


**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 (Борисюк І.Ю.)

“ 27” серпня 2021 р

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ  
з самостійної роботи студентів (СРС)**

Факультет: фармацевтичний

Навчальна дисципліна «Фармацевтична біотехнологія»

Тема №9 **«Технологія виготовлення нанопрепаратів.»**  
для аспірантів

Методичні рекомендації з СРС  
розробив:  
асистент



(Акішева А.С.)

підпис

Методичні рекомендації з СРС  
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, хроматографія.

### План

#### I. Теоретичні питання до заняття:

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 кріопротекторів. 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 кріопротекторів є збереження досліджуваною 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 кріопротектори 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», викликаного 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 бислоя 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 фосфатидилхоліна. У той же час у везикул, приготованих з інших кислих фосфоліпідів, таких як фосфатидилсерин, фосфатидними кислота або фосфатидлінозит, 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 ліпиду. 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 уніламельлярні 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 розчиненої речовини, яка відбувається під час дегідратації / регідратації ліпосом, викликається процесом заморожування. Однак пряме порівняння «витоку», викликаного 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» інкапсульованого 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 переупаковку фосфоліпідів всередині бішару.

З урахуванням того факту, що для багатьох ліпосом різного складу, ліофілізованих в присутності сахаракріопротектора, з носія втрачається тільки частина спочатку інкапсульованого 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 інкапсульованого речовини проісходіт із 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 інкапсульованого 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 ліофілізованом стані. Відносні захисні властивості різних вуглеводів пов'язували як з числом гідроксильних груп, доступних для водневої зв'язку, так з їх просторової 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 діпальмітоїлфосфатіділхоліна знижена до 68 ° С для безводного і до 41 ° С для повністю гідратованого ліпіда. Аналогічноєсніженіє 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» інкапсульованого речовини може

бути наслідком цього переходу. Тому виникло припущення, що трегалоза і інші цукру, здатні зберігати безводні ліпіди в рідкокристалічному стані, запобігають такий фазовий перехід і тим самим зменшують «витік» інкапсульованої речовини. Прямий доказ взаємодії між трегалозою і безводних дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїном було отримано при ЯМР - дослідженнях твердого стану ліпїдїв. Цї дослідження показали, що в сумїшах дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїн - трегалоза при температурах вище 46 ° С липїд приймає ту форму, яку називають  $\lambda$ -фазою. У цїй фазї жирні ацильні ланцюга неупорядкованї, подїбно жидкокристалїческой фазї, але ряд їх груп іммобілізувати в результатї зв'язування з трегалозою. Доведено, що при температурах нижче 46 ° С  $\lambda$ фаза повільно переходить в гель. Відомостї, присвяченї взаємодїї між вуглеводами і фосфолїпідами і впливу цукрїв на термотропнїє властивостї липїдїв, досить суперечливї. Колишнї уявлення про пряме взаїмодїєвїмежду дисахарїдами і фосфолїпідами в гїдратованому станї базувалися на дослідженнї монослоев, що дало підставу думати, що трегалоза та інші цукру створюють збїльшення площї на молекулі липїда. Далї інші дослідникї показали, що трегалоза і сахароза мало впливають як на температуру переходу гель - рїдкокристалїчна фаза, так і на ентальпїю переходу повнїстю гїдратованого дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїна, що вказує на відсутнїсть взаємодїї сахараї липїдїв. Цї спостереження сприяли створенню уявлення про те, що взаємодїя між цукрами і фосфолїпідами відбувається тїльки в безводному станї. Крім того, трегалоза може знижувати температуру переходу з гелю в рїдкокристалїчний стан безводних фосфолїпїдїв при спїльнїй лїофїлізації з органїчного розчинника. У той же час, при гїдратїрованїем лїпосом з води в присутностї трегалози спостерїгається значно бїльш складне термотропнїє поведїнку. Наприклад, в разї лїпосом з 2олеїлснглїцеро3фосфохолїна і фосфатїдїлсерїна пїсля дегїдратацїї існують переходи, як при високїй, так і при низькїй температурї, що не залежать від спїввїдношення трегалоза - липїд в початковому зразку, що вказує на присутнїсть як гелевого, так і рїдкокристалїчного домену. Виникло припущення, що цї фазовї домени вїдображають внутрїшнїй і зовнїшнїй дїлянки подвїйного шару і є результатом вїдмінностей між вїдносинами трегалоза - липїд по обидвї сторони мембрани. Вїдповїдно до цїєї гїпотези зовнїшнїй моношар знаходиться в рїдкокристалїчному станї, а внутрїшнїй - в станї гелю. На додаток до питань, що стосуються трактування досліджень, котрї безпосередньо займалися взаємодїями цукор - липїд, гїпотеза, згїдно з якою цукру гальмують викликану дегїдратацїєю «витїк», запобїгаючи фазовї переходї липїда, несумїсна з цїлим рядом спостережень. Як зазначалося ранїше, якби фазовї переходи були вїдповїдальнї за «витїк», це означало б, що склад липїду сильно впливає на стабїльнїсть подвїйного шару. Однак спостерїгалосся, що вїдмінностї в «вїтоку» карбоксїфлуоресцеїна з фосфатїдїлхолїнових везїкул з неоднаковим складом жирних кислот незначнї,

