Определение оптимальных технологических условий процесса получения липосомальной лекарственной формы цифетрилина

М. В. Дмитриева^{1*}, О. Л. Орлова¹, А. В. Ланцова¹, И. И. Краснюк²

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

² ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

*Корреспондент: Дмитриева Мария Вячеславовна. E-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: М. В. Дмитриева – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; О. Л. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>; А. В. Ланцова – <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>; И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Статья поступила: 07.09.2021

Статья принята в печать: 04.02.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России разработана композиция инъекционной липосомальной лекарственной формы на основе соевого фосфатидилхолина гидрофобного аналога гипоталамического гормона соматостатина – цифетрилина, предназначенного для терапии нейроэндокринных опухолей.

Цель. Определение оптимальных технологических условий процесса получения липосомальной лекарственной формы цифетрилина.

Материалы и методы. В работе использована субстанция цифетрилина, синтезированная в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России (Россия); соевый фосфатидилхолин S PC и полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтанолламин, произведенные компанией Lipoid GmbH (Германия); холестерин $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Япония). Для приготовления фосфолипидных везикул, загруженных цифетрином и «пустых», применяли метод гидратации липидной пленки с последующей экструзией или гомогенизацией дисперсии многослойных липосом. Полученные образцы липосомальной дисперсии оценивали по показателям качества – эффективность включения цифетрилина в везикулы, их средний размер и поверхностный заряд (дзета-потенциал), вязкость дисперсии. Для оценки данных характеристик применены методы спектрофотометрии, лазерной спектроскопии рассеяния, определения электрофоретической подвижности частиц и вискозиметрии.

Результаты и обсуждение. Установлено, что наиболее подходящим органическим растворителем для получения раствора цифетрилина и липидных компонентов лекарственной формы является хлороформ. Продолжительность периода высушивания липидной пленки под вакуумом для удаления остаточного растворителя определяется соотношением объема используемой отгонной колбы и массой ее загрузки. При этом смыл липидной пленки водой для инъекций следует проводить в условиях пониженного давления и комнатной температуры. Для получения дисперсии однослойных липосом цифетрилина требуемого размера с сохранением высокого уровня включения лекарственного вещества в везикулы выбран метод экструзии с использованием нейлоновых и поликарбонатных мембран с диаметром пор фильтра 0,22 и 0,2 мкм, соответственно.

Заключение. Определены оптимальные технологические условия процесса получения липосомальной лекарственной формы в виде дисперсии гидрофобного аналога гипоталамического гормона соматостатина – цифетрилина.

Ключевые слова: липосомы, лекарственная форма, дисперсия, технологические факторы, цифетрилин, соевый фосфатидилхолин

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. В. Дмитриева – дизайн исследования, получение и анализ данных, написание текста статьи. О. Л. Орлова – дизайн исследования, анализ данных. А. В. Ланцова – получение и анализ данных, обзор публикаций. И. И. Краснюк – дизайн исследования, проверка окончательной версии статьи.

Финансирование. Исследование проведено в рамках государственного задания № АААА-А20-120031190026-9 «Создание инновационного лекарственного средства с повышенной биодоступностью для лечения нейроэндокринных опухолей».

Для цитирования: Дмитриева М. В., Орлова О. Л., Ланцова А. В., Краснюк И. И. Определение оптимальных технологических условий процесса получения липосомальной лекарственной формы цифетрилина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):82–89. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-82-89>

Determination of Optimal Technological Conditions for the Process of Production a Liposomal Dosage Form of Cyphetrylin

Maria V. Dmitrieva^{1*}, Olga L. Orlova¹, Anna V. Lantsova¹, Ivan I. Krasnyuk²

¹ FSBI "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin", 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia

² I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Maria V. Dmitrieva. E-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: Maria V. Dmitrieva – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; Olga L. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>; Anna V. Lantsova – <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>; Ivan I. Krasnyuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Received: 07.09.2021

Revised: 04.02.2022

Published: 25.02.2022

© Дмитриева М. В., Орлова О. Л., Ланцова А. В., Краснюк И. И., 2022

© Dmitrieva M. V., Orlova O. L., Lantsova A. V., Krasnyuk I. I., 2022

Abstract

Introduction. The Laboratory for the development of dosage forms of the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russian Federation has developed a composition of an injectable liposomal dosage form based on soybean phosphatidylcholine, a hydrophobic analog of the hypothalamic hormone somatostatin – cyphetrylin, intended for the treatment of neuroendocrine tumors.

