение»)
Температура плавления	Методика производителя	От 193 °С до 197 °С
Родственные примеси	ВЭЖХ	Кето-примесь – не более 0,15%; хлоро-примесь – не более 0,15%; N-окись-примесь – не более 0,15%; амино-примесь – не более 0,15%; максимальная единичная неидентифицированная примесь – не более 0,10%; сумма примесей – не более 1,0%
Потеря в массе при высушивании	Методика производителя	Не более 1,0 % м/м
Сульфатная зола	Методика производителя	Не более 0,10 % м/м
Остаточные органические растворители	ГХ, методика производителя	Дихлорметан – не более 0,06%; Изопропиловый спирт – не более 0,5%; Метанол – не более 0,3%; Толуол – не более 0,089%; Этанол – не более 0,5%; Этилацетат – не более 0,5%
Количественное определение	ВЭЖХ	Не менее 98,0 % и не более 102,0 % $C_{22}H_{24}ClFN_4O_3$ (гефитиниба) в пересчете на сухое вещество

Источник: составлено автором

Липосомальную мембрану получали, используя следующие компоненты:

– яичный фосфатидилхолин Е РС S 96% (ЯФХ, Lipoid, Германия) – порошок белого цвета с желтоватым оттенком; растворим в хлороформе, метаноле, этаноле, толуоле, эфире; нерастворим в воде и ацетоне (Рисунок 5А);

– соевый фосфатидилхолин S PC 96% (СФХ, Lipoid, Германия) – твердое воскообразное вещество белого цвета, становится желтым на воздухе; растворим в хлороформе, эфире; нерастворим в воде и ацетоне (Рисунок 5Б);



А - яичный фосфатидилхолин, Б – соевый фосфатидилхолин

Рисунок 5 – Фосфатидилхолин

– холестерин $\geq 99\%$ (ХОЛ, Sigma-Aldrich, Япония) – кристаллический порошок от белого до бледно-желтого цвета без запаха или со слабым запахом, чувствителен к действию света. Легко растворим в хлороформе и диэтиловом эфире, растворим в 1,4-диоксане, умеренно растворим в ацетоне и этаноле, практически нерастворим в воде и метаноле (Рисунок 6);

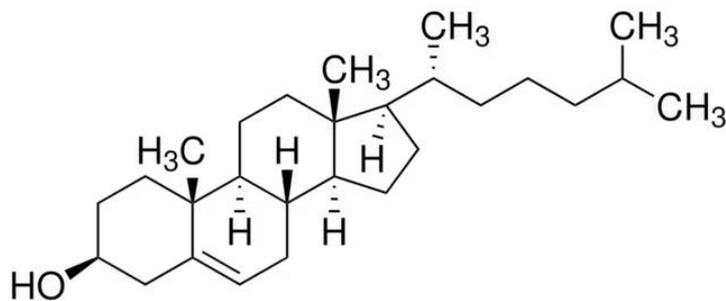


Рисунок 6 – Холестерин

– полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ДСФА, Lipoid, Германия) – порошок белого цвета, растворим в хлороформе, толуоле, метаноле и этаноле, нерастворим в воде и ацетоне (Рисунок 7);

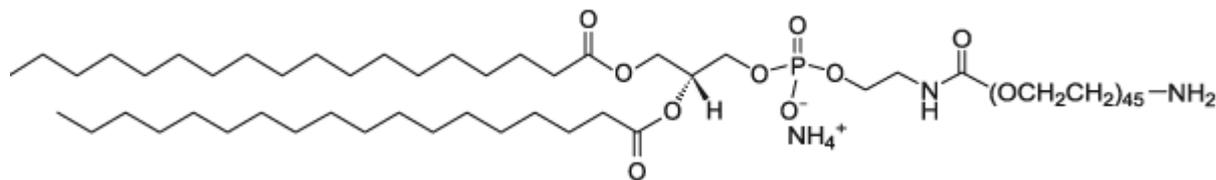


Рисунок 7 – Полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин (натриевая соль)

Для получения ЛЛФ применяли:

- криопротекторы
 - сахароза чда (Химмед, Россия),
 - глюкозы моногидрат (Химмед, Россия),
 - лактоза PhEur (Sigma-Aldrich GmbH, Германия),
 - трегалоза (Химмед, Россия);
- растворители
 - ДМСО (Химмед, Россия),
 - ДМСО чда (Scharlau, Германия),
 - спирт 95 % (ООО «Константа-Фарм М», Россия),
 - этанол абс. для ВЭЖХ (ООО «Акваметрия», Россия),
 - хлороформ (Химмед, Россия),
 - хлороформ для ГЖХ (Merck, Германия),
 - 1,2-дихлорэтан осч (Acros Organics, Германия),
 - вода очищенная (Аквалаб, Медиана-фильтр, Россия),
 - фосфатно-солевой буфер pH 7,4 (Merck, Германия);
- материалы
 - нейлоновые фильтры «Pall» N66 диаметром 25 мм, с размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (ООО Палл Евразия, Россия);
 - диализные мешки (MWCO = 12-14 КДа) (Spectrum Laboratories Inc, США)

(мембраны перед использованием замачивали в PBS pH 7.4 при комнатной температуре в течение 12 часов для удаления консерванта).

Для получения липосом и контроля их качества использовали следующее оборудование:

- весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия);
- весы лабораторные DL-120 (AND, Япония),
- весы лабораторные электронные XPR205/A (Mettler Toledo, Швейцария),
- водяная баня WT 100-1 (Hangzhou MIU Instruments Co. Ltd, Китай),
- платформенный вибрационный шейкер Vibramax 100 (Heldolph, Германия),
- шейкер орбитальный OS-20 (Biosan, Латвия),
- испаритель роторный Heidolph Hei-VAP Advantage с отгонной колбой вместимостью 2 л (Heidolph, Германия),
- экструдер Lipex™ Thermobarrel Extruder на 10 мл (Northern Lipids, Канада),
- установка сублимационной сушки «Edwards Minifast DO.2» (Ero Electronic S.p.A., Италия),
- центрифуга Mini GZ-1312 (Gyrozen, Ю. Корея),
- дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern, Великобритания),
- вискозиметр Vibro Viscometer SV-10 (AND Company Limited, Япония),
- pH-метр HANNA pH 2211 (Hanna Instruments, Румыния),
- газовый хроматограф Agilent 6890N (Agilent Inc., США),
- колонка капиллярная ZB-5Msi (5% фенил, 95% диметилполисилоксан), 30 м × 0,32 мм, толщина пленки 0,5 мкм,
- азот особой чистоты (более 99,999%),
- спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия).

2.2 Методы исследования

Липосомы получали методом Бенгхема с модификацией для гидрофобных субстанций (подробная методика получения приведена в *ГЛАВЕ 3*).

Для определения **размера липосом и распределения** липосомальных частиц по размеру и ζ -потенциала использовали метод ДСР [169]. Измерение проводили на дзетасайзере Nanoseries Nano-ZS 3600. Проводили не менее трех параллельных определений каждого показателя.

Испытуемый образец. В качестве испытуемых образцов использовали свежеприготовленную липосомальную дисперсию или регидратированную ЛЛФ-лио. Для регидратации ЛЛФ-лио предварительно размораживали при комнатной температуре, прибавляли 10 мл воды и выдерживали в течение 10 мин

Разбавленный испытуемый образец. 0,1 мл свежеприготовленной липосомальной дисперсии или регидратированной ЛЛФ-лио тщательно встряхивают и помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки, перемешивают.

Определение рН липосомальных дисперсий проводили потенциометрически без предварительного разбавления испытуемых образцов (ОФС.1.2.1.0004) [7].

Динамическую вязкость определяли с помощью вискозиметра Vibro Viscometer SV-10 (AND Company Limited, Япония) без предварительного разбавления испытуемых образцов (ОФС.1.2.1.0015) [7].

Потерю в массе при высушивании для тонкой липидной пленки и ЛЛФ-лио определяли в соответствии с ОФС.1.2.1.0010 «Потеря в массе при высушивании», высушивая образцы до постоянной массы в вакуумном сушильном шкафу над пятиокисью фосфора при комнатной температуре и остаточном давлении 5 мм рт. ст. [7].

Определение **остаточных органических растворителей** (хлороформ) проводили методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ). Методика подробно описана в *ГЛАВЕ 4*.

Количественное определение ГФТ в мульти- и моноламеллярных дисперсиях, ЛЛФ-лио, эффективность включения, высвобождение ГФТ из липосом проводили методом прямой спектрометрии. Методики разработаны в ходе выполнения диссертационной работы и подробно описаны в *ГЛАВЕ 4*.

Оценку цитотоксической активности ЛЛФ–лио *in vitro* проводили с использованием МТТ–теста.

МТТ–тест основан на способности дегидрогеназ живых клеток превращать бледно-желтый водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) в голубые кристаллы формазана, не растворимые в воде. Количество образовавшегося формазана, определяемое колориметрическим методом после его растворения в ДМСО, характеризует интенсивность окислительно–восстановительных процессов в клетках культуры и является косвенной характеристикой активной биомассы.

Методика

Клетки в концентрации 5×10^4 клеток/мл засеивали в 96-луночные круглодонные планшеты и прибавляли ГФТ и липосомальную дисперсию ГФТ в концентрациях 10 мкг/мл и 20 мкг/мл. Исследуемые образцы инкубировали с клетками в течение 72 часов в CO_2 -инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO_2 . Контролем служили клетки, которые инкубировали в тех же условиях. В качестве положительного контроля использовали клетки, к которым добавляли рассчитанное количество раствора ГФТ. За 6 ч до окончания инкубации в каждую лунку вносили раствор МТТ (концентрация 5 мг/мл). По окончании инкубации планшеты центрифугировали при скорости вращения ротора 1500 об/мин 10 мин, надосадочную жидкость удаляли, а осадок растворяли в 150 мкл ДМСО и помещали планшеты на 5–7 мин в термостат при температуре 37°C . Затем планшеты встряхивали на шейкере и измеряли интенсивность окрашивания на спектрофотометре при длине волны 492 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Количество живых клеток, % рассчитывали по формуле (1):

$$N = \frac{(N_1 - n) \times 100}{N_2}, \quad (1)$$

где N –число живых клеток, %;

N_1 – средняя оптическая плотность в лунках, содержащих клетки и ЛС;

N_2 – средняя оптическая плотность в контрольных лунках, содержащих клетки;

n – оптическая плотность лунок, содержащих только ГФТ.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных исследований проводили на основе требований ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» [7], используя программное обеспечение Microsoft Office.

2.3 Дизайн исследования

Основной целью получения липосомального нанопрепарата является формирование монодисперсных частиц с узким распределением по размерам и требуемой степенью ламеллярности, эффективное включение ЛС и длительная стабильность получаемого продукта [10].

Настоящее исследование включало несколько этапов. На первом этапе проведено планирование диссертационной работы, анализ зарубежной и отечественной научной литературы, выдвинута гипотеза, определены цель, задачи и методы исследования.

Диссертационная работа по разработке липосомальной лекарственной формы ГФТ включает два больших блока – технологические исследования и аналитические исследования, которые тесно взаимосвязаны (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Дизайн диссертационного исследования

Источник: составлено автором

ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГЕФИТИНИБА

3.1 Выбор оптимального состава липосом гефитиниба

Основным структурным компонентом липосом являются фосфолипиды, которые имеют амфифильную природу и включают липофильную длинную углеводородную цепь(и) и водорастворимую гидрофильную головку. В присутствии воды такие липиды агрегируют (самособираются) в различные структуры – плоские липидные бислои, мицеллы и (или) везикулы, геометрия которых зависит от структуры липидов [188]. Именно липиды, используемые при получении липосом, определяют их свойства – заряд поверхности бислоя, биораспределение, проницаемость, высвобождение и клиренс активного вещества [134], а также определяют эффективность включения, стабильность и токсичность липосомальных ЛС [114].

В диссертационной работе в качестве основного структурного компонента липосом ГФТ использовали ЯФХ или СФХ (далее – ЯФХ- и СФХ-липосомы, соответственно). Для снижения проницаемости липосомальной мембраны и повышения ее стабильности в мембрану вводили холестерин [134; 135; 140].

Чтобы получить липосомы, которые не будут распознаны клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) и смогут находиться в кровяном русле в течение продолжительного времени, использовали дистеароилфосфатидилэтанол-амин, конъюгированный с полиэтиленгликолем-2000 (ПЭГ-ДСФА). При этом получали стерически стабилизированные (stealth, стелс) липосомы. Включение ПЭГ-ДСФА позволяет не только увеличить время циркуляции липосом в кровяном русле и защитить их от инактивации или метаболической деградации, но и повысить стабильность липосом при хранении [10; 104].

Липосомы получали, используя метод Бенгхема с модификацией для гидрофобных субстанций.

В общем случае технология получения липосомальной ЛФ гидрофобного ЛС включает следующие основные операции:

1. Растворение липидных компонентов и липофильного ЛС в органическом растворителе;
2. Выпаривание органического растворителя с получением тонкой липидной пленки, включающей действующее вещество;
3. Получение дисперсии многослойных липосом (мультиламеллярных везикул, МЛВ) при гидратации липидной пленки водной средой (с последующим взбалтыванием/перемешиванием);
4. Измельчение МЛВ для получения малых однослойных везикул (МОВ), дополнительная обработка (очистка, стерилизующая фильтрация) и дозирование липосомальной дисперсии;
5. Лиофилизация (при необходимости) и упаковка;
6. Характеристика конечного продукта (стандартизация).

Исследования начинали с определения оптимального соотношения компонентов липосомальной мембраны, которое позволяет получить липосомы необходимого размера с эффективным включением ГФТ.

Критериями приемлемости для выбора состава липосом на данном этапе разработки технологии считали:

- размер частиц – не более 200 нм [8; 10] и
- эффективность включения (ЭВ) ГФТ – не менее 80% [10].

При выборе оптимального состава получили по 6 моделей ЯФХ- и СФХ-липосомальных дисперсий с различными соотношениями ГФТ и липидного компонента. Эксперименты проводили, уменьшая содержание ГФТ и соотношение ГФТ/ФХ, соответственно. При этом также изменяли соотношение ФХ и других компонентов липосомальной оболочки (Хол и ПЭГ-ДСФА).

Методика

ГФТ, ЯФХ (СФХ), Хол и ПЭГ-ДСФА растворяли в хлороформе при перемешивании. Полученный раствор переносили в круглодонную колбу и отгоняли органический растворитель на роторном испарителе при температуре

водяной бани $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ до формирования полупрозрачной пленки. Пленку досушивали под вакуумом до полного удаления хлороформа. При гидратации пленки водой для инъекций получали липосомальную дисперсию ГФТ (МЛВ), которую последовательно экструдировали через нейлоновые фильтры с размером пор 1,2 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм, получая МОВ.

В ходе исследования прежде всего контролировали размер получаемых липосомальных везикул, поскольку размер липосом является критическим показателем их эффективности и безопасности. Это особенно важно для липосомальных форм противоопухолевых препаратов, для которых размер частиц является определяющим для направленного транспорта и накопления ДВ непосредственно в опухоли (Таблица 3).

Таблица 3 – Модельные составы липосом ГФТ, размер липосомальных частиц

Модель	Массовое соотношение ГФТ/ФХ	Массовое соотношение ФХ/Хол/ПЭГ-ДСФА	Размер липосом ^{1,2} , нм
Модельные составы с ЯФХ			
1	1/75	33,4/5,5/1	205±5
2	1/100	44,5/6,7/1	189±10
3	1/140	62,2/6,7/1	178±10
4	1/160	83,3/6,7/1	180±10
5	1/187,5	83,3/6,7/1	190±10
6	1/200	83,3/6,7/1	210±10
Модельные составы с СФХ			
1	1/40	35,6/3,6/1	183±10
2	1/50	44,4/4,4/1	189±6
3	1/60	53,3/5,3/1	178±11
4	1/67,5	60,0/5,9/1	180±5
5	1/75	66,8/7,5/1	190±10
6	1/100	88,8/9,2/1	220±19

Источник: составлено автором

Примечание – ¹среднее значение из 3 определений; ² – после экструзии

Данные, представленные в Таблице 3, свидетельствуют о том, что по размеру везикул критерию приемлемости соответствуют ЯФХ-липосомы модельных составов 2, 3, 4 и 5 и СФХ-липосомы всех изученных составов, кроме 6-го. Кроме того, полученные результаты показывают, что размер частиц зависит от соотношения ГФТ и ФХ, но соотношение компонентов липидной оболочки не оказывает на него влияния.

ЭВ представляет собой отношение количества ЛС, включенного в липосому, к общему количеству ЛС и является критическим показателем качества ЛЛП, поскольку свободное ЛС в липосомальной дисперсии может изменить безопасность или биораспределение ДВ.

При выборе оптимального состава ЛЛФ для определения эффективности включения проводили количественное определение ГФТ в дисперсии МОВ до и после экструзии. Методика разработана в ходе исследования и приведена в *ГЛАВЕ 4*.

Результаты определения ЭВ ГФТ в модельные дисперсии МЛВ при выборе оптимального состава липосом представлены в Таблице 4.

Как видно из данных, представленных в Таблице 4, при массовом соотношении ГФТ/ЯФХ 1/75 (состав 1) в липосомы включается менее 50 % действующего вещества. С увеличением массовой доли ЯФХ происходит повышение ЭВ ГФТ в липосомы. Так, в липосомы с массовым соотношением 1/187,5 и 1/200 ГФТ включается практически полностью (составы 5 и 6).

Среди моделей СФХ-липосом только состав 1 не соответствовал установленному критерию приемлемости по эффективности включения (ЭВ около 70%). Для других моделей СФХ-липосом ЭВ отличалась незначительно и составляла около 100 %. Скорее всего, такое высокое включение ГФТ обусловлено бóльшим количеством ненасыщенных связей в СФХ, что позволяет ГФТ активнее связываться с фосфолипидом.

Таблица 4 – Результаты определения эффективности включения ГФТ в МЛВ

Модель	Массовое соотношение ГФТ/ФХ	$C_{\text{гот}}^1$, мг/мл	$C_{\text{дэкстр.}}^1$, мг/мл	ЭВ ^{1,2} , %
Модельные составы с ЯФХ				
1	1/75	0,18	0,41	43,90
2	1/100	0,24	0,43	55,81
3	1/140	0,31	0,41	72,09
4	1/160	0,33	0,39	84,62
5	1/187,5	0,39	0,40	97,50
6	1/200	0,39	0,39	99,98
Модельные составы с СФХ				
1	1/40	0,57	0,82	69,51
2	1/50	0,74	0,81	91,36
3	1/60	0,79	0,81	97,53
4	1/67,5	0,80	0,81	98,77
5	1/75	0,79	0,80	98,75
6	1/100	0,79	0,80	98,76

Источник: составлено автором

Примечание – ¹среднее значение из 3 определений

Для дальнейших исследований отобрали:

- для получения липосом с ЯФХ – состав 5, как соответствующий обоим критериям приемлемости – размер частиц 190 ± 10 нм, ЭВ = 97 – 100 %;
- для получения липосом с СФХ – состав 3, отвечающий критериям приемлемости – размер частиц 178 ± 11 нм, ЭВ = 97 – 100%. Кроме того, состав 3 содержал наименьшее количество липидов и соотношение ГФТ/ФХ было наиболее высоким (Таблица 5).

Таблица 5 – Выбранные составы липосом ГФТ

Состав	ДВ, мг	Компоненты липидной пленки, мг				Массовое соотношение ГФТ/ФХ/Хол/ПЭГ-ДСФА
	ГФТ	ЯФХ	СФХ	Хол	ПЭГ-ДСФА	
5	8	1500	–	120	18	1/187,5/15/2,25
3	16	–	960	96	18	1/60/6/1,125

Источник: составлено автором

3.2 Разработка технологии получения липосомальной дисперсии гефитиниба

3.2.1 Получение дисперсии мультиламеллярных везикул

Первым этапом получения липосомальной дисперсии является растворение липидных компонентов и ДВ в органическом растворителе. В данном исследовании использовали хлороформ. Выбор этого растворителя обусловлен тем, что и ГФТ, и выбранные компоненты липосомальной мембраны растворимы в хлороформе. Кроме того, хлороформ обладает высокой летучестью и имеет низкую температуру кипения ($61,15^{\circ}\text{C}$). Навески ГФТ, липидных компонентов и холестерина, соответствующие составу 5 (ЯФХ-липосомы) и составу 3 (СФХ-липосомы) (Таблица 5), растворяли в хлороформе, полученные растворы объединяли и тщательно перемешивали на шейкере.

Полученный раствор (концентрация ГФТ 0,4 мг/мл и 0,8 мг/мл для ЯФХ- и СФХ-липосом, соответственно) количественно переносили в круглодонную колбу и отгоняли органический растворитель.

При выпаривании хлороформа на роторном испарителе при постоянном перемешивании под вакуумом (200 – 300 мбар) получали липидную пленку, Глубину вакуума подбирали экспериментально. Выпаривание проводили при температуре выше $T_{\text{фп}}\text{ФХ}$ (40 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ до формирования однородной полупрозрачной липидной пленки.

Для получения тонкой пленки, равномерно распределенной по стенкам колбы, устанавливали скорость вращения ротора 50-60 об/мин. При меньшей скорости вращения ротора выпаривание хлороформа происходило медленно с образованием плотной «тяжелой» пленки на дне круглодонной колбы. Значительное повышение скорости вращения ротора ускоряло образование липидной пленки, однако приводило к неравномерному распределению раствора и, соответственно, к образованию пленки неравномерной толщины. По мере образования липидной пленки на стенках колбы, скорость вращения ротора постепенно снижали.

Как указано выше, ГФТ и липидные компоненты растворяли в хлороформе. Хлороформ относится к растворителям 2-го класса, содержание которых в ЛС ограничено в связи с их токсичностью (ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители») [7]. Кроме того, остаточные количества хлороформа могут изменять физические свойства липосомальной мембраны после восстановления. Для полного удаления хлороформа из липидной пленки ее досушивали под глубоким вакуумом (500-1000 мбар) в течение 20 – 40 мин (в зависимости от объема и загрузки колбы). Время досушивания устанавливали экспериментально (Таблица 6).

Таблица 6 – Определение времени досушивания липидной пленки

Время досушивания, мин	Масса содержимого колбы, г ^{1, 2}		Потеря в массе при высушивании, %	
	ЯФХ-липосомы	СФХ-липосомы	ЯФХ-липосомы	СФХ-липосомы
0	2,733	2,308	–	–
15	2,691	2,274	1,54	1,47
30	2,599	2,222	0,34	0,23
45	2,297	2,220	0,08	0,09
60	2,296	2,220	0	0

Источник: составлено автором

Примечание – ¹среднее значение из 3 определений; ²до начала эксперимента определяли массу пустой колбы

Результаты, приведенные в Таблице 6, свидетельствуют о том, что потеря в массе при высушивании не превышает 0,1% при досушивании липидной пленки, образованной как ЯФХ, так и СФХ, в течение 45 мин.

При гидратации высушенной липидной пленки водой для инъекций при постоянном взбалтывании и перемешивании получали липосомальные дисперсии (МЛВ). Операции проводили при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении.

Полученные дисперсии МЛВ оценивали по следующим параметрам:

- размер и ζ -потенциал липидных везикул,
- рН липосомальной дисперсии,

– количественное содержание ГФТ.

Результаты определения параметров, полученных липосомальных дисперсий приведены в Таблице 7.

Таблица 7 – Характеристики дисперсий МЛВ

Опыт	Размер липосом ¹ , нм	pH ¹	ζ-потенциал ¹ , мВ	ГФТ ² , мг/мл
ЯФХ-МЛВ				
1	878±96	7,9	-26±2,0	0,41
2	969±51	7,6	-28,1±1,5	0,48
3	930±80	7,7	-25,7±2,0	0,39
СФХ-МЛВ				
1	870±74	7,3	-24,5±1,5	0,88
2	931±87	7,3	-22,8±1,1	0,81
3	962±43	7,4	-24,1±1,7	0,78

Источник: составлено автором

Примечание – ¹среднее значение из 3 определений; ²методика приведена в ГЛАВЕ 4

Результаты, представленные в Таблице 7, свидетельствуют о том, что выполнение технологических операций в предложенных условиях позволяет получить МЛВ со следующими характеристиками:

- средний размер как ЯФХ-МЛВ, так и СФХ-МЛВ лежит в диапазоне от 780 до 1020 нм;
- поверхность МЛВ заряжена слабо отрицательно, что типично для ПЭГ-липосом, а определенное значение ζ-потенциала лежит в пределах – 30 мВ, что предполагает достаточную стабильность липосом [179];
- содержание ГФТ (мг/мл) соответствует рассчитанному [13].

3.2.2 Получение малых однослойных везикул

МЛВ, образовавшиеся при гидратации липидной пленки водой, можно измельчить до МОВ, применив механическое воздействие, например, экструзию. Механизм уменьшения размеров данным методом заключается в том, что МЛВ разрываются на входе в пору мембраны и перестраиваются во время прохождения

мембраны. Применение экструзии для получения МОВ очень удобно в лабораторных условиях при отработке технологии получения липосомальных дисперсий, поскольку позволяет измельчить небольшие объемы дисперсий [10].

