

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»

Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко

ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ:
БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ГОТОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ

Навчальний посібник
для студентів спеціальності «Біотехнології та біоінженерія»

Рекомендовано вченою радою НТУ «ХПІ»

Харків
Друкарня «Мадрид»
2020

УДК 615.012(075):602.4(075):577(075)

К 78

Рецензенти:

Є.В. Гладух, д-р фарм. наук, проф.,
Національний фармацевтичний університет;
Л.О. Бобрицька, д-р фарм. наук, проф.,
Національний фармацевтичний університет

*Рекомендовано вченою радою НТУ «ХПІ»
як навчальний посібник для студентів спеціальності «Біотехнології та
біоінженерія», протокол № 4 від 03 липня 2020 р.*

Краснопольський Ю.М., Пилипенко Д. М.

К 78 Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва
готових лікарських форм : навчальний посібник для студентів
біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М.
Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с.
: іл. 4, табл. 21, бібліогр. 130 назв.
ISBN 978-617-7845-80-4

Навчальний посібник включає опис різних лікарських форм, що містять активні інгредієнти, отримані біотехнологією; технологічні схеми їх одержання в умовах GMP; вимоги до якості одержаних препаратів. Розглянуто основні групи біотехнологічних продуктів: вакцини, антибіотики, гормони, пробіотики, продукти нанобіотехнології та ін. Лікарські форми представлені препаратами для ін'єкцій, таблетками, капсулами, суспензіями, мазями та ін.

Навчальний посібник призначено для студентів та аспірантів біотехнологічного напрямку.

УДК 615.012(075):602.4(075):577(075)

ISBN 978-617-7845-80-4

© Ю.М. Краснопольський, Д.М. Пилипенко, 2020
© НТУ «ХПІ», 2020
© ТОВ «Друкарня Мадрид», 2020

ЗМІСТ

ВСТУП	7
ГЛАВА 1. БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ВАКЦИННИХ ПРЕПАРАТІВ.....	9
1.1. Живі вакцини.....	12
1.2. Субдиничні / інактивовані вакцини	21
1.3. Цілісний патогенний організм.....	22
1.4. Білкові вакцини	24
1.5. Хімічна інактивація	26
1.6. Генетична інактивація	27
1.7. Рекombінантні поліпептиди	28
1.8. Носії.....	29
1.9. Прямі полісахаридні вакцини.....	33
1.10. ДНК вакцини. Вірусна і бактеріальна доставка	35
1.11. Створення протипухлинних вакцин	41
1.12. Розробка складу вакцин	42
Контрольні запитання.....	52
ГЛАВА 2. ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНИХ ФОРМ ПРЕПАРАТІВ.....	55
2.1. Загальна характеристика і класифікація парентеральних форм препаратів	55
2.2. Скляні контейнери для фармацевтичного використання відповідно до вимог ДФУ	56
2.3. Технологічні аспекти одержання парентеральних форм.....	62

2.4.	Методи стерилізації парентеральних препаратів відповідно до вимог ДФУ	68
2.5.	Технологія виробництва парентеральних лікарських форм ..	71
2.6.	Контроль параентеральних препаратів.....	96
	Контрольні запитання.....	98
ГЛАВА 3.	НАНОБІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ОДЕРЖАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ	100
3.1.	Загальна характеристика ліпосом	100
3.2.	Технологічні аспекти отримання ліпосом.....	102
3.3.	Контроль ліпосомальних форм препаратів	120
3.4.	Приклади отримання ліпосомальних препаратів на основі гідрофільних і ліпофільних АФІ	121
	Контрольні запитання.....	144
ГЛАВА 4.	ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ, ЩО МІСТЯТЬ ШТАМИ ПРОБІОТИКІВ	148
4.1.	Мікробна екологічна система людини	151
4.2.	Засоби профілактики мікроекологічних порушень на фармацевтичному ринку України	157
4.3.	Клінічне застосування пробіотичних препаратів	161
4.4.	Характеристика пробіотичних штамів	163
4.4.1.	Біфідобактерії.....	164
4.4.2.	Лактобацили.....	167
4.4.3.	E.Coli	169
4.4.4.	Bacillus	169
4.4.5.	Пропіоновокислі бактерії.....	170
4.4.6.	Рекомбінантні штами пробіотиків	172
4.5.	Біотехнологічне отримання препаратів пробіотиків.....	175
	Контрольні запитання.....	188

ГЛАВА 5. ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ У ФОРМІ КАПСУЛ	194
5.1. Загальна характеристика капсул	194
5.2. Технологія приготування капсул	196
5.3. Використання капсул з продуктами біотехнології.....	202
5.4. Контроль капсул.....	212
Контрольні запитання.....	213
ГЛАВА 6. ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ У ФОРМІ ТАБЛЕТОК	215
6.1. Загальна характеристика таблеток.....	215
6.2. Технологія виробництва таблеток	220
6.3. Контроль таблеток	229
6.4. Таблетки з продуктами, отриманими за допомогою біотехнології.....	229
6.4.1. Препарати, що містять антибіотики	229
6.4.2. Препарати, що містять протективні антигени	236
Контрольні запитання.....	240
ГЛАВА 7. ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ У ФОРМІ СУСПЕНЗІЙ	243
7.1. Загальна характеристика суспензій	243
7.2. Технологія отримання суспензій.....	245
7.3. Суспензійні форми препаратів, що містять продукти біотехнології.....	248
7.4. Контроль суспензій.....	251
Контрольні запитання.....	251
ГЛАВА 8. ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ У ФОРМІ СУПОЗИТОРІЇВ.....	253
8.1. Загальна характеристика супозиторіїв	253
8.2. Технологія отримання супозиторіїв.....	255
8.3. Супозиторії, які містять продукти, одержані біотехнологічним шляхом.....	257
8.4. Контроль супозиторіїв.....	261
Контрольні запитання.....	261

ГЛАВА 9. ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ У ФОРМІ МАЗЕЙ.....	263
9.1. Загальна характеристика мазей.....	263
9.2. Технологія отримання мазей.....	265
9.2.1. Класифікація мазей та їх компонентів.....	265
9.2.2. Вибір складу мазі та технології.....	270
9.2.3. Промислова технологія виготовлення мазі.....	273
9.3. Контроль мазей.....	275
9.4. Мазі, що містять продукти біотехнології.....	275
Контрольні запитання.....	278

ВСТУП

Фармацевтична біотехнологія – один з основних напрямків розвитку сучасної фармації. Сьогодні на фармацевтичному ринку присутні тисячі препаратів, що містять продукти біотехнології, які рятують життя мільйонів людей. Це, передусім, вакцини, які використовуються для профілактики і лікування інфекційних, пухлинних та інших захворювань. Створено вакцини проти більшості соціально-значущих інфекцій, фахівцями постійно проводиться розробка нових вакцинних препаратів. Для країн з розвиненим напрямком фармацевтичної біотехнології пріоритетним є виведення на ринок оригінальних вакцин для порятунку людей від епідемій і пандемій, як це відбувається в 2020 році зі створенням препарату для профілактики COVID 19, коли до цієї розробки підключилися провідні фахівці в цій галузі. Сьогодні вакцини випускаються в декількох лікарських формах: ін'єкції (розчини і суспензії), таблетки, капсули. Значні обсяги випуску препаратів на основі отриманих біотехнологічним шляхом антибіотиків, які випускаються у формі розчинів для ін'єкцій, таблеток, мазей, капсул, супозиторіїв та ін.

Активно розвивається напрямок з виробництва препаратів, призначених для лікування та профілактики пухлинних захворювань, що містять цитокіни і моноклональні антитіла. Успішно використовуються в медицині пробіотики, антитоксичні сироватки в різних лікарських формах. За останні роки досить активно розвивається нанобіотехнологія, зокрема, створюються десятки ліпосомальних препаратів, які використовуються в онкології, кардіології, пульмонології, боротьбі з бактеріальними та грибовими інфекціями. Активно розвивається напрямок зі створення рекомбінантних препаратів різної спрямованості.

Кожне відкриття біотехнології, імунології, нанобіотехнології та інших наукових напрямів – це черговий крок до створення нових лікарських і профілактичних препаратів. Все це було б неможливо без розвитку сучасної фарма-

цевтичної науки зі створення технологічних основ розробки готових лікарських форм: розчинів для ін'єкцій та інфузій, таблеток, суспензій, мазей, супозиторіїв та інших лікарських форм. Найважливішою складовою успішності розвитку фармацевтичних технологій є постійне створення високоефективного технологічного обладнання, що особливо актуально при фармацевтичному виробництві в умовах GMP.

У даному навчальному посібнику неможливо висвітлити питання щодо розробки та виробництва всіх існуючих сьогодні в світовій практиці готових лікарських форм. У зв'язку з цим зупинимося на основних лікарських формах, до складу яких входять активні інгредієнти, отримані за допомогою біотехнології. Технології, наведені в даному навчальному посібнику, є принципово можливими схемами одержання готових лікарських форм і не є технологіями конкретного виробника, оскільки наведені тільки загальні характеристики процесів, що дозволяють представити і оцінити сучасний стан проблеми. У навчальному посібнику подані вимоги до готових лікарських форм і методи їх контролю відповідно до рекомендацій Державної Фармакопеї України.

Метою створення посібника є забезпечення студентів та аспірантів спеціальності «Біотехнології та біоінженерія» інформацією про біотехнологічні продукти, які найчастіше використовуються в сучасних технологіях лікарських засобів. Наведено класифікацію та властивості різних готових лікарських форм, включаючи властивості та застосування допоміжних речовин.

У навчальному посібнику підсумовані основні технології, ключові проблеми і цілі створення різних готових лікарських форм.

ГЛАВА 1. БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ВАКЦИННИХ ПРЕПАРАТІВ

Вакцини і антисироватки є першою групою препаратів, отриманих за допомогою біотехнології.

Жодній медичній науці людство не завдячує порятунком стількох життів, як вакцинології. Вакцинопрофілактика довела свою ефективність як найекономічніший засіб попередження інфекційних хвороб. Створені вакцини проти 34 соціально-значущих інфекцій, що привело до значного зниження захворюваності на дифтерію, правець, кір, туляремію, поліомієліт і зникнення віспи та ін.

Основним завданням досліджень в галузі вакцинології є розробка безпечних і високоефективних вакцинних препаратів. Весь шлях створення вакцин був можливий тільки при використанні основних досягнень біотехнологічної науки – відкриття анатоксинів та можливість їх отримання, створення клітинних культур, атенуація вірусів і бактерій, виділення та очищення полісахаридів, створення рекомбінантних технологій. Кожне відкриття біотехнології та імунології – це черговий крок до створення нових вакцин, причому не тільки для профілактики інфекційних захворювань. Сьогодні вакцини активно використовуються для лікування ряду захворювань: алергічних, аутоімунних, онкологічних та ін. Так, наприклад, в Україні зареєстровано дві вакцини для лікування і профілактики онкологічних захворювань: вакцина URO-BCG, яка використовується для лікування поверхневого раку сечового міхура (виробництва NVI, Нідерланди), і вакцина Гардасил проти вірусу папіломи людини, рекомбінантна (виробництва Merck Sharp & Dohme B.V., Нідерланди). Багатообіцяючими є комбіновані вакцини, що забезпечують імунізацію проти кількох інфекційних захворювань. Удосконалення і розвиток виробництва традиційних вакцин йде паралельно з розвитком технологій принципово нових вакцинних препаратів: ДНК-вакцин; вакцин на основі пептидів; мукозальних і рибосомальних вакцин;

створення препаратів, за допомогою яких з'явиться можливість впливати на імунну систему при використанні нових імуномодуляторів, які підвищують імунну відповідь; створення нових систем-переносників, наприклад, ліпосом для доставки антигенів або імуномодуляторів; рекомбінантних вакцин і ряду інших.

Інтенсивний розвиток біотехнології, біохімії, імунології визначив прогрес у розвитку світової фармації і створенні високоефективних вакцин, як традиційних, так і вакцин нового покоління, препаратів крові, інтерферонів, цитокінів і рекомбінантних продуктів різної спрямованості. З розвитком технології рекомбінантних ДНК стало можливим створення вакцин нового покоління, позбавлених недоліків традиційних вакцин.

У даному посібнику неможливо висвітлити питання, що стосуються розробки та виробництва існуючих сьогодні в світовій практиці вакцин. У зв'язку з цим ми зупинилися тільки на принципових технологічних підходах до створення нових високоефективних вакцинних препаратів. У цьому розділі підсумовані основні технології, ключові проблеми та імунологічні цілі створення різних видів активних вакцин. У наших попередніх матеріалах були детально висвітлені технології отримання основних вакцин чинного в Україні Календаря щеплень [1, 2].

Представлені технології та приклади повинні надати читачеві чітку структуру, яка дала б йому можливість оцінити різні підходи до досліджень і розробки нових вакцин. Даний розділ цього навчального посібника повинен розглядатися спільно з матеріалами, викладеними в навчальному посібнику [1].

У теперішній час в арсеналі імунопрофілактичних препаратів – вакцини, які розрізняють за видом і характером технології виробництва, способом застосування і ефективністю, а саме: живі (атенуйовані); інактивовані: корпускулярні, хімічні та класичні – анатоксини. За новими технологіями отримують вакцини: рибосомальні, рекомбінантні субодиничні зі штучних антигенів. Для кращого розуміння існуючих сьогодні технологій отримання вакцинних препаратів ми наводимо основні стратегії отримання препаратів із зазначенням типу вакцини та виду мікроорганізмів.

Вірусні вакцини:

а) класична стратегія (атенуація в клітинній культурі) – віруси поліомієліту, кору, епідемічного паротиту, краснухи, вітряної віспи;

б) мутанти, відібрані шляхом температурного впливу, – ротавіруси, віруси грипу;

в) рекомбінантні віруси – простого герпесу (HSV), коров'ячої віспи);

Бактеріальні вакцини:

а) класичні стратегії – туберкульоз БЦЖ (бацила Кальмета–Герена), черевний тиф (*Salmonella typhi*);

б) рекомбінантні бактерії – холера (*Vibrio cholerae*),

в) рекомбінантні бактеріальні вектори – *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*;

Субодиничні / інактивовані вакцини (цілісний патогенний організм):

а) інактивовані бактерії – кашлюк (*Bordetella pertussis*), холера;

б) інактивовані віруси – поліомієліту, грипу, сказу, японського енцефаліту, гепатиту А;

Вакцини на основі білків: природні (вірус гепатиту В (HBV), кашлюк);

Хімічно інактивовані вакцини – правець (*Clostridium tetani*), дифтерія (*Corynebacterium diphtheriae*), кашлюк (*Bordetella pertussis*);

Генетично інактивовані вакцини – кашлюк, дифтерія;

Рекомбінантні поліпептиди – хвороба Лайма (*Borrelia burgdorferi*), HBV;

Вакцини на основі білків: гібридний білок (малярія), кон'югат (малярія), клітинний епітоп (рак, HBV);

Вакцини на основі полісахаридів: простий полісахарид (*Haemophilus influenzae* тип b (Hib)), менінгококовий (*Neisseria meningitides*), пневмококовий (*Streptococcus pneumoniae*); кон'югат (Hib);

Вакцини на основі ДНК – грип, гепатит В.

Стратегічне рішення з приводу розробки живої, субодиничної / інактивованої вакцини або вакцини на основі нуклеїнової кислоти необхідно приймати, зваживши епідеміологічні, патогенетичні та імунобіологічні аспекти інфекції або захворювання, що розглядається, а також технічну здійсненність різних підходів. Епідеміологія диктує цільову популяцію вакцини. Вік і стан здоров'я цієї популяції зазвичай визначають конкретні стратегії як більш бажані для стиму-

ляції захисного імунітету. Наприклад, для вакцини, призначеної для здорових немовлят, дуже важлива мінімальна реактогенність, а деякі типи вакцин марні для немовлят, оскільки вони не стимулюють захисний імунітет. Однак рівень реактогенності менш важливий в таких випадках, як терапевтична протиракова вакцина. Знання імунобіології може допомогти виявити природу захисного імунітету, який повинен стимулюватися вакциною; певні імунні реакції можуть бути захисними, а інші – марними для запобігання або лікування конкретної інфекції. Наприклад, наявність природної інфекції може корелювати з появою антитіл проти певного мікробного антигену; це обумовлює ймовірність того, що даний антиген є вакцинним імуногеном. З іншого боку, дослідження в імунобіотехнології значною мірою полегшується або стає можливим при розробці експериментальної тваринної моделі, наявність якої дозволяє тестувати та оптимізувати можливі вакцини для досягнення ефективного захисту до того, як виводити кращі з них у фазу клінічних випробувань. Історично для конкретної вакцини є тільки обмежений ряд технічних підходів. Проте, з огляду на зростаючу кількість технічних підходів, у майбутньому, ймовірно, буде можливо створювати багато вакцин «на замовлення» для досягнення оптимальних ефективності та переносимості.

1.1. Живі вакцини

Живі вакцини готують з атенуйованих штамів (авірулентних або слабковірулентних), які нездатні викликати захворювання, але зберегли властивість розмножуватися в організмі. Вимоги до штамів для створення живих вакцин: 1 – повинні належати до слабковірулентних або авірулентних; 2 – мати високу антигенність та імуногенність; 3 – бути здатними до розмноження у конкретних органах, а також короткочасної персистенції в органах.

Деякі живі вакцини значно наближаються до «ідеальної вакцини», будучи здатними стимулювати захист на все життя з мінімальною реактогенністю при використанні однієї або двох доз. Такі вакцини можуть бути доступні у випадках, коли природна інфекція дає хазяїну захист на все життя. Ці вакцини складаються з мікроорганізмів (зазвичай вірусів), які реплікуються в організмі хазяїна таким же чином, як і природний мікроорганізм, тобто вакцина може сти-

мулювати імунну реакцію, аналогічну викликаній природною інфекцією. Жива вакцина атенується, її здатність викликати захворювання виключається. Необхідно забезпечити, щоб жива вакцина не залишалася ні недостатньо атенуваною (не зберігала патогенність навіть на мінімальному рівні), ні надмірно атенуваною (не була недостатньо інфекційною для функціонування як вакцини). Живі вакцини зазвичай викликають як гуморальний імунітет (антитіла), так і клітинний (наприклад, цитотоксичні Т-лімфоцити).

Жива вакцина може бути недостатньо атенуваною і згодом викликати своє природне захворювання з низькою частотою або бути повністю атенуваною, що значною мірою знижує імуногенність. Завдяки тому, що жива вакцина може реплікуватися, існує потенційна можливість її перетворення на більш властиву їй патогенну форму. Живі вакцинні штами можуть передаватися з вакцини невакцинованій людині, що може бути досить серйозним у разі, якщо реципієнт має імунодефіцит або проходить хіміотерапевтичне лікування раку.

Класичні стратегії. Термін «класичні» стосується технологічних стратегій, в яких не використовується технологія рекомбінантних ДНК. Виробництво живих вірусних вакцин ґрунтується на ефективному розмноженні вірусу в культурі клітин.

Атенуація *in vitro*. Розробка живих атенуованих бактеріальних вакцин класичними методами шляхом культивування бактерій *in vitro* для їх атенуації при збереженні імуногенності є не дуже успішною. Конкурентний або селективний тиск на бактерії, що робить їх менш вірулентними, при проведенні пасажів *in vitro* може бути невеликим; бактерії можуть припинити експресувати фактори вірулентності *in vitro*, але повернутися до їх експресії *in vivo* (реверсія).

Одна з широко розповсюджених живих бактеріальних вакцин, основана на серійних пасажах *in vitro*, – це вакцина проти туберкульозу. У перші десятиліття ХХ століття найважливішою спробою створення живих вакцин була розробка вакцини проти туберкульозу. Вона відома як БЦЖ – бацила Кальметта–Герена (BCG, *Bacillus of Calmette–Guerin*), за іменами двох французьких вчених, які отримали ослаблений штам туберкульозних бактерій. Вакцина була отримана протягом 13 років шляхом багаторазових серійних пасажів (231 послідовний пересів *in vitro*) штаму *Mycobacterium bovis*. Вакцина складається з

живого атенуйованого штаму *Mycobacterium bovis*. БЦЖ фактично була першою живою бактеріальною вакциною, в широких масштабах застосованою на людині. Досвід показав, що вакцини виготовлені з цих ослаблених туберкульозних бацил, абсолютно безпечні, і з 1950 року у Великій Британії та більшості інших країн почалися широкі компанії з імунізації школярів. Сьогодні імунізація вакциною БЦЖ проводиться у новонароджених на 3-7 день життя підшкірно. Ревакцинацію проводять дітям у віці 7 і 14 років. Щорічно вакциною БЦЖ прищеплюються близько 100 млн осіб.

Вакцина БЦЖ являє собою ліофілізовані живі мікобактерії вакцинних штамів, висушені в стабілізаторі – глютамінаті натрію. В одній дозі 0,05 мг вакцини міститься $1,5 \cdot 10^5 - 6,0 \cdot 10^5$ живих мікробних клітин. Всього зареєстровано 16 субштамів БЦЖ (відомо більше 30). Субштами розрізняються за морфологією клітин і колоній (від довгих паличок до кокоподібних форм), залишковою вірулентністю, імуногенністю, антигенним складом. Так, наприклад, субштам Токіо 172, отриманий в Японії, характеризується дуже дрібними клітинами, низькою залишковою вірулентністю, зниженою імуногенністю і незначною реактогенністю. Такі субштами прийнято називати «слабкими». «Сильні» субштами відрізняються більшою залишковою вірулентністю і високою захисною здатністю. У той же час ці штами більш реактогенні (штами, які використовуються у Франції – Pasteur 1173 P2, Данії – Copenhagen 1331, Болгарії – Sofia SL 222 та ін.). Вакцини, виготовлені з «сильних» субштамів, викликають великий відсоток гнійних лімфоденітів при вакцинації. Раніше в Україні використовували тільки вакцину, вироблену в Росії, в якій застосовано субштам БЦЖ (BCG – 1 Russia, що містить 4 антигени, відсутні у більшості інших субштамів), що займає при високій імуногенності середнє положення за залишковою вірулентністю серед інших субштамів, тобто при високих захисних властивостях вакцина має невисоку реактогенність. У теперішній час для вакцинації дітей в Україні використовують вакцину БЦЖ SSI виробництва Данії (Державний серологічний інститут, штам Copenhagen 1331, який відносять до сильних штамів).

Наявні вакцини БЦЖ відрізняються переносимістю, імуногенністю та ступенем ефективності захисту в клінічних випробуваннях. Вакцини БЦЖ зазвичай мають прийнятні профілі переносимості. Слід очікувати, що для ате-

нуації нового бактеріального штаму застосовуватимуться методики рДНК-технології. Тому, з огляду на наявні технічні та регуляторні стандарти, дуже ймовірно, що буде розроблена нова жива бактеріальна вакцина, атенуована із застосуванням виключно класичної стратегії.

Застосування першої класичної стратегії для вірусів стало можливим в 1950-х рр. Разом з можливістю вирощування вірусів у культурах клітин. Цей підхід є емпіричним, тобто вірус дикого типу, ізольований з людської інфекції, проходить пасажі *in vitro* через один або більше тип клітин з метою ослаблення його патогенності. В такому випадку може мати місце селективний тиск у напрямі меншого пошкодження клітин. Механізм, завдяки якому в ході атенуації вводяться мутації, не до кінця зрозумілий. У деяких випадках (наприклад, вірус поліомієліту) було можливо продемонструвати атенуацію на приматах, хоча в більшості випадків атенуація підтверджується лише в ході інтенсивних клінічних випробувань. Успіх даного емпіричного підходу, який застосовувався як для вакцин для перорального введення (вакцина вірусу поліомієліту (OPV) для перорального введення), так і для вакцин, що вводяться ін'єкційним (парентеральним) шляхом (кір, епідемічний паротит, краснуха, вітряна віспа), підтверджується кількістю наявних ліцензованих вакцин. Реактогенність таких вакцин досить низька для того, щоб деякі з них (поліомієліт, кір) були широко прийняті в усьому світі у звичайній педіатричній практиці. Завдяки інтенсивним програмам імунізації OPV поліомієліт рухається в бік викорінення в усьому світі.

Реасортантні геноми. Вірус-реасортант, отриманий після сумісного інфікування культури двома різними вірусами з сегментованими геномами, містить гени обох батьківських вірусів. Для підвищення ефективності ротавірусів тварин були ізольовані ротавіруси-реасортанти, які містять переважно гени ротавірусів тварин, що несуть фенотип атенуації для людини, а також ген(и) поверхневого білка ротавірусів людини, що стимулюють вироблення серотип-специфічних нейтралізуючих антитіл ротавірусу людини.

Ротавірусна інфекція викликає гострий гастроентерит і є однією з основних причин, що призводить до смерті від важкої дегідратуючої діареї у дітей молодше 5 років у всьому світі. Живі вакцини проти ротавірусного гастроентериту першого покоління являли собою атенуовані штами ротавірусів тварин: ротавіруси мавп RRV (Rhesus Rotavirus Vaccine Strain MMU 18006 G3P5B); би-

чачий – NCDV (Bovine Rotavirus Vaccine Strain RIT 4237 G6 [P6] UK G6 [P5]) і WC3 (Bovine Rotavirus Vaccine Strain WC 3 G6 P7) та ін. Ефективність вакцини проти ротавірусного гастроентериту на основі штаму RIT 4237 коливалася від 0 до 64 %, а проти важких форм – від 0 до 84 %. Вакцини не забезпечували відтворюваного захисту проти інфекції.

Далі виробничі вакцинні штами були використані для отримання вакцин другого покоління. З них були отримані реасортанти епідеміологічно важливих серотипів штамів ротавірусу людини G1-G4 і штамів ротавірусів тварин, здатних розмножуватися в кишечнику людини, не викликаючи захворювання. На основі штаму ротавірусу мавп резус RRV і штаму ротавірусу телят UK були розроблені тетравалентні вакцини RRV-TV і BRV-TV.

Перша ліцензована вакцина Rota Shield (RRV-TV, США) була дозволена до застосування в 1998 році. Ця вакцина містила три штами реасортанту, які мали: по 10 генів атенуйованого штаму RRV і по одному гену ротавірусу людини, що кодує VP7 серотипів G1, G2, G4 і штаму RRV з антигеном VP7 серотипу G3. Однак внаслідок підвищеного рівня проникнення в тканини, що спостерігався відразу після імунізації, застосування вакцини було припинено. Це відкликання показує, що безпека є ключовою проблемою при розробці нових живих вакцин.

У наш час активно використовуються вакцини проти ротавірусної інфекції на основі реасортантних штамів ротавірусу. Це вакцини RotaTeg і RotaRik. RotaTeg (Merck, США) містить антигени п'яти реасортантних штамів ротавірусу, геноми яких експресують білки VP7 (G1-G4) і VP4 ротавірусу людини і білки VP7 і VP4 ротавірусу теляти. Таким чином, вакцина RotaTeg містить живі реасортанти людського і бичачого типу, подана таким складом: реасортантом G1 не менше $2,0 \cdot 10^6$ інфікуючих одиниць (ІО); реасортантом G2 не менше $2,8 \cdot 10^6$ ІО; реасортантом G3 не менше $2,2 \cdot 10^6$ ІО; реасортантом G4 не менше $2,0 \cdot 10^6$ ІО; реасортантом P1A не менше $2,3 \cdot 10^6$ ІО. Як допоміжні речовини у вакцині присутні: сахароза, натрію цитрат дигідрат, натрію гідроксид, натрію дигідрофосфат, полісорбат 80.

Аналогічний підхід був застосований до вакцин проти грипу, в яких новий відібраний вірус грипу надавав гени, що кодують імуногенні поверхневі глікопротеїни (гемаглютинін і нейрамінідазу), а атенуйований вірус забезпечу-

вав всі інші гени, а також фенотип атенуації. Такі віруси грипу – реасортанти можуть бути адаптовані до росту в клітинних лініях ссавців, таких, як MDCK12 (лінія клітин нирок собаки), як клітинного субстрату замість курячих яєць. Переважна більшість сезонних і пандемічних вірусів мають реасортантне походження. Це насамперед стосується і сучасного вірусу грипу H1N1v-2009, який викликав пандемію грипу. Тому застосування живих грипозних вакцин для запобігання виникнення реасортантів з новими властивостями обмежено на підйомі захворюваності на грип і тим більше в умовах пандемії грипу.

Термочутливі мутанти. Вірусні мутанти можуть бути відібрані за їхньою здатністю до зростання при різних температурах. Ці віруси називаються термочутливими, нездатними до зростання при підвищених температурах, або адаптованими до холоду, відібраними за здатністю до зростання *in vitro* при температурах нижче фізіологічних (37 °C), тобто до 25 °C. Ідея, втілена в цьому підході, полягає в тому, що віруси будуть менш активними при зростанні *in vivo*, ніж батьківські віруси дикого типу, а отже, менш вірулентними та фенотипічно атенуйованими. Живі грипозні вакцини, вперше запропоновані А.А. Сморозинцевим у 1938 році, успішно застосовуються в Росії протягом багатьох років. У США жива інтраназальна вакцина була схвалена FDA у червні 2003 року і дозволена для використання у віковій категорії від 5 до 49 років. Завдяки багаторазовим пасажам на курячих ембріонах в умовах зниження температури стало можливим отримання ослабленого вірусу, який не реплікується при високих температурах, характерних для легенів людини, але здатний розмножуватися в носоглотці при температурі 34 °C, викликаючи локальну інфекцію, що призводить до вироблення секреторної та генералізованої імунної відповіді. У зв'язку з тим, що жива грипозна вакцина нагадує природну транзиторну інфекцію, вона має досить високу ефективність і, за різними даними, характеризується 94 %-вою сероконверсією у дітей, а в комбінації з інактивованою вакциною викликає позитивну імунну відповідь у 68 % літніх людей.

Хімічний мутагенез. Ще однією методикою створення атенуйованого штаму є хімічний мутагенез з подальшою селекцією. Таким способом було отримано штаму Ty21a *Salmonella typhi*, призначений для запобігання черевному тифу. Дозвіл на використання атенуйованого штаму отримано на основі даних про його безпеку та ефективність.

Рекомбінантні віруси. Підвищена стабільність фенотипу атенуації досягається внаслідок створення модифікацій або делецій у вірусних генах, досить великих для того, щоб повернення до вихідного стану шляхом зворотних мутацій було неможливим або вкрай мало ймовірним. На відміну від цього, атенуовані віруси, отримані із застосуванням класичних стратегій, можуть мати тільки точкові мутації, а отже, і здатність до повернення в початковий стан.

У гені вірусу простого герпесу (HSV), що кодує глікопротеїн, необхідний для інфекційності, була створена мутація. Даний глікопротеїн вводиться у вірус із клітинної лінії в ході культивування *in vitro*, і завдяки цьому отриманий вірус може ініціювати інфекцію *in vivo*, але не здатний поширюватися, що забезпечує його молекулярну атенуацію.

Рекомбінантні бактерії. Конструювати атенуовані бактерії складніше, ніж віруси, беручи до уваги значно більший розмір бактеріальних геномів. Стратегія полягає у виявленні гену(ів), відповідальних за бактеріальну вірулентність або колонізацію і виживання, а потім або видалення гену (кращий варіант), або виключення чи моделювання його експресії *in vivo*. Як і для вірусів, може існувати баланс між вірулентністю та активністю вакцини, що означає можливість надмірної атенуації бактеріального штаму до такої міри, коли він більше не здатний реплікуватися в достатній кількості для стимуляції ефективної імунної відповіді.

Атенуація штамів *V. cholerae* була проведена шляхом рДНК-спрямованої делеції генів, що кодують фактори (такі, як холерний токсин). Живі атенуовані можливі вакцини холери, виготовлені таким способом, пройшли клінічну оцінку, і одна з них була ліцензована. Щоб закріпити атенуацію, знизивши ймовірність повернення в початковий стан, бажано делетувати два або більше незалежних гени або генетичні локуси, які беруть участь у забезпеченні вірулентності.

Рекомбінантні вектори. Іншим застосуванням технології рДНК у розробці нових живих вакцин є конструювання вірусів в якості векторів для «чужорідних» поліпептидів інших патогенних мікроорганізмів. Метою створення таких векторів є презентація чужорідного антигену імунній системі в контексті живої інфекції, щоб імунна система реагувала на антиген, як на живий імуноген, і таким чином виробляла ширший імунітет (гуморальний і клі-

тинний) на відповідний патогенний мікроорганізм людини. Рекомбінантний поліпептид експресується в інфікованій клітині і транспортується до клітинної поверхні з метою стимулювання вироблення антитіл або розпадається на пептидні фрагменти, які транспортуються до клітинної поверхні. Дана стратегія також має потенційну перевагу ампліфікації імуногенного сигналу при реплікації живого вектора.

Вірусні вектори. Прототипом вірусного вектора є вірус коров'ячої віспи. У вірусі коров'ячої віспи експресували десятки різних рекомбінантних поліпептидів. Щонайменше на 25 моделях для різних інфекцій було показано, що вакцинація тварин може захистити їх від патогенного мікроорганізму, який кодує рекомбінантний поліпептид. Рекомбінантні віруси коров'ячої віспи, які експресують пухлинні антигени, також проявляли захисні функції в дослідженнях із введенням антигенного стимулу на моделі раку гризунів. З огляду на відомі ускладнення імунізації проти віспи, більш тяжкі у людей з ослабленим імунітетом, вірус коров'ячої віспи був сам по собі сконструйований таким чином, щоб знизити його вірулентність без зменшення його ефективності як живого вірусного вектора. Цитокіни можуть впливати на природу або величину імунної реакції. З метою селективного маніпулювання типом імунної відповіді на вакцинний антиген в контексті вакцинації живим вектором був сконструйований рекомбінантний вектор, експресуючий як цитокін, так і рекомбінантний вакцинний антиген. Віруси віспи свійської птиці та канарки розробляються як живі вектори, здатні інфікувати клітини людини, але не дають інфекційного вірусного потомства. Ця нездатність до поширення дозволяє класифікувати дані вірусні вектори також як вакцини на основі ДНК.

Інші віруси ссавців також послужили основою для конструювання живих векторів. Штами аденовірусів, які широко використовуються як вакцини серед військовослужбовців з метою запобігання гострих респіраторних захворювань, були сконструйовані таким чином, щоб експресувати чужорідні поліпептиди, і стимулювали захисний імунітет на декількох вірусних моделях антигенного стимулу у тварин. Оптимізація експресії рекомбінантних поліпептидів залишається важливою технічною задачею для всіх цих живих вірусних векторів.

РНК-віруси можуть бути сконструйовані аналогічним чином. Сіндбіс (Sindbis) та інші альфавіруси користувалися підвищеною увагою завдяки широ-

кому спектру хазяїнів, здатності інфікувати клітини, що не діляться, а також потенційного високого рівня експресії в перерахунку на клітину. З огляду на ці властивості, із Сіндбіс була розроблена вакцина на основі нуклеїнової кислоти.

Бактеріальні рекомбінантні вектори. На основі патогенних бактерій можна сконструювати живі рекомбінантні вектори для експресії чужорідних поліпептидних антигенів. Найбільш частим способом застосування було конструювання шлункових патогенних організмів таким чином, щоб вони могли індукувати імунітет слизових оболонок проти чужорідного поліпептиду при його пероральному введенні. У сфері розробки живих бактеріальних векторів, що стосуються розробки штамів, імунології, молекулярних розробок і клінічних випробувань, максимальні зусилля були сконцентровані на *S. typhi*, *V. cholera* і *S. flexneri* також були перетворені на рекомбінантні вектори для перорального введення для клінічної оцінки. Проблемою таких живих атенуєваних векторів залишається збереження достатньої вірулентності для реплікації в травному тракті та експресія чужорідних поліпептидів на необхідному рівні, а також досягнення достатньої атенуації для забезпечення прийнятної переносимості. Здатність деяких з цих видів бактерій реплікуватися всередині клітини може посилити здатність експресованих чужорідних поліпептидів стимулювати клітинні імунні реакції проти відповідних патогенних організмів.

Серед перспективних розробок вірусних вакцин перевага віддається створенню мукозальних препаратів, тобто препаратів, що вводяться в слизову оболонку. Можливе створення ректальних живих вакцин проти вірусних інфекцій на основі атенуєваних рекомбінантних штамів *Salmonella*, які несуть протективні вірусні антигени. Супозиторії для імунопрофілактики вірусних інфекцій містять такі компоненти: на один супозиторій масою 2.0 г мас. % суспензія клітин рекомбінантних атенуєваних штамів *Salmonella*, трансформованих рGEX-2T-BI, рсDNA-TCI або рКНВс, що несуть гени проти вірусних антигенів і що входять в супозиторну основу в кількості 10^6 – 10^9 живих клітин. Застосування супозиторіїв дозволяє індукувати специфічний гуморальний і клітинний імунітет у відповідь на відповідні антигени. Непатогенні атенуєвані штами *Salmonella* здатні інвазувати слизову і деякий час жити в клітинах лімфоїдної тканини організму ссавців. Клітина-вектор, будучи природним депо і ад'ювантом для антигену, представляє його в максимально імуногенній формі,

збільшує час персистенції і сприяє накопиченню антигену в імунокомпетентних клітинах.

1.2. Субодиничні / інактивовані вакцини

Перевага субодиничних вакцин полягає в їх нездатності розмножуватися в організмі хазяїна. Зазвичай вони добре переносяться, особливо більшість таких вакцин, що піддаються багатоступінчастому очищенню з метою видалення інших макромолекул. Імуногенність такої вакцини можна посилити шляхом її спільного введення з ад'ювантом або за допомогою системи доставки. Проте слід починати програму розробки з розумінням того, що для досягнення тривалого захисного імунітету потрібно неодноразове введення вакцини, часто з подальшим введенням бустерних доз. Такі вакцини зазвичай функціонують шляхом стимулювання гуморальної імунної реакції, а також ініціювання імунологічної пам'яті.

Необхідно зазначити, що конструювання рекомбінантних вірусних вакцин включає в себе:

- клонування і експресію в різних векторах індивідуальних вірусних генів з метою отримання вірусних антигенів у різних експресійних системах в якості високоочищених вакцинних препаратів;
- клонування і експресію індивідуальних вірусних антигенів з метою отримання вірусоподібних частинок;
- клонування і експресію вірусних антигенів в еукаріотичних векторах з метою отримання ДНК-вакцин.

Для розгляду даного питання зупинимося на протигрипозних вакцинах. На поверхні вірусної частинки локалізуються такі білки-антигени: гемаглютинін (H), нейрамінідаза (N) і білок M2. Встановлено, що в «голівці» апікальної частини молекули H локалізується 5 антигенних сайтів, і вірус-нейтралізуюча активність антитіл пов'язана з імунною відповіддю на ці сайти. Антитіла до H блокують взаємодію вірусу з клітинними рецепторами, тобто інфікування клітин. Антитіла до N блокують виділення вірусів інфікованими клітинами (тобто поширення інфекції). Антитіла до білка M2 також значною мірою блокують від'єднання інфекційних вірусних частинок від мембран інфікованих клітин.

Виходячи із зазначеного вище ясно, що з трьох основних поверхневих білків принципове значення має Н, що і лежить в основі технології виробництва суб-одиночних вакцин, які містять переважно Н. Вважається, що імунітет на Н має допоміжне значення. Білок М2 через високу консервативність став об'єктом для конструювання універсальної вакцини проти грипу А.

