

*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

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) и в федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

доктор фармацевтических наук,  
профессор

**Бунятян Наталья Дмитриевна**

доктор фармацевтических наук

**Шпрах Зоя Сергеевна**

**Официальные оппоненты:**

**Егорова Светлана Николаевна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по образовательной деятельности Института фармации

**Каленикова Елена Игоревна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», заведующая кафедрой фармацевтической химии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «25» ноября 2024 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.020 на базе ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Электронная версия диссертации, автореферат и объявление о защите размещены на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета ПДС 0300.020,  
доктор фармацевтических наук, профессор

**В.В. Дорофеева**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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 gefитиниб – низкомолекулярный селективный обратимый ингибитор тирозинкиназы EGFR, который блокирует фосфорилирование и активацию EGFR опухолевых клеток. Gefитиниб (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 gefitiniba и методов ее аналитических исследований и контроля качества.

### **Цель и задачи исследования**

**Цель** исследования – разработка ЛЛФ-лио gefitiniba 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 gefitiniba.
2. Обосновать и разработать технологию (способ) получения ЛЛФ для парентерального введения, устойчивой при хранении.
3. Изучить физико-химические характеристики дисперсий мульти- и моноламеллярных липосом gefitiniba 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 гевитиниба.

**Научная новизна.** Впервые:

- выбран оптимальный состав стерически стабилизированной ЛЛФ гевитиниба и обоснована технология ее получения, базирующаяся на модификации метода гидратации тонкой пленки;
- разработана технология получения инъекционной ЛЛФ гевитинаба, стабильной при хранении, с использованием лиофилизации;
- исследованы физико-химические характеристики дисперсий мульти- и монослоевых 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 гевитиниба 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 гевитиниба;
- обоснованы и разработаны лабораторный регламент получения ЛЛФ-лио гевитиниба 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, Ego 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 gefitinib и модель ЛЛФ для парентерального применения на его основе.

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

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты выбора оптимального состава стерически стабилизированной ЛЛФ-лио gefitiniba 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 gefitiniba.
4. Показатели качества готового продукта – ЛЛФ-лио gefitiniba.

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 научного направления исследований, определены цель и 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 гефитиниба, 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 РUDN/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 159 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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Липосомы получали методом Бенгхема с модификацией для гидрофобных субстанций. В соответствии с требованиями ГФ РФ и Ф ЕАЭС экспериментальные исследования проведены не менее чем в 3 повторностях (для технологических операций и при разработке аналитических методик) и в 9 повторностях (при валидации аналитических методик).

Определение размера липосом, распределения липосомальных частиц по размеру и  $\zeta$ -потенциала проводили методом ДСР на дзетасайзере Nanoseries Nano-ZS 3600. рН, динамическую вязкость, потерю в массе при высушивании устанавливали в соответствии с требованиями ГФ РФ. Для оценки ООР (хлороформа) применяли ГЖХ (газовый хроматограф Agilent 6890N).

Методики для количественного определения, оценки ЭВ и изучения высвобождения ГФТ из липосом методом спектрометрии (спектрофотометр Cary 100, Varian, Inc., Австралия), оценки ООР (хлороформа) методом ГЖХ (газовый хроматограф Agilent 6890N) разработаны в ходе выполнения диссертационной работы. Оценку цитотоксической активности ЛЛФ *in vitro* проводили с использованием МТТ-теста.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Выбор оптимального состава липосом ГФТ.** Основным структурным компонентом липосом являются фосфолипиды, имеющие амфифильную природу. Липиды определяют основные свойства липосом – заряд поверхности бислоя, биораспределение, проницаемость, высвобождение ДВ, а также определяют ЭВ, стабильность и токсичность липосомальных ЛС.

В диссертационной работе в качестве основного структурного компонента липосом использовали яичный (ЯФХ) или соевый (СФХ) фосфатидилхолин (далее – ЯФХ- и СФХ-липосомы, соответственно). Для снижения проницаемости липосомальной мембраны и повышения ее стабильности в мембрану вводили холестерин (Хол).

