

На правах рукописи

**Широнин Александр Владимирович**

**ФОСФОЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В КАЧЕСТВЕ  
ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИНДОМЕТАЦИНА.**

03.01.04 – БИОХИМИЯ

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук  
Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени  
В.Н.Ореховича РАМН

Научный руководитель            Доктор биологических наук  
**Ипатова Ольга Михайловна**

Официальные оппоненты        Академик РАМН, доктор биологических  
наук, профессор  
**Егоров Алексей Михайлович**

Доктор биологических наук, профессор  
**Соколов Николай Николаевич**

Ведущая организация            Учреждение Российской академии  
медицинских наук Научно-  
исследовательский институт питания  
РАМН

Защита диссертации состоится «25» ноября 2010 г. в 12 часов 30 минут в  
Конференц-зале на заседании диссертационного совета Д 001.010.01  
при ИБМХ РАМН по адресу: 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, корп.  
1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ РАМН по адресу:  
119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, корп. 1.

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» октября 2010 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
Д 001.010.01, к.х.н.

Карпова Е.А.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность работы.** Нанотехнологии обладают большим потенциалом и приведут в ближайшее время к крупным переменам во многих отраслях промышленности, к созданию новых материалов, изделий и продуктов. Сегодня наиболее существенное применение нанотехнологий в медицине связано с развитием фарминдустрии, что можно объяснить уникальными свойствами появившихся новых наноматериалов и наночастиц. Такое применение нанотехнологий способствовало развитию в последние годы новых стратегий в фармацевтике, направленных, прежде всего, на создание систем, способствующих повышению биодоступности, терапевтической эффективности лекарств, снижению/устранению их побочных проявлений. Среди этих стратегий важное место занимают системы транспорта лекарств к органам, тканям, клеткам-мишеням.

Снабжение лекарственных соединений системами транспорта устраняет многие недостатки разрабатываемых и уже существующих препаратов – низкую растворимость в воде, быструю сорбцию или метаболизм в организме, трудность перехода через естественные барьеры (мембраны клеток, гематоэнцефалический барьер и др.), побочные эффекты. Интенсивное развитие на основе нанотехнологий систем доставки приведет не только к продлению «жизненного цикла» известных лекарственных средств на международном фармацевтическом рынке, но и появлению препаратов с улучшенными фармакологическими и фармакокинетическими свойствами. Разработка лекарств, снабженных системами транспорта, не требует больших капиталовложений, а достигаемые эффекты весьма значительны для здравоохранения и экономики. В РФ производства лекарств, снабженных наносистемами транспорта еще нет, что обуславливает актуальность проведения собственных, отечественных разработок. Это особенно важно для лекарств, применение которых в свободных формах ограничено их выраженной токсичностью, в частности, для нестероидных противовоспалительных препаратов, среди которых одним из наиболее распространённым является индометацин.

Многие исследователи занимаются разработкой различных оптимизированных лекарственных форм индометацина (Schlansky B. et al., 2009, Lichtenberger L. et al., 2009, и др.). Определенные успехи были достигнуты в разработке пролонгированной пероральной формы индометацина. Однако все имеющиеся в настоящее время на фармацевтическом рынке лекарственные формы индометацина отличаются плохой растворимостью, относительно низкой эффективностью действия и ярко выраженными побочными эффектами (Rainsford K., 2007).

Одним из способов повышения биодоступности, терапевтической эффективности лекарственных препаратов и уменьшения их токсичности является снабжение их наносистемами транспорта на основе фосфолипидов, так как такие системы биodeградируемы, не вызывают аллергических реакций, поверхность наночастиц на их основе легко модифицируется для придания адресности, устойчивости и других свойств. Включение лекарственной субстанции в состав фосфолипидных наночастиц защищает лекарство от преждевременной деградации в кровотоке, снижает его клиренс, что создает возможность использования его в более низких дозах.

Первыми фосфолипидными транспортными системами были липосомы (Fendler J.H., 1977). Лекарства, снабженные такой системой транспорта, первыми появились и на фармацевтическом рынке. Необходимо отметить, что основными недостатками липосомальных транспортных систем являются (1) быстрая деградация в кровяном русле и (2) относительно крупный размер частиц (200-400 нм), что делает их доступными для лизиса ретикулоэндотелиальной системой клетки, в итоге существенно снижается эффективность транспортируемого лекарственного препарата. Одним из подходов, в преодолении этих недостатков является существенное уменьшение размера фосфолипидных наночастиц. Исследования показали что, чем меньше размер фосфолипидных наночастиц, тем более выражен их оптимизирующий эффект на фармакокинетику лекарства и эффективность его проникновения в орган-мишень (Drummond, 1998; Mankertz, 1997; Lanao, 2007; Ипатова, 2009).

В отделе нанолечарств ИБМХ РАМН была разработана технология получения фосфолипидных наночастиц, размером до 30 нм. в лиофилизированном виде. Композиция не содержит других компонентов (стабилизаторов, эмульгаторов, консервантов и т.д.), стабильна при длительном хранении. Было показано, что разработанная композиция может быть использована как наносистема для транспорта различных лекарственных соединений в организме. Минимальный размер фосфолипидных частиц придает наносистеме уникальные свойства, способствующие повышению терапевтической эффективности встроенных в них лекарств, повышению биодоступности, снижению их побочного действия (Заявка на изобретение № 2009104785 РФ). В продолжении этих исследований в представленной диссертационной работе на примере индометацина изучается возможность разработки новых, оригинальных готовых лекарственных форм – нанолечарств – для перорального и инъекционного введения.

Представленная работа выполнена в соответствии с заданием Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы»: ГК № 02.522.11.2011 «Разработка

фосфолипидной транспортной системы и технологии включения в ее состав лекарственных субстанций».

**Цель работы:** на основе фосфолипидных наночастиц, как системы транспорта, получить новую лекарственную композицию индометацина и изучить возможность использования ее для получения готовых лекарственных форм, обладающих высокой биодоступностью и терапевтической эффективностью.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить композицию индометацина на основе фосфолипидной транспортной наносистемы в лиофилизированном виде.
2. Изучить влияние лиофильного высушивания на физико-химические свойства фосфолипидных наночастиц и оптимизировать данный этап технологического процесса.
3. Изучить при пероральном введении композиции влияние встраивания индометацина в фосфолипидные наночастицы на изменение его биодоступности, эффективности действия и токсичности.
4. Изучить при инъекционном введении композиции влияние встраивания индометацина в фосфолипидные наночастицы на его связывание с компонентами крови, специфическую активность и токсичность.
5. Изучить возможность использования вместо процесса лиофилизации сушку в псевдооживленном слое для получения пероральной формы индометацина, снабженного фосфолипидной транспортной наносистемой.

**Научная новизна.** Впервые получен индометацин встроенный в фосфолипидные наночастицы как систему транспорта. Впервые показано, что композиция под условным названием Индолип может быть использована для получения пероральной и инъекционной лекарственных форм (нанолекарств). Впервые разработан режим лиофилизации фосфолипидной транспортной наносистемы и лекарств на её основе.

Впервые показано, что включение индометацина в фосфолипидную транспортную наносистему существенно повышает его биодоступность и терапевтическую эффективность, что может позволить снизить (в 2 раза) терапевтическую дозу препарата. Показано, что фосфолипидные наночастицы размером до 30 нм осуществляют неселективный транспорт индометацина в организме и оказывают влияние на его фармакокинетику.

Впервые разработан способ высушивания фосфолипидной транспортной наносистемы и лекарственных препаратов на ее основе в псевдооживленном слое при низкотемпературном режиме. Этим способом была получена микрокапсулированная лекарственная форма Индолипа. Показано, что покрытие микросфер кишечнорастворимой пленкой приводит к повышению биодоступности и предохраняет наночастицы от воздействия агрессивной среды желудка.

**Практическая значимость.** Способ получения Индолипа оптимизирован и масштабирован. Подана заявка на изобретение № 2009139992 от 30.10.2009 «Фармацевтическая композиция для лечения ревматических и воспалительных заболеваний на основе индометацина, включенного в фосфолипидные наночастицы». Проведены доклинические исследования при пероральном и инъекционном способах введения Индолипа. Доказана возможность получения готовых пероральной и инъекционной лекарственных форм, подготовлены документы для получения разрешения на проведение клинических исследований.

