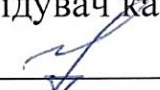


**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 (Борисюк І.Ю.)

“ 27 ” серпня 2021 р

МЕТОДИЧНА РОЗРОБКА ПРАКТИЧНОГО ЗАНЯТТЯ

Факультет: фармацевтичний

Навчальна дисципліна «Фармацевтична біотехнологія»

Семінарське заняття №12 Тема: **«Технологія виготовлення нанопрепаратів.»**

для аспірантів

Практичне заняття розробив:
асистент



(Акішева А.С.)

підпис

Практичне заняття обговорено на
методичній нараді кафедри
«27» серпня 2021 р.

Протокол № 1

Одеса – 2021

Тема: Технологія виготовлення нанопрепаратів.

Мета: Ознайомитися з технологією виготовлення нанопрепаратів.

Основні поняття: Біотехнологія, біоб'єкти, біомолекули

Обладнання: згідно до вимог Належної аптечної практики (GPP).

Навчальний час: 4,0

План

I. Організаційний момент

Зміст теми

1. Зміст теми.

При розробці фармацевтичних препаратів необхідно приділяти особливу увагу завданням, пов'язаним зі стійкістю ліпосом при зберіганні продукту, т. К. Відомо, що ліпосоми виявляють «витік» ліки і ліпідну деградацію протягом інтервалу часу між їх приготуванням і використанням хворими. Необхідно розрізняти два види стабільності - хімічну стабільність компонентів ліпідів і основної речовини;

стабільність зв'язування між ліпідами і лікарською речовиною. Стабільність хімічного складу можна досягти підбором оптимальних температурних режимів зберігання. Для стабілізації комплексів використовують заморожування - висушування в присутності криопротекторів. При цьому отримують дегідратуєміє ліпосомальні форми препаратів, які легко зберігаються і при регідратації водою утримують понад 90% лікарського засобу. Так, наприклад, ліпосомальні форми доксорубіцину витримують зберігання в ліофільно висушеному вигляді більш 1 року. Таким чином, основним критерієм підбору криопротекторів є збереження досліджуванією речовиною стабільності при дегідратації мембран ліпосом. Хоча за допомогою ліофілізації можна отримати стабільний сухий препарат ліпосом легко відновлюваний при додаванні води, це вимагає ретельного управління процесом дегідратації. Так як процес ліофілізації включає заморожування препарату з подальшим видаленням води, то виникає проблема, пов'язана з тим, що на стадіях заморожування і зневоднення можливо фізичне пошкодження ліпосом. Так, в якості криопротектори для ліпосом запропоновано використання циклічної інулогексози (мінус 25 ° С). Одним з найбільш важливих факторів, що визначають ступінь захисної дії на ліпосоми під час дегідратації цукрів, є розмір ліпосоми. Як відомо, при збільшенні середнього діаметра ліпосоми спостерігається відповідне збільшення «витоку», викликанією ліофілізацією. Везикули середнього діаметра близько 100 нм і менше забезпечують максимальне збереження вмісту. Це підвищення стабільності зі зменшенням розмірів ліпосоми має місце тільки для везикул не менше 50 нм. «Витік» після дегідратації з більш дрібних везикул значно вище, ніж з відповідних ліпосом діаметром понад 100

нм. Крім того, дрібні ліпосоми більш схильні до злиття, ніж більші. Можливо, що ліпосоми, які мають більше одного подвійного шару, властива велика чутливість злиття при дегідратації або регідратації, ніж уніламельярним везикул. Ліпідний склад ліпосом також визначає стабільність препаратів під час дегідратації і регідратації при використанні кріопротекторів. У повністю гідратованих бішару проникність значно зменшується за рахунок включення холестерину і зростає при збільшенні ступеня насичення ацильних ланцюгів фосфоліпідів. Однак при дослідженні «витоку» при дегідратації або регідратації залежності від складу везикул, чіткої кореляції між ступенем «витоку» і фізичними властивостями біслоя не було виявлено. У великих уніламельярних везикулах (середній діаметр близько 100 нм), що складаються з яєчного фосфатидилхоліну, додавання холестерину в мольних відносинах до 40% не впливало на вміст карбоксифлуоресцеїна.