Aim. Determination of optimal technological conditions for the process of obtaining a liposomal dosage form of cyphetrylin.

Materials and methods. The study used the substance cyphetrylin synthesized in the of Chemical Synthesis Laboratory of the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russian Federation; soybean phosphatidylcholine S PC and polyethylene glycol-2000-distearoylphosphatidylethanolamine, produced by Lipoid GmbH (Germany); cholesterol $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Japan). For the preparation of phospholipid vesicles loaded with cyphetrylin and "empty", the methods of lipid film hydration with subsequent extrusion or homogenization of the dispersion of multi-layer liposomes were used. The obtained liposomal samples were evaluated by quality indicators – the effectiveness of the inclusion of cyphetrylin in vesicles, their average size and surface charge (zeta potential), the viscosity of the dispersion. To evaluate these characteristics, the methods of spectrophotometry, laser scattering spectroscopy, determination of the electrophoretic mobility of particles and viscometry were used.

Results and discussion. It was found that the most suitable organic solvent for obtaining a solution of cyphetrylin and lipid components of the dosage form is chloroform. The duration of the drying period of the lipid film under vacuum to remove the residual solvent is determined by the ratio of the volume of the distillation flask used and the mass of its loading its loading. At the same time, hydration off the lipid film with water for injection should be carried out under conditions of low-pressure and room temperature. To obtain a dispersion of single-layer cyphetrylin liposomes of the required size, an extrusion method using nylon and polycarbonate membranes with a filter pore diameter of 0.22 and 0.2 μm , respectively, was chosen.

Conclusion. The optimal technological conditions for the process of obtaining a liposomal dosage form in the form of a dispersion of a hydrophobic analog of the hypothalamic hormone somatostatin – cyphetrylin are determined.

Keywords: liposomes, dosage form, dispersion, technological factors, cyphetrylin, soybean phosphatidylcholine

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Maria V. Dmitrieva – research design, obtaining and analyzing data, writing the text of the article. Olga L. Orlova – research design, data analysis. Anna V. Lantsova – obtaining and analyzing data, review of publications. Ivan I. Krasnyuk – research design, verification of the final version of the article.

Funding. The study was conducted within the framework of the state task No. AAAA20-120031190026-9 "Creation of an innovative drug with increased bioavailability for the treatment of neuroendocrine tumors".

For citation: Dmitrieva M. V., Orlova O. L., Lantsova A. V., Krasnyuk I. I. Determination of optimal technological conditions for the process of production a liposomal dosage form of cyphetrylin. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):82–89. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-82-89>

ВВЕДЕНИЕ

Химиотерапия гормонозависимых опухолей остается одним из актуальных направлений в лечении онкологических заболеваний. Повышенное внимание к проблеме гормонозависимости опухолей в аспекте их возможной химиотерапии создает условия для применения гормонов в качестве противоопухолевых средств. В этом ключе ведется активный поиск противоопухолевых соединений среди агентов, способных избирательно воздействовать на гормонозависимые опухоли. К таким агентам относятся пептидные гормоны гипоталамуса, в частности соматостатин [1].

Цифетрилин, аналог гипоталамического гормона соматостатина, представляет собой защищенный по функциональным группам пентапептид – метиловый эфир N^α-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-L-цистеинил-L-фенилаланил-D-триптофил-N^α-карбобензоксид-L-лизил-L-треонина, синтезированный в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. По результатам изучения гормональной, цитотоксической и противоопухолевой активности цифетрилин как перспективный препарат для лече-

ния ряда злокачественных новообразований был отобран для дальнейших исследований. В связи с гидрофобной природой цифетрилина на его основе была создана таблетированная лекарственная форма (ЛФ), которая к настоящему времени прошла I стадию клинических исследований у пациентов с нейроэндокринными опухолями. С целью повышения эффективности и снижения побочных эффектов в качестве альтернативы таблеткам предложена композиция инъекционной ЛФ цифетрилина на основе липосом [2–5].