Как показали проведенные исследования, фосфолипидные наночастицы предельно малого размера (до 30 нм) способны служить переносчиками для трудно растворимых лекарств, обладающих выраженными побочными эффектами. Встраивание лекарственных субстанций известного спектра действия в наночастицы направлено на получение новых форм лекарственных препаратов с высокой эффективностью, биодоступностью и сниженными побочными действиями.

**Апробация.** Основные положения диссертационной работы были доложены на IV международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии (Москва, Россия, 2008); V Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2009); II Международном конкурсе научных работ молодых ученых в области нанотехнологий в рамках II Международного форума по нанотехнологиям (Москва, Россия, 2009); The 5th International Conference “Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnologies for Medicine” (St. Petersburg, Russia, 2010), Международной конференции с элементами научной школы для молодежи «Инновационные материалы и технологии в химической и фармацевтической отраслях промышленности» в рамках X юбилейного Московского международного салона инноваций и инвестиций (Москва, Россия, 2010), European Congress for Drug Discovery (MipTec)(Basel, Switzerland, 2010), The 17th International Drying Symposium(Magdeburg, Germany, 2010).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 1 статья - в научном журнале, определенном ВАК, 1 патент РФ, 1 заявка на изобретение, 7 публикации - в сборниках докладов научных конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, списка используемых сокращений, 3 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы из 136 наименований. Работа изложена на 118 страницах печатного текста, содержит 19 таблиц и 36 рисунков.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Основные материалы** - соевый фосфолипид Lipoid S100 (Липоид ГмбХ, Германия) с содержанием фосфатидилхолина 78-95 %, моногидрат мальтозы (MERCK, Германия), субстанция индометацина (Хузхоу Синтетик Фармацевтикал Фэктори, Китай), полимер ойдрагит (Eudragit) L 100.

**Получение эмульсии фосфолипидных наночастиц.** Грубую водную эмульсию соевого фосфолипида (50 мг/мл) с индометацином (2.5 мг/мл) в 20 % растворе мальтозы пропускали через гомогенизатор высокого давления (Mini-Lab 7.30 VH, Rannie или APV 2000 (Дания), или микрофлюидайзер (M110EN30K, Microfluidics, США) при 1000 атм и T=45-55°C. Процесс гомогенизации (5-9 циклов) или микрофлюидизации (4-7 циклов) повторяли до достижения 60% светопропускания при 660 нм, затем эмульсию фильтровали через мембрану «Millipore» типа Dugapore 0.22,

**Лиофильное высушивание образцов.** До лиофилизации эмульсию разливали либо по 10 мл в 20-ти мл флаконы, либо в поддоны. Лиофилизацию образцов проводили на (1) лабораторной установке Virtis Advantage XL (США) и (2) опытно-промышленной установке «ЛФС – 09» производства НПО «Энергетические системы и приводы машин».

**Характеристика тепловых параметров образцов.** Измерения температуры стеклования, криогидратной температуры (температура полного замерзания раствора), температуры фазового перехода «гель-жидкий кристалл» проводили с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии на установке Netzsch DSC 204 F1 Phoenix

**Определение размеров наночастиц** проводили с помощью фотонного корреляционного спектрометра Beckman N5 фирмы Beckman Coulter

**Получение микрокапсул Индолипа,** покрытых рН-чувствительным кишечнорастворимым полимером, проводили в псевдооживленном слое на установке Oustar Nuttlin Mucrolab, путём последовательного нанесения на микросферы мальтозы слоев индометацина, снабженного фосфолипидной транспортной системой, и далее дисперсии ойдрагита Eudragit L100.

**Сравнительное изучение биодоступности индометацина в препаратах.** Крысам-самцам породы Vistar вводили перорально по 1 мл эмульсии «Индолипа» или суспензии индометацина в 4% растворе мальтозе. Отбирали кровь из хвостовой вены, с последующей обработкой метанолом.

**Масс-спектрометрическое определение уровня индометацина** проводили с применением высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1100, соединенного с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Agilent G1956B (Agilent Technologies, США), функционирующим в системе электрораспыления (Electrospray, API-ES<sup>+</sup>). (А.Т.Лебедев, 2003). Использовали калибровочные кривые зависимости соотношений площадей пиков

индометацина и внутреннего стандарта (диклофенака) от отношений их концентрации. Результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения ChemStation B.03.01.

**Противовоспалительную активность** препарата Индолип определяли в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (ред. Р.У. Хабриев, М.: 2005). При пероральном введении активность оценивали на модели конконовалинового отека у мышей и адьювантного артрита у крыс. Активность при инъекционном введении изучали у крыс на модели каррагенинового отёка.

Влияние на **реакцию воспаления на конконовалин А** (Кон А) оценивали на мышцах-самцах линии СВА. Препараты вводили *per os* в дозах 0,1; 0,5; 1 и 2 мг/кг в 1% растворе крахмала. Острое воспаление вызывали введением раствора Кон А в подушечку задней стопы. На основе данных о массе воспаленной и невоспаленной стоп рассчитывали индекс реакции воспаления.

Для модели **адьювантного артрита** у крыс использовали две схемы:

1) Хроническое иммунное воспаление моделировали введением адьюванта Фрейнда в подушечку стопы правой задней лапы белых беспородных крыс. Лечение начинали через 14 дней после индукции воспаления, вводя препараты внутривентриально по 0,7 или 1,2 мг/кг ежедневно в течение 12 дней. Определяли лейкоцитарную формулу крови, скорость оседания эритроцитов и толщину лап как показатель воспаления.

2) У крыс-самцов линии Vistar вызывали хроническое воспаление введением адьюванта Фрейнда в подушечку стопы правой задней лапы. Профилактическое лечение начинали за 2 дня до индукции воспаления, вводя препараты внутривентриально по 0,75; 1,5 или 2,5 мг/кг ежедневно в течение 14 дней. Оценивали первичную воспалительную реакцию (отек) по толщине лапы.

В экспериментах **на модели каррагенинового отёка** острую воспалительную реакцию вызывали введением раствора каррагенина в подушечку задней стопы крыс. За час перед этим внутривентриально вводили препараты индометацина в дозах 1; 2,5 и 6 мг/кг. Выраженность воспалительной реакции оценивали онкометрически через 3 и 24 часа по изменению объема лапы.

**Токсичность препарата Индолип.** Изучали «острую», «субхроническую» и «хроническую» токсичности в экспериментах на двух видах животных (нелинейные мыши и крысы). Проводили визуальное наблюдение, оценку физиологических функций, гематологические и биохимические исследования (определение в плазме крови активности аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз, щелочной фосфатазы, холестерина, количества сахара, содержания альбумина и мочевины), патоморфологические исследования (визуальный осмотр внутренних органов), гистологические исследования. Полученные данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента.



**Распределение индометацина по компонентам плазмы** оценивали после инкубации плазмы с «Индолипом», и ее фракционированием в градиенте плотности NaBr центрифугированием на ультрацентрифуге Optima L90K Beckman (В.Н.Тёртов, 1997). Концентрацию индометацина во фракциях определяли методом ВЭЖХ.