Таким чином, рекомбінантні вакцини з використанням індивідуальних компонентів вірусів грипу типу А орієнтовані головним чином на ключовий і сильно варіабельний компонент вірусу – молекулу Н. Із внутрішніх антигенів вірусної частинки як матеріал для отримання вакцин активно розглядаються білки NP, M1, NS1.

1.3. Цілісний патогенний організм

Найперший підхід до виготовлення інактивованих вакцин полягає у використанні цілісних бактерій або вірусів з метою стимулювання утворення антитіл до багатьох антигенів, деякі з яких зможуть нейтралізувати патогенний організм.

Бактерії. Такі вакцини виготовляються шляхом культивування бактерій, збору клітин та їх інактивації за допомогою нагрівання або хімічних агентів, таких, як мертиолят, фенол, формалін. Кінцева вакцина не піддається подальшому очищенню. Завдяки відсутності очистки таких вакцин, які містять практично всі бактеріальні клітинні компоненти (а також продукти метаболізму і залишкові кількості поживних середовищ), їх реактогенність при парентеральному введенні (наприклад, *Bordetella pertussis* або *St. aureus*) зазвичай вище, ніж у інших типів вакцин. З іншого боку, інактивовані цілісноклітинні вакцини *V. cholerae* та ентеротоксигенної *Escherichia coli* добре переносяться при пероральному введенні. Пероральна інактивована цілісноклітинна вакцина холери (WCC), позбавлена токсину (і його токсичного впливу), як виявилось, добре переноситься, а її рівень ефективності склав приблизно 60 % при випробуванні на популяції високого ризику протягом 3 років. Для стимуляції антитіл, які зможуть нейтралізувати токсини і підвищити ефективність, рекомбінантна В-суб-одиноця токсину, яка не має активності токсину, незалежно експресується, очищається і знову додається до вакцини WCC. Показано, що ця комбінована

вакцина WCC + r-B-субодиниця токсину має дещо вищий рівень ефективності, ніж сама вакцина WCC.

Віруси. Деякі інактивовані вірусні вакцини використовуються вже протягом десятиліть і зазвичай добре переносяться. Оскільки віруси при вирощуванні *in vitro*, як правило, виходять у клітинне культуральне середовище, то збирають середовище від інфікованих культур, що не містить клітин. Великий розмір частинок вірусів у порівнянні з іншими макромолекулами середовища дозволяє легко відокремити частинки з використанням простих технологій очищення на основі поділу частинок за розміром. Прикладами таких вакцин є віруси поліомієліту, грипу, сказу та японського енцефаліту. В альтернативному підході, що застосовується у випадку вбитої вірусної вакцини гепатиту А (HAV), інфіковані клітини піддають лізису і проводять очистку вірусних частинок. Вірусні частинки інактивуються хімічним шляхом, зазвичай за допомогою обробки формаліном, а потім їх дія може посилюватися за рахунок ад'ювантів (наприклад, гідроксиду або фосфату алюмінію). Можливе використання ліпосом для посилення імуногенності вірусних вакцин.

У Швейцарії в Swics Serum and Vaccine Institute розроблена і ліцензована ліпосомальна вакцина проти гепатиту А – «Eрахal -Berna»; фірмою «Lірохен» запропонована вакцина проти гепатиту В – «НераХел». Тривають розробки й інших вірусних вакцин: проти сказу, герпесу. Фірмою «Lірохен» розроблена платформа «ImmuХен», що дозволяє розробляти ліпосомальні форми вакцинних вірусних матеріалів в імунну систему таким чином, щоб імітувати реакцію природного контакту з інфекційним агентом. Технологія «ImmuХен» викликає сильні імунологічні реакції подібні до тих, які досягаються за допомогою ослаблених вакцин, при цьому повністю зникає ризик зараження. Як приклад наводимо склад ліпосомальної вакцини для профілактики грипу «Інфлексал V», виробництва Berna Biotech (Швейцарія), що містить фосфатидилхолінові віросоми, очищені гемаглютиніни і нейрамінідазу грипу А і В: А (H1N1) – 15 мкг; А (H3N2) – 15 мкг і В – 15 мкг. Допоміжні речовини: фосфатидилхолін, натрію хлорид, фосфати натрію і калію.

У наших попередніх матеріалах більш детально розглянуті питання отримання і характеристики ліпосомальних вакцинних препаратів [3].

Захисні епітопи на поверхні багатьох некапсульованих дрібних вірусів, що стимулюють захисну імунну реакцію часто мають конформаційну структуру, будучи сформованими з високоорганізованої сукупності структурних білків в антигенні структури. Для більшості перерахованих вірусів, для яких були розроблені і зареєстровані інактивовані вакцини, виявилось неможливо повністю відтворити конформацію таких епітопів за допомогою інших технологій, наприклад, рекомбінантних поліпептидів. Інактивовані вірусні вакцини зазвичай мають високу імунологічну активність, наприклад, 1 доза вакцини гепатиту А забезпечує захист у кількості 50 нг. Таким чином, ця класична стратегія, що характеризується бездоганною історією створення добре переносимих і ефективних вакцин, залишається вельми перспективною технологією, яка обирається для багатьох вірусних вакцин.

1.4. Білкові вакцини

Розробка вакцини на основі білка є кращою стратегією для багатьох патогенних організмів, в яких поліпептид містить захисні епітопи, враховуючи вищевказані моменти, що стосуються інактивованих вакцин. Підходи, які беруть за основу білок, ґрунтуються на генетичних, біохімічних та імунологічних методиках, що дозволяють виявляти захисні епітопи та їх відповідні поліпептиди як можливі вакцинні антигени.

Останнім часом, у біотехнології, замість раніше необхідних біохімічних даних або інформації про антигени, дозволяють виявляти нові вакцинні антигени. Як тільки отримана повна послідовність (або її частини) геномної ДНК або РНК, виявляються відкриті рамки зчитування. Отриману амінокислотну послідовність можна перевірити на наявність структурних властивостей, таких, як гомологія з білками інших споріднених патогенних організмів, які є кандидатами для створення вакцин, або гідрофобні N-кінцеві послідовності, які передбачають поверхневу локалізацію. Гени експресуються в рекомбінантних клітинах хазяїна (зазвичай *E. coli*), а рекомбінантний поліпептид очищається і використовується для імунізації тварин з метою отримання поліклональних антитіл для того, щоб виявити, чи виробляється патогенним організмом даний гіпотетичний білок. Антисироватку можна використовувати також для біологіч-

них аналізів (нейтралізація вірусів, опсонізація бактерій), щоб перевірити чи може даний білок бути привабливим кандидатом для створення вакцини. Новий білок може також використовуватися для імунізації та контрольного зараження тваринної моделі. Деякі з ранніх застосувань технології геноміки до вірусів мали на меті виявлення вірусу гепатиту С (HCV) і вірусу гепатиту Е (HEV), що привело до безпосереднього визначення ймовірних вакцинних антигенів. Геномний підхід був застосований і до *Neisseria meningitidis*, в ході чого було виявлено кілька ймовірних вакцинних антигенів.

Природні. Перші вакцини на основі білка були основані на природних джерелах антигенів. У даному відношенні вакцина гепатиту В першого покоління унікальна тим, що в ній за джерело вакцинного антигену використовується тканина людини (плазма).

Гепатит В – захворювання, що передається парентеральним або статевим шляхом і є однією з причин захворюваності і смертності на планеті. Інфікування вірусом гепатиту В викликає різні клінічні прояви: блискавичну, гостру, хронічну і приховані форми гепатиту. Блискавична і гострі форми є вкрай важкими і дають високу смертність. Хронічний гепатит несе відповідальність за поширення вірусу і потенційно може розвинутися в цироз і рак печінки. Щороку помирає понад мільйон хронічних вірусоносіїв. Вакцинопрофілактика – єдиний ефективний спосіб попередження цього захворювання.

Спочатку було створено вакцину для профілактики гепатиту В, яку отримували із плазми людини. Вельми цікавим є досвід, накопичений у ході створення інактивованої вакцини проти вірусу гепатиту В, який, як відомо, не культивується *in vitro* і не розмножується в організмах тварин, придатних для широкого використання. Клітини печінки людей, хронічно інфікованих вірусом гепатиту В виділяють надлишок вірусного поверхневого білка, тобто поверхневого антигену гепатиту В – (HBs-Ag) в кров у вигляді вірусоподібних частинок розміром 22 нм із захисними епітопами. Тому для виробництва вакцини було запропоновано вилучати із плазми клінічно здорових антигено-носіїв поверхневий антиген (HBs-Ag), очищати і концентрувати його, а потім інактивувати формаліном. Антиген виділяли за допомогою ультрацентрифугування, хроматографії та ферментативної обробки. Отриманий препарат піддавали інактивації для знищення вірусу гепатиту В та інших потенційно патогенних для організму

людини контамінантів. Препарат проходив клінічні випробування в США, Франції, Англії, Голландії, Японії. Однак у зв'язку з технологічними труднощами при отриманні вакцини, обмеженістю в сировині і можливості контамінації препарату ця вакцина не отримала широкого застосування.

З 1987 року стали доступні дві рекомбінантні вакцини, які виробляються дріжджами і містять головний поверхневий білок вірусу гепатиту В – S-білок (HBs-Ag), вироблені лідерами виробництва вакцин: Merck Sharp Dohme (США) і Smith Kline Beecham (Бельгія). За оцінкою FDA було визнано безпеку вакцини проти гепатиту В на основі дослідження 12 млн доз, введених дітям у віці до 12 місяців. Вакцина продемонструвала високу ефективність для захисту від гепатиту В. У наш час рекомбінантну вакцину для профілактики гепатиту В виробляють: GlaxoSmithKline (Бельгія), Heberbiotec (Куба), Verna Biotech (Корея), Instituto Butantan (Бразилія), науково-виробнича компанія «Комбіотех» (Росія) і ряд інших виробників. В Україні дана вакцина входить до переліку обов'язкових щеплень «Календаря щеплень».

Білки, очищені з культур *B. pertussis*, комбінуються для створення неклітинних вакцин проти кашлюку, які повинні замінити цілісноклітинну вакцину кашлюку для поточних педіатричних вакцинацій в багатьох розвинених країнах. Залежно від кількості різних білкових антигенів, ці вакцини називають одно-, дво-, три-, чотири- або п'ятикомпонентними; дані вакцини були ліцензовані на підставі недавніх досліджень ефективності. Всі ці вакцини містять як компонент токсод кашлюку.

1.5. Хімічна інактивація

Багато бактерій виробляють білкові токсини, відповідальні за патогенез інфекції. Уже кілька десятиліть тому стало відомо, що якщо токсин після інфікування залишався патогенним, то антитоксини (антисироватка, збагачена токсин-специфічними антитілами), які були ефективними в нейтралізації активності токсину *in vivo*, можуть запобігти або змінити в кращий бік симптоми деяких бактеріальних інфекцій. Цей прецедент став підґрунтям для введення бактеріальних токсинів до складу активних вакцин. Молекули токсину очищаються із бактеріальних культур (наприклад, *Corynebacterium diphtheriae* (D),

Clostridium tetani (Т), *B. pertussis* (Р)), а потім проходять детоксикацію шляхом інкубації з таким хімічним реагентом, як формалін або глутаральдегід. Токсини, позбавлені токсичних властивостей, названі токсосоїдами (анатоксинами), являють собою дві частини (D, Т) комбінованої вакцини проти дифтерії, правця та кашлюку (DTP). Кашлюковий анатоксин, поєднаний з іншими антигенами кашлюку, складає ацелюлярні кашлюкові вакцини. В основі процесу знешкодження токсину лежить принцип незворотної зміни ділянки його білкової молекули, відповідальної за прояв токсичності, при повному збереженні антигенної активності. Наприклад, метод детоксикації дифтерійного токсину формальдегідом при температурі 37 °С був запропонований Рамоном в 1924 році. При вивченні механізму анатоксинування було встановлено, що процес переходу токсину в анатоксин проходить у два етапи. Перший етап пов'язаний з реакцією між формальдегідом і NH₂-групою білка. При цій реакції утворюється метиламінна група. На цьому етапі детоксикація дифтерійного токсину проходить дуже швидко; вже на 1-2 добу спостерігається зниження токсичності на 95 %. Однак таке знешкодження зворотне, і, якщо з препарату видалити надлишок формаліну, токсичність відновлюється (реверсія). На другому етапі відбуваються внутрішньо-молекулярні реакції: метиламінні групи взаємодіють з деякими активними радикалами амінокислот (амідні, індольні, фенольні та ін. групи), що призводить до створення стабільних метиленових містків. Стабільного знешкодження можна домогтися тільки після другого етапу формальдегідної детоксикації – утворення метиленових груп. Другий етап є незворотним. Він проходить досить повільно (20–40 діб) при температурі 39–40 °С в зоні нейтральних або слабколужних значень рН і завершується утворенням дифтерійного анатоксину. Необхідно відзначити, що умови детоксикації токсинів специфічні для кожного виду токсину.

1.6. Генетична інактивація

Хімічна процедура отримання анатоксинів має певні недоліки, в тому числі зміна захисних епітопів, що веде до зниження імуногенності, і потенційне повернення до біологічно-активного токсину (реверсія). Для отримання стабільних анатоксинів кашлюку створювалася мутація кодонів амінокислот, необ-

хідних для біологічної активності токсину (аденозиндифосфат (ADP) рибозилтрансфераза). Змінений ген замінив собою нативний ген у батьківському організмі, на основі якого потім був отриманий імуногенний, але стабільно інактивований анатоксин кашлюку. У вдосконаленому варіанті цієї стратегії в токсин кашлюку були введені дві мутації для забезпечення неможливості повернення в початковий стан. Цей подвійний мутант кашлюкового токсину (який також обробляється формаліном у більш м'яких умовах, щоб поліпшити його імуногенність або стабільність) є компонентом ацелюлярної вакцини кашлюку. У близькому до цього варіанті застосування мутантні культури *C. diphtheriae* піддавали скринінгу для виявлення секреції ферментативно неактивних, але антигенних молекул анатоксину. Подальше клонування і секвенування одного з таких мутантних генів токсину виявило мутацію однієї амінокислоти у ферментативно активному сайті (також ADP-рибозилтрансферази). Цей генетичний анатоксин (CRM197)⁴⁷ є білком-носієм ліцензованої кон'югованої вакцини Hib. Дана технологія застосовувалася також до токсину *V. cholerae* (CT) та ін.

1.7. Рекombінантні поліпептиди

Першим застосуванням технології рДНК при виробництві вакцин було створення вакцини проти гепатиту В. Враховуючи те, що отриманий з крові HBs-Ag проявив себе як ефективна вакцина із доброю переносимістю, ген S, який кодує HBs-Ag, експресували в пекарських дріжджах *S. cerevisiae*, що приводило до утворення частинок HBs-Ag розміром 22 нм всередині клітин. Поверхня HBs-Ag подібна поверхні віріонів HBV. Вакцина, отримана з дріжджів, доступна у всьому світі у великих кількостях, значною мірою витіснила настільки ж ефективну і добре переносиму вакцину на основі плазми. Крім того, HBs-Ag експресували в трансгенному листі тютюну і бульбах картоплі; виділений і очищений HBs-Ag зберігав високу імуногенність.

Проводяться численні наукові дослідження, розробки та застосування технології рДНК до виробництва білків – можливих компонентів вакцин. Основний поверхневий білок *Borrelia burgdorferi* (OspA), експресований у *E. coli* у вигляді рекombінантного ліпопротеїну, був зареєстрований як вакцина проти хвороби Лайма. Отримані рекombінантним шляхом глікопротеїни HSV,

експресовані в клітинах яєчників китайського хом'яка (CHO) і введені у вакцину, були досліджені на клінічних випробуваннях.

Найчастіше великі частинки більш імуногенні, ніж окремі поліпептиди. Більш того, як і у випадку VLP HBs-Ag, частинки зазвичай стимулюють вироблення антитіл на їхні конформаційні епітопи, тоді як ізольовані поверхневі поліпептиди можуть не стимулювати продукування таких антитіл. Віріон людського вірусу папіломи (HPV) – це високоорганізована структура, основним білком якої є L1. Експресія L1 в клітині (наприклад, *S. cerevisiae*) призводить до утворення VLP L1, який після імунізації стимулює вироблення антитіл, які зв'язуються з віріонами. Рекombінантні VLP ротавірусу і парвовірусу також експресувалися у вигляді потенційних батьківських вакцин.

Багато клітин-хазяїв використовувалися для експресії гетерологічних рекombінантних генів. Крім зазначених раніше (*E. coli*, *S. cerevisiae* і CHO), були розроблені системи експресії для клітин інших видів бактерій і дріжджів, а також інших стабільних клітинних ліній (SCL) ссавців, наприклад, клітини нирки африканської зеленої мавпи (Vero). Цілі тварини і рослини також можуть використовуватися як хазяїн для рекombінантної експресії. В цілому, дрібніші білки, які не потребують посттрансляційних модифікацій, можуть ефективно експресуватися у вихідній формі в мікробних системах експресії. На відміну від цього поліпептиди, яким для імуногенності потрібні посттрансляційні модифікації, наприклад глікозилування для належної імуногенності, експресуються в SCL ссавців, здатних до правильного здійснення таких модифікацій.

1.8. Носії

Новим підходом в галузі рекombінантних вакцин є застосування частинок дріжджів Ту-елемент як носіїв чужорідних білків. Дріжджовий Ту-елемент – це частинка, що збирається в *S. cerevisiae*, яка не здатна до реплікації в організмі ссавців. Для отримання багатокопійних трансформаторів за допомогою векторів інтеграція може бути здійснена в повторювані ділянки хромосомної ДНК *S. cerevisiae*, наприклад, в тандемний повтор генної РНК або в мобільний ретро-транспозон дріжджів (Ту-елемент). Ретротранспозон – це елемент, який переміщується, в еукаріотичних організмах, що має гени, цикл реплікації та інтегра-

ційний механізм, подібний до ретровірусу. Крім того, такі транспозони присутні в дріжджах (Ту-елемент). Можна експресувати ген, що кодує чужорідний білок, спільно з генами Ту таким чином, що чужорідні білки разом з білками Ту будуть збиратися у змішані частинки. Завдяки тому, що чужорідні білки експресуються на поверхні цих великих частинок, їх імуногенність як вакцинних антигенів може бути посилена.

Носії, на основі білків. У багатьох випадках було можливо ідентифікувати в складі поліпептиду В-клітинні епітопи, проти яких спрямована дія нейтралізуючих антитіл. Багато В-клітинних епітопів є конформаційними, що утворюються внаслідок накладання у тривимірному просторі залишків амінокислот із різних частин поліпептиду. Це означає, що даним епітопам для належної імуногенної презентації потрібен повний поліпептид. На відміну від цього, інші пептидні епітопи лінійні за своєю природою і мають усі антигенні властивості навіть у вигляді коротких лінійних послідовностей довжиною близько 6–20 послідовних амінокислотних залишків поліпептиду. Деякі лінійні епітопи мають слабку імуногенність при їх презентації на тлі повного поліпептиду. В інших випадках природні пептиди були б ефективними вакцинними антигенами, якби їх можна було зробити досить імуногенними. Лінійні В-клітинні епітопи даного типу були визначені для малярійного білка циркумспорозоїт (circumsporozoite (CS) – повторна послідовність, що складається з 4 амінокислотних залишків) і для білка пілус (pilus) *Pseudomonas aeruginosa*. Обидва ці поліпептиди містять лінійні епітопи, що розпізнаються антитілами, які нейтралізують відповідні патогенні мікроорганізми, проте цілі поліпептиди слабо стимулюють вироблення таких антитіл. Цікавим є припущення, що це явище може являти собою механізм, за допомогою якого ці та інші патогенні організми еволюціонували з метою уникнення імунологічного контролю, роблячи свої епітопи нейтралізації менш імуногенними.

Застосування таких стратегій (злитий білок, кон'югат, комплексний пептид) до слабо імуногенних лінійних епітопів призвело до імуногенних презентацій, які стимулювали значно вищі титри нейтралізуючих антитіл порівняно з тими, які стимулюються епітопами, презентованими на тлі природного цілого поліпептиду. Проте найефективніша стратегія за показниками кінцевої клінічної користі повинна визначатися у кожному конкретному випадку.

Носії на основі злитого білка. Імуногенність лінійних епітопів можна підвищити за допомогою генетичного злиття певних епітопів з білком-носієм, який формує велику частинку з метою поліпшення імунної презентації пептиду. Двома зазвичай використовуваними білками-партнерами у злитті такого типу є HBs-Ag і ядерний білок гепатиту В – частинка розміром 28 нм, яка кодується вірусом гепатиту В. Злиття може відбуватися за N-кінцем, C-кінцем або внутрішньою частиною поліпептидної послідовності білка-партнера, залежно від того, яке розташування забезпечує найкращу імуногенну презентацію при збереженні ефективного формування частинок.

Носії на основі кон'югатів. Пептид може бути хімічно кон'югованим із білком-носієм. Пептидна послідовність синтезується хімічним шляхом разом з реактивним амінокислотним залишком, за допомогою якого відбувається кон'югація з білком-носієм. Найчастіше як білки-носії в кон'югаті використовують бактеріальні білки, з якими часто стикається людина, такі, як правцевий токсод (ПТ), кон'югат якого з малярійним епітопом CS пройшов клінічні випробування.

Носії на основі комплексного пептиду. Можна синтезувати мультимери пептидної послідовності для сумісного зв'язування в повторювані масиви, що застосовується для пептидних епітопів малярійного CS і gp120 HIV-1.

Носії на основі Т-клітинних епітопів. Пептидні епітопи, які розпізнаються цитотоксичними Т-лімфоцитами (CTL), можуть бути корисними імуногенами для профілактики інфекцій, що викликаються такими збудниками, як HIV, або для імунотерапії хронічних захворювань, таких, як гепатит В. Епітопи пептиду CTL зазвичай є слабкими імуногенами. Тому для імунотерапевтичної вакцини гепатиту В епітоп CTL з ядерного білка HBV був модифікований шляхом ковалентного зв'язування з Т-хелперним епітопом (з токсодом правця), а також з двома молекулами пальмітинової кислоти. В ході клінічних випробувань було показано, що дана вакцина має достатню імуногенність для стимуляції HBV-специфічних CTL і CTL пам'яті. Меланома-специфічні Т-клітинні епітопи у вигляді пептидів використовувалися в імпульсній обробці дендритних клітин *in vitro* для доставки пацієнту, при цьому спостерігалось деяке зниження розміру пухлини.

Носії на основі полісахаридів. Ряд грамнегативних і грампозитивних бактерій утворюють капсульну структуру, яка містить полісахариди (ПС). Здатність бактерій до утворення капсул значною мірою визначає взаємодію між бактеріальними клітинами і організмом хазяїна при розвитку інфекційного процесу. Капсульні антигени відіграють важливу роль у вірулентності та імунногенності бактерій. Є залежність між наявністю у бактерій капсули та їх токсичністю. Встановлено, що гемолітична активність також властива переважно капсульним формам бактерій. Капсульні антигени здатні пригнічувати фагоцитоз бактерій і створювати умови для розмноження збудників інфекції в організмі хазяїна. Капсульні полісахариди несуть в собі основну серологічну антигенність бактеріальних видів і успішно взаємодіють з антитілами до даних бактерій. Такі полісахариди являють собою ефективні вакцинні антигени. Як приклад використання полісахаридних вакцин можна навести препарат, що містить очищені капсульні полісахариди *Streptococcus pneumoniae* (Pneumo 23 – PPV 23). Вакцина є полівалентною та містить полісахариди з 23 серотипів бактерій, містить по 25 мг кожного полісахариду в дозі. Використовується для підшкірного та внутрішньом'язового введення. Вакцина PPV 23 (Sanofi Pasteur) ефективна проти 90 % нечутливих до пеніциліну пневмококів і 96 % пневмококів, що викликають захворювання. У деяких випадках для конкретного патогенного організму є єдиний серотип полісахариду, наприклад, Hib проти інвазивного менінгіту. В цьому випадку можна створити моновалентну вакцину. Однак у більшості випадків мають місце численні серотипи капсульних полісахаридів (близько 90 для *Streptococcus pneumoniae*), і такі вакцини повинні бути мультивалентними, щоб мати досить високий рівень загальної ефективності. Ці вакцини першого покоління були просто очищеними полісахаридами і мали низькі протективні властивості.

Гемофільна інфекція (збудник – *Haemophilus influenzae* b (Hib)) є основною причиною гнійного менінгіту у дітей до двох років життя, який часто призводить до серйозних неврологічних ускладнень і летальних наслідків. Крім менінгіту, Hib викликає перикардити, ендокардити, перитоніти та інші гнійно-септичні захворювання. Зараження відбувається повітряно-крапельним шляхом. За даними ВООЗ, щорічно від даних інфекцій помирає близько 500 000 дітей у всіх країнах світу.

У багатьох, якщо не в більшості, вивчених інкапсульованих бактерій, антитіла, спрямовані проти капсульних ПС, здатні захищати проти інфекції. Ці спостереження дозволили використовувати капсульні ПС як вакцинні антигени.

1.9. Прямі полісахаридні вакцини

Нативний капсульний ПС містить до сотень повторюваних одиниць, характерних для кожного виду бактерій і антигенного підтипу, в якому кожен номер складається з поєднання моносахаридів, фосфатних груп і дрібних органічних компонентів. ПС вивільняються організмом у міру його росту і збираються із культурального середовища. Ці препарати ПС зазвичай імуногенні для дорослих і дітей старше 2 років і стимулюють вироблення антитіл, які можуть опосередковувати опсонізацію організму, таким чином захищаючи його від інфекції. Вакцини ПС ліцензовані для Hib64 (моновалентні для серотипу b), *Neisseria meningitidis* (квадривалент) і *Streptococcus pneumoniae* (23-валентна). Недолік цих вакцин полягає в тому, що ПС, будучи імуногенами, незалежними від Т-клітин (ТІ), мають слабку імуногенність або не проявляють імуногенність у дітей молодше 2 років і не стимулюють імунологічну пам'ять у старших дітей і дорослих.

Кон'югат полісахаридних вакцин. Хоча діти молодше 2 років не можуть ефективно розпізнавати імуногени ТІ, вони можуть проявляти імунологічні реакції на залежні від Т-клітин (ТD) імуногени, наприклад, білки. Хімічна кон'югація ПС з білком-носієм перетворює ПС з ТІ на ТD-імуноген. Внаслідок цього вакцини у вигляді кон'югату ПС-білок можуть стимулювати захисний імунітет IgG та імунологічну пам'ять у немовлят і маленьких дітей. Дана стратегія особливо важлива для інкапсульованих бактерій, таких, як Hib і *S.pneumoniae*, внаслідок переважання інвазивних захворювань, що викликаються цими бактеріями, у дітей молодше двох років, для яких вакцина ПС неефективна.

Перша ліцензована вакцина Hib містила полірибо-силрибатолфосфат (PRP), полісахарид капсули мікроорганізму. Однак полісахаридна вакцина була недостатньо імуногенною для дітей молодше 2 років. У зв'язку з цим вона була дозволена до використання тільки для дітей старше 18 місяців. Дослідження у

Фінляндії (1977 рік) підтвердило значне зниження НІв-захворювань і ефективність PRP-вакцини в 90 % випадків. У той же час вивчення вакцини в США показало її менш надійну ефективність. В результаті цих досліджень і суттєвої потреби мати вакцину для малолітніх дітей почалися розробки зі створення кон'югованих вакцин. Такі кон'юговані вакцини, в яких НІв-полісахарид пов'язаний з білком, мають ряд переваг: індукують високі титри антитіл; більш імуногенні для малолітніх дітей; демонструють високу імунну відповідь при ревакцинації. У 1989 році було дозволено до використання у дітей молодше 18 місяців чотири кон'югованих вакцини:

1. (PRP-D) містила полісахарид, кон'югований з дифтерійним анатоксином;
2. (НвОС) містила полісахарид, кон'югований з нетоксичним мутантним дифтерійним токсином, відомим як CRV 197;
3. (PRP-OMR) містила полісахарид, кон'югований з білком зовнішньої мембрани *Neisseria meningitidis*;
4. (PRP-T) містила полісахарид, кон'югований з правцевим анатоксином.

Вивчення імуногенних властивостей чотирьох вакцин у процесі трьох імунізацій продемонструвало суттєві відмінності в продукції антитіл.

Структура капсульного полісахариду (PRP), що відіграє важливу роль у вірулентності бактерії *Haemophilus influenzae*, встановлена як 3-В-D-рибофунарозил(1-1)-D-рибітол-5-фосфат.

Таким чином, на ринку вакцин наявні чотири різні ліцензовані вакцини-кон'югати НІв. Всі вони мають різні білки-носії (ТТ, DT, CRM197 і зовнішній мембранний білковий комплекс *N. meningitidis* групи В) з різними розмірами та імунологічними параметрами, різні довжини ланцюга ПС і різні технології кон'югації.

В теперішній час для профілактики захворювань викликаних *H. influenzae* і *N. Meningitides*, широко використовують кон'югати полісахаридних вакцин, виробництва Sanofi Pasteur. Для профілактики менінгококової інфекції використовують вакцину «Менактра», яка містить полісахариди серогрупи: А, У, W135 в кількості 4 мг кожен. Кожен полісахарид кон'югований з дифтерійним анатоксином у кількості 48 мг. Кон'югат вакцини НІв містить полісахарид пов'язаний з правцевим анатоксином.

1.10. ДНК вакцини. Вірусна і бактеріальна доставка

Новий підхід, який дозволяє індукувати в організмі імунну відповідь без введення антигену і ґрунтується на включенні в клітини тварини-мішені гена, що кодує білок-антиген, привів до появи нового типу вакцин – ДНК-вакцин (генетична імунізація). Виявлено, що фрагменти ДНК вірусів і бактерій, імплантовані в клітини тварин, здатні синтезувати власні білки. Клітини, які отримали гени іншого організму, у відповідь починають виробляти антитіла на заново синтезовані білки. Експерименти зі створення ДНК-вакцин ведуться переважно з бактеріальними плазмідами – невеликими стабільними кільцевими позакромосомними ДНК. Перевага плазмід у тому, що вони самі по собі не провокують розвиток інфекції. Їх використовують як вектор – засіб доставки. Для того щоб викликати необхідну імунну відповідь, виділені з бактерій плазмиди модифікують, вносячи певні зміни в структуру ДНК, а саме «вшивають» гени, які кодують один або кілька конкретних білків-антигенів, які виробляються конкретними вірусами або бактеріями. Так само вбудовуються в плазмиду гени, необхідні для забезпечення експресії всієї конструкції. Дуже важливо, що фрагменти ДНК, відповідальні за відтворення і розвиток інфекційного процесу, в плазмиди не вводяться.

Однією зі стратегій було внутрішньом'язове введення розчину ДНК, що кодує вакцинний антиген. Клітини поглинають плазмідну ДНК, транскрибують її та синтезують антиген, який може проходити таку ж обробку, як і в процесі вірусної інфекції. Перевагами використання ДНК є відносна технічна простота виготовлення і можливість направляти синтез численних копій мРНК, звідки впливає очікуване посилення як синтезу антигену, так і імунної реакції. Такі вакцини проявили свою ефективність на багатьох тваринних моделях інфекції, особливо вірусних моделях. У пошуках нового шляху доставки ДНК без оболонки наносили на шкіру мишей, звідки вона поглиналася волосяними фолікулами з метою стимуляції імунної відповіді. Хоча ДНК без оболонки і проявляє стимулюючу дію на вироблення специфічних антитіл, вона особливо ефективно стимулює клітинні імунні реакції.

У перших експериментах такого роду *E.coli*-плазмиду, що містить клонований ген білка-антигена, транскрипція якого перебувала під контролем промо-

тора вірусу тварин, кон'югували з мікрочастинками золота і бомбардували ними клітини вуха миші за допомогою «генної гармати». У цьому методі використовується стиснений гелій, що містить частинки колоїдного золота із сорбованими на ньому плазмідами, які експресують антиген. При цьому препарат вводиться в епідерміс. Перевагами цього методу є потрапляння плазмід безпосередньо в клітини і факт того, що велика частина плазмід прямо контактує з клітинами Лангерганса. Це важливо у зв'язку з тим, що шкіра багата антиген-презентуючими клітинами (клітини Лангерганса), які синтезують молекули II класу МНС (головний комплекс гістосумісності – major histocompatibility complex). Тому ДНК, що введена безпосередньо в шкіру, може бути легко захоплена ними. Згодом з'ясувалося, що клоновану ДНК можна вводити в клітини і шляхом внутрішньом'язової ін'єкції розчину з великою кількістю плазмід, які несуть відповідну ДНК. Для цього необхідно в 10^3 - 10^4 разів більше ДНК, ніж при бомбардуванні мікрочастинками. В одному з експериментів більш ніж у 75 % випадків ген включався в клітини миші, і синтезований білок-антиген індукував синтез антитіл. В одній із серій експериментів мишам в задні кінцівки вводили розчин з *E. coli*-плазмідною, що несе ДНК нуклеопротеїну вірусу грипу А, транскрипція якої знаходилася під контролем промотора вірусу саркоми Рауса або цитомегаловірусу. Хоча рівень експресії гена нуклеопротеїну був настільки низький, що не піддавався реєстрації, через 2 тижні після імунізації в крові мишей виявлялися антитіла до вірусу грипу А. Вживання імунізованих мишей виявилось значно вищим, ніж мишей з контрольної групи. Крім того, вони були нечутливими і до іншого штаму вірусу грипу. Такий перехресний захист не виробляється при введенні традиційних протигрипозних вакцин. Пізніше відбулися перші клінічні випробування на людині, які перш за все продемонстрували безпеку нового методу. Гени ВІЛ вносили в клітини пацієнтів вже заражених вірусом. Ще пізніше аналогічні експерименти провели зі здоровими людьми. Крім генів ВІЛ пересаджували гени грипу та гепатиту В. У всіх випадках вакцини приводили до імунної відповіді у вигляді вироблення специфічних антитіл. Вакцини вводили або шляхом ін'єкцій, або за допомогою так званої «генної гармати». Цей апарат, випускаючи струмінь стисненого гелію, пробиває клітинні мембрани мікроскопічними металевими частинками покритими ДНК. Існують дані про можливість «вистрілювати» ДНК-вакцину, упако-

вану в ліпосоми. Полегшення впливу може відбуватися на рівні клітинного всмоктування, експресії або імунологічної активації. Однією із стратегій було включення ДНК в мікроскопічні бомбардуючі частинки, які «вистрілюють» в клітини, які продукують кодований антиген. Ця технологія «генної гармати», яка згідно зі звітами потужно стимулює імунну реакцію, вже пройшла вихідні клінічні випробування. Для підвищення ефективності всмоктування ДНК уклали в оболонку з катіонних ліпідів, ліпоспермінів або інших молекул, які нейтралізують їх заряд і мають ліпідні групи для покращення проникнення крізь мембрану. Такі композиції досліджувалися також на предмет альтернативних шляхів введення (наприклад, пероральний або назальний), які можуть стимулювати імунітет слизових оболонок. Було показано, що анестезуюча речовина бупівакаїн, що вводиться разом із ДНК, підсилює всмоктування і експресію ДНК. АДФ-рибозилуючі екзотоксини, що вводяться разом із ДНК і наносяться на шкіру, можуть стимулювати трансдермальну імунізацію.

Особливо необхідно зупинитися на вірусній доставці ДНК-вакцин. Всі зазначені вище вакцини на основі нуклеїнових кислот призводять до введення плазміди в клітину. З метою доставки ДНК за допомогою вірусу віспи домашньої птиці експресійна касета рекомбінантного білка інтегрується у вірусний геном. Ці пташині поксвіруси можуть інфікувати клітини ссавців (людини), але не можуть продукувати інфекційний вірус, отже, даний підхід можна вважати основаним на нуклеїнових кислотах. Цього єдиного циклу самообмежуючої інфекції може бути досить для стимуляції широкого імунітету проти патогенного організму, рекомбінантний поліпептид якого експресується цими пташиними поксвірусами в інфікованих клітинах, тоді як реактогенність повинна бути мінімальною через нездатність вірусу розповсюджуватися в організмі-хазяїна. Одним із варіантів конструкції експресійної плазміди є застосування системи експресії ДНК на основі вірусу, яка може підвищувати рівень РНК і білкової експресії, що відбувається при живій вірусній інфекції, як було розроблено для вірусних векторів Sindbis.

Використання векторів для конструювання та виробництва вірусоподібних частинок як вакцин є вельми перспективним. Аденовіруси багато років використовуються як інструмент у модельних дослідженнях з генотерапії. В останні роки переваги векторів на основі аденовірусів приваблюють фахівців у

галузі конструювання рекомбінантних вакцин. Особливо цінною є висока продуктивність аденовірусів і висока ефективність переносу генів та експресії. Вектори для вакцин конструюються з делеціями за ранніми генами E1 і E2. У ряді досліджень аденовірусні вектори використовують для експресії індивідуальних вірусних антигенів і, зокрема, гемаглютининів вірусів грипу. Серйозним недоліком цих векторів є наявність в популяції людей поширеного імунітету, що призводить до швидкого обмеження експресії цільових антигенів. Від 15 до 25 % популяції людей в епідемічні періоди страждають аденовірусною інфекцією. Найсильнішим антигеном серед білків аденовірусу є гексон (гексон аденовірусу містить рідоспецифічні антигени і має досить консервативну амінокислотну послідовність серед аденовірусів різних типів, крім того, білок синтезується в інфікованих клітинах у великій кількості), антитіла до якого виявляються у понад 75 % здорових людей. У зв'язку з цим при плануванні робіт з використання таких векторів слід враховувати їхню популяційну сприйнятливість.

Вектори на основі альфа-вірусів – відносно новий інструмент для конструювання рекомбінантних вакцин. Вірус венесуельського енцефаломієліту коней, вибірково патогенний для коней, належить до привабливих об'єктів вірусологів. Фундаментальні проблеми реплікації та експресії геному РНК-вірусів досліджуються з початку 70-х років ХХ століття. Експресія геному цього вірусу забезпечується двома оперонами, ранніми та пізніми генами. У рамки зчитування пізніх генів здійснюють вставку чужорідних генів із забезпеченням високого рівня їх експресії, який можна порівняти із рівнем експресії поверхневих мажорних білків альфа-вірусів. Компанія Alfa Vax є світовим лідером у використанні альфа-вірусів як векторів для конструювання вакцин. При цьому слід підкреслити безпечність векторів на основі альфа-вірусів: вони непатогенні для людини, і в людській популяції не існує імунітету проти цих вірусів, оскільки вони ніколи не циркулювали серед людей.

Бактерії, які реплікуються внутрішньоклітинно, можна піддати генно-інженерній обробці з метою доставки плазмідної ДНК в клітини для експресії рекомбінантних білків. *S. flexneri* було атенуєвано шляхом створення делеційного мутанта за життєво важливим геном (*asd*). Хоча такий штам може розмножуватися *in vitro* за наявності діамінопімелінової кислоти (DAP) і може

окупувати клітини, він не здатний розмножуватися *in vivo*, за відсутності DAP. Цей штам було трансформовано плазмідною, яка несе еукаріотичний промотор і рекомбінантний ген. Отриманий рекомбінантний штам *S. flexneri strain* виявився здатним заселяти клітини ссавців *in vitro* і експресувати білок, який кодується плазмідною, як потенційний вакцинний антиген. Оскільки *S. flexneri* реплікується в кишечнику і стимулює імунітет слизових оболонок, даний вектор можна вводити пероральним шляхом з метою доставки ДНК до клітин, в яких стимулюється імунітет слизових оболонок. Інші атенуйовані штами різних видів бактерій, наприклад, *Salmonella*, які здатні до заселення клітин ссавців, але не до поділу, також можуть доставляти рекомбінантні плазмідні пероральним шляхом для експресії рекомбінантних білків як вакцинних антигенів.