У той же час в везикулах, що складаються з діпальмітоїлфосфатиділхоліна і діпальмітоїлфосфатиділгліцеріна (мольное ставлення 10: 1) при включенні близько 40% холестерину відзначалася вірогідно більше включення карбоксифлуоресцеїна. Інші дослідники повідомили, що везикули з діпальмітоїлфосфатиділхоліна, зневоднені в присутності циклічної інулогексози, характеризуються максимальним вмістом карбоксифлуоресцеїна при включенні в подвійний шар 20% холестерину. При дослідженні «витоку» після дегідратації / регідратації уніламілярних ліпосом, приготовлених із фосфатидилхолін з різним складом жирних кислот, найбільше включення спостерігається в системах, що містять повністю насичені ланцюга, такі як діпальмітоїлфосфатиділхолін. Вражає, однак, те, що спостерігаються відмінності відносно невеликі, враховуючи, що діпальмітоїлфосфатиділхолінові ліпосоми знаходяться в стані гелю при температурі нижче 41 ° С, в той час як інші вивчені сполуки (наприклад, діолеїлфосфатиділхолін) знаходяться при цій температурі в рідкокристалічному стані. Аналогічно цьому, при дослідженні впливу головки фосфоліпідів на «витік», викликану дегідратацією, важко пояснити спостерігаються відмінності простими фізичними характеристиками. Наприклад, везикули, приготовані з сумішшю яєчного фосфатидилхоліну і яєчного фосфатидилгліцерин, характеризуються зростанням «витоку», викликаного дегідратацією при збільшенні вмісту в ліпосоми фосфатидилхолина. У той же час у везикул, приготованих з інших кислих фосфоліпідів, таких як фосфатидилсерин, фосфатидними кислота або фосфатиділінозит, ступінь включення вмісту та ж, що і у везикул з фосфатидилхоліну. Також показано, що везикули, що складаються з 1-пальмітоїл-2-олеїлфосфатиділхоліна і фосфатидилсерина, утримують по суті весь включений в них ізоцитрат при дегідратації в присутності мальтози або

трегалози. Описані вище дослідження наводять думку, що ступінь збереження бар'єру проникності везикул в присутності сахарокріопротекторів визначається досить складною взаємодією чинників. До цих факторів можуть ставитися взаємодії між головною групою фосфоліпіда і цукром, хімічною структурою ліпіда, термотропних фазовим поведінкою ліпіда, природою застосованого кріопротектори і розміром везикули. У разі везикул, приготованих методом екструзії, цей останній параметр теоретично може регулюватися, однак може спостерігатися незначна відмінності середнього розміру, розподілу розмірів або ламеллярною в функції складу ліпіду. Захист ліпосом під час ліофілізації може передбачати запобігання злиття везикул, збереження бар'єру проникності подвійного шару і те й інше. З цих двох компонентів запобігання злиття досягається легше і, ймовірно, пред'являє менше вимог до властивостей кріопротектори. При цьому гальмування злиття може зажадати тільки мінімізації взаємного накладення везикул. Тому для будь-якого успішного кріопротектори, якщо цукрова матриця, утворена шляхом дегідратації, знаходиться при температурі, нижче температури замерзання, ця вельми жорстка структура повинна задовольняти необхідним критеріям. Однак досягнення цієї мети можна полегшити, якщо цукор взаємодіє з головками фосфоліпідів і створює стерическое бар'єр для збереження подвійних шарів, навіть якщо під час циклу ліофілізації везикули концентруються між кристалами льоду. Звертаючись до більш важкої проблеми збереження бар'єру проникності подвійного шару і до розгляду механізму, за допомогою якого ліофілізація може викликати «витік», необхідно проаналізувати ряд етапів процесу в цілому. Було досліджено, чи відбувається «витік» переважно під час заморожування зразка, протягом фази дегідратації / регідратації або в результаті підвищення проникності регідратованих везикул. Хоча заморожування і відтавання суспензії ліпосом може викликати значну «витік» інкапсульованого розчиненої речовини, ступінь цієї «витоку» залежить від розміру і складу везикул. Везикули обмеженого розміру (малі уніламельлярніе везикули) чутливі до злиття, викликаному заморожуванням і розморожуванням, і характеризуються також вираженою «витоком», причому ця дія можуть гальмувати деякі цукру. Розмір великих везикул зазвичай не змінюється, і «витік» з них набагато менше, ніж з відповідних малих систем. На відміну від звичайних кріопротекторів (наприклад, гліцерин), здатних ефективно запобігати викликану заморожуванням / відтаюванням «витік» з великих ліпосом, цукру (наприклад, трегалоза), мають в кращому випадку лише помірної захисною здатністю. Це сприяє тому, що щонайменше частина втрати розчиненого речовини, яка відбувається під час дегідратації / регідратації ліпосом, викликається процесом заморожування. Однак пряме порівняння «витоку»,

