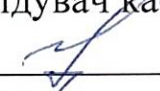


**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 (Борисюк І.Ю.)

“ 27 ” серпня 2021 р

**МЕТОДИЧНА РОЗРОБКА ПРАКТИЧНОГО ЗАНЯТТЯ**

Факультет: фармацевтичний

Навчальна дисципліна «Фармацевтична біотехнологія»

Семінарське заняття №13 Тема: **«Ліпосомальні форми лікарських препаратів.»**

**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: Ліпосомальні форми лікарських препаратів.**

**Мета:** Ознайомитися з ліпосомальними формами лікарських препаратів.

**Основні поняття:** Ліпосома

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

**Навчальний час: 4,0**

## План

### I. Організаційний момент

#### Зміст теми

Ліпосомальні препарати мають ряд переваг:

- пролонгують дію введеного в організм лікарського препарату;
- змінюють фармакокінетику лікарських препаратів, істотно підвищуючи їх фармакологічну ефективність;
- захищають лікарські речовини від деградації;
- захищають здорові клітини і патологічні органи від токсичної дії лікарських препаратів;
- здатні збільшувати біодоступність лікарських субстанцій. Необхідно також відзначити високу ефективність ліпосом при використанні їх в якості ад'ювантів складі вакцин. В даний час світової фармацевтичною промисловістю розроблені, виробляються і виведені на ринок уже понад 30 ліпосомальних препаратів спрямованої дії.

В ході робіт зі створення лікарських ліпосомальних препаратів авторами даної роботи і їх колегами накопичено певний досвід по розробці і промислового виробництва ліпосомальних препаратів. На нашу думку дані препарати можуть бути конкурентно здатні на світовому фармацевтичному ринку. Оригінальність складу і технології, висока фармакологічна ефективність і низька токсичність дають підставу припустити, що створення умов виробництва, що відповідає вимогам GMP, дасть можливість вивести зазначену групу ліпосомальних препаратів на світовий фармацевтичний ринок. Перспективність цих препаратів цілком очевидна, є реальні економічні обґрунтування для їх впровадження, наприклад, для протипухлинного препарату «Ліподокса». Відповідність стандартам GMP є необхідною умовою для «пропуску» продукції вітчизняної промисловості на світові фармацевтичні ринки. У даній роботі розглянуті основні аспекти технології при отриманні ліпосомальних лікарських форм в умовах виробництва, що відповідають вимогам GMP і вимагають проведення валідації при розробці кожної стадії технологічного процесу. Протягом останніх 30 летнаміпроводяться різнопланові дослідження зі створення різних препаратів на основі фосфої гліколипидов. Дослідження ведуться за трьома напрямками:

- створення сировинної бази, що дозволяє отримувати фосфоліпиди і гліколіпиди високого ступеня очищення;

- вивчення залежності біологічної активності ліпідів від їх структури і складу, і на основі отриманих даних створення лікарських і діагностичних препаратів;

- вирішення технологічних задач по створенню ліпосомальних форм препаратів. У цьому розділі ми зупинимося на розгляді технологічних аспектів отримання ліпосомальних препаратів. Дані про ефективність і безпеку ліпосомальних препаратів, отримані на лабораторному рівні, часто не піддаються відтворенню в масштабі промислового виробництва. Це в значній мірі пояснюється тим, що фізико-хімічні властивості ліпосом, отриманих в малому масштабі, не відображаються в умовах промислового отримання. Хоча розміри і електричний заряд ліпосом вимірюються і досить чітко вказуються в методах в більшості розробок по отриманню ліпосом, однорідність ліпідних компонентів, експозиція біохімічно важливих функціональних груп на зовнішній поверхні ліпосом, фіксована товщина водного шару, число ліпідних бішару і т. Д. Залежить від масштабу виробництва. Крім того, властивості ліпосом багато в чому визначаються присутністю в них холестерину, жирнокислотним складом ліпідів, наявністю тих чи інших доменів ліпідів в структурі мембрани. Стабільність ліпосом в значній мірі залежить від режиму заморожування і ліофілізації, жирнокислотного складу ліпідів, які повинні бути мінімально окислені по подвійних зв'язках, розміру і заряду ліпосом.

Схема отримання ліпосомального препарату зводиться до наступних основних стадій:

- отримання ліпідної плівки; емульгування ліпідів у відповідному буферному розчині або органічному розчиннику;

- безпосереднє отримання ліпосом по одному з відомих методів;

- відділення, при необхідності, не включеного в ліпосоми лікарської речовини;

- освітлююча і стерилізуюча фільтрації;

- розлив препарату в ємності;

- заморожування, ліофілізація, герметизація препарату в атмосфері інертного газу;

