



ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СУБСТАНЦИИ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ В ЛИПИДАХ УСТОЙЧИВЫХ НАНОЧАСТИЦ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКС БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МУСКУСА КАБАРГИ, С ЗАДАНЫМИ ПАРАМЕТРАМИ СТАБИЛЬНОСТИ

С.Л. Люблинский¹, И.Н. Люблинская^{2,*}, Е.М. Колоскова², Л.Ф. Керемецкая²,
А.М. Азизов², В.Н. Каркищенко¹, М.С. Нестеров¹, А.В. Капцов¹, А.В. Шарабанов¹,
Р.А. Агельдинов^{1,3}, В.Н. Герасимов⁴

¹ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

² ООО «Научно-производственная фирма «МОБИТЕК-М»»
249010, Российская Федерация, Калужская область, Боровск, п. Институт, 6

³ ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»
125047, Российская Федерация, Москва, Миусская пл., 9

⁴ ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
142279, Российская Федерация, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

В ходе усовершенствования опытно-промышленной технологии производства липосомированной субстанции биологически активных веществ (БАВ) из мускуса кабарги установлены режимы, обеспечивающие получение липосом в соответствии с правилами GMP с заданными параметрами стабильности (форма, гидродинамический диаметр, заряд, индекс полидисперсности) и максимальное включение БАВ из мускуса кабарги в липосомы с сохранением исходной биологической активности важнейших его компонентов, а также в два раза сокращающие продолжительность технологического цикла производства субстанции с выходом конечного продукта более 90%.

Усовершенствованная технология обеспечивает получение не менее 80% липосом с оптимальным для трансмукозального способа доставки лекарственных веществ размером основной фракции липосом в опытных образцах в диапазоне 200±50 нм — для конечной субстанции (до лиофилизации), и 250±100 нм — после её восстановления (регидратации), индексом полидисперсности менее 0,3 и дзета-потенциалом — менее -35 мВ.

Показатели качества, характеризующие дисперсность полученной липосомальной субстанции, исследованы соответствующими методами анализа (динамическое светорассеяние, электронная микроскопия). На основании полученных результатов доработан проект спецификации на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги.

Ключевые слова: кабарга, мускус, липосомы, гомогенизатор высокого давления

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Люблинский С.Л., Люблинская И.Н., Колоскова Е.М., Керемецкая Л.Ф., Азизов А.М., Каркищенко В.Н., Нестеров М.С., Капцов А.В., Шарабанов А.В., Агельдинов Р.А., Герасимов В.Н. Опытная-промышленная технология получения субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, с заданными параметрами стабильности. *Биомедицина*. 2023;19(1):8–21. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-8-21>

Поступила 01.09.2022

Принята после доработки 15.12.2022

Опубликована 10.03.2023

PILOT-SCALE TECHNOLOGY FOR OBTAINING A SUBSTANCE OF LIPID-STABILIZED NANOPARTICLES CONTAINING A COMPLEX OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ISOLATED FROM GLAND SECRETION OF MUSK DEER WITH SPECIFIED STABILITY PARAMETERS

Stanislav L. Lyublinskiy¹, Irina N. Lyublinskaya^{2*}, Elena M. Koloskova², Larisa F. Keremetskaya², Arif M. Azizov², Vladislav N. Karkischenko¹, Maksim S. Nesterov¹, Alexander V. Kaptsov¹, Andrey V. Sharabanov¹, Ruslan A. Ageldinov^{1,3}, Vladimir N. Gerasimov⁴

¹ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

² Scientific-Production Firm "MOBITEK-M"
249010, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institute Village, 6

³ D.I. Mendeleev Russian Chemical Technology University
125047, Russian Federation, Moscow, Miuskaya Square, 9

⁴ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District, Obolensk Village

In the course of improving the pilot-scale technology for manufacturing a liposomal substance of biologically active substances (BAS) isolated from the gland secretion of musk deer, the authors established operations and modes to ensure the production of liposomes with the specified stability parameters (shape, hydrodynamic diameter, charge, and polydispersity index) in full compliance with GMP requirements and the maximum inclusion of BAS from deer musk into liposomes with the preservation of the initial biological activity of its most important components. The established modes provide for a two-fold reduction in the technological cycle duration with the substance yield of more than 90%. The improved technology ensures the production of at least 80% of liposomes with the main liposome fraction in experimental samples in the range of 200+50 nm and 250+100 nm for the final substance (before lyophilization) and after its recovery (rehydration), respectively, which is considered optimal for transmucosal drug administration. The polydispersity index was less than 0.3, and the zeta (Z)-potential was less than -35 mV. The quality indicators characterizing the dispersity of the resulting liposomal substance were studied by conventional analytical methods (dynamic light scattering, electron microscopy). On the basis of the obtained results, a draft specification for a liposomal substance (powder) containing a complex of BAS isolated from deer musk was finalized.