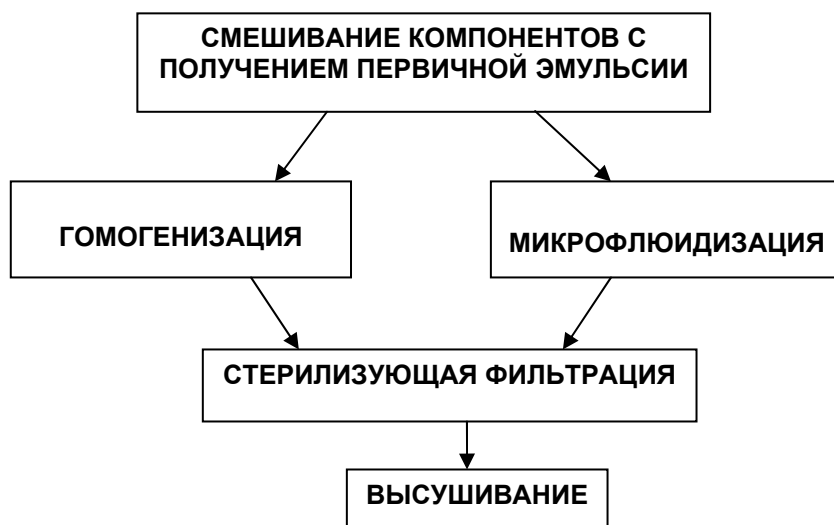
## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Получение новой лекарственной композиции индометацина, на основе фосфолипидных наночастиц, как системы транспорта, представляет собой комплексную задачу, для решения которой на первом этапе необходимо подобрать и оптимизировать методы включения индометацина в наночастицы, а также разработать режим лиофилизации фосфолипидной транспортной наносистемы без/с включением индометацина

### **1. Оптимизация процесса получения лекарственной композиции на основе индометацина и фосфолипидных наночастиц**

#### **1.1. Встраивание индометацина в фосфолипидные наночастицы**

Получение фосфолипидных наночастиц предельно малого размера, согласно разработанной в ИБМХ РАМН технологии (Заявка на изобретение № 2009104785 РФ) включает стадии первичной гомогенизации, гомогенизации высокого давления, стерилизующей фильтрации и высушивания (рисунок 1). Было показано, что процент включения лекарственных субстанций в фосфолипидную транспортную наносистему существенно зависит от их химического строения, а технология требует оптимизации для каждого конкретного лекарства. Поэтому при выполнении работы на первом этапе нами был изучен и оптимизирован процесс встраивания индометацина в фосфолипидную транспортную наносистему.



*Рисунок 1. Схема получения фосфолипидной транспортной наносистемы.*

Были испытаны две методики встраивания лекарственных соединений в ФТС: стандартная и «пленочная». Стандартная методика встраивания заключается в прибавлении навески лекарственной субстанции к грубой эмульсии фосфолипида в воде. Было установлено, что встраивание индометацина данным методом при соотношении фосфолипид/индометацин в пределах (7-13)/1 не превышало 80%.

Экспериментально было показано, что наибольшее встраивание индометацина происходит при использовании, так называемого, «пленочного» метода. Для чего смешивали спиртовые растворы индометацина и фосфатидилхолина. Спирт упаривали на роторном испарителе, а из образующейся «пленки» при добавлении водного раствора мальтозы получали грубую фосфолипидную эмульсию. В дальнейшем, используя метод гомогенизации на микрофлюидайзере получали ультрадисперсную фосфолипидную наноэмульсию с размером частиц (45±5) нм и соотношением индометацин / фосфатидилхолин - 1/8,9. При этом весь индометацин (100 %) «встраивался» в фосфолипидные наночастицы, образуя прозрачную фосфолипидную наноэмульсию со светопропусканием при 660 нм не менее 60%.

Таким образом, оптимальным для встраивания индометацина является «пленочный» метод, при котором возможно включить в фосфолипидные наночастицы максимальное количество индометацина (приблизительно 55 мг на 500 мг фосфатидилхолина). Композиция индометацина, включенного в фосфолипидные наночастицы, получила условное название Индолип.

**1.2. Оптимизация условий лиофильного высушивания.** Особое внимание было уделено лиофильному высушиванию как процессу, во многом определяющему стабильность и хранение лекарств, снабженных фосфолипидной наносистемой транспорта (нанолекарств). Основным параметром лиофильно высушенных препаратов после регидратации является размер фосфолипидных наночастиц. Однако очень важное значение имеет сохранение фармакологической активности лиофилизированных препаратов. Совпадение этих параметров с аналогичными в свежеприготовленной наноэмульсии свидетельствует о качестве процесса лиофилизации.

При изучении процесса лиофильного высушивания фосфолипидной наноэмульсии особое значение придается изменениям жесткости и текучести фосфолипидного слоя в зависимости от температуры, а также возможности «утечки» встроеного в наночастицы лекарственного соединения (Дудниченко, 2001). Все вышеперечисленное делает процесс лиофильного высушивания сложным и деликатным.

При выполнении работы в качестве базового был выбран режим, который применяли ранее на опытно-промышленном производстве Института в

технологии получения инъекционной формы препарата «Фосфоглив» (О.М.Ипатова, 2005).

В первую очередь, была разработана методика оптимизации процесса лиофильного высушивания (Широнин А.В., 2008; Широнин А.В., 2009). Для ее использования определяли точки эвтектики продуктов и изучали зависимости их (продуктов) качества от скорости сублимации. Точка эвтектики для препарата «Фосфоглив» была определена нами методами дифференциальной сканирующей калориметрии и анализа зависимости электрического сопротивления от температуры и составила  $-21,5^{\circ}\text{C}$ .

Учет полученных данных позволил сократить продолжительность процесса вакуумной сублимационной сушки при производстве инъекционной формы препарата Фосфоглив с 92 до 62 часов при полном сохранении всех свойств препарата.

В дальнейшем, используя этот подход были установлены оптимальные параметры лиофилизации препарата Индолип:

- заморозка препарата ниже температуры  $-25^{\circ}\text{C}$ ,
- выдерживание более 2 часов,
- проведение стадии лиофилизации при температуре препарата  $-25^{\circ}\text{C}$  и температуре полки  $20^{\circ}\text{C}$  для пилотной установки и  $-5^{\circ}\text{C}$  для опытно-промышленной,
- досушка препарата при температуре полки  $40 - 45^{\circ}\text{C}$ .

Этот подход был использован для оптимизации процесса лиофилизации других лекарственных композиций, полученных на основе фосфолипидных наночастиц (с доксорубицином, преднизолоном, хлорином Е6 и т.д.).

В целом, отработанные метод встраивания и режим лиофилизации позволили получить устойчивую фосфолипидную композицию индометацина (Индолип), с размером частиц не выше 50 нм, сохраняющую свои физико-химические свойства при хранении. Лиофилизированный препарат в виде пористой массы («таблетки») в 20-мл флаконах, содержащих 50 мг индометацина, 500 мг фосфатидилхолина и 1950 мг мальтозы, представлял собой лекарственную композицию Индолипа для инъекционного введения. А лиофилизированный порошок того же состава в пакетиках саше представлял собой лекарственную композицию Индолипа для перорального введения (в перспективе, инъекционная и пероральная готовые лекарственные формы).

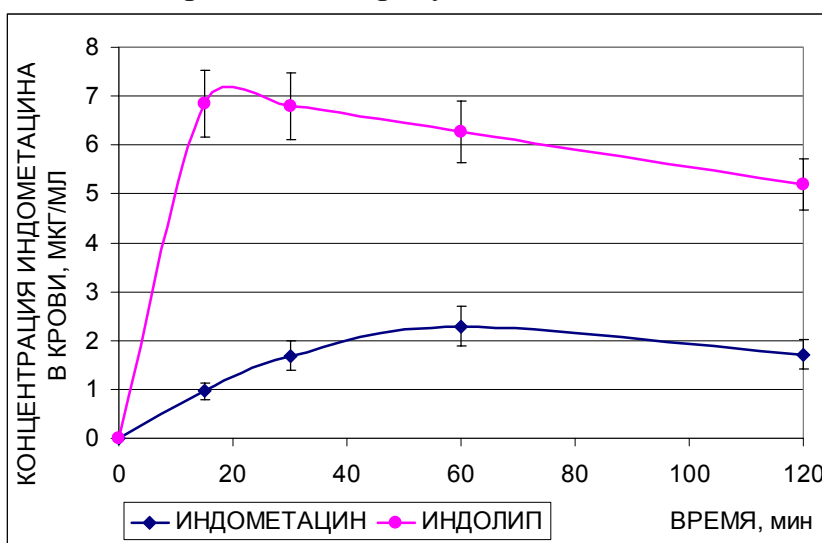
Биологическое действие этих двух форм Индолипа исследовали в экспериментах на животных.