- контроль і зберігання препарату при певних умовах. На нашу думку, обов'язковими методами контролю отриманих ліпосомальних форм лікарських засобів має бути визначення наступних параметрів: величини частинок ліпосом, стерильності, нешкідливості, пирогенності, змісту включеного в ліпосоми речовини, кількісне визначення ліпідних компонентів і основного лікарського речовини, рН, наявність стабілізаторів та ін. Необхідним є визначення в процесі виготовлення і в готовому препараті продуктів перекисного окислення, наприклад, індексу окислення. Препарати необхідно контролювати за вказаними параметрами як в процесі виготовлення, так і в процесі зберігання. На підставі узагальнення результатів багаторічних досліджень запропонована і реалізована в виробничих умовах

технологія отримання ліпосомальних препаратів. Відповідно до даної схеми технологія виробництва ліпосом включає критичні стадії, які будуть розглянуті в цьому розділі:

- 1-отримання субстанції ліпідів;
- 2-отримання ліпідної плівки;
- 3-процес отримання ліпосом гомогенизацією ліпідної емульсії і включення лікарського засобу;
- 4 -відділення не віднесеного лікарського засобу;
- 5 -освітлююча і стерилізуюча фільтрація;
- 6 -розлив препарату;
- 7 -ліофілізація препарату;
- 8 -контроль готового препарату;
- 9-вивчення стабільності і режиму зберігання.

### **Основні критичні стадії процесу виробництва ліпосомальних препаратів**

1. Субстанція ліпідів:
  - вміст основної речовини;
  - ступінь окислення;
  - МБЧ;
  - температура фазового переходу;
  - важкі метали;
  - ендотоксини;
  - зміст лізоформ;
  - залишкові розчинники.
2. Отримання ліпосом:
  - температура;
  - тиск;
  - колво циклів;
  - ступінь включення АФС;
  - розмір і заряд ЛЗ;
  - рН;
  - стабільність субстанцій (ФО + АФС);
  - стабільність ліпосом;
  - зміст кріопротектори
3. Стерилізуюча фільтрація:
  - підбір матеріалу;
  - швидкість і тиск;
  - температура;
  - обсяг і концентрація.
4. Ліофілізація:
  - параметри заморожування;

- параметри сублімації;
- тип і колво кріопротектори;
- вибір первинної упаковки;
- вміст залишкової вологості;
- умови герметизації і зберігання;
- стабільність;
- умови регідратації

У цьому розділі не обговорюються сировинні джерела ліпідних речовин, що використовуються для отримання ліпосом, а також переваги і недоліки природних і синтетичних ліпідів, так як це є прерогативою кожної дослідницької групи, самостійно проводить експериментальний підбір оптимального складу ліпідної композиції для формування ліпосом конкретного цільового призначення, і тому рекомендації тут, очевидно, є недоцільними. Крім того, раніше нами були детально проаналізовані принципи отримання різних ліпідних субстанцій для біомедичних цілей. Як приклад ми наводимо протоколи отримання ліпосомальних форм препаратів. Протокол 1.

Отримання «вільних» ліпосом

Метод:

1. Готують 10 мл розчину фосфатидилхоліну яєчного жовтка (2000 мг) в безводному етанолі (концентрація -20%). Фосфатидилхоліну не менше 93% (домішки тільки фосфоліпідної природи), індекс окислення не більше 0, 2. Концентрацію ліпідів визначають за вмістом фосфору. Індекс окислення визначають УФ-спектроскопією.

2. Отримують липідну плівку в роторному випарнику при температурі 40-45 ° С протягом 90 хвилин. Плівку обробляють азотом або аргоном.

3. ліпідного плівку суспендують в 80 мл відповідного буферного розчину (рН -6, 5-6, 8) до утворення гомогенної емульсії. Процедуру проводять при температурі 40-45 ° С на Vortex протягом 30-45 хвилин в присутності інертного газу або азоту.

4. Емульсію обробляють при високому тиску 400-600 МПа в екструдері при температурі 40-45 ° С під контролем розміру часток. При досягненні розміру 100 ± 20 нм процес гомогенізації припиняють. В процесі екструзії в емульсію додають кріопротектор, наприклад, лактозу в співвідношенні: фосфатидилхолін: лактоза 1: (1-2). Роботу проводять в атмосфері інертного газу, наприклад, аргону.

5. Проводять фільтрацію емульсії через фільтри з розміром 0, 45 і 0, 22 нм.

6. Проводять розлив у флакони.

7. Заморожують флакони з емульсією при мінус 60-70 ° С і ліофілізують протягом 72 годин. Залишкової води не більше 5%.

8. Флакони герметизують в атмосфері інертного газу.

9. Контроль зразків ліпосом.

Протокол 2.

Отримання ліпосом, що містять біофлавоноїди

Метод:

1. Готують 10 мл розчину кверцетину (100 мг) в безводному етанолі (концентрація 1, 0%).

2. Готують 10 мл розчину фосфатидилхоліну яєчного жовтка (4000 мг) в безводному етанолі (концентрація -40%). Фосфатидилхоліну не менше 93% (домішки тільки фосфоліпідної природи), індекс окислення не більше 0,15. Концентрацію ліпідів визначають за вмістом фосфору. Індекс окислення і зміст біофлавоноїдів визначають УФспектроскопією.