При введенні ДНК-вакцини активізуються клітини імунної системи: В-лімфоцити виробляють антитіла, що нейтралізують антигени в рідких міжклітинних тканинах (гуморальна імунна відповідь), а цитотоксичні Т-лімфоцити руйнують бактерії і віруси всередині клітин (клітинна імунна відповідь). Отримано експериментальні дані, що один і той же антиген, введений в організм звичайним методом і за допомогою ДНК-вакцини, продукує різні варіанти імунної відповіді. При ДНК вакцинації синтезуються імуноглобуліни – IgG2a (максимум через 6 тижнів), а при традиційному введенні – IgG1 (через 1-2 тижні). При ДНК-вакцинації Т-хелпери тварин секретують інтерферон гамма, а після звичайної вакцинації інтерлейкіни: ІЛ-4 і ІЛ-5. Таким чином, використання ДНК-вакцини призводить до так званої Т-хелперної відповіді (Th-1), а звичайна вакцинація – до Th-2 (Т-хелпери активують В-лімфоцити, сприяючи розвитку гуморального імунітету, наприклад, продукції інтерлейкінів).

Інтерес до ДНК вакцин стимулюється низкою їх властивостей. Використовуючи один і той же плазмідний або вірусний вектор, можна створювати вакцини проти різних інфекційних захворювань, змінюючи тільки послідовність, що кодує необхідні антигени. У той же час, на думку ряду дослідників, пряма інокуляція плазмідної ДНК повинна приводити до синтезу білків *in vivo*, конформаційна і посттрансляційна модифікація яких ідентична синтезованим при інфекційному процесі зараження вірусом.

Перевагою ДНК-вакцин є: відсутність спеціальних методів доставки і висока стабільність (ДНК-вакцини стабільні навіть при кімнатній температурі),

високий ступінь очищення, відсутність баластних білків і контамінації сторонніми агентами, індукування у тварин системного і місцевого імунітету. Дворазова внутрішньом'язова вакцинація собак плазмідною ДНК, що експресує глікопротеїн вірусу сказу, захищає тварин від контрольного зараження вірулентним штамом вірусу сказу. Уже розроблені і проходять випробування ДНК-вакцини проти інфекцій, що викликаються вірусами гепатиту В і С, грипу, лімфоцитарного хоріоменінгіту, сказу, японського енцефаліту, туберкульозу, лейшманіозу, малярії та ін. Потрібний ген вставляють в плазмиду або безпечний вірус. Такий носій-вектор проникає в клітину і синтезує необхідні білки, що мають протективну дію. Для впровадження цих вакцин в медичну практику потрібно вирішити ще дуже багато питань. Наприклад, генами кодуються білкові антигени, і поки немає альтернативи полісахаридних антигенів, які входять до складу ряду традиційних вакцин. Безсумнівно важливою є розробка методів отримання та очищення плазмідної ДНК, звільнення від баластних домішок бактеріального походження, хромосомної ДНК і домішок РНК. Самостійним питанням є підбір для ДНК-вакцин ад'ювантів і носіїв. Звертає на себе увагу питання про долю введеної в клітину ДНК. На сьогоднішній день немає однозначної відповіді. ДНК може інтегруватися в геном хазяїна з дуже серйозними наслідками, якщо при цьому відбувається злаякісна трансформація клітин або зачіпається який-небудь важливий ген, що призводить до мутагенного ефекту. На думку багатьох дослідників, такий розвиток подій вважається вкрай малоімовірним. На їхню думку, така ДНК деякий час проіснує в клітині у вигляді позахромосомного елемента, який не реплікується, а потім зруйнується. На нашу думку, ці питання ще недостатньо вивчені і впровадження ДНК-вакцин в медичну практику вимагає всебічного вивчення, а саме: доля введеної ДНК-вакцини; тривалість експресії антигену; нешкідливість ДНК-вакцин; утворення антитіл до самої ДНК і домішок вакцини та ін.

Таким чином, було показано, що після того, як клітини *in vivo* приймають ДНК, що кодує вакцинні антигени, які можуть секретуватися або зв'язуватися з клітинною поверхнею, запускається гуморальна або клітинна імунна відповідь. Крім того, поглинання ДНК можна посилити хімічним шляхом або при використанні для доставки вірусів або бактерій. Останні підходи відповідають визначенню вакцини на основі ДНК як нездатної реплікуватися в організмі людини.

Вакцини на основі ДНК без оболонки, які були вдосконалені і вводяться за допомогою вірусів, нещодавно почали проходити клінічні випробування. Незважаючи на те, що ДНК-вакцини розробляються більше 20 років, жодна з таких вакцин досі не дозволена до застосування.

Генетична імунізація – метод, оснований на ДНК-вакцинації, оскільки в організм вводять не білок-антиген, а нуклеїнові кислоти (ДНК або РНК), в яких закодована інформація про білок. У наш час розроблена відносно безпечна система, яка забезпечує ефективність дії нуклеїнових кислот в тканинах. Потрібний ген включають в плазмиду або безпечний вірус. Такий носій-вектор проникає в клітину і синтезує потрібні білки. Трансформована клітина перетворюється на фабрику з виробництва вакцин всередині організму. ДНК-вакцина приводить до повноцінного імунітету і забезпечує захист від вірусної інфекції. Ці системи випробовували при гепатиті В і С, грипі, сказі, сальмонельозі, туберкульозі, лейшманіозі, малярії.

1.11. Створення протипухлинних вакцин

У теперішній час активно розвивається напрямок зі створення індивідуальних протиракових вакцин з використанням різних аутовакцин, які ґрунтуються на використанні дендритних і стовбурових клітин, вивченні мутантних ДНК пухлинних клітин.

Лікування такими вакцинами передбачає природний захист організму, направлений на знищення тільки ракових клітин, виявляючи мутації, унікальні для кожної пухлини. Використовуючи природний захист організму для виборчого знищення тільки пухлинних клітин, такі вакцини, на відміну від традиційних методів хіміотерапії, обмежують пошкодження здорових клітин. Запропонована вакцина зможе впливати на імунну систему організму людини, визначаючи пухлину за її унікальними мутаціями, і ефективно боротися з деякими видами раку. Можливість появи таких вакцин з'явилася після завершення Human Genome Project, спрямованого на вивчення геному людини і вивчення послідовностей ДНК в ракових клітинах людини. Після цього вчені почали порівнювати ДНК пухлинних і здорових клітин. Дослідження підтвердили, що всі ракові клітини містять безліч специфічних мутацій, більшість з яких унікальні

для кожної пухлини. Було також показано, що вакцина, яка містить копії таких мутацій, може каталізувати імунну систему організму і збільшує синтез Т-клітин, призначених для знищення всіх ракових клітин. У грудні 2017 року BioNTech спільно з біотехнологічною компанією Genentech почали масштабне тестування вакцини на онкологічних хворих. Дослідження націлене на 10 ракових захворювань. Планується охопити 500 пацієнтів по всій земній кулі. Обидві компанії розробляють нові технології виробництва, що забезпечують швидке виробництво індивідуальних вакцин доступної вартості. Технологія отримання цих вакцин передбачається біопсією пухлини пацієнта, секвенування і аналіз його ДНК, а також передача цієї інформації в місце виробництва вакцини. Швидкість виробництва даної вакцини і її передача в клініку значною мірою забезпечує можливість життя пацієнта. Можливість виробництва протипухлинних вакцин почала ставати реальністю в 2018 році.

1.12. Розробка складу вакцин

Імунологічна ефективність вакцин (крім живих) може підвищуватися шляхом підбору складу, що стосується остаточної форми вакцини, яка повинна вводиться *in vivo*. Крім «активної речовини» (антиген або ДНК), до складу може входити ад'ювант і/або система доставки, наповнювачі. Ад'ювант – це речовина, яка стимулює підвищену гуморальну і/або клітинну імунну відповідь на спільно введений антиген. Система доставки – це носій для забезпечення презентації вакцини клітинам імунної системи або для стабілізації і вивільнення антигенів протягом тривалого періоду часу. Ад'юванти і системи доставки можуть перекриватися за структурою і функціями. Очікується, що багато майбутніх вакцин будуть містити нові ад'юванти і системи доставки.

Ад'юванти. Солі алюмінію, такі, як гідроксид або фосфат, на даний момент є єдиними ад'ювантами, широко ліцензованими для використання людьми. Цей ад'ювант вже використовується протягом десятиліть. Вакцинний антиген утворює стабільний зв'язок з сіллю алюмінію за рахунок йонних зв'язків і утворює макроскопічну суспензію в розчині. Цей ад'ювант переважно стимулює імунну реакцію типу Th2, тобто основу на антитілах, що не є корисним у випадках, коли для захисту необхідна опосередкована клітинами імунна відпо-

відь. Хоча солі алюмінію корисні для деяких вакцин (наприклад, гепатит В, кашлюк), у разі інших вакцинних антигенів вони не характеризуються достатньою потужністю, щоб стимулювати досить високу для оптимальної ефективності імунну відповідь, опосередковану антитілами. Показано, що солі алюмінію не є корисними для презентації вакцин, що вводяться пероральним або інтраназальним шляхом. Тому багато хімічних речовин, біохімічних речовини з природних джерел, а також білки, що мають активність по відношенню до імунної системи (цитокіни) досліджувалися як потенційні ад'юванти. Ад'ювантна здатність практично всіх відомих компонентів пов'язана з місцевими або системними побічними ефектами, які можуть бути основані на певному механізмі, або бути неспецифічними. Ідеальний ад'ювант повинен зберігати баланс між ступенем побічних ефектів і посиленням імунної відповіді.

Деяким бактеріальним токсинам із АДФ-рибозилуючою активністю приділялась значна увага при розгляді їх як ад'ювантів слизових оболонок у молекулярній інженерії. Зокрема, було показано, що правцевий токсин має активність ад'юванта слизових оболонок для антигену, презентованого пероральним, назальним, вагінальним або ректальним шляхами, як було згодом показано для термолабільного токсину (LT) ЕТЕС. Ці токсини складаються з каталітичної субодиниці А і пентамерної субодиниці В, яка зв'язується з гангліозидом GM1 на багатьох типах клітин. Однак і правцевий токсин, і LT токсичні для людей, особливо при пероральному застосуванні, в результаті чого вони викликають діарею. Для відділення токсичності і ад'ювантної здатності правцевого токсину та LT були створені точкові мутації, які призвели до зниження або виключення АДФ-рибозилуючої активності, зниження токсичності і помітного збереження ад'ювантної здатності у мишей. Альтернативним підходом була елімінація В-субодиниці та заміна її на синтетичний димерний пептид, отриманий на основі білка А *Staphylococcus aureus*, який зв'язується з імуноглобуліном (Ig). Безсумнівний інтерес становлять дані про можливість використання як ад'ювантів гангліозидів GT1 і GD1a, оскільки при введенні тваринам їх комплексу з вірусом сказу SVS підвищувалась імуногенність вірусу і знижувалась летальність заражених вірусом мишей. Переносимість та ефективність ад'ювантів, створених генно-інженерним шляхом, повинна проходити оцінку на людях. Характеристика ад'ювантів детально розглянута нами в навчальному посібнику [1].

Системи доставки. Важливо не тільки створити вакцину, але і доставити її в організм. Крім презентації антигену або ДНК клітинам імунної системи, система доставки може здійснювати інші ключові функції. Може мати місце «ефект депо», коли підтримується наявність антигену в певному місці *in vivo* для постійної стимуляції імунної системи. Може відбуватися посилення стабільності вакцини *in vivo*. Для вакцин, що вводяться через слизові оболонки, система доставки може забезпечити ефективну презентацію і поглинання М-клітинами, після чого відбувається трансцитоз в «пейєрові бляшки» і презентація лімфоцитам з метою індукції імунітету слизових оболонок. Для деяких композицій вакцина може підтримуватися *in vivo* всередині фізичної структури протягом значного періоду часу, протягом якого вона вивільняється повільно або в пульсуючому режимі, щоб вона могла функціонувати як вакцина, яка вводиться одноразово. Широко ліцензованих систем доставки не існує. Напрацювання клінічного і фармацевтичного досвіду з новими системами доставки і ад'ювантами залишається ключовою метою в даній галузі.

Таким чином, технології отримання вакцин ґрунтуються на принципах, викладених вище. В одному навчальному посібнику неможливо навести технологічні схеми отримання існуючих вакцинних препаратів тому, що вакцини отримують за принципово різними технологіями. Як приклад наводимо опис технологій і складу ряду вакцин календаря щеплень України.

Таблиця 1.1 – Інфанрікс-Пента, суспензія для ін'єкцій

<p>Склад антигенів, у 0,5 мл</p>	<p>Правцевий анатоксин – не менше 40 МО; Дифтерійний анатоксин – 30 МО; Антигени кашлюка: кашлюковий анатоксин – 25 мкг; філаментозний гемаглютинін – 25 мкг; пертактин (зовнішній білок мембрани – 69 кДа) – 8 мкг; Антиген (HBs-Ag) – 10 мкг; D-антигени інактивованих вірусів поліомієліту: 40-D одиниць – типу 1 Mohnеу, 8-D одиниць – типу 2 MEF-1, 32-D одиниць – типу 3 Sаukett</p>
---	--

Продовження таблиці 1.1

<p>Коротка технологія одержання вакцин</p>	<p>1) Культивування штаму <i>Clostridium tetani</i>; одержання токсину; одержання анатоксину шляхом детоксикації формальдегідом; очистка та контроль анатоксину.</p> <p>2) Культивування штаму <i>Corynebacterium diphtheriae</i>; одержання токсину; одержання анатоксину шляхом детоксикації формальдегідом; очистка та контроль анатоксину.</p> <p>3) Виділені з <i>Bordetella pertussis</i> антигени очищають осадженням та афінною хроматографією з наступною детоксикацією формальдегідом / глютаровим альдегідом; контроль антигенів.</p> <p>4) Поверхневий антиген гепатиту В одержано методом генної інженерії з культури рекомбінантних дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i>; очистку HBs-Ag проводять за допомогою різних хроматографічних методів; інактивація антигену формальдегідом; контроль HBs-Ag.</p> <p>5) Три інактивовані віруси поліомієліту штамів: Mahoney – тип 1, MEF 1 – тип 2, Saukett – тип 3 культивують у культурі клітин VERO; очистку вірусних антигенів проводять гель-фільтрацією та йонно-обмінною хроматографією; інактивацію проводять обробкою формальдегідом; контроль інактивованих штамів поліомієліту.</p> <p>Одержання готової лікарської форми: п'ять антигенів змішують у відповідних співвідношеннях, вводять ад'ювант, контролюють продукт до розливу у флакони; наповнення флаконів; контроль готової лікарської форми (ГЛФ).</p>
<p>Ад'ювант</p>	<p>Алюмінію гідроксид та алюмінію фосфат</p>
<p>Консервант</p>	<p>2- фенокси-етанол, неоміцину сульфат, формальдегід</p>
<p>Стабілізатор / кріопротектор</p>	<p>Динатрію фосфат, монокалію фосфат, калію хлорид, натрію хлорид</p>
<p>Допоміжні речовини</p>	<p>Полісорбат 20 і 80, гліцин та ін. (в залишкових кількостях)</p>

Продовження таблиці 1.1

Призначення	Профілактика дифтерії, правця, кашлюку, гепатиту В, поліомієліту
--------------------	--

Таблиця 1.2 – Інфанрікс-Гекса, суспензія для ін'єкцій

Склад антигенів, у 0,5 мл	Всі компоненти препарату Інфанрікс-Пента із додаванням полісахаридного антигену Ніб в кількості 10 мкг, ковалентно зв'язаного з 20-40 МО правцевого анатоксину
Коротка технологія одержання вакцин	Очищений капсульний полісахарид Ніб-PRP одержують із використанням ультрафільтрації, осадження етанолом, деполімеризації, з наступним одержанням кон'югату: PRP із правцевим анатоксином.
Ад'ювант	Алюмінію гідроксид та алюмінію фосфат
Консервант	2-фенокси-етанол, формальдегід, неоміцину сульфат
Стабілізатор / кріопротектор	Лактоза, натрію хлорид, динатрію фосфат, монокалію фосфат
Допоміжні речовини	Полісорбат 20 і 80, гліцин та ін. (в залишкових кількостях)
Призначення	Профілактика дифтерії, правця, кашлюку, гепатиту В, поліомієліту та гемофільної інфекції

Таблиця 1.3 – Твінрікс, суспензія для ін'єкцій

Склад антигенів, у 0,5 мл	Антигени вірусу гепатитів: В (HBs-Ag) 10 мг і очищеного інактивованого вірусу гепатиту А (HA) 360 Од.
Коротка технологія одержання вакцин	Поверхневий антиген гепатиту В виділяють методом генної інженерії із культури рекомбінантних дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; очистку HBs-Ag проводять різними хроматографічними методами; контроль HBs-Ag. Вірус гепатиту А вирощують у культурі диплоїдних клітин людини MRS-5; клітини промивають для видалення поживного середовища; клітини лізують; суспензію вірусу очищають методами ультрафільтрації та гелевої хроматографії; вірус інактивують формальдегідом; контроль інак-

Продовження таблиці 1.3

	тивованого вірусу HBs-Ag і НА. Після контролю кожний антиген адсорбують окремо. Після проходження контролю обидва продукти об'єднують. Проводять контроль. Наповнення флаконів. Контроль ГЛФ
Ад'ювант	Алюмінію гідроксид та алюмінію фосфат
Консервант	–
Стабілізатор / кріопротектор	Натрію хлорид
Допоміжні речовини	Формалін (в залишкових кількостях)
Призначення	Вакцина для профілактики гепатитів А та В

Таблиця 1.4 – Гепатрікс, суспензія для ін'єкцій

Склад антигенів, у 0,5 мл	Очищений інактивований вірус гепатиту А – не менше 720 од. та полісахарид VI з оболонкою, екстрагований зі штаму <i>Salmonella typhi</i> – 12,5 мкг
Коротка технологія одержання вакцин	<p>1) Вірус гепатиту А вирощують у культурі диплоїдних клітин людини MRS-5. Клітини промивають для видалення поживного середовища. Клітини лізують і суспензію очищають методами ультрафільтрації та гелевої хроматографії. Інактивацію проводять обробкою формальдегідом. Контроль інактивованого вірусу. Адрорбція вірусу на гелі гідроокису алюмінію.</p> <p>2) Культивують виробничий штам <i>Salmonella typhi</i> на синтетичному поживному середовищі, одержану біомасу дезінтегрують, виділяють неочищений капсульний полісахарид VI із оболонкою, екстрагують із культури <i>Salmonella typhi</i>, проводять очистку від нуклеїнових кислот і білків різними методами з наступним діалізом. Контроль полісахариду.</p>

Продовження таблиці 1.4

	3) Після проведення контролю обох компонентів їх об'єднують . Контроль препарату. Наповнення флаконів з препаратом. Контроль ГЛФ
Ад'ювант	Гідроокис алюмінію
Консервант	2-фенокси-етанол
Стабілізатор / кріопротектор	Натрій хлорид
Допоміжні речовини	Формальдегід, полісорбат 20, амінокислоти, трометамол (у незначних кількостях)
Призначення	Профілактика гепатиту А і тифу

Таблиця 1.5 – Пріорікс, ліофілізований порошок для приготування розчину для ін'єкцій

Склад антигенів, у 0,5 мл	Ослаблені штами вірусів: кору(<i>Schwarz measles</i>), ендемічного паротиту (RIT 4385, Jeril Lynn), краснухи (Wistar RA 27/3)
Коротка технологія одержання вакцин	Вакцина містить живі штами кору, краснухи та паратиту, одержані культивуванням вірусів на відповідних культурах клітин, відділення вірусів стерилізуючою фільтрацією, ультрафільтрація вірусомісної рідини для очистки та концентрації вірусів, стерилізуюча фільтрація, додавання кріопротектора, ліофілізація та герметизація
Ад'ювант	–
Консервант	–
Стабілізатор / кріопротектор	Лактоза, манітол, сорбіт
Допоміжні речовини	Амінокислоти, неоміцин, альбумін людини (у незначних кількостях)
Призначення	Вакцина для профілактики кору, ендемічного паротиту і краснухи

Таблиця 1.6 – BCG, ліофілізований порошок для приготування розчину для ін'єкцій

Склад антигенів, у 0,5 мл	Живі ліофілізовані <i>Micobacterium bovis</i> , наприклад, штам Мерье, 1077. В 1 дозе (0,1 мл) – 0,05 мг ліофілізату.
Коротка технологія одержання вакцин	Мікобактерії культивують на рідкому поживному середовищі з наступним відділенням бактерій та видаленням залишків поживного середовища. До бактерій додають розчин глютаміну натрію в концентрації 1,0 – 1,5 %.
Ад'ювант	–
Консервант	–
Стабілізатор / кріопротектор	Глутамінат натрію
Допоміжні речовини	–
Призначення	Активна специфічна профілактика туберкульозу

Детально технології отримання зазначених у таблиці вакцин наведені в навчальному посібнику [1]. У посібнику наведено характеристику штамів, поживних і культуральних середовищ, методи культивування, виділення і очищення антигенів, контроль антигенів; отримання готових вакцинних препаратів із зазначенням консервантів, стабілізаторів, ад'ювантів та інших допоміжних речовин. В даному навчальному посібнику у главі 2 докладно описані технологічні стадії, які є обов'язковими для виробництва ін'єкційних вакцин: підготовка вентиляційного повітря для «чистих» приміщень; отримання води очищеної та води для ін'єкцій; підготовка технологічного одягу персоналу до роботи в «чистих» приміщеннях; підготовка чистих приміщень, технологічного обладнання та допоміжних матеріалів; мийка та стерилізація флаконів, ампул і пробок.

ПІДСУМОК

Технологічні розробки останнього десятиліття значно розширили число загальних стратегій створення нових вакцин. У наступному десятилітті кіль-

кість підходів буде і далі розширюватися, а технічні аспекти – додатково відточуватися, щоб більшість антигенів можна було презентувати у високоімуногенній формі у вигляді живої або субодиничної вакцини. Білкові антигени в альтернативній формі можна представити у вигляді вакцини на основі нуклеїнових кислот. Подальше розуміння функцій генів вірусних і бактеріальних патогенних організмів може дозволити більш стабільно і передбачувано атенувати живі вакцини, як у вигляді вакцин, так і у вигляді живих векторів для імунізації проти інших патогенних організмів. Технології ад'ювантів повинні розвиватися доти, доки композиції, більш дієві, ніж солі алюмінію, проте настільки ж добре переносимі, не будуть широко застосовуватися для субодиничних / ін-активованих вакцин і доки не стане можливою пероральна доставка очищених білків для імунізації. Аналогічним чином композиції ДНК можуть покращити дієвість ДНК-вакцин і їх придатність для доставки шляхами, стимулюючими імунітет слизових оболонок. Запропоновано мукозальні вакцини – доставка антигенів через слизову оболонку.

Необхідно зупинитися на ще одному питанні. Раніше створення вакцин проходило від вивчення цілого організму до його складових. Сьогодні використовують метод зворотної вакцинації – від геному збудника до його продуктів. Оскільки основна маса протективних антигенів являє собою білки – необхідно визначитися, який білок є потенційним антигеном для введення його у вакцину. Для цього проводять визначення нуклеотидної послідовності повного геному мікроорганізму, який викликає інфекції. Далі використовують три стратегічних прийоми:

1-й прийом: з геному вирізають ген, який відповідає за вірулентність (хвороботворні властивості), але не впливає на розмноження та імуногенність;

2-й прийом: визначається активність окремих генів мікроорганізмів і розпізнають ген, залучений до процесу поширення інфекції;

3-й прийом: оснований на протеомній технології – деталізація кількісної та якісної характеристики білків у компонентах клітини мікроорганізму.

У результаті проведення зазначених прийомів можливо визначити новий набір білків та відповідних їм генів, які становлять інтерес для створення вакцини (як правило, в цю групу входить близько 20–30 % всіх генів бактеріального геному). Потім необхідно синтезувати та очистити відібрані антигени в

кількостях, необхідних для імунізації лабораторних тварин. Використовуючи ці прийоми, останнім часом розроблено вакцини проти *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *St. aureus*, *Plasmodium falciparum* та ін. Ці методи дозволяють прискорити створення нових вакцинних препаратів, наприклад, створення вакцин проти циркулюючих штамів грипу займає до 3 місяців (раніше – не менше року).

Створення вакцинних препаратів проти грипозної інфекції є актуальним у зв'язку з мінливістю вірусу та наявністю ряду циркулюючих штамів. Сьогодні поширені спліт-вакцини, які являють собою розщеплений вірус грипу. В результаті в складі вакцини міститься не тільки поверхневі, але й внутрішні антигени. В Україні зареєстровано кілька спліт-вакцин проти різних штамів грипу: «Джис Флю», Південна Корея (містить антигени проти трьох штамів грипу) і «Ваксигрип Тетра», Франція (містить чотири штами вірусу грипу). Для виробництва вакцин використовують інактивовані віруси, вирощені на курячих ембріонах. Наведемо склад антигенів вакцини «Ваксигрип Тетра»: 1. А / Michigane / 45/2015 (H1N1) pdm09; 2. А / Singapore / INFIMH-16-0019 / 2016 (H3N2) 3. В / Phuket / 3073/2013 дикий тип; 4. В / Colorado / 61 2017 подібний В. Maryland / 15/2016 / NYMCBX-69A. Кожен штам представлений у вакцині гемаглютинінами по 15 мкг кожен. Вакцина індукує продукцію гуморальних антитіл проти гемаглютинінів, які нейтралізують вірус грипу. Антитіла накопичуються протягом 2-3 тижнів.

У 2019-2020 роках у Китаї в місті Ухань виявлений раніше невідомий «вірус грипу COVID-19», потім отримав назву SARSCOV-2, який дуже швидко поширювався і призводив до захворюваності на вірусну пневмонію і летального результату. Встановлено, що цей вірус належить до вірусів тваринного походження і здатний мутувати, що підвищує ризик його поширення. Раніше вірус був невідомий і належить до великого сімейства коронавірусів, які раніше викликали спалахи важкого гострого респіраторного синдрому (SARS), який передавали людині хижі ссавці цівети, та близькосхідний респіраторний синдром (MERS), який також передавався від тварин до людини. У багатьох країнах світу (Китай, США, Франція, Німеччина та ін.) в 2020 році розпочато створення вакцини проти цього вірусу. Вчені прогнозують створення такої вакцини протягом 12–18 місяців. У березні 2020 ВООЗ офіційно оголосила про панде-

мію коронавірусу в світі. Для розробки цієї вакцини використовується метод створення вакцини на основі фрагментів генетичного коду вірусу. Оскільки вченим відомий повний код коронавірусу SARSCOV-2, то можна розробити вакцину, яка після введення в клітину забезпечує продукування білків патогенів та викликає необхідну імунну реакцію. Зокрема, вчені використовують метод перенесення генетичного коду SARSCOV-2 в інші безпечні для людини віруси. Така «генетична вакцина», на думку фахівців, повинна допомогти підвищити стійкість імунітету до коронавірусу. До 1 квітня 2020 запропоновано понад 20 вакцин проти коронавірусу нового типу, які знаходяться на різних етапах дослідження: в Італії фірма «TaKis», в Німеччині фірма «CureVac» і ряд інших.

Досить імовірно, що в міру вдосконалення цих біотехнологічних досягнень лімітуючим фактором у розробці нових вакцин для застосування людьми залишатиметься більш повне розуміння імунології. Однією з галузей, в яких зростання знань мало б практичну користь для розробки вакцин, є імунобіологія білків, тип і специфічність імунної реакції, необхідні для постійного захисту від захворювання, отримання імунітету слизових оболонок, а також оптимальна стратегія вакцинації для досягнення такого захисту. Очікуються і значні досягнення в галузі застосування вакцин для лікування неінфекційних захворювань, таких, як рак та аутоімунні хвороби.

Основна кількість вакцин виробляється сьогодні у вигляді розчинів або суспензій для ін'єкцій. У відповідних главах даного навчального посібника наведено вакцини в інших лікарських формах (таблетки, супозиторії, капсули та ін.).

Контрольні запитання

1. Навести класифікацію вакцин і основні технологічні принципи їх одержання.
2. Навести приклади живих бактеріальних вакцин, їх одержання та контролю.
3. Навести приклади живих вірусних вакцин, їх одержання та контролю.
4. Описати технологічні принципи атенуації бактерій і вірусів. Навести приклади атенуованих вакцин Календаря Щеплень.

5. Навести технологічне одержання реасортантних геномів та їх використання у складі вакцин.
6. Які вектори для одержання вакцин Вам відомі (рекомбінантні, вірусні, бактеріальні) та в чому необхідність їх використання?
7. Описати субодиночні інактивовані вакцини, їх функції та технології одержання.
8. Технологічне одержання цілісноклітинних вакцин на прикладі вакцини проти кашлюка.
9. Навести методи інактивації патогенів (хімічна, генетична інактивація).
10. Описати носії на основі білків, злитого білка, кон'югатів, комплексних пептидів, полісахаридів.
11. Навести приклади прямих полісахаридних вакцин та охарактеризувати технології їх одержання.
12. Технологічні аспекти одержання кон'югованих полісахаридних вакцин.
13. ДНК-вакцина. Вірусні та бактеріальні вставки.
14. Технологічні принципи одержання протипухлинних вакцин.
15. Технологічне одержання та розробка складу вакцинних препаратів.
16. Роль ад'ювантів у складі бактеріальних і вірусних вакцин.
17. Технологія одержання рекомбінантної вакцини (на прикладі вакцини проти гепатиту В).
18. Навести приклади відомих Вам вакцин та методи їх контролю відповідно ДФУ та міжнародних Фармакопей.

Список джерел інформації

1. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, М.И. Борщевская. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009. – 358 с.
2. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2012. – 304 с.

3. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, А.С. Дудниченко, В.И. Швец. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2011. – 228 с.
4. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2 вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. – Т. 3. – С. 17-170.
5. Мартинов А.В. Конструювання рекомбінантних ліпосомальних вакцин / А.В. Мартинов, Е.А. Романова, Б.С. Фарбер. – Харків: Планета-Принт, 2014. – 137 с.
6. Красочко П.А. Биологические препараты для профилактики, вирусных заболеваний животных / П.А. Красочко, Н.А. Ковалев, И.В. Насонов и др. – Минск: «Беларуская навука», 2016. – 292 с.
7. Петров Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.И. Хайтов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 698 с.
8. Мельников В.Л. Вакцины, вакцинопрофилактика / В.Л. Мельников, Н.Н. Митрофанова. – Пенза: Изд-во ПГУ, 2015. – 76 с.
9. Шаро Д.А. Оптимизация процесса концентрирования микробных клеток в технологии чумных вакцин / Д.А. Шаро, А.А. Лещенко, С.В. Вагин и др. // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. –2019. – Т. 19. – № 1. – С. 50–55.
10. Шевцова В.А. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики ротавирусной инфекции / В.А. Шевцова, Е.Э. Евреинова, И.Н. Индикова и др. // Биопрепараты. Профилактика, диагностика и лечение. –2019. – Т. 19. – № 4. – С. 215–224.

ГЛАВА 2. ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНИХ ФОРМ ПРЕПАРАТІВ

2.1. Загальна характеристика і класифікація парентеральних форм препаратів

Препарати для парентерального введення (ін'єкційні та інфузійні) випускають в рідкому або сухому (для введення розчиняються у відповідних розчинниках) вигляді. Препарати знаходяться в спеціальних контейнерах: флаконах, ампулах, пляшках, шприцах та ін. Контейнер для фармацевтичного використання являє собою виріб, який містить продукцію. Закупорювальний пристрій є частиною контейнера. Контейнер сконструйований таким чином, щоб із нього можна було вилучити лікарський засіб способом, зазначеним в інструкції із застосування. Контейнер забезпечує різний ступінь захисту залежно від природи лікарського засобу і ризиків з боку навколишнього середовища, повинен приводити до мінімальних втрат компонентів лікарського препарату. Між контейнером та його вмістом не повинно відбуватися хімічної або фізичної взаємодії, що призводить до зміни якості лікарського засобу відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ) та інших нормативних документів (НД).

Існує кілька характеристик контейнерів відповідно до вимог ДФУ:

- ✓ ододозовий контейнер, який містить кількість лікарського препарату, призначену для одноразового введення;
- ✓ багатодозовий контейнер, який містить дві або більше доз лікарського препарату;
- ✓ щільно закупорений контейнер, який захищає вміст від забруднення ззовні твердими частинками і рідинами, а також захищає від втрат вмісту контейнера при використанні, зберіганні та транспортуванні в звичайних умовах;

✓ повітронепроникний контейнер, непроникний для твердих речовин, газів і рідин при використанні, зберіганні та транспортуванні в звичайних умовах; якщо контейнер повинен відкриватися більше одного разу, він повинен бути сконструйований таким чином, щоб після повторного закупорювання зберігалась повітронепроникність;

✓ герметично закупорений контейнер, закупорений за допомогою розплавлення матеріалу контейнера;

✓ контейнер з контролем першого розкриття – закритий контейнер, забезпечений пристроєм контролю розкриття контейнера;

✓ контейнер, захищений від дітей – закритий контейнер, забезпечений системою закупорювання, яка виключає розкриття контейнера дітьми.

2.2. Скляні контейнери для фармацевтичного використання відповідно до вимог ДФУ

Скляні контейнери для фармацевтичного використання являють собою вироби зі скла, які безпосередньо контактують з лікарськими препаратами. Існує кілька видів скляних контейнерів:

Ампули – тонкостінні скляні контейнери різної ємності (1, 2, 3, 5, 10, 20 і 50 мл), які після наповнення продукцією герметизують запаюванням. Ампула складається з розширеної частини – корпусу та одного або двох капілярів, які служать для наповнення і вилучення вмісту ампул. Вміст ампули необхідно вилучати тільки один раз після розкриття ампул. Ампули повинні відповідати вимогам за формою і геометричними розмірами, зазначеним у НД. У наш час широко використовуються ампули для шприцевого наповнення. Ампули отримують зі скляного дроту.

Флакони, пляшки, шприци і карпули – контейнери з різною товщиною стінок, контейнери з пробками зі скла або іншого матеріалу, наприклад, пластичних матеріалів або еластомерів. Вміст можна вилучати окремими порціями за один або кілька разів.

Контейнери для людської крові та компонентів крові – циліндричні контейнери з різною товщиною стінок різної ємності з безбарвного і прозорого нейтрального скла.

Якість скла.

Безбарвне скло має високу світлопроникність у видимій області спектра.

Забарвлене скло отримують додаванням невеликої кількості оксидів металів, підібраних відповідно до необхідного спектрального поглинання.

Нейтральне скло являє собою скло, яке містить значну кількість бору або оксиду алюмінію, або оксидів лужноземельних металів. Завдяки своєму складу нейтральне скло характеризується високою термічною стійкістю і дуже високою гідролітичною стійкістю.

Силікатне скло отримують на основі кремнію діоксиду, який містить оксиди лужних металів, переважно оксид натрію, і оксидів лужноземельних металів, переважно оксид кальцію. Завдяки своєму складу силікатне скло характеризується середньою гідролітичною стійкістю.

Для підвищення хімічної стійкості до складу скла вводять оксиди бору (B_2O_3) і алюмінію (Al_2O_3). Для збільшення термічної стійкості – оксид магнію (MgO). Введення до складу скла різних співвідношень бору, магнію та алюмінію підвищує ударну міцність і знижує крихкість.

До скла для виготовлення ампул висувають такі вимоги:

✓ безбарвність і прозорість для контролю відсутності механічних включень і оцінки зміни якості розчинів препарату;

✓ легкоплавкість для можливості герметизації ампул запаюванням;

✓ водостійкість;

✓ механічна міцність;

✓ термічна стійкість (відсутність руйнування при зміні температури (при стерилізації ампул)) – термічно стійкі ампули не повинні руйнуватися при перепадах температури при стерилізації: різні види скла повинні витримувати перепади від 110 до 160 °С;

✓ хімічна стійкість, що забезпечує стабільність лікарського засобу.

Хімічна стабільність скляних контейнерів для фармацевтичного використання визначається гідролітичною стійкістю, тобто стійкістю до вивільнення розчинних мінеральних речовин у воду у визначених умовах контакту внутрішньої поверхні контейнера з водою. Гідролітична стійкість визначається шляхом титрування лугу, який виділяється у водний розчин. Такі характеристики, як

лугостійкість і водостійкість, визначаються титриметрією, вимірюванням рН або використанням індикатора (оцінка зміни його забарвлення).

Важливим тестом є визначення залишкової напруги, яка утворюється за рахунок нерівномірного нагрівання різних частин скляного дроту в процесі отримання ампул. Залишкову напругу визначають за допомогою поляризаційно-оптичного методу за різницею ходу променів у зразку.

Відповідно до гідролітичної стійкості скляні контейнери класифікуються так:

✓ контейнери зі скла I класу – виготовлені з нейтрального скла і мають високу гідролітичну стійкість внаслідок складу самого скла;

✓ контейнери зі скла II класу – зазвичай виготовлені із силікатного скла і мають високу гідролітичну стійкість внаслідок відповідної обробки поверхні скла;

✓ контейнери зі скла III класу – виготовлені зазвичай із силікатного скла і мають помірну гідролітичну стійкість;

✓ контейнери зі скла IV класу – виготовлені зазвичай із силікатного скла і мають низьку гідролітичну стійкість.

Контейнери зі скла I класу є придатними для всіх лікарських форм, призначених як для парентерального, так і для непарентерального використання, а також для людської крові та компонентів крові.

Контейнери зі скла II класу є придатними для кислих і нейтральних водних лікарських препаратів для парентерального застосування.

Контейнери зі скла III класу є придатними для неводних лікарських препаратів для парентерального застосування, для порошків для парентерального застосування, а також для лікарських препаратів для непарентерального застосування.

Контейнери зі скла IV класу придатні для твердих лікарських препаратів, не призначених для парентерального застосування, а також для деяких рідких або м'яких препаратів, не призначених для парентерального застосування.

При зберіганні рідких лікарських препаратів в ампулах може спостерігатися вилугування, пов'язане із переходом зі структури скла, переважно оксидів лужних і лужноземельних металів, у водний розчин препарату. Перехід ок-

сидів лужних і лужноземельних металів у розчин пов'язаний з їх високою активністю в порівнянні з високим зарядом чотирьохвалентного кремнію.

Як правило, також можна використовувати скляні контейнери, які мають більш високу гідролітичну стійкість, яка може бути рекомендована для конкретних видів лікарських препаратів.

Для лікарських препаратів, не призначених для парентерального використання, можна використовувати як безбарвне, так і кольорове скло. Лікарські препарати для парентерального застосування у звичайних випадках випускають в контейнерах із безбарвного скла, однак для чутливих до світла субстанцій можна використовувати забарвлене скло. Рекомендовано, щоб усі скляні контейнери для рідких лікарських препаратів і порошоків для парентерального застосування дозволяли візуально контролювати вміст.