Для измельчения методом экструзии МЛВ последовательно пропускали через нейлоновые фильтры с размером пор 1,2 мкм и 0,45 мкм (при этом также происходила очистка от возможных механических включений), а затем дисперсию пропускали через нейлоновые фильтры с размером пор 0,22 мкм.

Оптимальное количество циклов экструзии через фильтры с размером пор 0,22 мкм установлено экспериментально при оценке получаемых МОВ по размеру частиц и PDI (Таблица 8).

Таблица 8 – Определение оптимального числа циклов экструзии для получения МОВ ГФТ

Число циклов	Размер частиц ¹ , нм		PDI ¹	
	После экструзии	Через 72 ч после экструзии	После экструзии	Через 72 ч после экструзии
ЯФХ-МОВ²				
1	280±4	269±8	0,31±0,01	0,32±0,03
2	222±4	231±7	0,25±0,01	0,28±0,01
3	190±10	190±10	0,19±0,01	0,19±0,02
4	185±7	195±11	0,18±0,02	0,20±0,01
5	176±13	188±6	0,16±0,03	0,22±0,01
СФХ-МОВ³				
1	245±21	273±17	0,28±0,01	0,29±0,01
2	190±10	198±4	0,22±0,01	0,25±0,02
3	171±11	173±10	0,18±0,01	0,18±0,01
4	168±7	171±6	0,17±0,02	0,18±0,01
5	164±6	178±9	0,16±0,03	0,20±0,02

Источник: составлено автором

Примечание – ¹среднее значение из 3 определений; ²размер ЯФХ-липосом до экструзии составил 926 нм; ³размер СФХ-липосом до экструзии – 921 нм (Таблица 7)

Из данных, представленных в Таблице 8, видно, что при однократной экструзии МЛВ средний размер липосомальных частиц уменьшился с 920 нм до 280 нм и 245 нм, а после 3-кратной размер – в среднем, до 190 нм и 170 нм для ЯФХ-МОВ и СФХ-МОВ, соответственно. При этом размер полученных частиц не

изменялся в течение 3-х суток при хранении в холодильной камере при температуре не выше +8 °С.

При увеличении числа циклов экструзии PDI также уменьшался, что свидетельствует о получении однородных по размеру липосом. Низкие значения PDI (менее 0,20) после 3 циклов экструзии – 0,190 и 0,177 для ЯФХ-МОВ и СФХ-МОВ, соответственно, – свидетельствуют о том, что 3 цикла экструзии через нейлоновые фильтры 0,22 мкм необходимы и достаточны для получения монодисперсных липосомальных систем ГФТ.

Также из Таблицы 8 видно, что при увеличении числа циклов измельчения до 4-х, а потом до 5-ти удалось получить ЯФХ-МОВ размером около 176 нм, а СФХ-МОВ уменьшились до 164 нм непосредственно после экструзии. Однако при хранении таких МОВ в холодильной камере при температуре +8° С через 72 ч наблюдали увеличение размера частиц на 10 %, а индекса PDI – до 25 %, что свидетельствует о дестабилизации дисперсий.

После 3-кратной экструзии для полученных МОВ дополнительно контролировали ζ -потенциал частиц, рН и вязкость дисперсии, количественное содержание и ЭВ ГФТ (Таблица 9).

Таблица 9 – Основные характеристики МОВ ГФТ, полученных при 3-кратной экструзии

Опыт	Размер липосом, нм	рН ¹	ζ -потенциал ¹ мВ	Вязкость ¹ мПа·с	ГФТ ¹ , мг/мл	ЭВ ¹ , %
ЯФХ-МОВ						
1	190±10	8,0	-19,9±1,6	7,0±0,1	0,39	98,0±1,9
2	184±7	7,9	-19,2±2,0	6,7±0,5	0,41	98,5±1,3
3	191±16	7,6	-20,1±0,8	6,9±0,3	0,39	98,6±1,1
СФХ-МОВ						
1	171±11	7,4	-24,1±1,7	3,9±0,1	0,80	97,5±2,0
2	177±5	7,2	-23,1±3,0	3,5±0,5	0,81	98,3±1,5
3	175±10	7,4	-23,9±0,7	4,0±0,7	0,81	98,4±1,5

Источник: составлено автором

Примечание – ¹среднее значение из 3 определений

Анализ данных Таблиц 7 и 9, показывает, что после экструзии уменьшился не только размер частиц, но и поверхностный заряд везикул. Это особенно заметно

для ЯФХ-МОВ, где изменение составило около 25 %, и может быть связано с частичной дестабилизацией липидного бислоя. В то же время ζ -потенциал СФХ-МОВ не изменился. Также сохранялось количественное содержание ГФТ в липосомах и эффективность инкапсулирования ДВ, что, по-видимому, связано с достаточно равномерным распределением гидрофобного ГФТ в бислое.

3.2.3 Исследование стабильности дисперсии однослойных везикул гефитиниба

Основным свойством, ограничивающим использование липосом, как универсальной системы доставки лекарств, является их как физическая, так и химическая нестабильность.

Как отмечено выше, при краткосрочном (в течение 3-х суток) хранении липосомальных дисперсий в холодильной камере может происходить укрупнение везикул и повышении неоднородности дисперсии.

Для определения стабильности дисперсий МОВ в течение более длительного времени их хранили в защищенном от света месте при температуре не выше +8 °С в течение 4 недель. При этом контролировали такие характеристики, как размер и ζ -потенциал частиц, рН дисперсии и ее вязкость и количественное содержание ГФТ.

Данные, представленные в Таблице 10, свидетельствуют о том, что полученная по разработанной технологии липосомальная дисперсия ЯФХ-МОВ нестабильна – в течение месяца хранения произошло увеличение размеров везикул, снижение рН и вязкости.

Особое внимание обращает на себя значительное увеличение размера везикул ЯФХ-МОВ и их поверхностного заряда через 4 недели хранения – средний размер частиц увеличивается с 183 нм до 270 нм, то есть, в 1,5 раза, а ζ -потенциал и вязкость резко падают также в 1,5 раза. Данные изменения явно свидетельствуют о процессах деструкции липосомальной мембраны и физико-химической

дестабилизации дисперсии МОВ, а также о необходимости поиска путей повышения ее устойчивости.

Таблица 10 – Исследование стабильности моделей липосомальной дисперсии ГФТ

Срок наблюдения, нед	Размер липосом ¹ , нм	pH ¹	ζ-потенциал ¹ , мВ	Вязкость ¹ , мПа·с	ГФТ ¹ , мг/мл
ЯФХ-МОВ					
0	191±16	7,6	-20,1±0,8	6,9±0,3	0,39
2	183±21	7,0	-22,9±1,1	5,6±0,2	0,36
4	270±23	6,5	-13,1±1,6	4,3±0,5	0,37
СФХ-МОВ					
0	175±10	7,4	-23,9±0,7	4,0±0,7	0,81
2	188±10	7,2	-23,3±3,5	3,9±0,5	0,80
4	180±15	6,5	-23,4±4,1	4,1±0,5	0,80

Источник: составлено автором

Примечание – ¹среднее значение из 3 определений

3.3 Разработка технологии получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гефитиниба

Основной проблемой, ограничивающей использование липосом, как универсальной доставки ЛС, является их нестабильность – окисление и гидролиз липидов приводят, с одной стороны, к изменению плотности липосомальной мембраны и вытеканию ДВ из липосомы, с другой стороны – к термодинамически неустойчивому состоянию, которое способствует агрегации и/или слиянию везикул.

Повышение стабильности липосомальных дисперсий при хранении достигается в основном, двумя способами – с помощью применения химических соединений-стабилизаторов или путем лиофилизации. Поскольку некоторые химические материалы могут вызывать нежелательные эффекты как в высоких концентрациях, так и ввиду эффекта накопления в организме, использование химических стабилизаторов в фармацевтических целях нежелательно.

Оптимальным методом стабилизации липосом является лиофилизация дисперсии, которая заключается в удалении воды из замороженного материала при

сублимации. Методика сублимационного высушивания включает несколько отдельных взаимозависимых этапов:

- замораживание – стадия охлаждения, на которой большая часть растворителя отделяется от липосом и наполнителей, что приводит к образованию кристаллов льда;
- сублимацию (первичную сушку) – при этом давление в камере снижается до нескольких мбар и повышается температура полки для подачи тепла, необходимого для сублимации;
- досушивание (вторичную сушку), во время которого температуру повышают, чтобы обеспечить десорбцию воды.

Очевидно, что этапы лиофилизации связаны с изменениями температуры и давления и, таким образом, могут влиять на целостность липосомальной мембраны, агрегацию везикул и удержание включенного ДВ.

Для стабилизации мембраны везикул во время лиофилизации и уменьшения изменений физических свойств везикул, прежде всего, размера частиц, PDI и ЭВ) и/или утечки ЛС, во внешнюю водную фазу липосомальных дисперсий вводят ВВ с различными физическими и химическими свойствами, так называемые криопротекторы.

3.3.1 Выбор криопротектора для лиофилизации

Криопротектор, который предполагается использовать для лиофилизации липосомального ЛС должен обладать определенными свойствами – он должен быть растворимым в воде, не должен выпадать в осадок и образовывать эвтектики и должен быть относительно нетоксичен [191].

Большое значение для эффективности защитных свойств криопротектора имеет определение технологического этапа для его введения (при гидратации липидной пленки или после экструзии) и концентрация/соотношение криопротектор:фосфолипид.

Предпочтительными криопротекторами являются сахара и особенно

дисахариды, хотя механизм их защитного действия до конца не изучен. Предполагается, что оно основано на способности углеводов образовывать водородные связи между тремя фосфолипидами и замещать эти связи молекулами воды для стабилизации структуры липосом. Установлено, что данные углеводы не проникают через липосомальную мембрану, а обеспечивают ее стабильность путем взаимодействия с полярными головками липидов. Дисахариды по отдельности или в комбинации снижают осмотический стресс, стабилизируют липосомы и, в конечном итоге, защищают целостность липосом [207].

Кроме того, предполагается, что за счет взаимодействия с полярной областью липида сахара способны заменять связанную воду вокруг бислоя и при замораживании образуют аморфную фазу с высокой вязкостью и низкой подвижностью, которая действует как барьер между соседними бислоями. Такая стекловидная матрица ограничивает слияние везикул и защищает бислои от повреждений, вызванных образованием льда. То есть, молекулы сахара позволяют сохранять расстояние между везикулами и таким образом препятствуют их слиянию. Кроме того, образование стекловидного слоя криопротектора вокруг бислоя предотвращает любую утечку лекарственного средства во время фазовых превращений при лиофилизации.

В данной работе в качестве криопротекторов исследовали моносахарид (глюкозу) и дисахариды – лактозу, сахарозу и трегалозу в виде 5%-ти и 10%-х водных растворов, которые вводили в ЛС на стадии гидратации липидной пленки или непосредственно перед лиофилизацией.

В первом случае липидную пленку смывали (гидратировали) соответствующим раствором криопротекторов различной концентрации. При этом пленка с трудом смывалась со стенок колбы, и густую вязкую дисперсию МЛВ с было сложно измельчать для получения МОВ. В дальнейших исследованиях криопротектор растворяли в предварительно полученной дисперсии МОВ. Возможность использования того или иного криопротектора оценивали по размеру везикул и заряду их поверхности (Таблица 11).

Данные, представленные в Таблице 11, показывают, что введение

криопротекторов в дисперсию МОВ не оказывает существенного влияния на размер липосом ГФТ – их размер изменяется менее, чем на 10%. Гораздо более выраженным является влияние криопротекторов на поверхностный заряд везикул – так, при использовании растворов глюкозы ζ -потенциал изменился (снизился) более, чем на 30% с $-20,8$ мВ до $-15,9$ мВ. Из данных Таблицы 11 также видно, что наименьшее влияние на характеристики МОВ оказывает применение в качестве криопротектора 5%-го или 10%-го растворов сахарозы.

Таблица 11 – Влияние криопротекторов на характеристики МОВ

Криопротектор	Размер везикул ¹ , нм		ζ -потенциал ¹ , мВ	
	без криопротектора	с криопротектором	без криопротектора	с криопротектором
ЯФХ-МОВ				
глюкоза 5%	191±16	178,9±8,0	-20,8±2,1	-16,9±0,9
глюкоза 10%		181,3±12,5		-15,9±2,1
лактоза 5%		175,8±7,9		-23,4±2,3
лактоза 10%		177,4±5,6		-22,1±1,1
сахароза 5%		188,0±8,2		-20,9±2,1
сахароза 10%		186,5±5,4		-21,5±1,3
СФХ-МОВ				
трегалоза 5%	175±10	179,3±9,1	-23,9±2,8	-22,5±1,9
трегалоза 10%		169,1±15,3		-22,9±2,0
лактоза 5%		158,0±17,0		-22,2±3,0
лактоза 10%		155,3±11,4		-21,9±1,8
сахароза 5%		169,8±9,9		-24,1±1,7
сахароза 10%		171,1±2,1		-24,5±2,2

Источник: составлено автором

Примечание – ¹среднее значение из 3 определений

3.3.2 Получение лиофильно высушенного лекарственного средства

Для лиофилизации точную навеску криопротектора растворяли в дисперсии МОВ, перемешивали до полного растворения и фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 0,22 мкм. Полученную дисперсию дозировали по 5 мл во флаконы вместимостью 20 мл и помещали в камеру сублимационной сушки при комнатной температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Липосомальные везикулы, включающие ГФТ, имеют более высокую

температуру эвтектики ($-2/-3^{\circ}\text{C}$) по сравнению с другими липосомальными препаратами ($-6/-8^{\circ}\text{C}$). Лиофилизацию проводили в соответствии с рекомендованной программой сублимации для липосомальных лекарственных форм [1].

Сначала проводили охлаждение ЛС от 20°C до -5°C с выдерживанием при этой температуре в течение 30 мин, дальнейшее охлаждение полок сублимационной сушилки до -45°C проводили в течение 2 ч. После достижения ЛС минимальной температуры полки выдерживали в течение 6-8 ч и начинали откачку воздуха из сублимационной установки. Через 5-7 ч начинали нагрев полок до температуры -25°C со скоростью $+1,5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ с последующим выдерживанием при -25°C в течение 2-3 ч. После этого продолжали нагрев ЛС до температуры -5°C со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ (около 20 ч) и затем – до комнатной температуры $+20^{\circ}\text{C}$ со скоростью $+5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ (около 5 ч). После окончания нагрева ЛС досушивали при температуре $+20^{\circ}\text{C}$ в течение примерно 3 ч, контролируя остаточное давление в сублимационной камере.

В ходе работы получено 12 образцов лиофилизатов ЯФХ- и СФХ-липосом. Все лиофилизаты представляли собой сухую пористую массу белого цвета, которая легко регидратировалась водой для инъекций. Получаемые при этом липосомальные дисперсии оценивали по следующим характеристикам:

- размер везикул;
- PDI;
- ζ -потенциал;
- pH и
- вязкость.

Основные результаты приведены в Таблице 12.

Из данных, представленных в Таблице 12, видно, что при использовании для лиофилизации трегалозы, глюкозы и сахарозы размер частиц липосом после регидратации практически не отличался от размера частиц липосомальной дисперсии после экструзии (без использования криопротектора). При введении в

дисперсию для лиофилизации 5%-го или 10%-го раствора лактозы происходило значительное увеличение размера везикул от 190 нм (ЯФХ) и 174 нм (СФХ) до 328 и 456 нм, соответственно. При использовании лактозы также значительно повышалась вязкость дисперсий с ЯФХ, что свидетельствует о недостаточном протективном действии криопротектора. Когда в раствор МОВ вводили растворы глюкозы, наблюдали существенное уменьшение поверхностного заряда липосомальных частиц, что может свидетельствовать о деструкции липосом. Следует также отметить гигроскопичность глюкозы, которая может влиять на стабильность лиофилизированных липосом при хранении.

Таблица 12 – Влияние криопротекторов на параметры липосом¹

Криопротектор	Размер везикул ² , нм	PDI ²	ζ-потенциал ² , мВ	pH ²	Вязкость ² , мПа·с
ЯФХ-липосомы					
глюкоза 5 %	168±10	0,227±0,021	-16,2±2	7,8	11,1±1
глюкоза 10 %	194±10	0,260±0,017	-13,7±2	7,9	11,2±2
лактоза 5 %	284±30	0,370±0,029	-26±2	8,1	13,2±1
лактоза 10 %	328±30	0,411±0,045	-25,1±2	8,0	12,4±1
сахароза 5 %	185±10	0,201±0,020	-19,2±2	8,1	6,5±1
сахароза 10 %	177±10	0,195±0,017	-19,9±2	8,0	6,9±1
СФХ-липосомы					
трегалоза 5 %	179,3±9,1	0,341	-21,8±2,8	6,7	3,1±1
трегалоза 10%	219,2±26,3	0,294	-21,7±1,4	6,6	5,0±1
лактоза 5 %	152,7±20,8	0,365	-20,6±5,6	6,8	3,2±1
лактоза 10 %	456,3±29,7	0,384	-15,9±1,2	6,8	5,4±1
сахароза 5 %	278,8±8,9	0,354	-27,4±2,9	7,3	3,0±1
сахароза 10%	168,1±3,3	0,188	-23,0±1,7	7,3	3,9±1

Источник: составлено автором

Примечание – ¹результаты получены после регидратации лиофилизата; ²среднее значение из 3 определений

ЯФХ- и СФХ-липосомы, полученные при лиофилизации с сахарозой, имели оптимальные размеры и сохраняли размер частиц дисперсии МОВ в пределах от 170 до 200 нм. PDI также был самым низким при использовании 10%-го раствора

сахарозы, что свидетельствует о получении монодисперсного продукта. Кроме того, при использовании сахарозы после гидратации получали дисперсии с наименьшей вязкостью (6,5–6,9 мПа·с).

В Таблице 13 приведены данные о количестве бракованных флаконов при использовании различных криопротекторов (бракованной считали ЛЛФ, в которой визуально видно, что лиофилизат не досушен).

Таблица 13 – Уровень брака при лиофилизации с различными криопротекторами

Криопротектор	% недосушенных флаконов	
	5%-й раствор КП	10%-й раствор КП
Трегалоза	90	70
Лактоза	90	90
Сахароза	70	0

Источник: составлено автором

Из данных Таблицы 13 видно, что самый низкий уровень брака получали при использовании 10%-го раствора сахарозы.

На основании всех полученных данных для лиофилизации в качестве криопротектора выбрана сахароза; а технологической стадией введения криопротектора, стала стадия ТП-4.3 (Рисунок 9). Следует также отметить, что растворимость сахарозы в воде позволяет получить 10%-й раствор сахарозы в дисперсии, а также не создает дополнительных трудностей при контроле качества ЛЛФ.

Как видно из результатов, представленных в Таблице 12, СФХ-липосомы с сахарозой также обладали необходимыми характеристиками. Однако в настоящей работе не удалось подобрать режим лиофилизации дисперсий СФХ-липосом, который позволил бы получать качественный продукт, поэтому в дальнейших исследованиях использовали липосомы на основе яичного ФХ.

Проведенные исследования позволили разработать лабораторную технологию получения ЛЛФ-лио, которая кратко описана ниже и представлена в виде блок-схемы на Рисунке 9.

Краткое описание технологического процесса получения ЛЛФ-лио

Рассчитанные количества ГФТ, липидных компонентов и холестерина (точные навески) растворяют в хлороформе при постоянном перемешивании. Полученные растворы объединяют и тщательно перемешивают на шейкере.

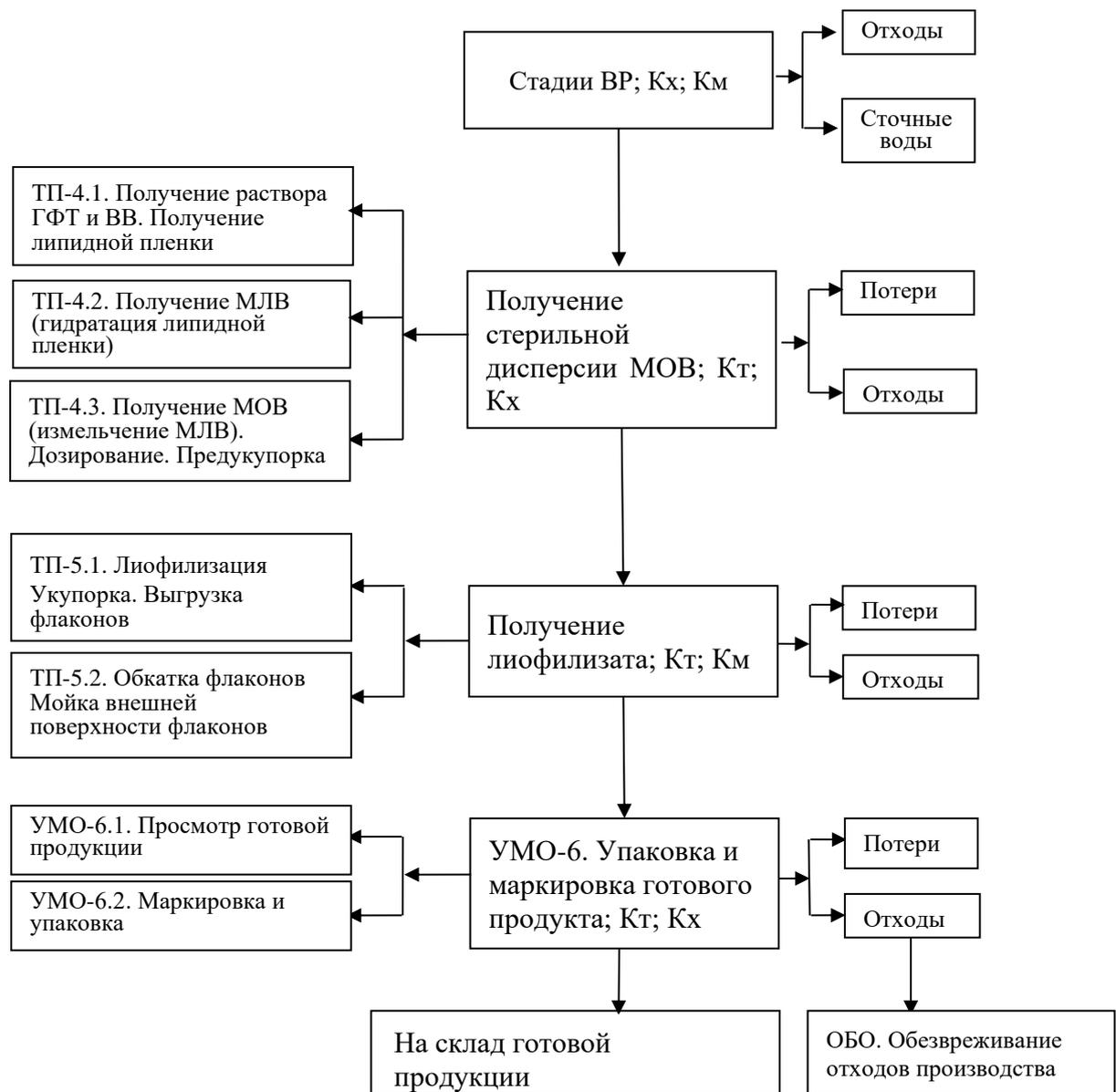


Рисунок 9 – Блок-схема технологического процесса получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гефитиниба
 Источник: составлено автором

Полученный раствор количественно переносят в круглодонную колбу вместимостью 1000 мл и отгоняют хлороформ на роторном испарителе при постоянном перемешивании под вакуумом (200 – 300 мбар) при температуре

водяной бани 40 ± 2 °С до формирования однородной полупрозрачной липидной пленки. Пленку досушивают под глубоким вакуумом (500 – 1000 мбар) в течение 40 мин и гидратируют, прибавляя рассчитанное количество воды для инъекций. Получают дисперсию МЛВ гефитиниба. МЛВ последовательно экстрадируют через нейлоновые фильтры с размером пор 1,2 мкм – 1 раз; 0,45 мкм – 1 раз и 0,22 мкм – 3 раза.

В полученной дисперсии МОВ растворяют рассчитанное количество сахарозы (точная навеска), перемешивают до полного растворения и экстрадируют через нейлоновый фильтр с размером пор 0,22 мкм. Полученную дисперсию разливают по 5 мл во флаконы темного стекла вместимостью 20 мл и укупоривают резиновыми пробками для лиофильных продуктов.

Наполненные и прекупоренные флаконы, помещенные в металлические кассеты, устанавливают на полки сублимационной установки и проводят лиофильную сушку МОВ гефитиниба в соответствии с программой лиофилизации.

Подробно все стадии технологического процесса получения ЛЛФ-лио гефитиниба описаны в проекте Лабораторного регламента (Приложение А).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

В результате проведенных исследований выбран оптимальный состав липосом гефитиниба с массовыми соотношениями компонентов ГФТ/ЯФХ 1:187,5; ЯФХ/Хол/ ПЭГ-ДСФА-2000 83,3/6,7/1 и ГФТ/СФХ 1:60; СФХ/Хол/ ПЭГ-ДСФА-2000 53,3/5,3/1. Использование указанных композиций позволяет получить однородные по размеру липосомальные частицы диаметром менее 200 нм с высокой эффективностью включения ДВ (до 99%).