викликаной ліофілізацією і заморожуванням / оттаиванием, важко. Хоча обидва процеси містять етап заморожування, під час ліофілізації відтавання як таке не відбувається. Тому можливо, що втрата розчиненої речовини, яка спостерігається після циклу заморожування / відтавання, відбувається тільки на етапі відтавання і не робить впливу на «витік», викликану ліофілізацією. При порівнянні «витоку» розчиненої речовини з везикул, які зазнали або циклу заморожування / відтавання, або тільки ліофілізації, відзначається, що «витік» виявляється більшою мірою після регідратації сухих ліпосом. Це змушує припустити, що в результаті самого процесу дегідратації на ліпосомний бар'єр проникності впливають додаткові напруги, відмінні від сил, що діють під час заморожування. Нарешті, розглядаючи етап, на якому «витік» інкапсульованої речовини відбувається під час ліофілізації, слід також відзначити, що перед відновленням початкової проникності везикул після регідратації може спостерігатися також період підвищення проникності подвійного шару. Цей ефект, можливо, відображає залежить від часу переупаковки фосфоліпідів всередині бішару.

З урахуванням того факту, що для багатьох ліпосом різного складу, ліофілізованих в присутності сахаракріопротектора, з носія втрачається тільки частина спочатку інкапсульованої речовини, виникло припущення, що ця «витік» може відбуватися з безлічі везикул всередині популяції. Наприклад, в популяції великих ліпосом середнього діаметра 100 нм за що спостерігається «витоком» з первинної популяції буде нести відповідальність група більших везикул. Або часткова «витік» вмісту везикул може відображати осмотично обумовлений лізис з повторним утворенням (герметизацією) везикул після зміни осмотичного градієнта. Ці припущення привели до оцінки «витоку» з везикул під час множинних циклів ліофілізації. Якщо втрата інкапсульованої речовини проісходіть з безлічі чутливих везикул або відображає розсіювання осмотичного градієнта, під час наступних циклів дегідратації / регідратації можна очікувати лише невелику додаткову «витік» або її відсутність. Однак це припущення не доведено наявними даними. Якщо зразки ліпосом, що містять карбоксифлуоресцеїн, піддати двом циклам ліофілізації і регідратації і виміряти «витік» після кожного циклу, втрата інкапсульованої речовини спостерігається як після першого, так і після другого циклу дегідратації / регідратації. Далі, після кожного циклу «витік» одна і та ж. Ці дані підтримують уявлення, згідно з яким «витік», викликана дегідратацією, можливо, відображає напруги, що діють на всі везикули, і не усувається попередніми оновленням ліпосом. Для пояснення механізму, за допомогою якого деякі цукру здатні захищати зневоднені ліпосоми, був запропонований цілий ряд гіпотез. Спочатку припускали, що цукру можуть утворювати водневий зв'язок з полярними головками фосфоліпідів і заміщати молекулу води в ліофілізованому стані.