Чтобы получить стерически стабилизированные липосомы, которые не будут распознаны клетками ретикулоэндотелиальной системы и смогут находиться в

кровяном русле в течение продолжительного времени, использовали дистеароилфосфатидилэтаноламин, конъюгированный с полиэтиленгликолем-2000 (ПЭГ-ДСФА).

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

Технология получения ЛЛФ гефитиниба включала следующие основные операции:

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

На первом этапе исследования определяли оптимальное соотношение компонентов липосомальной мембраны, которое позволяет получить липосомы необходимого размера с эффективным включением ГФТ. Критериями приемлемости для выбора состава липосом считали размер частиц – не более 200 нм и ЭВ гефитиниба – не менее 80 %.

Установлено, что при низком содержании ЯФХ в липосомальной оболочке в везикулы включается менее 50 % ДВ. С увеличением массовой доли фосфатидилхолина происходит повышение ЭВ гефитиниба в липосомы (Таблица 1).

Таблица 1 – Выбор оптимального состава липосом

Модель	Массовое соотношение ГФТ/ФХ	Массовое соотношение ФХ/Хол/ПЭГ-ДСФА	Размер липосом, нм	ЭВ, %
Модельные составы с ЯФХ				
1	1/75	33,4/5,5/1	205 ± 5	43,90
2	1/100	44,5/6,7/1	189 ± 10	55,81
3	1/140	62,2/6,7/1	178 ± 10	72,09
4	1/160	83,3/6,7/1	180 ± 10	84,62
<b>5</b>	<b>1/187,5</b>	<b>83,3/6,7/1</b>	<b>190 ± 10</b>	<b>97,50</b>
6	1/200	83,3/6,7/1	210 ± 10	99,98
Модельные составы с СФХ				
1	1/40	35,6/3,6/1	183 ± 10	69,51
2	1/50	44,4/4,4/1	189 ± 6	91,36
<b>3</b>	<b>1/60</b>	<b>53,3/5,3/1</b>	<b>178 ± 11</b>	<b>97,53</b>
4	1/67,5	60,0/5,9/1	180 ± 5	98,77
5	1/75	66,8/7,5/1	190 ± 10	98,75
6	1/100	88,8/9,2/1	220 ± 19	98,76

Источник: составлено автором

Для дальнейших исследований отобрали:

– для получения липосом с ЯФХ – состав 5, как соответствующий обоим критериям приемлемости – размер частиц  $190 \pm 10$  нм, ЭВ = 97 – 100%; массовое соотношение ГФТ/ФХ/Хол/ПЭГ-ДСФА 1/187,5/15/2,25;

– для получения липосом с СФХ – состав 3, отвечающий критериям приемлемости – размер частиц  $178 \pm 11$  нм, ЭВ = 97 – 100%; массовое соотношение ГФТ/ФХ/Хол/ПЭГ-ДСФА 1/60/6/1,125. Кроме того, состав 3 содержал наименьшее количество липидов и соотношение ГФТ/ФХ было наиболее высоким.

### **Разработка технологии получения липосомальной дисперсии ГФТ.**

Первым этапом получения липосомальной дисперсии является растворение липидных компонентов и ДВ в органическом растворителе. В данном исследовании использовали хлороформ, поскольку и ГФТ, и выбранные компоненты липосомальной мембраны растворимы в данном растворителе. Кроме того, хлороформ обладает высокой летучестью и имеет низкую температуру кипения ( $61,15^\circ\text{C}$ ). Экспериментально установлены следующие условия получения липидной

пленки на роторном испарителе при постоянном перемешивании: растворитель – хлороформ; вакуум 200 – 300 мбар; температура –  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ ; скорость вращения ротора – 50–60 об/мин; время досушивания – от 20 до 40 мин; вакуум – 500 – 1000 мбар; гидратирующий агент для получения липосомальной дисперсии – вода для инъекций.