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 дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїна, при дегїдратації при кїмнатній температурї повинні перебувати в станї гелю до дегїдратації, в зневодненї станї і після регїдратації. Незважаючи на відсутність фазового переходу, з цих лїпосом також відбувається значна «витїк» інкапсульованої речовини. Нарештї, якщо зневодненї везикули дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїна Регїдратїрующее при температурї вище або нижче температури фазового переходу, спостерїгається однакова ступїнь змїсту карбоксїфлуоресцеїна. Цї результати важко узгодити з уявленнєм про те, що «витїк» інкапсульованої речовини є наслїдком дестабїлізації бїслою в результатї фазового переходу лїпіда і про те, що захисна дїя деяких цукрїв вїдображає запобїгання таких переходїв. Цї несумїсностї були усвідомленї прихильникими гїпотези фазового переходу, якї у вїдповїдь припустили, що в присутностї трегалози в везикулах, що складаються з яєчного фосфатидилхолїну, дїолеїлфосфатїдїлхолїна або дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїна, фазовий перехїд при дегїдратації і регїдратації при кїмнатній температурї не відбувається. Стверджують, що везикули, що складаються з ненасичених лїпїдов (яєчний фосфатидилхолїн, дїолеїлфосфатїдїлхолїн), протягом всього часу залишаються в жидкокристалїческой фазї, в той час як везикули дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїна залишаються в фазї гелю. Однак цей аргумент здається спїрним. У разї везикул, що складаються з ненасичених лїпїдїв, на початковому етапї заморожування під час лїофїлізації температура повнїстю гїдратованих везикул знижується до значень, якї набагато нижче їх фазового переходу. Навїть допускаючи той факт, що зразок не заморожений спочатку в рїдкому азотї або в смесїсухой лїд / етанол, первинна сушка буде проводитися при температурї нижче температури колапсу крїопротектори (вїд мїнус 30 ° С до мїнус 35 ° С для дисахаридов), що набагато нижче температури фазового переходу лїпіда (вїд +4 ° С до мїнус 21 ° С, в залежностї вїд складу жирних кислот). Тому після заморожування везикули будуть перебувати в станї гелю. Якщо під час дегїдратації утворився комплекс цукор - лїпїд, їснуючий в рїдкокристалїчній або в  $\lambda$ -фазї, то ясно, що лїпїд повинен зробити фазовий перехїд. Якщо такий комплекс не утворився, то везикули перейдуть з гелю в рїдкокристалїчну фазу після регїдратації при кїмнатній температурї. Аналогїчно цьому для везикул дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїна, навїть якщо вони пїдтримуються в станї гелю при заморожуванні, первинної та вторинної сушіннї, регїдратація при 50 ° С призведе до переходу в рїдкокристалїчну