Внутрішня поверхня скляних контейнерів може бути спеціально оброблена для покращення гідролітичної стійкості, надання водозахисних властивостей і т.д. Одним з методів обробки поверхні є силіконування, тобто обробка силіконом – емульсією кремнійорганічної сполуки. Така обробка приводить до гідрофобності поверхні скла, що підвищує міцність скла. Зовнішня поверхня також може бути оброблена, наприклад, для зниження стирання і підвищення стійкості до стирання. Обробка зовнішньої поверхні не повинна призводити до забруднення внутрішньої поверхні контейнера. Скляні контейнери для лікарських препаратів не можуть бути використані повторно, за винятком контейнерів зі скла I класу.

Контейнери для крові людини і продуктів крові також не можна повторно використовувати. Скляні контейнери повинні витримувати вимоги на гідролітичну стійкість.

Лікарські форми з активними фармакологічними інгредієнтами (АФІ), отриманими біотехнологічними методами, переважно представлені ін'єкційними та інфузійними препаратами. Найбільшого поширення набули ін'єкційні форми вакцин, антибіотиків, цитокінів, гормонів, вітамінів та ін. Інфузійні препарати представлені розчинами антибіотиків, імуноглобулінів, моноклональних антитіл та ін. У зв'язку з цим ця глава присвячена обговоренню питань технології одержання парентеральних форм препаратів.

Лікарські засоби для парентерального застосування (парентеральні лікарські засоби) – стерильні лікарські засоби, призначені для введення шляхом ін'єкцій, інфузій або імплантацій в організм людини. Для виготовлення лікарських засобів для парентерального застосування використовують допоміжні речовини, наприклад, такі, що забезпечують ізотонічність лікарського засобу відносно крові, регулюють рН, покращують розчинність діючих речовин, запобігають їх розкладанню, забезпечують відповідні антимікробні властивості лікарських засобів. Ці речовини не мають негативно впливати на основну терапевтичну дію лікарського засобу або у використуваних концентраціях не мають чинити токсичну дію або надмірне місцеве подразнення.

Контейнери для лікарських засобів для парентерального застосування мають бути виготовлені з матеріалів, які є досить прозорими і дозволяють візуально переглянути вміст контейнера, за винятком імплантатів. Контейнери для лікарських засобів для парентерального застосування мають відповідати вимогам монографій ДФУ. Лікарські засоби для парентерального застосування випускають у скляних контейнерах або в інших, таких, як пластмасові контейнери, або у заздалегідь наповнених шприцах. Герметичність контейнера забезпечують відповідними способами. Закупорювальні засоби мають забезпечувати надійну ізоляцію, запобігати доступу мікроорганізмів та інших забруднень і звичайно дозволяють вилучати частину або весь вміст контейнера без видалення закупорювального засобу. Пластикові матеріали, призначені для закупорювання, мають бути достатньо густими і еластичними, щоб при проходженні голки виділялася найменша кількість частинок. Закупорювальні засоби для багатодозових контейнерів мають бути достатньо еластичними, щоб забезпечити герметизацію контейнера при видаленні голки.

Збільшення біотехнологічних фармацевтичних препаратів вимагає постійного розширення номенклатури і об'ємів випуску первинної упаковки: ампул, флаконів, картриджів та ін. Однією з основних тенденцій, яка сьогодні спостерігається на світовому ринку первинної упаковки, є поступова заміна ампул на шприци. В даний час активно використовуються попередньо наповнені шприци. Їх виробництвом займається ряд провідних фармацевтичних фірм: SCHOTT, SeCuReject та ін. Перевагою попередньо наповнених шприців є забезпечення стерильності, точності дози, стабільність лікарського препарату, що

знаходиться в шприці, а також простота у використанні і зниження трудовитрат медичного персоналу. Попередньо наповнені шприци випускаються у двох формах: скляні та пластикові. Перевагою пластику перед склом є те, що пластик не ламається за нормальних умов і при транспортуванні. Пластикові шприци можуть мати більшу рівномірність у внутрішньому діаметрі порівняно зі скляними. Пластикові поршні в шприцах також кращі порівняно зі скляними, оскільки забезпечують більшу точність дозування за рахунок геометричної форми. Перехід з ампул до шприців йде досить повільно, що перш за все пов'язано з високою вартістю як шприців, так і обладнання для їх заповнення.

Провідними виробниками флаконів і ампул є Vormioli Rocco Pharma, Thueringer Pharmaglass, Helvoet Pharma Belgium та ін. В Україні виробником ампул є підприємство Полтавмедскло.

Одночасно проводиться постійне вдосконалення якості скла для ампул, флаконів і шприців. Наприклад, фірмою SCHOTT Folaх кілька років випускається боросилікатне скло високої якості, розроблене для використання у фармацевції. Первинна упаковка з даного скла гарантує стабільність складу, гідролітичну і хімічну стійкість.

Лікарські засоби для парентерального застосування можна класифікувати як ін'єкційні лікарські засоби; внутрішньовенні інфузійні лікарські засоби; концентрати для ін'єкційних або внутрішньовенних лікарських засобів; порошки для приготування ін'єкційних або внутрішньовенних лікарських засобів.

При розробці лікарських засобів для парентерального застосування, до складу яких входять антимікробні консерванти, необхідно підтвердити ефективність вибраних консервантів. Метод визначення і критерії оцінки ефективності консервантів мають відповідати вимогам статті ДФУ. Лікарські засоби для парентерального застосування виготовляють з використанням матеріалів і методів, що забезпечують стерильність, запобігають забрудненню лікарських засобів і росту в них мікроорганізмів, відповідно до вимог статті ДФУ. Вода, використовувана у виробництві лікарських засобів для парентерального застосування, має відповідати вимогам до води для ін'єкцій «in bulk» (ДФУ).

2.3. Технологічні аспекти одержання парентеральних форм

Технологія виготовлення парентеральних лікарських препаратів – багато-стадійне виробництво, яке включає як основні, так і допоміжні процеси. Виготовлення розчинів для ін'єкцій треба проводити в приміщеннях визначених класів чистоти.

Процес виробництва розчинів включає кілька стадій: розчинення, ізотоніювання, стабілізація, введення консервантів, фільтрування, наповнення первинної упаковки, за необхідності ліофілізація, герметизація, контроль готової лікарської форми.

Розчинення. Як розчинники використовують воду для ін'єкцій та комплексні розчинники: неводні розчинники, як індивідуальні, так і суміші. Як комплексні розчинники можуть бути використані етанол, гліцерин, пропілен-гліколь, спирт бензиловий, бензилбензоат та ін. Усі розчинники мають бути дозволені до медичного використання. Для виготовлення ін'єкційних розчинів використовують суміші неводних розчинників (водно-гліцеринові, спирто-водно-гліцеринові, суміші рослинних масел з бензилбензоатом та ін.), які мають значно більші розчинні властивості порівняно з кожним окремим розчинником. Суміш розчинників використовують при виробництві ряду біотехнологічних продуктів: вітамінів, антибіотиків, гормонів та ін.

Ізотоніювання. Серед ін'єкційних розчинів особливу групу складають ізотонічні розчини, під якими розуміють розчини з осмотичним тиском, рівним осмотичному тиску рідин організму (плазми крові, лімфи, спинномозкової рідини та ін.). Осмотичний тиск розчинів є наслідком теплового руху молекул розчиненої речовини, що прагне зайняти якомога більший об'єм. В організмі він підтримується на постійному рівні дією саморегуляторів. Осмотичний тиск плазми крові в нормі знаходиться на рівні $72,52 \cdot 10^4 \text{ Н/м}^2$ або 7,4 атм. Розчини з меншим тиском є гіпотонічними, з більшим – гіпертонічними, рівним – ізотонічними. При введенні в кров гіпертонічного розчину вода виходить з клітини, яка зневоднюється, – настає плазмоліз, при якому еритроцити зморщуються. При введенні гіпотонічного розчину рідина переходить всередину клітини до моменту вирівнювання концентрації. Клітина набухає, клітинна оболонка при цьому може лопнути, а клітина – загинути. Даний процес називається лізисом, а

для еритроцитів – гемолізом. Крім того, внутрішньом'язове і підшкірне введення неізотонічних розчинів викликає біль, причому він тим сильніший, чим більш різкою є осмотична різниця. Ізотонічність розчину розраховують такими методами: на основі закону Вант-Гоффа; криоскопічний метод на основі закону Рауля; метод еквівалентів лікарських речовин за хлоридом натрію.

Найпростішим способом є розрахунок з використанням ізотонічного еквіваленту (E) за хлоридом натрію. Він показує, яка кількість натрію хлориду в рівному об'ємі та рівних умовах створює такий осмотичний тиск як і 1 г лікарської речовини. Існує таблиця ізотонічних еквівалентів за хлоридом натрію для ряду речовин. Наприклад, 1 г безводної глюкози за осмотичним ефектом еквівалентний 0,18 г натрію хлориду. Це означає, що 1 г безводної глюкози і 0,18 г натрію хлориду ізотонують однакові об'єми водних розчинів в однакових умовах за наявності між ними напівпроникної мембрани.

Вант-Гофф запропонував емпіричне рівняння для розрахунків осмотичного тиску P розбавлених неелектролітів:

$$P = (C_m) RT,$$

де (C_m) – молярна концентрація, моль/л; R – універсальна газова стала, яка дорівнює $8,31 \cdot 10^3$ Дж (кмоль · К); T – температура, К.

Підставивши у рівняння Вант-Гоффа значення осмотичного тиску плазми крові (~ 750 кПа) і нормальну температуру тіла (310 К), отримаємо значення осмотичної молярної концентрації ізотонічного розчину:

$$C_m = P : (RT) = 750 : (8,31 \cdot 310) = 0,29 \text{ М}$$

Відповідно до закону Вант-Гоффа ізотонічним плазмі крові буде розчин неелектроліту, що містить 0,29 Моль речовини в 1000 мл розчину.

Отже, щоб виготовити 1 л ізотонічного розчину неелектроліту, наприклад, глюкози, потрібно взяти 0,29 моль глюкози безводної. Мол. маса глюкози – 180,18. Ізотонічний розчин буде містити 52,25 г речовини в 1 л розчину, що відповідає концентрації 5,2 %.

При розрахунку ізотонічної концентрації електролітів в наведене вище рівняння вводять поправковий множник (ізотонічний коефіцієнт Вант-Гоффа), який показує, у скільки разів збільшується осмотична активність розчину, обумовлена дисоціацією та утворенням осмотично активних частинок:

$$\pi = 1 + \alpha (n-1),$$

де α – ступінь електролітичної дисоціації; n – число частинок, що утворюються при дисоціації однієї молекули.

Тоді рівняння Вант-Гоффа набуває вигляду:

$$P = i(C_m)RT$$
$$C_m = P : (iRT)$$

При аналізі результатів вимірювань тиску насиченої пари розчинів нелетких речовин В.Ф. Рауль виявив таку закономірність: парціальний тиск насиченої пари i -го компонента над розчином (p_i) дорівнює добутку тиску насиченої пари над чистим компонентом (p_{oi}) на мольну частку (x_i) цього компонента.

Стабілізація. При виготовленні та зберіганні лікарських засобів нерідко спостерігається зміна їх властивостей, що проходить із різною швидкістю і ступенем прояву. Це пов'язано зі зменшенням вмісту АФІ або зниженням їх фармакологічної активності, зміною властивостей лікарської форми. Подібні зміни впливають на термін придатності препаратів, який може коливатися від кількох годин (розчини антибіотиків) або днів (розчини ферментів) до кількох років. Процеси, які відбуваються у препаратах, можна умовно класифікувати на фізичні, хімічні та біологічні. Умовність полягає в їх взаємозв'язку: хімічні перетворення (гідроліз, окисно-відновні, фотохімічні перетворення, полімеризація та ін.) можуть стати причиною зміни фізичних властивостей (укрупнення частинок дисперсної фази, розшарування, зміна консистенції, випаровування, сублімація та ін.), тоді як фізичні зміни стають причиною небажаних хімічних процесів. Біологічні процеси супроводжуються як хімічними, так і фізичними перетвореннями. Біологічні процеси обумовлені життєдіяльністю мікроорга-

нізмів, що призводить до небажаних хімічних перетворень діючих речовин, а іноді до зміни зовнішнього вигляду лікарської форми.

Стабільність лікарських препаратів залежить від багатьох факторів: температури виготовлення і зберігання, освітленості, складу навколишнього середовища, допоміжних речовин і упаковки. Використовувані в наш час методи стабілізації лікарських засобів – хімічний та фізичний – застосовуються в комплексі, доповнюючи один одного. Хімічні методи основані на додаванні хімічних речовин: стабілізаторів, антиоксидантів та консервантів. Фізичні методи основані на захисті АФІ речовин від несприятливих умов зовнішнього середовища, використанні АФІ високого ступеня очищення, сучасного технологічного обладнання, неводних розчинників, ампульованні у струмі інертних газів, зневодненні препаратів.

Таким чином, стабільність препарату – це здатність біологічно активної речовини зберігати фізико-хімічні властивості і фармакологічну активність протягом певного терміну зберігання, передбаченого НД.

Хімічні методи стабілізації основані на пригніченні процесу розкладання АФІ за рахунок зв'язування або нейтралізації тих хімічних сполук, які активують деструкцію АФІ. Такі сполуки знаходяться в розчині в незначних кількостях або переходять в розчин з упаковки скла при його технологічній обробці або зберіганні.

Стабільність ін'єкційних розчинів насамперед залежить від якості вихідних розчинників та АФІ, класу і марки скла ампул і флаконів, наявності кисню у воді і розчинах, рН, температури і часу стерилізації, наявності іонів важких металів, умов зберігання.

Особливе значення необхідно приділяти впливу скла контейнерів на стабільність речовин препарату. На поверхні ампул або флаконів при контакті з водними ін'єкційними розчинами під час зберігання і особливо при тепловій стерилізації залежно від марки скла і значення рН розчину може відбуватися вилуговування або розчинення верхнього шару скла. Вилуговування – це вихід зі скла переважно оксидів лужних і лужноземельних металів, завдяки високій рухливості іонів цих металів в порівнянні з високим зарядом чотирьохвалентного іона кремнію. З цієї причини іон натрію навіть при кімнатній температурі може заміщатися іншими іонами. Вилуговування зі скла компонентів та їх гід-

роліз ведуть до збільшення або зменшення величини рН розчину. Це призводить до зміни властивостей АФІ, в основі яких лежать різні хімічні процеси: гідроліз, окислення, відновлення, омилення, ізомеризація, декарбоксилювання та ін.

Оптимальна концентрація водневих іонів (рН) в ін'єкційних розчинах – суттєвий стабілізуючий фактор. Вона досягається додаванням стабілізаторів, які передбачені НД. Стабілізатори можуть уповільнювати або прискорювати небажані хімічні реакції, створювати певні значення рН розчинів, підвищувати розчинність АФІ або утримувати їх у завислому стані.

Стабілізатори повинні характеризуватися: терапевтичною індиферентністю, хорошою розчинністю у використаному розчиннику, ефективністю у застосовуваних концентраціях, хімічною чистотою і доступністю.

Стабілізатори можуть бути представлені різними групами хімічних і біологічних сполук: емульгаторами, наприклад, поверхнево-активними речовинами (дозволяють отримувати стійкі емульсії та суспензії), загусниками, наприклад, полісахаридами (покращують в'язкість дисперсних систем шляхом згущення), регуляторами рН, наприклад, кислота хлористоводнева, натрію гідроксид, буферні суміші (підтримання рН на необхідному рівні) і ряд інших. Для виробництва парентеральних препаратів, що містять біотехнологічні продукти, наприклад, вакцини, цитокіни, препарати імуноглобулінів, вводять стабілізатори для стабільності антигенів і антитіл. У складі імунобіологічних препаратів як стабілізатори використовують желатин, глюкозу, сахарозу, гліцерин, Твін 80 (полісорбат), альбумін людини, натрію глутамат, амінокислоти (гліцин, пролін), магнію хлорид, магнію сульфат, сорбіт і ряд інших.

Введення консервантів. Одна з причин зниження якості лікарських препаратів – їх мікробна контамінація в процесі виробництва або зберігання, яка може призвести до зниження терапевтичного ефекту. У зв'язку з цим застосування лікарських препаратів можливе тільки за відсутності мікроорганізмів, тобто стерильними. Введення консервантів у розчини проводиться в тих випадках, коли збереження стабільності не можна гарантувати. Антимікробна речовина, що використовується для консервування ліків, має забезпечувати безпеку хворого і необхідну якість лікарських засобів. Виходячи з цього, до консервантів висувають такі вимоги:

- ✓ широкий спектр антимікробної дії при низьких концентраціях;
- ✓ хороша розчинність;
- ✓ сумісність з більшістю АФІ та допоміжних речовин, а також з пакувальними матеріалами;
- ✓ стабільність у широкому діапазоні рН і температури протягом терміну придатності лікарського препарату;
- ✓ відсутність впливу на органолептичні властивості лікарського препарату;
- ✓ відсутність здатності до утворення резистентної форми мікроорганізмів;
- ✓ не мають знижувати фармакологічну ефективність АФІ або проявляти токсичну, алергізуючу і подразнюючу дію.

До теперішнього часу не знайдено ще ні однієї хімічної сполуки, що повністю відповідає всім цим вимогам.

Класифікація консервантів:

1. Неорганічні сполуки.
2. Металоорганічні сполуки.
3. Органічні сполуки: спирти, феноли, органічні кислоти, солі четвертинних амонієвих сполук.

Основним результатом є порушення життєвих функцій клітини, зокрема, інактивація білкової частини ключових ферментів. Залежно від ступеня інактивації настає або загибель клітини, або уповільнення її життєвих функцій.

Для консервування рідких лікарських препаратів можуть використовуватися такі речовини: хлорбутанол, бензалконію хлорид, тіомерсал, сорбінова і борна кислоти, ніпазол, ніпагін, хлоргіксидину дیاцетат, біглюконат та ін.

Використовуються комбінації консервантів: суміш бензалконію хлориду і хлоргексидину, фенілетиловий ефір (0,4 %), ЕДТА (0,05 %) у поєднанні з бензалконієм, хлоргіксидином, хлорбутанолом. Вибір консерванта визначається складом лікарського засобу, рН середовища, режимом застосування препарату.

Для виробництва парентеральних препаратів, що містять біотехнологічні продукти, наприклад, вакцини, цитокіни, препарати імуноглобулінів, вводять ряд консервантів. У складі імунобіологічних препаратів як консерванти

використовують мертиолят (тіомерсал), фенол, формалін, мінімальні кількості антибіотиків (неоміцину, канаміцину, гентаміцину та ін.).

2.4. Методи стерилізації парентеральних препаратів відповідно до вимог ДФУ

Самостійним питанням отримання лікарських препаратів є методи стерилізації: інвентарю, первинної упаковки, ряду розчинів, скляних і металевих ємностей, окремих вузлів обладнання та ін.

Усі процеси стерилізації мають пройти валідацію. Особливу увагу цьому питанню слід приділяти, якщо обраний спосіб стерилізації не описаний у чинних виданнях Європейської Фармакопеї, ДФУ чи іншої відповідної фармакопеї або коли він використовується для продукції, що не є простим водним чи масляним розчином. За можливості термічна стерилізація має бути способом вибору. В усіх випадках процес стерилізації має відповідати реєстраційному досьє та ліцензії на виробництво.

Перед вибором будь-якого процесу стерилізації необхідно продемонструвати за допомогою фізичних вимірювань і, якщо можливо, біологічних індикаторів, що він підходить для даної продукції та ефективний для досягнення необхідних умов стерилізації у всіх частинах кожного типу завантаження. Валідацію процесу необхідно повторювати через проміжки, встановлені графіком, але не рідше одного разу на рік, а також завжди в разі внесення істотних змін у обладнання. Необхідно зберігати протоколи з результатами.

Для ефективної стерилізації весь матеріал у цілому має бути підданий необхідній обробці, а процес організований таким чином, щоб гарантувати, що це було досягнуто. Для всіх процесів стерилізації необхідно розробити способи завантаження і провести їх валідацію.

Застосування біологічних індикаторів слід розглядати тільки як додатковий метод контролю стерилізації. Біологічні індикатори необхідно зберігати і використовувати відповідно до інструкцій виробника, а їх якість контролювати методами позитивного контролю. У випадку використання біологічних індикаторів необхідно вжити суворих заходів, які запобігають мікробній контамінації з самих індикаторів. Мають бути чіткі способи диференціації непростерилізо-

ваної продукції та продукції, яка пройшла стерилізацію. Кожен кошик, лоток або інша тара для продукції або компонентів (первинного пакування) мають бути чітко марковані з вказівкою назви матеріалу, номера його серії та позначення: простерилізований він чи ні. Індикатори, такі, як автоклавна стрічка, за необхідності можуть бути використані для вказівки того, чи пройшла серія (або частина серії) процес стерилізації, проте вони не дають достовірної вказівки, чи серія справді стерильна. Для кожного циклу стерилізації потрібно складати протоколи. Вони мають бути затверджені як частина документації при видачі дозволу на випуск серії.

Термічна стерилізація. Кожний цикл термічної стерилізації має бути записаний на діаграмі час / температура з відповідною довжиною шкали або за допомогою іншого відповідного обладнання, що має необхідну точність і чіткість. Місце розташування температурних зондів, використовуваних для контролю та / або запису, має бути визначене під час валідації і в разі необхідності також перевірене за допомогою іншого незалежного температурного зонда, розташованого в тому ж місці. Можна також використовувати хімічні або біологічні індикатори, але вони не можуть замінити фізичні виміри. Має бути передбачений достатній час, щоб усе завантаження у всьому об'ємі досягло необхідної температури до того, як буде розпочато відлік часу стерилізації. Цей період має бути визначений для кожного типу завантаження, яке стерилізується. Після завершення високотемпературної фази циклу термічної стерилізації мають бути вжиті застережні заходи, що запобігають контамінації простерилізованого завантаження під час охолодження. Будь-яка охолоджувальна рідина або газ, що контактують із продукцією, мають бути простерилізовані за винятком тих випадків, коли гарантується, що жодний негерметичний контейнер не буде дозволений для використання.

Вологий жар. Для контролю процесу стерилізації вологим жаром необхідно перевіряти як температуру, так і тиск. Регулювальні прилади, як правило, мають бути незалежні від контролюючих приладів і від записуючих пристроїв. При використанні для цих цілей автоматизованих систем керування та моніторингу вони мають пройти валідацію, щоб гарантувати дотримання вимог до критичного процесу. Система керування і порушення в циклі стерилізації мають реєструватися системою контролю і знаходитися під наглядом оператора.

Протягом періоду стерилізації показання незалежного температурного зонда слід постійно перевіряти в порівнянні з показаннями самописної діаграми. Для стерилізаторів, обладнаних зливником на дні камери, також може бути необхідним реєстрація температури в цьому місці протягом усього періоду стерилізації. Необхідні часті випробування на герметичність камери, якщо цикл стерилізації включає вакуумну фазу. Об'єкти, які мають бути простерилізовані, крім продукції в герметичних контейнерах (первинному пакуванні), мають бути загорнені в матеріал, що пропускає повітря і пар, але запобігає повторній контамінації після стерилізації. Всі частини завантаження мають знаходитися в контакті зі стерилізуючим агентом при необхідній температурі протягом необхідного часу. Необхідно забезпечити, щоб для стерилізації застосовувався пар належної якості, що не містить такої кількості домішок, яка могла б викликати контамінацію продукції або обладнання.

Сухий жар. Процес стерилізації сухим жаром має передбачати циркуляцію повітря усередині камери і підтримку надлишкового тиску для запобігання надходженню в неї нестерильного повітря. Все повітря, що подається, має бути пропущене через фільтри HEPA. Якщо цей процес призначений також для усунення пірогенів, то як частина валідації мають бути проведені випробування з навмисним використанням ендотоксинів.

Стерилізація опроміненням. Стерилізація опроміненням використовується, головним чином, для стерилізації матеріалів і продукції, що чутливі до нагрівання. Багато лікарських засобів і деяких пакувальних матеріалів чутливі до випромінювання, отже, цей метод допустимий тільки тоді, коли була експериментально підтверджена відсутність шкідливого впливу на продукцію. Ультрафіолетове опромінення, як правило, не є прийнятним способом стерилізації. Під час процесу стерилізації необхідно вимірювати дозу випромінювання. Для цих цілей доцільно використовувати дозиметри, показання яких не залежать від інтенсивності випромінювання, але забезпечують кількісну реєстрацію дози випромінювання, поглинену продукцією, що стерилізується. Дозиметри мають бути розміщені серед завантаження в достатній кількості і на достатньо близькій відстані один від одного, щоб гарантувати наявність дозиметрів у всіх місцях, що піддаються опроміненню. Пластмасові дозиметри слід застосовувати лише в межах терміну дії їх калібрування. Показання дозиметрів необ-

хідно знімати протягом короткого відрізка часу після закінчення опромінення. Для додаткового контролю можуть бути використані біологічні індикатори. Процедури валідації мають гарантувати, що врахований вплив різної щільності укладок. Загальна доза випромінювання має бути дана протягом визначеного короткого проміжку часу.

Стерилізація оксидом етилену. Цей метод може бути використаний тільки тоді, коли неможливе використання іншого способу. Під час валідації процесу має бути доведено, що відсутній ушкоджуючий вплив на продукцію, а передбачені для дегазації умови і час є такими, що кількість залишкового газу і продуктів реакції буде знаходитися у встановлених межах, прийнятних для даного типу продукції або матеріалу. Істотне значення має безпосередній контакт між газом і мікробними клітинами; необхідно вжити запобіжних заходів, які усувають можливість проникнення мікробів у матеріал, такий, як кристали або сухий білок. Тип і кількість пакувальних матеріалів можуть істотно вплинути на процес. Перед обробкою газом має бути забезпечена відповідність вологості і температури матеріалів вимогам процесу. Необхідний для цього час слід навести у відповідність із протилежною вимогою – звести до мінімуму час перед стерилізацією. Кожний цикл стерилізації слід контролювати за допомогою відповідних біологічних індикаторів, необхідна кількість яких має бути рівномірно розподілена по всьому завантаженню.

2.5. Технологія виробництва парентеральних лікарських форм

Стадія 1. Санітарна підготовка виробництва

Санітарна підготовка виробництва включає комплекс заходів з очищення, вологого прибирання, дезінфекції поверхонь приміщень і обладнання, які спрямовані на досягнення відповідного класу чистоти, на забезпечення випуску високоякісного готового продукту, на попередження мікробного обсіменіння в ході виробництва, в процесі зберігання і транспортування, на створення безпечних умов праці та охорони здоров'я працівників.

Стадія 2. Підготовка вентиляційного повітря для «чистих» приміщень

Підготовка вентиляційного повітря для «чистих» приміщень здійснюється згідно з НД.

Для захисту чистих приміщень від забруднень, що вносяться з менш чистих зон, необхідно: підтримувати в чистих приміщеннях більш високий статичний тиск в порівнянні з сусідніми зонами; підтримувати достатню швидкість потоку повітря в місці розмежування чистої і менш чистої зони. Зворотний рух повітря може становити ризик забруднень.

Обмін повітрям у виробничих приміщеннях забезпечується за допомогою триступеневих припливних вентиляційних систем з попередньою підготовкою повітря, а також загальнообмінних витяжних систем. Ділянка обслуговується припливною триступеневою вентиляційною системою.

Очищення повітря, що подається в приміщення класів чистоти В і D, триступеневе, в зони класу чистоти А – додаткове очищення повітря на установках з ламінарним потоком повітря.

На першому ступені очищення відбувається забір повітря з вулиці, його підготовка і подача в камеру змішування. В системі передбачена двоступенева фільтрація повітря (фільтри класу G3 для першого ступеня очищення, F7 – для другого). Система оснащена двома вентиляторами (робочим і резервним), електрокалорифером, секцією шумоглушіння і системою кондиціонування.

Третій ступінь очищення призначений для забезпечення повітрям приміщень класу С з зонами А і В. Система оснащена фільтром високої ефективності очищення (фільтри класу H14). Забір попередньо підготовленого повітря проводиться вентилятором з камери змішування, оснащеної секцією шумоглушіння.

Для створення зони класу В використовується комплекс обладнання для чистих і особливо чистих приміщень.

У комплектацію ламінару входять: вентилятори; фільтри попереднього очищення; фільтри високої ефективності очищення; пристрій для УФ-опромінення.

Комплекс змонтований в приміщенні класу чистоти С. За допомогою вентиляторів, розташованих у верхній частині ламінарної камери, відбувається за-

бір повітря з приміщення класу чистоти С. Далі повітря продавлюється послідовно через фільтри класу F7 і H14, розташовані у верхній частині камери, і з визначеною швидкістю надходить в зону В.

Розлив препарату у флакони або ампули відбувається в зоні класу А.

У зоні класу А проводять технологічні стадії отримання препаратів, які в подальшому не піддаються стерилізуючій фільтрації, наприклад, отримання сорбованих вакцин для профілактики дифтерії, правця, кашлюку, гепатиту В і ряду інших.

Зона класу А створюється за допомогою ламінарної камери. Ламінарна камера входить до складу установки для розливу препарату у флакони і включає в себе: вентилятори; фільтри попереднього очищення; фільтри високої ефективності очищення. Повітря продавлюється послідовно через фільтри, розташовані у верхній частині ламінарної камери, і надходить в зону наповнення флаконів (зону А). У зоні А створюється односпрямований (ламінарний потік) повітря, що забезпечує в незамкненій чистій зоні швидкість 0,42–0,46 м/с.

Контроль концентрації частинок у чистих приміщеннях і зонах в період експлуатації організують відповідно до НД «Правила виробництва і контролю якості лікарських засобів» та «Контроль чистоти повітря і класифікація виробничих приміщень».

Клас чистоти виробничих приміщень визначений у НД «Правила виробництва і контролю якості лікарських засобів» (EC Guide to Good Manufacturing Practice) і «Підготовка та нормування чистоти вентиляційного повітря для виробничих приміщень».

Контроль температури і вологості повітря у виробничих приміщеннях, а також підпорів повітря здійснює персонал відділу виробництва відповідно до стандартної операційної процедури (СОП).

Регулярно, згідно з графіком виробничих робіт фахівець відділу контролю якості (ВКЯ) – мікробіолог – проводить моніторинг виробничого середовища з урахуванням всіх правил GMP. На підставі результатів складаються протоколи і виконуються записи в журналі реєстрації контролю.

Забір повітря, для контролю мікробної контамінації (кількість мікроорганізмів, що містяться в 1 м³ повітря) у виробничих приміщеннях, здійснюється за допомогою приладу для бактеріологічного аналізу повітря. Рекомендовані

вимоги до мікробіологічної чистоти «чистих» зон і приміщень наведені у табл. 2.1.

Таблиця 2.1 – Класифікація «чистих» приміщень

Клас чистоти приміщень	Технологічні операції	Максимально допустиме число частинок в 1 м ³ повітря, з розміром частинок, мкм				Максимально допустима кількість життєздатних мікроорганізмів в 1 м ³ повітря
		≥0,5	≥5,0	≥0,5	≥5,0	
		Оснащений стан		Функціонуючий стан		
А – локальна зона з ламінарним потоком стерильного повітря	Стерилізуюча фільтрація. Розлив у флакони та закупорювання пробками, обкатка ковпачками в асептичних умовах*	3500	* 1	3500	* 1	Менше 1
С	Приготування розчинів препарату	350000	2000	3500000	20000	100
Д	Приготування дезрозчинів; Підготовка технологічного одягу	3500000	20000	Не регламентується	200	

* у зоні А проводять виготовлення препаратів, які надалі не піддаються стерилізуючій фільтрації, а виготовляються із стерильних інгредієнтів.

Стадія 3. Одержання води очищеної

Отримання «Води очищеної» відповідно до вимог ДФУ здійснюється на установці отримання води очищеної з використанням таких послідовно з'єднаних функціональних блоків:

А) Блок попередньої підготовки води, який складається з сітчастого фільтра механічного очищення (рівень фільтрації – 100 мкм), який необхідний для видалення з води піску, окалин, іржі та інших завислих частинок.

Б) Мембранний блок, який складається з фільтра для видалення заліза (наповнювачі – гравій, кварцовий пісок, гідроантрацит) в комплекті з автома-

тичним клапаном керування; фільтра катіонообмінного пом'якшення води – пом'якшувач (наповнювач – Na-катіонообмінна смола) в комплекті з автоматичним клапаном керування, сольовим баком для таблетованої кухонної солі і станцією дозування луку з насосом.

В) Блок автоматичного керування роботою установки, який складається з контролера, який забезпечує роботу установки в автоматичному режимі і має вбудовану рідкокристалічну панель; установки УФ-знезараження; насоса; рулонного зворотноосмотичного елемента; дроселя концентрату; дроселя рециркуляції; датчика електропровідності і температури; датчика електропровідності.

Г) Система зберігання води очищеної з кільцевим трубопроводом, яка складається з накопичувальної ємності для зберігання води очищеної з кільцевим трубопроводом; фільтра дихання; кондуктометра; насоса багатоступеневого відцентрового для очищеної води.

Якість вихідної питної води, яка подається на установку, повинна відповідати ДСТУ «Вода питна».

Якість води очищеної має відповідати вимогам ДФУ, контролюватися згідно з графіком ВКЯ, відбір проб проводиться з точки споживання.

Отриману воду очищену подають на стадії: 4. Отримання води для ін'єкцій; 5. Підготовка технологічного одягу; 6. Приготування розчинів антисептиків; 7. Підготовка технологічного обладнання, посуду і допоміжного матеріалу до роботи в «чистих» приміщеннях; 8. Підготовка первинної упаковки.

Стадія 4. Одержання води для ін'єкцій

Воду для ін'єкцій, що відповідає вимогам ДФУ, отримують, наприклад, на установці «Milli-Q» (фірми «Millipore») з води очищеної, отриманої на стадії 3.

Установка «Milli-Q» являє собою блок з послідовно з'єднаних змінних елементів:

✓ пакет Q-Gard – для видалення іонів і органічних молекул з води, що надходить;

✓ лампа УФ 185 нм – для знищення бактерій і для зменшення рівня органічних молекул у воді;

✓ картридж Quantum – для видалення рівнів іонів і органічних молекул, які відслідковуються;

✓ фільтр Millipak Express 40 – для видалення всіх частинок і бактерій з розміром більше 0,22 нм;

✓ ультрафільтр BioPak – для видалення бактерій, нуклеаз (RNases, DNases) і ендотоксинів (пірогенів) з води.

Воду очищену, що надходить з накопичувальної ємності з показниками якості, що відповідають вимогам ДФУ, питомою електропровідністю не більше $10 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$ (при 20 °C) і рН 5,0-7,0 (потенціометрично), збирають у збірник і далі воду очищену подають на «Milli-Q» для отримання води для ін'єкцій, що відповідає вимогам ДФУ. Вода для ін'єкцій контролюється згідно з графіком ВКЯ, відбір проб проводиться з точки споживання.

Отриману воду для ін'єкцій подають на стадії: 9. Підготовка «чистих» приміщень; 7. Підготовка технологічного обладнання, посуду і допоміжного матеріалу до роботи в «чистих» приміщеннях; 8. Підготовка первинної упаковки (флаконів / ампул); 10. Отримання інфузійного або ін'єкційного препарату.

Стадія 5. Підготовка технологічного одягу

Підготовка технологічного одягу здійснюється відповідно до СОП «Підготовка технологічного одягу».

У комплект технологічного одягу, призначеного для роботи в приміщеннях класу чистоти В та зоні А, входять комбінезон облягаючого силуету, глибокий шолом – капюшон з прорізом для очей і бахіли. Робота повинна проводитися в стерильних одноразових рукавичках з гуми або еластичних полімерів.

Кожен комплект технологічного одягу може бути використаний тільки протягом однієї зміни. Потім він передається на обробку.

Персонал, який здійснює прання, сушку, упаковку і стерилізацію технологічного одягу, підготовку і стерилізацію рукавичок, повинен працювати в стерильному технологічному одязі з безворсової тканини.

Перед пранням проводять огляд стану технологічного одягу, оцінку ступеня його зносу, виявлення пошкоджень, перевірку роботи застібок і поділ одягу за кольорами і приналежністю. За наявності дефектів одяг підлягає ремонту або заміні на новий.

Огляд стану технологічного одягу перед пранням або ремонтом проводиться в спеціальному приміщенні класу чистоти С. Прання, полоскання і сушіння одягу проводять в пральній машині згідно з інструкцією. Для прання ви-

користовують синтетичні миючі засоби для автоматичних пральних машин, що характеризуються низькими піноутворюючими властивостями. Масова частка миючого засобу в розчині повинна бути визначена шляхом валідації процесу. Одяг завантажують в пральну машину, заливають воду очищену зі стадії 3, профільтровану через мембранний фільтр з розміром пор 5,0 мкм і засипають миючий засіб. На кожен кілограм одягу повинно припадати не менше 10 л розчину миючого засобу. Рекомендована температура для змішаних тканин 30–35 °С, для нейлону – 50–55 °С, для поліефірних тканин – 60–67 °С.

Після закінчення прання одяг слід кілька разів прополоскати протягом 20–30 хв у воді очищеній, профільтрованій через мембранний фільтр з порами розміром не більше 5,0 мкм, спочатку – теплою, потім – холодною водою.

Просушений технологічний одяг укладають в мішок для стерилізації, наклеюють індикатор стерилізації і стерилізують в паровому стерилізаторі при температурі 120 ± 1 °С, надмірному тиску 0,10–0,11 МПа протягом 45 ± 1 хв. Контроль параметрів режиму роботи автоклаву проводять візуально за показниками мановакууметра. Після закінчення циклу стерилізації колір індикаторів повинен відповідати стандарту або бути темнішим. Зразок індикатора вклеюють в журнал стерилізації матеріалів.

Після стерилізації технологічний одяг вивантажують з автоклава і передають на інші стадії.

Підготовлений технологічний одяг контролюють за показниками мікробної контамінації відповідно до СОП лабораторією ВКЯ з періодичністю: 1 раз на два тижні безпосередньо після стерилізації контролюється не менше 2 комплектів від кожного завантаження автоклава – технологічний одяг повинен бути стерильним; 2 рази на тиждень в процесі роботи контролюється технологічний одяг 2–3 чоловік, допускається не більше 2-х колоній неспоруютворюючих мікроорганізмів у змивах з технологічного одягу однієї людини, що працює в приміщеннях і зонах класів чистоти А і В. Тривалість зберігання стерильного одягу не більше 24 годин.

Відповідно до СОП контроль ступеня виділення частинок тканиною технологічного одягу повинен проводитися не рідше 1 разу на два тижні (на наступний день після прання). Для цього необхідно досліджувати не менше 5 % від усієї партії випраного одягу.

Технологічний одяг вважається придатним для використання в приміщеннях і зонах класів чистоти А і В виробництва стерильних лікарських засобів у тому випадку, якщо з ділянки тканини площею 10 см² під впливом потоку повітря об'ємом 1 л виділяється в середньому не більше 40 часток розміром \geq 5,0 мкм.

Строк носіння технологічного одягу за ступенем зносу становить від 3 до 6 місяців. Після закінчення зазначеного терміну технологічний одяг замінюють на новий.

Можливе використання комерційного одноразового стерильного комплексу одягу.

Стадія 6. Приготування розчинів антисептиків

Особи, які готують дезінфікуючі розчини, проходять інструктаж, працюють в гумових рукавичках, захисних окулярах, респіраторі типу «Пелюстка».