3. Змішують розчин фосфатидилхоліну і розчин кверцетину, перемішують при температурі 40-45 ° С протягом 10-15 хвилин.

4. Отримують ліпидну плівку в роторному випарнику при температурі 40-45 ° С протягом 90 хвилин. Плівку обробляють азотом або аргоном.

5. ліпідного плівку суспендують в 100 мл відповідного буферного розчину (рН -6, 5-7, 3) до утворення гомогенної емульсії. Процедуру проводять при температурі 40-45 ° С на Vortex протягом 60 хвилин в присутності інертного газу або азоту.

6. Емульсію обробляють при високому тиску 400-600 МПа в екструдері при температурі 40-45 ° С під контролем розміру часток. При досягненні розміру 120 ± 20 нм процес припиняють. В процесі екструзії в емульсію додають кріопротектор, наприклад, лактозу в співвідношенні: фосфатидилхолін: лактоза 1: (2-4). Роботу проводять в атмосфері інертного газу, наприклад, аргону.

7. Проводять фільтрацію емульсії через фільтри з розміром 0, 45 і 0, 22 нм.

8. Проводять розлив у флакони.

9. Заморожують флакони з емульсією при мінус 60-70 ° С і ліофілізують протягом 72 годин. Залишкової води не більше 5%.

10. Флакони герметизують в атмосфері інертного газу. 11. Контроль зразків ліпосом.

Протокол 3. Отримання ліпосом, що містять антрацикліновий антибіотик метод:

1. Готують 10 мл розчину фосфатидилхоліну яєчного жовтка (1000 мг) в безводному етанолі (концентрація -10%). Фосфатидилхоліну не менше 93% (домішки тільки фосфоліпідної природи), індекс окислення не більше 0,15. Концентрацію ліпідів визначають за вмістом фосфору. Індекс окислення визначають УФ-спектроскопією.

2. Готують розчин антрациклінового антибіотика (доксорубіцину, епірубіцину, ідарубіцину, мітоксантрон) у відповідному буферному розчині

(з урахуванням кінцевої концентрації в зразках 1-2 мг / мл при рН 6, 5-7, 5). Зміст антрациклінових антибіотиків визначають методом ВЕРХ.

3. Отримують липидну плівку в роторному випарнику при температурі 40-45 ° С протягом 90 хвилин. Плівку обробляють азотом або аргоном.

4. ліпідного плівку суспендують в 100 мл відповідного буферного розчину (рН -6, 5-7, 5) до утворення гомогенної емульсії. Процедуру проводять при температурі 40-45 ° С на Vortex протягом 30-45 хвилин в присутності інертного газу або азоту.

5. Емульсію обробляють при високому тиску 400 МПа в екструдері при температурі 40-45 ° С під контролем розміру часток. При досягненні розміру 90 ± 20 нм процес припиняють. Роботу проводять в атмосфері інертного газу, наприклад, аргону.

6. Створюють умови для хімічного градієнта за рахунок технології градієнта рН або технології градієнта концентрації сульфату амонію з завантаженням активної фармацевтичної субстанції - антрациклінового антибіотика. При необхідності проводять видалення не включеної субстанції. У емульсію додають криопротектор, наприклад, лактозу в співвідношенні: фосфатидилхолін: лактоза 1: (1-3).

7. Проводять фільтрацію емульсії через фільтри з розміром 0, 45 і 0, 22 нм.

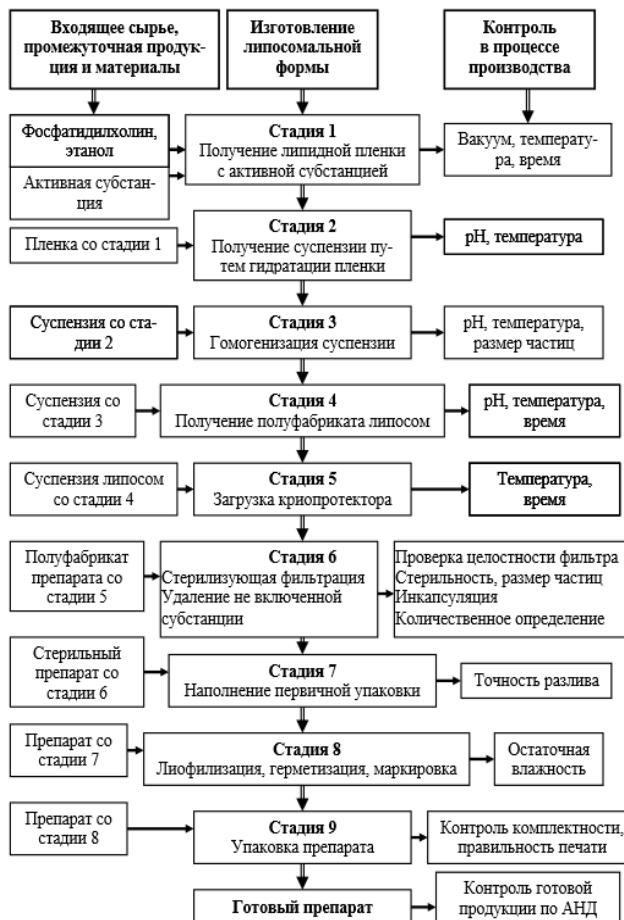
8. Проводять розлив у флакони.