фазу (температура фазового переходу - 41 ° С для повністю гідратованого ліпіда). Спостерігаються лише невеликі відмінності в «витоку» карбоксифлуоресцеїна в разі везикул з дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїна, регїдратованих при 30 ° С і при 50 ° С. Дослїдниками проведено вивчення стабїльностї лїпосом, що мїстять карбоксифлуоресцеїн, в процесї лїофїлізацїї і зберїгання. Як стабїлізатори використовували ряд цукрїв: сахарозу, манїт, лактозу, трегалозу і їн. Найкращї результати отриманї при використаннї трегалози. На думку авторїв, частина захисного ефекту трегалози і їнших цукрїв може бути обумовлена здатнїстю дїяти як промїжна матриця мїж везикулами, запобїгаючи їх зближенню. Останнє може бути пов'язано з тим, що однїєю з передумов до мембранного злиття є тїсне зближення двох бїшару. Здається, в кожному випадку необхідно вивчати роль окремих цукрїв як стабїлізаторїв лїпосом. Пїдтвердженню цьому служить робота, в якїї автори для стабїлізацїї лїпосом використовували лактозу. Порївняння даного цукру з трегалозу, мальтозою, глїукозою продемонструвало явну перевагу. Їмовїрно, дисахара проявляють велику стабїлізуючу активнїсть дегїдратованих мембран лїпосом. Крім того, встановлено, що лактоза має бути присутня по обидва боки лїпосом, в зв'язку з чим її додавання в процесї виготовлення препарату проводили на рїзних стадїях. Необхїдно також врахувати доступнїсть лактози і дозвїл її використання в складї їн'екцїйних форм в фармакопєях багатьох країн. При лїофїлізацїї багатошарових лїпосом з метою їх стабїлізацїї використовували в якостї крїопротектори олігомери глїукози - мальтодекстрини. Показано, що в мїру пїдвищення в складї лїпосом, отриманих з дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїна, кїлькостї глїукозїдної залишків температура фазового переходу лїпїдїв вїд гелю в рїдкокристалїчний стан зростал. Вивчення впливу режиму заморожування і лїофїлізацїї проведено в роботї, в якїї використовували лїпосоми, що складаються з дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїна і дїпальмітоїлфосфатїдїлгліцерїна в спїввїдношеннї 10: 1. У лїпосоми включали карбоксифлуоресцеїн. Лїпосоми заморожували повільно зї швидкїстю 0, 5 ° С в хвилину до температури мїнус 60- 70 ° С або швидким зануренням в рїдкий азот. Авторами встановлено, що повільне заморожування призводить до значно бїльшого змїсту карбоксифлуоресцеїна пїсля лїофїлізацїї і регїдратацїї, нїж при швидкому заморожуваннї. Вплив швидкостї заморожування залежить вїд лїпїдного складу. Так, бїльш «жорсткї» лїпосоми, що мїстять холестерин, зберїгали свою структуру в бїльшїй мїрі при повільному заморожуваннї. У той же час режим заморожування не впливав на взаємодїю фосфолїпїдїв з крїопротекторами сахарозою, трегалозу, глїукозою. Основна кїлькїсть робїт, присвячених захисту лїпосом вїд пошкодження при лїофїлізацїї, зосереджувалася на цїлїсностї подвїйних шарїв пїд час етапїв заморожування і лїофїлізацїї, на вивченнї проникностї бїшару лїпосом, отриманих з дїпальмітоїлфосфатїдїлхолїна і дїпальмітоїлфосфатїдїлгліцерїна (молярне



соотношеніе10: 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 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 підвищену проникність 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 гидрофобной активної фармацевтичної субстанцією (препарат «Ліпотакс»)

розмір ліпосом на 7-12% менше, ніж при використанні розчинника кімнатної температури. При використанні препаратів з гідрофільною 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 використуваного 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 використуваних 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.