Из Таблицы 2 видно, что выполнение технологических операций в предлагаемых условиях позволяет получить МЛВ со следующими характеристиками: средним размером в диапазоне от 780 до 1020 нм; поверхность частиц заряжена слабо отрицательно, что характерно для ПЭГ-липосом; содержание ГФТ (мг/мл) соответствует рассчитанному.

Таблица 2 – Характеристики дисперсий МЛВ

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

*Источник: составлено автором*

МЛВ, образовавшиеся при гидратации липидной пленки водой, можно измельчить до МОВ, применив механическое воздействие, например, экструзию. 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 – через нейлоновые фильтры с размером пор 0,22 мкм. Оптимальное количество циклов экструзии установлено экспериментально (Таблица 3).

При однократной экструзии средний размер липосомальных частиц с ЯФХ уменьшился до 280 нм, а после 3-кратной – в среднем, до 190 нм. При этом размер частиц не изменялся в течение 3-х суток при хранении в холодильной камере при температуре не выше  $+8^\circ\text{C}$ . Низкие значения индекса полидисперсности после 3-х циклов экструзии также свидетельствуют о том, что такое количество циклов необходимо и достаточно для получения монодисперсных липосом ГФТ.

Таблица 3 – Определение оптимального числа циклов экструзии для получения МОВ гефитиниба

Число циклов	Размер частиц, нм		PDI	
	После экструзии	Через 72 ч после экструзии	После экструзии	Через 72 ч после экструзии
<b>ЯФХ-МОВ</b>				
1	280±4	269±8	0,310±0,01	0,315±0,03
2	222±4	231±7	0,250±0,01	0,278±0,01
3	190±10	190±10	0,190±0,01	0,190±0,02
4	185±7	195±11	0,177±0,02	0,200±0,01
5	176±13	188±6	0,164±0,03	0,220±0,01

*Источник: составлено автором*

После 3-кратной экструзии для полученных МОВ дополнительно контролировали  $\zeta$ -потенциал частиц, рН и вязкость дисперсии, количественное содержание и ЭВ гефитиниба (Таблица 4).

Таблица 4 – Основные характеристики МОВ гефитиниба, полученных при 3-кратной экструзии

Опыт	Размер липосом, нм	рН	$\zeta$ -потенциал мВ	Вязкость мПа·с	ГФТ, мг/мл	ЭВ, %
<b>ЯФХ-МОВ</b>						
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

*Источник: составлено автором*

Основным свойством, ограничивающим использование липосом, является их физическая и химическая лабильность. Нами установлено, что полученная по разработанной технологии липосомальная дисперсия неустойчива – в течение одного месяца хранения произошло увеличение размеров везикул в 1,5 раза и резкое падение  $\zeta$ -потенциала и вязкости также в 1,5 раза.

Оптимальным методом стабилизации липосом является лиофилизация дисперсии. Для стабилизации мембраны в процессе лиофилизации во внешнюю водную фазу дисперсий вводят вспомогательные вещества (ВВ) – криопротекторы. В данной работе в качестве криопротекторов для получения ЛЛФ-лио исследовали моносахарид (глюкозу) и дисахариды – лактозу и сахарозу. Показано, что введение криопротекторов не оказывает существенного влияния на размер липосом – их размер изменяется менее, чем на 10 %. Гораздо более выраженным является влияние криопротекторов на поверхностный заряд везикул – так, при использовании растворов глюкозы  $\zeta$ -потенциал снизился с -20,8 мВ до -15,9 мВ. Наименьшее влияние на

характеристики липосом оказывало применение в качестве криопротектора 10% раствора сахарозы.

Лиофилизацию проводили в соответствии с рекомендованной программой сублимации для ЛЛФ, используя ступенчатое, медленное замораживание (охлаждение полок сублимационной сушилки до  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч), с равномерным подъемом температуры до  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $+1,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ , а затем до  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$  и нагревание до температуры  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ .

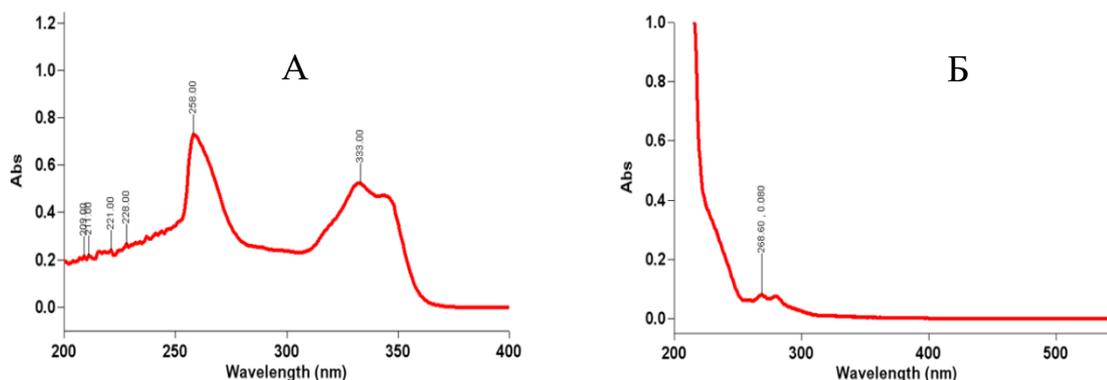
Проведенные исследования позволили разработать лабораторную технологию получения ЛЛФ-лио гефитиниба, включающую ГФТ/ЯФХ/Хол/ПЭГ-ДСФА/сахароза = 2/375/30/4,5/500 (мг/флакон), и проект ЛР.

**Разработка методов исследований и контроля качества ЛЛФ гефитиниба.** При разработке технологии получения ЛЛФ для оценки составов и различных ТП измеряли размер и  $\zeta$ -потенциал частиц, динамическую вязкость и рН липосомальной дисперсии. Для аналитических исследований разработана и валидирована методика спектрофотометрического количественного определения ДВ, которую модифицировали в зависимости от задач.

Поскольку компоненты липидного слоя растворимы в этаноле, а ГФТ – в диметилсульфоксиде (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 ( $332\pm 2$ ) нм, в котором ВВ не мешают определению ГФТ (Рисунок 1).

Валидация разработанной методики количественного определения гефитиниба в ЛЛФ показала ее соответствие действующим требованиям по всем валидационным характеристикам – специфичности, линейности, правильности и прецизионности (Таблица 5).



А – раствор гефитиниба в ДМСО 0,01 мг/мл); Б – раствор компонентов липосом в смеси ДМСО – этанол

Рисунок 1 – Электронные спектры поглощения ГФТ

Источник: получено автором

Таблица 5 – Результаты валидации методики количественного определения ГФТ в липосомальной дисперсии

Валидационная характеристика	Установленный критерий	Результат
Линейность	$r \geq 0,990$	$y = 0,187x + 0,031;$ $r = 0,998$
Повторяемость (сходимость)	$\bar{\varepsilon} \leq 2,0\%$	1,9
Внутрилабораторная прецизионность	$\bar{\varepsilon} \leq 2,0\%$ $\Delta_{\max} < \max \Delta_{As}$	$\Delta_{\max} = 0,87 \% <$ $\max \Delta_{As} = 3,2 \%$
Правильность	$\bar{\varepsilon} \leq 2,0\%$ $(\bar{x} - \Delta\bar{x}) \leq \mu \leq (\bar{x} + \Delta\bar{x})$	1,7 $99,67 \pm 1,64$

Источник: составлено автором

**Определение эффективности включения ГФТ в липосомы.** В исследовании использовали разработанную методику количественного определения, при этом определяли общее количество ГФТ и количество инкапсулированного или свободного лекарственного средства, а ЭВ, % рассчитывали как отношение количества инкапсулированного или свободного ГФТ к его общему количеству в процентах (Таблица 6).