Відносні захисні властивості різних вуглеводів пов'язували як з числом гідроксильних груп, доступних для водневої зв'язку, так з їх просторовою орієнтацією на цукрі. Пізніше ця модель була уточнена в світлі спроможності ряду цукрів модифікувати термотропні характеристики ліпідів. Температура, при якій фосфоліпідні мембрани переходять з гелю в рідкокристалічну фазу, залежить від ступеня їх гідратації. Як встановлено, температура переходу з гелю в рідкокристалічний стан для діпальмітоїлфосфатиділхоліна знижена до 68 ° С для безводного і до 41 ° С для повністю гідратованого ліпіда. Аналогічноєсніження температури переходу з гелю в рідкокристалічний стан може бути досягнуто при асоціації зазначеного ліпіда з дисахаридом трегалозу. Ці спостереження дали підставу припустити, що під час дегідратації суспензії ліпосом мембрана фосфоліпідів може здійснювати фазовий перехід і що «витік» інкапсульованої речовини може бути наслідком цього переходу. Тому виникло припущення, що трегалоза і інші цукру, здатні зберігати безводні ліпіди в рідкокристалічному стані, запобігають такому фазовий перехід і тим самим зменшують «витік» інкапсульованої речовини. Прямий доказ взаємодії між трегалозу і безводних діпальмітоїлфосфатиділхоліном було отримано при ЯМР - дослідженнях твердого стану ліпідів. Ці дослідження показали, що в сумішах діпальмітоїлфосфатиділхолін - трегалоза при температурах вище 46 ° С ліпід приймає ту форму, яку називають λ -фазой. У цій фазі жирні ацильні ланцюга неупорядковані, подібно жидкокристалічній фазі, але ряд їх груп іммобілізувати в результаті зв'язування з трегалозу. Доведено, що при температурах нижче 46 ° С λ фаза повільно переходить в гель. Відомості, присвячені взаємодії між вуглеводами і фосфоліпідами і впливу цукрів на термотропні властивості ліпідів, досить суперечливі. Колишні уявлення про пряме взаємодія між дисахаридами і фосфоліпідами в гідратованому стані базувалися на дослідженні монослоев, що дало підставу думати, що трегалоза та інші цукру створюють збільшення площі на молекулі ліпіда. Далі інші дослідники показали, що трегалоза і сахароза мало впливають як на температуру переходу гель - рідкокристалічна фаза, так і на ентальпію переходу повністю гідратованого діпальмітоїлфосфатиділхоліна, що вказує на відсутність взаємодії сахарів ліпідів. Ці спостереження сприяли створенню уявлення про те, що взаємодія між цукрами і фосфоліпідами відбувається тільки в безводному стані. Крім того, трегалоза може знижувати температуру переходу з гелю в рідкокристалічний стан безводних фосфоліпідів при спільній ліофілізації з органічного розчинника. У той же час, при гідратуванні ліпосом з води в присутності трегалози спостерігається значно більш складне термотропних поведінку. Наприклад, в разі ліпосом з 2-олеїлн-гліцеро-3-фосфохоліна і фосфатидилсерина після дегідратації