### **Контроль препарата**

Наступним етапом отримання ліпосомальних препаратів є контроль якості готового лікарського препарату як після виготовлення, так і в процесі зберігання, з метою вивчення стабільності. При вивченні якісних показників ліпосомальних препаратів ми виходили з визначення трьох груп показників:

I - показники, якості які характеризують індивідуальних біологічно активних компонентів препарату (фосфатидилхолін, доксорубіцину гідрохлорид, антраль, кверцетин, амфотерицин В, доцетаксел та ін.) I допоміжних речовин (лактоза, вітамін Е та ін.);

II - показники якості, що характеризують готову форму препарату;

III - показники, що характеризують властивості ліпосом.

### **Основні методи контролю ліпідних препаратів.**

1. I Показники, що характеризують властивості індивідуальних компонентів: • справжність ліпідних компонентів і АФС;

- кількісне визначення діючих та допоміжних речовин;
- сторонні домішки;
- ступінь включення АФС в ліпосоми.

2. II Показники, що характеризують готову форму препарат:

- рН;
- стерильність;
- пірогенність (ендотоксини);
- аномальна токсичність;
- механічні включення;
- розмір ліпосом;
- визначення часу утворення і стійкості емульсії;
- вміст води

### 3. III Показники, які характеризують властивості ліпосом :

- включення лікарської речовини;
- розмір ліпосом;
- Z-потенція

Випробування повинні зачіпати ті властивості продукту, які схильні до змін при зберіганні і можуть впливати на якість, ефективність і безпеку застосування готового препарату, причому методи кількісного визначення повинні дозволяти характеризувати стабільність. Особливу увагу необхідно приділяти профілем нових продуктів, що утворюються при деградації (розкладанні) компонентів препарату. У цьому випадку ці нові продукти розкладання необхідно кваліфікувати. Так, наприклад, повинні бути ідентифіковані і вказані граничні кількості утворюються домішок, наприклад, для фосфатидилхоліну (лізопродукти або вільні жирні кислоти) або для доксорубіцину гідрохлориду (аглікони або інші продукти розкладання). Важливим питанням є розробка методу визначення кількості включеного в ліпосомі лікарського засобу, причому такі визначення повинні проводитися як в процесі виготовлення ліпосом і їх ліофілізації, так і при зберіганні препарату протягом терміну його придатності. Це питання має вирішуватися конкретно для кожного виду ліпосом безпосередньо дослідником, при цьому валідація є обов'язковою умовою його використання.

Це питання має вирішуватися конкретно для кожного виду ліпосом безпосередньо дослідником, при цьому валідація є обов'язковою умовою його використання. До одного з проблемних питань можна віднести випробування на механічне включення (сторонні частинки). Їх визначення саме по собі складно, по-перше, тому що препарат являє собою емульсійну рідина, забарвлену в білий, червоний, зелений або жовті кольори, а по-друге, препарат ліофілізований, що вимагає високої якості скла і закупорювальних матеріалів та розливу препарату в класі А. Кількість ліпосомальних форм препаратів збільшується з кожним роком. Препарати знаходяться в різних фазах клінічного вивчення:

від I фази (препарат «SPI77», що представляє собою ліпосомі з природних фосфоліпідів величиною близько 150 нм в діаметрі, що містить цисплатин, який використовується для лікування широкого спектру пухлин);

II фази (препарат «Міказон», що представляє собою ліпосомі, що складаються з фосфоліпідів і холестерину, величиною близько 120 нм в діаметрі, що містить амікоцін, який використовується для лікування бактеріальних і мікобактеріальних інфекцій);

III фази (препарат Д99, що представляє собою ліпосомі, що складаються з фосфатидилхоліну і холестерину, величиною 100 нм в діаметрі, що містить доксорубіцин) - до готових препаратів, впроваджених в промислове виробництво і використовуються для лікування хворих. Наприклад, «Ліпін», що представляє собою ліпосомі з фосфатидилхоліну, величиною 140-180 нм,