Як антисептики використовують розчини дезінфікуючих засобів (далі – деззасобів) для обробки виробничих приміщень, обладнання, рук і рукавичок персоналу. Використовуються такі миючі та дезінфікуючі розчини: деззасоби Ефект-форте, Септабик, Біодез-екстра, розчини перекису водню різної концентрації, розчини спирту етилового та ін. Не допускається доливання свіжоприготовлених розчинів в ємності, частково заповнені дезрозчином.

Антисептики готують в спеціально призначених приміщеннях або обладнаних зонах, оснащених витяжною вентиляцією. Антисептики для «чистих» приміщень готують в контрольованих приміщеннях (приміщеннях, в яких контролюється мікробіологічна забрудненість на рівні класу чистоти D або вище).

Для приготування антисептиків використовують градуйовані контейнери. На контейнер наклеюють етикетку із зазначенням назви підприємства, підрозділу і деззасобу, його кількості, дати відмірювання і підпису виконавця. У журналі приготування антисептиків виконують відповідний запис.

Сипучі інгредієнти зважують в спеціально виділеній зоні або приміщенні на вагах. Необхідну кількість наважок поміщають в чисті контейнери.

Контейнери з інгредієнтами закривають (пробками, кришками, алюмінієвою фольгою). На контейнер наклеюють етикетку зі зазначенням назви підприємства і підрозділу, назви деззасобу, його кількості, дати зважування і під-

пису виконавця. У журналі приготування антисептиків виконують відповідний запис.

Стадія 7. Підготовка персоналу до роботи в «чистих» приміщеннях

Вимоги до персоналу. Персонал, що працює в «чистих» приміщеннях виробництва, повинен володіти знаннями і досвідом практичної роботи, необхідними для виробництва стерильних лікарських засобів, у тому числі знаннями з гігієни та основ мікробіології, мати спокійний, врівноважений характер, схильність до підтримки чистоти і порядку в приміщенні, бути заздалегідь готовим до перенесення деяких незручностей, пов'язаних з умовами роботи.

Працівники, які тільки стають до роботи, повинні пройти первинне навчання. Періодично, не рідше 1 разу на рік, персонал повинен проходити навчання і перевірку знань, інструктаж з охорони праці та техніки безпеки.

Весь персонал, зайнятий безпосередньо на виробництві, включаючи тимчасово працюючих, повинен проходити регулярні медичні огляди.

Персонал, який здійснює візуальний контроль препарату у флаконах або ампулах, повинен проходити огляди лікарями-окулістами 1 раз у 6 місяців.

До роботи в «чистих» приміщеннях не повинні допускатися носії патогенної мікрофлори, які страждають на алергічні та шкірні захворювання, в тому числі підвищеним відділенням лупи, а також, що палять.

Персонал повинен доводити до відома свого керівника про будь-які захворювання (шкірні, гострі респіраторні та ін.), які здатні негативно впливали на якість лікарських засобів.

Всі люди, що входять у виробничі приміщення, а також відвідувачі та інспектори повинні суворо дотримуватися правил особистої гігієни, включаючи носіння захисного одягу.

Число працівників обмежується мінімально необхідним.

Персонал не повинен торкатися незахищеними руками вихідної сировини, допоміжних матеріалів, матеріалів первинної упаковки, частин обладнання, що контактують з препаратом, якщо це не передбачено робочими інструкціями.

Правила поведінки персоналу. Персонал повинен суворо дотримуватися правил особистої гігієни, носити технологічний одяг з безворсової тканини.

Забороняється: використовувати косметику, носити ювелірні вироби; приймати їжу, пити, палити, а також зберігати їжу і особисті ліки; заносити у виробничі приміщення особисті речі.

Вхід і вихід, зайві рухи в «чистому» приміщенні суворо обмежені. Переміщення персоналу всередині приміщення повинні здійснюватися в певному порядку залежно від виконуваних виробничих операцій. Забороняється безцільне ходіння по приміщеннях під час роботи. Слід уникати розмов на сторонні теми.

Все усне спілкування з людьми, що знаходяться поза виробничими приміщеннями, має відбуватися через телефон, селектор або інший переговорний пристрій.

Персонал не повинен нахилитися над відкритими флаконами / ампулами.

Не можна піднімати і використовувати предмети, що впали на підлогу під час роботи.

Підготовка персоналу до роботи в приміщеннях класу чистоти В.
Підготовка персоналу здійснюється відповідно СОП «Виробництво лікарських засобів. Персонал фармацевтичних підприємств. Основні положення»

У вбиральні, розташованій при вході у виробничу будівлю, співробітники знімають верхній одяг і взуття, надягають перехідний одяг і змінне взуття. Потім вони проходять в приміщення підготовки персоналу, яке доцільно розділити лавою з ячейками для взуття в нижній частині. Лава призначена для умовного поділу етапів підготовки персоналу.

У першій частині приміщення підготовки персонал знімає з себе перехідний одяг, змінне взуття та особисті речі, залишаючи нижню білизну, і розміщує знятий одяг в індивідуальних шафах. Потім приймає душ (за необхідності), надягає індивідуальні тапочки і миє руки.

Для миття рук потрібно відкрити крани (рекомендується використовувати змішувачі, які приводяться в дію без допомоги рук) і змочити руки теплою водою. Бажано використовувати рідке мило, поміщене в дозатор. Слід налити мило на долоні, ретельно вимити руки до ліктів і потім насухо витерти рушником одноразового або багаторазового використання або висушити за допомогою повітряної сушарки. При виробництві стерильних лікарських препаратів слід використовувати стерильні рушники з матеріалів, які не виділяють ворс.

Потім персонал повинен підійти до лави і сісти на неї. Сидячи на лаві, слід зняти тапочки, помістити їх без допомоги рук в індивідуальну комірку лави, перекинути ноги через лаву, повернутися на 180° і взяти з індивідуальної полиці шафи або стелажа пакети з комплектами технологічного одягу, нижньої білизни (якщо використовується) і взуттям. Упаковку, в яку було загорнуто одяг, слід помістити в ємність з кришкою, що відкривається за допомогою ножної педалі.

Друга частина кімнати служить для надягання нижньої білизни (якщо використовується), комплекту технологічного одягу і взуття, а також обробки рук розчинами деззасобів. За необхідності слід надягати рукавички.

Одяг слід надягати обережно, щоб він не торкався підлоги, стін та інших предметів. Усі деталі комплекту технологічного одягу повинні вдягатися зверху вниз, заправляючи верхню частину під нижню. Взуття (шкіряні тапки) надягають в останню чергу.

У приміщенні підготовки персоналу бажано мати дзеркало, щоб людина могла перевірити, чи правильно вона одягнена.

Рекомендується, щоб у приміщенні підготовки персоналу була інструкція (СОП) з перевдягання, що детально описує всі необхідні дії, або порядок підготовки персоналу був зображений у вигляді схеми.

При виробництві стерильних лікарських засобів вхід до приміщення, особливо класу чистоти В із зоною А, доцільно здійснювати через повітряний шлюз, класу чистоти С – за необхідності. За необхідності вийти з виробничого приміщення персонал проходить ті ж процедури у зворотному порядку, минаючи повітряний шлюз.

Зберігання технологічного одягу, якщо він використовується знову при поверненні до виробничого приміщення, повинно забезпечити його мінімальне забруднення. Він може зберігатися на вішалках у шафах, на вішалках у ламінарному потоці стерильного повітря, в пакетах у шафах або на полицях стелажа. При зберіганні одягу можливе використання УФ-опромінення.

Після того як надягнуто весь комплект технологічного одягу, персонал проходить в другу умивальну кімнату, де обробляє руки деззасобами. Для обробки рук використовують деззасоби, наприклад, розчин з масовою часткою Септабіка 0,1 % або розчин спирту етилового з об'ємною часткою 70 % та ін.

Підготовка «чистих» приміщень. Підготовка «чистих» приміщень здійснюється відповідно до СОП «Підготовка виробничих приміщень».

Підготовка виробничих приміщень класу чистоти В з локальними зонами класу чистоти А ділиться на щоденну і генеральну. У процесі підготовки використовують: серветки з безворсової тканини, капронової тканини із обробленими краями, губки з пінополіуретану.

Для прибирання підлоги використовують ганчірки з забитими краями з тканин пакувального і технічного призначення. Для запобігання появі стійких форм мікроорганізмів деззасоби чергуються.

Матеріали та інвентар для обробки приміщень маркують, зберігають в спеціально відведеному місці і використовують суворо за призначенням.

Підготовка виробничих приміщень при щоденному і генеральному прибиранні. Щоденне прибирання приміщень класу чистоти В з локальними зонами класу чистоти А проводять в кінці кожної зміни вологим способом. Поверхні приміщень протирають дезінфікуючим розчином антисептика з додаванням миючого засобу. Обробку проводять із розрахунку визначених норм антисептика на 1 м².

Контроль чистоти виробничих приміщень. Контроль мікробної контамінації поверхонь чистих виробничих приміщень проводять згідно з СОП 1 раз на тиждень після обробки приміщень дезрозчинами і 1 раз на зміну в процесі роботи. У виробничих приміщеннях і зонах класів чистоти А і В поверхні приміщень після обробки повинні бути стерильними. У процесі роботи в змивах з поверхонь приміщень допускається не більше 2 колоній неспорутворюючих мікроорганізмів на 2 паралельних чашках Петрі.

Контроль мікробної контамінації повітря зон класу чистоти А проводять 1 раз на тиждень перед початком роботи після обробки, 1 раз на зміну в процесі роботи; контроль мікробної контамінації повітря приміщень класу чистоти В проводять 1 раз на тиждень перед початком роботи після обробки, 2 рази на тиждень в процесі роботи згідно з СОП, з використанням пробовідбірника.

Допустима кількість життєздатних мікроорганізмів в 1 м³ повітря в зонах класу чистоти А – менше 1, в приміщеннях класу чистоти В – не більше 10.

Можливий контроль мікробної контамінації повітря методом седиментації на чашки Петрі. Допустима кількість життєздатних мікроорганізмів за 30 хв.

на двох паралельних чашках у зонах класу чистоти А – менше 1, в приміщеннях класу чистоти В – не більше 2.

Контроль мікробної контамінації повітря виробничих приміщень класу чистоти D проводять 1 раз на місяць методом седиментації на чашки Петрі, допускається не більше 100 життєздатних мікроорганізмів.

Контроль концентрації аерозольних частинок у повітрі проводять за допомогою лічильника аерозольних частинок відповідно до СОП: 2 рази на тиждень у функціонуючому стані зон класу чистоти А, допускається не більше 3500 частинок розміром $\geq 0,5$ мкм, не повинно бути частинок розміром $\geq 5,0$ мкм в 1 м^3 повітря; 2 рази в тиждень у функціонуючому стані приміщень класу чистоти В, допускається не більше 350000 частинок розміром $\geq 0,5$ мкм, не більше 2000 частинок розміром $\geq 5,0$ мкм в 1 м^3 повітря.

Підготовка технологічного обладнання, посуду і допоміжного матеріалу до роботи в «чистих» приміщеннях. Підготовка технологічного обладнання здійснюється згідно з СОП «Підготовка технологічного обладнання». Для забезпечення належної безперебійної роботи виробничого устаткування регулярно, відповідно до графіків планово-попереджувальних ремонтів (ППР), проводяться огляди і, за необхідності, поточний ремонт обладнання. За результатами ремонту виконується відповідний запис у журналі здачі / приймання обладнання в ремонт і з ремонту, ставиться відмітка у графіку ППР. Графіки ППР розробляються щорічно групою технічного обслуговування і ремонту, затверджуються відповідальною особою підприємства.

До початку і після закінчення ремонтних робіт проводиться очистка обладнання. Перед початком робіт з виробництва перевіряють наявність статусних етикеток і записів про стан обладнання в журналах контролю очищення обладнання, наявність протоколів про відсутність слідів попереднього препарату в змивах з устаткування і мікробіологічного контролю. Результати записують у виробничих картах. Підготовка технологічного обладнання складається з мийки і стерилізації знімних частин (вузлів) або обробки внутрішніх і зовнішніх частин (поверхонь) миючими та деззасобами. Підготовка проводиться до або після проведення технологічного процесу. Контроль якості підготовки обладнання проводять відповідно до СОП.

Необхідно чергувати деззасоби для запобігання появи стійких форм мікроорганізмів. Дезрозчини повинні бути стерильними. Щоб уникнути росту мікроорганізмів розбавлені розчини слід зберігати обмежений час в чистих щільно закритих ємностях. До частково порожніх ємностей не можна доливати свіжоприготовлені розчини.

Як матеріали для підготовки обладнання рекомендується застосовувати поролоні губки, серветки із обробленими краями з капронових або шовкових тканин. Матеріали та інвентар для обробки обладнання необхідно маркувати, зберігати в спеціальному приміщенні та використовувати тільки за призначенням.

Після використання матеріали для обробки протягом 2–3 годин знешкоджують замочуванням у розчині перекису водню (масова частка 6 %), розчині хлораміну Б (масова частка 1 %) або в освітленому розчині хлорного вапна (масова частка 5 %).

Підготовка технологічного обладнання у виробничих приміщеннях класів чистоти А і В. Частини (вузли) устаткування, які знімаються, що безпосередньо стикаються з лікарськими речовинами або засобами слід зняти, розібрати і ретельно вимити в розчині миючого засобу (масова частка 0,05 %) при температурі 60 °С, потім кілька разів обполоснути водою очищеною і водою для ін'єкцій, профільтрованою через мембранний фільтр з порами розміром не більше 5,0 мкм. Промивні води рекомендується контролювати на залишкову кількість діючої речовини.

Вимиті частини (вузли) слід зібрати на «чистому» столі в ламінарному потоці стерильного повітря (зона А класу чистоти), загорнути, помістити в бікси і передати на стерилізацію. Стерилізацію знімних частин обладнання рекомендується проводити в прохідному автоклаві при температурі 120 ± 1 °С, надмірному тиску 0,11 МПа ($1,1 \text{ кгс/см}^2$) протягом 45 хвилин, з подальшим підсушуванням при залишковому тиску 0,07 МПа (кгс/см^2) не менше 10 хвилин.

Внутрішні частини обладнання слід обробляти розчином миючого засобу при температурі 60 °С, потім кілька разів обполоснути водою очищеною і водою для ін'єкцій, профільтрованою через мембранний фільтр з порами розміром не більше 5,0 мкм, і продути профільтрованим стисненим повітрям. Стерилізацію нерозбірних ділянок технологічного обладнання рекомендується здійс-

нювати гострим паром при температурі 120 ± 1 °C протягом 60 хв. За необхідності внутрішні поверхні протирати серветкою, змоченою спиртом етиловим (об'ємна частка 70 %).

Зовнішні поверхні обладнання слід обробляти відповідно до СОП із використанням миючих і деззасобів.

Контроль якості підготовки обладнання слід проводити відповідно до СОП. Результати контролю фіксують у протоколі кількісного визначення діючої речовини в змивах обладнання.

Фахівець ВКЯ відбирає пробу для аналізу мікробної контамінації обладнання 1 раз на тиждень під час виробничого процесу (зовнішні поверхні) і 1 раз на 2 тижні до початку виробничого процесу після проведення очищення (генерального прибирання та / або обробки деззасобами).

Результати мікробіологічних досліджень, оформлені у вигляді протоколів, підшивають в папку «Протоколи мікробіологічного контролю обладнання». Копію протоколу передають на виробництво. На підставі результатів вносяться дані до журналу «Морфологія колоній, виявлених на виробничих ділянках і боксах ВКЯ».

Стадія 8. Стерилізація флаконів / ампул

Флакони / ампули зі стадії мийки (підготовка флаконів здійснюється в приміщенні класу чистоти D) надходять на стерилізацію в стерилізаційний тунель, який має три зони: 1 – зона нагрівання до температури стерилізації; 2 – зона стерилізації продувкою гарячого повітря – 296 ± 5 °C; 3 – зона охолодження.

Після стерилізації і охолодження флакони / ампули контролюють:

- ✓ на стерильність у мікробіологічній лабораторії ВКЯ: флакони / ампули повинні бути стерильними, визначення проводять відповідно до СОП;
- ✓ на вміст механічних включень (кожну партію): в змивах з внутрішньої поверхні флаконів / ампул не повинно бути видимих неозброєним оком механічних включень, визначення проводять відповідно до СОП.

Стерильні флакони / ампули на стадії 8 маркують ідентифікаційними етикетками із зазначенням номера партії флаконів, дати стерилізації і передають на стадію наповнення флаконів препаратом.

Стадія 9. Підготовка пробок, стерилізація пробок. Підготовка ковпачків

При виробництві препаратів у флаконах для закупорювання використовують пробки з різних матеріалів, наприклад, з бромбутилу або іншого матеріалу. Вхідний контроль пробок на відповідність СОП здійснює контрольна-аналітична лабораторія ВКЯ. Пробки доставляють зі складу в пакетах. Одночасно з партією пробок передається і аналітичний лист із висновком ВКЯ про якість пробок. Поверхню пакетів, в яких отримують пробки, перед передачею до мийки обробляють розчином антисептику. Пробки розфасовують по 50–100 шт. в пакети для стерилізації, наклеюють індикатор стерилізації ІС-120 і стерилізують в паровому стерилізаторі при температурі 120 ± 1 °С і тиску 0,1 МПа протягом 15 хв. Контроль стерилізації – ІС-120. Сушка пробок проводиться гарячим повітрям при температурі не вище 90 ± 5 °С протягом не менше 2 год і не більше 3 год. Охолодження пробок проводиться протягом 30 хв після сушки. Після стерилізації та сушки пробки контролюють:

✓ на стерильність в мікробіологічній лабораторії ВКЯ: пробки повинні бути стерильними, визначення проводять відповідно до СОП;

✓ на вміст механічних включень: в змивах з пробок не повинно бути видимих неозброєним оком механічних включень, визначення проводять відповідно до СОП;

✓ на вміст води в пробках: втрата в масі повинна становити не більше 0,2 %.

Після стерилізації пакети для стерилізації маркують ідентифікаційними етикетками із зазначенням номера партії пробок і дати стерилізації. Зберігають пробки в приміщенні в умовах, що повністю виключають порушення стерильності і потрапляння механічних включень.

Можливе використання митих і стерильних пробок в спеціальних пакетах, що надходять на підприємство.

Для обкатування флаконів використовують ковпачки або алюмінієві, або з пластиковими вставками.

Вхідний контроль ковпачків на відповідність НД здійснює ВКЯ: зовнішній вигляд і стерильність (в разі отримання стерильних ковпачків). Наприклад, комбіновані ковпачки в герметичних поліетиленових пакетах поставляються

готовими до використання RTU (Ready to Use), зі складу їх передають на стадію 10.3.

Одночасно з партією ковпачків передається і аналітичний лист із висновком ВКЯ про якість ковпачків.

Стадія 10. Отримання розчину препарату для ін'єкцій або інфузій

Стадія 10.1. Приготування розчину

При виробництві препаратів використовують сировину, що пройшла вхідний контроль у ВКЯ на відповідність НД. При виробництві препаратів використовують допоміжні речовини, які мають різний вміст основної речовини і вологи, що вимагають перерахунку на 100 % ваги. На вагах у тарі для наважок зважують розрахункові кількості АФІ та допоміжних речовин. Матеріали повинні бути забезпечені етикетками із зазначенням назви, номера серії і маси речовини.

Приготування ін'єкційних форм препаратів проводять за двома напрямками:

1. Приготування розчинів лікарського препарату, що містять гідрофільні АФІ, отримані біотехнологією (імуноглобуліни, моноклональні антитіла, цитокіни, ферменти, бактеріофаги, антибіотики та ін.). Отримані компоненти розчиняють у воді для ін'єкцій (або в іншому необхідному розчиннику) в регламентованій послідовності (стабілізатори, консерванти, компоненти для ізотонічності та ін.). Завантаження АФІ ведуть при постійному перемішуванні і рекомендованій температурі розчинника. Перемішування розчину ведуть до повного розчинення компонентів. У разі необхідності ліофілізації препарату проводять підбір стабілізатора – кріопротектора. Проводять контроль препарату за показниками, описаними у СОП і МКЯ на препарат. Ємність з напівпродуктом направляють на стадію 10.2.

2. Приготування суспензій лікарського препарату, що містять АФІ, отримані біотехнологією (вакцини бактеріальні, вірусні, рекомбінантні, полісахаридні та ін.). Оскільки ряд вакцинних препаратів випускається у формі суспензій, що містять ад'юванти, наприклад, алюмінію гідроксид, для них неможлива мембранна стерилізуюча фільтрація. У зв'язку з цим їх виробництво здійснюють в умовах аспетики (зона А). Отримані стерильні компоненти вакцин – АФІ (анатоксини, бактеріальні та вірусні суспензії, їх очищені антигени та ін.) роз-

чиняють у фізіологічному розчині натрію хлориду у воді для ін'єкцій в регламентованій послідовності (стабілізатори, консерванти, ад'юванти, сорбенти, кріопротектори та ін.). Завантаження АФІ ведуть при постійному перемішуванні і рекомендованій температурі розчинника. Перемішування розчину ведуть до повного розчинення компонентів і сорбції антигенів. Проводять контроль препарату за показниками, описаними у НД на препарат. Ємність з напівпродуктом направляють на стадію наповнення первинної упаковки (ампули / флакони).

Стадія 10.2. Стерилізуюча фільтрація

Ємність з напівпродуктом переносять до приміщення стерилізуючої фільтрації і поміщають до напірної ємності. Кришку ємності щільно закривають. На штуцер напірної ємності з розчином препарату надягають шланг, що йде від вхідного штуцера капсули для освітлюючої та стерилізуючої фільтрації одноразової системи з діаметром пор 0,22 мкм. До другого відведення напірної ємності під'єднують шланг від лінії стисненого повітря і створюють тиск в ємності $0,1 \pm 0,01$ МПа, контролюючи його за манометром. Стиснене повітря, яке подається в напірну ємність, стерилізують за допомогою фільтруючого елемента, наприклад, Мідісарт-2000 з утримуючою здатністю 0,22 мкм.

Перед початком роботи капсулу для стерилізуючої фільтрації перевіряють на цілісність мембрани методом визначення «точки бульбашки» або іншим методом згідно з НД.

Перші порції відфільтрованої емульсії в кількості 50 ± 2 мл, які пішли на промивку капсули, збирають окремо. Після заповнення і промивання фільтра відбирають пробу фільтрату на стерильність. Потім продовжують фільтрацію в стерильну ємність. В кінці фільтрації знову відбирають пробу на визначення стерильності препарату.

Після закінчення фільтрації проводять контроль цілісності мембрани. При виявленні порушення цілісності мембрани весь профільтрований препарат підлягає повторній фільтрації на резервному фільтрі (в складі одноразової системи), що витримує зазначений тест.

Ємність з препаратом маркують ідентифікаційною етикеткою із зазначенням назви препарату, номера серії, дати стерилізуючої фільтрації і передають на стадію наповнення первинної упаковки у флакони / ампули.

Препарат після стерилізуючої фільтрації і перед наповненням первинної упаковки повинен відповідати таким показникам: стерильність, кількісне визначення, рН, прозорість / кольоровість та ін.

Усі дані з ведення технологічного процесу отримання препарату заносять в робочі журнали, технологічні протоколи.

Розчин передають на стадію наповнення флаконів і ампул.

Стадія 10.3. Наповнення флаконів і ампул на машині асептичного дозування розчинів

Наповнення напівпродукту проводять на апараті для асептичного наповнення розчину препарату в приміщенні класу чистоти В зоні А при включеному ламінарі. Точність об'єму розливу контролюють каліброваним мірним шприцом згідно з «Інструкцією з контролю точного розливу препарату». У процесі розливу відбирають флакони / ампули: на початку, всередині і в кінці розливу на контроль стерильності. У разі виробництва препарату в рідкому вигляді ампули і флакони герметизують.

Розлив препаратів у вигляді суспензій проводять при постійному перемішуванні для їх рівномірного розподілу з метою гомогенності препарату при наповненні, наприклад, сорбованих або цілісноклітинних вакцин.

Для наповнення препаратів використовують різну первинну упаковку, яку постійно вдосконалюють. Для надійності закупорювання флаконів, яке здійснюється безпосередньо в камері ліофілізатора, були запропоновані флакони марки «LeoSeal» виробництва West Pharmaceuticals Services. Використання даної технології дозволяє флаконам виходити з сублімаційної установки повністю закупореними, що не вимагає додаткової стадії закатування алюмінієвим ковпачком.

Інтерес становлять флакони, розроблені фірмою SCHOTT Tioplyo, з ультратонким гідрофобним внутрішнім покриттям і оптимізованою геометрією дна, що дозволяють збільшити термін зберігання біотехнологічних продуктів. При використанні цих флаконів не відбувається прилипання сублімованих інгредієнтів до стінок флаконів та зводиться до мінімуму ймовірність руйнування скла.

Усі дані з ведення технологічного процесу розливу заносять в робочі журнали, технологічні протоколи.

При виробництві ліофілізованих препаратів при їх наповненні у флакони проводять передзакупорювання. Після наповнення флаконів їх передають на стадію ліофілізації препарату (при виробництві ліофілізованих препаратів).

Препарат після стерилізуючої фільтрації і перед розливом повинен відповідати показникам НД.

Для розливу препаратів, що містять біотехнологічні продукти, необхідно використовувати обладнання шприцевого наповнення в асептичних умовах. При цьому неприпустимою є термічна стерилізація флаконів і ампул з продуктом після наповнення у зв'язку з їх термолабільністю. Для розливу лікарських форм з біотехнологічними АФІ основною вимогою є точність дозування. Переважно дозування проводять за суворо заданим об'ємом. У наш час багато фірм виробляють різні види обладнання для автоматичного дозування препаратів в ампули або флакони. Добре зарекомендували себе апарати фірм: Bosch (Німеччина) Cozzoli (США), King (Велика Британія) Concept GmbH (Німеччина) та ін.

Стадія 10.4. Ліофілізація препарату

Висушування є одним з найбільш досконалих процесів стабілізації властивостей продуктів біологічного (мікробіологічного, рослинного, тваринного) походження і дозволяє зберегти продукти біотехнології тривалий час. Продукти біотехнології вимагають при зневодненні збереження життєздатності клітин (вакцини, пробіотики, рекомбінантні продукти і т.д.). При виробництві зазначених препаратів найбільш широко використовується метод заморожування-висушування (сублімація). Сутність сублімації полягає в тому, що волога із замороженого стану (льоду) переходить у газоподібний (пара), минаючи рідку фазу. Сублімаційне висушування (ліофілізація) має низку істотних переваг перед іншими методами:

- ✓ можливість висушування готових лікарських препаратів в ампулах або флаконах в асептичних умовах, причому герметизацію можна проводити в атмосфері захисного газу;

- ✓ вміст вологи в продукті може досягати вкрай низького рівня;

- ✓ висока стабільність і життєздатність ліофілізованого матеріалу.

До недоліків можна віднести неможливість ліофілізувати продукт, який для утворення льоду вимагає переохолодження або при заморожуванні утворюється плівка на поверхні, яка перешкоджає виходу парів вологи.

Процес ліофілізації здійснюється в чотири стадії: 1) попереднє заморожування; 2) первинне висушування (сублімація у вакуумі); 3) вторинне висушування (досушування); 4) закінчення процесу сушіння і витягання висушеного матеріалу. Основним фактором, що визначає виживання мікроорганізмів, збереження штучних мембран, біологічну активність препаратів і т.д., в період досушування слід вважати температуру матеріалів, яка є функцією фізико-хімічних, структурно-механічних і біохімічних властивостей. Вибір режимів ліофілізації безпосередньо залежить від ряду характеристик матеріалу, що висушується: дисперсності, від якої залежать фізико-механічні та теплофізичні властивості; густини і в'язкості; поверхневого натягу; теплоємності; теплопровідності та ін.

Попереднє заморожування продукту, який висушується, є визначальною стадією процесу ліофілізації і має здійснюватися: 1) нижче евтектичної точки компонента із найнижчою температурою заморожування; 2) при підтримці оптимальної швидкості заморожування для забезпечення мінімально можливих впливів на клітину (мембрану) кристалів льоду і електролітів.

Евтектична точка – евтектична температура, при якій відбувається повне заморожування матеріалу, а в замороженій масі не буде вільної вологи. Для визначення евтектичної точки замерзання будь-якого розчину можна використовувати ефект різкого збільшення його опору при переході рідини (провідник другого ряду) в твердий стан (лід), який за своїми характеристиками аналогічний діелектрику і може бути визначений за допомогою приладу для визначення питомого опору (кондуктометра) з одночасним вимірюванням температури. На думку ряду авторів, для більшості біопрепаратів евтектичні температури лежать в діапазоні від мінус 25 до мінус 70 °С. Тільки в тому випадку, якщо забезпечено повне попереднє заморожування ліофілізованого матеріалу, можна створювати вакуум для другої стадії первинного висушування – сублімації льоду. Якщо вакуум прикладений до неповністю замороженого або переохолодженого матеріалу, то спостерігається ефект його спінювання, що різко знижує якість висушеного продукту – виживаність, біологічну активність, стабільність і т.д. Таке значення евтектичної температури біотехнологічних об'єктів пов'язано з ефектом колапсу, який виникає, якщо матеріал, який сублімується, охолоджується нижче евтектичної температури. Ефект колапсу проявляється в

тому, що заморожена система втрачає здатність до повної кристалізації. Цей ефект має місце тоді, коли матеріал охолоджується нижче точки евтектики таким чином, що всередині замороженої маси залишаються дрібні полоски сублімованого льоду із незамороженою вологою. Особливо часто це проявляється для речовин, що знаходяться в аморфному фазовому стані. Важливо враховувати швидкість заморожування продукту, яка безпосередньо залежить від властивостей ліофілізованого матеріалу. Швидкість заморожування визначається дослідником для кожного конкретного продукту. Процес висушування біологічних препаратів із замороженого стану зазвичай розбивають на два основні періоди, за межу між якими приймають нульову температуру препарату. Перший період – сублімаційний, температура препарату нижче 0 °С (зазвичай мінус 20 °С – мінус 40 °С). Протягом цього періоду вільна вода у формі льоду видаляється з препарату повністю і його температура підвищується до 0 °С. Вологість препарату становить в цей час 5–10 % і обумовлена зв'язаною водою. У другий період температура препарату більше нуля і відбувається видалення зв'язаної води. В кінці цього періоду температура доходить до 25–40 °С і створюються умови для видалення води, зв'язаної з препаратом міцнішими зв'язками. Вологість до кінця цього періоду – 2–3 %. Такий поділ є умовним, тому певна частина зв'язаної з найменшою енергією зв'язку може бути видалена в перший період.

Первинне висушування – сублімація льоду в камері субліматора при створенні вакууму, який забезпечує вільну дифузію водяної пари від замороженої маси до охолодженої поверхні конденсатора. Розглядаючи видалення парів води із замороженого матеріалу як дифузійний процес, можна відзначити, що процес заморожування-висушування є відносно повільним. У роботах з дослідження моделей масопереносу при сублімації льоду з продукту передбачає наявність безперервних каналів, утворених сублімованим льодом, оточеним каркасом продукту з низькою проникністю (при цьому пара при швидкому заморожуванні за рахунок температурних напружень дифундує через цей каркас). Випаровування води відбувається при будь-якій температурі, але величина тиску насиченої пари різко знижується при зниженні температури. В області сублімації при температурах нижче 0 °С, коли вода знаходиться в твердій фазі, тиск насиченої пари має величини нижче 4,6 мм.рт.ст. Здійснення процесу ви-

сушування при такому низькому тиску пари стає можливим лише при досить високій швидкості випаровування. Найістотніший вплив на швидкість випаровування здійснює тиск повітря над поверхнею води або льоду. При значному зниженні тиску повітря, тобто при підвищенні вакууму, інтенсивність випарювання різко зростає. При висушуванні методом сублімації тиск повітря над препаратом повинен бути нижчим, ніж тиск насиченої пари льоду при температурі сублімації даного препарату. Інтенсивне випаровування можна здійснити без безперервного відведення пари з поверхні матеріалу, що висушується. Зниження швидкості відведення пари тягне за собою підвищення тиску над матеріалом, зменшення перепаду тисків і зниження швидкості висушування. Оптимальна температура конденсатора від мінус 40 до мінус 60 °С. Подальше зниження температури помітно не збільшує інтенсивність висушування.

Вторинне висушування – додаткова стадія висушування (десорбція), яка дозволяє максимально видалити зв'язану воду. Необхідно уникати пересушування препарату (вміст вологи менше 1,0 %).

Закінчення сушки – герметизація препарату. Характерні ознаки, що свідчать про неправильну ліофілну сушку біопрепаратів: поява бульбашок на поверхні матеріалу, як результат наявності в замороженій масі деякої кількості рідини; велика нерівномірна пористість; значне скорочення об'єму в порівнянні з початковим об'ємом; погане відставання сухої маси від стінок ампул і флаконів; погана розчинність висушеного матеріалу.

Для стабілізації матеріалів, що піддаються ліофілізації застосовують різні захисні середовища (кріопротектори). З огляду на різноманітність застосовуваних кріопротекторів, їх класифікують за відношенням до мембранного апарату клітини на проникаючі всередину клітини (ендоцелюлярні) і непроникаючі (екзоцелюлярні). Останні адсорбуються на зовнішній оболонці клітини і знижують її проникність для води і біологічно активних речовин, уповільнюють процеси утворення внутрішньоклітинного льоду, захищають мембрани від механічних пошкоджень зростаючими кристалами льоду. До теперішнього часу розроблені вимоги до захисних речовин, що використовуються, наприклад, для ліофілізації вакцинних препаратів: атоксичність, відсутність антигенних властивостей, ад'ювантні властивості, властивості структуруючого (опорного) матеріалу, інгібування ферментів у біоматеріалі, антиоксидантна активність.

Практично всім цим вимогам відповідають такі речовини: лактоза, сахароза, сорбіт, манітол, декстран, желатин, ПВП, глутамат натрію, амінокислоти та ін. В буферні розчини можливе додавання іона кальцію і магнію, які мають стабілізуючу дію на мембрани клітини. Захисна дія кріопротекторів може бути пояснена на біомолекулярному рівні, наприклад, можливо, гідрофобна взаємодія субодиниць білкової молекули в їх четвертинній структурі. Денатуруючий вплив заморожування компенсується інактивацією цих захисних агентів.

Контроль ліофілізованих препаратів проводиться за такими тестами: опис (із зазначенням кольору і зовнішнього вигляду); час розчинення (визначається візуально із зазначенням меж часу розчинення – не більше); середня маса і однорідність за масою; механічні включення; вода (із зазначенням меж вмісту води у %, не більше). Крім зазначених показників, визначають: справжність, рН, сторонні домішки, стерильність, ендотоксини, кількісне визначення, аномальну токсичність.

Обладнання для ліофілізації виробляють ряд відомих фірм: Martin Christ (Німеччина), Niro, GEA Pharma Systems (США), Zirbus technology (Німеччина), Tofflon (Гонконг), Biotron (Південна Корея), VirTis (США) та ін. Випуск продукції фірм здійснюється у відповідності до правил організації виробництва і контролю якості, що відповідають вимогам GMP, GAMP, EN / ISO 13408, EN / ISO 14644, ISPE і ряду інших документів. Ліофілізатори випускаються як в лабораторному, так і в промисловому виконанні. Продуктивність за льодом становить від 10 до 1000 кг на добу. Виробники постійно вдосконалюють обладнання для ліофілізації. Так, наприклад, Martin Christ пропонує ліофілізатори, які мають низку переваг: простота контролю і легкий доступ до конденсатора через двері камери; великий поперечний переріз між камерою ліофілізатора і камерою льодового конденсатора, безперешкодна подача водяної пари до конденсатора; короткий шлях для водяної пари, завдяки чому досягається високий коефіцієнт корисної дії і економічна робота установки; відсутність перешкод для очищення камери ліофілізатора і камери льодового конденсатора; мінімальна кількість ущільнень, що важливо в плані технічного обслуговування; відсутність проблем при валідації.

Ліофілізації піддаються препарати, отримані з використанням біотехнології, з метою стабілізації продукту, наприклад, живі противірусні та

антибактеріальні вакцини з метою збереження живих мікроорганізмів; препарати моноклональних антитіл, рекомбінантні гормональні препарати, цитокіни, антибіотики і багато інших.

Заморожування і ліофілізацію розчину проводять у сублімаційних установках. Перед завантаженням препарату проводять санітарну обробку внутрішніх поверхонь і полиць камери. Після обробки проводять контроль камери на мікробіологічну чистоту.

У субліматор на охолоджені до температури мінус 40–70 °С полиці завантажують касети з розлитим у флакони препаратом. Для подальшої ліофілізації необхідно орієнтуватися на точку евтектики. У контрольні флакони на кожній полиці встановлюють термодатчики. Нульовим часом процесу заморожування вважається завантаження продукту до сушки і запуск програми заморожування.

Проводять охолодження полиць до регламентованої температури. Тривалість процесу заморожування повинна визначатися для кожного конкретного препарату, включаючи час для врівноваження температури камери і препарату. Потім проводять первинну сублімацію препаратів. Після витримування препарату при встановленій температурі починається процес вакуумування. При досягненні регламентованого вакууму 12–15 Па і температури конденсатора до мінус 65±2 °С і нижче починають процес сублімаційного висушування. При цьому необхідно фіксувати температуру полиць і температуру продукту. Дана операція вважається нульовим часом сушіння.

Потім проводять підігрів полиць за встановленим режимом. Всі температурні параметри і величини тиску в субліматорі записуються і щогодини реєструються. На наступному етапі проводять вторинну сублімацію препаратів. Вторинне досушування починається при досягненні встановленої температури продукту, при цій температурі продукт витримують до кінця вторинного висушування. Необхідно вказувати загальну тривалість процесу вторинного висушування. Після закінчення процесу вторинного висушування вакуум у камері «гаситься» через стерилізуючий фільтр Мідісарт-2000 з розміром пор 0,2 мкм або азотом, або інертним газом. При досягненні регламентованого залишкового тиску в камері субліматора проводиться закупорювання флаконів пробками переведенням рукоятки в положення «down». Флакони з напівпродуктів в касетах

вивантажують з камери субліматора, касети закривають кришками, маркують ідентифікаційною етикеткою із зазначенням назви препарату, номера серії, дати ліофілізації і передають через передавальне вікно на стадію обкатки ковпачками.

На підставі представницькою сповіщення контролер ВКЯ відбирає від кожної серії препарату проби відповідно до ДФУ для повного аналізу на відповідність вимогам НД.

Готову продукцію маркують статусною етикеткою «Карантин» і передають на склад, де її зберігають в сухому, захищеному від світла місці при температурі, зазначеній в НД з отримання результатів аналізу ВКЯ.

2.6. Контроль парентеральних препаратів

При виробництві внутрішньовенних інфузійних лікарських засобів, які містять дисперговані частинки, слід передбачити заходи, що забезпечують необхідний розмір частинок та його контроль.

Внутрішньовенні інфузійні лікарські засоби – стерильні водні розчини або емульсії з водою як дисперсійним середовищем. Вони зазвичай ізотонічні з кров'ю. Вони переважно призначені для застосування у великих об'ємах. Внутрішньовенні інфузійні лікарські засоби не містять ніяких антимікробних консервантів. Розчини для внутрішньовенних інфузійних лікарських засобів оцінюють у відповідних умовах спостереження, при цьому вони мають бути прозорими і практично вільними від частинок.

Емульсії для внутрішньовенних інфузій не мають виявляти ознак розшарування.