Разработана технология получения липосомальной лекарственной формы ГФТ. Гефитиниб и компоненты липосомальной мембраны растворяли в хлороформе, который удаляли в выбранных условиях (вакуум 200 – 300 мбар, 40 ± 2 °С). Дисперсию мультиламелярных везикул получали при гидратации липидной пленки водой для инъекций с последующей экстразией через

нейлоновые фильтры. Показано, что 3 цикла экструзии позволяют получить МОВ с оптимальными характеристиками – размер липосом около 190 нм для частиц с ЯФХ и около 185 нм для СФХ-липосом, слабо отрицательный заряд поверхности липосом (около –20 мВ и – 24 мВ для ЯФХ и СФХ, соответственно), эффективность включения ГФТ – более 98%.

Для стабилизации малых моноламеллярных липосом во время лиофилизации в качестве криопротектора выбран 10%-й водный раствор сахарозы, который вводили в дисперсию непосредственно перед замораживанием. После гидратации лиофильно высушенных липосом их основные характеристики не изменялись. Каждый флакон разработанной ЛЛФ-лио гефитиниба содержит ГФТ/ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДСФА/сахароза 2/375/30/4,5/500 (мг/флакон).

На основании проведенных исследований разработана технологическая схема и лабораторный регламент получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гефитиниба.

ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГЕФИТИНИБА

Уникальные процессы получения и сложные физико-химические свойства ЛЛП предъявляют особые требования к их аналитическим характеристикам. Анализ научной литературы и нормативных документов, касающихся разработки и контроля качества липосомальных ЛС, позволяет выделить несколько критичных показателей для качества липосом (critical quality attributes, CQAs) ЛЛП [18; 23; 87] (CQA– это физическое, химическое, биологическое или микробиологическое свойство, которое может влиять на качество или характеристики готового продукта). CQAs и их влияние на фармацевтико-технологические и фармакологические свойства липосом представлены на Рисунке 4 (*ГЛАВА 1*).

Для определения основных характеристик использовали методики, описанные в *ГЛАВЕ 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ* и в [7]. Методики количественного определения ГФТ в липосомах, эффективности включения и высвобождения ГФТ разработаны в ходе выполнения диссертационного исследования.

4.1 Разработка методики количественного определения гефитиниба

Несмотря на разнообразие методов количественного определения ГФТ, описанных в научной литературе, для количественного определения ГФТ в липосомах чаще других используют метод спектрофотометрии, который отличается простотой, специфичностью и низкой стоимостью [78; 95; 190].

На первом этапе разработки методики количественного определения ГФТ в ЛЛФ изучили спектры поглощения действующего вещества и вспомогательных веществ.

В электронном спектре поглощения (ЭСП) раствора ГФТ в ДМСО (0,01 мг/мл) в области от 200 нм до 400 нм наблюдают максимумы поглощения при длинах волн (332 ± 2) нм и (259 ± 2) нм (Рисунок 10).

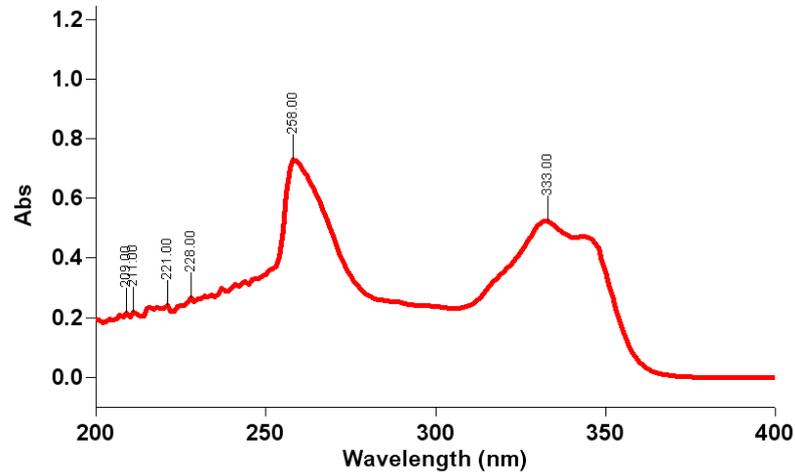


Рисунок 10 – Электронный спектр поглощения ГФТ (раствор в ДМСО 0,01 мг/мл)
Источник: получено автором

Поскольку компоненты липидного слоя (ЯФХ/СФХ, ХОЛ и ПЭГ-2000-ДСФА) растворимы в этаноле, а ГФТ – в ДМСО, при разработке методики в качестве растворителя использовали смесь ДМСО и этанола (1:75).

В качестве аналитического выбрали наиболее интенсивный и стабильный максимум поглощения при длине волны (332 ± 2) нм.

Предварительно показали, что растворы ГФТ в ДМСО при разбавлении этиловым спиртом остаются прозрачными и их спектральные характеристики в аналитической области от 300 до 400 нм не изменяются (Рисунок 11). Растворы готовили следующим образом: около 10 мг ГФТ (точная навеска) растворяли в 1 мл ДМСО, прибавляли около 10 мл этанола, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки этанолом. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки этанолом, перемешивали.

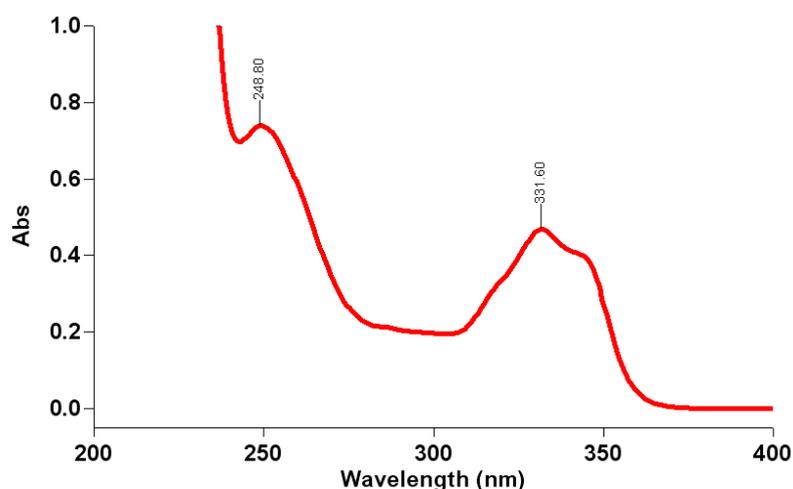


Рисунок 11 – Электронный спектр поглощения раствора ГФТ (раствор в смеси растворителей ДМСО-этиловый спирт 1:75 0,01 мг/мл)

Источник: получено автором

Разработка методики включала исследование зависимости интенсивности поглощения от концентрации ГФТ в растворах (проверка соблюдения закона Бугера-Ламберта-Бера). Для этого готовили растворы ГФТ различной концентрации в смеси ДМСО-этанол и измеряли оптическую плотность полученных растворов при длине волны (332 ± 2) нм (Таблица 14).

Таблица 14 – Зависимость оптической плотности растворов ГФТ от их концентрации при длине волны (332 ± 2) нм

Концентрация раствора ГФТ, мг/мл	Оптическая плотность раствора
0,003	0,168
0,005	0,274
0,008	0,431
0,010	0,549
0,015	0,804

Источник: составлено автором

Полученные результаты использовали для графического выражения зависимости «концентрация раствора – оптическая плотность». Построенная зависимость была линейной в диапазоне концентраций от 0,003 до 0,015 мг/мл (Рисунок 12), то есть в данном диапазоне соблюдается закон Бугера-Ламберта-Бера.

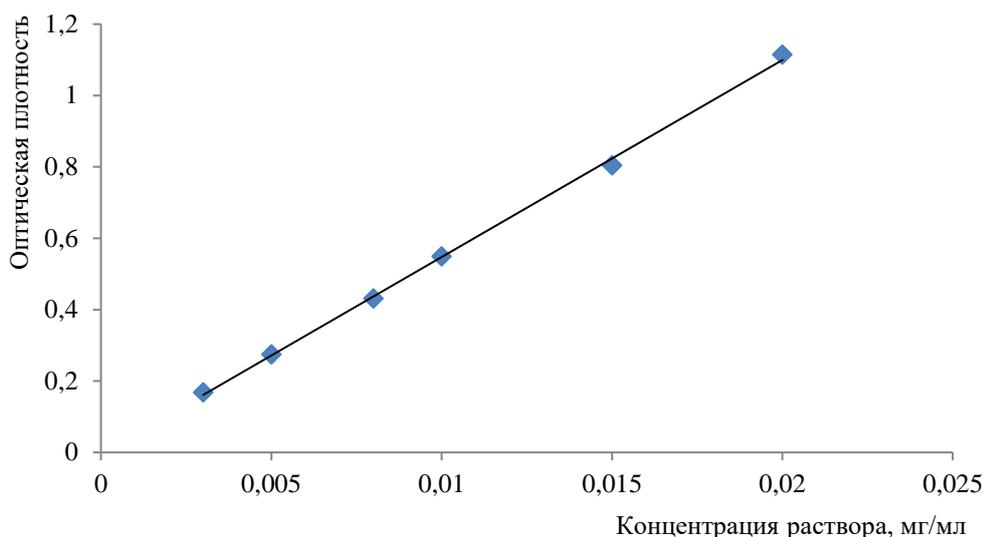


Рисунок 12 – Зависимость оптической плотности растворов ГФТ в смеси растворителей ДМСО – этанол 1:75 от концентрации

Источник: составлено автором

На следующем этапе работы проанализировали спектральные характеристики компонентов липосомального бислюя (Таблица 15).

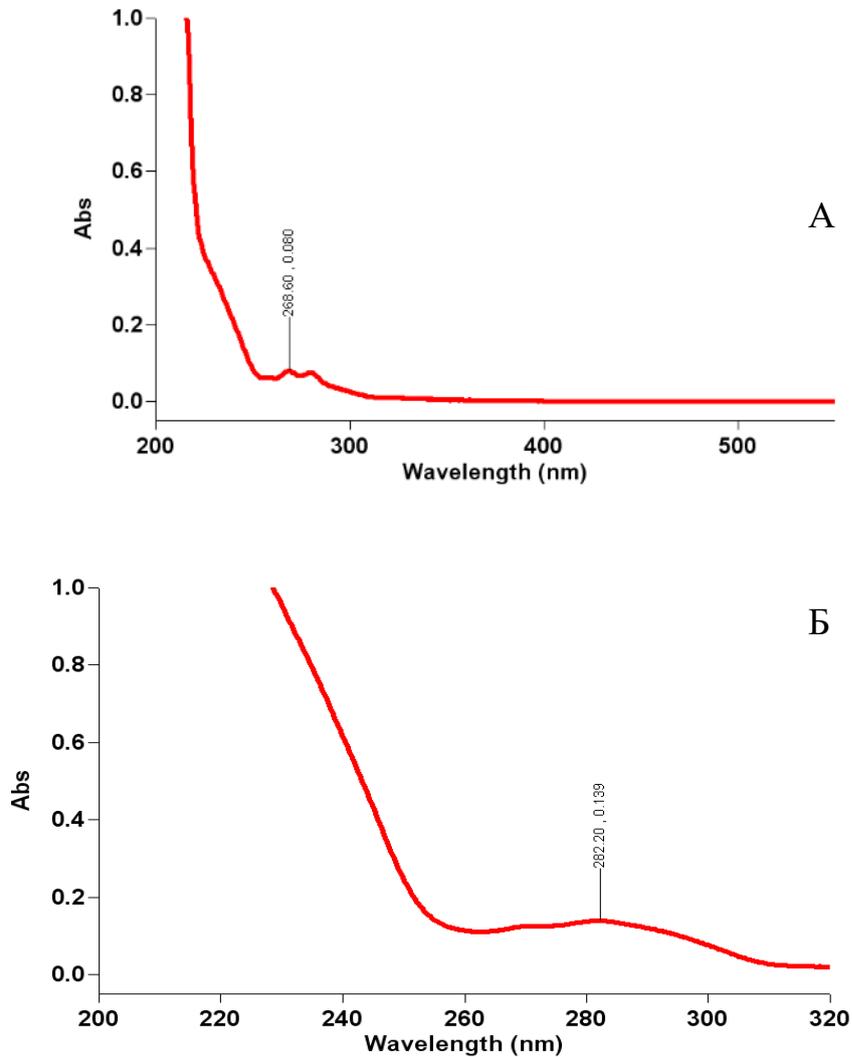
Таблица 15 – Спектральные характеристики компонентов липосомальной дисперсии

Компонент липосомального бислюя	Максимум поглощения (длина волны, ± 2 нм)
PEG - DSPE	250-320
Холестерин	280,0
ЯФХ	279,6
	268,2
СФХ	283,4
ЯФХ + холестерин	279,6
	268,2
СФХ+ холестерин	282,0
Ненагруженные липосомы ЯФХ	279,8
	268,4
Ненагруженные липосомы СФХ	282,2

Источник: составлено автором

Из данных, представленных в Таблице 15, видно, что ЭСП компонентов липосом в области от 200 нм до 400 нм содержат пики при длинах волн (268 ± 2) нм, (279 ± 2) нм и (282 ± 2) нм. Несмотря на то, что эти максимумы располагаются

довольно близко к аналитическому сигналу (332 ± 2 нм), они не влияют на его количественную характеристику и не мешают количественному определению ГФТ в липосомальной дисперсии (Рисунок 13).



А – ЯФХ-липосомы; Б – СФХ-липосомы

Рисунок 13 – Электронный спектр поглощения раствора липидных компонентов в смеси растворителей ДМСО – этанол 1:75

Источник: получено автором

В методику анализа введен способ расчета по стандартному образцу, в качестве которого использовали субстанцию ГФТ, из которой получали липосомальную дисперсию. При расчетах учитывали чистоту субстанции, в качестве раствора сравнения использовали этиловый спирт.

Методика количественного определения ГФТ в липосомальной дисперсии

Испытуемый раствор. 1 мл липосомальной дисперсии помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 1 мл ДМСО, встряхивают и прибавляют около 10 мл этанола, перемешивают и доводят этанолом до метки, перемешивают.

Раствор стандартного образца (СО) ГФТ. Около 2 мг ГФТ (точная навеска) растворяют в 1 мл ДМСО, прибавляют около 10 мл этанола, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят этанолом до метки. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят этанолом до метки, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора относительно этанола на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны (332 ± 2) нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО ГФТ.

Содержание ГФТ в липосомальной дисперсии (X, мг/мл) вычисляют по формуле (2):

$$X = \frac{A \times a_0 \times 5 \times 50 \times C}{A_0 \times 50 \times 25 \times 100} = \frac{A \times a_0 \times C}{A_0 \times 500} \quad (2)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО ГФТ;

a_0 – навеска СО ГФТ, мг;

C – содержание ГФТ в субстанции, %.

Результаты количественного определения ГФТ в образцах липосомальной дисперсии, представленные в Таблице 16, свидетельствуют о том, что разработанная методика позволяет достоверно определить количество ГФТ в липосомальной дисперсии.

Как указано в ГЛАВЕ 3, для получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ-лио), содержащей ЯФХ, в качестве криопротектора выбрали 10%-й раствор сахарозы. Этот олигосахарид не имеет хромофора и его водные растворы прозрачны в используемой аналитической области.

Таблица 16 – Результаты количественного определения ГФТ в липосомальной дисперсии

Образец	Оптическая плотность испытуемого раствора	Найдено ГФТ ¹	
		мг/мл	% от номинального
ЯФХ-липосомы (номинальное содержание ГФТ – 0,4 мг/мл)			
1	0,400	0,402	100,5
2	0,424	0,426	106,5
3	0,372	0,374	93,5
СФХ-липосомы (номинальное содержание ГФТ – 0,8 мг/мл)			
1	0,817	0,813	101,6
2	0,811	0,807	100,9
3	0,800	0,796	99,5

Источник: составлено автором

Примечание – ¹навеска СО $a_0 = 2,174$ мг; оптическая плотность раствора СО $A_0 = 0,435$

Поскольку сахара очень мало растворима в этиловом спирте, для приготовления испытуемого раствора к содержимому флакона с ЛЛФ-лио прибавляли воду, а затем ДМСО и этанол. При этом получали прозрачный раствор, ЭСП которого по форме и положению максимума в аналитической области соответствовал спектру раствора ГФТ в смеси ДМСО-этанол (Рисунок 14).

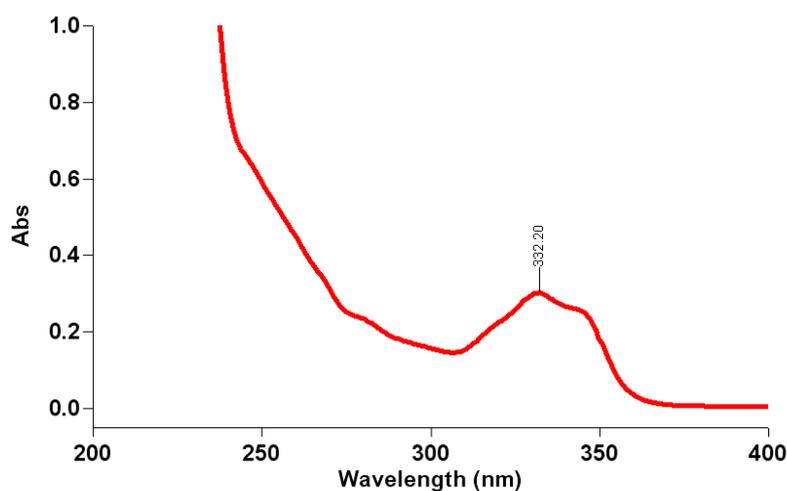


Рисунок 14 – Электронный спектр поглощения раствора ЛЛФ-лио в смеси растворителей ДМСО–этанол (1:75)

Источник: получено автором

Методика количественного определения ГФТ в ЛЛФ-лио

Испытуемый раствор. К содержимому флакона прибавляют 5 мл воды, 1 мл ДМСО, около 10 мл этанола, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки этанолом. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки этанолом, перемешивают.

Раствор стандартного образца (СО) ГФТ готовят, как описано в *методике количественного определения ГФТ в липосомальной дисперсии*.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора относительно этанола на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны (332 ± 2) нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО ГФТ.

Содержание ГФТ в ЛЛФ-лио (X, мг) вычисляют по формуле (3):

$$X = \frac{A \times a_0 \times 5 \times 50 \times 25 \times C}{A_0 \times 5 \times 50 \times 25 \times 100} = \frac{A \times a_0 \times C}{A_0 \times 100} \quad (3)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО ГФТ;

a_0 – навеска СО ГФТ, мг;

C – содержание ГФТ в субстанции, %.

Результаты количественного определения ГФТ в образцах ЛЛФ-лио представлены в Таблице 17.

Результаты количественного определения ГФТ в образцах липосомальной дисперсии, представленные в Таблице 16, свидетельствуют о том, что разработанная методика позволяет достоверно определить количество ГФТ в липосомальной дисперсии.

Таблица 17 – Результаты количественного определения ГФТ в образцах ЛЛФ-лио

Образец	Оптическая плотность испытуемого раствора	Найдено ГФТ, мг ¹	Метрологические характеристики
1	0,418	2,137	$\bar{x} = 2,10$ мг $S = 0,0371$ $S\bar{x} = 0,0151$ $\Delta\bar{x} = 0,0389$ $\bar{\varepsilon} = 1,85$ %
2	0,413	2,114	
3	0,385	1,975	
4	0,408	2,090	
5	0,413	2,111	
6	0,375	1,918	

Источник: составлено автором

Примечание – ¹навеска СО $a_0 = 2,328$ мг; оптическая плотность раствора СО $A_0 = 0,449$

4.2 Валидация методики количественного определения гефиниба в липосомальной лекарственной форме

На первом этапе рассчитали критерии приемлемости методики:

- полная неопределенность пробоподготовки $\Delta_{SP,r} = 1,20\%$;
- неопределенность конечной аналитической операции (спектрофотометрии) $\Delta_{FAO,r} = 0,30\%$;
- полная прогнозируемая неопределенность $\Delta_{As,r} = 1,24\%$;
- максимальная полная неопределенность результатов анализа $\max \Delta_{As} = 3,2\%$ [17].

Из приведенных выше данных видно, что полная прогнозируемая неопределенность значительно меньше рассчитанной максимальной неопределенности результатов анализа, а основной вклад в погрешность методики вносит неопределенность пробоподготовки.

В ходе исследования определяли следующие валидационные характеристики:

- специфичность,
- линейность,
- правильность,

- прецизионность (повторяемость и внутрिलाбораторная прецизионность),
- предел обнаружения и предел количественного определения.

Специфичность разработанной методики характеризовали как способность оценивать ГФТ в присутствии компонентов липосом. Как сказано выше, максимумы поглощения ВВ располагаются достаточно близко к аналитическому сигналу ГФТ (332 ± 2 нм), однако они не влияют на спектральные характеристики ГФТ и не мешают его количественному определению в ЛЛФ-лио (Рисунки 11, 13).

Линейность методики определяли, как прямо пропорциональную зависимость аналитического сигнала (оптической плотности) от концентрации ГФТ в образце в пределах аналитической области методики (Таблица 18). Исследование проводили для 7 уровней концентрации ГФТ в образцах в области от 70% до 130%.

Таблица 18 – Определение параметров линейной зависимости методики количественного определения ГФТ в ЛЛФ-лио

Содержание ГФТ в образце		Оптическая плотность ²	Параметры линейной зависимости				
% от номинального ¹	мг						
70	1,4	0,295	$y = 0,1871x + 0,031$ Угловой коэффициент линейной зависимости $b = 0,1871$ Свободный член линейной зависимости $a = 0,031$ Коэффициент корреляции $r = 0,9994$				
80	1,6	0,328					
90	1,8	0,364					
100	2,0	0,410					
110	2,2	0,434					
120	2,4	0,481					
130	2,6	0,516					
\bar{x} , мг	S_0^2	S_a	S_b	Δa	t_a	$t_{\text{табл}}$	Δb
2,0	$6,05 \times 10^{-5}$	$1,50 \times 10^{-2}$	$7,35 \times 10^{-3}$	0,0385	2,07	2,57	0,0189

Источник: составлено автором

Примечание – ¹номинальное значение 2 мг, ²среднее значение из трех определений

Как видно из данных, представленных в Таблице 18, разработанная методика линейна, описывается уравнением $y = 0,1871x + 0,031$ и соответствует рекомендуемым условиям:

- рассчитанное значение $t_a < t_{\text{табл}}(95,5)$, то есть величина свободного члена линейной зависимости статистически незначима;
- рассчитанный коэффициент корреляции r равен 0,998 и соответствует рекомендуемому условию $|r| \geq 0,99$ [16].

Графически линейность разработанной методики представлена на Рисунке 15.

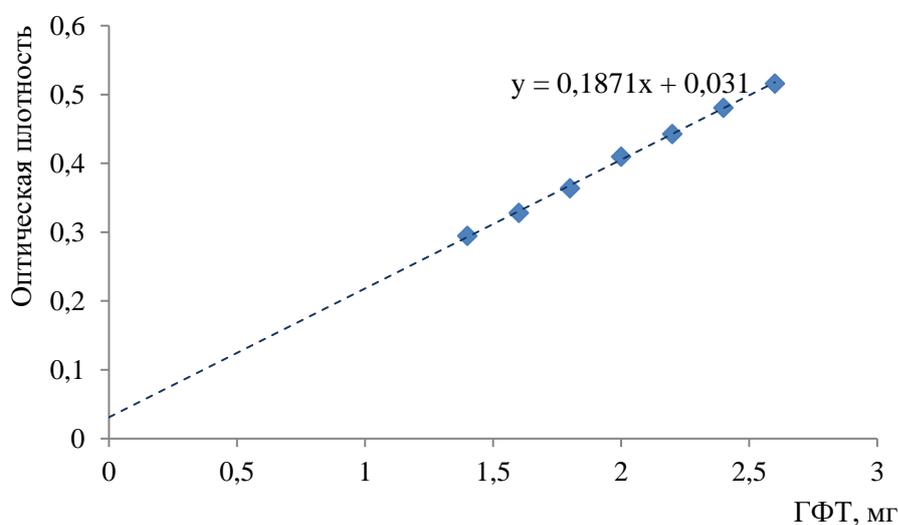


Рисунок 15 – Линейная зависимость оптической плотности от количества ГФТ в образце

Источник: составлено автором

Под *правильностью* разработанной методики понимали близость между истинным значением и полученным результатом [7; 16; 17]. Правильность определяли на моделях ЛЛФ-лио, содержащих ГФТ на трех уровнях концентраций 70%, 100% и 130%, и выражали как открываемость, % (Таблица 19).

Данные, представленные в Таблице 19, свидетельствуют о том, что полученные результаты не отягощены систематической ошибкой и методика может считаться правильной в изученном диапазоне концентраций (от 70 до 130%), поскольку:

- относительная ошибка среднего результата ($\bar{\epsilon}$) – 1,65%,

- результаты лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$) = 99,67±1,64 и приближаются к истинному значению;
- вычисленное значение критерия Стьюдента меньше табличного ($t_{\text{вычисл.}} = 1,39 < t_{\text{табл.}} = 2,31$);
- систематическая погрешность статистически неотличима от нуля ($\delta = 0,33$).