При выборе оптимального состава ЛФ для оценки ЭВ гефитиниба в МЛВ проводили его количественное определение до и после экструзии через нейлоновые фильтры с диаметром пор 1,2 мкм и 0,45 мкм и показали, что ЭВ зависит от соотношения липидов липосомальной оболочки (Таблица 1). По данным, представленным в Таблице 6, видно, что в МЛВ выбранного состава (5)

инкапсулируется около 97,5% ГФТ и концентрация свободного ГФТ меньше предела количественного определения.

Таблица 6 – Определение ЭВ гефитиниба в ЯФХ-липосомы

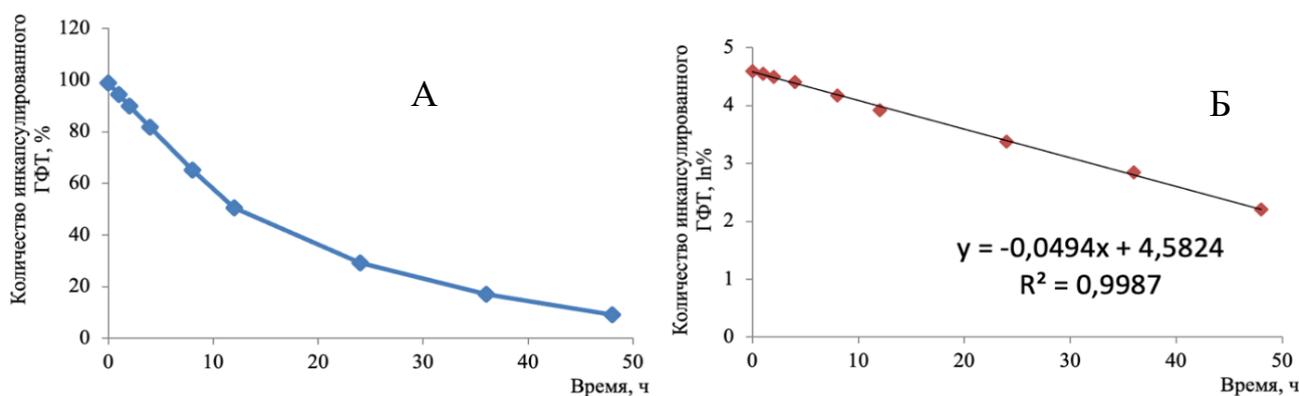
Мультиламеллярные везикулы							
Найдено ГФТ, мг/мл	состав	1	2	3	4	5	
	до экструзии	0,412	0,433	0,413	0,392	0,394	
	МЛВ	0,181	0,242	0,298	0,332	0,384	
ЭВ, %		43,90	55,81	72,09	84,62	97,50	
Моноламеллярные везикулы							
Найдено ГФТ, мг/мл	инкапсулированного	0,388		0,391		0,379	
	общее количество	0,397		0,408		0,384	
ЭВ, %		97,66		95,83		98,75	
ЛЛФ-лио							
Найдено ГФТ, мг/мл	всего	2,186	2,138	1,920	1,896	2,074	2,241
	свободного	0,060	0,042	0,062	0,056	0,077	0,071
ЭВ, %		97,26	98,04	96,78	97,05	96,29	96,83
Метрологические характеристики		$\bar{x} = 97,04$ $S = 0,5870$ $s\bar{x} = 0,2396$ $\Delta\bar{x} = 0,62$ $\bar{\epsilon} = 0,63$ %					

Источник: составлено автором

Поэтому для оценки ЭВ гефитиниба в МОВ проводили определение общего количества и количества инкапсулированного ГФТ, а отделение свободного ДВ от нагруженных липосом проводили центрифугированием. Показано, что при измельчении липосом выбранного состава ЭВ гефитиниба не изменилась и составила более 97 %. Оценку ЭВ в ЛЛФ-лио проводили после гидратации лиофилизата и установили, что ЭВ гефитиниба в липосомы не снижалась после лиофилизации и также составляла около 97% (Таблица 6).