Суспензії можуть утворювати осад, що має швидко ресуспендуватися при збовтуванні, утворюючи суспензію, досить стабільну, щоб забезпечити необхідну дозу при введенні.

Багатодозові водні ін'єкційні лікарські засоби містять прийнятний антимікробний консервант у необхідній концентрації, за винятком лікарських засобів, що мають достатню антимікробну дію. При випуску лікарських засобів для парентерального застосування у багатодозовому контейнері необхідно зазна-

чити запобіжні заходи щодо його введення і особливо щодо зберігання між відбором доз.

Водні лікарські засоби, які готують в асептичних умовах і які не можуть бути піддані термічній стерилізації, мають містити певні антимікробні консерванти у відповідних концентраціях.

Методики контролю якості (МКЯ) на готові лікарські форми для ін'єкцій та інфузій мають містити такі розділи:

- ✓ опис;
- ✓ розчинність (для ліофілізованих препаратів);
- ✓ ідентифікація;
- ✓ показники якості розчину (прозорість, кольоровість, рН);
- ✓ механічні включення (невидимі частинки – лікарські засоби для застосування людиною, розчини для ін'єкцій або інфузій мають витримувати випробування на механічні включення);

- ✓ розмір частинок (для суспензій) – для підшкірних і внутрішньом'язових ін'єкцій допустимі більш високі межі вмісту невидимих механічних частинок;

- ✓ супровідні домішки – залишкові кількості органічних розчинників;
- ✓ неорганічні аніони (хлориди, сульфати, нітрати і т.д.);
- ✓ неорганічні катіони (залізо та ін.);
- ✓ важкі метали;
- ✓ втрата в масі при висушуванні або вода (для ліофілізованих препаратів);

- ✓ стерильність;
- ✓ пірогени (або бактеріальні ендотоксини) – проводять випробування на бактеріальні ендотоксини або, якщо немає інших зазначень, випробування на пірогени, рекомендації з граничної концентрації бактеріальних ендотоксинів зазначені в нормативних документах (НД);

- ✓ кількісне визначення та біологічна активність та ін.;
- ✓ пакування, маркування, транспортування в зберігання.

Контрольні запитання

1. Навести загальну характеристику та класифікацію ін'єкційних форм препаратів.
2. Які контейнери використовують для ін'єкційних форм та вимоги до них? Навести вимоги до скляних контейнерів: ампул та флаконів.
3. Які вимоги до якості скла для контейнерів?
4. Навести схему виробництва розчинів для ін'єкцій.
5. Вказати з якою метою проводять ізотонювання. Навести приклади. Рівняння Вант-Гоффа.
6. Вимоги до стабілізації ін'єкційних розчинів. Навести приклади стабілізуючих сполук.
7. З якою метою використовують консерванти в лікарських розчинах. Навести приклади консервантів.
8. Які види фільтрації Вам відомі. Стерилізуюча та освітлююча фільтрації. Обладнання для стерилізуючої фільтрації.
9. Методи стерилізації при виробництві розчинів препарату (термічна, сухим жаром, опроміненням, оксидом етилену).
10. Навести методи санітарної підготовки виробництва. Підготовка вентиляційного повітря.
11. Виробництво води очищеної та води для ін'єкцій. Вимоги ДФУ до якості.
12. Описати підготовку персоналу та вимоги до технологічного одягу.
13. Вимоги до підготовки приміщень та технологічного обладнання.
14. Навести вимоги до «чистих» приміщень.
15. Основні стадії виробництва розчинів для ін'єкцій (розчинення, введення допоміжних речовин, стерилізуюча фільтрація, розлив та герметизація препарату).
16. Які препарати необхідно ліофілізувати. Які основні технологічні стадії ліофілізації Вам відомі?
17. Навести приклади ін'єкційних препаратів із вмістом біотехнологічних активних фармакологічних інгредієнтів.
18. Основні вимоги до контролю ін'єкційних препаратів відповідно до ДФУ.

Список джерел інформації

1. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-ге вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.
2. Перцев І.М. Допоміжні речовини в технології ліків / І.М. Перцев, Д.І. Дмитрівський, В.Д. Рибачук та ін. – Харків: Золоті сторінки, 2010. – 599 с.
3. Чуешов В.И. Технология лекарств промышленного производства / В.И. Чуешов, Е.В. Гладух, И.В. Сайко и др. – Винница: Нова книга, 2014. – 696 с.
4. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, М.И. Борщевская. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.
5. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, Дудниченко А.С., Швець В.И. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2011. – 228 с.
6. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология биологически активных веществ: учебное пособие. Часть 1 / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев – Харьков: НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.
7. Рубан Е.А. Практикум по промышленной технологии лекарственных средств / Е.А. Рубан, Д.И. Дмитриевский, А.И. Хохлова и др. – Харьков: НФАУ, 2016. – 389 с.
8. Медетханов Д.Д. Изготовление лекарственных форм / Д.Д. Медетханов, А.П. Овсянников, Д.Д. Хайруллин. – Казань: Центр инновационной технологии, 2016. – 123 с.
9. Настанова СТ-Н Міністерства охорони здоров'я 42-4.0. 2016. «Лікарські засоби . Належна виробнича практика. Затверджено наказом МОЗ від 29.07. 2016.

ГЛАВА 3. НАНОБІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ОДЕРЖАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

3.1. Загальна характеристика ліпосом

Основна властивість фосфоліпідів як природних біологічно-активних речовин – біфільність, що обумовлює різноманітність утворених ними структур у водних дисперсіях і, зокрема, утворення протяжних бішарів – основи біологічних і модельних мембран (ліпосом). Ці властивості молекул фосфоліпідів спонтанно утворювати ліпідні бішари є вкрай важливими для будь-якого живого організму.

Створення і застосування ліпосом – штучних сферичних мембранних конструкцій на основі ліпідів – є одним із перспективних напрямків сучасної біонанотехнології. Ліпосоми вперше були отримані Бенгхемом при дослідженні ролі фосфоліпідів у процесі згортання крові. Ліпосоми можуть бути «навантажені» різними лікарськими засобами, серед яких вітаміни, гормони, ферменти, цитостатики та інші сполуки. Введені в організм ліпосоми, навантажені лікарським засобом, взаємодіють з мембранами клітин, зв'язуються з ними і передають клітині лікарський препарат.

Використання ліпосом у медицині за останні 35 років знайшло широке застосування як в лікувальних, так і в діагностичних цілях.

Ліпосомальні препарати мають ряд переваг: пролонгують дію введеного в організм лікарського препарату; змінюють фармакокінетику лікарських препаратів, істотно підвищуючи їх фармакологічну ефективність; захищають лікарські речовини від деградації; захищають здорові клітини і від токсичної дії лікарських препаратів; здатні збільшувати біодоступність активних фармакологічних інгредієнтів (АФІ). Необхідно також відзначити високу ефективність ліпосом при використанні їх як ад'ювантів у складі вакцин. Значна кількість лі-

посомальних препаратів представлена цитостатичними сполуками. Висока токсичність протипухлинних препаратів лімітує їх застосування в клініці і вимагає створення оригінальних форм доставки, які здатні знизити токсичний вплив на організм людини. Одним із способів зниження токсичності є ліпосомальна форма протипухлинних препаратів.

У наш час світовою фармацевтичною промисловістю розроблені, виробляються і виведені на ринок уже близько 45 ліпосомальних препаратів спрямованої дії (таблиці 3.1 і 3.2).

У ході робіт зі створення лікарських ліпосомальних препаратів накопичено значний досвід з розробки і промислового виробництва ліпосомальних препаратів. Дані препарати можуть бути конкурентоспроможними на світовому фармацевтичному ринку. У цьому розділі навчального посібника розглянуті основні аспекти технології при отриманні ліпосомальних лікарських форм в умовах виробництва, що відповідають вимогам GMP і вимагають проведення валідації при розробці кожної стадії технологічного процесу.

Дані про ефективність і безпеку ліпосомальних препаратів, отримані на лабораторному рівні, часто не піддаються відтворенню в масштабі промислового виробництва. Це значною мірою пояснюється тим, що фізико-хімічні властивості ліпосом, отриманих у малому масштабі, не відображаються в умовах промислового отримання. Хоча розміри і електричний заряд ліпосом вимірюються і досить чітко вказуються в методах у більшості розробок з отримання ліпосом, однорідність ліпідних компонентів, експозиція біохімічно важливих функціональних груп на зовнішній поверхні ліпосом, фіксована товщина водного шару, число ліпідних бішарів і т.д. залежать від масштабу виробництва. Крім того, властивості ліпосом багато в чому визначаються присутністю в них холестерину, жирнокислотним складом ліпідів, зарядом ліпідів, наявністю тих чи інших доменів ліпідів у структурі мембрани. Стабільність ліпосом значною мірою залежить від режиму заморожування і ліофілізації, жирнокислотного складу ліпідів, які повинні бути мінімально окисленими за подвійними зв'язками, розміром і зарядом ліпосом.

3.2. Технологічні аспекти отримання ліпосом

Отримання ліпосомальних структур проводять при розчиненні висушених фосфоліпідів у водному розчиннику. При цьому утворюються структури, схожі на «капусту», великі багатошарові везикули (lager multilammelar vesicle), які досягають розміру кількох мікрон. Отримані багатошарові везикули шляхом обробки екструзією, ультразвуком та іншими методами перетворюються на малі одношарові везикули (small unilammelar vesicle) – ліпосоми, утворені єдиним бішаром із розміром від 30 нм до 200 нм.

Схема отримання ліпосомального препарату зводиться до таких основних стадій: отримання ліпідної плівки; емульгування ліпідів у відповідному буферному розчині або органічному розчиннику; безпосереднє отримання ліпосом одним із відомих методів; включення гідрофільного компонента різними методами (методом градієнта рН або градієнта хлористого амонію, сорбцією та ін.); відділення, за необхідності, не включеної в ліпосоми лікарської речовини; освітлююча та стерилізуюча фільтрації; розлив препарату в ємності; заморожування, ліофілізація, герметизація препарату в атмосфері інертного газу; контроль і зберігання препарату за певних умов. Обов'язковими методами контролю отриманих ліпосомальних форм лікарських засобів є визначення таких параметрів: величини частинок ліпосом, стерильності, нешкідливості, пірогенності, вмісту включеної в ліпосоми речовини, кількісне визначення ліпідних компонентів і основної лікарської речовини, рН, наявність стабілізаторів та ін. Необхідним є визначення в процесі виробництва і в готовому препараті продуктів перекисного окислення, наприклад, індексу окислення. Препарати необхідно контролювати за вказаними параметрами як в процесі виготовлення, так і в процесі зберігання.

У даному посібнику не обговорюються сировинні джерела ліпідних речовин, що використовуються для отримання ліпосом, а також переваги і недоліки природних і синтетичних ліпідів, оскільки це є прерогативою кожної дослідницької групи, яка самостійно проводить експериментальний підбір оптимального складу ліпідної композиції для формування ліпосом конкретного цільового призначення, і тому рекомендації тут, мабуть, недоцільні. Крім того, раніше

нами були детально проаналізовані принципи отримання різних ліпідних субстанцій для біомедичних цілей [1].

Отримання ліпідної плівки проводять при постійному перемішуванні розчину ліпиду в органічному розчиннику при температурі 37–42 °С і при упарюванні розчину у вакуумі. При використанні гідрофобного АФІ його розчиняють у відповідному органічному розчиннику і змішують з розчином ліпідів. На цій стадії критичними факторами є температура і величина вакууму, що забезпечує швидку концентрацію ліпідів.

Отримання багат шарових везикул. Отриману ліпідну плівку або плівку ліпиду з АФІ емульгують у воді або буферному розчині з метою отримання мультиламелярних везикул. Необхідно відзначити, що температура в процесі ресуспендування повинна бути вищою за температуру фазового переходу ліпідів. При отриманні везикул необхідно враховувати, крім температури, ряд чинників: величину рН та іонну силу буфера, концентрацію ліпідів, співвідношення ліпідів і співвідношення «ліпіді:АФІ», фізико-хімічні властивості використовуваних компонентів. Розмір утворюваних везикул визначається так само інтенсивністю і часом перемішування. Крім цього, необхідно в кожному конкретному випадку враховувати заряд ліпідів. Для запобігання процесам окислення ліпідів – ліпосом, отриману емульсію насичують азотом або інертним газом.

Отримання ліпосом. Критичною стадією отримання ліпосомального лікарського препарату є утворення ліпосом і включення в них АФІ. У теперішній час відомий ряд способів отримання ліпосомальних препаратів: обробка ультразвуком, екструзія, інжекція, методи, основані на спонтанній везикуляції і на видаленні детергентів, ряд інших.

Ультразвукова обробка – процес отримання ліпосом за допомогою ультразвуку. Недоліком цього методу є вкрай низька продуктивність, окислення і гідроліз ліпідів, тривалість технологічного процесу, підвищення температури реакційної суміші. Також недоліком даного методу є те, що отримані ліпосоми недостатньо стійкі в процесі зберігання і вимагають додаткових заходів щодо стабілізації. Крім того, виявлена низька стандартність отриманих препаратів, яка проявляється в неоднорідності складу. Використання озвучування не ефективно в ряді випадків тому, що деякі лікарські речовини не витримують

режимів обробки ультразвуком, що призводить до розвитку процесів перекисного окислення фосфоліпідних компонентів ліпосом.

Рядом авторів запропоновано комбіноване використання методів для отримання ліпосом. Так, наприклад, при отриманні ліпосом, які містять цитостатик цисдиаміндихлорплатин, спочатку проводять ультразвукову обробку при 22 кГц протягом 3–5 хв., а потім заморожування в рідкому азоті, з подальшим відтаюванням при кімнатній температурі. Процес повторюють 6 разів. За даними авторів, в ліпосоми включається 50–60 % від вихідної концентрації платини. За даними більшості авторів, використання ультразвукової обробки дозволяє отримувати ліпосоми з низькою ефективністю включення речовин у внутрішній простір.

Метод спонтанної везикуляції ґрунтується на спонтанному утворенні ліпосом при швидкому додаванні луґу до водних дисперсій, що містять фосфоліпіди. До недоліків даного методу можна віднести обмеженість у використанні фосфоліпідного складу (фосфатидилхолін, фосфатидна кислота), високу швидкість процесу, що ускладнює використання цього методу в промислових умовах при отриманні великих об'ємів ліпосомальних препаратів. Крім того, високе значення рН (більше 9,0), а також визначальне значення температурного режиму робить даний метод неприйнятним для ряду лікарських і біологічно-активних речовин.

Інжекція – отримання ліпосом шляхом вприскування у водне середовище розчину фосфоліпідів у летючому органічному розчиннику. До недоліків цього методу необхідно віднести низьку ефективність включення в ліпосоми лікарських речовин, необхідність видалення розчинника з препарату, нестандартність складу ліпосом. Крім того, ліпосоми, отримані інжекцією або методом видалення детергенту, відрізняються низькою стабільністю. До переваг методу можна віднести можливість впливу на розмір ліпосом за рахунок температури водного середовища, розчинника, швидкості перемішування і концентрації фосфоліпідів.

Екструзія – є одним з найбільш використовуваних методів отримання ліпосом. Даний процес здійснюється в гомогенізаторах високого тиску, в результаті відбувається руйнування великих міцел при пропущенні ліпідної емульсії під високим тиском через спеціальний клапан при температурі, вищій від тем-

ператури фазового переходу ліпідів, які використовуються в складі ліпосом. Перевагою цього методу є стандартність складу ліпосом, висока продуктивність методу, мінімальне окислення і гідроліз фосфоліпідів, збереження лікарського препарату, стабільність ліпосом. Суттєве значення має наявність стандартного промислового обладнання для робіт під високим тиском і отримання препарату в асептичних умовах в закритому режимі, при цьому в ході процесу можливий контроль значень температури і тиску. Технологія з використанням гомогенізації дозволяє отримати ліпосоми стандартного складу, подані частинками з розміром 30–200 нм до і після ліофілізації. Емульсія повинна піддаватися багаторазовій циркуляції через гомогенізатор з тим, щоб при кожному проході отримувати все більшу кількість малорозмірних ліпосом; емульсія повинна безперервно охолоджуватися для відведення тепла, яке виділяється насосом при стисненні. Таким чином, критичними параметрами є температура, тиск в гомогенізаторі, кількість проведених циклів. З огляду на те, що при роботі гомогенізатора утворюються аерозолі, а субстанції ряду лікарських препаратів, наприклад, цитостатиків (доксорубіцину гідрохлориду, іринотекану гідрохлориду, доцетакселу та ін.), які належать до речовин підвищеного класу небезпеки, роботу необхідно проводити в ізоляторі. Для забезпечення мінімального ризику контамінації гомогенізатор поміщають в ізолятор. Необхідно проводити обов'язкову санітарну обробку гомогенізатора при переході від одного препарату до іншого. Воду, яка використовується для отримання ліпідної емульсії, слід регулярно контролювати на хімічну та біологічну контамінацію, а також на контамінацію ендотоксинами, оскільки включення ендотоксинів в ліпосоми має незворотний характер і в такому випадку очищення готового препарату від пірогену практично недосяжне.

Отриманню розчинів лікарських засобів і кріопротекторів, наприклад, дисахаридів (трегалози, лактози та ін.) необхідно приділяти особливу увагу. Незважаючи на те, що оптимальний рівень контамінації при контролі мікробіологічної чистоти становить не більше ніж 10 КУО / 100 мл розчину, при роботі слід використовувати розчини, піддані стерилізуючій фільтрації, що гарантує мінімальну контамінацію в процесі виготовлення готового препарату. Крім того, актуальним є питання депірогенізації компонентів з використанням різних видів фільтрації через спеціальні фільтри.

Використання гомогенізаторів високого тиску дозволяє отримати ліпосоми з заданими характеристиками. Перевагою останнього способу є можливість великих завантажень (до 150 літрів препарату на добу і більше), отримання препарату в асептичних умовах у закритому режимі, стандартність і реальна можливість постійного контролю за температурою і тиском.

Кількість циклів гомогенізації є критичним, оскільки в ході робіт було виявлено, що нерідко збільшення циклічності або тиску призводить до нестабільності ліпосом, збільшення їх розмірів або злиття. Контроль процесу гомогенізації необхідно оцінювати за розміром ліпосом, і при збільшенні цього параметра процес слід припиняти. При отриманні ліпосомальних препаратів використовувався тиск, наприклад $5 \cdot 10^7 - 7 \cdot 10^7$ Па. Конкретне значення величини тиску повинне підбиратися в кожному конкретному випадку з урахуванням використання ліпідного складу, хімічної структури АФІ, величини рН, заряду і т.д.

Умови гомогенізації необхідно підбирати для кожного виду ліпосом, причому визначальним є величина ліпосом і ступінь включення субстанції. На стабільність ліпосом і включення речовини до їх складу впливає іонна сила, величина рН, температура проведення технологічного процесу. Крім того, самостійне значення має стабільність самого лікарського засобу (субстанції), що включається в ліпосоми. Так, наприклад, температура, рН та тиск визначають не тільки ступінь включення доксорубіцину гідрохлориду в ліпосоми, а й фармакологічну активність отриманого препарату, в разі включення антибіотика.

Істотним фактором є введення кріопротекторів до складу препаратів. Визначальне значення при цьому мають хімічна структура кріопротектора, його концентрація, форма введення і момент введення в процесі гомогенізації, тобто при якому вже присутньому в апараті розмірі ліпосом (на якому циклі) його додавати, оскільки деякі протектори вуглеводної природи (наприклад, лактоза або трегалоза) можуть на першому етапі призвести до небажаної зміни розміру ліпосом і знижувати включення в них лікарського засобу. При цьому особливу увагу потрібно приділяти досягненню необхідного розміру ліпосом і виключенню їх агрегації.

При вивченні фармакокінетики ліпосом встановлено, що комплемент-стимулююче захоплення ліпосом печінкою щурів залежить як від розміру ліпосом, так і від вмісту в них холестерину. У той же час при введенні в організм

щурів ліпосом діаметром 200 нм вміст холестерину в них не визначає захоплення даних везикул печінкою. При використанні частинок великого (800 нм) або середнього діаметра (400 нм) їх захоплення печінкою щурів збільшувалось в міру збільшення вмісту в ліпосомах холестерину.

Існує можливість отримання стерично стабілізованих ліпосом, які використовуються для доставки ліків. До складу ліпосом вводять 1,2-диацил-sn-гліцеро-3-фосфохолін; 1,2-димірістоіл-sn-гліцеро-3-фосфохолін; 1,2-дипальмітоіл-sn-гліцеро-3-фосфатидилетаноламін-поліетиленоксид-кон'югат. Показано, що термодинамічно стабільні моноламельярні ліпосоми утворюються спонтанно шляхом простої гідратації рідкої фази бішарових фосфоліпідних плівок. Вивчено захисну дію полімерів на прикладі ліпосом. В основі може лежати механізм, який передбачає те, що зшиті з поверхнею ліпосом ланцюги гнучких і гідрофільних полімерів утворюють щільні "конформаційні хмари", які перешкоджають взаємодії інших макромолекул з поверхнею ліпосом, навіть при низьких концентраціях захисного полімеру.

Відомо, що невеликі, близько 100-120 нм, ПЕГ-ліпосоми можуть проходити через пори в ендотелії кровоносних судин до пухлини і впроваджуватися в міжклітинний простір. При цьому інкапсульований в ліпосоми цитостатик вивільняється з ліпосом в тканини пухлини.

Включення активного фармакологічного інгредієнта. Одним з найважливіших етапів отримання ліпосомальних лікарських препаратів є включення АФІ в ліпосоми: у внутрішній об'єм наночастинок (переважно для водорозчинних речовин); у гідрофобну область ліпідного бішару (переважно для ліпофільних речовин); включення шляхом адсорбції на поверхні ліпосоми; за рахунок хімічного зв'язування з компонентами бішару (як для ліпофільних, так і водорозчинних речовин).

Включення речовини в ліпосоми може реалізуватися кількома методами:

а) утворенням ліпідної плівки з включенням в неї ліпофільного АФІ з наступною гідратацією у водному середовищі;

б) гідратація ліпідної плівки водним або буферним розчином, що містить АФІ;

в) методом хімічного градієнта іонів, який включає отримання ліпідної плівки та її гідратацію буферним розчином, який містить компоненти, які реа-

гують шляхом обміну іонів або комплексоутворення з АФІ. Після отримання ліпосом зовнішній буфер замінюють на нейтральний. При додаванні до таких ліпосом лікарського засобу, він за рахунок дифузії проходить у внутрішній простір наночастинок через фосфоліпідну мембрану і зв'язується з компонентами внутрішнього буфера. Після зв'язування всередині ліпосоми, АФІ втрачає здатність виходити у зовнішній буфер, тим самим зміщаючи рівновагу «речовина всередині ліпосоми ↔ речовина зовні ліпосоми» у бік інкапсульованої форми;

г) використання фармацевтичної субстанції, яка може взаємодіяти з компонентами мембрани ліпосом з утворенням комплексу.

Метод хімічного градієнта. Сьогодні добре відомі ліпосомальні препарати, отримані з використанням методу хімічного градієнта. Інтерес становлять роботи з включення в ліпосоми доксорубіцину гідрохлориду, епірубіцину гідрохлориду, іринотекану гідрохлориду, препаратів платини та ін., які успішно використовуються для лікування онкологічних захворювань.

Метод оснований на підкисленні внутрішнього об'єму розчину ліпосом, внаслідок чого прониклі в нього нейтральні молекули субстанції приєднують протон, набуваючи позитивного заряду, і вже не можуть вийти в зовнішнє середовище. Чим нижче рН всередині ліпосом, тим більше речовини перерозподіляється із зовнішнього об'єму у внутрішній. Однак через деякий час величина рН всередині і зовні ліпосоми вирівнюється, оскільки протони досить добре проникають через мембрану і, отже, концентрація речовини всередині і поза ліпосомами також вирівнюється. Запропоновано заповнювати ліпосоми не кислим буфером, а розчином амонію сульфату. При гідролізі цієї солі утворюється аміак, який, будучи незарядженою молекулою, легко проникає через мембрану і виходить у зовнішній розчин. Ліпосоми одержують шляхом диспергування ліпідної плівки в цитратному або фосфатному буферному розчині з величиною рН 3,5–5,5. Механізм інкапсуляції, наприклад, антрациклінових антибіотиків, в ліпосоми можна подати таким чином: при попаданні солянокислої форми антрациклінового антибіотика у зовнішній буферний розчин, який містить фосфатний буферний розчин з величиною рН 6,5–7,5, створюється рівновага, в результаті чого частина антибіотика переходить в молекулярну форму і адсорбується на поверхні ліпосоми, проходячи при цьому через ліпідний бішар мем-

брани у внутрішній простір. Усередині ліпосоми молекула протонується за допомогою протона, отриманого в результаті дисоціації цитрату натрію або реакції обміну з іоном амонію; при цьому молекула антибіотика втрачає здатність проходити через ліпідний бішар і в результаті цього відбувається процес накопичення антибіотика всередині ліпосоми. В іншому випадку, іон амонію, віддаючи протон, перетворюється в газоподібний аміак у молекулярній формі, який проходить через мембрану ліпосоми в середовищі, яке оточує ліпосому. Включення антибіотика, наприклад, доксорубіцину гідрохлориду, в ліпосоми становить 75–85 % від початкової кількості субстанції.

Рядом дослідників пропонується технологія отримання комбінованих ліпосомальних препаратів доксорубіцину гідрохлориду, в якій гідратацію ліпідної плівки проводять 250 мМ розчином амонію сірчаноокислого при температурі вище фазового переходу використовуваних ліпідів при 50 °С. При отриманні ліпосом гомогенізацію ліпідної емульсії проводять при вказаній температурі. Запропоновано для досягнення необхідної для досягнення концентрації сульфату амонію проводити розведення в 20 разів, що дозволяє в подальшому відмовитися від гельфільтрації або ультрафільтрації. Для отримання ліпосом використовували ліпіди у співвідношенні дипальмітоїлфосфатидилхолін : холестерин : дистеароїлфосфатидилетаноламін-ПЕГ-2000 : дистеароїлфосфатидилетаноламін-ПЕГ-3400 (0,65:0,3:0,045:0,005). Як кріопротектор при ліофілізації препарату використовували лактозу в кінцевій концентрації 5,0 %. Співвідношення доксорубіцину гідрохлориду та ліпідів становило 0,20:1,0. При використанні даного методу включення доксорубіцину в ліпосоми становило 80–90 %. Покриття ліпосом ПЕГ-покриттям дозволяє створити ліпосомальні препарати, які мінімально взаємодіють з навколишнім середовищем, наприклад, з білками плазми крові. Встановлено, що ПЕГ діє як бар'єр – перешкоджає прикріпленню білків плазми до поверхні ліпосом і уповільнює кліренс ліпосом з кровотоку у мишей, виявляючи вкрай слабку взаємодію між ПЕГ-ліпосомами і білками плазми. У той же час показана висока ефективність ліпосом, що містять доксорубіцин: «Ліподокс», «Міоцет» та ін., які не містять ПЕГ. Один з препаратів містить в своєму складі гідрогенізований фосфатидилхолін, холестерин, стеариламін, фосфатидилгліцерин і амонію сульфат (ліпосоми отримують нейтральні, негативно і позитивно заряджені).

Для методу отримання ліпосом з використанням градієнта концентрації сульфату амонію найчастіше використовують такі суміші ліпідів:

- дипальмітоїлфосфатидилхолін : холестерин (2:1);
- гідрогенізований соєвий фосфатидилхолін : гідрогенізований соєвий фосфатидилінозит : холестерин (9:1:4);
- гідрогенізований соєвий фосфатидилхолін : холестерин : дистеароїлфосфатидилетаноламін з ПЕГ-групами (55:40:5).

Досвід, накопичений при отриманні ліпосомальної форми доксорубіцину, дозволив отримати ліпосомальну форму протипухлинного препарату іринотекану, який пригнічує фермент ДНК-топоізомеразу I. Іринотекан і його активний метаболіт SN-38 порушують синтез ДНК у пухлинних клітинах. Він проявляє антибластомну дію і в тих випадках, коли попередня терапія антиметаболітами виявилася неефективною, бо має здатність блокувати ацетилхолінестеразу. Показаннями до застосування є прогресуючий колоректальний рак. Для мембрани ліпосоми використовують природний фосфатидилхолін і холестерин у встановлених співвідношеннях і концентраціях. Отриману ліпідну плівку гідратують буферним розчином з рН близько 2,0. Ліпосоми отримують методом екструзії. Їх розміри становлять близько 150 нм. Потім зовнішній кислий буфер замінюють на нейтральний фосфатний буфер. Заміна зовнішнього буфера проводиться методом ультрафільтрації. Визначальними умовами при проведенні процесу є: температура, об'єм розчину для промивання і нейтрального буфера, іонна сила розчинів. При додаванні до таких ліпосом лікарського засобу – водного розчину іринотекану в концентрації від 1 до 5 мг/мл цитостатик за рахунок дифузії проходить у внутрішній простір ліпосом через холестерин-фосфатидилхолінову мембрану і зв'язується з компонентами внутрішнього буфера. Після зв'язування всередині ліпосоми іринотекан втрачає здатність «повернення» у зовнішній буфер, зміщаючи таким чином рівновагу «речовина всередині ліпосом ↔ речовина зовні ліпосом» у бік інкапсульованої форми. Визначальними при включенні АФІ в ліпосоми є: температура, величина рН проведення процесу, іонна сила, час взаємодії компонентів і ряд інших чинників. З метою стабілізації продукту його піддають ліофілізації в присутності кріопротектора. Як кріопротектори досліджували розчини лактози або трегалози в різних концен-

траціях – від 3 до 8 %. Включення іринотекану в ліпосоми становить від 85 до 95 % (до ліофілізації) і 80–85 % після ліофілізації.

Використовуючи метод хімічного градієнта були отримані ліпосоми препаратів доксорубіцину гідрохлориду, ідарубіцину гідрохлориду та іринотекану гідрохлориду. Запропоновані препарати були стабільні при зберіганні в ліофілізованій формі, і кількість включеного АФІ була досить високою – не менше 80–85 %. Причому встановлені режими ліофілізації дозволяють зберегти нанорозміри препарату в діапазоні 140–170 нм.

Варто враховувати, що при дослідженні методу інкапсуляції АФІ в ліпосоми необхідно вивчити кілька методів. Зупинитися потрібно на тому методі, який дозволяє отримати ліпосоми стандартного і стабільного складу з максимальним включенням АФІ. Як приклад розглянемо кілька методів включення цитостатику іринотекану гідрохлориду в ліпосоми.

Технологія «градієнта амонію», в основі якої лежить створення градієнта концентрації іонів амонію всередині і зовні ліпосоми. Важливим для цієї технології є показник константи протонування АФІ. За даними програми ACD 6.0, константа протонування іринотекану становить $6,57 \pm 0,7$ за рівнянням: $\text{RNH}_3^+ \leftrightarrow \text{RNH}_2 + \text{H}^+$; $\text{pK}_a = 6,57 \pm 0,7$

Будова ліпідного бішару дозволяє проникати крізь фосфоліпідну мембрану об'єктів тільки в молекулярній, а не в іонізованій формі, тобто не маючи поверхневого заряду. Об'єкти, які мають поверхневий заряд, можуть проникати тільки в гідрофільну частину мембрани, яка утворена залишками фосфорної кислоти, і не здатні проникати крізь подвійний гідрофобний шар жирних кислот.

При рН в діапазоні 5,0–6,0 тільки невелика частина молекул знаходиться в депротонованому молекулярному стані. Молекулярна форма адсорбується на поверхні ліпосом і переходить всередину через гідрофобний бішар. При цьому рівновага, наведена на рис. 3.1, зміщується вправо. Молекулярна форма речовини залишає сферу реакції, і, за принципом Ле-Шатальє, реакція компенсує рівновагу дисоціацією протонів від зарядженої молекули іринотекану. Виходячи з цього механізму можна припустити, що чим вище різниця концентрації амоній-іонів зовні ліпосоми і в середині ліпосоми, тим більше тенденція іринотекану до проникнення в ліпосому. Також величина рН зовнішнього буфера

має бути ретельно визначена, щоб сприяти проникненню протонованої форми всередину, але не руйнувати молекулярну структуру. При цьому інкапсульована всередині ліпосоми кількість іринотекану значною мірою залежить від ємності буферного розчину всередині ліпосоми. У технології «градієнта амонію» молекулярна форма іринотекану, проникаючи крізь ліпідний бішар всередину ліпосом протонується амоній-іонами. В результаті реакції вивільняється молекулярна форма аміаку, яка проникає крізь ліпідний бішар у буферний розчин навколо ліпосом. На рис. 3.1 наведена принципова схема хімізму процесу інкапсуляції при використанні градієнта іонів цитрату амонію на ліпідній мембрані.

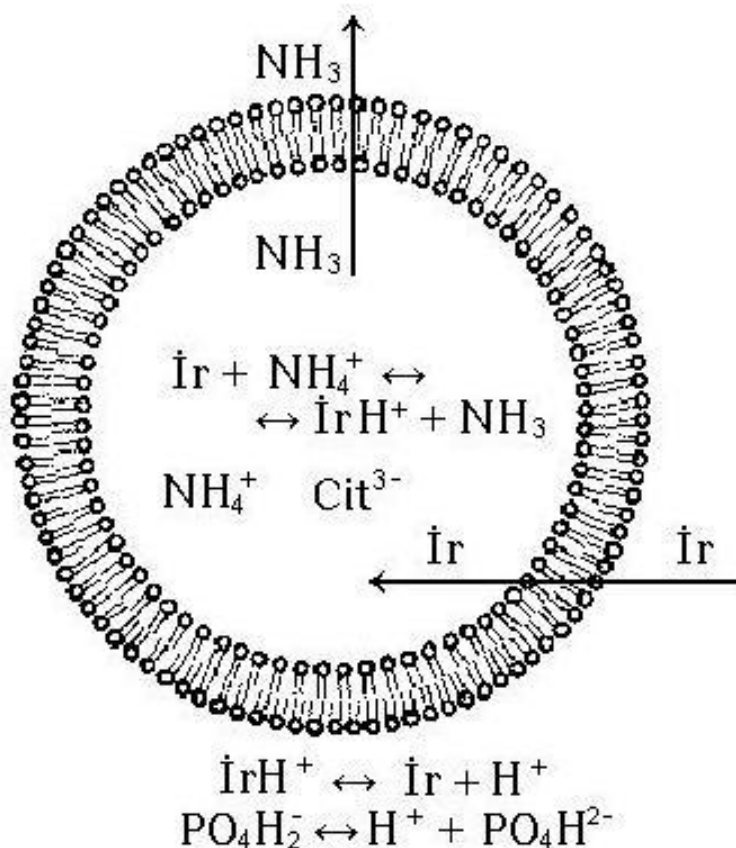


Рисунок 3.1 – Схема процесу інкапсуляції іринотекану в ліпосоми при створенні «градієнта іонів» цитрату амонію на ліпідній мембрані

Технологія «градієнта рН» має загальний механізм з технологією «градієнта амонію», коли інкапсуляція відбувається за рахунок різниці рН всередині і зовні ліпосом. При рН в діапазоні від 5,0 до 6,0 частина молекул іринотекану знаходиться в молекулярному стані. Оскільки через бішар фосфоліпідів можуть

проходити тільки незаряджені молекули, частина іринотекану в молекулярній формі адсорбується на поверхні і проникає в середину ліпосом, де протонується за рахунок наявності протонів. При цьому молекула втрачає здатність проходити через ліпідний бішар і накопичується всередині ліпосом. На рис. 3.2 показана принципова схема реакції протонування/депротонування, яка відбувається під час дії системи «градієнта рН». У зовнішньому фосфатному буфері відбувається депротонування зарядженої молекули іринотекану, після чого вона проникає всередину ліпосом через ліпідний бішар, де протонується за рахунок наявного надлишку протонів.

На рис. 3.2 можна побачити, що кількість іринотекану, яка накопичується всередині ліпосом, буде залежати від ємності внутрішнього і зовнішнього буфера, тобто від показника градієнта – різниці рН між внутрішнім і зовнішнім буферними розчинами.

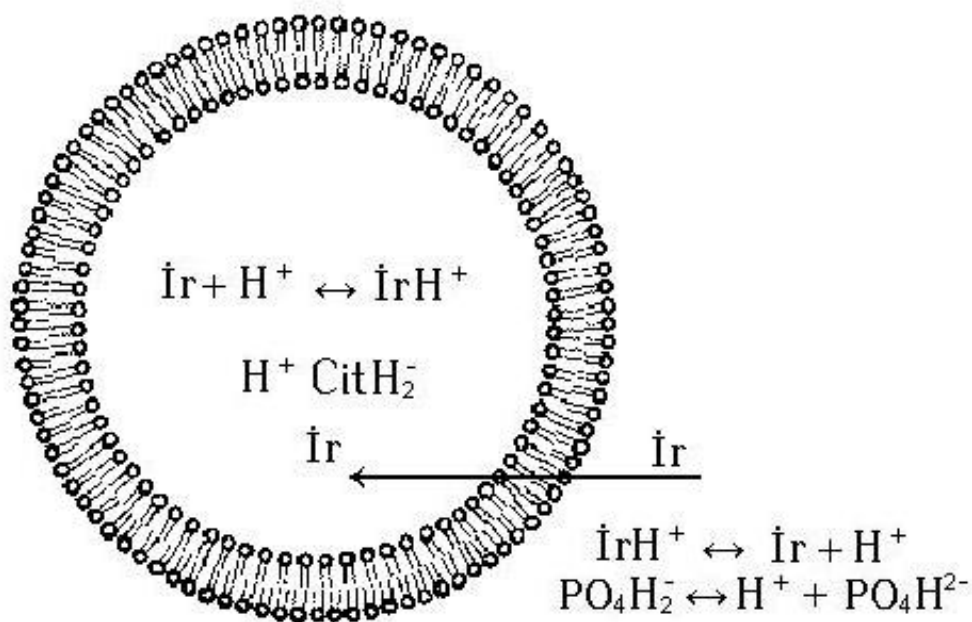


Рисунок 3.2 – Схема процесу інкапсуляції іринотекану в ліпосоми при створенні «градієнту рН» на ліпідній мембрані

Оцінити переваги тієї чи іншої технології включення АФІ в ліпосоми можна тільки після проведення всіх технологічних стадій до отримання ліпосомальної форми препарату. Підбір технології визначається також стабільністю АФІ при різних значеннях рН. У випадку іринотекану гідрохлориду при значеннях рН вище 5,0 можлива конверсія активного лактонного кільця іринотекану за

механізмом, наведеним на рис. 3.3. В результаті цієї реакції з'являються супутні домішки, зміст яких виходить за межі специфікації.