Таблица 19 – Результаты определения правильности методики количественного определения ГФТ в ЛЛФ-лио

ГФТ					Открываемость, %	Среднее значение в трипликате, %	
Содержание от номинального, %	Включено, мг	Найдено, мг					
70	1,48	1,50			101,35	99,78	
	1,38	1,40			101,45		
	1,44	1,39			96,53		
100	2,02	2,03			100,50	99,36	
	2,07	2,04			98,55		
	2,06	2,04			99,03		
130	2,59	2,62			101,16	99,87	
	2,47	2,52			102,02		
	2,53	2,44			96,44		
Метрологические характеристики среднего результата							
\bar{x} , %	S^2	S	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$t(p,f)_{\text{табл.}}$	$t(p,f)_{\text{вычисл.}}$	$\bar{\varepsilon}$, %
99,67	4,55	2,13	0,71	1,64	2,31	1,39	1,65

Источник: составлено автором

Примечание – n=9, f=8, P=95 %

Как определено в [7, 16] *прецизионность* – это близость результатов между сериями измерений, проведенными на множестве проб, взятых из одной и той же однородной пробы, в условиях, предписанных методикой. Для разработанной методики прецизионность определяли на двух уровнях как повторяемость и промежуточную (внутрилабораторную) прецизионность. Полученные результаты приведены в Таблице 20.

При оценке повторяемости найдено:

- среднее содержание ГФТ в ЛЛФ-лио – 2,02 мг;
- относительная ошибка среднего результата – 1,87 %;
- значение критерия Стьюдента $t(P,f)_{\text{вычисл.}} = 1,23 < t(P,f)_{\text{табл.}} = 2,31$;

– относительное стандартное отклонение среднего результата (коэффициент вариации) – 0,81%.

То есть, полученные результаты не отягощены систематической ошибкой и являются повторяемыми.

Таблица 20 – Результаты определения повторяемости и внутрिलाбораторной прецизионности методики количественного определения ГФТ в ЛЛФ-лио

Опыт	Найдено ГФТ, мг								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Аналитик 1	2,09	1,98	1,99	2,07	2,04	2,02	1,99	2,03	1,93
Аналитик 2	2,05	2,04	1,98	1,95	2,05	1,97	2,03	1,96	2,08
Метрологические характеристики									
\bar{x} , мг	\bar{x} , %	S, мг	S, %	$\Delta\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$, %	Δ_{\max} , %	$t(P,f)_{\text{вычис.}}$	$\bar{\epsilon}$, %	
2,02	101,0	0,0490	0,2426	0,0377	0,1868	0,87	1,23	1,87	
2,01	100,5	0,0474	0,2358	0,0365	0,1816		0,63	1,81	

Источник: составлено автором

Примечание – $n=9$, $f=8$, $P=95\%$, $t(P,f)_{\text{табл}} = 2,31$; верхняя нормируемая граница, $V_n - 110\%$; нижняя нормируемая граница, $V_1 - 90\%$; $k = 0,32$

Внутрिलाбораторную прецизионность оценивали, сравнивая результаты, полученные двумя аналитиками, с максимально допустимой относительной неопределенностью анализов $\max\Delta_{As} = 3,2\%$ (Таблица 20). Поскольку определенное $\Delta_{\max} = 0,87\%$ значительно меньше указанного значения, методику можно считать соответствующей требованиям по внутрिलाбораторной прецизионности.

Так как линейность, правильность и прецизионность разработанной методики установлены в интервале от 70 до 130% содержания ГФТ в образцах, данный диапазон можно считать аналитической областью методики и использовать ее не только для количественного определения, но и для определения однородности дозирования ГФТ в ЛЛФ-лио [14].

Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО), рассчитывали с использованием параметров линейной зависимости (Таблица 18) по формулам, приведенным в [7; 14]. Вычисленные ПО и ПКО составили 0,26 мг и 0,80 мг ГФТ, соответственно.

4.3 Определение однородности дозирования гефитиниба в лиофилизированной липосомальной лекарственной форме

Определение однородности дозирования ГФТ в ЛЛФ-лио проводили в соответствии с ОФС.1.4.2.0008, способ 1 [7].

Для этого из партии ЛЛФ-лио отбирали случайным образом 30 флаконов, а из них – 10 флаконов для проведения первого этапа испытания и проводили количественное определение ГФТ по методике, описанной в *разделе 4.1*.

Содержание ГФТ во флаконе в процентах от номинального содержания (X, %) рассчитывали по формуле (4):

$$X = \frac{A \times a_0 \times 5 \times 50 \times 25 \times 100}{A_0 \times 5 \times 50 \times 25 \times 2} = \frac{A \times a_0 \times 50}{A_0} \quad (4)$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность раствора СО;

a₀ – навеска СО, мг;

2 – номинальное содержание ГФТ во флаконе, мг.

Таблица 21 – Определение однородности дозирования ГФТ в образце ЛЛФ-лио

Флакон	Оптическая плотность испытуемого раствора	Найдено ГФТ ¹		Показатели приемлемости
		мг	X, %	
1	0,399	1,97	98,50	f = n-1 = 9 k = 2,4 $\bar{X} = 102,78\%$ S = 5,28 M = 101,50 AV = 13,96 ≤ 15,00
2	0,433	2,14	107,00	
3	0,417	2,06	103,00	
4	0,404	2,00	99,83	
5	0,417	2,06	103,00	
6	0,401	1,98	99,00	
7	0,447	2,21	110,50	
8	0,443	2,19	109,47	
9	0,378	1,87	93,50	
10	0,421	2,08	104,00	

Источник: составлено автором

Примечание – ¹навеска СО a₀=2,308 мг; оптическая плотность раствора СО A₀=0,467

Как видно из данных, представленных в Таблице 21, однородность дозирования ГФТ в ЛЛФ-лио, 2 мг соответствовала требованиям ГФ РФ7], то есть приемлемое значение для первых 10 дозированных единиц (13,96) меньше $L1$ (15).

При валидации методики количественного определения ГФТ в липосомах аналитическая область расширена до диапазона от 70 до 130% от номинального значения и показано, что методика обеспечена приемлемой правильностью и линейностью в данном экстремальном диапазоне (*Раздел 4.2*). То есть, методику можно считать валидированной и для теста Однородность дозирования.

4.4 Определение эффективности включения гефитиниба в липосомы

Как указано в *ГЛАВЕ 3*, ЭВ представляет собой отношение количества ЛС, включенного в липосомы, к общему количеству ЛС. Поскольку ЭВ влияет на фармакокинетические и фармакодинамические свойства *in vivo*, данный показатель является критическим для качества ЛЛП. При определении ЭВ проводят определение, по крайней мере, двух из трех параметров:

- общего количества ЛС;
- количества инкапсулированного ЛС
- и/или свободного лекарственного средства.

4.4.1 Определение включения гефитиниба в мультиламеллярные везикулы

При выборе оптимального состава ЛЛФ для определения ЭВ ГФТ в МЛВ проводили количественное определение ГФТ в липосомальной дисперсии до и после экструзии через нейлоновые фильтры с диаметром пор 1,2 мкм и 0,45 мкм.

В исследовании использовали *методику количественного определения ГФТ в липосомальной дисперсии*, вычисляя содержание ГФТ в липосомальной дисперсии (X, мг/мл) по формуле (2).

ЭВ, выраженную в %, рассчитывали по формуле (5):

$$\text{ЭВ} = C_{\text{МЛВ}} / C_{\text{дэкстр}} \times 100 \% \quad (5),$$

где $C_{\text{МЛВ}}$ – количество ГФТ в дисперсии МЛВ, мг/мл;

$C_{\text{дэкстр}}$ – количество ГФТ в липосомальной дисперсии до экструзии, мг/мл.

Как указано в *ГЛАВЕ 3*, для дальнейших исследований отобрали липосомальные дисперсии модельного состава 5 (с ЯФХ – ЭВ 97,50%) и 3 (с СФХ – ЭВ 97,53%).

Таблица 22 – Эффективность включения ГФТ в МЛВ различных составов

Модель ¹	Оптическая плотность испытуемого раствора ²		Найдено ГФТ, мг/мл ²		ЭВ, % ²
	До экструзии	МЛВ	До экструзии	МЛВ	
Модельные составы с ЯФХ					
1	0,410	0,180	0,412	0,181	43,90
2	0,431	0,241	0,433	0,242	55,81
3	0,411	0,297	0,413	0,298	72,09
4	0,390	0,330	0,392	0,332	84,62
5	0,392	0,382	0,394	0,384	97,50
6	0,396	0,496	0,398	0,398	99,98
Модельные составы с СФХ					
1	0,825	0,573	0,829	0,576	69,51
2	0,808	0,739	0,812	0,742	91,36
3	0,807	0,790	0,811	0,794	97,53
4	0,807	0,797	0,811	0,801	98,77
5	0,800	0,790	0,804	0,794	98,75
6	0,801	0,791	0,805	0,795	98,76

Источник: составлено автором

Примечание – ¹состав моделей приведен в Таблицах 3 и 4; ²среднее значение из 3 определений

4.4.2 Определение эффективности включения гефинибина в малые однослойные везикулы

По данным, представленным в Таблице 22, видно, что в МЛВ выбранных составов инкапсулируется более 97,5% ГФТ. То есть, концентрация свободного ГФТ и, соответственно, оптическая плотность растворов свободного ГФТ будет слишком мала для его достоверного количественного определения. Поэтому для оценки ЭВ ГФТ в МОВ проводили определение общего количества ГФТ и количества инкапсулированного ГФТ. Отделение свободного ДВ от липосом, нагруженных ГФТ, проводили центрифугированием.

Для этого 2 мл дисперсии МОВ выбранных составов центрифугировали в течение 1 часа при скорости вращения ротора 10000 об/мин. Отделяли супернатант, к осадку прибавляли 1 мл ДМСО и 1 мл этанола, перемешивали. Количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли этанол, доводили этим же растворителем до метки, перемешивали. 5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили до метки этанолом, перемешивали.

Далее поступали, как описано в *методике количественного определения ГФТ в липосомальной дисперсии*.

Содержание ГФТ, инкапсулированного в МОВ, (X, мг/мл) вычисляли по формуле (6):

$$X = \frac{A \times a_0 \times 5 \times 25 \times 25}{A_0 \times 2 \times 50 \times 25 \times 5} = \frac{A \times a_0}{A_0 \times 4} \quad (6)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность раствора СО ГФТ;

a₀ – навеска СО ГФТ, мг.

Общее количество ГФТ определяли, разрушив липосомальную оболочку, по *методике количественного определения ГФТ в липосомальной дисперсии*.

ЭВ, % рассчитывали по формуле (7):

$$\text{ЭВ} = \frac{C_{\text{инкапс}} \times 100\%}{C_{\text{общее}}} \quad (7)$$

где $C_{\text{общее}}$ – общее количество ГФТ в липосомальной дисперсии, мг/мл;

$C_{\text{инкапс}}$ – количество инкапсулированного ГФТ в МОВ, мг/мл.

Результаты определения эффективности включения ГФТ в образцах МОВ представлены в Таблице 23.

Данные, представленные в Таблицах 22 и 23, свидетельствуют о том, что при экструзии выбранных составов (5 – для ЯФХ и 3 – для СФХ, соответственно), эффективность включения ГФТ в липосомальные везикулы не изменялась и составила более 97 %.

Таблица 23 – Эффективность включения ГФТ в МОВ

Образец ¹	Оптическая плотность раствора ²		Найдено ГФТ ² , мг/мл		ЭВ ² , %
	МОВ	дисперсии	инкапсулированного в МОВ	общее количество	
ЯФХ-МОВ					
1	0,321	0,367	0,388	0,397	97,66
2	0,283	0,349	0,391	0,408	95,83
3	0,344	0,391	0,379	0,384	98,75
Среднее значение			0,386	0,396	97,41
СФХ-МОВ					
1	0,606	0,619	0,788	0,805	97,82
2	0,615	0,624	0,800	0,811	98,67
3	0,582	0,591	0,756	0,768	98,46
Среднее значение			0,781	0,795	98,32

Источник: составлено автором

Примечание – ¹навеска СО $a_0=2,101$ мг; оптическая плотность раствора СО $A_0 = 0,404$;
²среднее значение из 3 определений

4.4.3 Эффективность включения гевитиниба в лиофилизированной липосомальной лекарственной форме

Определение эффективности включения ГФТ в ЛЛФ-лио проводили для липосом на основе ЯФХ. В этом случае оценивали общее количество ДВ и количество свободного ГФТ после гидратации лиофилизата.

Для этого ЛЛФ-лио гидратировали 2 мл воды для инъекций и центрифугировали в течение 1 часа при скорости вращения ротора 10000 об/мин. 1 мл супернатанта помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 1,0 мл ДМСО, перемешивали, доводили этанолом до метки, перемешивали. Далее поступали, как описано в *методике количественного определения ГФТ в липосомальной дисперсии*.

Содержание свободного ГФТ в липосомальной дисперсии (X, мг) вычисляли по формуле (8):

$$X = \frac{A \times a_0 \times 50 \times 10}{A_0 \times 50 \times 25} = \frac{A \times a_0}{A_0 \times 25} \quad (8)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность раствора СО ГФТ;

a₀ – навеска СО ГФТ, мг.

Общее количество ГФТ определяли, как описано в разделе *Методика количественного определения ГФТ в ЛЛФ-лио*.

ЭВ, %, рассчитывали по формуле (10):

$$\text{ЭВ} = \frac{(C_{\text{общее}} - C_{\text{свободн}}) \times 100\%}{C_{\text{общее}}} \quad (9)$$

где C_{общее} – общее количество ГФТ в липосомальной дисперсии, мг/мл;

C_{свободн} – количество свободного (неинкапсулированного) ГФТ в липосомальной дисперсии, мг/мл.

Результаты эффективности включения ГФТ в образцах ЛЛФ-лио на основе ЯФХ приведены в Таблице 24.

Таблица 24 – Эффективность включения ГФТ в ЛЛФ-лио

Образец	Найдено ГФТ, мг		Эффективность включения, %	Метрологические характеристики
	свободного	всего		
1	0,060	2,186	97,26	$\bar{x} = 97,04\%$ $S = 0,5870$ $s\bar{x} = 0,2396$ $\Delta\bar{x} = 0,62$ $\bar{\varepsilon} = 0,63 \%$
	0,042	2,138	98,04	
	0,062	1,920	96,78	
	0,056	1,896	97,05	
	0,077	2,074	96,29	
	0,071	2,241	96,83	
2	0,013	1,941	98,33	$\bar{x} = 98,41\%$ $S = 0,9197$ $s\bar{x} = 0,3755$ $\Delta\bar{x} = 0,97$ $\bar{\varepsilon} = 0,98 \%$
	0,004	2,325	99,83	
	0,059	2,111	97,21	
	0,023	1,839	98,75	
	0,045	1,917	97,65	
	0,023	1,742	98,68	

Источник: составлено автором

Данные Таблицы 24 показывают, что эффективность включения ГФТ в липосомы не снижалась после лиофилизации.

4.5 Исследование высвобождения гефитиниба из лиофилизированной липосомальной лекарственной формы *in vitro*

Основной целью тестов и методов, позволяющих оценить высвобождение ЛС, описанных в ГЛАВЕ 1, является прогнозирование фармакокинетики ЛП *in vivo* с помощью корреляции *in vitro-in vivo* (IVIVC) и, таким образом, уменьшить нагрузку на исследования *in vivo* для разработки ЛП [201].

Исследование высвобождения ГФТ из лиофилизированных ЯФХ-липосом *in vitro* проводили методом мембранного диализа по методике, разработанной в ходе исследования. Условия для изучения высвобождения ГФТ выбраны с учетом требований, приведенных в [192; 202] и данных научной литературы [78] – поскольку ГФТ практически нерастворим в воде, в качестве среды растворения использовали фосфатно-солевой буфер pH 7,4 (phosphate-buffered saline, PBS), содержащий 2 % полисорбата 80. Объем пробы внутри диализного мешка был в 10

раз меньше, чем объем среды высвобождения, то есть, поддерживали условия «достаточного разбавления».

Данные, полученные при разработке и валидации методики количественного определения ГФТ, позволили предположить, что при медленном высвобождении действующего вещества из липосом, его концентрация в среде высвобождения будет недостаточной для достоверного определения ГФТ (ГЛАВА 4, разделы 4.1 и 4.2). Поэтому проводили определение инкапсулированного ГФТ и определяли ГФТ, который не перешел в среду высвобождения.

Методика

Содержимое 1 флакона ЛЛФ-лио гидратировали 5 мл воды для инъекций (концентрация ГФТ 0,4 мг/мл). Полученную дисперсию переносили в диализный мешок (MWC0 = 12 КДа), запечатывали и помещали в коническую колбу, содержащую 50 мл среды высвобождения, колбу устанавливали в шейкер-инкубатор. Для каждой временной точки отбора проб использовали отдельный диализный мешок и проводили по три параллельных определения. Условия эксперимента приведены в Таблице 25.

Таблица 25 – Условия изучения высвобождения ГФТ из ЯФХ-липосом

Условие	Характеристика
Среда высвобождения	фосфатно-солевой буфер (PBS) pH 7,4, содержащий 2 % полисорбата 80
Объем среды высвобождения	50 мл ± 1%
Температура среды высвобождения	37 °C ± 0,5°C
Скорость перемешивания	100 ± 2 об./мин
Продолжительность исследования	до 48 часов
Время отбора проб	1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 и 48 ч
Длина волны анализа	332 ± 2 нм

Источник: составлено автором

Через временные промежутки, указанные в Таблице 25, диализный мешок вынимали из среды и его содержимое количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл (для проб 0, 1, 2, 4 и 8 ч) или 25 мл (для проб 12, 24 и 36 ч) или

10 мл. Прибавляли 1 мл ДМСО и доводили спиртом 96% до метки, перемешивали (испытуемый раствор).

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора СО ГФТ, приготовленного как описано в разделе «Разработка методики количественного определения ГФТ».

Измеряли оптическую плотность испытуемого раствора относительно этанола на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны (332 ± 2) нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм. В расчетах учитывали ЭВ, %.

Количество ГФТ, не перешедшего в среду высвобождения (X, мг) вычисляли по формуле (10):

$$X = \frac{A \times a_0 \times 5 \times 50 \times L \times 100}{A_0 \times 50 \times 25 \times 100} = \frac{A \times a_0 \times L}{A_0 \times V} \quad (10)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО ГФТ;

a_0 – навеска СО ГФТ, мг;

V – разведение;

L – эффективность включения ГФТ, %.

Количество ГФТ, не перешедшего из липосом в среду высвобождения (X, %) вычисляли по формуле (11):

$$\text{ЭВ} = \frac{C_t \times 100 \%}{C_{\text{начальн.}}} \quad (11)$$

где C_t – количество инкапсулированного ГФТ (не перешедшего в среду высвобождения) во временной точке t, мг;

$C_{\text{начальн.}}$ – начальное количество инкапсулированного ГФТ, мг.

Результаты количественного определения ГФТ в образцах представлены в Таблице 26.

Экспериментальный профиль высвобождения ГФТ из липосом графически представлен на Рисунке 16.

Данные, представленные в Таблице 26 и на Рисунке 16, свидетельствуют о постепенном высвобождении ГФТ из липидного бислоя.

Таблица 26 – Результаты изучения высвобождения ГФТ из ЯФХ-липосом

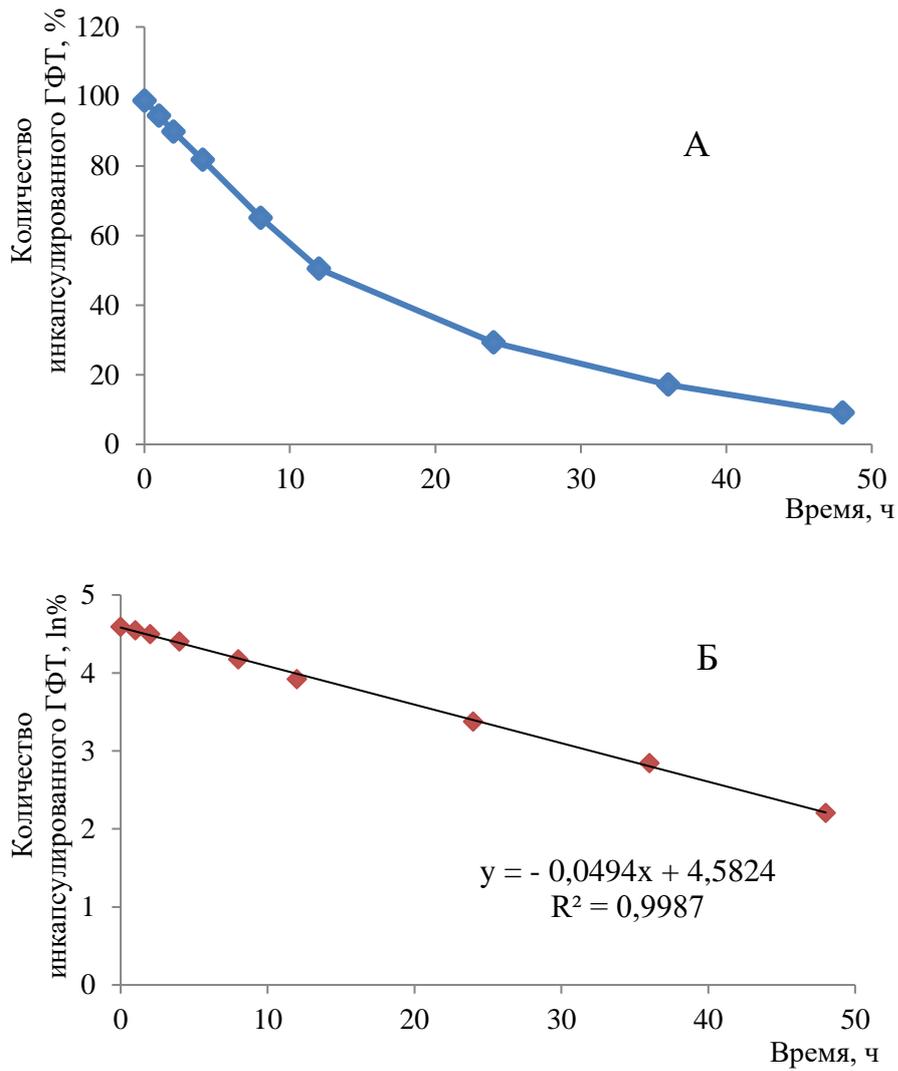
Найдено ГФТ ^{1,2}	Время, ч								
	0	1	2	4	8	12	24	36	48
мг	1,98	1,87	1,78	1,62	1,29	1,00	0,58	0,34	0,18
%	98,84	94,44	89,90	81,82	65,15	50,51	29,29	17,17	9,09
ln%	4,59	4,55	4,50	4,40	4,18	3,92	3,38	2,84	2,21
Размер везикул, нм ^{1,3}	181	186	173	189	184	192	198	191	194

Источник: составлено автором

Примечание – ¹среднее значение из 3 определений, ²эффективность включения 97,04 %, ³после регидратации

Отсутствие «взрывного» высвобождения ГФТ указывает на то, что во время исследования не происходит распада липосом. О стабильности структуры липосом в ходе исследования свидетельствует и отсутствие существенных изменений в размере МОВ (Таблица 26).

Дополнительно построили график зависимости натурального логарифма концентрации (ln% ГФТ), не перешедшего в среду высвобождения, от времени (Рисунок 16, Б). На Рисунке 16, Б видно, что зависимость представляет собой прямую, описываемую уравнением $y = -0,0494x + 4,5824$ с $R^2 = 0,9987$. Это указывает на то, что высвобождение ГФТ из липосом соответствует кинетике первого порядка. Время высвобождения 50 % инкапсулированного ГФТ из липосом (T1/2) составляет около 13,5 часов. Полученные результаты позволяют предположить, что высвобождение ГФТ из липосом, в основном, происходит по диффузионному механизму.



А – высвобождение ГФТ из липосом, %; Б – высвобождение ГФТ из липосом, ln%

Рисунок 16 – Высвобождение ГФТ из липосом

Источник: составлено автором

Из данных научной литературы известно, что скорость высвобождения ДВ из липосом неразрывно связана с цитотоксической активностью ЛС [69; 95; 175]. Поэтому на следующем этапе изучили действие ГФТ и его ЛЛФ на выживаемость опухолевых клеток.

4.6 Изучение действия липосомальной лекарственной формы на выживаемость опухолевых клеток

Исследование проводили на культивируемых *in vitro* клетках рака легкого А549, характеризующихся высокой чувствительностью к ингибиторам тирозинкиназы, в том числе к ГФТ. Выживаемость опухолевых клеток под действием свободного и инкапсулированного ГФТ оценивали по методике, описанной в разделе 2.2.2, рассчитывая количество живых клеток, % по формуле (1).

Данные, представленные на Рисунках 17 и 18, свидетельствуют о том, что ЛЛФ ГФТ проявляет значительно меньшую цитотоксичность, чем раствор ДВ как в концентрации 10 мкг/мл, так и в концентрации 20 мкг/мл.