9. Заморожують флакони з емульсією при мінус 60-70 ° С і ліофілізують протягом 72 годин.

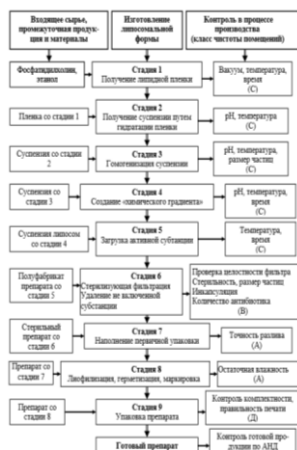
10. Флакони герметизують в атмосфері інертного газу.

11. Контроль зразків ліпосом. На рис. 4 і рис. 5пріведені схеми технології отримання ліпосомальних препаратів з використанням гідрофобної та гідрофільної субстанцій.

Технологічна схема виробництва ліпосомальної форми біофлавоноїду кверцетин



### Технологічна схема виробництва ліпосомальної форми антрациклінових антибіотиків



### ліпідні субстанції

На першому етапі необхідно провести вивчення використовуваних ліпідних субстанцій і органічних розчинників, які застосовуються в технології отримання ліпосомальних препаратів. Розчинники (етанол, хлороформ, діетиловий ефір і ін.), Які використовуються в ході виробничого процесу повинні контролюватися на наявність домішок, в тому числі, і токсичних. Дані, отримані нами, показують, що вміст залишкових розчинників, використовуваних при виробництві ліпідних субстанцій і ліпосомальних



препаратів відповідають загальноприйнятим нормам, а в готовому препараті після ліофілізації або не визначаються, або їх кількість мінімально, що відповідає вимогам міжнародних фармакопеї. Зміст ендотоксинів і важких металів в ліпідних субстанціях, їх контамінація мікроорганізмами повинні контролюватися відповідно до вимог, що пред'являються до субстанцій для ін'єкційних препаратів. Для зниження контамінації ліпідних субстанцій можлива стерилізуюча фільтрація ліпідів в розчині органічного розчинника, наприклад, фосфатидилхоліну в етанолі. Крім того, одним з методів зниження контамінації ліпідних субстанцій може бути їх обробка органічними розчинниками, наприклад, хлороформом. Особливу увагу необхідно приділяти процесам розкладання субстанцій під впливом світла, нагрівання, величини рН, кисню повітря і ряду інших факторів, що впливають на структуру ліпідів. Також важливо привести короткий опис продуктів, які розглядаються як потенційні домішки, що виникають в результаті виділення і очищення ліпідів з природних джерел або отриманих синтетичним шляхом. На рис. 6 представлена схема промислового способу виділення природного фосфатидилхоліна як приклад отримання ліпідної субстанції.

Схема промислового способу виділення природного фосфатидилхоліну



### Отримання ліпідної плівки

Другим етапом технології, відповідно до запропонованої схеми, є отримання ліпідної плівки, яке проводять при постійному перемішуванні розчину ліпіда в органічному розчиннику при температурі 37 - 42 ° С. Отримання ліпідної плівки здійснюють при упарюванні розчину в вакуумі.

При використанні гідрофобного препарату його розчиняють у відповідному органічному розчиннику і змішують з розчином ліпіда. На цій стадії критичні фактори - температура і величина вакууму, що забезпечує швидку концентрацію ліпідів. На наступному етапі отриману ліпидную плівку або плівку ліпіда з лікарської субстанцією емульгують в буферному розчині з метою отримання мультіламеллярних везикул. Необхідно відзначити, що температура в процесі ресуспендування повинна бути вище температури фазового переходу ліпідів. При отриманні везикул необхідно враховувати, крім температури, ряд чинників: величину рН і іонну силу буфера, концентрацію ліпідів і співвідношення ліпід: лікарський засіб, фізико-хімічні властивості використовуваних компонентів. Розмір утворюються везикул визначається так само інтенсивністю і часом перемішування. Крім цього, необхідно в кожному конкретному випадку враховувати заряд ліпідів. Для запобігання процесів окислення ліпідів - ліпосом отриману емульсію насичують азотом або інертним газом. Наступним етапом є отримання ліпосом. В даний час відомий ряд способів отримання ліпосомальних препаратів:

- озвучування;
- методи, засновані на спонтанній везикуляції і на видаленні детергентів;
- інжекція;
- екструзія.