Keywords: musk deer, musk, liposomes, high pressure homogenizer

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Lyublinskiy S.L., Lyublinskaya I.N., Koloskova E.M., Keremetskaya L.F., Azizov A.M., Karkischenko V.N., Nesterov M.S., Kaptsov A.V., Sharabanov A.V., Ageldinov R.A., Gerasimov V.N. Pilot-Scale Technology for Obtaining a Substance of Lipid-Stabilized Nanoparticles Containing a Complex of Biologically Active Substances Isolated from Gland Secretion of Musk Deer with Specified Stability Parameters. *Journal Biomed.* 2023;19(1):8–21. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-8-21>

Submitted 01.09.2022

Revised 15.12.2022

Published 10.03.2023

Введение

В настоящее время установлены основные критические точки и их параметры для процесса производства липосомальных препаратов, подлежащие тщательному контролю в соответствии с ОФС 1.1.0006.15 «Фармацевтические субстанции». Однако при разработке данных технологий известны многочисленные случаи, когда эффективные и безопасные липосомальные препараты, полученные в лабораторных условиях, не всегда удавалось воспроизвести в условиях промышленного производства.

Это связано с множеством различных факторов — составом инкапсулированного лекарственного вещества, неоднородностью липидных компонентов, применяемых для формирования бислоя везикул, экспозицией биохимически важных функциональных групп на наружной поверхности липосом, фиксированной толщиной водного слоя, числом липидных бислоев и т. д., а также во многом зависит от используемого технологического оборудования и масштаба производства.

Разработанная технология должна отличаться простотой способа получения липосом, нужной производительностью и наличием стандартного промышленного оборудования, а также обеспечивать необходимые параметры дисперсий, определяющих высокую стабильность получаемых липосом. Из известных технологий получения липосом [7] был выбран, как наиболее производительный и легко масштабируемый, способ гомогенизации под высоким давлением [9].

При совершенствовании опытно-промышленной технологии получения субстанции липосом, содержащих биологически активные вещества (БАВ) из мускуса кабарги, учитывался тот факт, что в последующем данную субстанцию планируется применять для производства пероральных препаратов трансмукозального введения

[8]. Это позволяет использовать меньшее количество действующего вещества при одной и той же его биодоступности.

В связи с этим усовершенствованная технология должна обеспечивать получение не менее 80% липосом с оптимальным для данного способа доставки лекарственного вещества (ЛВ) размером основной фракции липосом в опытных образцах в диапазоне 200 ± 50 нм — для исходной субстанции (до лиофилизации), и 250 ± 100 нм — после её восстановления (регидратации), индексом полидисперсности менее 0,3 и дзета-потенциалом — менее -35 мВ.

Целью настоящей работы являлось усовершенствование опытно-промышленной технологии для получения стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц с заданными основными параметрами дисперсности методом гомогенизации под высоким давлением.

Материалы и методы

Для получения липосомальной субстанции в ходе работы в качестве сырья были использованы сухой концентрат БАВ из мускуса кабарги [5] и 70% фосфатидилхолин (ФХ) отечественного производства [6].

Технологический процесс получения липосом осуществляли при помощи последней модификации отечественного гомогенизатора высокого давления «Донор-5» [4], превосходящего по своим технологическим характеристикам все серийно выпускаемые в настоящее время отечественные и зарубежные аналоги.

Оценку подлинности и верификацию липосомированной формы проводили в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (г. Оболенск) методом негативного контрастирования в трансмиссионном электронном микроскопе Tecnai G2 Spirit bioTWIN («FEI», США) при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличениях до 80 000 крат.

Для определения размерного распределения липосом, индекса полидисперсности и дзета-потенциала использовался метод динамического рассеяния света (ДРС) с помощью лазерного корреляционного спектрометра Photocor Compact [4].

Индекс окисленности липидов в составе липосом определялся фотометрическим методом при 232 нм. Определение БАВ из мускуса кабарги и процента их включения в липосомы проводилось методом ВЭЖХ, разработанным ФГБУН НЦБМТ ФМБА России [2, 4].

Результаты и их обсуждение

Получение липосомальной субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги, осуществляли по разработанной технологической схеме (рис. 1).

В ходе усовершенствования опытно-промышленной технологии производства липосом, содержащих БАВ из мускуса кабарги, использовались не только зарубежные и отечественные информационные материалы, но и собственный практический опыт [4], а также технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов в условиях GMP [3].

Для выработки липосом предварительно готовили р-ры концентрата БАВ из мускуса кабарги, ФХ и трегалозы с применением буферного р-ра на основе 0,9% р-ра хлорида натрия с $pH=7,5\pm 0,5$.

Подготовленные р-ры БАВ мускуса и ФХ объединяли и диспергировали до образования гомогенной дисперсии при помощи гомогенизатора-диспергатора при скорости 10 000 об./мин.

В полученную 20% (из расчёта на ФХ) липосомальную преддисперсию добавляли трегалозу и обрабатывали с помощью гомогенизатора высокого давления, постепенно поднимая давление от 20 до 40 МПа, постоянно контролируя процесс с помо-

щью лазерного анализатора размера частиц «Photocor Mini». При достижении частицами среднего размера 200 ± 50 нм (не менее 80% от их общего количества) добавляли остаток буферного р-ра, содержащего трегалозу, и проводили гомогенизацию 10% липосомальной дисперсии при давлении 40 МПа.

Электронно-микроскопические исследования структуры конечной 10% дисперсии липосом до лиофильной сушки показали, что липосомы в опытных образцах представляют собой везикулы регулярной округлой и овальной формы диаметром от 50 до 250 нм (рис. 2). При этом липосомы диаметром от 50 до 200 нм составляют более 80% от всех липосомальных частиц в образце. Во внутренней структуре липосом отчётливо видны мелкие образования нерегулярной формы с разной электронно-оптической плотностью диаметром 5–20 нм, предположительно — частицы БАВ из мускуса кабарги.