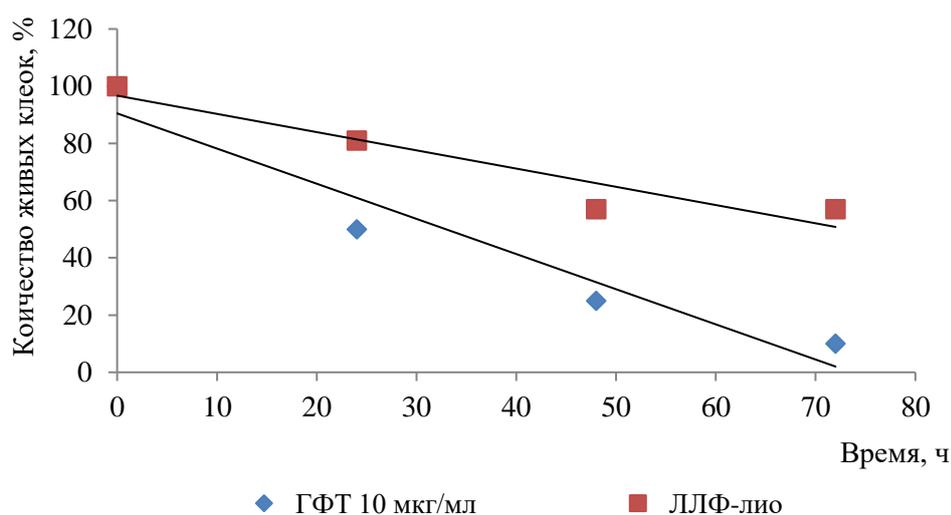


Рисунок 17 – Влияние ГФТ на выживаемость клеток рака легкого А549 (концентрация ГФТ 10 мкг/мл)

Источник: составлено автором

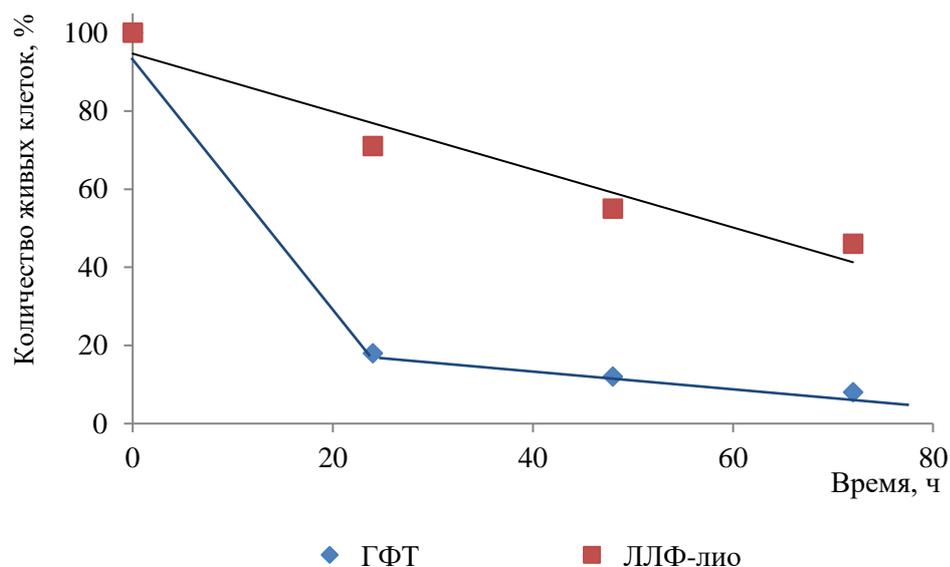


Рисунок 18 – Влияние ГФТ на выживаемость клеток рака легкого A549 (концентрация ГФТ 20 мкг/мл)

Источник: составлено автором

Результаты согласуются с данными, полученными при изучении высвобождения ГФТ из липосом (Рисунок 16). Скорее всего, более низкая цитотоксичность липосомального ГФТ связана с его медленным высвобождением из липосомальных везикул и, соответственно, более медленным проникновением ДВ в клетку.

4.7 Стандартизация лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гефитиниба и разработка спецификации нормативного документа по качеству готового продукта

Как указано в *ГЛАВЕ 1 (раздел 1.5)* и [18; 23; 24; 83; 87] критичными показателями для качества липосом являются количество инкапсулированного и общее количество ДВ, средний размер частиц/распределение по размеру (индекс полидисперсности) и поверхностный заряд (ζ -потенциал).

Для стандартизации готового продукта – ЛЛФ-лио гефитиниба, 2 мг, использовали методики, описанные в [7], методики производителей аналитического оборудования (*ГЛАВА 2*) и методики, разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования (*ГЛАВА 4*).

Ниже приведены результаты исследований 3-х экспериментальных партий лекарственного средства, полученных по разработанной технологии (010223, 020323 и 030323).

Все исследованные образцы ЛЛФ-лио ГФТ представляли собой сухую пористую массу белого или почти белого цвета. Внешний вид лекарственного средства приведен на Рисунке 19.



Рисунок 19 – Внешний вид ЛЛФ-лио

Источник: составлено автором

При **гидратации** лиофилизата к содержимому флакона прибавляли 5 мл воды очищенной при встряхивании. Время, необходимое для получения однородной дисперсии белого цвета не превышало 10 мин (Таблица 28).

Идентификацию ГФТ в ЛЛФ-лио проводили спектрофотометрически после регидратации одновременно с количественным определением, сравнивая спектр поглощения липосомальной дисперсии со спектром поглощения раствора стандартного образца ГФТ (*ГЛАВА 4, раздел 4.1*).

pH липосомальной дисперсии, полученной после регидратации лиофилизата, определяли потенциометрически (*ГЛАВА 2*). Для всех изученных экспериментальных партий значение pH укладывалось в диапазон от 6,5 до 8,5 (Таблица 28).

Определение **потери в массе при высушивании** проводили по методике, описанной в [7] (*ГЛАВА 2*). Данные, представленные в Таблице 28, свидетельствуют о том, что использованный режим лиофилизации позволяет получить ЛЛФ-лио с остаточной влажностью, не превышающей 3,0%.

Остаточные органические растворители. Поскольку в качестве растворителя для всех компонентов лекарственной формы используют хлороформ (ГЛАВА 2), в готовом продукте проводили его определение методом газожидкостной хроматографии [7]. Следует отметить, что при разработке режима высушивания липидной пленки показали, что в выбранных условиях (досушивание под глубоким вакуумом 500-1000 мбар в течение 20 – 40 мин) происходит практически полное удаление хлороформа (ГЛАВА 3, Таблица 6).

Методика

Условия проведения анализа:

Прибор	– газовый хроматограф, Agilent 6890N
Колонка	– капиллярная ZB-5Msi (5% фенил, 95% диметилполисилоксан), 30 м × 0,32 мм с толщиной пленки 0,5 мкм
Детектор	– электронно-захватный
Программа термостата колонки	– 45°C в течение 3,5 мин, затем повышение до 250°C со скоростью 20°C/мин, выдержка 5 мин
Температура детектора	– 240°C
Вспомогательный поток	– 20 мл/мин
Температура инжектора	– 220°C
Деление потока	– 5:1
Газ-носитель	– азот
Давление газа-носителя в колонке	– 7 psi (постоянное)
Объем пробы	– 0,2 мкл
Время хроматографирования	– 18,75 мин
Холостой раствор	– растворитель

Растворитель. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещали 5 мл ДМСО и 25 мл воды очищенной, перемешивали и доводили объем до метки абсолютизированным этанолом, перемешивали.

Стандартный раствор. В мерную колбу вместимостью 25 мл, содержащую 15 мл растворителя, помещали около 32,0 мг хлороформа (точная навеска) и около

1500,00 мг 1,2-дихлорэтана (точная навеска), доводили до метки растворителем и перемешивали. 100 мкл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки растворителем и перемешивали.

Испытуемый раствор. К содержимому 1 флакона прибавляли 5 мл воды, 1 мл ДМСО, около 10 мл этанола и навеску 1,2-дихлорэтана (внутренний стандарт), количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки этанолом.

Проверку пригодности хроматографической системы проводили, анализируя на хроматограмме относительное стандартное отклонение времени удерживания (RT, мин), площади пика и полуширины пика для хлороформа и дихлорэтана и открываемость для хлороформа (Таблица 27, Рисунок 20).

Таблица 27 – Проверка пригодности хроматографической системы при определении остаточных растворителей

Образец	Хлороформ			Открываемость, %	Дихлорэтан		
	RT, мин	Полуширина пика	Площадь пика		RT, мин	Полуширина пика	Площадь пика
1	3,602	686,304	1851,212	94,35	4,088	439,063	1813,324
2	3,602	652,644	1751,902	93,18	4,088	420,930	1721,931
3	3,602	661,966	1834,603	92,32	4,088	438,833	1811,116
4	3,600	685,337	1837,990	92,06	4,087	439,797	1808,887
5	3,603	623,909	1711,235	93,52	4,091	405,614	1691,224
6	3,600	698,329	1838,610	94,30	4,086	444,293	1808,124
7	3,600	697,543	1849,165	94,93	4,086	447,272	1820,929
8	3,600	686,659	1831,740	95,84	4,086	441,271	1796,414
9	3,600	698,137	1838,658	96,71	4,086	445,561	1798,004
10	3,600	688,349	1832,818	96,53	4,086	441,424	1795,404
Среднее значение	3,601	679,918	1817,813	94,37	4,087	436,406	1786,536
Станд. отклон.	0,001	23,696	46,89		0,002	13,017	43,51
RSD	0,032	3,485	2,58		0,038	2,983	2,44

Источник: составлено автором

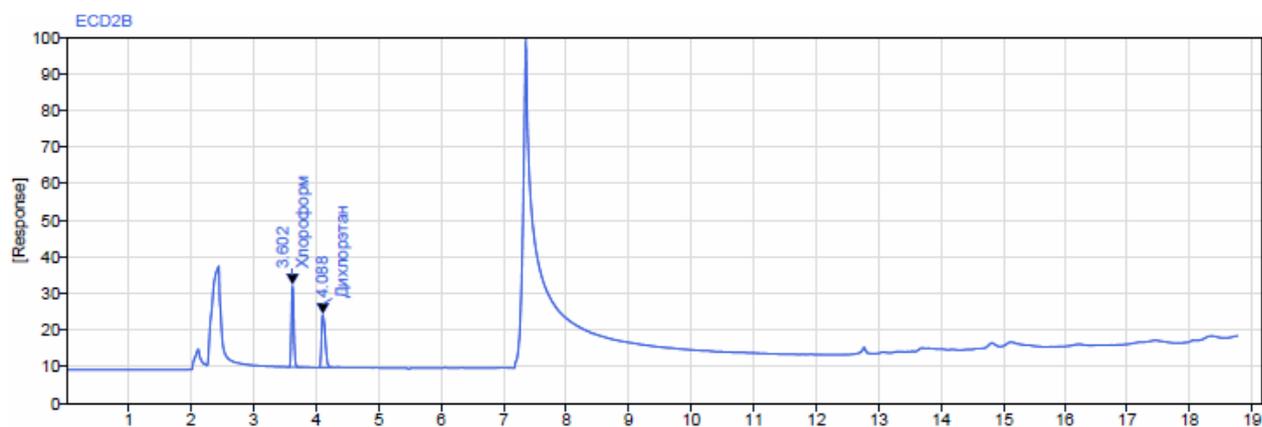


Рисунок 20 – Проверка пригодности хроматографической системы
 Источник: получено автором

Результаты, полученные методом ГЖХ, подтвердили минимальное содержание хлороформа в партиях готового продукта (менее 10 ppm), что полностью соответствует требованиям [7] – не более 60 ppm (Рисунок 21, Таблица 28).

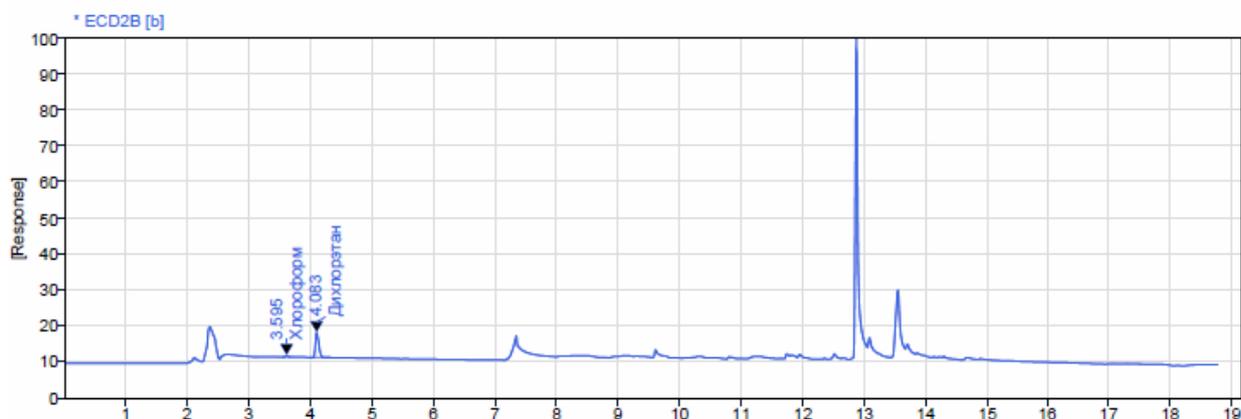


Рисунок 21 – ГЖХ-хроматограмма образца ЛЛФ-лио ГФТ
 Источник: получено автором

Размер липосомальных везикул и индекс полидисперсности, ζ -потенциал и вязкость определяли для липосомальной дисперсии, полученной при гидратации лиофилизата, по методикам, описанным в *ГЛАВЕ 2*.

Как видно из данных, представленных в Таблице 28, средний размер липосом ГФТ изученных партий ЛЛФ-лио находился в диапазоне от 170 до 200 нм. При этом PDI не превышал 0,25, что свидетельствует об однородности липосомальной дисперсии ГФТ, полученной после гидратации лиофилизата.

Поверхностный заряд липосом, полученных при гидратации, определенный по их электрофоретической подвижности, составил от 19 до 22 мВ (Таблица 28), что свидетельствует о стабильности полученных липосом.

Динамическая вязкость всех образцов липосомальной дисперсии составила около 7 мПа·с (Таблица 28).

Таблица 28 – Результаты определения основных характеристик ЛЛФ-лиогефитиниба, 2 мг

Партия ЛС	Показатели качества ^{1,2}								
	О	ВР, мин	И	ПМ, %	рН	ООР, ppm	РВ, нм и PDI	ζ-п, мВ	В, мПа·с
010223	Сухая пористая масса белого цвета	8	Спектр поглощения ЛФ совпадает со спектром поглощения раствора СО ГФТ	1,1	7,2	9,1	198; 0,21	- 22,4	7,2
020323	то же	7	то же	0,8	7,9	3,6	171; 0,19	- 19,3	7,0
030323	- « -	8	- « -	1,2	8,1	8,3	185; 0,24	- 20,0	7,4

Источник: составлено автором

Примечание – ¹сокращения для показателей качества: О – описание; ВР – время регидратации; И – идентификация; ПМ – потеря в массе при высушивании; ООР – остаточные органические растворители (хлороформ); РВ и PDI – размер везикул и индекс полидисперсности; ζ-П – ζ-потенциал; В – вязкость; КО – количественное определение, ОД – однородность дозирования; ²среднее значение из 3-х определений

Количественное содержание ГФТ в готовом продукте и однородность дозирования определяли спектрофотометрически по методике, разработанной в ходе исследования (ГЛАВА 4). Результаты, представленные в Таблице 29, свидетельствуют о том, что количественное содержание ГФТ во всех партиях ЛЛФ-лио составило около 2,00 мг, а однородность дозирования ГФТ в образцах соответствовала критериям приемлемости, установленным [7]. При этом относительная ошибка определения не превышала 2,00 %.

Таблица 29 – Результаты количественного определения и определения однородности дозирования для экспериментальных партий ЛЛФ-лио ГФТ

Партия	Образец (флакон)	Количественное определение		Однородность дозирования	
		Найдено ГФТ, мг	Метрологические характеристики	Найдено ГФТ, % от номинального	Показатели приемлемости
010223	1	2,22	$\bar{x} = 2,19$ мг $S = 0,0551$ $S\bar{x} = 0,0184$ $\Delta\bar{x} = 0,0415$ $\bar{\varepsilon} = 1,90$ %	101,37	$f = n-1 = 9$ $k = 2,4$ $\bar{X} = 99,91\%$ $S = 2,5174$ $M = 99,9$ $AV = 6,05 \leq 15,00$
	2	2,27		103,20	
	3	2,14		97,72	
	4	2,24		102,28	
	5	2,19		100,00	
	6	2,23		101,83	
	7	2,11		96,35	
	8	2,18		99,54	
	9	2,25		100,91	
	10	2,10		95,89	
020323	1	2,11	$\bar{x} = 2,07$ мг $S = 0,0489$ $S\bar{x} = 0,0163$ $\Delta\bar{x} = 0,0368$ $\bar{\varepsilon} = 1,78$ %	101,93	$f = n-1 = 9$ $k = 2,4$ $\bar{X} = 99,95\%$ $S = 2,3608$ $M = 100,0$ $AV = 5,72 \leq 15,00$
	2	2,09		100,97	
	3	2,12		102,42	
	4	2,02		97,59	
	5	1,98		95,65	
	6	2,08		100,48	
	7	2,06		99,52	
	8	2,05		99,03	
	9	2,04		98,55	
	10	2,14		103,38	
030323	1	2,18	$\bar{x} = 2,17$ мг $S = 0,0457$ $S\bar{x} = 0,0152$ $\Delta\bar{x} = 0,0344$ $\bar{\varepsilon} = 1,59$ %	100,46	$f = n-1 = 9$ $k = 2,4$ $\bar{X} = 99,86\%$ $S = 2,1066$ $M = 99,9$ $AV = 5,10 \leq 15,00$
	2	2,21		101,84	
	3	2,22		102,30	
	4	2,15		99,08	
	5	2,09		96,31	
	6	2,15		99,08	
	7	2,16		99,54	
	8	2,13		98,16	
	9	2,14		98,62	
	10	2,24		103,23	

Источник: составлено автором

Анализ данных, полученных при исследованиях лабораторных образцов, модельных смесей и экспериментальных партий липосом ГФТ (Таблицы 9, 12, 17, 21, 28, 29), позволил разработать проект спецификации нормативного документа по качеству ЛС – гефитиниб, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций, 2 мг.

Проект спецификации разработан в соответствии с требованиями [7] и действующими регуляторными документами по регистрации ЛС для медицинского применения [20] и представлен в Таблице 30.

Таблица 30 – Проект спецификации на лиофилизированную липосомальную лекарственную форму гефитиниба (гефитиниб, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций, 2 мг)

ПОКАЗАТЕЛИ	НОРМА	МЕТОД
Описание	Сухая пористая масса белого цвета или почти белого цвета	Визуальный
Время регидратации	Не более 10 мин	Визуальный
Идентификация	УФ-спектр поглощения образца соответствует УФ-спектру поглощения гефитиниба	УФ-спектроскопия
pH	От 6,5 до 8,5	ГФ РФ, потенциометрически
Потеря в массе при высушивании	Не более 3,0 %	ГФ РФ
Остаточные органические растворители	Хлороформ – не более 60 ppm	ГФ РФ
Размер везикул и индекс полидисперсности	Не более 200 нм; не более 0,25	Методика разработчика (производителя)
ζ-потенциал	Не более –25,0 мВ	Методика разработчика (производителя)
Вязкость	Не более 7,0 мПа·с	ГФ РФ
Бактериальные эндотоксины²	Должен выдерживать требования	ГФ РФ
Аномальная токсичность²	Должен выдерживать требования	ГФ РФ
Стерильность²	Должен быть стерильным	ГФ РФ
Количественное определение	От 1,8 мг до 2,2 мг	УФ-спектрометрия
Однородность дозирования	Должен соответствовать требованиям	ГФ РФ, способ 1
Упаковка	В соответствии с проектом НД ¹	
Маркировка	В соответствии с НД	
Хранение	В защищенном от света месте при температуре не выше –18 °С	
Срок годности	Устанавливается	

Источник: составлено автором

Примечание – ¹По 2 мг во флаконах для инъекционных лекарственных форм из трубки темного стекла с гидролитической стойкостью внутренней поверхности по ИСО 4802 – НС 1 по ИСО 8362-1-2022, вместимостью 10 мл, укупоренных пробками из резины по ИСО 8362-2-2022 под обкатку алюминиевыми колпачками по ИСО 8362-3-2019 [4; 5; 6]; ²тест-дозы разрабатываются

Нормы для выбранных показателей определены в соответствии с ГФ РФ (ОФС.1.4.1.0007 Лекарственные формы для парентерального применения, ОФС.1.4.1.0031 Лиофилизаты) и на основе фактических данных анализа полученных образцов/партий ЛС и при анализе стабильности ЛС.

4.8 Результаты исследования стабильности разработанного лекарственного средства

Стабильность липосом можно условно разделить на физическую, химическую и биологическую, которые взаимосвязаны. При определении сроков годности ЛЛФ обычно оценивают физическую и химическую стабильность – контролируют размер частиц и однородность по размеру (PDI), ЭВ и количественное содержание ДВ.

Для получения информации об изменениях разработанного ЛС с течением времени и для определения предполагаемого срока годности, проводили изучение стабильности ЛС в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0009 [7].

Исследование стабильности проводили на трех партиях ЛС, полученных по разработанной технологии. ЛС хранили в первичной упаковке – флаконах из трубки стеклянной темного стекла для лекарственных средств, закупоренных резиновой пробкой под обкатку алюминиевым колпачком, отвечающих требованиям [4; 5; 6].

Поскольку липосомы образованы фосфолипидами, которые являются химически нестабильными веществами (возможен гидролиз сложноэфирных связей и перекисное окисление ненасыщенных ацильных цепей), хранение проводили при пониженной температуре не выше $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в защищенном от света месте (морозильная камера).

К моменту написания диссертационной работы провели хранение разработанного ЛС в течение 6 месяцев. При закладке на хранение оценку качества проводили по всем показателям проекта спецификации, во временных точках 3 и 6 месяцев анализ проводили по показателям, которые могут измениться при

хранении. Результаты исследования стабильности ЛЛФ-лио гeфитиниба представлены в Таблице 31.

Таблица 31 – Результаты исследования стабильности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы гефитиниба, 2 мг¹

№ партии	Показатели ²										Срок хранения
	О	И	pH	ПМ, %	ООР, ppm	PВ, нм/ PDI	ζ-П, мВ	В, мПа·с	КО, мг	ОД	
040323	соответствует	соответствует	7,2	1,1	9,1	171/0,174	- 20,2	7,5	2,1	соответствует	0
	то же	-	7,3	1,2	-	174/0,187	- 20,4	7,4	2,1	-	3
	- « -	-	7,2	1,1	-	175/0,162	- 20,5	7,5	2,2	-	6
050423	соответствует	соответствует	7,9	0,8	3,5	177/0,143	- 19,9	7,8	2,4	соответствует	0
	то же	-	7,8	1,0	-	180/0,154	- 20,0	7,7	2,5	-	3
	- « -	-	7,8	1,0	-	176/0,167	-20,0	7,8	2,4	-	6
060423	соответствует	соответствует	8,1	1,2	7,8	185/0,170	- 21,0	8,0	2,3	соответствует	0
	то же	-	8,2	1,2	-	183/0,192	-21,2	8,1	2,3	-	3
	- « -	-	8,2	1,1	-	185/0,166	- 21,3	8,2	2,4	-	6

Источник: составлено автором

Примечание – ¹нормы по спецификации представлены в Таблице 30; ²сокращения для показателей качества: О – описание; И – идентификация; ООР – остаточные органические растворители; PВ и PDI – размер везикул и индекс полидисперсности; ζ-П – ζ-потенциал; В – вязкость; КО – количественное определение, ОД – однородность дозирования

Из данных, представленных в Таблице 31, видно, что через 6 месяцев хранения в указанных выше условиях изменений качества ЛЛФ-лио не произошло.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

Изучение физико-химических характеристик дисперсий мульти- и моноламеллярных везикул ГФТ показало, что они не изменяются при проведении основных технологических операций.

Для аналитических исследований и стандартизации полученной ЛЛФ гефитиниба разработана методика его количественного определения методом прямой спектрофотометрии. Валидация показала линейность методики и ее высокую специфичность. Правильность и прецизионность методики подтверждены в расширенном аналитическом диапазоне от 70 до 130% от номинального содержания гефитиниба в единице ЛФ.

Показано, что эффективность включения гефитиниба в липосомы не изменяется при получении однослойных везикул из мультиламеллярных и составляет более 97%. Лиофилизация также не оказывала влияния на включение гефитиниба в липосомальную мембрану. Для отделения свободного гефитиниба от инкапсулированного использовали экструзию через нейлоновые фильтры или центрифугирование.

Разработанную методику использовали для изучения высвобождения гефитиниба из липосом. Постепенный характер высвобождения ЛС свидетельствует о том, что липосомы не разрушаются в ходе исследования, а зависимость $\ln\%$ инкапсулированного гефитиниба от времени представляет собой прямую, описываемую уравнением $y = -0,0494x + 4,5824$ с $R^2 = 0,9987$, время $T_{1/2}$ составляет около 13,5 часов. Медленное высвобождение гефитиниба из липосом подтверждается значительно более низкой цитотоксичностью ЛЛФ *in vitro* на модели рака легкого A549.

Определены критические показатели для качества ЛЛФ-лио гефитиниба и экспериментально обоснованы их нормы. Анализ результатов показал, что разработанная технология позволяет получить ЛС, отвечающее требованиям ГФ РФ к лекарственным формам для парентерального применения и лифилизатам.

Оценка стабильности разработанной ЛЛФ показала отсутствие значимых изменений ЛС при хранении при температуре – 18°C в течение 6 месяцев.