Липосомы представляют собой сферические липидные везикулы, состоящие из одного или нескольких фосфолипидных бислоев и водной внутренней полости. В зависимости от количества мембранных бислоев их можно разделить на одно-, олиго- или многослойные везикулы, которые образуются в результате самоорганизации фосфолипидов в контакте с гидрофильной средой. Такое поведение увеличивает их растворимость в среде и снижает отношение поверхности к объему [6]. Хотя везикулярная структура характеризуется минимальным термодинамическим уровнем энергии, для образования пузырьков в сис-

тому необходимо подать минимальное количество энергии, называемое «энергией активации». Эта требуемая подводимая энергия может быть физической, механической, термической, акустической или их комбинацией [7]. Существует множество различных способов приготовления липосом, при этом выбор подходящего метода зависит от нескольких факторов: физико-химических характеристик липосомных компонентов и загружаемого лекарственного средства; токсичности и концентрации загружаемого вещества; типа среды, в которой диспергированы липосомы; размера и периода полураспада, желаемые для успешного применения; стоимости, воспроизводимости и применимости в отношении крупномасштабного производства для клинических целей и др. [8].

Целью настоящей работы являлось определение оптимальных технологических условий процесса получения липосомальной ЛФ (ЛЛФ) гидрофобного аналога гипоталамического гормона соматостатина – цифетрилина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы: субстанция цифетрилина серии 010220, $\geq 97\%$ (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), соевый фосфатидилхолин (СФХ) S PC $\geq 98\%$ (Lipoid GmbH, Германия), холестерин $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Япония), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтанолламин (ПЭГ-ДСФЭ) 18:0/18:0 (Lipoid GmbH, Германия); хлороформ (х.ч.), стабилизированный этанолом (ООО ТД «ХИММЕД», Россия); спирт этиловый 95 % (ООО «Гиппократ», Россия), вода для инъекций ФС.2.2.0019.18, вода очищенная ФС.2.2.0020.18; нейлоновые мембраны NNG025100, NXG025100, NRG025100 с размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (ООО «Палл Евразия», Россия), поливинилиденфторидовые мембраны GVHP02500 с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия), поликарбонатные мембраны Nuclepore 110606 с размером пор 0,2 мкм (Whatman International Ltd., Великобритания), полиэфирсульфоновые мембраны Express® PLUS GPWP02500 с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия), фильтр из сложных эфиров целлюлозы GSWP02500 с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия).

Оборудование: весы лабораторные GF600 (AND, Япония), роторный испаритель Hei-VAP Advantage с отгонной колбой на 2 л (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия), экструдеры Lipex™ на 10 и 100 мл (Northern Lipids Inc., Канада), микрофлюидизер M-110S (Microfluidizer, США), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия), дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern, Великобритания), вискозиметр Vibro Viscometer SV-10 (AND, Япония).

Методы

Получение липосом с цифетрилином. Многослойные липосомы (МСЛ) цифетрилина получали плечным методом, однослойные липосомы (ОСЛ) – ме-

тодом экструзии и гомогенизации, предварительно профильтровав дисперсию МСЛ через нейлоновые фильтры с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм. «Пустые» липосомы получали, как и липосомы с цифетрилином, но без добавления активной субстанции в состав хлороформного раствора липидов.