Для прогнозирования фармакокинетики липосомального ЛС изучили высвобождение гефитиниба из ЛЛФ-лио *in vitro*. Исследование проводили методом мембранного диализа. Поскольку ГФТ практически нерастворим в воде, в качестве среды растворения использовали фосфатно-солевой буфер рН 7,4, содержащий 2 % полисорбата 80, при скорости перемешивания  $100 \pm 2$  об/мин, пробы отбирали через 1, 2, 4, 8, 24, 36 и 48 часов.

Экспериментальный профиль высвобождения ГФТ из липосом (Рисунок 2) свидетельствует о постепенном высвобождении ДВ из липидного бислоя. Отсутствие «взрывного» высвобождения ГФТ указывает на то, что во время исследования не происходит распада липосом. Графически зависимость концентрации ГФТ, не перешедшего в среду высвобождения, от времени в координатах ln-время представляет собой прямую, описываемую уравнением  $y = -0,0494x + 4,5824$  с  $R^2 = 0,9987$  (Рисунок 2). Это позволяет предположить, что высвобождение ГФТ из липосом соответствует кинетике первого порядка.



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

Рисунок 2 – Высвобождение gefitinib из липосом

Источник: составлено автором

**Изучение действия ЛЛФ на выживаемость опухолевых клеток** показало, что она проявляет значительно меньшую цитотоксичность на клеточной культуре аденокарциномы легкого A549 по сравнению со свободным ГФТ (Рисунок 3). Скорее всего, более низкая цитотоксичность связана с медленным высвобождением ГФТ из липосомальных везикул и, соответственно, более медленным проникновением ДВ в клетку.

Для стандартизации ЛЛФ-лио gefitinib, 2 мг, использовали методики ГФ РФ и методики, разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования.

Поскольку в качестве органического растворителя для всех компонентов ЛЛФ использовали хлороформ, в готовом продукте проводили определение его остаточных количеств методом ГЖХ (Рисунок 4).

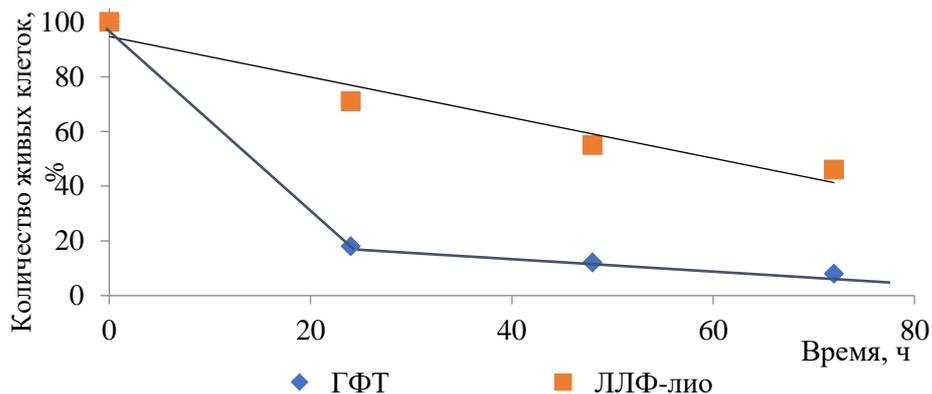


Рисунок 3 – Влияние ГФТ на выживаемость клеток аденокарциномы легкого А549 (концентрация ГФТ 20 мкг/мл)  
 Источник: составлено автором