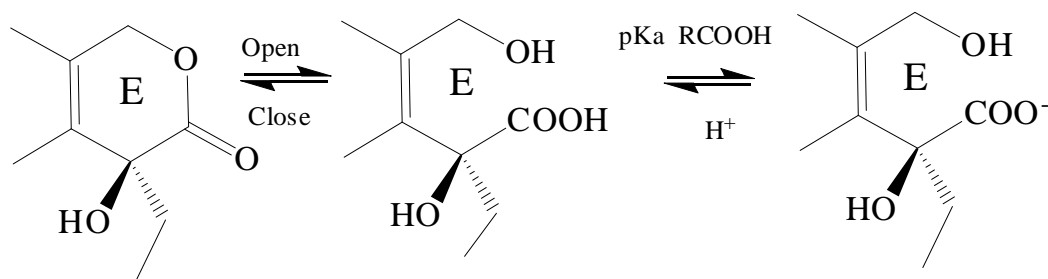


Рисунок 3.3 – Ймовірний механізм конверсії активного лактона E в неактивний аніон гідроксікислоти

Виходячи з представлених даних, верхня межа рН зовнішнього буферного розчину ліпосом не має перевищувати 4,8–5,0. Використовуючи метод «градієнта рН» проводять гідратацію 0,2 М розчином цитрату амонію з рН 2,5. Гідратація проводиться за допомогою апарату для струшування і ультразвукової обробки протягом 10 хв. Екструзію проводять на гомогенізаторі при 1500 атм. Після 5 циклів отриманий середній розмір ліпосом становить 129 нм – 92 % за наявності 8 % частинок з розміром понад 1 мкм. Емульсію фільтрують через фільтр (0,22 мкм) з передфільтром 0,8 мкм. Далі замінюють зовнішній буфер цитрату амонію на фосфатний буферний розчин з рН 4,8 за допомогою ультрафільтраційних касет з порогом відсікання 30 кДа. Завантажують іринотекан до концентрації 2 мг/мл. Після 12 годин інкубації при 25 °С і перемішуванні інкапсуляція іринотекану становить 87,75 %, а розмір не більше 140 нм.

При використанні методу «градієнта амонію» з використанням сульфату амонію як протонуючої солі технологію проводять за аналогічною схемою. Гідратацію проводять 0,2 М розчином сульфату амонію з рН 5,4 за допомогою апарату для струшування і ультразвукової обробки протягом 10 хв. Екструзію проводять на гомогенізаторі при 1500 атм. Однак після 9 циклів екструзії не вдається позбутися частинок більше 1 мкм. Було визначено, що при зазначеному режимі частинки з діаметром 115 нм становлять 98,3 %, частинки з діаметром 4,8 мкм – 1,7 %. Емульсію фільтрують через фільтр 0,22 мкм з передфільтром 0,8 мкм. Далі замінюють зовнішній буфер цитрату амонію на фосфатний буферний розчин з рН 5,0 за допомогою ультрафільтраційних касет з поро-

гом відсікання 30 кДа. Завантажують іринотекан до концентрації 2 мг/мл. Після 12 годин інкубації при 25 °С і перемішування інкапсуляція іринотекану становить 41,0 %

Таким чином, при проведенні технології двома методами встановлено, що, беручи до уваги ризик руйнування іринотекану при рН технології «градієнта амонію» – 5,5 усередині ліпосом, а також кращі показники інкапсуляції до 88,0 % при використанні технології «градієнта рН», рекомендовано використовувати технологію з «градієнтом рН». Ліпосомальна форма іринотекану гідрохлориду під назвою «ONIVYDE» довела свою ефективність у клінічних дослідженнях.

Метод ліпідної плівки. Включення лікарських речовин в ліпосоми, при використанні методу ліпідної плівки, дозволяє отримувати лікарські препарати переважно з ліпофільними субстанціями. Для ряду гідрофільних субстанцій також можливо використовувати даний метод. Однак, якщо для ліпофільних АФІ включення в ліпосоми становить не менше 85–90 %, то для гідрофільних не більше 30–50 %.

Принцип методу полягає в отриманні розчину ліпідів і ліпофільного АФІ в органічних розчинниках (етанол, метанол, хлороформ або їх суміші та ін.) з подальшим утворенням плівки, яка містить ліпіди та АФІ.

У теперішній час з використанням ліпідної плівки отримано ряд лікарських ліпофільних препаратів: паклітаксел, доцетаксел, рифабутин, убіхінон та ін.

Метод хімічного зв'язку. Метод оснований на можливості утворення хімічного зв'язку між компонентом бішару ліпосом і АФІ. Як приклад можна зупинитися на такій водорозчинній субстанції, як фермент Цитохром С, який знайшов широке застосування в офтальмології при дистрофії і помутнінні рогівки, кератитах, надаючи антигіпоксичну і трофічну дію, стимулюючи процеси регенерації і будучи каталізатором клітинного дихання.

Для отримання ліпосом, що містять цитохром С, використано здатність утворення комплексу між цитохромом С і негативно зарядженими фосфоліпідами (наприклад, дифосфатидилгліцерином, фосфатидилгліцерином, фосфатидною кислотою та ін.). У зв'язку з цим включення до складу ліпосом негативно зарядженого фосфоліпіду і фосфатидилхоліну, як основного мембраноутворюючого ліпіду, дозволило отримати ліпосомальний препарат ферменту.

Причому ступінь включення цитохрому С залежить від співвідношення ліпідних компонентів і кількості взятого ферменту. У цих умовах позитивно заряджені аміногрупи на молекулах цитохрому С вступають у взаємодію з негативно зарядженими групами на молекулі фосфоліпідів. Встановлено основні закономірності отримання ліпосомальної форми цитохрому С: отримання ліпідної плівки, утворення комплексу ліпід-фермент, отримання ліпосом та ліофілізації препарату. В результаті отримано ліпосомальний препарат, що містить 90–95 % включеного цитохрому С з розміром частинок 120–170 нм. Встановлено стабільність ліофілізованого препарату при зберіганні. Ліпосомальний препарат цитохрому С сприяє прискоренню регенеративних процесів, зменшує вираженість клінічних проявів пошкодження тканини ока, нівелює залишкові явища в процесі загоєння.

За даними літератури ліпосоми з негативним зарядом проявляють високу фармакологічну активність. Проте дані літератури не однозначні – ряд дослідників дотримуються протилежної думки про те, що ліпосоми з негативним зарядом володіють зниженою активністю. Так, наприклад, показано, що тільки позитивно заряджені ліпосоми збільшують час утримання лікарського препарату на рогівці. Певне, ці протиріччя пов'язані з використанням різного складу ліпідів мембрани ліпосом, різними методами їх отримання. Імовірно, роль заряду ліпосом має визначатися в кожному конкретному випадку залежно від використовуваної субстанції та цілі, яка визначає використання препарату. Проведені дослідження з включення в бішар мембран ліпосом негативно заряджених фосфоліпідів при отриманні ліпосомальної форми цитохрому С, доцетакселу, убіхінону, оксаліплатину, іринотекану та ін. продемонстрували такі властивості: збільшення включення АФІ в ліпосоми; стабілізація і стандартизація ліпосомальної емульсії; підвищення технологічності процесу за рахунок підвищення швидкості фільтрації ліпосомальної емульсії; стабільність ліпосомальної емульсії при регідратації ліофілізованого препарату.

Відділення субстанції, яка не включилась у ліпосоми. Перед стерилізуючою фільтрацією можливе проведення відділення не включеного в ліпосоми лікарського препарату шляхом мікрофільтрації на мембранах, виготовлених з різноманітних матеріалів. Ці мембрани можуть застосовуватися у вигляді плоских, трубчастих або інших картриджів. Після формування ліпосом, що містять

лікарський препарат, виникає необхідність розділення суміші, що складається з «вільного» АФІ і «навантажених» ліпосом. Найбільш доцільним є процес ультрафільтрації ліпосомального препарату для відділення незв'язаного АФІ. З цією метою доцільно використовувати апарати з різним порогом відсікання, наприклад, від 5 кДа до 300 кДа. При цьому в кожному конкретному випадку необхідно визначати умови ультрафільтрації, які значною мірою залежать від молекулярної маси речовини, її концентрації, заряду і властивостей мембрани. Розробник повинен на свій розсуд визначати температурні умови ультрафільтрації, поріг розділення, швидкість і тиск при проведенні процесу. Проводити ультрафільтрацію необхідно в умовах асептики на обладнанні, яке пройшло спеціальну антимікробну обробку. Фільтрація проводиться при відносно низькому тиску. У пермеаті може знаходитися невиключена в ліпосомі речовина. Мембрани можна використовувати з різним порогом відсікання (20, 50, 100 кДа та ін.). У кожному конкретному випадку необхідно підбирати умови проведення мікрофільтрації. Якщо неможлива фільтрація препаратів з високим вмістом ліпідів, доцільно встановити концентрацію, що дозволяє отримати препарат, що забезпечує стерилізуючу фільтрацію, а тільки потім проводити концентрування препарату шляхом мікрофільтрації. При цьому також можливе відокремлення невиключеного до ліпосомі компонента.

Стерилізуюча фільтрація. Наступною критичною стадією є стерилізуюча фільтрація. З метою підбору оптимального фільтруючого матеріалу повинні проводитися дослідження, що приводять до мінімальної сорбції АФІ та ліпосом; режим і спосіб фільтрації повинні мінімально впливати на стабільність ліпосом і не приводити до зниження фармакологічної дії одержуваного препарату.

Оскільки відповідно до вимог Європейської фармакопеї фільтри з розмірами пор 0,22 і 0,1 мкм є прийнятними для стерилізуючої фільтрації, можливо використовувати їх без додаткового обґрунтування. Використання фільтрів з великим розміром пор, в комбінації з додатковою стерилізацією, має пройти валідацію. Найбільш часто використовуваний метод стерилізації – стерилізуюча фільтрація через каскад фільтрів типу «Millipore», з величиною пор від 1,2 до 0,22 мкм. Необхідно відзначити, що зазначена фільтрація дозволяє так само проводити стандартизацію препаратів ліпосом. Дані, отримані рядом авторів,

свідчать про можливість фільтрації ліпосом з величиною 0,1–0,35 мкм через фільтри з величиною пор 0,22 мкм. При цьому втрати ліпосом становлять не більше 1–3 %. Отримані препарати містять ліпосоми розміром 30–200 нм. У ряді випадків, при роботі з ліпосомами більших розмірів, стерилізуюча фільтрація стає неможливою. У таких випадках існує можливість отримання ліпосом в асептичних умовах або проведення подальшої термічної стерилізації. Останнє передбачає стерилізацію при температурі 112–121 °С протягом 10–20 хв. Однак, на нашу думку, використання термічної стерилізації обмежується низкою факторів: ліпідним складом ліпосом (їх стабільністю до окислення); термостійкістю речовин, що вводяться в ліпосоми. Так, наприклад, при стерилізації ліпосом, що містять ліпіди з насиченими жирними кислотами не виявлено зміни фізико-хімічних і біологічних властивостей препаратів. Для надання "жорсткості" структурі ліпосом запропоновано вводити до їхнього складу урсолову або олеанолову кислоти (природні тритерпенові сполуки – представники сапонінів). Ліпосоми отримували з дипальмітоїлфосфатидолхоліну. Як маркери використовували кальцин і 1,6-дифеніл-1,3,5-гексатриєн. Показано, що введення до складу ліпосом зазначених речовин викликає помірну зміну плинності рідкокристалічної мембрани ліпосом і значну конденсацію як кристалічних, так і рідкокристалічних мембран ліпосом. Рядом дослідників показано, що аналогічну дію має введений в ліпосоми холестерин. Мабуть, одним з варіантів стерилізації ліпосомальних препаратів може бути метод радіаційної стерилізації гамма-опроміненням і потоком прискорених електронів. Даний метод був запропонований для стерилізації наночастинок з полібутилціаноакрилату, що містять доксорубіцин. Оптимальною дозою є 15 кГр, причому опромінення в дозі 15 кГр не призводило до деструкції наночастинок і доксорубіцину. Для визначення використання гамма-опромінення з метою стерилізації фосфоліпідних наночастинок повинні бути проведені спеціальні дослідження.

Внаслідок того, що при стерилізуючій фільтрації існує потенційний додатковий ризик контамінації, безпосередньо перед наповненням флаконів може бути доцільна друга фільтрація через додатковий стерилізуючий фільтр, що затримує мікроорганізми. Останню стерилізуючу фільтрацію необхідно здійснювати якомога ближче до місця наповнення флаконів. Фільтр не повинен впливати на продукцію, яка стерилізується, наприклад, внаслідок утримання її інгре-

дієнтів або виділення в неї речовин. Перевагою стерилізуючої фільтрації є відділення водонерозчинного компонента, що не включився в ліпосоми. Крім того, необхідно виключити здатність фільтра відокремлювати волокна або, принаймні, звести цей процес до мінімуму. Цілісність фільтра має бути перевірена застосуванням і підтверджена відразу після використання (точкова бульбашка, дифузний потік та ін.). Необхідно на всіх стадіях технологічного процесу здійснювати заходи, що зводять до мінімуму можливу контамінацію.

При виборі фільтрів потрібно враховувати як характеристику матеріалу фільтра, так і властивості ліпосомальної емульсії. Використовують мембрани на основі целюлози, нейлону, полісульфону тощо з розміром пор 1,2 мкм, 0,8 мкм, 0,4 мкм, 0,22 мкм. Для забезпечення більш ефективної фільтрації комбінують попередню фільтрацію емульсії через мембрани з розміром пор 1,2 мкм, 0,8 мкм, 0,4 мкм, з подальшою фінішною фільтрацією (стерилізуючий фільтр) через мембрани з розміром пор 0,22 мкм. Визначення придатності фільтруючого матеріалу проводять таким чином: кожну мембрану поміщають у фільтротримач типу «Millipore». Емульсію ліпосом пропускають через фільтри під тиском стисненого повітря. Фракції фільтрованої емульсії через кожен фільтр збирають порціями, наприклад, три. Після закінчення фільтрації кожну порцію аналізують за такими показниками: рН; вміст АФІ (порівняно із вихідною кількістю); вміст мембраноутворюючого ліпиду, наприклад, фосфатидилхоліну (порівняно із вихідною кількістю); розмір частинок до 220 нм; механічні включення; стерильність.

Фільтри і умови фільтрації повинні бути визначені з урахуванням отриманих даних, а саме мінімальні втрати діючих речовин, стерильність емульсії, відсутність механічних включень і стабільність рН.

Розлив ліпосомальної емульсії та її ліофілізація. Після отримання стерильної емульсії препарату її розливають в асептичних умовах, заморожують при температурі мінус 50–70 °С, ліофілізують і проводять герметизацію в атмосфері захисного газу. За наявними даними, ліпосоми розміром більше 220–250 нм і менше 100 нм менш стабільні в процесі ліофілізації, ніж препарати ліпосом з розміром 140–200 нм. Проведення процесу ліофілізації визначається цілою низкою чинників: величиною і зарядом ліпосом, фосфоліпідним складом і фізико-хімічними властивостями речовини, що вводиться в ліпосоми, струк-

турою бішару та іншими факторами. Внаслідок цього режим ліофілізації необхідно визначати для кожного запропонованого препарату.

Від обґрунтованого режиму сублимації залежить стабільність ліпосом, кількість включеного в ліпосоми АФІ і, нарешті, розмір ліпосом. За допомогою ліофілізації можна отримати стабільний сухий препарат ліпосом, легко відновлюваний при додаванні води. Це вимагає ретельного керування процесом дегідратації, оскільки процес ліофілізації включає заморожування препарату з подальшим видаленням води, і виникає проблема, пов'язана з тим, що на стадії заморожування і зневоднення можливе фізичне пошкодження структури ліпосом. Одним з найважливіших факторів при ліофілізації є підбір кріопротектору, який не повинен мати евтектичних властивостей, тобто не повинен кристалізуватися при замерзанні. Важливим питанням є визначення етапу для введення кріопротекторів у ліпосомальний препарат, наприклад, цукрів. Необхідно враховувати, що необхідне створення захисного середовища як внутрішньої, так і зовнішньої поверхні мембрани ліпосоми. Питання ліофілізації ліпосомальних продуктів досить докладно розглянуті в ряді робіт.

3.3. Контроль ліпосомальних форм препаратів

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

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

II – показники якості, що характеризують готову форму препарату (стерильність, величина рН, аномальна токсичність, пірогенність (ендотоксини));

III – показники, що характеризують властивості ліпосом (включення АФІ, розмір ліпосом, zeta-потенціал та ін.).

Випробування повинні стосуватися тих властивостей продукту, які схильні до змін при зберіганні і можуть впливати на якість готового препарату,

причому методи кількісного визначення повинні дозволяти характеризувати стабільність. Особливу увагу необхідно приділяти профілю нових продуктів, що утворюються при деградації (розкладанні) компонентів препарату. У цьому випадку ці нові продукти розкладання необхідно кваліфікувати. Так, наприклад, повинні бути ідентифіковані і вказані граничні кількості утворених домішок, наприклад, для фосфатидилхоліну (лізопродукти або вільні жирні кислоти) або для доксорубіцину гідрохлориду (аглікони або інші продукти розкладання). Випробування повинні вказати на ті властивості, які схильні до зміни при технології отримання препаратів або при їх зберіганні та можуть впливати на якість ліпосомальних препаратів, їхню ефективність і безпечність при застосуванні. Важливим питанням є розробка методу визначення кількості включеного в ліпосоми АФІ, причому такі визначення повинні проводитися як в процесі виготовлення ліпосом та їх ліофілізації, так і при зберіганні препарату протягом терміну його придатності. Це питання має вирішуватися конкретно для кожного виду ліпосом безпосередньо дослідником, при цьому валідація є обов'язковою умовою його використання. До одного з проблемних питань можна віднести випробування на механічні включення (сторонні частинки). Їх визначення саме по собі є складним, по-перше, тому що препарат являє собою емульсійну рідину, забарвлену в білий, червоний, зелений або жовтий кольори, а по-друге, препарат є ліофілізованим, що вимагає високої якості скла і закупорювальних матеріалів та розливу препарату в класі чистоти А.

3.4. Приклади отримання ліпосомальних препаратів на основі гідрофільних і ліпофільних АФІ

Як приклади розглянемо технології отримання ліпосомальної форми препаратів: гідрофільного АФІ з цитостатичною дією – іринотекану гідрохлориду та ліпофільного рослинного АФІ з антиоксидантною дією – біофлавоноїду куркуміну.

З огляду на те що обидва препарати є ін'єкційними формами, ми вважаємо недоцільним зупинятися на ряді стадій, які докладно описані у главі 2: підготовка вентиляційного повітря для «чистих приміщень»; отримання води очищеної та води для ін'єкцій; підготовка технологічного одягу персоналу до ро-

боти в «чистих» приміщеннях; підготовка чистих приміщень, технологічного обладнання та допоміжних матеріалів; мийка та стерилізація флаконів, ампул і пробок.

Нижче наведені основні технологічні стадії отримання препарату нано-емульсії іринотекану, ліофілізату для приготування розчину для інфузій 20 мг у флаконі:

Стадія 1. Одержання плівки ліпідів

При виробництві препарату наноемульсії «Іринотекан, ліофілізат для приготування розчину для інфузій 20 мг у флаконі» використовують сировину, що пройшла вхідний контроль у ВКЯ на відповідність нормативно-технічної документації. Для отримання препарату використовуються такі діючі речовини і допоміжні компоненти: АФІ іринотекану гідрохлориду тригідрату, фосфатидилхолін яєчний, холестерин, трегалоза, кислота лимонна, натрій фосфорнокислий монозаміщений моногідрат.

При виробництві препарату наноемульсії іринотекану використовують АФІ і допоміжні речовини, які мають різний вміст основної речовини і вологи, що вимагають перерахунку на 100 % ваги.

Розрахунок наважок завантажуваних компонентів проводять з огляду на склад препарату. На вагах у тарі для наважок зважують розрахункові кількості фосфатидилхоліну яєчного жовтка і холестерину.

Для приготування ліпідної плівки отримані наважки поміщають в ємність і розчиняють в етанолі. Отримані суміші перемішують до повного розчинення.

Ємність з напівпродуктом переносять в ламінар для проведення стерилізуючої фільтрації. Стерилізуючу фільтрацію проводять з використанням фільтра, наприклад, «Акропак» для освітлюючої та стерилізуючої фільтрації, що має в своєму складі мембрану з діаметром пор 0,22 мкм.

Отриманий розчин двох компонентів завантажують в колби вакуумного роторного випарника. Концентрування у вакуумі проводять при температурі 40–42 °С при постійному перемішуванні до повного видалення органічних розчинників і отримання тонкої ліпідної плівки на стінках колби. Ліпідна плівка обробляється газоподібним азотом.

Стадія 2. Одержання розчину іринотекану

Для приготування розчину іринотекану в ємність завантажують стерильну воду для ін'єкцій.

Якщо аналіз води для ін'єкцій відповідає вимогам НТД, приступають до приготування розчину іринотекану.

У ємність для приготування напівпродукту доливають необхідний об'єм стерильної води для ін'єкцій. Після чого завантажують розрахункову кількість субстанції іринотекану гідрохлориду тригідрату. Завантаження субстанції проводять при постійному перемішуванні і температурі води не менше 70 °С і не більше 75 °С. Перемішування розчину ведуть протягом 20–25 хв. до повного розчинення субстанції. Після закінчення перемішування доводять об'єм розчину іринотекану водою для ін'єкцій до заданого, після чого знову продовжують перемішування розчину протягом 5–10 хв. Ємність із напівпродуктом переносять до боксу стерилізуючої фільтрації і переливають до напірної ємності. Кришку ємності щільно закривають. На штуцер напірної ємності з розчином іринотекану надягають шланг, що йде від вхідного штуцера капсули одноразового використання «Акропак» для освітлюючої та стерилізуючої фільтрації, що має у своєму складі мембрану з діаметром пор 0,22 мкм. До другого відведення напірної ємності під'єднують шланг від лінії стисненого повітря і створюють тиск в ємності не вище 0,11 МПа, контролюючи його манометром. Стиснене повітря, яке подається до напірної ємності, стерилізують за допомогою фільтруючого елемента, наприклад, Мідісарт-2000 з утримуючою здатністю частинок не вище 0,22 мкм.

Після закінчення фільтрації із загального об'єму розчину іринотекану відбирають пробу для проведення аналізу на відповідність специфікації на напівпродукт.

Після закінчення фільтрації проводять контроль цілісності мембрани. При виявленні порушення цілісності мембрани весь профільтрований розчин має пройти повторну фільтрацію на резервній капсулі, що витримує зазначений тест.

Стадія 3. Одержання розчину трегалози

Розрахунок наважок завантажуваних компонентів проводять з огляду на складу препарату. На вагах у тарі для наважок зважують розрахункову кількість субстанції трегалози.

У ємність для приготування напівпродукту доливають необхідний об'єм стерильної води для ін'єкцій. Після чого завантажують розрахункову кількість субстанції трегалози. Завантаження субстанції ведуть при постійному перемішуванні і температурі води не менше 50 °С і не більше 70 °С. Перемішування розчину ведуть до повного розчинення трегалози (протягом 20–30 хв). Після закінчення перемішування доводять об'єм розчину трегалози водою для ін'єкцій до заданого, після чого знову продовжують перемішування розчин протягом 5–10 хв.

Ємність з напівпродуктом переносять до боксу стерилізуючої фільтрації і переливають до напірної ємності і проводять стерилізуючу фільтрацію аналогічно процесу стадії 2. Із загального об'єму розчину трегалози відбирають пробу для проведення аналізу на відповідність специфікації на напівпродукт.

Після закінчення фільтрації проводять контроль цілісності мембрани. При виявленні порушення цілісності мембрани весь профільтрований розчин має пройти повторну фільтрацію на резервній капсулі, що витримує зазначений тест.

Стадія 4. Одержання розчину лимонної кислоти

На вагах у тарі для наважок зважують розраховані на об'єм кількості субстанції лимонної кислоти.

У ємність для приготування напівпродукту заливають стерильну воду для ін'єкцій. Після чого завантажують розрахункову кількість субстанції кислоти лимонної. Завантаження субстанції ведуть при постійному перемішуванні і температурі води не менше 30 °С і не більше 50 °С. Перемішування розчину ведуть до повного розчинення лимонної кислоти (протягом 20–30 хв.). Після закінчення перемішування доводять об'єм розчину кислоти лимонної стерильною водою для ін'єкцій до заданого, після чого знову продовжують перемішування розчин протягом 5–10 хв.

Ємність з напівпродуктом переносять до боксу стерилізуючої фільтрації, переливають до напірної ємності і проводять стерилізуючу фільтрацію аналогічно процесу стадії 2.

Після закінчення фільтрації із загального об'єму розчину кислоти лимонної відбирають пробу для проведення аналізу на відповідність специфікації на напівпродукт.

Після закінчення фільтрації проводять контроль цілісності мембрани. При виявленні порушення цілісності мембрани весь профільтрований розчин має пройти повторну фільтрацію на резервній капсулі, що витримує зазначений тест. На цій стадії отримують розчин кислоти лимонної з рН 1,8-2,0.

Стадія 5. Отримання розчину натрію фосфорнокислого монозаміщеного

У ємність для приготування напівпродукту заливають необхідний об'єм стерильної води для ін'єкцій. Після чого завантажують розрахункову кількість субстанції натрію фосфорнокислого монозаміщеного. Завантаження субстанції ведуть при постійному перемішуванні і температурі води не менше 30 °С і не більше 50 °С. Перемішування розчину ведуть до повного розчинення солі (протягом 10–20 хв.). Після закінчення перемішування доводять об'єм розчину натрію фосфорнокислого монозаміщеного стерильною водою для ін'єкцій до заданого після чого знову продовжують перемішування розчину протягом 3–5 хв.

Ємність з напівпродуктом переносять до боку стерилізуючої фільтрації і переливають до напірної ємності та проводять стерилізуючу фільтрацію аналогічно процесу стадії 2.

Після закінчення фільтрації із загального об'єму розчину натрію фосфорнокислого монозаміщеного відбирають пробу для проведення аналізу на відповідність специфікації на напівпродукт.

Після закінчення фільтрації проводять контроль цілісності мембрани. При виявленні порушення цілісності мембрани весь профільтрований розчин має пройти повторну фільтрацію на резервній капсулі, що витримує зазначений тест.

Стадія 6. Регідратація плівки ліпідів і отримання наноемульсії

У колбу з плівкою ліпідів доливають розрахунковий об'єм розчину лимонної кислоти (рН 1,8–2,0), поміщають на апарат для струшування і перемі-

шують при 130–140 об./хв. Перемішують 1 годину до отримання однорідної ліпідної емульсії. Спостереження – візуально. Потім колбу з гомогенною емульсією переносять на ультразвукову ванну. Ультразвукову обробку проводять протягом 1 години. Однорідну ліпідну емульсію переносять в робочу ємність апарату для отримання наноемульсії.

Процес диспергування здійснюють при температурі (35–40) °С. Після заповнення робочої ємності апарату ліпідну емульсією включають апарат, доводять тиск до 1500 атм, проводять гомогенізацію протягом 3 циклів. Охолодження здійснюють холодною водопровідною водою. Процес проводять під контролем розміру частинок. Розмір частинок після проведення 3-х циклів – не більше 150 нм. Після закінчення диспергування препарат завантажують в стерильну ємність.

Ємність з напівпродуктом переносять до боксу стерилізуючої фільтрації, переливають до напірної ємності і проводять стерилізуючу фільтрацію аналогічно процесу стадії 2.

Після закінчення фільтрації із загального об'єму наноемульсії відбирають пробу для проведення аналізу на відповідність специфікації на напівпродукт.

Після закінчення фільтрації проводять контроль цілісності мембрани. При виявленні порушення цілісності мембрани весь профільтрований розчин має пройти повторну фільтрацію на резервній капсулі, що витримує зазначений тест.

Стадія 7. Проведення ультрафільтрації стерильної емульсії для заміни зовнішнього розчину лимонної кислоти

Ємність з напівпродуктом наноемульсії переносять до приміщення для ультрафільтрації та охолоджують до температури 6–10 °С. Ультрафільтрацію проводять на апараті, що містить касети 10 і 30 кДа, зібрані паралельно. Розчин концентрують і додають до охолодженої до 6–10 °С стерильної води для ін'єкцій. Проводять 12 циклів ультрафільтрації при температурі не вище 15 °С. рН отриманої емульсії – 3,5–3,9.

Стадія 8. Завантаження іринотекану в ліпосомальну емульсію

У ємність з наноемульсією по краплях доливають розчин натрію фосфорнокислого монозаміщеного при постійному перемішуванні. Перемішування наноемульсії ведуть до повного додавання розчину натрію фосфорнокислого мо-

нозаміщеного. Потім при постійному перемішуванні в наноемульсію додають 1М розчин NaOH до рН 5,2. В отриманій емульсії з рН 5,2 при постійному перемішуванні повільно додають розчин іринотекану гідрохлориду. При цьому рН емульсії знижується, що вимагає постійного коректування рН до значення 5,2 з використанням 1М розчину NaOH протягом 10–12 годин.

Стадія 9. Введення трегалози в наноемульсію

У ємність з наноемульсією іринотекану доливають розчин трегалози і перемішують. Перемішування наноемульсії ведуть протягом 10–20 хв. Після закінчення перемішування доводять рН емульсії до величини 5,5 за допомогою 1 М NaOH. Об'єм наноемульсії іринотекану гідрохлориду доводять стерильною водою для ін'єкцій до кінцевого об'єму, після чого продовжують перемішування емульсії протягом 3–5 хв. Наноемульсії іринотекану гідрохлориду витримують при температурі 16–18 °С протягом 1 години, а потім негайно передають на стерилізуючу фільтрацію і наповнення флаконів.

Стадія 10. Стерилізуюча фільтрація, наповнення і ліофілізація препарату

Стадія 10.1. Стерилізуюча фільтрація наноемульсії іринотекану

Ємність з напівпродуктом переносять до боксу стерилізуючої фільтрації і переливають до напірної ємності. Кришку ємності щільно закривають. На штуцер напірної ємності з наноемульсією іринотекану гідрохлориду надягають шланг, що йде від вхідного штуцера капсули одноразового використання «Акропак» для освітлюючої та стерилізуючої фільтрації, що має в своєму складі мембрану з діаметром пор 0,22 мкм. До другого відведення напірної ємності приєднують шланг від лінії стисненого повітря і створюють тиск в ємності не вище 0,11 МПа, контролюючи його манометром. Стиснене повітря, яке подається до напірної ємності, стерилізують за допомогою фільтруючого елемента Мідісарт-2000 з утримуючою здатністю частинок не вище 0,22 мкм.

Перед початком роботи капсулу для стерилізуючої фільтрації перевіряють на цілісність мембрани одним з рекомендованих методів визначення, наприклад, методом «точкової бульбашки».

Перші порції відфільтрованої емульсії в кількості 10 мл, які пішли на промивку капсули, збирають окремо. Після заповнення і промивання фільтра відбирають пробу фільтрованої емульсії на стерильність. Потім продовжують

фільтрацію в стерильну ємність. В кінці фільтрації знову відбирають пробу на визначення стерильності препарату.

Після закінчення фільтрації проводять контроль цілісності мембрани. При виявленні порушення цілісності мембрани весь профільтрований розчин має пройти повторну фільтрацію на резервній капсулі (в складі одноразової системи), що витримує зазначений тест.

Ємність з препаратом маркують ідентифікаційною етикеткою із зазначенням найменування препарату, номера серії, дати стерилізуючої фільтрації і передають на стадію стерильного розливу у флакони.

З боксу виносять всі використані на даній стадії інструменти, матеріали і проводять прибирання приміщення відповідно до стандартної операційної процедури (СОП).

Напірну ємність передають для підготовки до наступної операції.

Усі дані з ведення технологічного процесу отримання препарату заносять у робочі журнали, технологічні протоколи.

Препарат після стерилізуючої фільтрації і перед розливом повинен відповідати таким показникам: рН – від 5,0 до 6,0; фосфатидилхоліну – від 15,0 до 17,0 мг/мл; іринотекану гідрохлориду – від 1,95 до 2,05 мг/мл; стерильність – стерильно; включення іринотекану в ліпосоми – не менше 90 %; розмір частинок – до 180 нм.

За відповідності препарату вимогам специфікації ємність закривають стерильним матеріалом, наклеюють ідентифікаційну етикетку: «Наноемульсії іринотекану перед розливом». Виконавці здійснюють записи в заповнюваних формах документації (робочі журнали, протокол виготовлення).

Розчин передають на стадію наповнення у флакони.

10.2. Розлив наноемульсії іринотекану

Розлив наноемульсії іринотекану проводять у флакони по 10,0 мл.

Розлив напівпродукту проводять на обладнанні для асептичного наповнення флаконів у зоні А приміщення класу чистоти В при включеному ламінарі. Точність об'єму розливу контролюють каліброваним мірним шприцом згідно з "Інструкцією з контролю точного розливу препарату". Препарат не повинен містити механічних включень. Контроль об'єму розливу слід проводити на початку, всередині і вкінці розливу.

У процесі розливу відбирають по 2 флакони на початку, всередині і вкінці розливу на контроль стерильності.

Після розливу флакони частково закупорюють пробками для ліофілізації і передають в апарат для ліофілізації.

Всі дані з ведення технологічного процесу розливу наноемульсії іринотекану заносять у робочі журнали, технологічні протоколи.

10.3. Сублімаційне висушування наноемульсії іринотекану

Заморожування і сушку наноемульсії іринотекану проводять в сублімаційній установці. Перед завантаженням препарату проводять санітарну обробку внутрішніх поверхонь і полиць камери 3 %-вим розчином пероксиду водню, після чого протирають безворсовою серветкою, змоченою 96 %-вим розчином етилового спирту. Після обробки проводять контроль камери на мікробіологічну чистоту.

У камеру апарату на охолоджені до температури мінус 30 ± 2 °C полиці завантажують касети з розлитим у флакони препаратом. Точка евтектики наноемульсії іринотекану становить мінус 30 °C. У два контрольних флакони встановлюють термодатчики. Нульовим часом процесу заморожування вважається завантаження продукту в ліофільну сушку і запуск програми заморожування. Проводять охолодження полиць до температури мінус 55 ± 2 °C і нижче, при цьому температура препарату досягає мінус 50 ± 2 °C і нижче. Тривалість процесу заморожування наноемульсії іринотекану становить не менше 14-16 годин, у тому числі час для врівноваження температури камери і препарату.

10.4. Ліофілізація препарату у флаконах

Після загартування препарату при температурі мінус 50 ± 2 °C і нижче протягом 14–16 годин починається процес вакуумування. При досягненні в камері сталого показника вакууму (12-15 Па) починають процес сублімаційного висушування.

Включають підігрів теплоносія на 20 °C. Підігрів теплоносія відбувається на 1–2 °C за годину при цьому температура препарату також підвищується на 1–2 °C за годину і до 40–45 годин від початку висушування досягає нульової позначки. Включають підігрів теплоносія на 30 °C. При цьому температура препарату підвищується і до 60–65 годин досягає

температури 30–35 °С. Після досягнення цієї температури препарат витримують протягом 6–8 годин. Після чого відключають працюючі частини установки і через фільтр Мідісарт-2000 з розміром пор 0,2 мкм в камеру подають азот.

При досягненні залишкового тиску в камері сублиматора 15 кПа проводиться закупорювання флаконів пробками переводом рукоятки в положення «down». Флакони з препаратом у касетах вивантажують з камери сублиматора, касети закривають кришками, маркують ідентифікаційною етикеткою із зазначенням найменування препарату, номера серії, дати ліофілізації і передають через передавальне вікно на стадію обкатки ковпачками.

На підставі представницького сповіщення фахівець ВКЯ відбирає від кожної серії препарату проби відповідно до ДФУ 2-го видання для повного аналізу на відповідність вимогам МКЯ.

Стадія 11. Обкатка флаконів ковпачками

Закупорені флакони з ліофілізованим препаратом іринотекану через передавальне вікно надходять на стадію обкатки ковпачками. Обкатка проводиться на напівавтоматі для закатування в зоні А приміщення класу чистоти В. Обкатка флакона ковпачком повинна бути щільна, без гофри, задирів.

Флакони з ліофілізатом наноемульсії іринотекану, закупорені пробками і закатані ковпачками, через накопичувальний стіл передають на стадію перегляду.

Стадія 12. Контроль флаконів з ліофілізованим препаратом іринотекану

Зі стадії 11 закатані флакони з ліофілізатом наноемульсії іринотекану надходять на візуальний перегляд і контроль механічних включень. Контролю підлягають 100 % флаконів відповідно до «Інструкції з контролю на механічні включення ін'єкційних лікарських засобів».

При перегляді відбраковують флакони:

- за якістю обкатки: повинна бути щільна, без гофри і задирів, дефектів ковпачків, дефектів обтиску, вм'ятин, надрізів, вищербин;
- за дефектами скла: відсутність тріщин, сколів, насічок.

Флакони з нещільною обкаткою (які прокручуються або недокатані) відправляють на повторну обкатку, яку проводять протягом зміни на напівавтоматі для закатування флаконів і потім приєднують до своєї серії.

Флакони з препаратом, що пройшли контроль на відсутність вмісту механічних включень і візуальний контроль за якістю обкатки і дефектів скла укладають в касети, вкладають ідентифікаційну етикетку із зазначенням назви препарату, номера серії, закривають касети кришкою і передають на стадію маркування та упаковки.

Стадія 13. Маркування та упаковка флаконів з ліофілізатом наноемульсії іринотекану 20 мг у флаконі

Переглянуті флакони з препаратом іринотекану надходять до етикетувальної машини. На флакон наклеюють етикетку, на якій вказують: підприємство-виробник і його товарний знак, торгову назву препарату, лікарську форму, концентрацію, номінальний об'єм, номер серії, термін придатності. На пачці та етикетці для групової упаковки вказують: підприємство-виробник і його товарний знак, адресу, телефон, факс, торгову назву препарату, міжнародну непатентовану назву, лікарську форму, кількість флаконів в упаковці, інформацію про склад лікарського препарату, умови зберігання, позначку «Стерильно», умови відпуску, спосіб застосування, попереджувальні написи: «Зберігати в недоступному для дітей місці», «Застосовувати за призначенням лікаря», реєстраційний номер, номер серії, термін придатності, штрих-код.

Контролюють якість маркування: етикетка повинна бути наклеєна рівно, печатка повинна бути чітка, ясна, текст повинен бути правильно написаний.

По 1-му або 5-ть (згідно з ТЗ) флаконів з рівною кількістю інструкцій із застосування поміщають в пачку з картону.

На столі перевіряють якість укладання флаконів у коробки – всі гнізда повинні бути заповнені флаконами, в кожному коробку повинні бути вкладені інструкції із застосування.

Пачки поміщають в коробку з картону. На коробку наклеюють етикетку-бандероль.

Групову упаковку і транспортну тару виконують відповідно до НТД.

На етикетці-бандеролі вказують: підприємство-виробник, його товарний знак, адресу, телефон, факс, торгову назву препарату, міжнародну непатенто-

вану назву, лікарську форму, дозування, кількість флаконів в одній упаковці, кількість пачок у коробці, інформацію про склад лікарського засобу, умови зберігання, позначку «Стерильно», умови відпуску, спосіб введення, попереджувальні написи: «Застосовувати за призначенням лікаря», «Зберігати в недоступному для дітей місці», реєстраційний номер, номер серії, термін придатності, штрих-код.

Додатково вказують кількість пачок у груповій упаковці.

Після закінчення процесу упаковки майстер здійснює маркування кожної серії ідентифікаційно, етикеткою із зазначенням: найменування продукції (із зазначенням дози), умов зберігання, терміну придатності, дати виготовлення, номера серії, кількості ящиків у серії, кількості палет у серії, прізвища майстра. На ідентифікаційній етикетці і пакувальних листах передбачено місце для закріплення кольорових ярликів, які показують приналежність продукції до певного статусу: «Чекає рішення ВКЯ», «Придатна до реалізації», «Брак».

На підставі представницького сповіщення контролер ВКЯ відбирає від кожної серії препарату проби відповідно до ДФУ 2-го видання для повного аналізу на відповідність вимогам МКЯ.