Количественное содержание действующего вещества в липосомах определяли методом спектрофотометрии с использованием рабочего стандартного образца (СО) при длине волны 282 ± 2 нм. В качестве раствора сравнения использовали раствор «пустых» липосом. Методика количественного анализа цифетрилина представлена в работе [4]. **Эффективность включения (ЭВ)** определяли как отношение концентрации цифетрилина в дисперсии после фильтрации ($C_{\text{фил.}}$) к его концентрации в дисперсии после получения ($C_{\text{пол.}}$), выраженное в процентах. Анализ **диаметра липосом** проводили методом корреляционной спектроскопии светорассеяния, **дзета-потенциала (ζ-потенциала)** – посредством измерения их электрофоретической подвижности. Значения **динамической вязкости** образцов дисперсии определяли на вибрационном вискозиметре при температуре 21–25 °С. Методики пробоподготовки и проведения анализа диаметра и дзета(ζ)-потенциала (ζ-потенциала) липосом и вязкости дисперсии представлены в работе [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее распространенной технологией производства липосом является метод липидной пленки, который впервые был описан и использован для приготовления липосом А. Бенгхемом и его коллегами в 1965 г. Существует несколько модифицированных версий оригинальной техники, однако выделяют общие основные этапы процесса: 1) приготовление липидной пленки; 2) гидратация липидной пленки; 3) получение ОСЛ требуемого размера [9].

Получение липидной пленки

Исходя из свойств компонентов ЛФ (таблица 1) для растворения цифетрилина и липидов используют легколетучий растворитель хлороформ. Полученный раствор переливают в круглодонную колбу и отгоняют органический растворитель в условиях пониженного давления при температуре водяной бани +40 °С и скорости вращения ротора 90 ± 5 оборотов в минуту. По мере загущения раствора скорость вращения постепенно снижают, обеспечивая достаточную скорость отгона растворителя и равномерное распределение пленки на стенках колбы.

Для удаления остаточного хлороформа пленку выдерживают под вакуумом до постоянной массы. При этом период сушки пленки определяется соотношением вместимости используемой круглодонной колбы и ее загрузкой (рисунок 1). Так, при использова-

Таблица 1. Растворимость компонентов ЛЛФ цифетрилина в органических растворителях

Table 1. Solubility of cyphetrylin liposomal dosage form (LDF) components in organic solvents

Компонент ЛЛФ Component LDF	Органический растворитель Organic solvent			
	Хлороформ Chloroform	Метанол Methanol	Этанол Ethanol	Ацетон Acetone
Цифетрилин Cyphetrylin	Растворим Soluble	–	Мало растворим Slightly soluble	
СФХ SPC	Растворим Soluble			Практически нерастворим Practically insoluble
Холестерин Cholesterol	Легко растворим Easily soluble	Практически нерастворим Practically insoluble	Умеренно растворим Moderately soluble	
ПЭГ-ДСФЭ PEG-DSPE	Растворим Soluble			Практически нерастворим Practically insoluble

нии колбы вместимостью 1 л и массе загрузки 0,511 г период полного удаления хлороформа составляет в среднем не более 40 мин, объемом 2 л и массе загрузки 1,533 г – 50 мин. С увеличением высушиваемой массы в колбе объемом 2 л в 1,5 раза отмечается удлинение этого периода на 30 мин.

Гидратация липидной пленки

Для образования МСЛ цифетрилина липидную пленку гидратируют водой для инъекций. В ходе исследования было отмечено, что большое значение при гидратации имеет температура дисперсионной среды, которая обуславливает качество липосомальной дисперсии цифетрилина. С увеличением температуры гидратанта отмечается повышение вязкости дисперсии и формируются более стабильные липосомы, что характеризуется повышением их поверхностного заряда. При этом ЭВ цифетрилина сохраняет-

ся практически на одном уровне, а размеры везикул не превышают 225 нм (таблица 2).

Также при гидратации пленки необходимо учитывать давление окружающей среды. Ранее при исследовании влияния вакуума на стадии гидратации при получении ЛЛФ гидрофобных веществ нами было установлено, что пониженное давление оказывает положительный эффект на процесс формирования МСЛ [10]. Поэтому при разработке технологии получения липосомального цифетрилина был проведен сравнительный анализ дисперсий МСЛ цифетрилина, образованных при различных уровнях давления – 1000, 500 и 100 мбар. Согласно данным таблицы 3 со снижением давления среды при гидратации отмечается образование менее вязких дисперсий, но более крупных липосом с высоким поверхностным зарядом. При этом вариабельность данного технологического параметра не влияет на ЭВ цифетрилина в бислой.