В ходе технологического процесса контролировалось уменьшение размера и распределение везикул (рис. 3). Следует отметить, что значение «mean» в таблице соответствует радиусу измеряемой липосомы. Для получения величины гидродинамического диаметра везикулы полученный результат необходимо умножить на два.

Эти результаты подтверждают исследование липосомальной дисперсии с помощью электронной микроскопии. Приведённые в качестве примера данные на рис. 3 показывают, что в полученной липосомальной дисперсии мускуса кабарги 92,6% составляют везикулы с размером 198 ± 46 нм. Это полностью соответствует заданному при производстве опытных партий субстанции параметру, в соответствии с которым не менее 80% частиц конечной липосомальной дисперсии должны иметь размер 200 ± 50 нм.

Известно, что главным препятствием для применения липосом в медицинской практике является их неустойчивость в про-

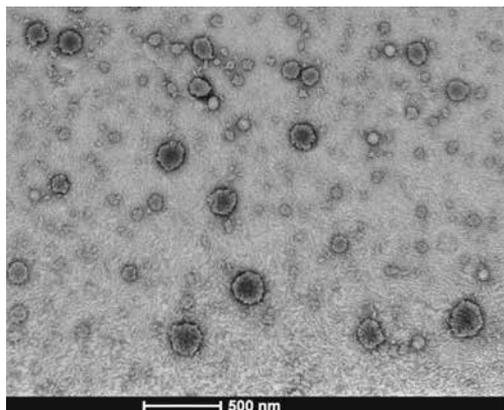


Рис. 2. Микрофотография липосом в конечной 10% липосомальной дисперсии.

Fig. 2. Micrograph of liposomes in the final 10% liposomal dispersion.

цессе производства и хранения. Это явление тесно связано с технологией получения липосом и их компонентным составом. Анализ данных факторов позволил оптимизировать соотношения различных по своей природе БАВ из мускуса кабарги, ФХ и других вспомогательных веществ, которые являются структурными компонентами липосом, а также основные режимы получения субстанции липосом с заданным размером и зарядом.

В ходе выполнения исследований установлено положительное влияние увеличения концентрации ФХ с 10 до 20% при получении липосомальной преддисперсии (рис. 1, ТП 4) с последующим постепенным её снижением до 10% при производстве липосомальной дисперсии (рис. 1, ТП 5) на размер и распределение липосом, а также степень включения в них БАВ.

Этот факт объясняется не только тем, что в два раза увеличилось количество везикул в дисперсии, но и тем, что усилилось взаимодействие ФХ липидного бислоя полученных липосом и холестерина, входящего в состав БАВ из мускуса кабарги.

Взаимодействие холестерина с метильными группами холина и С=О/Р=О группами в ФХ приводит к увеличению прочности

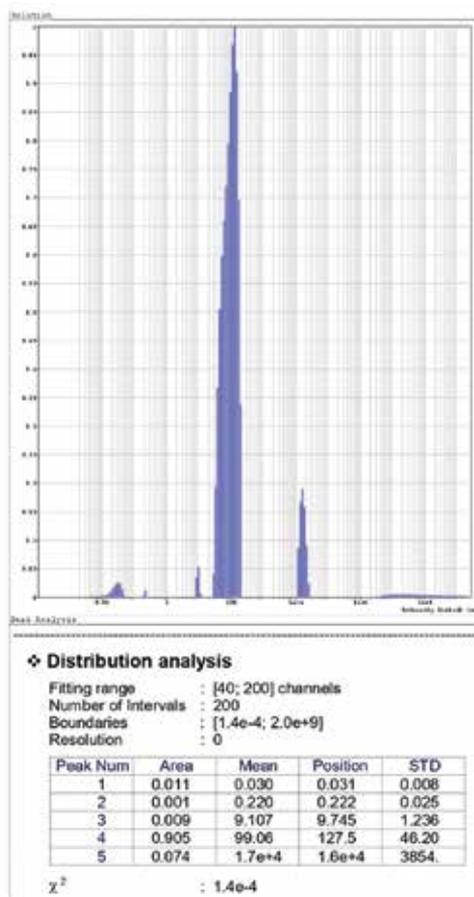


Рис. 3. Среднее интегральное значение размера частиц конечной 10% липосомальной дисперсии мускуса кабарги при давлении 40 МПа.

Fig. 3. Average integral value of the particle size of the final 10% liposomal dispersion of deer musk at a pressure of 40 MPa.

липосом, снижению скорости вытекания из них содержимого и увеличению процента включения БАВ за счёт ослабления связи между ацильными цепями фосфолипидов и повышения температуры их фазового перехода (Т°ф.п.). Известно, что липосомы, не содержащие холестерина, подвержены большей деградации при длительном хранении.

Дополнительным фактором, способствующим увеличению дзета-потенциала — отрицательного заряда липосом (до -50 мВ

и более) — и стабильности, явилась замена дистиллированной воды, используемой в технологическом процессе, на 0,9% р-р хлорида натрия.

После гомогенизации полученную липосомальную дисперсию равномерно разливали в лотки, замораживали в течение не менее 24 ч при температуре $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и проводили лиофилизацию опытных образцов в течение 30 ч, постепенно поднимая температуру продукта от -40 до $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Необходимо отметить, что лиофилизация в неоптимальных режимах и без специальных защитных веществ — криопротекторов — часто приводит к разрушению бислоевой мембраны липосом, их слиянию и агрегации, а также вытеканию включённого водорастворимого ЛВ. Это происходит, когда липидная мембрана достигает $T^{\circ}\text{ф.п.}$, и инкапсулированное ЛВ легко высвобождается из липосом при переходе из гелевой фазы в жидкокристаллическую.