існують переходи, як при високій, так і при низькій температурі, що не залежать від співвідношення трегалоза - ліпід в початковому зразку, що вказує на присутність як гелевого, так і рідкокристалічного домену. Виникло припущення, що ці фазові домени відображають внутрішній і зовнішній ділянки подвійного шару і є результатом відмінностей між відносинами трегалоза - ліпід по обидві сторони мембрани. Відповідно до цієї гіпотези зовнішній моношар знаходиться в рідкокристалічному стані, а внутрішній - в стані гелю. На додаток до питань, що стосуються трактування досліджень, котрі безпосередньо займалися взаємодіями цукор - ліпід, гіпотеза, згідно з якою цукру гальмують викликану дегідратацією «витік», запобігаючи фазові переходи ліпіда, несумісна з цілим рядом інших спостережень. Як зазначалося раніше, якби фазові переходи були відповідальні за «витік», це означало б, що склад ліпиду сильно впливає на стабільність подвійного шару. Однак спостерігалось, що відмінності в «витоку» карбоксифлуоресцеїна з фосфатиділхолінових везикул з неоднаковим складом жирних кислот незначні, незважаючи на великі відмінності температур переходу з гелю в рідкокристалічну фазу. У разі везикул, що складаються з яєчного фосфатидилхоліну, відмінності в «витоку» карбоксифлуоресцеїна при вмісті холестерину незначні, навіть при високих концентраціях стерину, при яких можна було б очікувати усунення переходу з гелю в рідкі кристали (хоча включення холестерину може підвищити включення інкапсульованого речовини при деякому складі ліпідів). Далі везикули, що складаються з діпальмітоїлфосфатиділхоліна, при дегідратації при кімнатній температурі повинні перебувати в стані гелю до дегідратації, в зневоднені стані і після регідратації. Незважаючи на відсутність фазового переходу, з цих ліпосом також відбувається значна «витік» інкапсульованої речовини. Нарешті, якщо зневоднені везикули діпальмітоїлфосфатиділхоліна Регідратуюче при температурі вище або нижче температури фазового переходу, спостерігається однакова ступінь змісту карбоксифлуоресцеїна. Ці результати важко узгодити з уявленням про те, що «витік» інкапсульованої речовини є наслідком дестабілізації біслою в результаті фазового переходу ліпіда і про те, що захисна дія деяких цукрів відображає запобігання таких переходів. Ці несумісності були усвідомлені прихильниками гіпотези фазового переходу, які у відповідь припустили, що в присутності трегалози в везикулах, що складаються з яєчного фосфатидилхоліну, діолеїлфосфатиділхоліна або діпальмітоїлфосфатиділхоліна, фазовий перехід при дегідратації і регідратації при кімнатній температурі не відбувається. Стверджують, що везикули, що складаються з ненасичених ліпідів (яєчний фосфатидилхолін, діолеїлфосфатиділхолін), протягом всього часу залишаються в жидкокристалічній фазі, в той час як везикули діпальмітоїлфосфатиділхоліна залишаються в фазі гелю. Однак цей аргумент