отримання ліпосом

Озвучування - процес отримання ліпосом за допомогою ультразвуку. Недоліком цього методу є вкрай низька продуктивність, окислення і гідроліз ліпідів, тривалість технологічного процесу, підвищення температури реакційної суміші, а також те, що отримані ліпосоми недостатньо стійкі в процес зберігання і вимагають додаткових заходів по стабілізації. Крім того, виявлено низька стандартність отриманих препаратів, що виявляється в неоднорідності складу. Використання озвучування неефективно в ряді випадків, т. К. Деякі лікарські речовини не витримують режимів обробки ультразвуком. Обробка ультразвуком призводить до розвитку процесів перекисного окислення фосфоліпідних компонентів ліпосом. Так, наприклад, за нашими даними, ультразвукова обробка фосфоліпідних сумішей різного складу при 22 кГц протягом 10 - 45 хвилин при температурі  $25 \pm 5$  ° С супроводжується збільшенням індексу окислення в 2 - 3 рази. Поруч авторів запропоновано комбіноване використання методів для отримання ліпосом. Так, наприклад, при отриманні ліпосом, що містять цитостатик цісдіаміндіхлорплатин, спочатку проводили ультразвукову обробку при 22 кГц протягом 3 - 5 хвилин, а потім заморожування в рідкому азоті, з подальшим відстоюванням при кімнатній температурі. Процес повторювали 6 разів. За даними авторів, в ліпосоми включалося 50 - 60% від вихідної концентрації платини. За даними більшості авторів, використання ультразвукової обробки

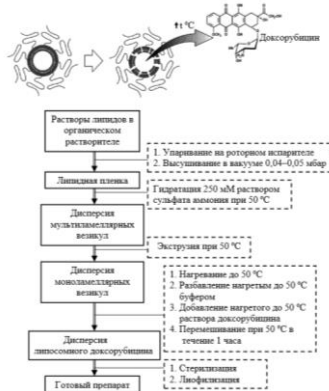
дозволяє отримувати ліпосоми з низькою ефективністю включення речовин у внутрішній простір. Метод спонтанної везикуляції - заснований на спонтанному освіту ліпосом при швидкому подщелачиванні водних дисперсій, що містять фосфоліпіди. До недоліків даного метода можна віднести обмеженість у використанні фосфоліпидного складу (фосфатидилхолін, фосфатидними кислота), високу швидкість процесу, що ускладнює використання цього методу в промислових умовах при отриманні великих обсягів ліпосомальних препаратів. Крім того, високі значення рН (більше 9, 0), а так само визначають значення температурного режиму, робить даний метод не прийнятним для ряду лікарських і біологічно активних речовин. 43 Інжекція - отримання ліпосом шляхом уприскування в водне середовище розчину фосфоліпідів в летучому органічному розчиннику. До недоліків цього метода необхідно віднести низьку ефективність включення в ліпосоми лікарських речовин, необхідність видалення розчинника з препарату, нестандартність складу ліпосом. Крім того, ліпосоми, отримані інжекцією або методом видалення детергенту, відрізняються низькою стабільністю. До переваг метода можна віднести можливість впливу на розмір ліпосом за рахунок температури водного середовища, розчинника, швидкості перемішування і концентрації фосфоліпідів. Екструзія - цей процес здійснюється в гомогенізаторах високого тиску, в результаті відбувається руйнування великих мицелл при пропусканні ліпідної емульсії під високим тиском через спеціальний клапан при температурі вище фазового переходу ліпідів, що використовуються в складі ліпосом. Перевагою цього методу є стандартність складу ліпосом, висока продуктивність методу, мінімальне окиснення і гідроліз фосфоліпідів, збереження лікарського препарату, стабільність ліпосом. Суттєве значення має наявність стандартного промислового устаткування для робіт під високим тиском і отримання препарату в асептичних умовах в закритому режимі, при цьому в ході процесу можливий контроль значень температури і тиску. Даний режим дозволяє отримати ліпосоми стандартного складу, основна маса яких представлена частками розміром 80 - 160 нм (80 - 90% всіх ліпосом) до ліофілізації і 120 - 180 нм після ліофілізації. З метою стабілізації весь процес екструзії проводять в атмосфері інертного газу, наприклад, аргону. При цьому будь-який газ повинен проходити через стерилізує фільтр з розміром пор не більше 0, 2 мкм. Емульсія повинна піддаватися багаторазової циркуляції через гомогенізатор з тим, щоб при кожному проході отримувати все велика кількість малорозмірних ліпосом, безперервно охолоджуватися для відводу тепла, що виділяється насосом при стисненні. Таким чином, критичними параметрами є температура, тиск в гомогенізаторе, кількість проведених циклів. З огляду на, що при роботі гомогенізатора утворюються аерозолі, а субстанції ряду лікарських препаратів, наприклад, цитостатиків (доксорубіцину гідрохлорид, цисплатин, доцетаксел та ін.) Відносяться до речовин підвищеного класу