## 2. Сравнительные доклинические исследования Индолипа при пероральном введении.

Известно, что включение лекарственного соединения в систему транспорта приводит к существенному изменению его фармакокинетических параметров и терапевтической эффективности (Drummond, 1998). Поэтому в дальнейших исследованиях было показано влияние встраивания индометацина в фосфолипидную транспортную наносистему на его биодоступность, кинетику накопления в тканях, специфическую активность в сравнении со свободной субстанцией при пероральном введении.

### 2.1. Сравнительная биодоступность Индолипа.

Кинетика изменения содержания индометацина в крови подопытных животных приведена на рисунке 2.



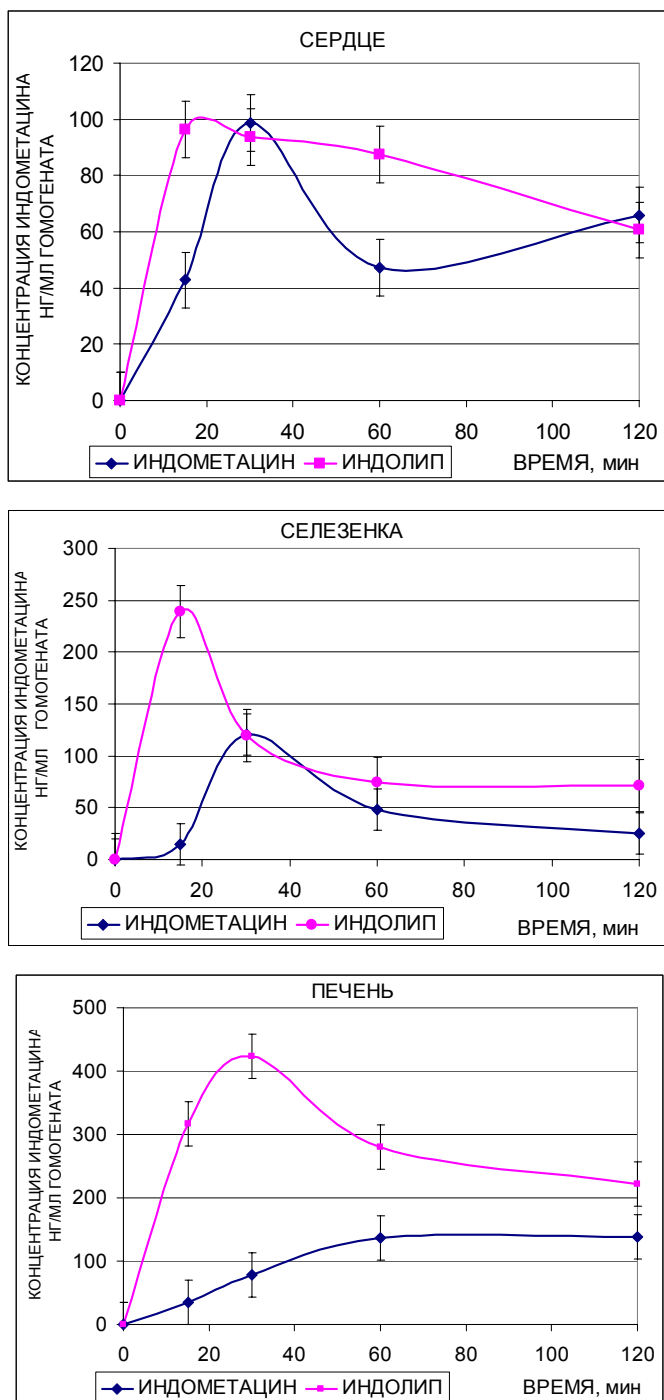
*Рисунок 2. Кинетика изменения содержания индометацина в крови крыс после перорального введения «Индолипа» и индометацина*

Крысам вводили перорально по 1 мл водного раствора «Индолипа» или суспензии индометацина в 4% растворе мальтозы, в дозе по 2.9 мг/кг. Количество индометацина в образцах крови определяли хромато-масс-спектрометрией (Electrospray, API-ES<sup>+</sup>) с использованием диклофенака в качестве внутреннего стандарта.

Из рисунка 2 видно, что при введении Индолипа концентрация в крови индометацина достигает максимума ( $C_{\max}$ ) уже через 15-20 минут, в то время, как для свободной субстанции – через 1 час. Кроме того, количественно  $C_{\max}$  для Индолипа в 4 раза выше, чем для индометацина. Соответственно, величина  $AUC_{0-120}$  (площадь под кривой «концентрация в крови – время»), характеризующая биодоступность препарата, для Индолипа почти в 2.5 раза выше, чем для свободной субстанции: 39,2 мин.×мкг/мл против 91,8 мин.×мкг/мл. Приведенные данные свидетельствуют о том, что при пероральном введении одной и той же дозы индометацина количество лекарства, поступившего в кровь, для Индолипа существенно выше, чем для свободной субстанции. Таким образом, встраивание индометацина в фосфолипидную наносистему транспорта более чем в 2 раза повышает его биодоступность.

## 2.2. Сравнительная кинетика накопления Индолипа в тканях.

Результаты сравнительных экспериментов по изучению кинетики накопления индометацина в тканях крыс после перорального введения представлены на рисунке 3.



*Рисунок 3. Изменения содержания индометацина в тканях крыс после перорального введения Индолипа и суспензии индометацина в 4% растворе мальтозы (доза индометацина 2.9 мг/кг).*

Условия эксперимента – как в подписи к рисунку 2.

Как видно из данных, представленных на рисунке 3, индометацин, включенный в фосфолипидные наночастицы, быстрее и количественно больше поступает в ткани исследуемых органов, что свидетельствует о повышении биодоступности перорально введенного Индолипа.

### 2.3. Сравнительная эффективность противовоспалительного действия Индолипа.

#### 2.2.1. Модель конконавалинового отека у мышей.

В таблице 1 представлены данные сравнительного противовоспалительного действия Индолипа при пероральном введении у мышей линии СВА на отек, индуцированный конконавалином А.

Таблица 1. Сравнительное противовоспалительное действие Индолипа на отек, индуцированный у мышей конконавалином

Доза препарата (мг/кг)	Индекс реакции воспаления ( $I_p$ ), %		
	Контроль	Индолип	Свободный индометацин
Контроль (без лечения)	18,5 ± 1,9	-	-
0.1	-	14,8 ± 1,6*	-
0.5	-	10,4 ± 2,1*	9,8 ± 1,5*
1	-	7,0 ± 1,6*	11,4 ± 1,0*
2	-	7,7 ± 2,3*	7,8 ± 2,1*

Препараты вводили по 0.1; 0,5; 1 и 2 мг/кг. Через 20 минут субплантарно вводили 20 мкл раствора конконавалина А (5 мг/мл), Через 1 час мышей забивали, определяли массу лапы и рассчитывали индекс реакции воспаления. \*  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, пероральное введение мышам Индолипа в дозе 0,1 мг/кг слабо подавляло реакцию воспаления, в то время как введение препарата в дозах 0,5, 1 и 2 мг/кг приводило к выраженному подавлению реакции воспаления - в 1,8, 2,6 и 2,4 раза соответственно. Введение индометацина также приводило к подавлению реакции воспаления. Однако Индолип, при дозировке 1 мг/кг, оказывал значительно более выраженное действие ( $I_p=7,0 \pm 1,6$ ), чем свободный индометацин ( $I_p = 11,4 \pm 1,0$ ), которого для достижения аналогичного эффекта ( $7,7 \pm 2,3$ ) приходилось вдвое увеличивать дозу (2 мг/кг).

Таким образом, полученные данные показывают, что на модели индуцированного конконавалином А воспаления у мышей Индолип по сравнению со свободным индометацином при пероральном введении обладает более выраженным противовоспалительным действием.

#### 2.2.2. Модель адьювантного артрита у крыс.

В экспериментах использовали 2 схемы лечения: (1) терапия развившегося воспаления (через 14 дней после введения адьюванта) и (2) лечебно-профилактическая терапия (введение адьюванта производили на 2-ой день после начала терапии).