Криопротектор, предотвращая фазовый переход, защищает липосомы от повреждения кристаллами льда при замораживании, а также ингибирует их слияние и агрегацию. Криопротекторы способны обеспечивать протективный эффект благодаря двум механизмам: первый связан с замещением воды, второй — с образованием матрицы.

Из всех изученных криопротекторов наиболее эффективными для лиофилизации липосом являются дисахариды глюкозы — сахароза и трегалоза. Благодаря оптимальной температуре образования матрицы ($T^{\circ}\text{м}$) трегалозы ($-110\text{ }^{\circ}\text{C}$) и сахарозы ($-65\text{ }^{\circ}\text{C}$) они обеспечивают сохранение проницаемости липосомальной мембраны, а также препятствуют вытеканию содержимого везикул при лиофилизации. Для эффективной защиты криопротектор должен находиться и внутри, и снаружи липосом, а концентрации его и включённого вещества должны быть подобраны таким образом, чтобы обеспечить оптимальную осмолярность интра-/экстралипосомального пространства.

Добавление трегалозы в установленных соотношениях в водную фазу липосомальной дисперсии (внутри и снаружи) перед замораживанием с последующей сублимацией (рис. 1, ТП 4.3 и ТП 5.1) позволяет предупредить фазовое разделение липидной композиции и вытекание инкапсулированных БАВ, а также сохранить высокую способность липосом к регидратации. Применение трегалозы приводит к формированию многочисленных гидратных форм, изолирующих воду и обеспечивающих тем самым сохранение высокой $T^{\circ}\text{м}$. Медленное охлаждение (не более $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) в её присутствии способствует более высокому уровню включения БАВ из мускуса кабарги в липосомы и улучшает их последующую регидратацию.

В настоящее время, в результате большого количества исследований [1], рекомендованы следующие режимы сублимации липосомальных лекарственных форм: время сублимации — от 90 до 100 ч; время предварительного замораживания — от 48 до 56 ч (температура замораживания от -50 до $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$); период постоянной скорости в течение 40–50 ч (подъём температуры препарата от -45 до $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$); период падающей скорости в течение 40–50 ч (температура изменяется от -25 до $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Применение общих принципов лиофилизации липосом и проведённые исследования по оптимизации режимов позволили подобрать индивидуальный режим лиофилизации липосом (рис. 1, ТП 5.2), содержащих БАВ из мускуса кабарги, в соответствии с их особенностями. В ходе исследований установлен оптимальный уровень жидкой лиофилизируемой субстанции при загрузке в лотки, который не должен превышать 5 мм.

Определено, что длительность этапа предварительного замораживания должна составлять 20–30 ч, из них выдержка («закаливание») при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ — не менее 18 ч. В начале сублимации до включения нагрева

полок после достижения субстанции температуры -50 ± 2 °С её выдерживают не менее 2 ч при температуре сублиматора ниже -60 °С и давлении (вакууме) в камере менее 10 Па (1 мм рт. ст.).

Важно, что действие криопротектора на этапе первичной сушки проявляется, когда продукт содержит менее 20% воды. Содержание воды влияет и на включение ЛВ, т. к. остаточная вода является причиной снижения температуры образования матрицы (T^m). Известно, что T^m трегалозы составляет $-99,7$ и $-40,3$ °С при остаточном содержании воды менее 0,5 и 6,5% соответственно. Особенностью процесса первичной сушки (сублимации) разработанной субстанции является удаление не менее 80% влаги при постепенном нагреве полок от -40 до -20 °С с шагом 5 °С.

На этапе вторичной сушки (десорбции) температуру повышают до $+25$ °С. После достижения субстанцией температуры $+20$ °С её выдерживают при этой температуре в течение 1 ч, затем при $+25$ °С — 30 мин. При таком режиме лиофилизации размер липосом и включение БАВ мускуса кабар-

ги изменяются незначительно, а остаточная влажность находится на уровне 1–2%. Обязательной является также рекомендация по поддержанию в помещении при выгрузке и последующей расфасовке субстанции в герметичную упаковку температуры $+25$ °С и влажности менее 40%.

Разработанный алгоритм лиофилизации значительно повышает не только качество и стабильность липосом, но и экономическую эффективность производственного процесса в целом. Изученные режимы лиофилизации субстанции липосом (рис. 1, ТП 5.2) сокращают процесс в более чем в два раза по сравнению с рекомендованным в существующей производственной практике.

Основываясь на полученных результатах, в ходе усовершенствования технологии были наработаны три опытных серии субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих БАВ из мускуса кабарги, с использованием ФХ отечественного производства.