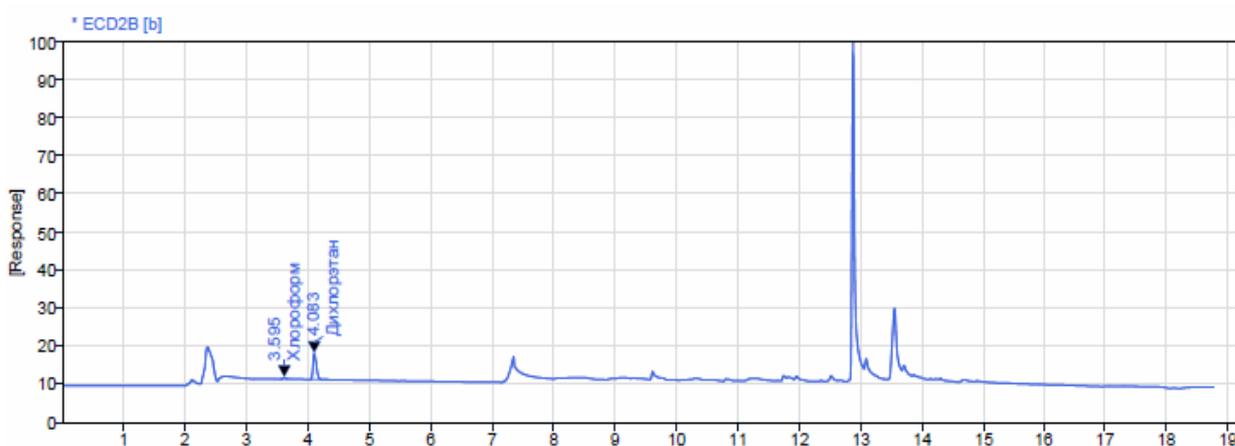


Рисунок 4 – ГЖХ-хроматограмма образца ЛЛФ-лио гефитиниба  
 Источник: получено автором

Полученные результаты показали минимальное содержание хлороформа в партиях готового продукта (менее 10 ppm), что полностью соответствует требованиям – не более 60 ppm.

При **исследовании стабильности** разработанное ЛС хранили в первичной упаковке – флаконах из трубки темного стекла для лекарственных средств, закупоренных пробками из резины под обкатку алюминиевыми колпачками при температуре не выше  $-18^{\circ}\text{C}$  в защищенном от света месте (морозильная камера). Хранение разработанного ЛС в течение 6 месяцев показало, что за этот период изменений качества ЛЛФ-лио гефитиниба не произошло.

Анализ фактических данных, полученных при исследованиях лабораторных образцов, модельных смесей и экспериментальных партий липосом ГФТ, а также при исследовании стабильности позволил разработать **проект спецификации на**

**гефитиниб, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций, 2 мг**  
(Таблица 7).

Таблица 7 – Проект спецификации на ЛЛФ-лио гефитиниба (гефитиниб, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций, 2 мг)

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

Источник: составлено автором

Примечание – <sup>1</sup> тест-дозы разрабатываются

## 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  $-18^{\circ}\text{C}$  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.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты фармацевтической разработки, представленные в диссертационной работе, станут основой для дальнейшей оптимизации и масштабирования технологии ЛЛФ-лио гефитиниба. Результаты диссертационного исследования могут быть использованы при получении и контроле качества липосомального ЛС в ходе доклинических исследований. Аналитические методики могут быть использованы для контроля качества ЛЛФ не только гефитиниба, но и наноформ других соединений.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшая разработка темы предполагает доклинические исследования разработанного липосомального ЛС, оптимизацию и валидацию технологии его получения и организацию производства. Кроме того, будет завершено долгосрочное изучение стабильности ЛЛФ-лио гефитиниба. Используемый в работе алгоритм может быть применен при разработке других липосомальных лекарственных средств.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### 1. Научные статьи, опубликованные в научных журналах, входящих в международные базы цитирования (МБЦ):

1. **Бурдаев, Н.И.** Разработка и валидация методики количественного определения гефитиниба в липосомальной лекарственной форме / Н.И. Бурдаев, З.С. Шпрах, Л.Л. Николаева [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2023. – Т. 57, № 5. – С. 50-54.