При 1-ой (лечебной) схеме для характеристики противовоспалительного эффекта Индолипа и индометацина измеряли толщину пораженных конечностей, а также исследовали динамику изменений показателей крови, таких, как скорость оседания эритроцитов (СОЭ), относительное содержание отдельных субпопуляций лейкоцитов (лейкоцитарная формула), концентрация С-реактивного белка. Указанные показатели изучали в динамике: в день начала исследования (фон), через 1 и 2 недели после введения адьюванта (т.е. до начала лечения), а также через 1 и 2 недели после начала лечения (соответственно 3-я и 4-я недели после введения адьюванта).

Исследования показали, что противовоспалительное действие Индолипа проявлялось достоверным изменением таких показателей, как СОЭ (таблица 2) и степень ингибирования «иммунного» воспаления, оцениваемая по изменению толщины лапы (таблица 3).

*Таблица 2. Скорость оседания эритроцитов в крови у крыс с моделью адьювантного артрита при лечении Индолипом и свободным индометацином*

Доза индометацина	Лекарственная форма	До введения	Через 7 дней	Через 12 дней
0,7 мг/кг	Индолип	12,5 ±6,8	4,0 ±0,1 *	2,8 ±0,5
	Свободный индометацин	11,5 ±4,1	8,0 ±1,7	3,0 ±0,4
1,2 мг/кг	Индолип	11,5 ±1,8	4,3 ±0,8 *	3,8 ±0,5
	Свободный индометацин	12,8 ±6,8	7,3 ±1,7	3,3 ±0,5

Через 14 дней после введения крысам адьюванта Фрейнда (0.1 мл) начинали вводить внутривенно препараты индометацина, ежедневно в течение 12 дней; \* -  $p < 0,01$

Как видно из данных, представленных в таблице 2, через 7 дней после начала лечения у крыс наблюдалось быстрое снижение СОЭ. При этом в случае лечения Индолипом снижение происходило в 2 раза быстрее, что может свидетельствовать о более интенсивном купировании воспалительного процесса. Лечение Индолипом в дозе 1.2 мг/кг также приводило к более выраженному снижению вторичной реакции воспаления (таблица 3).

В экспериментах, по сравнительному изучению лечебно-профилактического действия Индолипа (схема 2), препараты в дозах 0,75; 1,5 и 2,5 мг/кг вводили перорально крысам начиная за два дня до индукции воспаления адьювантом. Эффект оценивали по изменению толщины лапы, в которую вводился адьювант (показатель первичного воспаления, рисунок 4).

Как видно из данных, представленных на рисунке 4, с 5-го по 9-й дни лечения наблюдали достоверные различия между контролем и группами, получавшими Индолип. При этом дозы Индолипа 0,75 и 2,5 мг/кг проявляли близкий по эффективности лечебно-профилактический эффект.

Таблица 3. Вторичная реакция воспаления при моделировании адьювантного артрита у крыс.

Доза индометацина	Лекарственная форма	Воспалительная реакция, толщина левой лапы, мм	% изменения отека по сравнению с контролем
0 (контроль)	-	5,14±0,1	
0,7 мг/кг	Индолип	5,15±0,1	-0,2
	Свободный индометацин	4,94±0,1	-4,1
1,2 мг/кг	Индолип	4,69±0,1*	-9,5
	Свободный индометацин	4,98±0,1	-3,2

Измерения в соответствие с моделью проводили на 25 день после индукции артрита  
\* -  $p < 0,05$

Таким образом, Индолип уже в дозе 0,75 мг/кг оказывал выраженное лечебно-профилактическое действие. Необходимо отметить, что аналогичная доза для свободного индометацина составляет 1.5-3 мг/кг (Gürsoy A., 1988).

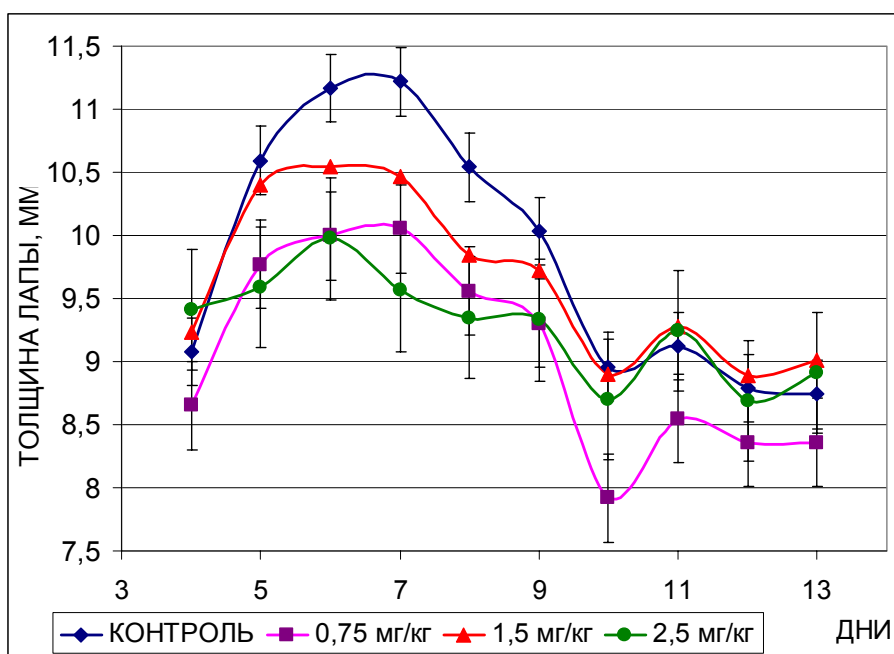


Рисунок 4. Первичная воспалительная реакция у крыс с моделью адьювантного артрита при профилактике воспаления Индолипом

Индолип вводили перорально в дозах 0,75; 1,5 и 2,5 мг/кг в объёме 1 мл ежедневно. Через 2 дня после начала терапии Индолипом вводили 0,25 мл адьюванта Фрейнда, продолжая введение Индолипа ещё 12 дней. Оценивали первичную воспалительную реакцию (отек) по толщине лапы.

#### 2.4. Изучение токсичности пероральной формы Индолипа

Острую и хроническую токсичность пероральной формы препарата Индолип изучали в лаборатории токсикологии ОАО ЦХЛС-ВНИХФИ.

**Острая токсичность.** Доза LD<sub>50</sub> для Индолипа и Индометацина составляла 32,8 мг/кг, и 35,8 мг/кг соответственно. Таким образом, включение



индометацина в фосфолипидные наночастицы не оказывало достоверного влияния на острую токсичность препарата в целом.

**Хроническая токсичность.** При введении исследуемых препаратов (Индолип и Индометацин) в дозе 1 мг/кг в течение 1 месяца не выявлено каких-либо существенных отклонений в поведении и общем состоянии подопытных животных по сравнению с контролем. Гематологические исследования также не выявили различий по показателям периферической крови между опытными и контрольными животными. Все биохимические показатели находились в пределах допустимой нормы.

Деструктивные изменения в системе желудочно-кишечного тракта наблюдали при дозе препаратов 3.5 мг/кг (15 дней введения), сопровождаемые смертностью 40% животных (4 из 10). При анализе гематологических показателей установлено некоторое повышение уровня лейкоцитов и снижение уровня тромбоцитов. Трехкратное введение Индолипа в дозе 7 мг/кг приводило к 100%-ной гибели животных.

Через 3 ч после однократного внутривенного введения в дозе 2,5 мг/кг Индолип и индометацин не оказывали ulcerогенного действия.

Таким образом, не обнаружено существенных различий в хронической токсичности высоких доз для Индолипа и Индометацина.

Полученные результаты показали, что встраивание индометацина в фосфолипидные наночастицы позволяет снизить терапевтическую дозу препарата практически в 2 раза, при сохранении эффективности, что будет способствовать существенному снижению его побочных проявлений. Проведенные эксперименты подтверждают перспективность дальнейшей разработки и внедрения пероральной формы Индолипа как нового противовоспалительного препарата, обладающего высокой биодоступностью и терапевтической эффективностью.