небезпеки, роботу необхідно проводити в ізоляторі. Приміщення гомогенізатора в ізолятор також забезпечує мінімальний ризик контамінації. Необхідно проводити обов'язкову санітарну обробку гомогенізатора при переході від одного препарату до іншого. Воду, що використовується для отримання ліпідної емульсії, слід регулярно контролювати на хімічну і біологічну контамінацію, а також на контамінацію ендотоксинами, оскільки включення ендотоксинів в ліпосоми має незворотний характер і в такому випадку очищення готового препарату від пірогенів практично не досяжна. Отриманню розчинів лікарських засобів і кріопротекторів, наприклад, лактози необхідно приділяти особливу увагу. Незважаючи на те, що прийнятний рівень контамінації при контролі мікробіологічної чистоти становить не більше ніж 10 КУО / 100 мл розчину, при роботі слід використовувати розчини, піддані стерилізуючій фільтрації, що гарантує мінімальну контамінацію в процесі виготовлення готового препарату. Крім того, актуальним є питання депірогенізації компонентів з використанням різних видів фільтрації через спеціальні фільтри. Використання гомогенізатори високого тиску дозволяє отримати ліпосоми з заданими характеристиками. Перевагою останнього способу є можливість більш загрузок (до 150 літрів препарату на добу), отримання препарату в асептичних умовах в закритому режимі, стандартність і реальна можливість постійного контролю за температурою і тиском. Так, за даними ряду авторів, при отриманні «порожніх» ліпосом, оптимальною є температура 30 - 35 ° С і тиск 5, 8 • 10<sup>7</sup> - 6, 2 • 10<sup>7</sup> Па. Даний режим дозволяє отримувати ліпосоми стандартного складу - основна маса ліпосом представлена частками розміром 100 - 140 нм (до 90% всіх ліпосом). Індекс окисленості ліпосом, отриманих таким способом, не перевищував 0, 4. Вихідний показник індексу окислення яєчного фосфатидилхоліну не більше 0, 25. У той же час, індекс окислення при отриманні ліпосом зазначеного складу і розміру з фосфатидилхоліну при використанні ультразвуку становив 0, 7 - 0, 9. Використання ліпосом зазначеного розміру в якості лікарського засобу для внутрішньовенного введення можливо в зв'язку з їх розміром, низьким ступенем окислення і відсутністю продуктів гідролізу. Гомогенізацією при високому тиску отримані ліпосомальні форми цитостатиків і препарати ліпосом, що володіють гепатозащитним дією. При отриманні ліпосом з антибіотиками антрациклінового ряду (доксорубіцин, ідарубіцин, епірубіцин) показано, що розмір ліпосом до ліофілізації становив 120 ± 30 нм, а після ліофілізації 140 ± 40 нм. Так само показано, що включення в ліпосоми холестерину призводить до збільшення розміру часток, отриманих після ліофілізації, до 300 ± 50 нм і зниження кількості цитостатика, пов'язаного з ліпосомами. Введення до складу ліпосом кислих фосфоліпідів, наприклад, діфосфатиділгліцеріна, призводило до підвищення включення антрациклінов на 8 - 12%. Індекс окисленості «навантажених» ліпосом не перевищував 0, 37 - 0, 42. Показано,

що невеликі, близько 100 - 120 нм, ПЕГ-ліпосоми можуть проходити через пори в ендотелії кровоносних судин до пухлини і впроваджуватися в міжклітинний простір. При цьому інкапсульований в ліпосоми доксорубіцин звільняється з ліпосом в тканини пухлини. Інтерес представляють роботи по включенню в ліпосоми доксорубіцину гідрохлориду. Автори цих робіт здійснювали підкислення внутрішнього обсягу ліпосом, внаслідок чого проникли в нього нейтральні молекули субстанції приєднують протон, набувають позитивний заряд і вже не можуть вийти в зовнішнє середовище. Чем нижче рН всередині ліпосом, тим більше речовини перерозподіляється з зовнішнього обсягу у внутрішній. Однак через деякий час величина рН всередині і зовні ліпосоми вирівнюється, так як протони досить добре проникають через мембрану і, отже, концентрація речовини всередині і поза ліпосом також вирівнюється. Автори запропонували заповнювати ліпосоми не кислий буфером, а розчином амонію сульфату. При гідролізі цієї солі утворюється аміак, який будучи молекулою незарядженою легко проникає через мембрану і виходить у зовнішній розчин. Ліпосоми одержують шляхом диспергування ліпідної плівки в цитратному або фосфатному буферному розчині з величиною рН 3, 5 - 5, 5. Механізм інкапсуляції, наприклад, антрациклінових антибіотиків в ліпосоми можна представити таким чином: при попаданні соляно-кислой форми антрациклінового антибіотика у зовнішній буферний розчин, що містить фосфатний буферний розчин з величиною рН 6, 5 - 7, 5 створюється рівновага, в результаті чого частина антибіотика переходить в молекулярну форму і адсорбується на поверхні ліпосоми, проходячи при цьому через ліпідний бішар мембрани у внутрішній простір. Усередині ліпосоми молекула протонується за допомогою протона, отриманого в результаті дисоціації цитрату натрію або по реакції обміну з іоном амонію; при цьому молекула антибіотика втрачає здатність проходити через ліпідний бішар і в результаті цього відбувається процес накопичення антибіотика всередині ліпосоми. В іншому випадку, іон амонію, відщеплюючи протон, перетворюється в газоподібний аміак в молекулярній формі, який проходить через мембрану ліпосоми в середу, навколишнє ліпосом. Включення антибіотика, наприклад, доксорубіцину гідрохлориду в ліпосом становить 75 - 85% від початкової кількості субстанції. Так, за даними ряду авторів, при отриманні «порожніх» ліпосом, оптимальною є температура 30 - 35 ° С і Тиск  $5,8 \cdot 10^7 - 6,2 \cdot 10^7$  Па. Даній режим дозволяє отримувати ліпосоми стандартного складу - основний маса ліпосом представлена Частка розміром 100 - 140 нм (до 90% всіх ліпосом). Індекс окисленості ліпосом, отриманий таким способом, не перевищував 0, 4. Вихідний Показник індексу окислення яєчного фосфатіділхоліну НЕ более 0, 25. У тій же година, індекс окислення при отриманні ліпосом зазначеним складу и розміру з фосфатіділхоліну при використанні ультразвуку стає 0, 7 - 0, 9. Використання ліпосом зазначеним розміру в якості лікарського засоби для внутрішньовенного Введення