здається спірним. У разі везикул, що складаються з ненасичених ліпідів, на початковому етапі заморожування під час ліофілізації температура повністю гідратованих везикул знижується до значень, які набагато нижче їх фазового переходу. Навіть допускаючи той факт, що зразок не заморожений спочатку в рідкому азоті або в смесісухой лід / етанол, первинна сушка буде проводитися при температурі нижче температури колапсу кріопротектори (від мінус 30 ° С до мінус 35 ° С для дисахаридов), що набагато нижче температури фазового переходу ліпіда (від +4 ° С до мінус 21 ° С, в залежності від складу жирних кислот). Тому після заморожування везикули будуть перебувати в стані гелю. Якщо під час дегідратації утворився комплекс цукор - ліпід, існуючий в рідкокристалічній або в λ -фазі, то ясно, що ліпід повинен зробити фазовий перехід. Якщо такий комплекс не утворився, то везикули перейдуть з гелю в рідкокристалічну фазу після регідратації при кімнатній температурі. Аналогічно цьому для везикул діпальмітоїлфосфатиділхоліна, навіть якщо вони підтримуються в стані гелю при заморожуванні, первинної та вторинної сушінні, регідратація при 50 ° С призведе до переходу в рідкокристалічну фазу (температура фазового переходу - 41 ° С для повністю гідратованого ліпіда). Спостерігаються лише невеликі відмінності в «витоку» карбоксифлуоресцеїна в разі везикул з діпальмітоїлфосфатиділхоліна, регідратованих при 30 ° С і при 50 ° С. Дослідниками проведено вивчення стабільності ліпосом, що містять карбоксифлуоресцеїн, в процесі ліофілізації і зберігання. Як стабілізатори використовували ряд цукрів: сахарозу, маніт, лактозу, трегалозу і ін. Найкращі результати отримані при використанні трегалози. На думку авторів, частина захисного ефекту трегалози і інших цукрів може бути обумовлена здатністю діяти як проміжна матриця між везикулами, запобігаючи їх зближення. Останнє може бути пов'язано з тим, що однією з передумов до мембранного злиття є тісне зближення двох бішару. Здається, в кожному випадку необхідно вивчати роль окремих цукрів як стабілізаторів ліпосом. Підтвердженню цьому служить робота, в якій автори для стабілізації ліпосом використовували лактозу. Порівняння даного цукру з трегалозу, мальтозою, глюкозою продемонструвало явну перевагу. Ймовірно, дисахара проявляють велику стабілізуючу активність дегідратованих мембран ліпосом. Крім того, встановлено, що лактоза має бути присутня по обидва боки ліпосом, в зв'язку з чим її додавання в процесі виготовлення препарату проводили на різних стадіях. Необхідно також врахувати доступність лактози і дозвіл її використання в складі ін'єкційних форм в фармакопєях багатьох країн. При ліофілізації багат шарових ліпосом з метою їх стабілізації використовували в якості кріопротектори олігомери глюкози - мальтодекстрини. Показано, що в міру підвищення в складі ліпосом, отриманих з діпальмітоїлфосфатиділхоліна, кількості глюкозидної

залишків температура фазового переходу ліпідів від гелю в рідкокристалічний стан зростає. Вивчення впливу режиму заморожування і ліофілізації проведено в роботі, в якій використовували ліпосоми, що складаються з діпальмітоїлфосфатиділхоліна і діпальмітоїлфосфатидігліцеріна в співвідношенні 10: 1. У ліпосоми включали карбоксифлуоресцеїн. Ліпосоми заморожували повільно зі швидкістю 0, 5 ° С в хвилину до температури мінус 60- 70 ° С або швидким зануренням в рідкий азот. Авторами встановлено, що повільне заморожування призводить до значно більшого змісту карбоксифлуоресцеїна після ліофілізації і регідратації, ніж при швидкому заморожуванні. Вплив швидкості заморожування залежить від ліпідного складу. Так, більш «жорсткі» ліпосоми, що містять холестерин, зберігали свою структуру в більшій мірі при повільному заморожуванні. У той же час режим заморожування не впливав на взаємодію фосфоліпідів з кріопротекторами сахарозою, трегалозу, глюкозою. Основна кількість робіт, присвячених захисту ліпосом від пошкодження при ліофілізації, зосереджувалася на цілісності подвійних шарів під час етапів заморожування і ліофілізації, на вивченні проникності бішару ліпосом, отриманих з діпальмітоїлфосфатиділхоліна і діпальмітоїлфосфатидігліцеріна (молярне співвідношення 10: 1) з доданим зовні карбоксифлуоресцеїном. Результати показали, що ліофілізація і регідратація ліпосом з сахарозою всередині і зовні везикул викликає тимчасове підвищення проникності бішару для карбоксифлуоресцеїна, який врівноважувався приблизно через 20 годин. Кількість карбоксифлуоресцеїна на моль фосфоліпіда, що проникає в везикули, підвищувався зі збільшенням відношення розміру везикул (діапазон 0, 1 до 1, 0 мкм). Зменшення числа подвійних шарів в везикулах підвищувало проникність для карбоксифлуоресцеїна після ліофілізації та регідратації. Присутність холестерину зменшувало ступінь проходження в везикули. Авторами встановлено, що за підвищеної проникності після ліофілізації - дегідратації як в присутності, так і під час відсутності сахарози відповідальні процеси ущільнення бішару. Одночасно показано, що, незважаючи на присутність кріопротектори, «ущільнення» компонентів бислоя відбувається як під час, так і після регідратації.