Анализ совокупности данных, полученных в ходе исследований, позволил разработать проект спецификации на лекарственное средство – гефитиниб лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 2 мг.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. По результатам проведенных технологических и химико-фармацевтических исследований определен оптимальный состав ЛЛФ-лио gefитиниба для парентерального применения, который включает ГФТ/ЯФХ/Холестерин/ПЭГ-ДСФА/сахароза в соотношении 1/187,5/15/2,25/250.

2. Разработана технология получения ЛЛФ gefитиниба методом гидратации тонкой пленки, стабилизация которой достигается с помощью лиофилизации. В качестве криопротектора выбран 10% водный раствор сахарозы, вводимый в дисперсию МЛВ. Для получения ЛЛФ-лио используют ступенчатое, медленное замораживание, с равномерным подъемом температуры.

3. Исследование физико-химических и фармацевтико-технологических характеристик мульти- и моноламеллярных липосомальных дисперсий ГФТ показало, что последовательная экструзия через нейлоновые фильтры не изменяет количественное содержание ДВ в липосомах и эффективность его инкапсулирования в липидный бислой. После лиофилизации с использованием выбранного криопротектора липосомы сохраняли основные свойства липосомальных дисперсий.

4. Выбраны и экспериментально обоснованы показатели качества ЛЛФ-лио gefитиниба и определены их нормы. Продемонстрирована стабильность разработанной ЛФ при хранении при температуре -18°C в течение 6 месяцев.

5. Разработана и валидирована методика спектрометрического количественного определения gefитиниба в дисперсиях мультиламеллярных и моноламеллярных везикул. Показано включение не менее 97% ГФТ в липосомы на различных этапах ТП. Установлено, что процесс медленного высвобождения gefитиниба из липосом можно описать уравнением реакции первого порядка.

6. Разработан проект технологической схемы и ЛР получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы gefитиниба.

7. Разработан проект спецификации НД по качеству лекарственного средства – ГФТ, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций, 2 мг.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВВ	– вспомогательные вещества
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЖХ	– газо-жидкостная хроматография
ГОВ	– гигантские однослойные везикулы
ГХ	– газовая хроматография
ГФ РФ	– Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания
ГФТ	– гефитиниб
ГФТ-НЛН	– гефитиниб в наноструктурированных липидных носителях
ГФТ-ТЛН	– твердые наночастицы гефитиниба
ДВ	– действующее вещество
ДМСО	– диметилсульфоксид
Докс	– доксорубицин
ДСР	– метод динамического светорассеяния
ДФГ	– дифенилгексатриен
ЖХ	– жидкостная хроматография
ЛЛП	– липосомальный лекарственный препарат
ЛЛФ	– липосомальная лекарственная форма
ЛЛФ-лио –	– лиофилизированная липосомальная лекарственная форма
ЛФ	– лекарственная форма
ЛС	– лекарственное средство
МЛВ	– мультиламеллярные везикулы
МОВ	– малые одноламеллярные везикулы
МС	– масс-спектрометрия
МТТ	– тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
НЛН	– наноструктурированные липидные носители
НМРЛ	– немелкоклеточный рак легкого
ПАВ	– поверхностно-активные вещества
ПВА	– поливиниловый спирт (PVA)
ПВП	– поливинилпирролидон (PVP)
ПЭГ-ДСФА	– дистеароилфосфатидилэтаноламин, конъюгированный с полиэтиленгликолем-2000
РЭС	– ретикулоэндотелиальная система
СКР	– спектроскопия комбинационного рассеяния

СФХ	– соевый фосфатидилхолин
ТД	– твердые дисперсии
ТЛН	– твердые липидные наночастицы
ТСХ	– тонкослойная хроматография
ТЭМ (ТЕМ)	– трансмиссионная электронная микроскопия
УФ-	– ультрафиолетовый
ФГ	– фосфатидилглицерин
Ф ЕАЭС	– Фармакопея ЕАЭС
ФХ	– фосфатидилхолин
Хол	– холестерин
ЭВ	– эффективность включения
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс
ЯФХ	– яичный фосфатидилхолин
AFM	– atomic-force microscopy (атомно-силовая микроскопия)
CF	– Continuous Flow (метод непрерывного потока)
CQAs	– Critical Quality Attributes (критичные показатели для качества)
DMT	– Membrane Diffusion Techniques (методы, использующие мембранную диффузию)
DOPA	– dioleoylphosphatidic acid
DSPE-PEG-2000	– дистеароилфосфатидилэтаноламин–полиэтиленгликоль-2000
DSPC	– дистеароилфосфатидилхолин
EGFR	– Epidermal Growth Factor Receptor (рецептор эпидермального фактора роста)
ESEM	– Environmental Scanning Electron Microscopy (сканирующая электронная микроскопия в среде)
FDA	– U.S. Food and Drug Administration
HP β -CD	– Hydroxypropyl β -cyclodextrin (гидроксипропилциклодекстрин)
HPMC	– Hydroxypropylmethylcellulose (гидроксипропилметилцеллюлоза)
HPSEC	– high performance size exclusion chromatography (высокоэффективная эксклюзионная хроматография)
IC50	– концентрация ЛС, необходимая для 50%-го ингибирования биологического процесса <i>in vitro</i>
MWCO	– molecular weight cutoff (отсечение диализной мембраны по молекулярной массе)

NaTPP	– натрия триполифосфат
NTA	– nanoparticle tracking analysis (анализ траекторий движения наночастиц)
PBS	– phosphate-buffered saline (фосфатно-солевой буфер)
PCEC	– поли(ε-капролактон)-поли(этиленгликоль)-поли(ε-капролактон)
PLLA	– (poly (l-lactic) acid (поли-L-молочная кислота)
PLGA	– Polylactic-glycolic acid (сополимер молочной и гликолевой кислот)
PTK	– Protein Tyrosine Kinase (протеинтирозинкиназа)
SEC	– Size Exclusion Chromatography (эксклюзионная хроматография)
SEM	– Scanning Electron Microscopy (сканирующая электронная микроскопия)
SS	– Sample and Separate (метод отбора образцов и разделения)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аршинова, О.Ю. Особенности лиофилизации липосомальных лекарственных препаратов (обзор) / О.Ю. Аршинова, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, Н.А. Оборотова // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46. – № 4. – С. 29 – 34.

2. Болотина, Л.В. Гефитиниб – терапия выбора 1-й линии немелкоклеточного рака легкого у больных с наличием мутаций в гене EGFR / Л.В. Болотина // Современная Онкология. – 2013. – Т. 15. – № 3. – С. 49 – 54.

3. Горбик, В.С. Липосомы как система таргетной доставки лекарственных средств (обзор) / В.С. Горбик, З.С. Шпрах, Ж.М. Козлова, В.Г. Салова // Российский биотерапевтический журнал. – 2021. – Т. 20. – № 1. – С. 33–41. DOI: [https://doi: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-33-41](https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-1-33-41)

4. ГОСТ Р ИСО 8362-1-2022 Первичная упаковка и укупорочные средства для инъекционных лекарственных форм. Часть 1. Флаконы для инъекционных лекарственных форм из стеклянной трубки [Электронный ресурс]. URL: <https://gostassistant.ru/> (Дата обращения: 01.11.2023).

5. ГОСТ Р ИСО 8362-2-2022 Первичная упаковка и укупорочные средства для инъекционных лекарственных форм. Часть 2. Пробки для флаконов для инъекционных лекарственных форм [Электронный ресурс]. URL: <https://gostassistant.ru/> (Дата обращения: 01.11.2023).

6. ГОСТ Р ИСО 8362-3-2019 Емкости для инъекционных лекарственных средств и принадлежности к ним. Часть 3. Алюминиевые колпачки для инъекционных флаконов. Общие технические требования [Электронный ресурс]. URL: <https://gostassistant.ru/> (Дата обращения: 01.11.2023).

7. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания [Электронный ресурс]. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (Дата обращения: 07.11.2023).

8 Дмитриева, М.В. Характеристика и оценка стабильности липосомальных препаратов / М.В. Дмитриева, Т.А. Тимофеева, Н.А. Оборотова, [и др.] //

Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – Т.20. – № 3. – С. 36 – 44.

9. Ле-Дейген, И.М. Экспериментальные методы исследования механизма взаимодействия липидных мембран с низкомолекулярными лекарствами / И.М. Ле-Дейген, А.А. Скуреедина, Е.В. Кудряшова // Биоорганическая химия. – 2020. – Т. 46. – № 4. – С. 340–359. DOI: [https://doi: 10.31857/S013234232004017X](https://doi.org/10.31857/S013234232004017X)

10. Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение / Н.И. Бурдаев, Л.Л. Николаева, В.В. Косенко, [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2023. – Т. 13. – № 1–2. – С. 316 – 332. DOI: [https://doi:10.30895/1991-2919-2023-508](https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-508)

11. Насретдинов, А.Ф. Механизм работы разных поколений ингибиторов EGFR при злокачественных опухолях легких. Обзор литературы и обобщение данных / А.Ф. Насретдинов, К.В. Меньшиков, А.В. Султанбаев, [и др.] // Современная Онкология. – 2022. – Т. 24. – № 3. С. 340–344. DOI: [https://doi: 10.26442/18151434.2022.3.201813](https://doi.org/10.26442/18151434.2022.3.201813)

12. Новикова, А.А. Методы получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств (обзор) / А.А. Новикова, П. Кезимана, Я.М. Станишевский // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – Т. 19. – № 2. – С. 134–138.

13. Разработка модельного состава липосомальной формы gefитиниба / Н.И. Бурдаев, Л.Л. Николаева, З.С. Шпрах, [и др.] // Фармация. – 2023. – Т. 72. – № 2. – С. 17–21. DOI: [https://doi: 10/29296/25419218-2023-02-03](https://doi.org/10/29296/25419218-2023-02-03)

14. Разработка и валидация методики количественного определения gefитиниба в липосомальной лекарственной форме / Бурдаев Н.И., Шпрах З.С., Николаева Л.Л., и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2023. – Т. 57. – №5. – С. 50–54. DOI: [https://doi: 10.30906/0023-1134-2023-57-5-50-54](https://doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-5-50-54)

15. Роль ингибиторов EGFR 2-го поколения в терапии рака легкого в реалиях современной клинической практики / А.А. Измайлов, А.Ф. Насретдинов, А.В.

Султанбаев, [и др.] // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2021. – Т. 10. – № 4. – С. 75-82. DOI: <https://doi.org/10.17116/onkolog20211004175>

16. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/550738945> (дата обращения 07.10.2023).

17. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации) / Под редакцией Н.В. Юргеля, А.Д. Младенцева, А.В. Бурдейн, [и др.] // Москва: Спорт и культура – 2000. – 2007. – 92 с. – ISBN 978-5-901682-46-4

18. Руководство по фармакокинетическому и клиническому изучению биоэквивалентности липосомальных лекарственных препаратов для внутривенного введения, утвержденное Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 15 сентября 2020 г. N 111 [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.eaeunion.org/docs/> (дата обращения 07.10.2023)

19. Руководство по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата, утвержденное Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. N 151 [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.eaeunion.org/docs/> (дата обращения 07.10.2023)

20. Руководство ICH Q6A «Спецификации: аналитические методики и критерии приемлемости для новых лекарственных веществ и лекарственных препаратов – химические вещества» [Электронный ресурс]. URL: <https://pharmadvisor.ru/documents/> (дата обращения 07.10.2023)

21. Ряженев, В.В. Сравнительный фармакоэкономический анализ применения ингибиторов тирозинкиназы Иресса® (гефитиниб) и Гиотриф® (афатиниб) в 1-й линии терапии у пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого при наличии мутации в гене рецептора эпидермального фактора роста / В.В. Ряженев // Современная Онкология. – 2017. – Т. 19. – № 1. – С. 54 – 57.

22. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / Под редакцией А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. – Москва: МНИОИ

им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. – 2023. – 239 с. – ISBN 978-5-85502-283-4

23. Шпрах, З.С. Теоретические и экспериментальные основы создания лекарственных средств для лечения нейроэндокринных опухолей: специальность 14.04.01. Технология получения лекарств, 14.04.02. Фармацевтическая химия, фармакогнозия: диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Шпрах Зоя Сергеевна; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2022. – 333 с.

24. Шпрах, З.С. Липосомальные лекарственные средства: методы аналитических исследований и контроля качества // З.С. Шпрах, Н.И. Бурдаев, Л.Л. Николаева, Н.Д. Бунятян // Химико-фармацевтический журнал. – 2023. – Т. 57. – № 11. – С. 45 – 52. DOI: [https://doi: 10.30906/0023-1134-2023-57-11-45-52](https://doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-11-45-52)

25. Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors / D. Kitagawa, K. Yokota, M. Gouda, [et al.] // Genes Cells. – 2013. – Vol. 18. – № 2. – P. 110–122. DOI: [https://doi: 10.1111/gtc.12022](https://doi.org/10.1111/gtc.12022)

26. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems / M. Maeki, N. Kimura, Y. Sato, [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2018 – Vol. 128. – P. 84–100. DOI: [https://doi: 10.1016/j.addr.2018.03.008](https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.008)

27. Advances of supercritical fluid chromatography in lipid profiling / Y. Yang, Y. Liang, J. Yang, [et al.] // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 1–8. DOI: [https://doi:10.1016/j.jpha.2018.11.003](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2018.11.003)

28. Advantages and Limitations of Current Imaging Techniques for Characterizing Liposome Morphology / A.-L. Robson, P.C. Dastoor, J. Flynn, [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2018. – Vol. 9. – P. 80. DOI: [https://doi: 10.3389/fphar.2018.00080](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00080)

29. Ali, I. Monolithic silica stationary phases in liquid chromatography / I. Ali, V.D. Gaitonde, H.Y. Aboul-Enein // Journal of Chromatographic Science. – 2009. – Vol. 47. – № 6. – P. 432–442. DOI: [https://doi: 10.1093/chromsci/47.6.432](https://doi.org/10.1093/chromsci/47.6.432).

30. Alsaadi, M.M. High performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection for the characterisation of a vesicular delivery system during stability studies / M.M. Alsaadi, K.C. Carter, A.B. Mullen // *Journal of Chromatography A*. – 2013. – Vol. 1320. – P. 80–85. DOI: <https://doi:10.1016/j.chroma.2013.10.054>
31. Analytical ultracentrifugation for analysis of doxorubicin loaded liposomes / D. Mehn, P. Iavicoli, N. Cabaleiro, [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 523. – № 1. – P. 320–326. DOI: <https://doi:10.1016/j.ijpharm.2017.03.046>
32. Analyzing EGFR mutations and their association with clinicopathological characteristics and prognosis of patients with lung adenocarcinoma / X. Zhou, L. Cai, J. Liu, [et al.] // *Oncology Letters*. – 2018. – Vol. 16. – № 1 – P. 362–370. DOI: <https://doi:10.3892/ol.2018.8681>
33. Andra, V.V.S.N.L. A comprehensive review on Novel liposomal methodologies, commercial formulations, clinical trials and patents / V.V.S.N.L. Andra, S.V.N. Pammi, L.V.K.P. Bhatraju, [et al.] // *Bionanoscience*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 274–291. DOI: <https://doi:10.1007/s12668-022-00941-x>
34. Angst, M.S. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam™ / M.S. Angst, D.R. Drover // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2006. – Vol. 45. – № 12. – P. 1153–1176. DOI: <https://doi:10.2165/00003088-200645120-00002>
35. Ansar, S.M. Direct quantification of unencapsulated doxorubicin in liposomal doxorubicin formulations using capillary electrophoresis / S.M. Ansar, W. Jiang, T. Mudalige // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 549. – № 1–2. P. 109–114. DOI: <https://doi:10.1016/j.ijpharm.2018.07.019>.
36. Anti-cancer activity of doxorubicin-loaded liposomes co-modified with transferrin and folic acid / Sh.K. Sriraman, G. Salzano, C. Sarisozen, [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2016. – Vol. 105. – P. 40–49. DOI: <https://doi:10.1016/j.ejpb.2016.05.023>
37. Anti-tumor efficacy of hyaluronan-based nanoparticles for the co-delivery of drugs in lung cancer / V. Jeannot, C. Gauche, S. Mazzaferro, [et al.] // *Journal of Control Release*. – 2018. – Vol. 275. – P. 117–128. DOI: <https://doi:10.1016/j.jconrel.2018.02.024>

38. Application of Bio-Layer Interferometry for the analysis of protein/liposome interactions / J. Wallner, G. Lhota, D. Jeschek, [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2013. – Vol. 72 – P. 150–154. DOI: <https://doi:10.1016/j.jpba.2012.10.008>

39. Arteaga, C.L. Tyrosine kinase inhibitors-ZD1839 (Iressa) / C.L. Arteaga, D.H. Johnson // *Current Opinion in Oncology*. – 2001. – Vol. 13. – № 6. – P. 491–498. DOI: <https://doi:10.1097/00001622-200111000-00012>

40. The association between clinical prognostic factors and epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) efficacy in advanced Non-small-cell lung cancer patients: A retrospective assessment of 94 cases with EGFR mutations / J.H. Lin, D. Lin, L. Xu, [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 2. – P. 3412–3421. DOI: <https://doi:10.18632/oncotarget.13787>

41. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report / D.J. Burgess, A.S. Hussain, T.S. Ingallinera, [et al.] // *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. – 2002. – Vol. 4. – № 2. – E. 7.

42. Bagatolli, L.A. Membranes and Fluorescence Microscopy / L.A. Bagatolli // *Reviews in Fluorescence*. – 2009. – Vol. 2007. – P. 33–51. DOI: https://doi:10.1007/978-0-387-88722-7_2

43. Bangham, A.D. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids / A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins // *Journal of Molecular Biology*. – 1965. – Vol. 13. – № 1. – P. 238–252. DOI: [https://doi:10.1016/s0022-2836\(65\)80093-6](https://doi:10.1016/s0022-2836(65)80093-6)

44. Bartlett, G.R. Phosphorus assay in column chromatography / G.R. Bartlett // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1959. – Vol. 234. – № 3. – P. 466–468.

45. Bibi, S. Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM / S. Bibi, R. Kaur, M. Henriksen-Lacey // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2011. – Vol. 417. – № 1–2. – P. 138–150. DOI: <https://doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.021>

46. Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing / I.V. Zhigaltsev, N. Belliveau, I. Hafez, [et al.] // *Langmuir*. – 2012. – Vol. 28. – № 7. – P. 3633–3640. DOI: [https://doi: 10.1021/la204833h](https://doi.org/10.1021/la204833h)

47. Cell-free biochemical fluorometric enzymatic assay for high-throughput measurement of lipid peroxidation in high density lipoprotein / S. Sen Roy, C.X. Nguyen, T.A. Angelovic, [et al.] // *Journal of Visualized Experiments*. – 2017. – Vol. 128. – P. 56325. DOI: [https://doi: 10.3791/56325](https://doi.org/10.3791/56325)

48. Cellular targets of gefitinib / D. Brehmer, Z. Greff, K. Godl, [et al.] // *Cancer Research*. – 2005. – Vol.65. – № 2 – P. 379–382.

49. Chandregowda, V. Improved Synthesis of Gefitinib and Erlotinib Hydrochloride- Anticancer Agents / V. Chandregowda, G.V. Rao, G.C. Reddy // *Synthetic Communications*. – 2007. – Vol. 37. – № 19. – P. 3409–3415. DOI: [https://doi: 10.1080/00397910701483761](https://doi.org/10.1080/00397910701483761).

50. Chen, D. Determination of free and encapsulated oligonucleotides in liposome formulated drug product / D. Chen, D.L. Cole, G.S. Srivatsa // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2000. – Vol. 22. – № 5. – P. 791–801. DOI: [https://doi: 10.1016/S0731-7085\(00\)00243-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00243-0)

51. Chen, P.S. Microdetermination of phosphorus / P.S. Chen, T.Y. Toribara, H. Warner // *Analytical Chemistry*. – 1956. – Vol. 28. – № 11. – P. 1756–1758. DOI: [https://doi:10.1021/ac60119a033](https://doi.org/10.1021/ac60119a033)

52. Cheraga, N. Characterization and Pharmacokinetic Evaluation of Oxaliplatin Long-Circulating Liposomes / N. Cheraga, A. Ouahab, N.-P. Huang // *Biomed Research International*. – 2021. – Vol. 2021. – Art. ID 5949804. DOI: [https://doi:10.1155/2021/5949804](https://doi.org/10.1155/2021/5949804)

53. Cherney, D.P. Optical-trapping Raman microscopy detection of single unilamellar lipid vesicles / D.P. Cherney, J.C. Conboy, J.M. Harris // *Analytical Chemistry*. – 2003. – Vol. 75. – № 23. – P. 6621–6628. DOI: [https://doi: 10.1021/ac034838r](https://doi.org/10.1021/ac034838r)

54. Chiba, M. Quantitative analysis of the lamellarity of giant liposomes prepared by the inverted emulsion method / M. Chiba, M. Miyazaki, S. Ishiwata *Biophysics Journal*. – 2014. – Vol. 107. – № 2. – P. 346–54. DOI: [https://doi:10.1016/j.bpj.2014.05.039](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.039)

55. The combination therapy of salinomycin and gefitinib using poly(d,l-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles for targeting both lung cancer stem cells and cancer cells / Y. Zhang, Q. Zhang, J. Sun, [et al.] // *Onco Targets and Therapy*. – 2017. – Vol. 10. – P. 5653–5666. DOI: [https://doi:10.2147/OTT.S141083](https://doi.org/10.2147/OTT.S141083)

56. Comparative study of intratracheal and oral gefitinib for the treatment of primary lung cancer / T. Zhang, R. Wang, M. Li, [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – Vol. 149. – P. 105352. DOI: [https://doi:10.1016/j.ejps.2020.105352](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105352)

57. Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of Leishmania membrane phospholipids / R.D. Ramos, D. Libong, M. Rakotomanga, [et al.] // *J Chromatogr A*. – 2008. – Vol. 1209. – № 1–2. – P. 88–94. DOI: [https://doi:10.1016/j.chroma.2008.07.080](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.080)

58. Crommelin, D.J.A. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What Now? Now what? / D.J.A. Crommelin, P. van Hoogevest, G. Storm // *Journal of Control Release*. – 2020. – Vol. 318. – P. 256–263. DOI: [https://doi:10.1016/j.jconrel.2019.12.023](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.023)

59. Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation / X. Shan, X. Gong, J. Li, [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica. B*. – 2022. – Vol. 12. – № 7. – P. 3028–3048. DOI: [https://doi:10.1016/j.apsb.2022.02.025](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.025)

60. Delayed sequential co-delivery of gefitinib and doxorubicin for targeted combination chemotherapy / Z. Zhou, M. Jafari, V. Sriram, [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 14. – № 12. – P. 4551–4559. DOI: [https://doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00669](https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00669)

61. Delivery of gefitinib with an immunostimulatory nanocarrier improves therapeutic efficacy in lung cancer / D. Diao, J. Zhai, J. Yang, [et al.] // *Translational*

Lung Cancer Research. – 2021. – Vol. 10. – № 2. – P. 926–935. DOI: [https://doi:10.21037/tlcr-21-144](https://doi.org/10.21037/tlcr-21-144)

62. Desai, D. Cyclodextrin-based gefitinib nanobubbles for synergistic apoptosis in lung cancer / D. Desai, P. Shende // *Materials Technology*. – 2022. – Vol. 37. – № 11. – P. 1665–1676. DOI: [https://doi:10.1080/10667857.2021.1969493](https://doi.org/10.1080/10667857.2021.1969493)

63. Design of gefitinib-loaded poly (l-lactic acid) microspheres via a supercritical anti-solvent process for dry powder inhalation / Q. Lin, G. Liu, Z. Zhao, [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 532. – № 1. – P. 573–580. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.051>

64. Determination of the phospholipid/lipophilic compounds ratio in liposomes by thin-layer chromatography scanning densitometry / S. Rodríguez, M.V. Cesio, H. Heinzen, [et al.] // *Lipids*. – 2000. – Vo. 35. – P. 1033–1036. DOI: [https://doi:10.1007/s11745-000-0615-x](https://doi.org/10.1007/s11745-000-0615-x)

65. Determination of platinum drug release and liposome stability in human plasma by CE-ICP-MS / T.T. Nguyen, J. Ostergaard, S. Sturup, [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 449. – № 1–2. – P. 95–102. doi: [10.1016/j.ijpharm.2013.03.055](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.055)

66. Development and Evaluation of Multifunctional Poly(Lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles Embedded in Carboxymethyl β -Glucan Porous Microcapsules as a Novel Drug Delivery System for Gefitinib / X. Li, J. Wang, S. Li, [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 11. – № 9. – P. 469. DOI: [https://doi:10.3390/pharmaceutics11090469](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090469)

67. Development of a flow-through USP-4 apparatus drug release assay to evaluate doxorubicin liposomes / W. Yuan, R. Kuai, Z. Dai [et al.] // *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. –2017. – Vol.19. – № 1. – P. 150–160. DOI: [https://doi:10.1208/s12248-016-9958-2](https://doi.org/10.1208/s12248-016-9958-2)

68. Development of a flow-through USP 4 apparatus drug release assay for the evaluation of amphotericin B liposome / J. Tang, S. Srinivasan, W. Yuan [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2019. – Vol. 134. – P. 107–116. DOI: [https://doi:10.1016/j.ejpb.2018.11.010](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.11.010)

69. Di, J. Suppression of long-circulating and liposomes containing gefitinib on nasopharyngeal carcinoma cells / J. Di, H. Zhang, H. Hui // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. – 2017. – Vol. 10. – № 1. – P. 540–547.