На микрофотографиях (рис. 4–6) представлены данные о морфологии и размере частиц трёх восстановленных липосомальных

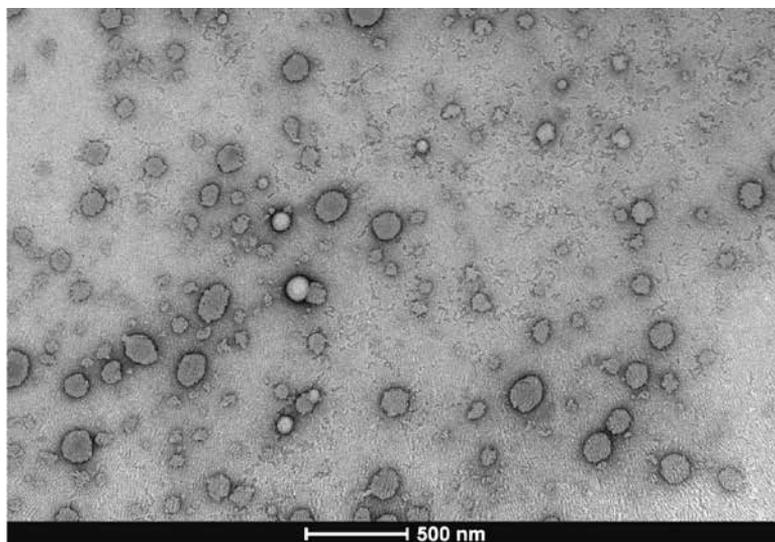


Рис. 4. Микрофотография липосомальной дисперсии, полученной после регидратации субстанции (образец № 1).
Fig. 4. Micrograph of a liposomal dispersion obtained after the substance rehydration (sample No. 1).

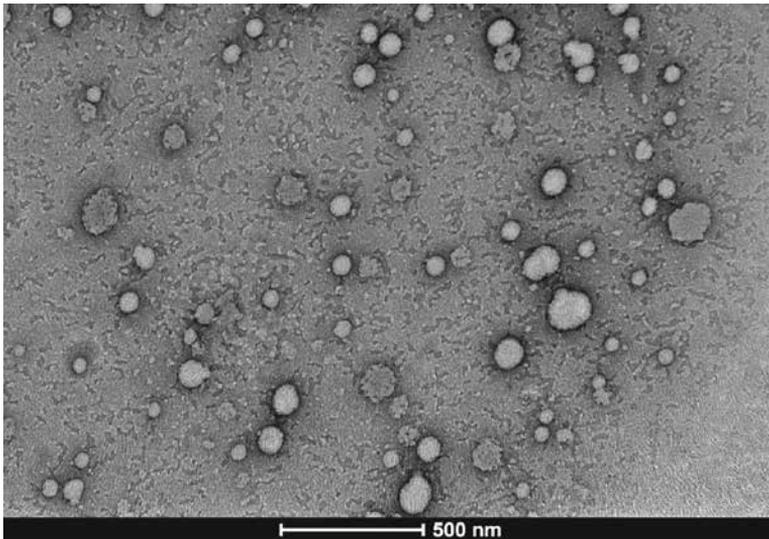


Рис. 5. Микрофотография липосомальной дисперсии, полученной после регидратации субстанции (образец № 2).
Fig. 5. Micrograph of a liposomal dispersion obtained after the substance rehydration (sample No. 2).

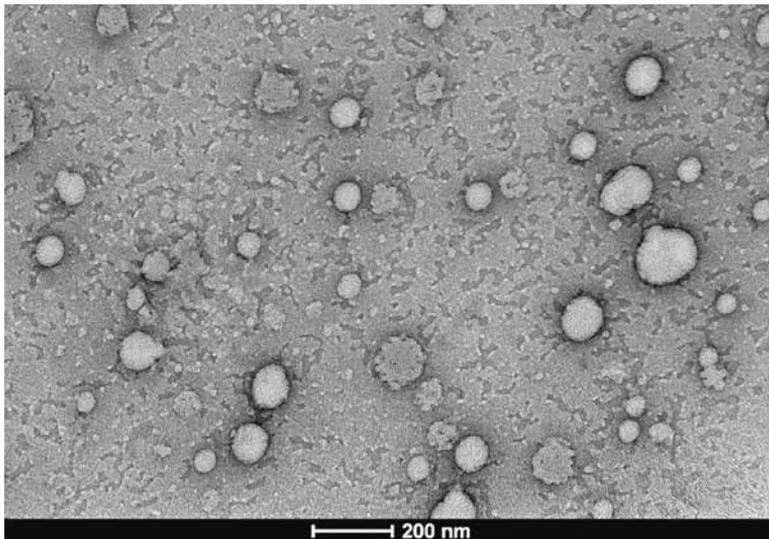


Рис. 6. Микрофотография липосомальной дисперсии, полученной после регидратации субстанции (образец № 3).
Fig. 6. Micrograph of a liposomal dispersion obtained after the substance rehydration (sample No. 3).

образцов мускуса. На них чётко видны отдельные мономеллярные липосомы сферической формы. Липосомы размером от 100 до 250 нм хорошо окрашены гидрофильными (внутренний объём везикул) и гидрофобными (пространство внутри

бислоя везикул, образованного фосфолипидами) компонентами, входящими в состав мускуса кабарги. Важно подчеркнуть, что эти данные хорошо коррелируют с результатами, полученными с помощью анализатора размеров частиц (табл. 1).