Рисунок 1. График удаления остатков хлороформа из липидной пленки

Figure 1. Graph of removal of chloroform residues from the lipid film

Таблица 2. Зависимость характеристик липосом цифетрилина от температуры воды для инъекций при гидратации липидной пленки

Table 2. Dependence of the characteristics of cyphetrylin liposomes on the temperature of the water for injection during the hydration of the lipid film

Показатели качества Quality indicators	Температура воды для инъекций, °C Water temperature for injection, °C			
	20 ± 1	25 ± 1	30 ± 1	40 ± 1
Вязкость, мПа · с Viscosity, mPa · s	7,2 ± 0,9	8,5 ± 1,2	9,9 ± 1,0	11,3 ± 1,0
ЭВ, % EE, %	100 ± 0,6	99,8 ± 0,8	99,7 ± 0,6	100 ± 1,0
ζ-потенциал, мВ ζ-potential, mV	-(17,6 ± 1,6)	-(19,7 ± 1,1)	-(19,6 ± 1,8)	-(23,4 ± 1,5)
Размер липосом, нм Liposome size, nm	208 ± 15 (98 %) / 16 ± 3 (2 %)	210 ± 15 (99 %) / 20 ± 5 (1 %)	195 ± 10 (99 %) / 11 ± 3 (1 %)	206 ± 12 (99 %) / 11 ± 3 (1 %)

Таблица 3. Влияние уровня давления на характеристики липосомальной дисперсии цифетрилина при гидратации липидной пленки

Table 3. Effect of the pressure level on the characteristics of the liposomal dispersion of cyphetrylin during the hydration of the lipid film

Показатели качества Quality indicators	Значение уровня давления, мбар Pressure level value, mbar		
	1000 ± 5	500 ± 5	100 ± 5
Вязкость, мПа · с Viscosity, mPa · s	7,3 ± 0,9	6,6 ± 0,8	5,5 ± 1,2
ЭВ, % EE, %	100 ± 0,8		
ζ-потенциал, мВ ζ-potential, mV	-(21,4 ± 1,6)	-(21,7 ± 1,7)	-(32,4 ± 1,3)
Размер липосом, нм Liposome size, nm	206 ± 14 (98 %) / 16 ± 3 (2 %)	353 ± 18 (97 %) / 27 ± 5 (3 %)	489 ± 18 (99 %) / 31 ± 3 (1 %)

Таким образом, гидратацию липидной пленки следует проводить при комнатной температуре в условиях пониженного атмосферного давления.

Получение ОСЛ цифетрилина

Эффективность химиотерапевтических препаратов в липосомальной форме достигается благодаря направленному транспорту и накоплению везикул непосредственно в опухолевой ткани. Определяющим фактором для проникновения в опухоль липосомальных носителей является их размер, который должен составлять не более 200 нм [11]. Для уменьшения размеров липосом, полученных в процессе гидратации пленки, применяют различные методы их измельчения.

Золотым стандартом в технологии производства липосомальных препаратов и одним из широко используемым методом получения ОСЛ является *экструзия*. Суть метода заключается в пропускании липосомальной дисперсии через мембранный фильтр с определенным размером пор под давлением с использованием специального оборудования – экструдера или подходящей индивидуальной установки. В отличие от других способов измельчения липосом процесс экструзии включает также фильтрацию дисперсии от видимых и невидимых механических час-

тиц, в том числе от «не включенного» в везикулы активного гидрофобного вещества, и стерилизацию препарата при соблюдении асептических условий. Эффективность экструзии определяется рядом факторов таких как природа материала и размер пор мембранного фильтра, состав липосом и концентрация липидов, скорость потока дисперсии и число циклов ее пропускания, величина давления [12].