### **3. Изучение свойств Индолипа при инъекционном введении.**

Наряду с распространённой пероральной формой индометацина на фармацевтическом рынке имеется его форма для внутримышечного введения, в основном, для лечения острой формы ревматоидных заболеваний. Рекомендуемая доза инъекционной формы индометацина - 60 мг (по сравнению с 25-50 мг вводимыми перорально). Кроме того, известна инъекционная форма индометацина для лечения сложного патологического состояния у новорожденных детей, связанного с дефектом артериального протока. На отечественном фармацевтическом рынке таких форм индометацина нет.

Разработанная нами технология позволяет получать индометацин, встроенный в фосфолипидные наночастицы, в виде ультратонкой эмульсии, которую можно использовать для инъекций. В связи с этим представляется

целесообразным исследовать влияние включения индометацина в фосфолипидные наночастицы на его фармакокинетику при инъекционном введении.

### 3.1. Сравнительное исследование распределения индометацина при его инкубации с плазмой крови (в экспериментах *in vitro*).

При инъекционном введении существенное значение имеет распределение лекарства по компонентам крови, так как известно, что для клеток тканей в участках воспаления характерна повышенная экспрессия рецепторов к липопротеинам низкой плотности (ЛНП) (Wasan К.М., 1998). Аффинность лекарства к ЛНП могла бы способствовать повышению проникновения его в клетки, особенно в воспаленных тканях, и соответственно, повышению эффективности.

Нами было проведено исследование распределения Индолипа и свободной субстанции по компонентам плазмы. На рисунке 5 приведено распределение индометацина по фракциям липопротеинов плазмы, полученное после ультрацентрифугирования образцов в градиенте плотности.

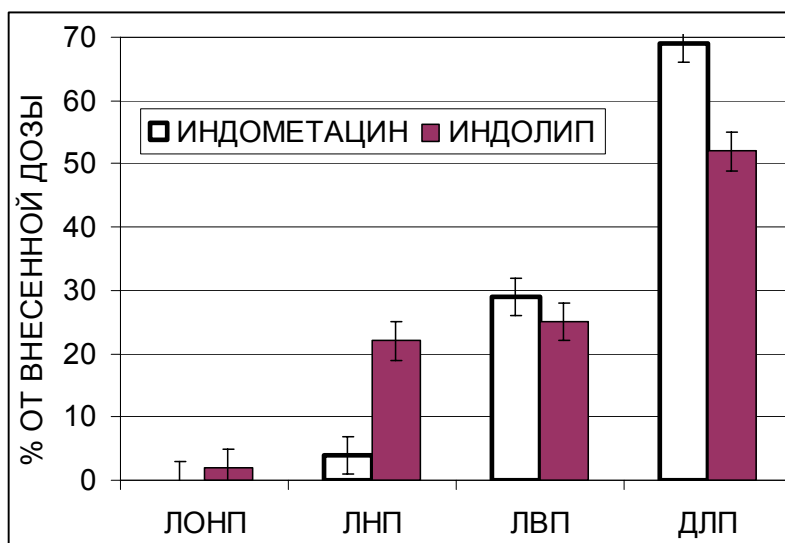


Рисунок 5. Содержание индометацина во фракциях плазмы после инкубации *in vitro*

Сокращения: ЛНП, ЛОНП, ЛВП, ДЛП – соответственно, липопротеины низкой, очень низкой, высокой плотности и делипидированная фракция. 4 мл плазм с индометацином и Индолипом инкубировали 30 минут при 37°, затем добавляли NaBr (0,5 г/мл плазмы), наслаивали раствор NaBr с плотностью 1,019 г/мл и центрифугировали в течение 2 часов при 40000 об/мин. Фракционирование осуществляли согласно распределению компонентов плазмы в контрольной пробирке. Содержание индометацина определяли с помощью ВЭЖХ.

Из рисунка 5 видно, что Индолип, по сравнению с индометацином, на 20% меньше связывается с белковой (делипидированной) фракцией плазмы. При этом его связывание с фракцией ЛНП возрастает практически в 10 раз.

На основании полученных результатов можно предположить, что фосфолипидные наночастицы как система транспорта, способны оказывать

влияние на фармакокинетику индометацина. Увеличение связывания с ЛНП должно способствовать селективному транспорту индометацина в воспаленные ткани, что возможно будет проявляться в повышении терапевтической эффективности препарата в целом.

### **3.2. Противовоспалительное действие Индолипа при инъекционном введении**

Изучение эффективности противовоспалительного действия инъекционной формы Индолипа проводили у крыс на модели воспаления индуцированного каррагенином.

В таблице 4 приведены данные по влиянию внутрибрюшинного введения Индолипа на выраженность воспалительной реакции, которую оценивали по изменению объема лапы (снижению отека).

*Таблица 4. Сравнительное действие Индолипа при внутрибрюшинном введении на индуцированную каррагенином реакцию воспаления у крыс.*

Доза индометацина мг/кг	Объем лапы, мл	
	Индолип	Свободный индометацин
0 (контроль)	2,29±0,05	2,29±0,05
1	2,16±0,2	2,4±0,2
2.5	1,78±0,1*	1,95±0,14*
6	1,83±0,1*	1,97±0,06*

\*  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем

Из данных, представленных в таблице 4 видно, что Индолип и свободный индометацин, введенные в дозах 2,5 и 6 мг/кг достоверно снижают степень воспаления. При этом Индолип в дозе 2,5 мг/кг оказывает более выраженное действие. В дозе 1 мг/кг не было обнаружено достоверного противовоспалительного действия, как у Индолипа, так и у препарата сравнения.

Ввиду отсутствия на фармрынке РФ инъекционной формы индометацина, в экспериментах в качестве препарата сравнения использовали раствор субстанции индометацин, полученный с добавлением Твина-80.

Способность Индолипа оказывать противовоспалительное действие не только при пероральном, но и при инъекционном (внутрибрюшинном) введении экспериментальным животным свидетельствует о возможности и целесообразности дальнейшей разработки инъекционной готовой лекарственной формы индометацина.

### **3.3. Изучение токсичности Индолипа при инъекционном введении.**

Острую и хроническую токсичность Индолипа при внутривенном введении мышам и крысам изучали в лаборатории токсикологии ОАО ЦХЛС-ВНИХФИ.

**Острая токсичность.** LD<sub>50</sub> при однократном внутривенном введении мышам составила 39.6 мг/кг. Надо добавить, что по данным литературы LD<sub>50</sub> для индометацина (натриевая соль) при внутривенном введении составляет 21 мг/кг. Таким образом, включение индометацина в фосфолипидные наночастицы, уменьшает его острую токсичность при инъекционном введении.

**Хроническая токсичность.** При инъекционном введении препарата Индолип патологические проявления возникали только при высоких дозах 5 мг/кг, и не ранее, чем на 17-ый день эксперимента. К этому дню наблюдалась смертность 60% животных с очаговым слущиванием кишечного эпителия. При дозе 2.5 мг/кг смертность составила 10% на 19-ый день, наблюдались признаки поражения эпителия (десквамации эпителия ворсинок и их деформация). При инъекционном введении Индолипа в дозах 2.5 и 1 мг/кг в течение двух недель не наблюдалось изменений внешнего вида, поведения животных, гематологических и биохимических показателей.

Таким образом, инъекционная форма препарата Индолип в соответствии с общепринятой классификацией можно отнести к классу умеренно токсичных веществ (Измеров Н.Ф., 1977). Исследования показали существенное снижение побочного токсического действия Индолипа на желудочно – кишечный тракт, отсутствие ulcerогенного действия, что подтверждает целесообразность дальнейшей разработки и внедрения инъекционной формы препарата.

Проведенные эксперименты показали, что встраивание индометацина в фосфолипидные наночастицы позволяет получить композицию, пригодную для инъекционного введения и оказывающую эффективное противовоспалительное действие. Учитывая отсутствие в РФ инъекционной формы индометацина, а также ограничение применения его пероральной формы из-за выраженного побочного действия, перспективность дальнейшей разработки готовой инъекционной формы индометацина, снабженного фосфолипидной наносистемой транспорта, очевидна.