Таблица 1. Показатели качества опытных образцов липосомированной субстанции мускуса
Table 1. Quality indicators of the prototypes of liposomal musk substance

Показатели	Норма	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Среднее значение
Средний размер везикул, нм	50–500	206±54	268±60	214±43	229±52
Размер частиц менее 250 нм, %	80	89	92	100	94
Индекс полидисперсности	не более 0,5	0,279	0,199	0,161	0,213
Дзета-потенциал, мВ	-25+–55	-52,7±8,3	-42,0±1,0	-36,3±1,0	-43,7±3,4
Индекс окисленности	не более 0,5	0,31	0,30	0,32	0,31

Электронно-микроскопические изображения свидетельствуют о том, что все образцы разработанной липосомальной субстанции после лиофильной сушки и регидратации сохраняют свою первоначальную тонкую структуру и морфометрические параметры.

Известно, что на стадии разработки и получения липосомальной лекарственной формы особое значение представляет характеристика и оценка устойчивости полученного продукта по трём основным показателям — размеру везикул, индексу полидисперсности и дзета-потенциалу.

Размер липосом применяется как основной показатель качества, определяющий стабильность производимой субстанции и её биодоступность. Проведённые исследования размеров везикул в опытных сериях субстанции после регидратации показали незначительное их увеличение по сравнению с исходной липосомальной дисперсией (до лиофилизации) с 200 до 229 нм, что составляет всего 13%. При этом следует отметить, что почти все 100% липосом находятся в заданном в технологическом процессе диапазоне, а именно 250±100 нм (рис. 7), из них везикулы с гидродинамическим диаметром менее 250 нм составляют 94%.

При совершенствовании технологии получения липосом были проведены исследования распределения частиц по их параметрам, а именно диапазон распределения частиц по размерам, который характеризуют по индексу полидисперсности (polydispersity index, PDI). В полученных опытных образцах данный показатель качества зна-

чительно ниже значения PDI для монодисперсных систем, равного 0,5, и составляет в среднем 0,213, что свидетельствует об их высокой гомогенности (табл. 1).

В процессе исследований большое внимание уделялось также дзета-потенциалу, который является важнейшим индикатором поверхностного заряда липосом и мерой их электростатического взаимодействия (отталкивания или притяжения). Липосомы с высоким отрицательным или положительным дзета-потенциалом отталкиваются друг от друга и остаются монодисперсными и стабильными.

Описанные выше дополнительные технологические приёмы позволили оптимизировать этот показатель, который составил в среднем -43,7 мВ (табл. 1). Такое значение дзета-потенциала обеспечивает не только получение стабильной липосомальной субстанции в исходном состоянии, но и высокие показатели качества после её регидратации.

Средний индекс окисленности опытных образцов составил 0,31, что также существенно лучше нормируемого показателя (не более 0,5).

Изучение других параметров, характеризующих качество липосомальной субстанции (подлинность, процент включения БАВ, количественное определение), было проведено в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и показало, что все опытные образцы соответствуют необходимым требованиям.

Следует подчеркнуть, что показатели микробиологической чистоты, в т. ч. общая обсеменённость (КМАФАнМ), которая со-

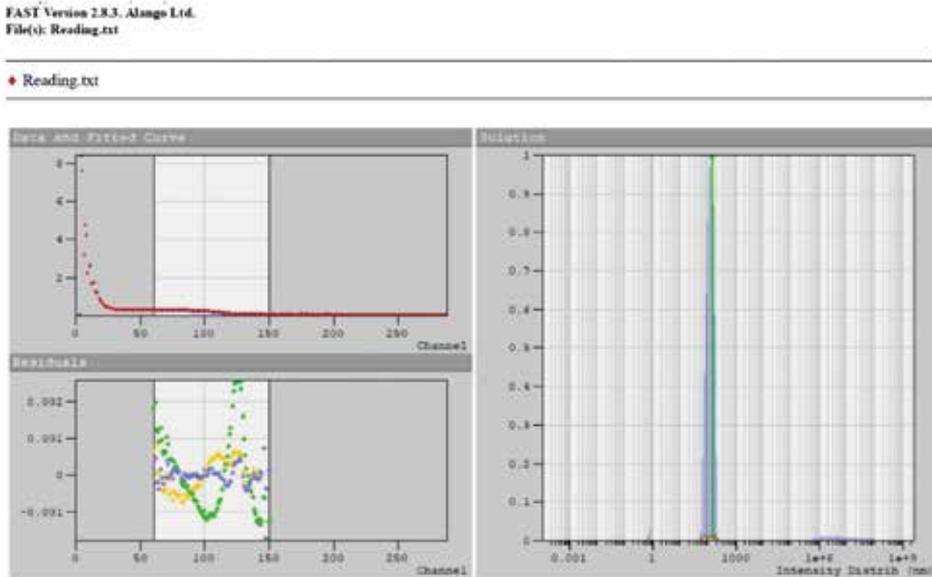


Рис. 7. Пример изученных физических показателей везикул (образец № 3, серия 180522) восстановленной липосомальной дисперсии мускуса кабарги.

Fig. 7. An example of the studied physical parameters of vesicles (sample No. 3, series 180522) of the restored liposomal dispersion of deer musk.

гласно ГФ РФ ОФС 1.2.4.0002.15 (категория 3.2) для этой группы препаратов должна быть не более 1000 КОЕ/г, во всех опытных образцах практически равны нулю.

Полученные результаты позволили уточнить показатели качества и безопасности для разработанной субстанции (табл. 2).

Выводы

1. В ходе совершенствования опытно-промышленной технологии производства липосомированной субстанции БАВ из мускуса кабарги установлены режимы, обеспечивающие получение липосом с заданными параметрами дисперсности (форма, гидродинамический диаметр, заряд, индекс полидисперсности и т. д.), а также максимальное

включение БАВ в липосомы с сохранением их исходной биологической активности.