70. Dielectric properties and lamellarity of single liposomes measured by in-liquid scanning dielectric microscopy / M. Di Muzio, R. Millan-Solsona, A. Dols-Perez, [et al.] // *Journal of Nanotechnology*. – 2021. – Vol. 19. – № 167. DOI: [https://doi: 10.1186/s12951-021-00912-6](https://doi.org/10.1186/s12951-021-00912-6)

71. Direct, simultaneous measurement of liposome-encapsulated and released drugs in plasma by on-line SPE-SPE-HPLC / E. Yamamoto, K. Hyodo, N. Ohnishi, [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2011. – Vol. 879. – № 30. – P. 3620–3625. DOI: [https://doi: 10.1016/j.jchromb.2011.10.004](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.10.004).

72. Drug release from nanomedicines: Selection of appropriate encapsulation and release methodology / S.J. Wallace, J. Li, R.L. Nation, [et al.] // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2012. – Vol. 2. – № 4. – P. 284–292. DOI: [https://doi: 10.1007/s13346-012-0064-4](https://doi.org/10.1007/s13346-012-0064-4)

73. Effect of Particle Size on Drug Loading and Release Kinetics of Gefitinib-Loaded PLGA Microspheres / W. Chen, A. Palazzo, W.E. Hennink, R.J. Kok // *Molecular Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 14. – № 2. – P. 459–467. DOI: [https://doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00896](https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00896)

74. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy / J.G. Paez, P.A. Jänne, J.C. Lee, [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 304. – № 5676. – P. 1497–1500. DOI: [https://doi: 10.1126/science.1099314](https://doi.org/10.1126/science.1099314)

75. Efficient preparation of giant vesicles as biomimetic compartment systems with high entrapment yields for biomacromolecules / T. Kuroiwa, R. Fujita, I. Kobayashi, [et al.] // *Chemistry Biodiversity*. – 2012. – Vol. 9. – № 11. – P. 2453–72. DOI: [https://doi: 10.1002/cbdv.201200274](https://doi.org/10.1002/cbdv.201200274)

76. *Encyclopedia of Lipidomics* / M. Wenk (eds). – Dordrecht: Springer. – 2016. – 379 p. – ISBN 978-94-007-7864-1. DOI: [https://doi:10.1007/978-94-007-7864-1_62-1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_62-1)

77. Engineering precision nanoparticles for drug delivery / M.J. Mitchell, M.M. Billingsley, R.M. Haley, [et al.] // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2021. – Vol. 20. – № 2. – P. 101–124. DOI: [https://doi: 10.1038/s41573-020-0090-8](https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8)

78. Enhancing Anticancer Effect of Gefitinib across the Blood-Brain Barrier Model Using Liposomes Modified with One α -Helical Cell-Penetrating Peptide or Glutathione and Tween 80 / K.H. Lin, S.T. Hong, H.T. Wang, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17. – № 12. – P. 1998. DOI: [https://doi:10.3390/ijms17121998](https://doi.org/10.3390/ijms17121998)

79. Environmental Scanning Electron Microscope Imaging of Vesicle Systems / Y. Perrie, H. Ali, D.J. Kirby, [et al.] // *Methods in Molecular Biology. Liposomes* – 2017. Vol. 1522. – P. 131–143. DOI: [https://doi: 10.1007/978-1-4939-6591-5_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_11)

80. Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: status 2012 / F.R. Hirsch, P.A. Jänne, W.E. Eberhardt, [et al.] // *Journal of Thoracic Disease*. – 2013. – Vol. 8. – № 3. – P. 373–384. DOI: [https://doi: 10.1097/JTO.0b013e31827ed0ff](https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31827ed0ff)

81. Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications / A. Gouda, O.S. Sakr, M. Nasr, [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science Technology*. – 2020. – Vol. 61. – P. 102174. DOI: [https://doi:10.1016/j.jddst.2020.102174](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102174)

82. Fabrication and characterization of gefitinib-releasing polyurethane foam as a coating for drug-eluting stent in the treatment of bronchotracheal cancer / W. Chen, C. di Carlo, D. Devery, [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 548. – № 2. – P. 803–811. DOI: [https://doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.026](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.026)

83. Fan, Yu. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery / Yu. Fan, M. Marioli, K. Zhang // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2021. – Vol. 192. – P. 113642. DOI: [https://doi:10.1016/j.jpba.2020.113642](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642).

84. FDA Approval of Gefitinib for the Treatment of Patients with Metastatic EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer / D. Kazandjian, G.M. Blumenthal, W. Yuan, [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – Vol. 22. – № 6. – P. 1307–1312. DOI: [https://doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2266](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2266)

85. FDA Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride [Electronic resource]. URL: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfdadocs/> (accessed: 07.02.2023)
86. FDA drug approval summary: Gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets / M.H. Cohen, G.A. Williams, R. Sridhara, [et al.] // *Oncologist*. – 2003. – Vol. 8. – № 4. – P. 303–306. doi: 10.1634/theoncologist.8-4-303
87. FDA Guidance document: Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation [Electronic resource]. URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/> (accessed: 07.02.2023)
88. FDA Guidance for Industry: Drug Products, Including Biological Products, That Contain Nanomaterials-guidance for Industry. [Electronic resource]. URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/> (accessed: 07.02.2023)
89. Filipe, V. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by Nano Sight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates / V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot // *Pharmaceutical Research*. – 2010. – Vol. 27. – № 5. – P. 796–810. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>
90. Formulation Development, Optimization by Box-Behnken Design, and In Vitro Characterization of Gefitinib Phospholipid Complex Based Nanoemulsion Drug Delivery System / M.P. Kumar, P. Solanki, B. Mangla, [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Innovation*. – 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12247-022-09690-6>
91. Formulation, In Vitro and In Vivo Evaluation of Gefitinib Solid Dispersions Prepared Using Different Techniques / S. Alshehri, A. Alanazi, E.M. Elzaya, [et al.] // *Processes*. – 2021. – Vol. 9. – №. 7. – P. 1210. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr9071210>
92. Franzen, U. Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance-liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography / U. Franzen, J. Ostergaard // *Journal of Chromatography A*. – 2012. – Vol. 1267. – P. 32–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.018>
93. Frohlich, M. Parameters influencing the determination of liposome lamellarity by ³¹P-NMR / M. Fröhlich, V. Brecht, R. Peschka-Süss // *Chemistry and Physics of*

Lipids. – 2001. – Vol. 109. – № 1. – P. 103–112. DOI: [https://doi: 10.1016/s0009-3084\(00\)00220-6](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(00)00220-6)

94. Galangin-loaded, liver targeting liposomes: Optimization and hepatoprotective efficacy / J. Zhu, Q. Wang, H. Li, [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science Technology*. – 2018. – Vol. 46. – P. 339–347.

95. Gefitinib encapsulation based on nanoliposomes for enhancing the curative effect of lung cancer / Y. Hu, J. Zhang, H. Hu, [et al.] // *Cell Cycle*. – 2020. – Vol. 19. – № 24. – P.3581–3594. DOI: [https://doi: 10.1080/15384101.2020.1852756](https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1852756)

96. Gefitinib for advanced Non-small cell lung cancer / E.H. Sim, I.A. Yang, R. Wood-Baker, [et al.] // *Cochrane Database System Review*. – 2018. – Vol. 1. – № 1. – P. CD006847. DOI: [https://doi: 10.1002/14651858.CD006847.pub2](https://doi.org/10.1002/14651858.CD006847.pub2)

97. Gefitinib induces EGFR and $\alpha 5\beta 1$ integrin co-endocytosis in glioblastoma cells / A.F. Blandin, E.C. Da Silva, M.C. Mercier, [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2021. – Vol. 78. – № 6. – P. 2949-2962. DOI: [https://doi: 10.1007/s00018-020-03686-6](https://doi.org/10.1007/s00018-020-03686-6)

98. Gefitinib-loaded starch nanoparticles for battling lung cancer: Optimization by full factorial design and in vitro cytotoxicity evaluation / H. Amin, S.K. Osman, A.M. Mohammed, [et al.] // *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2023. – Vol. 31. – № 1. – P. 29–54. DOI: [https://doi: 10.1016/j.jsps.2022.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.11.004)

99. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways / R. Sordella, D.W. Bell, D.A. Haber, [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 305 – № 5687. – P. 1163-1167. DOI: [https://doi: 10.1126/science.1101637](https://doi.org/10.1126/science.1101637)

100. Giant Unilamellar Vesicle Electroformation: What to Use, What to Avoid, and How to Quantify the Results / Z. Boban, I. Mardesic, W.K. Subczynski, [et al.] // *Membranes*. – 2021. – Vol. 11. – № 11/. – P. 860. DOI: [https://doi:10.3390/membranes11110860](https://doi.org/10.3390/membranes11110860)

101. Globally Approved EGFR Inhibitors: Insights into Their Syntheses, Target Kinases, Biological Activities, Receptor Interactions, and Metabolism / M.A.S. Abourehab, A.M. Alqahtani, B.G.M. Youssif, [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 21. – P. 6677. DOI: [https://doi: 10.3390/molecules26216677](https://doi.org/10.3390/molecules26216677)

102. Grabielle-Madelmont, C. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography / C. Grabielle-Madelmont, S. Lesieur, M. Ollivon // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 2003. – Vol. 56. – № 1–3. – P. 189–217. DOI: [https://doi: 10.1016/s0165-022x\(03\)00059-9](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(03)00059-9)

103. Gupta, M. Formulation and characterization of gefitinib loaded polymeric nanoparticles using Box-Behnken design / M. Gupta, R.K. Marwaha, H. Dureja // *Current Nanomedicine*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 46–60. DOI: [https://doi: 10.2174/2468187308666180815145350](https://doi.org/10.2174/2468187308666180815145350)

104. Has, C. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. / C. Has, P. Sunthar // *Journal of Liposome Research*. – 2020. – Vol. 30. – № 4. – P. 336–65. DOI: [https://doi: 10.1080/08982104.2019.1668010](https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010)

105. Hatziantoniou, S. Method of simultaneous analysis of liposome components using HPTLC/FID / S. Hatziantoniou, C. Demetzos // *Methods Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 1522. – P. 49–54. DOI: [https://doi: 10.1007/978-1-4939-6591-5_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_4)

106. Hegde, N. Formulation and optimization of gefitinib-loaded nanosuspension prepared using a newly developed dendritic lipopeptide oligomer material / N. Hegde, K. Juvale, P. Prabhakar // *Chemical Papers*. – 2021. – № 75. – P. 2007–2022. DOI: [https://doi:10.1007/s11696-020-01453-2](https://doi.org/10.1007/s11696-020-01453-2)

107. Herbst, R.S. Review of epidermal growth factor receptor biology / R.S. Herbst // *International Journal of Radiation Oncology – Biology – Physics*. – 2004. – № 59 (Suppl. 2). – P. 21–26. DOI: [https://doi: 0.1016/j.ijrobp.2003.11.041](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.11.041)

108. High performance liquid chromatography analysis of 100-nm liposomal nanoparticles using polymer-coated, silica monolithic columns with aqueous mobile phase / N. Itoh, A. Kimoto, E. Yamamoto, [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2017. – Vol. 1484. – P. 34–40. DOI: [https://doi: 10.1016/j.chroma.2016.12.080](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.080)

109. High Throughput Identification and Quantification of Phospholipids in Complex Mixtures / N.M. Balsgart, M. Mulbjerg, Z. Guo, [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 88. – № 4. – P. 2170–2176. DOI: [https://doi: 10.1021/acs.analchem.5b03798](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03798)

110. Honary, S. Effect of zeta potential on the properties of nanodrug delivery systems—a review (part 1) / S. Honary, F. Zahir // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. – 2013. – Vol. 12. – № 2. – P. 255–64. DOI: [https://doi: 10.4314/tjpr.v12i2.19](https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19)

111. Honary, S. Effect of zeta potential on the properties of nanodrug delivery systems—a review (part 2) / S. Honary, F. Zahir // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. – 2013. – Vol. 12. – № 2. – P. 265–73. DOI: [https://doi: 10.4314/tjpr.v12i2.20](https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20)

112. HPLC analysis as a tool for assessing targeted liposome composition / M. Oswald, M. Platscher, S. Geissler, [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2016. – Vol. 497. – № 1-2. – P. 293–300. DOI: [https://doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.11.014](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.014).

113. Impact of weight loss at presentation on survival in epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI) sensitive mutant advanced Non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with first-line EGFR-TKI / L. Lin, J. Zhao, J. Hu, [et al.] // *Journal of Cancer*. – 2018. – Vol. 9. – № 3. – P. 528–534. DOI: [https://doi: 10.7150/jca.22378](https://doi.org/10.7150/jca.22378)

114. Influence of PEG coating on the biodistribution and tumor accumulation of pH-sensitive liposomes / S.S. Nunes, R.S. Fernandes, C.H. Cavalcante, [et al.] // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 123–130. DOI: [https://doi: 10.1007/s13346-018-0583-8](https://doi.org/10.1007/s13346-018-0583-8)

115. Inhalation treatment of primary lung cancer using liposomal curcumin dry powder inhalers / T. Zhang, Y. Chen, Y. Ge, [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica: B* – 2018. – Vol. 8. – № 3. – P.440–448. DOI: [https://doi:10.1016/j.apsb.2018.03.004](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.03.004)

116. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction / C.S. Frings, T.W. Fendley, R.T. Dunn, [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 1972. Vol. 18. – № 7 – P. 673–674.

117. An improved well plate format lipid quantification assay for standardisation of experiments with extracellular vesicles / T. Visnovitz, X. Osteikoetxea, B.W. Sódar, [et al.] // *Journal of Extracellular Vesicles*. – 2019. – Vol. 8. – № 1. – P. 1565263. DOI: [https://doi: 10.1080/20013078.2019.1565263](https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1565263)

118. Itoh, N. Rapid evaluation of the quantity of drugs encapsulated within nanoparticles by high-performance liquid chromatography in a monolithic silica column / N. Itoh, T. Santa, M. Kato // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 407. – № 21. – P. 6429–6434. DOI: [https://doi: 10.1007/s00216-015-8805-0](https://doi.org/10.1007/s00216-015-8805-0)

119. Jampilek, J. Insights into Lipid-Based Delivery Nanosystems of Protein-Tyrosine Kinase Inhibitors for Cancer Therapy / J. Jampilek, K. Kralova // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 12. – P. 2706. DOI: [https://doi: 10.3390/pharmaceutics14122706](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122706)

120. Jeannot, V. Anti-tumor efficacy of hyaluronan-based nanoparticles for the co-delivery of drugs in lung cancer / V. Jeannot, C. Gauche, S. Mazzaferro // *Journal of Controlled Release*. – 2018. – Vol. 275. – P. 117–128. DOI: [https://doi: 10.1016/j.jconrel.2018.02.024](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.024)

121. Kapoor, A. Liposomal Drug Product Development and Quality: Current US Experience and Perspective / M. Kapoor, S.L. Lee, K.M. Tyner // *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. – 2017. – Vol. 19. – P. 632–641. DOI: [https://doi:10.1208/s12248-017-0049-9](https://doi.org/10.1208/s12248-017-0049-9)

122. Kaushik, R. An Overview on Recent Patents and Technologies on Solid Dispersion / R. Kaushik, V. Budhwar, D. Kaushik // *Recent Patents in Drug Delivery and Formulation*. – 2020. – Vol. 14. – № 1. – P. 63–74. DOI: [https://doi: 10.2174/1872211314666200117094406](https://doi.org/10.2174/1872211314666200117094406)

123. Koki, K. Formation of nanosized lipid vesicles with asymmetric lipid components using a pulsed-jet flow method / K. Koki, O. Toshihisa, T. Shoji // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2021. – Vol. 327. – P. 128917. DOI: [https://doi: 10.1016/j.snb.2020.128917](https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128917)

124. Kuntsche, J. Cryogenic (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems / J. Kuntsche, J.C. Horst, H. Bunjes // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2011. – Vol. 417. – № 1–2. – P. 120–137. DOI: [https://doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.001](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.001)

125. Lee, N.Y. Structure and dynamics of the epidermal growth factor receptor C-terminal phosphorylation domain / N.Y. Lee, T.L. Hazlett, J.G. Koland // *Protein Science*. – 2006. – Vol. 15. – № 5. – P. 1142–1152. DOI: [https://doi: 10.1110/ps.052045306](https://doi.org/10.1110/ps.052045306)

126. Leong, E.W.X. Lipid Nanoparticles as Delivery Vehicles for Inhaled Therapeutics / E.W.X. Leong, R. Ge // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10. – № 9. – P. 2179. DOI: <https://doi:10.3390/biomedicines10092179>

127. Li, L. Simultaneous separation of small interfering RNA and lipids using ion-pair reversed-phase liquid chromatography / L. Li, J.P. Foley, R. Helmy // *Journal of Chromatography A*. – 2019. – Vol. 1601. – P. 145–154. DOI: <https://doi:10.1016/j.chroma.2019.04.061>

128. Liang, X. Effect of chain lengths of PEO-PPO-PEO on small unilamellar liposome morphology and stability: an AFM investigation / X. Liang, G. Mao, K.Y.S. Ng // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2005. – Vol. 285. – № 1. – P. 360–372. DOI: <https://doi:10.1016/j.jcis.2004.11.042>

129. Lin, J.-T. Non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography of synthetic triacylglycerols and diacylglycerols / J.-T. Lin, C.L. Woodruff, T.A. McKeon // *Journal of Chromatography A*. – 1997. – Vol. 782. – № 1. – P. 41–48. DOI: [https://doi:10.1016/S0021-9673\(97\)00482-2](https://doi:10.1016/S0021-9673(97)00482-2)

130. Lin, W.S. Liposome production and concurrent loading of drug simulants by microfluidic hydrodynamic focusing / W.S. Lin, N. Malmstadt // *European Biophysics Journal*. – 2019. – Vol. 48. – № 6. – P. 549–58. DOI: <https://doi:10.1007/s00249-019-01383-2>

131. Lipid fatty acid profile analyses in liver and serum in rats with Nonalcoholic steatohepatitis using improved gas chromatography-mass spectrometry methodology / X. Wu, Y. Tong, K. Shankar et al. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 59. – № 2. – P. 747–754. DOI: <https://doi:10.1021/jf1038426>

132. “Lipidomics”: Mass spectrometric and chemometric analyses of lipids / Z. Wu, G. I. Bagarolo, S. Thoröe-Boveleth, [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2020. – Vol. 159. – P. 294–307. DOI: <https://doi:10.1016/j.addr.2020.06.009>

133. Liposomal and rographolide dry powder inhalers for treatment of bacterial pneumonia via anti-inflammatory pathway / M. Li, T. Zhang, L. Zhu, [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 528. – № 1–2. – P. 163–171. DOI: <https://doi:10.1016/j.ijpharm.2017.06.005>.

134. Liposomal formulations in clinical use: an updated review / U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 9. – № 2. – P.12. DOI: [https://doi: 10.3390/pharmaceutics9020012](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012)
135. Liposomal membrane permeability assessment by fluorescence techniques: main permeabilizing agents, applications and challenges / G. Nasr, H. Greige-Gerges, A. Elaissari, [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 580. – P. 119198. DOI: [https://doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119198](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119198)
136. *Liposome-Based Drug Delivery Systems* / Lu W, Qi XR, eds. – Berlin: Springer. – 2018. 496 p. ISBN 978-3-662-49231-4. DOI: [https://doi: 10.1007/978-3-662-49231-4_3-1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-49231-4_3-1)
137. Liposome: classification, preparation, and applications / A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, [et al.] // *Nanoscale Research Letter*. –2013. – Vol. 8. – № 1. – P. 102. DOI: [https://doi:10.1186/1556-276X-8-102](https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102)
138. Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors / D. Carugo, E. Bottaro, J. Owen, [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – № 6. – P. 25876. doi: [10.1038/srep25876](https://doi.org/10.1038/srep25876)
139. Liposome retention in size exclusion chromatography / T. Ruyschaert, A. Marque, J.L. Duteyrat, [et al.] // *BMC Biotechnology*. – 2005. –Vol. 5. – P. 11. DOI: [https://doi: 10.1186/1472-6750-5-11](https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-11)
140. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications / H. Nsairat, D. Khater, U. Sayed, [et al.] // *Heliyon*. – 2022. – Vol. 8. – № 5. – P. e09394. DOI: [https://doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09394](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394)
141. Liu, P. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives / P. Liu, G. Chen, J. Zhang // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – № 4. – P. 1372. DOI: [https://doi: 10.3390/molecules27041372](https://doi.org/10.3390/molecules27041372)
142. Local inflammation alters the lung disposition of a drug loaded pegylated liposome after pulmonary dosing to rats / S. Haque, O. Feeney, E. Meeusen, [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2019. – Vol. 307. – P. 32–43. DOI: [https://doi: 10.1016/j.jconrel.2019.05.043](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.05.043)

143. Lombardo, D. Methods of liposomes preparation: formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine application / D. Lombardo, M.A. Kiselev // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 3. – P. 543. DOI: [https://doi: 10.3390/pharmaceutics14030543](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543)

144. London, E. A convenient and sensitive fluorescence assay for phospholipid vesicles using diphenylhexatriene / E. London, G.W. Feligenson // *Analytical Biochemistry*. – 1978. – Vol. 88. – № 1. – P. 203–211. DOI: [https://doi: 10.1016/0003-2697\(78\)90412-8.88\(1978\)](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90412-8.88(1978))

145. Lung delivery of nanoliposomal salbutamol sulfate dry powder inhalation for facilitated asthma therapy / S. Honmane, A. Hajare, H. More, [et al.] // *Liposome Research*. – 2019. – Vol. 29. – № 4. – P. 332–342. DOI: [https://doi: 10.1080/08982104.2018.1531022](https://doi.org/10.1080/08982104.2018.1531022)

146. Mady, M.M. Effect of chitosan coating on the characteristics of DPPC liposomes / M.M. Mady, M.M. Darwish // *Journal of Advertising Research*. – 2010. – Vol. 1 – №3. – P. 187–191. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.05.008>

147. Magin, R.L. Rapid separation of liposomes using ultrafiltration / R.L. Magin, H.C. Chan // *Biotechnol Tech*. – 1987. – Vol. 1. – P. 185–188. <https://doi.org/10.1007/BF00227558>

148. Majumder, J. Multifunctional Lipid-Based Nanoparticles for Codelivery of Anticancer Drugs and siRNA for Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer with Different Level of Resistance and EGFR Mutations / J. Majumder, T. Minko // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – №. 7. – P. 1063. DOI: [https://doi: 10.3390/pharmaceutics13071063](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071063)

149. Makeen, H.A. Gefitinib loaded nanostructured lipid carriers: characterization, evaluation and anti-human colon cancer activity in vitro / H.A. Makeen, S. Mohan, M.A. Al-Kasim // *Drug Delivery*. – 2020. – Vol. 27. – № 1. – P. 622–631. DOI: [https://doi: 10.1080/10717544.2020.1754526](https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1754526)

150. Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics / C.B. Roces, G. Lou, N. Jain, [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 12. – № 11. – P. 1095. DOI: [https://doi: 10.3390/pharmaceutics12111095](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111095)

151. Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer / Y. Wang, P. Li, T. Truong-Dinh Tran, [et al.] // *Nanomaterials*. – 2016. – Vol. 6. – № 2. – P. 26. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano6020026>.