2. 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.

#### 2. Научные статьи, опубликованные в научных журналах из Перечня ВАК РФ (ИФ выше 0,1):

3. 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, № 2-1. – С. 316-322.

#### 3. Научные статьи, опубликованные в научных журналах из Перечня РУДН:

4. Разработка модельного состава липосомальной формы гефитиниба / **Н.И. Бурдаев**, Л.Л. Николаева, З.С. Шпрах [и др.] // Фармация. – 2023. – Т. 72, № 2. – С. 17-21.

#### 4. Материалы конференций:

5. Николаева, Л.Л. Выбор криопротектора для липосомальной формы гефитиниба / Николаева Л.Л., З.С. Шпрах, **Н.И. Бурдаев** [и др.] // XXX Российский

национальный конгресс "Человек и лекарство»: Сборник тезисов, Москва, 2023. – С. 88.

6. **Бурдаев, Н.И.** Разработка и валидация методики количественного определения гевитиниба в липосомах / Н.И. Бурдаев, З.С. Шпрах, Л.Л. Николаева [и др.] // Новые перспективные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы: Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова с международным участием, Москва, 2023. – С. 19-20.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВВ	– вспомогательные вещества
ГЖХ	– газо-жидкостная хроматография
ГФ РФ	– Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания
ГФТ	– гевитиниб
ДВ	– действующее вещество
ЛЛФ	– липосомальная лекарственная форма
ЛЛФ-лио –	– лиофилизированная липосомальная лекарственная форма
ЛР	– лабораторный регламент
ЛС	– лекарственное средство
МЛВ	– мультиламеллярные везикулы
МОВ	– малые одноламеллярные везикулы
НМРЛ	– немелкоклеточный рак легкого
ООР	– остаточные органические растворители
ПЭГ-ДСФА	– дистеароилфосфатидилэтаноламин, конъюгированный с полиэтиленгликолем-2000
СФХ	– соевый фосфатидилхолин
ТП	– технологический процесс
УФ-	– ультрафиолетовый
Ф ЕАЭС	– Фармакопея ЕАЭС
Хол	– холестерин
ЭВ	– эффективность включения
ЯФХ	– яичный фосфатидилхолин
EGFR	– Epidermal Growth Factor Receptor (рецептор эпидермального фактора роста)

## **АННОТАЦИЯ**

**Бурдаев Николай Игоревич (Россия)**

### **Разработка и исследование лекарственной формы gefitiniba для парентерального применения**

Разработана новая ЛЛФ gefitiniba для парентерального применения. Выбран оптимальный состав, разработана технология получения с использованием лиофилизации, стабильная при хранении. Изучены свойства полученной ЛЛФ и определены критичные показатели качества. Разработаны и валидированы аналитические методики контроля качества полученных липосом на различных стадиях технологического процесса, скорости высвобождения gefitiniba из липосом, определения остаточных органических растворителей, проведена стандартизация ЛЛФ. Обоснованы и разработаны лабораторный регламент получения противоопухолевой ЛЛФ-лио gefitiniba и нормативный документ по качеству.

**Burdaev Nikolay Igorevich (Russia)**

### **Development and research of gefitinib parenteral formulation**

A novel parenteral liposomal formulation for gefitinib has been developed. The optimal composition was selected, and a technology for manufacturing using lyophilization that is stable during storage was developed. The properties of the manufactured liposomal formulation have been studied and critical quality indicators have been determined. Analytical methods for quality control of liposomes manufactured at various stages of the technological process, the release rate of gefitinib from liposomes, determination of residual organic solvents were developed and validated, standardization of liposomal formulation was carried out. Laboratory regulations for obtaining antitumor lyophilized liposomal formulation for gefitinib and a regulatory document on quality were substantiated and developed.