2. Определены важнейшие контрольные точки производства, обеспечивающие соблюдение установленного технологического режима в соответствии с правилами GMP, а также основные параметры и требования при загрузке сырья, вспомогательных компонентов и отдельных технологических операций.

3. Усовершенствованные режимы в два раза сокращают процесс лиофилизации субстанции липосом по сравнению с рекомендованным в существующей практике и весь процесс производства субстанции в целом с выходом конечного продукта более 90%.

Таблица 2. Проект спецификации на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги

Table 2. Draft specification for a liposomal substance (powder) containing a complex of biologically active substances isolated from deer musk

Показатель	Метод	Норма
Описание	Органолептический ГФ XIII, ОФС 1.1.0006.15, ч. 1	Лиофилизированный аморфный порошок светло-коричневого цвета с характерным запахом и вкусом мускуса
Растворимость	ГФ РФ XIII, ОФС 1.2.1.0005.15, ч. 1, с. 531	Мало растворим в воде, мало растворим в 96% спирте, практически не растворим в гексане
Подлинность: - присутствие липосом; - наличие БАВ мускуса	Электронная микроскопия (метод негативного контрастирования) ГХ-МС (ГХ-ПИД) ВЭЖХ-УФ	Моноламеллярные липосомы сферической формы Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца липосом мускуса кабарги Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца липосом мускуса кабарги
Размер частиц	ГФ XII, ч. 2 Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	50–500 нм
Индекс полидисперсности	Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	Не более 0,5
Дзета-потенциал	Динамическое светорассеяние	–25±–60 мВ
Степень включения БАВ мускуса	Гель – хроматография ВЭЖХ-МС	Не менее 50% Не менее 50%
Индекс окисленности	Спектрофотометрия	Не более 0,5
pH	ГФ РФ, ОФС 1.1.0006.15 (потенциометрический метод)	От 6,0 до 8,0 (1% раствор)
Вода	ГФ РФ, ОФС 1.2.3.0002.15	Не более 5,0%
Общий белок (растворимая фракция)	ГФ РФ, ОФС 1.2.3.0012.15 Метод Бредфорд (колориметрический)	Не более 4,0%
Сульфатная зола	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0014.15	Не более 10,0%
Тяжёлые металлы	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0012.15	Не более 0,002%
Остаточные органические растворители	ГХ РФ	Этанола — не более 0,5%, изопропилового спирта — не более 0,5%
Микробиологическая чистота	ГФ РФ, ОФС 1.2.4.0002.15	Категория 3.2
Количественное определение	ВЭЖХ	Не менее 90,0% и не более 110,0% в пересчёте на безводное вещество
Хранение	В сухом защищённом от света месте при температуре не выше 20 °С	
Срок годности	Устанавливается	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Аршинова О.Ю., Санарова Е.В., Ланцова А.В., Оборотова Н.А. Особенности лиофилизации липосомальных лекарственных препаратов (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2012;46(4):29–34. [Arshinova O.Yu., Sanarova Ye.V., Lantsova A.V., Oborotova N.A. Osobennosti liofilizatsii liposomal'nykh lekarstvennykh preparatov (obzor) [Features of lyophilization of liposomal drugs (review)]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal [Chemical-Pharmaceutical Journal]*. 2012;46(4):29–34. (In Russian)].
2. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л. Протеомный анализ в идентификации белковых компонентов препуциальной железы кабарги сибирской. *Биомедицина*. 2019;15(1):35–47. [Karkishchenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L. Proteomnyy analiz v identifikatsii belkovykh komponentov preputsal'noy zhelezy kabargi sibirskoy [Proteomic analysis in the identification of active components in the preputial gland secretion of the Siberian musk deer]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(1):35–47. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-35-47.
3. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов в условиях GMP. *Биофармацевтический журнал*. 2009;1(3):18–29. [Krasnopol'skiy Yu.M., Stepanov A.Ye., Shvets V.I. Tekhnologicheskiye aspekty polucheniya liposomal'nykh preparatov v usloviyakh GMP [Technological aspects of obtaining liposomal preparations under GMP conditions]. *Biofarmatsevticheskii zhurnal [Russian Journal of Biopharmaceuticals]*. 2009;1(3):18–29. (In Russian)].
4. Люблинский С.Л., Люблинская И.Н., Колоскова Е.Н., Азизов А.М., Каркищенко В.Н., Нестеров М.С., Капцов А.В., Агельдинов Р.А., Герасимов В.Н., Гриненко Д.В. Технологические аспекты получения субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги. *Биомедицина*. 2021;17(4):18–37. [Lyublinskiy S.L., Lyublinskaya I.N., Koloskova E.N., Azizov A.M., Karkishchenko V.N., Nesterov M.S., Kaptsov A.V., Agel'dinov R.A., Gerasimov V.N., Grinenko D.V. Tekhnologicheskiye aspekty polucheniya substantsii stabilizirovannykh v lipidakh ustoychivyykh nanochastits, soderzhashchikh kompleks biologicheskii aktivnykh veshchestv, vydelennykh iz muskusa kabargi [Technological aspects of obtaining liposomes containing of a complex of biologically active substances isolated from deer musk]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(4):18–37. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-17-4-18-37.
5. ТУ 01.49.24-001-58709973-2017. Биологически активная добавка к пище «Концентрат мускуса кабарги». [ТУ 01.49.24-001-58709973-2017. Biologicheskii aktivnaya dobavka k pishche «Kontsentrat muskusa kabargi» [Biologically active food supplement “Musk deer concentrate”]. (In Russian)].
6. ТУ 10.89.19-001-43217402-2020. Фосфатидилхолин эссенциальный. [ТУ 10.89.19-001-43217402-2020. Fosfatidilkholin essentsial'nyy [Phosphatidylcholine essential]. (In Russian)].
7. Швец В.И., Краснопольский Ю.М., Сорокумова Г.М. Липосомальные формы лекарственных препаратов: технологические особенности получения и применение в клинике. М.: Ремедиум; 2016:197. [Shvets V.I., Krasnopol'skiy Yu.M. Soroko-umova G.M. Liposomal'nyye formy lekarstvennykh preparatov: tekhnologicheskiye osobennosti polucheniya i primeneniye v klinike [Liposomal forms of medicinal preparations: technological features of production and clinical application]. Moscow: Remedium Publ.; 2016:197. (In Russian)].
8. Шестаков Н.В., Лосенкова С.О., Закалюкина Е.В., Степанова Э.Ф. Ассортимент и характеристики трансмукозальных лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):96–101. [Shestakov N.V., Losenkova S.O., Zakalyukina E.V., Stepanova E.F. Assortiment i kharakteristiki transmukozal'nykh lekarstvennykh form [Range and characteristics of transmucosal dosage forms]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv [Drug development & registration]*. 2017;(2):96–101. (In Russian)].
9. Kaptsov V.V. Production PPC Bbmicron emulsions and liposomes with high pressure homogenizer «Donor-1». *Art. Cells Blood Subs. Immob. Biotech*. 1994;22(5):A110.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Люблинский Станислав Львович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Люблинская Ирина Николаевна*, ООО «Научно-производственная фирма “МОБИТЕК-М”»;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Stanislav L. Lyublinskiy, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Irina N. Lyublinskaya*, Scientific-Production Firm “MOBITEK-M”;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н.,
ООО «Научно-производственная фирма
“МОБИТЕК-М”»;
[e-mail: heleko3@yandex.ru](mailto:heleko3@yandex.ru)