## **4. Получение и свойства Индолипа, микрокапсулированного в кишечнорастворимую полимерную оболочку.**

Известно, что технологический процесс лиофильного высушивания широко применяется в различных областях промышленности, особенно пищевой и фармацевтической, и позволяет получать в сухом виде многие вещества, отличающиеся окисляемостью, химической лабильностью. Однако

данный процесс является экономически высоко затратным и длительным по времени. Учитывая это, нами была изучена возможность замены процесса лиофильного высушивания эмульсии фосфолипидных наночастиц на низкотемпературную сушку в псевдооживленном слое. Учитывая, что агрессивная среда желудка может инициировать агрегацию/разрушение фосфолипидных наночастиц при пероральном введении эмульсии, полученные при сушке микрогранулы в дальнейшем были инкапсулированы в кишечнорастворимую полимерную оболочку.

Проведенные исследования состояли из следующих этапов:

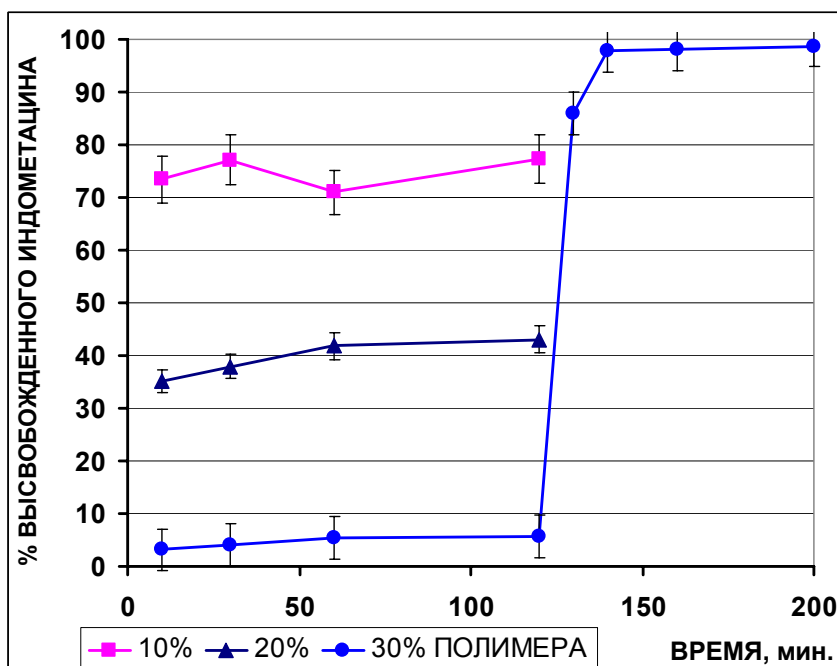
- сушка фосфолипидной наноэмульсии в псевдооживленном слое и оптимизация условий;
- сушка лекарственной композиции индометацина на основе фосфолипидных наночастиц;
- подбор условий и получение микрокапсул Индолипа, покрытых кишечнорастворимой оболочкой;
- сравнительное изучение биодоступности микрокапсулированного индометацина при пероральном введении в экспериментах *in vivo*.

#### ***4.1. Получение микрокапсулированного в полимерную оболочку индаметацина, включенного в фосфолипидные наночастицы***

На первом этапе было проведено исследование параметров высушивания фосфолипидной транспортной системы, а так же индометацина встроенного в фосфолипидные наночастицы путем нанесения на материал-носитель – микрокристаллическую целлюлозу или мальтозу в псевдооживленном слое. Было установлено, что оптимальным материалом-носителем является гранулированная мальтоза. Были определены параметры проведения процесса высушивания. Анализ полученных образцов показал, что процесс при установленном режиме не оказывал существенного влияния на физико-химические характеристики высушиваемой наноэмульсии. Так, размер фосфолипидных наночастиц достоверно не изменялся ( $40,5 \pm 7,8$  нм, 97,44% до высушивания и  $35,5 \pm 5,5$  нм, 94,01% после регидратации). Небольшое увеличение индекса окисленности (с 0,38 до 0,41) и перекисного числа (с 7,9 до 9,5 мэкв/кг) свидетельствовали о незначительном окислении фосфолипидов при высушивании. Процесс проходил с выходом по индометацину на уровне 100%. Полученные продукты содержали не более 3% остаточной влаги.

На втором этапе проводили инкапсуляцию полученных микрокапсул с фосфолипидными наночастицами, содержащими индометацин, в полимерную pH – чувствительную оболочку. Были подобраны условия нанесения полимерной пленки и получены образцы микрокапсул, в которых исследовали влияние толщины нанесенной полимерной оболочки на удерживание индометацина. Для

этого микрокапсулы инкубировали в искусственном желудочном соке и в пробах, отобранных через определенные промежутки времени определяли концентрацию индометацина (рисунок 6).



*Рисунок 6. Высвобождение индометацина из микросфер, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, в эксперименте in vitro в среде, соответствующей по pH желудку (до 120 минут) и кишечнику (120-200 минут).*

Микросферы с разной степенью покрытия полимерной оболочкой помещали в раствор 1н HCl при постоянном перемешивании (200 об/мин). Через 2 часа меняли pH инкубационного раствора добавлением 0,2 М раствора Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (до значения, соответствующего pH кишечника). Через определенные интервалы времени отбирали по 1 мл среды и определяли концентрацию индометацина методом ВЭЖХ.

Как видно из рисунка 6, по мере возрастания количества наносимого полимера уменьшалось высвобождение индометацина из микрокапсул. При содержании полимера 30% по отношению к массе микросферы в течение 2 часов индометацин практически не высвобождался. При изменении на 120-й минуте эксперимента pH среды до ~ 6-7 (аналогичному в кишечнике) микрокапсулы полностью растворились, освобождая индометацин в раствор. При выполнении данного этапа работы было установлено необходимое количество полимера (30%) для предохранения микрокапсул от разрушения в желудке. Анализ показал, что в процессе микрокапсулирования размер фосфолипидных наночастиц достоверно не увеличился.

Таким образом, была разработана технология микрокапсулирования индометацина, включенного в фосфолипидные наночастицы. Полученные микрокапсулы устойчивы в кислой среде и полностью растворимы при pH среды 5-7.

#### 4.2. Биодоступность индометацина микрокапсулированного в кишечнорастворимую полимерную оболочку (в экспериментах *in vivo*).

Сравнительную биодоступность микрокапсулированного индометацина, включенного в фосфолипидные наночастицы исследовали в экспериментах *in vivo*.

На рисунке 7 представлены данные об изменении уровня индометацина в крови крыс, получавших перорально индометацин в микросферах, покрытых и непокрытых кишечнорастворимой полимерной оболочкой.

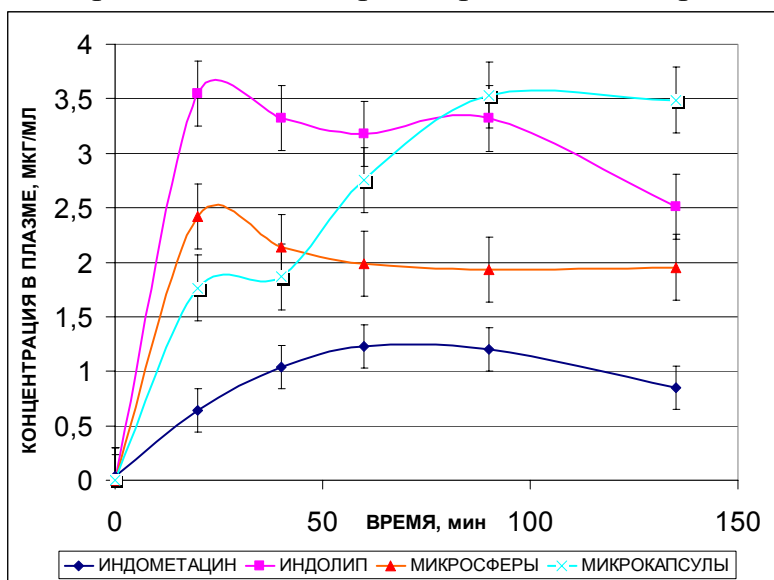


Рисунок 7. Динамика изменения содержания индометацина в плазме крыс после перорального введения Индолипа в форме микросфер, микрокапсул и лиофилизата в сравнении с субстанцией индометацина.