152. Mass spectrometry-based lipid analysis and imaging / K.C. Pathmasiri, T.T.A. Nguyen, N. Khamidova, [et al.] // *Current Topics in Membranes*. 2021. – Vol. 88. – P. 315-357. DOI: <https://doi:10.1016/bs.ctm.2021.10.005>

153. Metastatic Non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / D. Planchard, S. Popat, K. Kerr, [et al.] // *Annals of oncology*. – 2018. – Vol. 29 (Suppl 5). – P. iv192–iv237. DOI: <https://doi:10.1093/annonc/mdy275>

154. Microfluidic and lab-on-a-chip preparation routes for organic nanoparticles and vesicular systems for nanomedicine applications / L. Capretto, D. Carugo, S. Mazzitelli, [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – Vol. 65. – № 11–12. – P.1496–1532. DOI: <https://doi:10.1016/j.addr.2013.08.002>

155. Mithoowani, H. Non-Small-Cell Lung Cancer in 2022: A Review for General Practitioners in Oncology / H. Mithoowani, M. Febbraro // *Current Oncology*. – 2022. – Vol. 29. – № 3. – P.1828–1839. DOI: <https://doi:10.3390/curroncol29030150>

156. More, M.P. Quality by design approach for the synthesis of graphene oxide nanosheets using full factorial design with enhanced delivery of Gefitinib nanocrystals / M.P. More, P.K. Deshmukh // *Material Research Express*. – 2021. – Vol. 8. – № 7. –P. 075602. DOI: <https://doi:10.1088/2053-1591/ac144b>

157. Nano liquid chromatography directly coupled to electron ionization mass spectrometry for free fatty acid elucidation in mussel / F. Rigano, A. Albergamo, D. Sciarrone, [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 88. – № 7. – P. 4021 – 4028. DOI: <https://doi:10.1021/acs.analchem.6b00328>

158. Nayek, S. Development of Novel S PC-3 gefitinib lipid nanoparticles for effective drug delivery in breast cancer. Tissue distribution studies and cell cytotoxicity analysis / S. Nayek, N.M. Raghavendra, B.S. Kumar // *Journal of Drug Delivery Science*

and Technology. – 2021. – Vol. 61. – P. 102073. DOI: [https://doi: 10.1016/j.jddst.2020.102073](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102073)

159. Ni, X.L. In vitro and in vivo antitumor effect of gefitinib nanoparticles on human lung cancer. / X.L. Ni, L.X. Chen, H. Zhang // Drug Delivery. – 2017. – Vol. 24. – № 1. – P. 1501–1512. DOI: [https://doi: 10.1080/10717544.2017.1384862](https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1384862)

160. Novel Gefitinib Formulation with Improved Oral Bioavailability in Treatment of A431 Skin Carcinoma / C. Godugu, R. Doddapaneni, A.R. Patel, [et al.] // Pharmaceutical Research. – 2016. – Vol. 33. – № 1. – P. 137–154. DOI: [https://doi: 10.1007/s11095-015-1771-6](https://doi.org/10.1007/s11095-015-1771-6)

161. Novel Liposomal Gefitinib (L-GEF) Formulations / X. Zhou, B. Yung, Y. Huang, [et al.] // Anticancer Research. – 2012. – Vol. 32. – № 7. – P. 2919-2923. DOI: [https://doi:ar.iiarjournals.org/content/32/7/2919#sec-2](https://doi.org/ar.iiarjournals.org/content/32/7/2919#sec-2)

162. Novel method for obtaining homogeneous giant vesicles from a monodisperse water-in-oil emulsion prepared with a microfluidic device / S. Sugiura, T. Kuroiwa, T. Kagota, [et al.] // Langmuir. – 2008. – Vol. 24. – № 9. – P.4581–4588. DOI: [https://doi: 10.1021/la703509r](https://doi.org/10.1021/la703509r)

163. A Novel microfluidic-based approach to formulate size-tuneable large unilamellar cationic liposomes: formulation, cellular uptake and biodistribution investigations / G. Lou, G. Anderluzzi, S. Woods, [et al.] // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2019. – Vol. –143. – P. 51–60. DOI: [https://doi: 10.1016/j.ejpb.2019.08.013](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.08.013)

164. Osteikoetxea, X. Improved characterization of EV preparations based on protein to lipid ratio and lipidproperties / X. Osteikoetxea, A. Balogh, K. Szabó-Taylor // PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – № 3. – P. e0121184. DOI: [https://doi: 10.1371/journal.pone.0121184](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121184)

165. Ota, S. Microfluidic formation of monodisperse, cell-sized, and unilamellar vesicles / S. Ota, S. Yoshizawa, S. Takeuchi // Angewandte. – 2009. – Vol. 48. – № 35 – P. 6533–6537. DOI: [https://doi: 10.1002/anie.200902182](https://doi.org/10.1002/anie.200902182)

166. 31P NMR Spectroscopy of Phospholipids: From Micelles to Membranes / J. Schiller, M. Muller, B. Fuchs, [et.al.] // *Current Analytical Chemistry*. – 2007. – V. 3. – № 4. – P. 283-301. DOI: [https://doi: 10.2174/157341107782109635](https://doi.org/10.2174/157341107782109635)

167. p28-functionalized PLGA nanoparticles loaded with gefitinib reduce tumor burden and metastases formation on lung cancer / A.R. Garizo, F. Castro, C. Martins, [et al.] // *Journal of Control Release*. – 2021. – Vol. 337. – P. 329–342. DOI: [https://doi:10.1016/j.jconrel.2021.07.035](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.07.035)

168. McPhee, C.I. Measuring the lamellarity of giant lipid vesicles with differential interference contrast microscopy / G. Zorinants, W. Langbein, P. Borri // *Biophysical Journal*. – 2013. – Vol. 105. – № 6. – P. 1414–1420. DOI: [https://doi: 10.1016/j.bpj.2013.07.048](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.07.048)

169. Particle size analyses of polydisperse liposome formulations with a Novel multispectral advanced nanoparticle tracking technology / P. Singh, J. Bodycomb, B. Travers, [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 566. – P. 680–686. DOI: [https://doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.06.013](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.06.013)

170. Particle size analysis: AAPS workshop report, cosponsored by the Food and Drug Administration and the United States Pharmacopeia / D.J. Burgess, E. Duffy, F. Etzler et al. // *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. – 2004. – Vol. 6. – № 3. – P. e20. DOI: [https://doi: 10.1208/aapsj060320](https://doi.org/10.1208/aapsj060320)

171. Phospholipid hydrolysis in a pharmaceutical emulsion assessed by physicochemical parameters and a new analytical method // L. Rabinovich-Guilatt, C. Dubernet, K. Gaudin, [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2005. – Vol. 61. – № 1–2. – P. 69–76. DOI: [https://doi:10.1016/j.ejpb.2005.03.001](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.001)

172. Practical and efficient synthesis of gefitinib through selective O-alkylation: A Novel concept for a transient protection group / S.K. Kang, S.W. Lee, D. Woo, [et al.] // *Synthetic Communications* – 2017. – Vol. 47. – № 21. – P. 1990–1998. DOI: [https://doi:10.1080/00397911.2017.1359627](https://doi.org/10.1080/00397911.2017.1359627)

173. Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags / M. Yu, W. Yuan, D. Li, [et al.] / *Journal of Controlled Release*. – 2019. – Vol. 315. – P. 23–30. DOI: [https://doi: 10.1016/j.jconrel.2019.09.016](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.09.016).

174. Preparation and characterization of bupivacaine multivesicular liposome: A QbD study about the effects of formulation and process on critical quality attributes / B. Lu, Q. Ma, J. Zhang, [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 607. – P. 120646. DOI: [https://doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120335](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120335)

175. Preparation and Evaluation of Gefitinib Containing Nanoliposomal Formulation for Lung Cancer Therapy / S. Rohilla, R. Awasthi, M. Mehta, [et al.] // *BioNanoScience*. – 2022. – Vol. 12. – P. 241–255. DOI: [https://doi: 10.1007/s12668-022-00938-6](https://doi.org/10.1007/s12668-022-00938-6)

176. Preparation and evaluation of inhalable dry powder containing glucosamine-conjugated gefitinib SLNs for lung cancer therapy / N. Satari, S. Taymouri, J. Varshosaz, [et al.] // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2020. – Vol. 46. – № 8. – P. 1265–1277. DOI: [https://doi: 10.1080/03639045.2020.1788063](https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1788063)

177. Quality by Design Approach in Liposomal Formulations: Robust Product Development / W. Alshaer, H. Nsairat, Z. Lafi, [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 1. – P. 10. DOI: [https://doi:10.3390/molecules28010010](https://doi.org/10.3390/molecules28010010)

178. A quality by design approach on polymeric nanocarrier delivery of gefitinib: Formulation, in vitro, and in vivo characterization / N.S. Kola Srinivas, R. Verma, G. Pai Kulyadi, L. Kumar // *International Journal of Nanomedicine*. – 2017. – Vol. 12. – P. 15–28. DOI: [https://doi: 10.2147/IJN.S122729](https://doi.org/10.2147/IJN.S122729)

179. Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives / Z. Németh, I. Csóka, R. Semnani Jazani, [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. Vol. 14. – № 9. – P. 1798. DOI: [https://doi: 10.3390/pharmaceutics14091798](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091798)

180. Quantification of phospholipid degradation products in liposomal pharmaceutical formulations by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) / D.A. Siriwardane, C. Wang, W. Jiang, [et al.] // *International*

Journal of Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 578. – P. 119077. DOI: [https://doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119077](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119077)

181. Raman Spectroscopy Characterization of Multi-Functionalized Liposomes as Drug-Delivery Systems for Neurological Disorders / F. Rodà, S. Picciolini, V. Mangolini, [et al.] // *Nanomaterials*. – 2023. – Vol. 13. – № 4. – P. 699. DOI: [https://doi:10.3390/nano13040699](https://doi.org/10.3390/nano13040699)

182. Raman Microscopy for Non-Invasive Imaging of Pharmaceutical Nanocarriers: Intracellular Distribution of Cationic Liposomes of Different Composition / T. Chernenko, R.R. Sawant, M. Miljkovic, [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2012. – Vol. 9. – № 4. – P. 930–936. DOI: [https://doi: 10.1021/mp200519y](https://doi.org/10.1021/mp200519y)

183. A rapid isocratic high-performance liquid chromatography method for determination of cholesterol and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in liposome-based drug formulations / R. Singh, M. Ajagbe, S. Bhamidipati, [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2005. – Vol. 1073. – № 1–2. – P. 347–353. DOI: [https://doi:10.1016/j.chroma.2004.12.036](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.036)

184. Recent advancements in liposome technology / N. Filipczak, J. Pan, S.S.K. Yalamarty, [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2020. – Vol. 156. – P. 4–22. DOI: [https://doi: 10.1016/j.addr.2020.06.022](https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.022)

185. Recent development of drug delivery systems through microfluidics: from synthesis to evaluation / Z. Ma, B. Li, J. Peng, [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 2. – P. 434. DOI: [https://doi: 10.3390/pharmaceutics14020434](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020434)

186. Recent progress in bioconjugation strategies for liposome-mediated drug delivery / B. Almeida, O.K. Nag, K.E. Rogers, [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 23. – P. 5672. DOI: [https://doi: 10.3390/molecules25235672](https://doi.org/10.3390/molecules25235672)

187. Resveratrol Liposomes and Lipid Nanocarriers: Comparison of Characteristics and Inducing Browning of White Adipocytes / Y. Zu, H. Overby, G. Ren, [et al.] // *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*. – 2018. – Vol. 164. – P. 414–423. DOI: [https://doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.04](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.12.04)

188. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems / J. Li, X. Wang, T. Zhang, [et al.] // Asian Journal of Pharmaceutical Science. – 2015. – Vol. 10. – № 2. – P. 81–98. DOI: [https://doi: 10.1016/j.ajps.2014.09.004](https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004)

189. Rizwanullah, M. Nanostructured Lipid Carriers: A Novel Platform for Chemotherapeutics / M. Rizwanullah, J. Ahmad, S. Amin // Current Drug Delivery. – 2016. – Vol. 13. – № 1. – P. 4–26. doi: [10.2174/1567201812666150817124133](https://doi.org/10.2174/1567201812666150817124133)

190. Rohilla, S. Effect of chitosan coating on the physicochemical characteristics of gefitinib loaded nanoliposomes / S. Rohilla, H. Dureja // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2018. – Vol. 9. – № 12. – P. 5098–5110. DOI: [https://doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(12\).5098-10](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(12).5098-10)

191. The Role of Cryoprotective Agents in Liposome Stabilization and Preservation / G.F. Boafo, K.T. Magar, M.D. Ekpo, [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 20. – P. 12487. DOI: [https://doi: 10.3390/ijms232012487](https://doi.org/10.3390/ijms232012487).

192. Role of In Vitro Release Methods in Liposomal Formulation Development: Challenges and Regulatory Perspective / D. Solomon, N. Gupta, N.S. Mulla, [et al.] // An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists. – 2017. – Vol. 19. – P. 1669–1681. DOI: [https://doi: 10.1208/s12248-017-0142-0](https://doi.org/10.1208/s12248-017-0142-0)

193. Sanderson, J.M. Analysis of liposomal membrane composition using Raman tweezers / J.M. Sanderson, A.D. Ward // Chemistry Communications. – 2004. – Vol. 9. – P. 1120–1121. DOI: [https://doi: 10.1039/b316757g](https://doi.org/10.1039/b316757g)

194. Savale, S.K. Formulation and evaluation of nanoemulsion containing gefitinib / S.K. Savale // International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences. – 2018. – Vol. 7. – № 4. – P. 157–160.

195. Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation / M. Ono, A. Hirata, T. Kometani, [et al.] // Molecular Cancer Therapeutics. – 2004. – Vol.3. – № 4. – P. 465–472.

196. Shaker, S. Factors affecting liposomes particle size prepared by ethanol injection method / S. Shaker, A.R. Gardouh, M.M. Ghorab // *Research in Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Vol. 12. – № 5. – P. 346–352. DOI: <https://doi:10.4103/1735-5362.213979>

197. Shi, Y. High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry Method for the Identification and Quantification of Lipids in Liposomes / Y. Shi, X. Li // *Methods of Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 2622. – P. 227–239. DOI: https://doi: 10.1007/978-1-0716-2954-3_20

198. Significant Effect of Anti-tyrosine Kinase Inhibitor (Gefitinib) on Overall Survival of the Glioblastoma Multiforme Patients in the Backdrop of Mutational Status of Epidermal Growth Factor Receptor and PTEN Genes / S.H. Arif, A.A. Pandith, R. Tabasum, [et al.] // *Asian Journal of Neurosurgery*. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – P. 46–52. DOI: https://doi: 10.4103/ajns.AJNS_95_17

199. Size-Dependent Ability of Liposomes to Accumulate in the Ischemic Myocardium and Protect the Heart / R.A. Mukhamadiyarov, E.A. Senokosova, S.S. Krutitsky, [et al.] // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2018. – Vol. 72. – № 3. – P.143–152. DOI: <https://doi: 10.1097/FJC.0000000000000606>

200. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a review of the methods of manufacture and routes of administration // J. Akbari, M. Saeedi, F. Ahmadi, [et al.] // *Pharmaceutical Development and Technology*. – 2022. – Vol. 27. – № 5. – P. 525–544. DOI: <https://doi: 10.1080/10837450.2022.2084554>.

201. D'Souza, S. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms / S. D'Souza // *Advanced Pharmacology*. – 2014. – Vol. 2014. – ID 304757. DOI: <https://doi: 10.1155/2014/304757>

202. D'Souza, S.S. Methods to Assess in Vitro Drug Release from Injectable Polymeric Particulate Systems / S.S. D'Souza, P.P. DeLuca // *Pharmaceutical Research*. 2006. – Vol. 23. – P. 460–474. DOI: <https://doi: 10.1007/s11095-005-9397-8>

203. Sphingomyelin Distribution in Lipid Rafts of Artificial Monolayer Membranes Visualized by Raman Microscopy / J. Ando, M. Kinoshita, J. Cui, [et al.] //

Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – Vol. 112. – № 15. – P. 4558–4563.

204. Spira, A. Multidisciplinary management of lung cancer / A. Spira, D.S. Ettinger // *The New England Journal of Medicine*. – 2004. – Vol. 350. – №. 4. – P. 379–392. DOI: [https://doi: 10.1056/NEJMra035536](https://doi.org/10.1056/NEJMra035536)

205. Stetefeld, J. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences / J. Stetefeld, S.A. McKenna, T.R. Patel // *Biophysical Reviews*. – 2016. – Vol. 8. – P. 409–427. DOI: [https://doi: 10.1007/s12551-016-0218-6](https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6)

206. A study on characteristic of different sample pretreatment methods to evaluate the entrapment efficiency of liposomes / C.C. Ran, D. Chen, M. Xu, [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2016. – Vol. 1028. – P. 56–62. DOI: [https://doi: 10.1016/j.jchromb.2016.06.008](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.06.008)

207. Sugar-based Cryoprotectants Stabilize Liposomal Vesicles by Exhibiting a Cholesterol-like Effect / S.S. Sikandar, D. Kumar, A.G. Rathod, [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 21. – № 2. – P. 813–821. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00918>

208. Targeting CD44 receptor-positive lung tumors using polysaccharide-based nanocarriers: Influence of nanoparticle size and administration route / V. Jeannot, S. Mazzaferro, J. Lavaud, [et al.] // *Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 12. – № 4. – P. 921–932. DOI: [https://doi: 10.1016/j.nano.2015.11.018](https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.018)

209. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in EGFR-Mutated Lung Cancer: Current and Emerging Therapies / K. Khaddour, S. Jonna, A. Deneka, [et al.] // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – №13. – P. 3164. DOI: [https://doi :10.3390/cancers13133164](https://doi.org/10.3390/cancers13133164)

210. Timoszyk A. Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) to Study the Properties of Liposomes // *Liposomes*. InTech. 2017. DOI: [https://doi:10.5772/intechopen.68522](https://doi.org/10.5772/intechopen.68522)

211. Tissue distribution and tumor uptake of folate receptor-targeted epothilone folate conjugate, BMS-753493, in CD2F1 mice after systemic administration / H. Shen,

L. Wang, W. Chen, [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2016. – Vol. 6. – № 5. – P. 460–467. DOI: [https://doi: 10.1016/j.apsb.2016.07.009](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.07.009)

212. Tomnikova, A. Liposomes: preparation and characterization with a special focus on the application of capillary electrophoresis / A. Tomnikova, A. Orgonikova, T. Krizek // *Monatshefte für Chemie*. – 2022. – Vol. 153. – № 9 – P. 687–695. DOI: [https://doi: 10.1007/s00706-022-02966-0](https://doi.org/10.1007/s00706-022-02966-0)

213. Treatment of advanced non small cell lung cancer / M.A. Bareschino, C. Schettino, A. Rossi, [et al.] // *Journal of Thoracic Disease*. – 2011. – Vol. 3. – № 2. – P. 122–133. DOI: [https://doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2010.12.08](https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2010.12.08)

214. Tretiakova, D.S. Liposomes as adjuvants and vaccine delivery systems / D.S. Tretiakova, E.L. Vodovozova // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A (Membrane and Cell Biology)*. – 2022. – Vol. 16. – № 1. – P. 1–20. DOI: [https://doi: 10.1134/S1990747822020076](https://doi.org/10.1134/S1990747822020076)

215. United States Food and Drug Administration drug approval summary: gefitinib (ZD 1839, Iressa) tablets / M.N. Cohen, G.A. Williams, R. Sridhara, [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – Vol. 10. – № 4. – P. 1212–1218. DOI: [https://doi: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0564](https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0564)

216. Varache, M. Optimization of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Analysis of Drug-Loaded Lipid Nanoparticles and its Application to the Determination of Leakage and Release Profiles / M. Varache, M. Ciancone, A.-C. Couffin // *Journal of Pharmaceutical Science*. – 2020. – Vol. 109. – № 8. – P. 2527–2535. DOI: [https://doi:10.1016/j.xphs.2020.05.003](https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.05.003)

217. Vehring, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying / R. Vehring // *Pharmaceutical Research*. – 2008. – Vol. 25. – № 5. – P. 999–1022. DOI: [https://doi: 10.1007/s11095-007-9475-1](https://doi.org/10.1007/s11095-007-9475-1)

218. Wang, Y. Regulatory Considerations Specific to Liposome Drug Development as Complex Drug Products / Y. Wang, D.W. Grainger // *Frontiers Drug Delivery*. – 2022. – № 2. – P. 901281. DOI: [https://doi: 10.3389/fddev.2022.901281](https://doi.org/10.3389/fddev.2022.901281)

219. Xu, R.L. Progress in nanoparticles characterization: sizing and zeta potential measurement / R. Xu // *Particuology*. – 2008. – Vol. 6. – № 2. – P. 112–1155. DOI: [https://doi: 10.1016/j.partic.2007.12.002](https://doi.org/10.1016/j.partic.2007.12.002)
220. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes / M.C. Smith, R.M. Crist, J.D. Clogston, [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 409. – P. 5779–5787. DOI: [https://doi:10.1007/s00216-017-0527-z](https://doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z)
221. Zhang, G. Lipid in chips: a brief review of liposomes formation by microfluidics. / G. Zhang, J. Sun // *International Journal of Nanomedicine*. – 2021. – № 16. – P. 7391–16. DOI: [https://doi: 10.2147/IJN.S331639](https://doi.org/10.2147/IJN.S331639)
222. Zhang, H. Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids / H. Zhang, Z. Wang, O. Liu // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2015. – Vol. 5. – № 4. – P. 223–230. DOI: [https://doi: 10.1016/j.jpha.2015.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.005)
223. Zhang, H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation / H. Zhang // *Methods Mol Biol*. – 2017. – Vol. 1522. – P. 17–22. DOI: [https://doi: 10.1007/978-1-4939-6591-5_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2)
224. Zhao, C. Pharmacokinetics of gefitinib: roles of drug metabolizing enzymes and transporters / C. Zhao, S.Y. Han, P.P. Li // *Current Drug Delivery*. – 2017. – Vol. 14. – № 2. – P. 282–288. DOI: [https://doi: 10.2174/1567201813666160709021605](https://doi.org/10.2174/1567201813666160709021605)

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Министерство здравоохранения Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ ИМЕНИ Н.Н. БЛОХИНА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ «НМИЦ ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА»
МИНЗДРАВА РОССИИ)

Для служебного пользования. Экз. №1

УТВЕРЖДАЮ

Директор НИИ ЭДнТО
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина Минздрава России
к. биол. наук



В.С.Косоруков

2023 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ**НА ПРОИЗВОДСТВО ГОТОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ**

Гефитиниб

лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 2 мг

ЛР 01897624-1-2023

Срок действия регламента до «24» 11 2026г.

Москва 2023

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

СОГЛАСОВАН

(наименование уполномоченного
органа государства признания)_____
(Ф.И.О. должность подпись)

« ____ » _____ 202_ г.

М.П.

УТВЕРЖДЕН

(наименование уполномоченного
органа референтного государства)_____
(Ф.И.О. должность подпись)

« ____ » _____ 202_ г.

М.П.

СОГЛАСОВАН

(наименование уполномоченного
органа государства признания)_____
(Ф.И.О. должность подпись)

« ____ » _____ 202_ г.

М.П.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Торговое наименование лекарственного препарата: Гефитиниб

Международное непатентованное наименование: Гефитиниб

Лекарственная форма: лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекцийДозировка: 2 мг**Держатель регистрационного удостоверения:**федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет),
119048 Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Номер НД _____

ПРИЛОЖЕНИЕ В

**Общество с ограниченной ответственностью
«Исследовательский Институт Химического Разнообразия»
(ООО «ИИХР»)**

141401, Российская Федерация, Московская область, городской округ Химки, город Химки, улица Рабочая, дом 2а,
строение 1

Тел.: (495) 995-49-41, 225-11-89, 105-30-74; Факс: (495) 626-97-80
ОГРН 1215000003987, ИНН/КПП 5047247179/504701001

Генеральный директор ООО
«ИИХР», Напазова Н.А.


подпись
16.11.2016
дата



АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы

Мы, нижеподписавшиеся, входящие в комиссию представителей ООО «ИИХР»: директор по исследованиям и разработке Салахетдинов Д.Х., начальник лаборатории контроля качества Жесткова И.П., начальник отдела обеспечения качества Шапошников Н.А., составили настоящий акт о проведении апробации аналитических методик контроля качества лекарственного средства «Гефитиниб, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций, 2 мг» по проекту нормативного документа по качеству. Данное предложение было разработано в ходе выполнения научно-исследовательской работы по теме: «Разработка и исследование лекарственной формы гефитиниба для парентерального применения» в условиях контрольно-аналитической лаборатории ООО «ИИХР». Проект нормативного документа по качеству лекарственного средства «Гефитиниб, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций, 2 мг» может быть рекомендован к внедрению на производственной площадке ООО «ИИХР».

Директор по исследованиям и
разработке

должность

Начальник лаборатории
контроля качества

должность

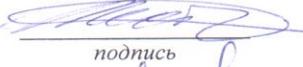
Начальник отдела обеспечения
качества

должность

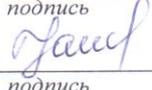

подпись

Салахетдинов Д.Х.

расшифровка
Жесткова И.П.


подпись

расшифровка
Шапошников Н.А.


подпись

расшифровка

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

УТВЕРЖДАЮ
 Проректор по учебной работе
 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
 Сеченова Минздрава России
 (Сеченовский Университет)
 _____ Литвинова Т.М.
 _____ 20__ г.



АКТ

о внедрении результатов диссертации Бурдаева Николая Игоревича
 в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии и фармакологии
 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Бурдаева Николая Игоревича на тему: «Разработка и исследование лекарственной формы гефитиниба для парентерального применения» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ИПО при изучении дисциплины фармацевтическая технология, читаемой слушателям циклов повышения квалификации по направлению подготовки (специальности) 33.08.01 Фармацевтическая технология.

Директор Института профессионального образования
 д-р мед. наук, профессор

_____ Е.В. Ших

Заведующий кафедрой
 фармацевтической технологии и фармакологии ИПО
 д-р фарм. наук, профессор

_____ Н.Д. Бунятян

Начальник Учебного управления

_____ Л.Ю. Юдина

ПРИЛОЖЕНИЕ Д



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ОНКОЛОГИИ ИМЕНИ Н.Н. БЛОХИНА»**
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
**(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России)**
Каширское ш., д. 24, Москва, 115522;
тел. +7 (499) 324-24-24; e-mail: info@ronc.ru

В диссертационный совет ДСУ 208.002.02
при ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)

от _____ № _____

на № _____ от _____

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящий акт составлен в том, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Бурдаева Николая Игоревича на тему «Разработка и исследование лекарственной формы гефитиниба для парентерального применения» апробированы в Научно-исследовательском институте экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России).

Материалы исследования используются при разработке лабораторной технологии получения липосомальных лекарственных форм противоопухолевых субстанций и методик их аналитических исследований.

Директор Научно-исследовательского
института экспериментальной диагностики и терапии опухолей
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
канд. биол. наук



В.С. Косоруков

24.11.2023