Керемецкая Лариса Фёдоровна, ООО «Научно-
производственная фирма “МОБИТЕК-М”»;
[e-mail: mobitek-m@mail.ru](mailto:mobitek-m@mail.ru)

Азизов Ариф Мурсалн Оглы, ООО «Научно-
производственная фирма “МОБИТЕК-М”»;
[e-mail: ximreaktiv@gmail.com](mailto:ximreaktiv@gmail.com)

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н.,
проф., ФГБУН «Научный центр биомедицин-
ских технологий ФМБА России»;
[e-mail: scbmt@yandex.ru](mailto:scbmt@yandex.ru)

Нестеров Максим Сергеевич, ФГБУН «Науч-
ный центр биомедицинских технологий ФМБА
России»;
[e-mail: mdulya@gmail.com](mailto:mdulya@gmail.com)

Капцов Александр Владимирович, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
[e-mail: a_v_kaptsov@mail.ru](mailto:a_v_kaptsov@mail.ru)

Шарабанов Андрей Вячеславович, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
[e-mail: shav@scbmt.ru](mailto:shav@scbmt.ru)

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН
«На-учный центр биомедицинских техноло-
гий ФМБА России»; ФГБОУ ВО «Российский
химико-технологический университет имени
Д.И. Менделеева»;
[e-mail: ageldinov@gmail.com](mailto:ageldinov@gmail.com)

Герасимов Владимир Николаевич, д.б.н.,
ФБун «Государственный научный центр при-
кладной микробиологии и биотехнологии»;
[e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org](mailto:ilcvngerasimov@obolensk.org)

Elena M. Koloskova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific-
Production Firm “MOBITEK-M”;
[e-mail: heleko3@yandex.ru](mailto:heleko3@yandex.ru)

Larisa F. Keremetskaya, Scientific-Production
Firm “MOBITEK-M”;
[e-mail: mobitek-m@mail.ru](mailto:mobitek-m@mail.ru)

Arif M. Azizov, Scientific-Production Firm
“MOBITEK-M”;
[e-mail: ximreaktiv@gmail.com](mailto:ximreaktiv@gmail.com)

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.),
Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia;
[e-mail: scbmt@yandex.ru](mailto:scbmt@yandex.ru)

Maksim S. Nesterov, Scientific Center of Bio-
medical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
[e-mail: mdulya@gmail.com](mailto:mdulya@gmail.com)

Alexander V. Kaptsov, Scientific Center of Bio-
medical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
[e-mail: a_v_kaptsov@mail.ru](mailto:a_v_kaptsov@mail.ru)

Andrey V. Sharabanov, Scientific Center of Bio-
medical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
[e-mail: shav@scbmt.ru](mailto:shav@scbmt.ru)

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center of Bio-
medical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia; D.I. Mendeleev
Russian Chemical Technology University;
[e-mail: ageldinov@gmail.com](mailto:ageldinov@gmail.com)

Vladimir N. Gerasimov, Dr. Sci. (Biol.), State
Research Center for Applied Microbiology and Bio-
technology;
[e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org](mailto:ilcvngerasimov@obolensk.org)

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author