можливо в зв'язку з їх розміром, низька щабель окислення и відсутністю продуктів гідролізу. Гомогенізацією при високого тиску отримані ліпосомальні форми цитостатиків и препарати ліпосом, що володіють гепатозащитним дією. При отриманні ліпосом з антибіотиками антраціклінового ряду (доксорубіцин, ідарубіцин, епірубіцин) показано, що розмір ліпосом до ліофілізації стає  $120 \pm 30$  нм, а после ліофілізації  $140 \pm 40$  нм. Так само показано, що включення в ліпосомі холестерину виробляти до збільшення розміру часток, отриманий после ліофілізації, до  $300 \pm 50$  нм и зниження кількості цитостатика, пов'язаного з ліпосомами. Введення до складу ліпосом кислих фосфоліпідів, наприклад, діфосфатіділгліцеріна, виготовляють до підвищення включення антрациклінов на 8 - 12%. Індекс окисленості «НАВАНТАЖЕННЯ» ліпосом НЕ перевищував 0,37 - 0,42. Показано, що невеликі, около 100 - 120 нм, ПЕГліпосомі можуть проходити через пори в ендотелії кровносна судина до пухлини и впроваджуватися в міжклітинний простір. При цьому інкапсульований в ліпосомі доксорубіцин звільняється з ліпосом в тканини пухлини. Інтерес представляються роботи по включенню в ліпосомі доксорубіцину гідрохлориду. Автори цих робіт здійснювали підкислення внутрішнього ОБСЯГИ ліпосом, внаслідок чого проникли в него нейтральні молекули субстанції приєднують протон, набувають позитивний заряд и вже НЕ можуть вийти в зовнішнє середовище. Чемніше рН всередині ліпосом, тим більше речовини перерозподіляється з зовнішнього ОБСЯГИ у внутрішньої. Однак через декілько годин величина рН всередині и зовні ліпосоми вирівнюється, так як протони досить добре проникають через мембрану I, отже, концентрація речовини всередині и поза ліпосом також вирівнюється. Автори предложили заповнювати ліпосомі не кислий буфером, а розчин амонію сульфату. При гідролізі цієї СОЛІ утворюється аміак, який будучи молекул незарядженою легко проникає через мембрану и виходом у зовнішній розчин. Ліпосомі одержують шляхом диспергування ліпідної плівки в цитратному або фосфатного буферного розчині з величиною рН 3,5 - 5,5. Механізм інкапсуляції, наприклад, антраціклінових антибіотикаів в ліпосомі можна представити таким чином: при попаданні солянокислой форми антраціклінового антибіотикаа у зовнішній буферний розчин, що містить фосфатних буферних розчин з величиною рН 6,5 - 7,5 створюється рівновага, в результаті чого частина антибіотикаа переходить в молекулярній формі и адсорбується на поверхні ліпосомі, проходячи при цьому через ліпідній бішар мембрани у внутрішній простір. Усередині ліпосомі молекула протонірується с помощью протона, отриманий в результаті дисоціації цитрату натрію або по реакції обміну з іоном амонію; при цьому молекула антибіотикаа втрачає здатність проходити через ліпідній бішар и в результаті цього відбувається процес накопичення антибіотика всередині ліпосомі. В іншому випадку, іон амонію, отщепляя протон, перетворюється в газоподібній аміак в молекулярній формі, який проходить через мембрану ліпосомі в середу,

Навколишнє ліпосом. Включення антибіотикаа, наприклад, доксорубіцину гідрохлориду в ліпосом ставити 75 - 85% від початкової кількості субстанції.