Крысам перорально вводили одну из исследуемых форм индометацина в дозе 1,2 мг/кг. Отбирали кровь из хвостовой вены, получали плазму и после экстракции метанолом определяли содержание индометацина хромато-масс-спектрометрией (Electrospray, API-ES<sup>+</sup>).

Как видно из представленных данных (рисунок 7), биодоступность инкапсулированных и не инкапсулированных образцов существенно отличалась. Так, для микрокапсул максимальную концентрацию в крови наблюдали только через 100 мин после их перорального введения, а для микросфер и лиофилизата – через 20-25 мин.  $C_{max}$  для микрокапсул была в 1,5-2 раза выше, чем для микросфер и свободного индометацина.

Полученные данные подтверждают эффективность инкапсулирования индометацина в кишечнорастворимую оболочку. С одной стороны, микрокапсулирование предотвращает высвобождение индометацина в желудке, тем самым снижая/устраняя его ulcerогенное действие. В дальнейшем, попадая в кишечник (рН 5-7), полимерное покрытие растворяется, индометацин, встроенный в фосфолипидные наночастицы высвобождается (рисунок 6, аналогичный процесс, проведенный *in vitro*). Необходимо отметить, что биодоступность микрокапсулированного индометацина, снабженного фосфолипидной системой транспорта аналогична биодоступности лиофилизата

Индолипа, что подтверждает возможность получения пероральной формы Индолипа низкотемпературным высушиванием в псевдооживленном слое.

Таким образом, микрокапсулирование индометацина, включенного в фосфолипидные наночастицы, позволяет получить препарат для перорального введения, обладающий высокой биодоступностью. Технология сушки в псевдооживленном слое для фармацевтической промышленности известна как в РФ, так и за рубежом. Однако впервые была разработана технология низкотемпературной сушки и микрокапсулирования наноэмульсии, состоящей из лабильных, чувствительных к изменению температуры, легко окисляемых фосфолипидных наночастиц, которые при этом сохраняли свои физико-химические характеристики.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате выполнения диссертационной работы впервые на основе фосфолипидных наночастиц как системы транспорта и индометацина была получена лекарственная композиция под условным названием Индолип. Средний диаметр наночастиц, составляющих композицию не превышал 50 нм. Способ получения композиции был масштабирован на опытно-промышленном участке института, разработаны и оптимизированы технологии лиофилизации наноэмульсии Индолипа, а также низкотемпературной сушки в псевдооживленном слое. Впервые получены микрокапсулы индометацина, встроенного в фосфолипидные наночастицы, покрытые кишечнорастворимой пленкой.

Были изучены физико-химические и биологические свойства Индолипа. Показано, что включение индометацина в фосфолипидные наночастицы предельно малого размера оказывает существенное влияние на такие фармакокинетические показатели, как биодоступность, распределение по компонентам крови, распределение по тканям, специфическая активность, токсичность. Впервые было показано, что снабжение индометацина фосфолипидной системой транспорта приводит не только к увеличению его биодоступности в 2-2,5 раза, но и к существенному увеличению специфической активности. Проведенные исследования показали возможность снижения терапевтической дозы индометацина не менее чем в 2 раза.

Были проведены необходимые доклинические исследования композиции и показана возможность и перспективность получения на ее основе инъекционной и пероральной готовых лекарственных форм – нанолекарств.

Полученные данные позволяют рекомендовать разработанную композицию для дальнейшего клинического изучения.



Таким образом, проведенные на примере индометацина исследования показали, что фосфолипидные наночастицы предельно малого размера (до 30 нм) способны служить системой транспорта для трудно растворимых лекарственных препаратов. Встраивание лекарственных субстанций известного спектра действия в наночастицы позволит получить в короткие сроки новые формы лекарственных препаратов (нанолекарства) с высокой эффективностью, биодоступностью и сниженными побочными действиями.

## **ВЫВОДЫ**

1. Получена новая композиция индометацина, снабженного фосфолипидной транспортной наносистемой, с диаметром частиц  $45 \pm 5$  нм (Индолип).
2. Предложен на примере индометацина оптимальный режим процесса лиофильного высушивания лекарственных препаратов, снабженных фосфолипидной транспортной наносистемой.
3. Установлено, что включение индометацина в фосфолипидную транспортную наносистему повышает его специфическую активность без изменения острой и хронической токсичности.
4. Биодоступность индометацина, снабженного фосфолипидной транспортной наносистемой, при пероральном введении повышается более чем в 2 раза по сравнению со свободной субстанцией.
5. Включение индометацина в фосфолипидные наночастицы при внутривенном введении приводит к повышению его связывания с липопротеинами, особенно, липопротеинами низкой плотности.
6. Доказано, что на основе композиции Индолип могут быть разработаны и внедрены в медицинскую практику пероральная и инъекционная готовые лекарственные формы.
7. Для пероральной формы Индолипа разработана технология низкотемпературного высушивания в псевдоожиженном слое. Микрокапсулирование Индолипа увеличивает биодоступность индометацина.

## **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Ипатова О.М., Торховская Т.И., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Иванова Н.Д., Широнин А.В., Баранова В.С., Арчаков А.И. Биодоступность пероральных лекарственных форм и способы ее повышения // Биомедицинская химия. – 2010. – Т.56, №4. – С.101-119.
2. Патент 2391966 Российская Федерация, МПК А61К9/127, В82В1/00. Наносистема на основе растительных фосфолипидов для включения биологически активных соединений и способ ее получения / Арчаков

- А.И., Гусева М.К., Учайкин В.Ф., Ипатова О.М., Тихонова Е.Г., Медведева Н.В., Лисица А.В., Прозоровский В.Н., Стрекалова О.С., Широин А.В.; заявитель и патентообладатель ООО «ЭкоБиоФарм» - № 2009104784/15; заявл. 13.02.2009; опубл. 20.06.2010.
3. Заявка на изобретение № 2009104785 Российская Федерация, МПК А61К 47/44, В82В 1/00. Способ получения эмульсии на основе растительных фосфолипидов с использованием устройства для его осуществления / Арчаков А.И., Ипатова О.М., Лисица А.В., Медведева Н.В., Тихонова Е.Г., Стрекалова О.С. Широин А.В.; заявитель Государственное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН - № 2009104785/15; заявл. 13.02.2009; опубл. 20.08.2010, Бюл. №23.
  4. Широин А.В., Меньшутина Н.В. Оптимизация технологической схемы процесса сублимационной сушки в производстве инъекционной формы лекарственного препарата «Фосфоглив» // Сборник докладов 4 –ого международного конгресса молодых ученых по химии и химической технологии. – Москва, 2008. – Т.1. – С. 26-30.
  5. Широин А.В., Ипатова О.М. Особенности процесса лиофилизации в технологии производства фосфолипидных нанолечарств // Сборник докладов 5-го московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 2009. – Т.1. – С. 203.
  6. Широин А.В., Воскресенская А.А., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н. Фосфолипидные наночастицы в качестве транспортной системы для индометацина // Сборник трудов второго международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий в рамках Второго Международного форума по нанотехнологиям. – Москва, 2009. – С.883.
  7. Alexander V. Shironin, Olga M. Ipatova. New indometacine nanodrug based on plant phospholipids // Materials of The 5th International Conference “Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnologies for Medicine”. – St. Petersburg, 2010. – P.93.
  8. Широин А.В., Ипатова О.М. Особенности процесса высушивания в технологии производства фосфолипидных нанолечарств // Сборник докладов международной конференции с элементами научной школы для молодежи «Инновационные материалы и технологии в химической и фармацевтической отраслях промышленности». – Москва, 2010. – С. 84-85.
  9. O.M.Ipatova, V.N.Prozorovskiy, N.V.Medvedeva, A.V.Shironin, O.S.Strekalova, N.D.Ivanova, T.I.Torkhovskaya, A.I.Archakov. Phospholipid nanoparticles as carriers for drug delivery // Materials of The European Congress for Drug Discovery (MipTec). – Basel, Switzerland, 2010. – P.80.
  10. K. Gurganova, A. Shironin. Optimization of freeze-drying process for hepatoprotective drug production // Materials of The 17-th International Drying Symposium. – Magdeburg, Germany, 2010. – P.182.