який використовується для лікування синдрому гострої та хронічної дихальної недостатності, гострого і хронічного активного гепатиту, цирозу печінки та ін.;

«Докса», що представляє собою ліпосоми, що складаються з фосфатидилхоліну і холестерину, величиною 80-120 нм в діаметрі, що містить доксорубіцин, який використовується для лікування саркоми Капоші;

«Амбізом», що представляє собою ліпосоми, що складаються з гідрогенізованого фосфатидилхоліна сої, дістеароїлфосфатідінгліцерола і холестерину, який використовується для лікування системних грибкових інфекцій і містить Амфотерицин В;

«Ліпофлавіон», що представляє собою ліпосоми з фосфатидилхоліну з включеним в них біофлавоноїдів - Кверцитин, величиною 120 - 180 нм, який використовується для застосування в кардіології та офтальмології;

«Ліюлів», що представляє собою ліпосоми з фосфатидилхоліну з включеним в них гепатопротектором - антраль, величиною 150- 180 нм, який використовується для лікування захворювань печінки. За запропонованою технологічною схемою було отримано ряд оригінальних ліпосомальних препаратів, характеристика яких наведена в табл. 5 і табл. 6. Таким чином, наведені дані доводять перспективність отримання ліпосомальних форм лікарських препаратів. Необхідно відзначити, що в кожному конкретному випадку необхідно вирішувати поставлені завдання, виходячи з кінцевої мети: підбір ліпідних компонентів, джерело їх виділення і зміст;

Фізико-хімічні властивості вводяться в ліпосоми речовини;

спосіб отримання ліпосом;

склад консервантів і стабілізаторів;

режими ліофілізації і зберігання і ряд інших факторів, що визначають якість і біологічну активність ліпосомальної форми лікарського засобу.

### **Питання для самоконтролю**

1. Опишіть основні стадії процесу ліофілізації ліпосом.
2. Які методи використовують для визначення ступеня включення речовини в ліпосоми?
3. Як впливає температура розчину на проведення регідратації ліпосом?
4. Наведіть основні критичні стадії виробництва лікарських ліпосомальних препаратів.
5. Запропонуйте апаратурну схему отримання ліпосомального лікарського препарату.

### **Орієнтовні завдання для опрацювання теоретичного матеріалу**

1. Скласти словник основних понять з теми

2. Заповнити орієнтувальну картку для самостійної підготовки студента з використанням літератури з теми:

<b>Основні завдання</b>	<b>Вказівки</b>	<b>Відповіді</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>

Фармацевтична біотехнологія рослин. Культивування клітин та тканин рослин. Отримання біологічно активних сполук з використанням культур рослинних клітин.	Розкрити питання	Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев – Харьков: НТУ «ХПИ», Ч.1.2012. – 304с. С. 63
---	------------------	---

## **II. Практичні роботи (завдання), які виконуватимуться на занятті**

### **III. Тестові завдання для самоконтролю**

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) гомополісахариди;
  - б) гетерополісахариди;
  - в) нуклеїновіекіслоти;
  - 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) меншій токсичності;
  - в) більшою частотою 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.

#### **IV. Індивідуальні завдання для студентів з теми заняття**

1. Доведіть, що ліпосомальні продукти є продуктом нанобіотехнології.
2. Опишіть основні фармакологічні методи контролю ліпосомальних лікарських форм.
3. Що таке кріопротектор, і які хімічні речовини використовують при ліофілізації ліпосом?

## **6.Рекомендована література:**

### **Основна**

1. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
2. S. Spada. G. Walsh Directory of Approved Biopharmaceutical Products 1st Edition . – CRC Press, 2019. – 336 p.
3. C. Kokare PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 1st Edition. – Nirali Prakashan, 2017. – 274.
4. Лихач А. В. Промислова біотехнологія / А. В. Лихач. – МНАУ. – 2016. – 116 с.
5. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
6. 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.