Таблиця 3-Основні характеристики ліпосомального препарату доксорубіцину

влаивості препарату	
ліпідний склад	DPPC:DSPC:DSPE-PEG-200: Chol(*) (9 : 1 : 0,02 : 0,2)
Розмір ліпосом	230–250 нм
Розмір ліпосом після регідратації ліофілізованого препарату	240–270 нм
концентрація доксорубіцину	0,4 мг/м
Ступінь включення доксорубіцину	85–92 %
Ступінь включення доксорубіцину після регідратації ліофілізованого препарату	не менее 80 %
Співвідношення субстанція / ліпід	0,2

(\*) DPPC–дипальмітоилфосфатидилхолин; DSPC–дистеароилфосфатидилхолин; DSPE-PEG-200–дистеароилфосфатидилэтаноламин + полиэтиленгликоль; Chol–холестерин.

## II. Контроль опорних знань

Виконати тестові завдання:

1. Фармацевтична підприємство освоєє випуск нової продукції. В якому розділі промислового технологічного регламенту описані Зовнішній вигляд и фізико-хімічні Влаивості готового продукту:

- A Інформаційні матеріали
- B. Виклад технологічного процесса
- C. Характеристика сировини, матеріалів и напівпродуктів
- D Характеристика допоміжного сировини и матеріалів

**Е. Характеристика кінцевого продукту виробництва**

2. В якому розділі регламенту описана санітарна підготовка виробничих приміщень:

А. Опис стадій технологічного процесу і виробнича санітарія

В. Техніка безпеки, пожежна безпека і виробнича санітарія

С. Безпечна експлуатація виробництва та охорона навколишнього середовища

Д Інформаційні матеріали

Е. Загальна характеристика виробництва

3. Вкажіть аналітичний нормативний документ, що встановлює вимоги до складу препарату та процесу його виробництва:

А. Галузевий стандарт (ОСТ)

В. Технічний регламент

С. Державний стандарт (ГОСТ)

Д Технологічний регламент, фармакопейна стаття

Е. Технічні умови

4. У промисловотехнічному відділі Розробляють технічний регламент. На виробництві замінили кілька одиниць обладнання. В Який розділ технічного регламенту нужно терміново внести Зміни.

А. Таблиця ГДК

В. Розділ охорони праці

С. Апаратурна схема

Д План ліквідації аварії

Е. Список інструкцій

5. На фармацевтичних підприємстві виготовляють різні готові лікарські засоби согласно з технологічними регламентами. В течение которого терміну промисловий регламент є дійсним:

А 5 років

В. 3 роки

С. 8 років

Д. 1 годину

Е. 6 місяців

6. Нормативний документ, в якому Встановлені вимоги до конкретної продукції та послуг, що регулює отношения между постачальником и Споживачем. Який документ відповідає цьому визначення:

А. Стандарт;

В. Технічні умови;

С. Технічний регламент;



- D Технологічний регламент;
- E. Методичні вказівки.
- 7. Що НЕ регламентують правила GMP:
  - A. вимоги до біологічної доступності препарату;
  - B. Фармацевтична термінологію;
  - C. вимоги до будівель та приміщень виробництва;
  - D. вимоги до персоналу;
  - E. необхідність валідації.
- 8. Витратні коефіцієнт це:
  - A. Відношення масі матеріальних Втрата до масі вихідних матеріалів.
  - B. Кількість Речовини, що викорістовується для Отримання заданої кількості препарату.
  - C. Відношення масі готового продукту до масі вихідних матеріалів.
  - D Відношення масі вихідних компонентів до масі готового продукту.
  - E. Сума мас Втрата и вихідного матеріалу
- 9. Валідація це поняття, що відноситься до GMP и что означає:
  - A. Контроль за роботою ВТК підприємства.
  - B. Рентабельність підприємства.
  - C. Що система працює так, як и передбачало.
  - D Стерильності продукції.
  - E. Перевірку якості ГЛЗ.
- 10. Правила GMP регламентують:
  - A. Необхідність валідації.
  - B. Фармацевтична технологію.
  - C. Вимоги до будівель та приміщень фармвиробництва.
  - D Вимоги до персоналу.
  - E. Всі відповіді вірні.
- 11. Правила GMP регламентують:
  - A. Проведення доклінічних випробувань фармацевтичних препаратів.
  - B. Організацію виробництва ГЛЗ.
  - C. проведення клінічних випробувань.
  - D Правила роздрібної торгівлі.
  - E. Правила оптової торгівлі.
- 12. Правила GMP регламентують:
  - A. Правила оптової торгівлі.
  - B. Організацію виробництва ГЛЗ.
  - C. Проведення доклінічних випробувань фармацевтичних препаратів.
  - D Правила роздрібної торгівлі.
  - E. Проведення клінічних випробувань.

### **III. Обговорення теоретичних питань:**

1. Імобілізація ферментів шляхом їх включення в структуру ліпосом.
2. Методи включення ферментів в структуру ліпосом.
3. Контроль ефективності включення ферментів в ліпосоми. Переваги і недоліки методу. Сфери практичного застосування.

#### **Теми доповідей/ рефератів**

1. Технологічні аспекти виготовлення ліпосомальних препаратів. Ліпідні субстанції.
2. Технологія отримання ліпідної плівки.
3. Технологія отримання ліпосом.

### **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. –