При выборе оптимального режима экструзии МСЛ цифетрилина оценивали эффективность 5 типов мембран – нейлоновых, поликарбонатных, полиэфирсульфоновых, целлюлозных, поливинилиденфторидовых. Профильтрованную дисперсию пропускали от 1 до 9 раз под давлением 1,0–1,2 бар через вышеуказанные фильтры.

Согласно данным диаграмм (рисунок 2) все фильтры позволяют получить однородные липосомы цифетрилина оптимального размера. При сравнении значений поверхностного заряда установлено, что экструзия МСЛ цифетрилина способствует частичной дестабилизации липосомальной структуры, характеризующейся снижением ζ-потенциала везикул (рисунок 3). В то же время при использовании поликарбонатных и полиэфирсульфоновых мембран после 3 пропусканий отмечается максимальное падение ζ-потенциала с последующим его постепенным уве-

Рисунок 2. Среднее значение размера везикул цифетрилина при экстракции с различными типами фильтров

Figure 2. The average value of the size of cyphetrylin vesicles during extrusion with various types of filters

Рисунок 3. Среднее значение ζ -потенциала везикул цифетрилина при экстракции с различными типами фильтров

Figure 3. The average value of the ζ -potential of cyphetrylin vesicles during extrusion with various types of filters

личением. 100 % ЭВ цифетрилина сохраняется только при использовании нейлоновых и поликарбонатных фильтров (рисунок 4). В остальных случаях отмечается снижение инкапсулирования по мере роста числа циклов, что обусловлено сорбцией активного вещества на фильтре.

Таким образом, обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о целесообразности применения поликарбонатных и нейлоновых фильтров для экстракции МСЛ цифетрилина.

В отличие от экстракции гомогенизация под высоким давлением позволяет получать липосомальные препараты в промышленных масштабах, благодаря высокой производительности метода. Жидкий

образец в гомогенизаторе под высоким давлением продавливается через отверстие и затем ударяется о стенку, выполненной из нержавеющей стали. Циркулирование дисперсии под влиянием высокого давления по системе гомогенизатора в течение определенного периода времени приводит к постепенному снижению размера липосом [13]. В ходе исследования 100 мл профильтрованной дисперсии МСЛ гомогенизировали в камере микрофлюидайзера под давлением 2,8 бар с отбором проб через каждый цикл прохождения дисперсии по системе.

Согласно данным, представленным в таблице 4, при гомогенизации отмечаются колебания в размерах липосом цифетрилина: после уменьшения диамет-

Рисунок 4. ЭВ цифетрилина в липосомы при экструзии с различными типами фильтров

Figure 4. EE of cyphetrylin in liposomes during extrusion with various types of filters

ра везикул последующее их пропускание через гомогенизатор приводит к укрупнению частиц. При этом везикулы требуемого размера могут быть получены уже после одного цикла гомогенизации, что составляет в данных условиях 15 сек. Кроме того, в процессе гомогенизации дисперсии наблюдаются волнообразные изменения ζ -потенциала везикул, средние значения которого соответственно находятся в диапазоне $-14,9$ – $20,8$ мВ.

Однако, несмотря на эффективность метода с точки зрения уменьшения размера везикул, при гомогенизации отмечается значительное снижение содержания лекарственного вещества в липосомах (рисунок 5), что вероятно обусловлено нагреванием дисперсии и частичным разрушением бислоя. В связи

с этим можно сделать вывод о нецелесообразности использования данного метода в технологии получения ЛЛФ цифетрилина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных фармацевтических исследований изучены различные параметры основных стадий технологии получения ЛЛФ цифетрилина с учетом гидрофобной природы активной субстанции. На основании сравнительного анализа характеристик экспериментальных образцов полупродуктов определены оптимальные технологические условия получения инъекционной ЛФ цифетрилина в виде липосомальной дисперсии, пригодной для доклинических исследований.