Ліофілізація складається з декількох етапів, кожен з яких може викликати появу різних змін. Слід розуміти, що оптимальний захист ліпосомального зразка не може бути досягнута за допомогою тільки одного засобу. Початкове заморожування зразка може привести до значної витоку або деформації бислоя за відсутності кріопротектори. Під час процесу дегідратації важливо також забезпечити дотримання звичайних вимог до ліофілізації. Розчинена речовина, як було показано вище, вибране як кріопротектори, в ідеалі повинно бути не евтектичним. Цим вимогам

відповідають багато цукру. Первинна сушка повинна проводитися при температурі нижче температури колапсу матриці. Температура колапсу дисахаров вище, ніж моносахаров. Крім того, слід розуміти, що при подальшій дегідратації бішару ліпосом до повного відновлення бар'єру проникності може знадобитися повторний процес заморожування і ліофілізації. Для готового лікарського препарату необхідно визначити оптимальний режим зберігання, що в свою чергу безпосередньо залежить від фізико-хімічних властивостей вхідних в нього компонентів: ліпідів і лікарського засобу. За даними літератури, температура зберігання ліпосомальних препаратів знаходиться в діапазоні від $(5 \pm 3) ^\circ \text{C}$ (для ліпосомальної вакцини проти грипу (тип А)) до мінус $10 ^\circ \text{C}$ (для препарату «Ліпін», використовуваного як антигіпоксичну засіб).

Ресуспендірованя ліпосом

Самостійним питанням застосування і контролю ліпосомальних лікарських препаратів є температура розчинника використовуваного для ресуспендування ліофілізованого продукту і співвідношення між масою препарату і обсягом розчинника. Нами виявлено, що температура розчинника в певній мірі визначає розмір ліпосом і кількість включеного в ліпосоми лікарського засобу. Так, наприклад, при використанні розчинника з температурою від $37 ^\circ \text{C}$ до $50 ^\circ \text{C}$ для ресуспендування ліпосом навантажених гідрофобної активної фармацевтичної субстанцією (препарат «Ліпотакс») розмір ліпосом на 7-12% менше, ніж при використанні розчинника кімнатної температури. При використанні препаратів з гідрофільної субстанцією і / або «вільних» ліпосом їх розмір також був дещо менше. На нашу думку, підбір умов ресуспендування залежить від ліпідного складу препарату, хімічної структури кріопротектори і активної фармацевтичної субстанції, вихідного розміру ліпосом, змісту і співвідношення компонентів. Дослідження по визначенню умов ресуспендування необхідно проводити для кожного конкретного препарату. Питання використовуваного розчинника (склад, рН, іонна сила) вимагає окремого вивчення, що пов'язано з впливом розчинника на розмір ліпосом і зниженням включення лікарської субстанції в ліпосоми. Крім того, необхідно звернути увагу на співвідношення ліпосомального препарату і водного розчинника використовуваних як для визначення розміру ліпідів, так і для інфузійного введення препаратів. В інструкціях по застосуванню необхідно вказувати температуру ресуспендування і температуру розчину готового препарату при ін'єкційному або інфузійному введенні.

II. Контроль опорних знань

Виконати тестові завдання:

1. Прямий перенесення чужорідної ДНК в протопласти можливий за допомогою:
 - а) мікроін'єкції;
 - б) трансформації;
 - в) упаковківліпосоми;
 - г) культивування протопластів на відповідних поживних середовищах.
2. Субстратами рестриктаз, які використовуються генним інженером, є:
 - а) гомополісахаріди;
 - б) гетерополісахаріди;
 - в) нуклеїновікислоти;
 - г) білки.
2. Генмаркер »необхідний в генетичній інженерії:
 - а) для включення вектора в клітини господаря;
 - б) для відбору колоній, утворених клітинами, в які проник вектор;
 - в) для включення «робочого гена» в вектор;
 - г) для підвищення стабільності вектора.
3. Поняття «липкі кінці» стосовно генетичної інженерії відображає:
 - а) комплементарність нуклеотидних після послідовно;
 - б) взаємодія нуклеїнових кислот і гістонів;
 - в) реагування один з одним 8Н-груп з утворенням дисульфідних зв'язків;
 - г) гідрофобна взаємодія ліпідів.
4. Пошук нових рестриктаз для використання в генетичній інженерії пояснюється:
 - а) відмінностями в каталітичній активності;
 - б) різним місцем впливу на субстрат;
 - в) видоспецифічністю;
 - г) високою вартістю.
5. Успіх і генетичної інженерії в області створення рекомбінантних білків більше, ніж у створенні рекомбінантних антибіотиків, що пояснюється:
 - а) більш простою структурою білків;
 - б) складністю підбору клітин господарів для біосинтезу антибіотиків;
 - в) великою кількістю структурних генів, включених в біосинтез антибіотиків;
 - г) проблемами безпеки виробничого процесу.
6. Фермент лігаза використовується в генетичній інженерії оскільки:
 - а) скріплює вектор з оболонкою клітини господаря;
 - б) каталізує включення вектора в хромосом у клітин господаря;
 - в) каталізує ковалентне зв'язування вуглеводно-фосфорноїцепі ДНК гена з ДНКвектора;
 - г) каталізує замикання пептидних містків в пептиди-гліканеклеточной стінки.

7. Біотехнологія «ген-маркер» необхідний:

- а) для підвищення активності рекомбінантного;
- б) для утворення компетентних клітин господаря;
- в) для модифікації місця взаємодії рестриктаз з субстратом;
- г) для відбору рекомбінантов.

8. Послаблення обмежень на використання в промисловості мікроорганізмів-рекомбінантний, які продукують гормони людини, стало можливим завдяки:

- а) вдосконалення методів ізоляції генно-інженерних рекомбінантов від навколишнього середовища;
- б) підвищення кваліфікації персоналу, що працює з рекомбінантов;
- в) встановленої експериментально слабкою життєздатності рекомбінантов;
- г) експериментальному підтвердженню обов'язкової втрати чужорідних генів.

9. Вектор на основі плазміди краще вектора на основі фагової ДНК завдяки:

- а) великим розміром;
- б) меншу токсичність;
- в) більшою частоти включення;
- г) відсутності лізису клітини господаря.

10. Активація нерозчинного носія в разі іммобілізації ферменту необхідно:

- а) для посилення включення ферменту в гель;
- б) для підвищення сорбції ферменту;
- в) для підвищення активності ферменту;
- г) для утворення ковалентного зв'язку.

III. Обговорення теоретичних питань:

1. Прівестісхему отримання ліпосомального препарату з гідрофобною активної фармацевтичної субстанцією.

2. Опишіть основні стадії процесу ліофілізації ліпосом.

3. Які методи використовують для визначення ступеня включення речовини в ліпосоми?

4. Як впливає температура розчину на проведення регідратації ліпосом?

5. Наведіть основні критичні стадії виробництва лікарських ліпосомальних препаратів.

6. Запропонуйте апаратурну схему отримання ліпосомального лікарського препарату.

Теми доповідей/ рефератів

1. Сучасні відкриття у напрямку технології виготовлення нанопрепаратів

IV. Підведення підсумків

Список рекомендованої літератури

1. S. Spada. G. Walsh Directory of Approved Biopharmaceutical Products 1st Edition . – CRC Press, 2019. – 336 p.
2. C. Kokare PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 1st Edition. – Nirali Prakashan, 2017. – 274.
3. Лихач А. В. Промислова біотехнологія / А. В. Лихач. – МНАУ. – 2016. – 116 с.
4. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
5. Державна фармакопея України : в 3 т. / ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. –2-е вид. –Харків : Державне підприємство “ Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів ”, 2015. –Т.1. –