Рисунок 5. ЭВ цифетрилина в липосомы при гомогенизации

Figure 5. EE of cyphetrylin in liposomes during homogenization

Таблица 4. Характеристики липосомальной дисперсии цифетрилина при гомогенизации

Table 4. Characteristics of the liposomal dispersion of cyphetrylin during homogenization

Число циклов Number of cycles	Размер везикул по фракциям, нм Vesicle size by fraction, nm	ζ-потенциал везикул, мВ ζ-vesicle potential, mV
0	226 ± 19 (100 %)	–(31,4 ± 1,6)
1	129 ± 8 (98 %) / 21 ± 2 (2 %)	–(19,6 ± 1,2)
2	166 ± 8 (84 %) / 48 ± 5 (16 %)	–(14,9 ± 1,1)
3	138 ± 7 (82 %) / 46 ± 3 (18 %)	–(19,1 ± 1,9)
4	167 ± 9 (66 %) / 58 ± 5 (33 %) / 11 ± 2 (1 %)	–(15,1 ± 1,2)
5	102 ± 6 (91 %) / 26 (9 %)	–(16,4 ± 1,2)
6	98 ± 8 (87 %) / 32 ± 3 (13 %)	–(17,2 ± 0,8)
7	115 ± 10 (81 %) / 31 ± 3 (19 %)	–(20,8 ± 1,5)
8	65 ± 5 (100 %)	–(18,4 ± 1,3)
9	91 ± 7 (94 %) / 19 ± 2 (6 %)	–(19,1 ± 2,1)
10	72 ± 9 (100 %)	–(20,5 ± 0,6)

ЛИТЕРАТУРА

- Борисова Л. М., Киселева М. П., Осипов В. Н., Сушинина Л. П., Устинкина С. В., Смирнова Л. И., Шпрах З. С. Цитотоксические аналоги цифетрилина (сообщение II). *Российский биотерапевтический журнал*. 2017;16(2):23–29. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-23-29.
- Осипов В. Н., Сушинина Л. П., Устинкина С. В., Смирнова Л. И., Шпрах З. С. Цитотоксические аналоги цифетрилина (сообщение I). *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(4):85–88. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-85-88.
- Коняева О. И., Кульбачевская Н. Ю., Ермакова Н. П., Чалей В. А., Меркулова И. Б., Абрамова Т. В., Бухман В. М., Шпрах З. С. Предклиническое токсикологическое изучение аналога гипоталамического гормона цифетрилина. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(2):63–70. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-63-70.
- Dmitrieva M., Shprakh Z., Orlova O., Ignatyeva E., Lantsova A., Nikolaeva L., Krasniuk I. Selection of the composition of a liposomal dosage form of a russian somatostatin analogue with antitumor activity. *Inter J Appl Pharm*. 2020;12(6):65–68. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i6.39253.
- Shprakh Z. Somatostatin analogues for the treatment of neuroendocrine tumours. Dosage forms and routes of administration (review). *Inter J Appl Pharm*. 2020;12(2):6–11. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i2.36558.
- Mania E. B., Abucafy M. P., Chiari-Andréo B. G., Silva B. L., Oshiro-Junior J. A., Chiavacci L. A. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:4991–5011. DOI: 10.2147/IJN.S133832.
- Zarrabi A., Abadi M. A. A., Khorasani S., Mohammadabadi M. R., Jamshidi A., Torkaman S., Taghavi E., Mozafari M. R., Rasti B. Nanoliposomes and tocosomes as multifunctional nanocarriers for the encapsulation of nutraceutical and dietary molecules. *Molecules*. 2020;25(3):638. DOI: 10.3390/molecules25030638.
- Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:975–99. DOI: 10.2147/IJN.S68861.
- Németh Z., Pallagi E., Dobó D. G., Csóka I. A proposed methodology for a risk assessment-based liposome development process. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1164. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121164.
- Dmitrieva M. V., Timofeeva T. A., Lugen B., Orlova O. L., Oborotova N. A., Krasniuk I. I. Hydration of the lipid film under normal and low-pressure in the technology of liposomal preparations. 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants. *MedChem Russia 2019. Abstract book*. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2019. P. 339.

- Allahou L. W., Madani S. Y., Seifalian A. Investigating the application of liposomes as drug delivery systems for the diagnosis and treatment of cancer. *Int J Biomater*. 2021;2021:3041969. DOI: 10.1155/2021/3041969.
- Дмитриева М. В., Лугэн Бу, Оборотова Н. А., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Беляцкая А. В., Степанова О. И., Боков Д. О., Нарышкин С. Р., Мазяркин Е. В. Метод экстракции в технологии получения липосом. *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2020;3:88–97.
- Jaradat E., Weaver E., Meziane A., Lamprou D. A. Microfluidics technology for the design and formulation of nanomedicines. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(12):3440. DOI: 10.3390/nano11123440.

REFERENCES

- Borisova L. M., Kiseleva M. P., Osipov V. N., Sushinina L. P., Ustinkina S. V., Smirnova L. I., Shprakh Z. S. Cyphetrylin cytotoxic analogues (report II). *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2017;16(2):23–29. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-23-29.
- Osipov V. N., Sushinina L. P., Ustinkina S. V., Smirnova L. I., Shprakh Z. S. Cyphetrylin cytotoxic analogues (report I). *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2016;15(4):85–88. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-85-88.
- Konyaeva O. I., Kulbachevskaya N. Yu., Ermakova N. P., Chaley V. A., Merkulova I. B., Abramova T. V., Buchman V. M., Shprakh Z. S. Pre-clinical toxicological study of analogue of hypothalamic hormone cyphetrylin. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2018;17(2):63–70. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-63-70.
- Dmitrieva M., Shprakh Z., Orlova O., Ignatyeva E., Lantsova A., Nikolaeva L., Krasniuk I. Selection of the composition of a liposomal dosage form of a russian somatostatin analogue with antitumor activity. *Inter J Appl Pharm*. 2020;12(6):65–68. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i6.39253.
- Shprakh Z. Somatostatin analogues for the treatment of neuroendocrine tumours. Dosage forms and routes of administration (review). *Inter J Appl Pharm*. 2020;12(2):6–11. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i2.36558.
- Mania E. B., Abucafy M. P., Chiari-Andréo B. G., Silva B. L., Oshiro-Junior J. A., Chiavacci L. A. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:4991–5011. DOI: 10.2147/IJN.S133832.
- Zarrabi A., Abadi M. A. A., Khorasani S., Mohammadabadi M. R., Jamshidi A., Torkaman S., Taghavi E., Mozafari M. R., Rasti B. Nanoliposomes and tocosomes as multifunctional nanocarriers for the encapsulation of nutraceutical and dietary molecules. *Molecules*. 2020;25(3):638. DOI: 10.3390/molecules25030638.
- Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:975–99. DOI: 10.2147/IJN.S68861.
- Németh Z., Pallagi E., Dobó D. G., Csóka I. A proposed methodology for a risk assessment-based liposome development process. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1164. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121164.
- Dmitrieva M. V., Timofeeva T. A., Lugen B., Orlova O. L., Oborotova N. A., Krasniuk I. I. Hydration of the lipid film under normal and low-pressure in the technology of liposomal preparations. 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants. *MedChem Russia 2019. Abstract book*. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2019. P. 339.
- Allahou L. W., Madani S. Y., Seifalian A. Investigating the application of liposomes as drug delivery systems for the diagnosis and treatment of cancer. *Int J Biomater*. 2021;2021:3041969. DOI: 10.1155/2021/3041969.
- Dmitrieva M. V., Lugen Bu, Oborotova N. A., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr.), Belyackaya A. V., Stepanova O. I., Bokov D. O., Naryshkin S. R., Mazyarkin E. V. The method of extrusion in the technology of obtaining liposomes. *Vestnik VGU, Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2020;3:88–97. (In Russ.)
- Jaradat E., Weaver E., Meziane A., Lamprou D. A. Microfluidics technology for the design and formulation of nanomedicines. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(12):3440. DOI: 10.3390/nano11123440.