Готову продукцію маркують статусною етикеткою «Карантин» і передають на склад, де її зберігають в сухому, захищеному від світла місці при температурі не вище мінус 10 °С до отримання результатів аналізу ВКЯ. Всі показники якості препарату «Ліофілізат наноемульсії іринотекану для приготування розчину для інфузій 20 мг у флаконі» повинні відповідати вимогам МКЯ.

На кожен серію готового продукту після аналізу ВКЯ видається паспорт затвердженого зразка, підписаний начальником ВКЯ.

У міру оформлення готову продукцію завантажують на транспорт для відправки за призначенням.

На стадії упаковки, маркування готового продукту утворюються втрати, які складаються з твердих і рідких відходів. Рідкі відходи – розчин, що губиться в процесі виробництва, тверді відходи – склобій, пакувальні матеріали (подрібнені етикетки, коробки, інструкції, пачки, обрізки паперу, картону). До втрат входить кількість препарату, що відбирається для проведення контролю якості готової продукції контрольним майстром ВКЯ, а також закладки архівних і арбітражних зразків.

Нижче ми наводимо основні технологічні стадії отримання препарату наноемульсії куркуміну, ліофілізату для приготування розчину для інфузій 15 мг у флаконі.

Стадія 1. Одержання плівки ліпідів

При виробництві препарату наноемульсії «Куркумін, ліофілізат для приготування розчину для інфузій 15 мг у флаконі» використовують сировину, що пройшла вхідний контроль у ВКЯ на відповідність нормативно-технічній документації. Для отримання препарату використовуються такі діючі речовини і допоміжні компоненти: куркумін, фосфатидилхолін яєчний, дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (DPPG), лактоза, натрій фосфорнокислий монозаміщений моногідрат, калій фосфорнокислий. При виробництві препарату наноемульсії куркуміну використовують допоміжні речовини, які мають різний вміст основної речовини і вологи, що вимагають перерахунку на 100 % ваги.

Розрахунок наважок завантажуваних компонентів проводять з огляду на склад препарату: куркумін, фосфатидилхолін яєчного жовтка і DPPG. Розрахункові кількості компонентів зважують на вагах у тарі для наважок.

Для приготування ліпідної плівки отримані наважки поміщають в ємність і розчиняють в суміші етанолу і хлороформу. Отриману суміш перемішують до повного розчинення.

Ємність з напівпродуктом переносять в ламінар для проведення стерилізуючої фільтрації. Стерилізуючу фільтрацію проводять з використанням фільтра, наприклад, «Акропак» для освітлюючої та стерилізуючої фільтрації, що має в своєму складі мембрану з діаметром пор 0,22 мкм.

Отриманий розчин двох компонентів завантажують в колби вакуумного роторного випарника. Концентрування у вакуумі проводять при температурі 40–42 °С при постійному перемішуванні до повного видалення органічних розчинників і отримання тонкої ліпідної плівки на стінках колби. Ліпідна плівка обробляється газоподібним азотом.

Стадія 2. Одержання розчину лактози

Розрахунок наважок завантажуваних компонентів проводять з огляду на склад препарату. На вагах у тарі для наважок зважують розрахункові кількості субстанції лактози.

У ємність для приготування напівпродукту доливають необхідний об'єм стерильної води для ін'єкцій. Після чого завантажують розрахункову кількість субстанції лактози. Завантаження субстанції ведуть при постійному перемішуванні і температурі води не менше 40 °С і не більше 60 °С. Перемішування розчину ведуть до повного розчинення лактози (протягом 20–30 хв.). Після закінчення перемішування доводять об'єм розчину лактози водою для ін'єкцій до заданого об'єму, після чого знову продовжують перемішування розчину протягом 5–10 хв.

Ємність з напівпродуктом переносять до боксу стерилізуючої фільтрації і переливають до напірної ємності і проводять стерилізуючу фільтрацію. Із загального об'єму розчину лактози відбирають пробу для проведення аналізу на відповідність специфікації на напівпродукт.

Після закінчення фільтрації проводять контроль цілісності мембрани. При виявленні порушення цілісності мембрани весь профільтрований розчин має пройти повторну фільтрацію на резервній капсулі, що витримує зазначений тест.

Стадія 3. Отримання буферного розчину

Розрахунок наважок завантажуваних компонентів проводять виходячи зі складу буферного розчину натрію фосфорнокислого монозаміщеного і калію фосфорнокислого. У ємність для приготування напівпродукту заливають необхідний об'єм стерильної води для ін'єкцій. Після чого завантажують розрахункову кількість солей. Завантаження солей ведуть при постійному перемішуванні і температурі води не менше 30 °С і не більше 50 °С. Перемішування розчину ведуть до повного розчинення солі (протягом 30–40 хв.). Після закінчення перемішування доводять об'єм буферного розчину стерильною водою для ін'єкцій до заданого об'єму, після чого знову продовжують перемішування розчину протягом 3–5 хв.

Ємність з напівпродуктом переносять до боксу стерилізуючої фільтрації і переливають до напірної ємності і проводять стерилізуючу фільтрацію.

Після закінчення фільтрації із загального об'єму буферного розчину відбирають пробу для проведення аналізу на відповідність специфікації на напівпродукт.

Після закінчення фільтрації проводять контроль цілісності мембрани. При виявленні порушення цілісності мембрани весь профільтрований розчин має пройти повторну фільтрацію на резервній капсулі, що витримує зазначений тест.

Стадія 4. Регідратація плівки ліпідів і куркуміну, отримання наноемульсії

У колбу з плівкою трьох компонентів доливають розрахунковий об'єм буферного розчину (рН 6,5–7,0) з лактозою і перемішують при 130–140 об./хв. Перемішують 2 години до отримання однорідної ліпідної емульсії. Спостереження – візуально. Однорідну емульсію переносять в робочу ємність апарату для отримання наноемульсії.

Процес диспергування здійснюють при температурі 35–40 °С. Після заповнення робочої ємності апарату емульсією включають апарат. Доводять тиск до 500 атм., гомогенізацію проводять протягом 3 циклів. Доводять тиск до 800 атм., гомогенізацію проводять протягом 3–4 циклів. Охолодження здійснюють холодною водопровідною водою. Процес проводять під контролем розміру частинок. Розмір частинок після проведення гомогенізації – не більше 150 нм. Після закінчення диспергування препарат завантажують в стерильну ємність. Ємність з напівпродуктом переносять до боксу стерилізуючої фільтрації і переливають до напірної ємності і проводять стерилізуючу фільтрацію (аналогічно процесу стадії 2 при одержанні ліпосом іринотекану).

Після закінчення фільтрації із загального об'єму наноемульсії відбирають пробу для проведення аналізу на відповідність специфікації на напівпродукт.

Після закінчення фільтрації проводять контроль цілісності мембрани. При виявленні порушення цілісності мембрани весь профільтрований розчин має пройти повторну фільтрацію на резервній капсулі, що витримує зазначений тест.

Стадія 5. Наповнення та ліофілізація препарату

Ємність з препаратом маркують ідентифікаційною етикеткою із зазначенням найменування препарату, номера серії, дати стерилізуючої фільтрації і передають на стадію стерильного розливу у флакони.

Всі дані з ведення технологічного процесу отримання препарату заносять у робочі журнали, технологічні протоколи.

Препарат після стерилізуючої фільтрації і перед розливом повинен відповідати таким показникам: рН від 6,5 до 7,0; фосфатидилхоліну – від 27,0 до 29,0 мг/мл; DPPG – від 2,7 до 2,9 мг/мл; куркуміну – від 0,70 до 0,74 мг/мл; стерильність – стерильно. Включення куркуміну в частинки не менше 85 %. Розмір частинок – до 150 нм.

За відповідності препарату вимогам специфікації на ємність наклеюють ідентифікаційну етикетку: «Наноемульсія куркуміну перед розливом».

Виконавці виконують записи в заповнюваних формах документації (робочі журнали, протокол виготовлення).

Розчин передають на стадію наповнення у флакони.

Стадія 5.1. Наповнення флаконів наноемульсії куркуміну

Розлив наноемульсії іринотекану проводять у флакони по 10,0 мл.

Розлив напівпродукту проводять на обладнанні для асептичного наповнення флаконів у зоні А приміщення класу чистоти В при включеному ламінарі. Точність об'єму розливу контролюють каліброваним мірним шприцом згідно з «Інструкцією з контролю точного розливу препарату». Препарат не повинен містити механічних включень. Контроль об'єму розливу слід проводити на початку, всередині і вкінці розливу.

У процесі розливу відбирають по 2 флакони на початку, всередині і вкінці розливу на контроль стерильності.

Після розливу флакони частково закупорюють пробками для ліофілізації і передають в апарат для ліофілізації.

Усі дані з ведення технологічного процесу розливу наноемульсії куркуміну заносять у робочі журнали, технологічні протоколи.

Стадія 5.2. Сублімаційне висушування наноемульсії куркуміну

Заморожування і сушку наноемульсії куркуміну проводять в сублімаційній установці. Перед завантаженням препарату проводять санітарну обробку внутрішніх поверхонь і полиць камери 3 %-вим розчином пероксиду водню, після чого протирають безворсовою серветкою, змоченою 96 %-вим розчином етилового спирту. Після обробки проводять контроль камери на мікробіологічну чистоту.

В камеру апарату на охолоджені до температури мінус 30 ± 2 °С полиці завантажують касети з розлитим у флакони препаратом. Точка евтектики наноемульсії куркуміну становить мінус 32 °С. У два контрольних флакони встановлюють термодатчики. Нульовим часом процесу заморожування вважається завантаження продукту в ліофільну сушку і запуск програми заморожування. Проводять охолодження полиць до температури мінус 55 ± 2 °С і нижче, при цьому температура препарату досягає мінус 50 ± 2 °С і нижче. Тривалість процесу заморожування наноемульсії куркуміну становить не менше 14–16 годин, у тому числі час для врівноваження.

Стадія 5.3. Ліофілізація препарату у флаконах

Після загартування препарату при температурі мінус 50 ± 2 °С і нижче протягом 14–16 годин починається процес вакуумування. При досягненні в камері сталого показника вакууму (12–15 Па) починають процес сублімаційного висушування.

Включають підігрів теплоносія на 20 °С. Підігрів теплоносія відбувається на 1–2 °С за годину, при цьому температура препарату також підвищується на 1–2 °С за годину і до 40–45 годин від початку висушування досягає нульової позначки. Включають підігрів теплоносія на 30 °С. При цьому температура препарату підвищується і до 60–65 годин досягає температури 30–35 °С. Після досягнення цієї температури препарат витримують протягом 6–8 годин. Після чого відключають працюючі частини установки і через фільтр Мідісарт-2000 з розміром пор 0,2 мкм у камеру подають азот.

При досягненні залишкового тиску в камері субліматора 15 кПа проводиться закупорювання флаконів пробками переводом рукоятки в положення «down». Флакони з препаратом у касетах вивантажують з камери субліматора, касети закривають кришками, маркують ідентифікаційною етикеткою із зазначенням найменування препарату, номера серії, дати ліофілізації і передають через передавальне вікно на стадію обкатки ковпачками.

На підставі представницькою сповіщення контролер ВКЯ відбирає від кожної серії препарату проби відповідно до ДФУ 2-го видання для повного аналізу на відповідність вимогам МКЯ.

Готову продукцію маркують статусною етикеткою «Карантин» і передають на склад, де її зберігають в сухому, захищеному від світла місці при температурі не вище мінус 10 °С до отримання результатів аналізу ВКЯ.

Стадія 6. Обкатка флаконів ковпачками; Стадія 7. Контроль флаконів з ліофілізованим препаратом куркуміну; Стадія 8. Маркування та упаковка і флаконів з ліофілізатом наноемульсії куркуміну 15 мг у флаконі – перераховані стадії проводяться аналогічно технологічними стадіями 11, 12 і 13 при виробництві ліпосомальної форми іринотекану гідрохлориду.

ПІДСУМОК

Аналізуючи наведені дані можна говорити про те, що в теперішній час основними способами отримання ліпосом являються методи: інжекції, екструзії високого тиску, ультразвукової обробки, спонтанної везикуляції, утворення ліпідної плівки, заморожування-відтавання, метод хімічного градієнта, а також їх спільне використання. У табл. 3.1 наведені способи отримання ряду розроблених ліпосомальних препаратів.

Таблиця 3.1 – Характеристика ліпосомальних препаратів

Назва АФІ, препарату	Призначення	Методи одержання
1	2	3
Фосфатидилхолін, «Ліпін»	Кардіологія, пульмонологія	Метод гідратації ліпідної плівки, гомогенізація високого тиску
Доксорубіцину гідрохлорид, «Доксил»	Онкологія	Метод гідратації ліпідної плівки, гомогенізація високого тиску, метод хімічного градієнта
Кверцетин «Ліпофлавон»	Кардіологія, офтальмологія	Метод гідратації ліпідної плівки, гомогенізація високого тиску
Доксорубіцину гідрохлорид «Ліподокс»	Онкологія	Метод гідратації ліпідної плівки, гомогенізація високого тиску, метод хімічного градієнта
Іринотекан	Онкологія	Метод гідратації ліпідної плівки, УЗ-обробка, гомогенізація високого

Продовження таблиці 3.1

1	2	3
		тиску, метод хімічного градієнта
Доцетаксел	Онкологія	Метод гідратації ліпідної плівки, гомогенізація високого тиску
Оксаліплатин	Онкологія	Метод гідратації ліпідної плівки, УЗ-обробка, гомогенізація високого тиску, метод хімічного градієнта
Цитохром С	Кардіологія, офтальмологія	Метод гідратації ліпідної плівки, гомогенізація високого тиску
Силібінін	Онкологія, антимікробна дія	Метод гідратації ліпідної плівки, метод заморожування-відтаювання

До складу ліпосомальних лікарських препаратів входять:

1. АФІ: гормони, анестетики, антиоксиданти, цитостатики, антибіотики та ін.;

2. Допоміжні речовини: природні і синтетичні ліпіди – фосфатидилхоліни: яєчний – ЕРС, соєвий – SPC, гідрогенізований соєвий - HSPC, дипальмітоїлфосфатидилхолін – DPPC, дистеароїлфосфатидилхолін – DSPC; стерини: холестерол – Chol, холестерил-гемісукцинат – Chol-GS; холестерин-сульфат – Chol-sulfat, фосфатидилетаноламіни: дистеароїлфосфатидилетаноламін, кон'югований з поліетиленгліколем з молекулярною масою 2000 або 5000 – DSPE-PEG-2000 або 5000, дистеароїлфосфатидилетаноламін-фолат-ПЕГ-3350 – DSPE-Fol-PEG-3350, 1,2-диолеоїлокси-3-[триметиламін]-пропан – DOTAP, дипальмітоїлфосфатидилетаноламін – DPPE; диміристоїлфосфатидилхолін – DMPC, диміристоїлфосфатидилгліцерин – DMPG, диолеїлфосфатидилхолін – DOPC, дипальмітоїлфосфатидилетаноламін – DPPE, сфінгомієлін – SPM; диміристоїлфосфатидихолін – DMPC, диолеїлфосфатидилетаноламін – DOPE, дигерукоїлфосфатидилхолін – DEPC; аніонні фосфоліпіди: фосфатидилінозит, дифосфатидилгліцерин – DPG, фосфатидилгліцерин – PG, дипальмітоїлфосфатидилгліцерин – DPPG; дистеароїлфосфатидилгліцерин – DSPG; лізофосфатидилхолін – LPC; яєчний фосфатидилгліцерин – EPG; тригліцериди: трикаприлін та ін. Ненасичені природні види фосфатидилхоліну (яєчний і соєвий) характери-

зуються більшою проникністю в клітини і стійкістю, ніж насичені фосфоліпіди з довгими ацильними ланцюгами, наприклад, дипальмітоїлфосфатидилхолін.

3. Стабілізатори – кріопротектори: трегалоза, лактоза, сахароза та ін.

4. Буферні розчини: цитратні, фосфатні та ін.

У табл.3.2 наведені комерційні препарати ліпосомальних лікарських препаратів, що випускаються світовою фармацевтичною промисловістю.

Таблиця 3.2 – Характеристика комерційних ліпосомальних лікарських препаратів

Назва препарату, виробник	АФІ, шлях введення	Склад ліпосом (мол. співвідн. або мг/мл)	Основна фармакологічна дія
1	2	3	4
Abelcet, Liposome Company, США	Амфотерицин В, в/в	DPPC : DMPG (7 : 3)	Противіробкова
Ambisom, NeXstar Pharmaceuticals, США	Амфотерицин В, в/в	HSPC : DSPC : Chol (2 : 0,8 : 1)	Противіробкова
Amphotec, Liposome Technology, США	Амфотерицин В, в/в	Chol-sulfat	Противіробкова
Ampholip, Bharat serum, Індія; Alza Pharmaceuticals, США	Амфотерицин В, в/в	DMPC : DMPG (3,4 : 1,5 мг/мл)	Противіробкова
Doxil, Alza Pharmaceuticals, США	Доксорубіцину гідрохлорид, в/в	HSPC : Chol : PEG-2000-DSPE (56 : 38 : 5)	Рак яєчника та молочної залози, саркома Капоши та ін.
DauneHome, NeXstar Pharmaceuticals, США	Доксорубіцину гідрохлорид, в/в	DSPC : Chol (2 : 1)	СНІД, саркома Капоши та ін.
Cuelyx, Schering-Plough, Бельгія	Доксорубіцину гідрохлорид, в/в	MPEG-DSPE: HSPC : Chol (3,19 : 9,58 : 3,19 мг/мл)	Рак молочної залози, легень, яєчників та ін.
Myocet, Elan Pharma, США	Доксорубіцину гідрохлорид, в/в	EPC : Chol (1 : 1)	Саркома Капоши, неопластичний рак молочної залози та ін.
Ліпін, Біолік, Харків, Україна	Фосфатидилхолін, в/в	EPC – 50 мг/мл	Антигіпоксична, антиоксидантна, мембранопротекторна

Продовження таблиці 3.2

1	2	3	4
Ліподокс, Біолік, Харків, Україна	Доксорубіцину гід- рохлорид, в/в	ЕРС : Chol (90 : 10)	Протипухлинна
Ліолів, Біолік, Харків, Україна	Антраль, в/в	ЕРС	Гепатопротекторна
Ліпофлавон, Біолік, Харків, Україна	Кверцетин, в/в	ЕРС	Кардіопротекторна, антиоксидантна
Ліпофлавон, Біолік, Харків, Україна	Кверцетин, очні краплі	ЕРС	Ранозагоювальна, ангіопротекторна, протизапальна
ДероСут, SkyPharma., Велика Британія; Pasira Pharmaceuticae, США	Цитарабин, спінально	DOPC : DPPG : Chol : триолеїн (5,7 : 1,0 : 4,4 : 1,2 мг/ мл)	Неопластичгий менінгіт
ДероDur, SkyPharma, Велика Британія	Морфіну сульфат, епидурально	DOPC : DPPG : Chol : триолеїн (4,2 : 0,9 : 3,3 : 0,1 мг/мл)	Знеболювальна
Onivyde (MM-398), Mer- tmack Pharmaceuticals, США	Іринотекан, в/в	DSPC : MPE- 2000 : DSPE (3 : 2 : 0,015)	Комплексна терапія з фторурацилом і лейко- ворином при аденокар- циномі підшлункової залози
Tears again, Optima Pharmaceutical GmbH, Німеччина	Природні фосфолі- піди, аерозоль	Природні фосфо- ліпіди	Лікування сухого ока
Ліпоферон, Jadran, Росія	Інтерферон $\alpha 2b$	ЕРС : Chol (4,53:0,56 мг/мл)	Противірусна
АгіКасе, Чунцинська Да- синська ФармКомпанія, Китай	Амікацин для інга- ляцій	DPPE : Chol (2 : 1)	Антибактеріальна
Fluidosomes, Axentis Pharma, Швейцарія	Тобраміцин		Антибактеріальна
Marqibo, Talon Thera- peutics, США	Вінкристин	SPM : Chol (60 : 40)	Гострий лімфобластний лейкоз

Продовження таблиці 3.2

1	2	3	4
Meract, IDM Pharma, США; Takeda Pharmaceutical, США	Мурамілтрипептид	DOPC : POPC (3 : 7)	Неместатичная остеосаркома
Exparel, Pacira Pharmaceuticals, США	Бупівакаїн, в/в	DPPG : DEPC : Chol : трикаприлін (0,9 : 8,2 : 4,7 : 2,0)	Знеболювальна
Vysudin, Novartis Pharma, Швейцарія	Вертепорфірин	DMPC : EPG (5 : 3)	Фотодинамічна терапія
Erahol-Berna Vaccine, Swiss Serum Vaccine Institute, Швейцарія	Антиген гепатиту А, в/м	DOPC : DOPE (75 : 25)	Противірусна
Inflexal virosomal Influenza, Vaccine, Swiss Serum Vaccine Institute, Швейцарія	Гемаглютинін, нейрамінідаза вірусів гепатиту А і В, в/м	DOPC : DOPE (75 : 25)	Противірусна
Ліпосомальний лідокаїн, BIOZONE Lab., США	Лідокаїн	HSPC/DMPC : Chol : Mannitol (3 : 1 : 1,25)	Анастезуюча
Ліпосом-форте Трикортин-1000, Fidia Pharmaceutical, SPA, Італія	Синтезовані фосфоліпіди гіпоталамуса	Фосфоліпіди	Лікування черепно-мозкових травм, нейротропна
ЛіроНер, Виатромб, Польща; Фабрил Фарма, Німеччина	Гепарин	Фосфоліпон-80	Протизапальна, протинабрякова, антикоагулянтна
Melatonin liposomal drops, Nutra BioGene-sis, Німеччина	Мелатонін	SFPC	Покращення сну
НераХен, Comb.I vaccine, Лірохен,, Велика Британія	Антиген гепатиту В, в/м	–	Профілактика гепатиту В
Ліроваса Influenzal, vaccine, Болгарія	Гемаглютинін і нейрамінідаза, в/м	–	Профілактика грипу
Invivac virosomal Influenza vaccine, Solvay, Бельгія	Поверхневий антиген грипу, в/м	–	Профілактика грипу

У наш час на різних фазах розробки (I, II, III) знаходиться велика кількість ліпосомальних форм: паклітакселу: LEP-ETU, в/в, (DOPC: Chol: cardiolipin - 90: 5: 5) і Endo Tag I, в/в, (DOTAP: DOPC-paclitaxel – 50: 47: 3); доксорубіцину: Thermodox, в/в, (DPPC: MSPC: PEG-2000-DSPE – 90: 10: 14) і ряд інших.

Ряд зазначених у таблиці препаратів, що містять однакові АФІ, є оригінальними препаратами, оскільки до їх складу входять різні ліпідні компоненти, і, крім цього, вони отримані за різними технологіями. У наш час сотні ліпосомальних лікарських форм знаходяться на доклінічних дослідженнях, а десятки препаратів завершують проходження II і III стадії клінічних досліджень: ніпагін (Nyotran), преднізолон (Nanocort), дексаметазон (Oncocort), вінкрисдин (Vincanome), камптотецин, простагландин E1 (Liprostin), оксалиплатин, цисплатин (Liporlatin і SPT 077), анаміцин, мітоксантрон, паклітаксел, ендонуклеаза бактеріофага і багато інших.

Таким чином, наведені дані доводять перспективність отримання ліпосомальних форм лікарських препаратів. Необхідно відзначити, що в кожному конкретному випадку необхідно вирішувати поставлені завдання виходячи із кінцевої мети: підбір ліпідних компонентів, джерело їх виділення і вміст; фізико-хімічні властивості АФІ, що вводиться в ліпосоми; спосіб отримання ліпосом; склад консервантів і стабілізаторів; режими ліофілізації та зберігання і ряд інших факторів, що визначають якість і біологічну активність ліпосомальної форми лікарського засобу. У теперішній час активно розробляються ліпосомальні препарати на основі комбінованого складу лікарських речовин, рН чутливі ліпосоми, магнітоліпосоми та ін. Вивчають різні методи введення ліпосомальних продуктів: внутрішньовенно, трансдермально, інтраназально, інгаляційно, у вигляді очних крапель та ін. Ліпосомальні препарати застосовують в онкології, офтальмології, кардіології, антибіотикотерапії, вакцинології, в генній інженерії, діагностиці та інших напрямках медицини. На нашу думку, перспективними є комплексні препарати, що проявляють синергічну дію, наприклад, комплекси антиоксидантів або комплекси цитостатичних АФІ.

Великий розмір ліпосом робить їх такими, що легко впізнаються системою мононуклеарних фагоцитів. Великий розмір зводить до мінімуму їх вплив на нормальні тканини.

У теперішній час існує чотири основних технології отримання ліпосомальних лікарських препаратів:

1. Ліпосомальна технологія Stealth.
2. Технологія неPEGільованих ліпосом.
3. Технологія DeroFoam.
4. Технологія термочутливих ліпосом.

Технологія DeroFoam інкапсулює лікарські засоби в свою багатовезикулярну ліпосомальну платформу без зміни їх молекулярної структури. Мультивезикулярні ліпосоми вивільняють лікарські засоби протягом необхідного періоду часу від 1 до 30 днів. DeroFoam складається з мікроскопічних сферидів (3–30 мкм) із зернистою структурою і одношарових ліпосомальних частинок, що складаються з безлічі неконцентрованих внутрішніх водних камер, що містять обмежений лікарський засіб. Кожна частинка містить численні неконцентровані водні камери, обмежені однією двошаровою ліпідною мембраною. Кожна камера відділена від сусідніх камер двошаровою ліпідною мембраною, що складається з синтетичних аналогів природних ліпідів (DOPC, DPPG, Chol, триолеїн та ін.). Збільшується час дії для ліків, які мають короткий період дії або побічні ефекти.

Контрольні запитання

1. Навести переваги ліпосомальних лікарських засобів перед вільними формами.
2. Загальна характеристика ліпосом.
3. Описати технологічні аспекти одержання ліпосомальних наночастинок.
4. Технологічне одержання ліпідної плівки.
5. Описати технологію багатошарових та одношарових ліпосом.
6. Які методи одержання ліпосом Вам відомі (ультразвукова обробка, метод спонтанної везикуляції, інжекція). Переваги та недоліки вказаних методів.
7. Навести основні технологічні параметри одержання ліпосом методом екструзії. Основні параметри екструзії.

8. Оцініть методи заправки ліпосом активним фармакологічним інгредієнтом (метод ліпідної плівки, хімічний зв'язок). Для яких інгредієнтів можливо використовувати ці методи?

9. Технологія заправки активного фармакологічного інгредієнта методом хімічного градієнта – градієнта рН.

10. Технологія заправки активного фармакологічного інгредієнта методом хімічного градієнта рН.

11. Технологія заправки активного фармакологічного інгредієнта методом хімічного градієнта сульфату амонію.

12. Вимоги до технології проведення стерилізуючої фільтрації ліпосомальних емульсій. Контроль цілісності мембран.

13. Навести основні параметри одержання ліпосом методом екструзії (час, тиск, кількість циклів та ін.).

14. Технологія розливу та сублімації ліпосомальних лікарських засобів. Кріопротектори.

15. Охарактеризувати методи контролю ліпосомальних лікарських препаратів відповідно до вимог ДФУ.

16. Навести основні технологічні стадії одержання ліпосом з ірінотеканом гідрохлоридом та основні критичні точки.

17. Навести основні технологічні стадії одержання ліпосом з куркуміном та основні критичні точки.

18. Які активні фармакологічні інгредієнти доцільно включати в ліпосоми і чому?

Список джерел інформації

1. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, А.С. Дудниченко, В.И. Швец. –Харьков: НТУ «ХПИ», 2011. – 227 с.

2. Швец В.И. Липосомальные формы лекарственных препаратов: технологические особенности получения и применение в клинике / В.И. Швец, Ю.М. Краснопольский, Г.М. Сорокоумова. –М.: Ремедиум, 2016. – 200 с.

3. Стадниченко А.В. Липосомальные противоопухолевые препараты / А.В. Стадниченко, А.С. Дудниченко, Ю.М. Краснопольский. – Харьков: Типография Мадрид, 2018. – 256 с.

4. Пилипенко Д.М., Звягинцева О.В., Краснопольский Ю.М. Нанобиотехнологические формы гидрофобных антиоксидантов: научные основы получения, фармакологические и терапевтические свойства: в монографии «Актуальные проблемы биотехнологии и биоинженерии» / Пилипенко Д.М., Звягинцева О.В., Краснопольский Ю.М. – Харьков: Типография Мадрид, 2019. – С. 9-72.

5. Bubake U. Liposomal Formulation in clinical use: An updated Review / U. Bubake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan // *Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 9. – № 2. – P. 12–26.

6. Eldem T. Ocular drug, Gene and Cellular Delivery Systems and Advanced Therapy Medicinal Products / T. Eldem, B. Eldem // *Turkish journal of ophthalmology*. – 2018. – Vol. 48. – P. 132–141.

7. Dubald M. Ophthalmic Drug Delivery Systems for Antibiotherapy A Review / M. Dubald, S. Bourgeois, V., Andrieu H. Fessi // *Pharmaceutics*. – 2018. Vol. 10. – № 1. – P. 10–41.

8. Krasnopolskii Yu.M. Technologies and perspectives of liposomal Drug Application in clinical practice / Yu.M. Krasnopolskii, A.S. Grigor'eva, A.G. Katsai et al. // *Rossiiskie Nanotekhnologii*. – 2017. – Vol. 12. – № 7–8. – P. 449–458.

9. Shakhmaiev A. E. Preparation and cardioprotective effect analysis of liposomal coenzyme Q₁₀ / A. E. Shakhmaiev, T. V. Gorbach, L. A. Bobritskaya, Yu. M. Krasnopolsky // *The Pharma Innovation Journal*. – 2015. – Vol. 4. – № 9. – P. 22–26.

10. Krasnopolsky Y.M. Experimental study of liposomal docetaxel incorporation and stability / Y.M. Krasnopolsky, A.S. Dudnichenko // *Experimental Oncology*. – 2017. – Vol. 39. – № 2. – P. 121–123.

11. Katsai O. “Quality-by-Design” approach to the development of a dosage form the liposomal delivery system of cytochrome C / O. Katsai, O. Ruban, Y. Krasnopolskyi // *Pharmakeftiki*. – 2018. – Vol. 30. – № 1. – P. 76–87.

12. Katsai O.G. Preparation and in-vivo evaluation of cytochrome-C-containing liposomes / O.G. Katsai, O.A. Ruban, Y.M. Krasnopolskyi // *Pharmazie*.

An International Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017. Vol. 72. – № 12. – P. 736–740.

13. Huang M. Encapsulation and flavonoides in liposomal delivery system / M. Huang, E. Su, F. Zheng, C. Tan // Food and function. – 2018. – Vol. 8. – P. 3198–3208.

14. Chen W. Co-Encapsulation of EGCG and Quercetin in liposomes for Antioxidant Activity / W. Chen, M. Zou, X. Ma et al. // Food Science. – 2019. – Vol. 84. – № 1. – P. 111–120.

15. Aqarwal R. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update / R. Aqarwal, L. Lezhitsa, P. Aqarwal et al. // Drug delivery. – 2016. – Vol. 23. – № 4. – P. 1075–1091.

16. Pylypenko D.M. A Study of Oxidative Stress Markers when Using the Liposomal Antioxidant Complex / D.M. Pylypenko, T.V. Gorbach, O.G. Katsai et al. // Pharmakeftiki. – 2019. – Vol. 31. – № 1. – P. 40–47.

17. Пилипенко Д.М. Исследования антиаритмической активности липосомальной формы цитохрома С. / Д.М. Пилипенко, А.Г. Кацай, В.В. Прохоров и др. // Scientific Journal. ScienceRise: Pharmaceutical Science. – 2017. – Vol. 3. – № 7. – С. 54–57.

18. Fahmy H.M. Treatment merits of Latanoprost/Thymoquinone – Encapsulated liposome of glaucomatous rabbits / H.M. Fahmy, E.A. Soad, N.M. Sabra et al. // International Journal of Pharmaceutics. – 2018. – Vol. 548. – № 1. – P. 597–608.

19. Carrigue J.S. Relevance of Lipid-Based Products in the Management of Drug Eye Disease / J. S. Carrigue, M. Amrane, M. O. Taure et al. // Journal of ocular Pharmacology and Therapeutics. – 2017. – Vol. 339. – № 9. – P. 647–661.

20. Stadnichenko O.V. The Concept “Quality by Design” in development of Liposomal cytostatics / O.V. Stadnichenko, Yu. M. Krasnopolsky, T.G. Yarnykh et al. // Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2020. – Vol. 13. – № 2. – P. 674–678.

ГЛАВА 4. ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ, ЩО МІСТЯТЬ ШТАМИ ПРОБІОТИКІВ

Пробіотики (pro-bios – для життя) – препарати, які містять живі мікроорганізми, що належать до нормальної, фізіологічно та еволюційно обґрунтованої флори кишкового тракту. Вони позитивно впливають на організм хазяїна, сприяють відновленню травлення, біологічного статусу, імунній відповіді, підвищують ефект вакцинації. Пробіотики є бактеріальними препаратами, які містять ті або інші мікроорганізми облигатної мікрофлори (біфідобактерії, лактобацили, ентерококи, аерококи, ешерихії та ін.), які здійснюють при природному способі введення позитивний вплив на мікробіоценоз кишечника хазяїна. Симбіонтне травлення відбувається за сприяння анаеробної кишкової мікрофлори і здійснюється переважно у висхідному відділі товстої кишки. При цьому розкладаються не тільки неперетравлені у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту залишки їжі (переважно рослинні волокна), а й інші органічні сполуки. У нормальних фізіологічних умовах протеолітичні і цукролітичні бактерії спільно беруть участь в цьому процесі. Серед метаболітів особливої уваги заслуговують так звані коротколанцюгові летючі жирні кислоти: оцтова, пропіонова, масляна, молочна та ін. До складу препаратів входять представники нормальної мікрофлори людини, що продукують різноманітні за хімічним складом речовини, які виявляють антимікробну активність: перекис, низькомолекулярні кислоти, антибіотикоподібні пептиди, лізоцим та ін. До теперішнього часу встановлено, що коротколанцюгові летючі жирні кислоти виконують в організмі ряд найважливіших функцій: енергетичну підтримку, стимуляцію функцій непатогенної симбіонтної флори, протизапальну і бактеріостатичну (щодо патогенної мікрофлори) активність, підтримання необхідних значень рН в кишечнику.

В останні роки в Україні дуже гостро постала проблема захворювань шлунково-кишкового тракту різної етіології. За оцінками лікарів, від 75 до 90 %

населення України тією чи іншою мірою страждають на дисбактеріоз. Дисбактеріоз, або синдром надлишкового бактеріального росту, включає зміни видового складу і метаболічної активності кишкової мікрофлори, ускладнює перебіг багатьох захворювань за рахунок порушення функціонування імунної системи організму. У результаті зниження рівня пробіотичних штамів, зокрема, біфідобактерій та лактобацил, порушуються процеси травлення, погіршується всмоктування речовин, засвоєння заліза та кальцію, синтез вітамінів, втрачається здатність до активізації різних ферментів, знижується стійкість кишечника до надлишкового заселення його умовно-патогенними та патогенними мікроорганізмами. Продукти метаболізму та токсини умовно-патогенних та патогенних бактерій знижують дезінтоксикаційну здатність печінки, пригнічують регенерацію слизового шару кишечника, гальмують перистальтику та призводять до розвитку діареї. Причиною зниження рівня корисної мікрофлори є великий перелік факторів, серед яких головними є неконтрольоване використання антибіотиків та неякісних біологічних добавок, відсутність препаратів, які включають місцеві штами пробіотичних бактерій, недостатнє і нераціональне харчування, шкідливі звички, психо-емоційне перевантаження, надмірне використання пестицидів, консервантів, барвників виробниками продуктів харчування.

Для покращання загального стану організму, з метою підвищення імунного захисту та запобігання розладам роботи шлунково-кишкового тракту (ШКТ) необхідно використовувати комплексний підхід. Лікування повинно бути направлено на зниження надлишкової кількості умовно-патогенної мікрофлори, відновлення нормальної мікрофлори, стабілізацію моторики шлунку, поліпшення процесів перетравлення та всмоктування у кишечнику. Для вирішення низки поставлених завдань застосовують препарати бактеріального походження, які належать до групи пробіотиків.

У медичній практиці пробіотичні фармакологічні препарати найчастіше назначають за необхідності фізіологічної імуномодуляції макроорганізму, для підвищення загальної неспецифічної резистентності за рахунок активації різних факторів клітинного та гуморального імунітету; для зниження розвитку патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів; для відновлення порушень нативної мікрофлори в різних біотопах (тканини і органи організму людини).

Основою пробіотиків є живі клітини мікроорганізмів, адаптовані до певних умов існування та досить сильно реагують на їх зміну. Симбіотична мікрофлора людей, які проживають в регіонах з різними кліматичними умовами, раціонами харчування не є абсолютно однаковими. Тому слід брати до уваги тісну взаємодію між мікрофлорою людини та екзогенним мікробним світом.

Тобто найвищу ефективність проявляють пробіотики, основу яких складають «місцеві» штами мікроорганізмів. Принциповою перевагою вітчизняних пробіотиків є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення.

В останні роки з'явилися висловлювання спеціалістів в галузі мікробіології та медицини про те, що склад пробіотика повинен бути полікомпонентним, що визначається полівидовим характером складу природної фізіологічної мікрофлори здорової людини, оскільки лише в багатоштамовому пробіотику можна сконцентрувати високий біотерапевтичний потенціал. З практичної точки зору при аналізі складу пробіотика необхідно враховувати, що популяція «здорових» кишкових бактерій являє собою динамічну суміш мікроорганізмів. Щоб мати позитивний вплив на здоров'я, пробіотик повинен відтворювати ефекти багатьох видів і штамів корисних мікроорганізмів, які присутні у ШКТ здорової людини.

Завдяки результатам численних досліджень, пробіотики на основі живої фізіологічної флори в наш час цілком обґрунтовано розглядаються як ефективний метод відновлення складу і функцій нормальної мікрофлори людини, а поява нової інформації створює великі перспективи для проведення наукових розробок та створення нових ефективних пробіотичних препаратів.

Разом з тим сучасна теоретична база в галузі мікробної екології людини недостатньо впроваджена у створення високоактивних препаратів пробіотичного ряду. Недостатня ефективність багатьох пробіотиків і складність селекції штамів з більш високим пробіотичним потенціалом привели до того, що лікарі призначають пацієнтам одночасно кілька препаратів різного складу. При цьому слід враховувати, що наслідки хаотичного введення комплексу різних мікробів є непередбачуваними, і адекватність їх взаємодії з організмом та між собою важко спрогнозувати.

Таким чином, гостро постає питання створення синбіотичних препаратів, з доведеною симбіотичною дією застосованих штамів, для ефективного лікування захворювань ШКТ різної етіології. Синбіотики можуть використовуватися для загального укріплення організму, для стимуляції механізмів імунологічної активності, як комплексна терапія інфекційних та соматичних захворювань. Використання синбіотиків підвищує ефективність лікування хворих на вірусні гепатити, гастроентерологічні патології, із захворюваннями органів дихання та алергіями. Результати низки мікробіологічних досліджень показали, що після прийому синбіотиків активізується захисна антагоністична функція, запускається комплекс імунологічних реакцій, формується резистентність організму, покращуються клінічні та мікробіологічні показники, не виникає побічних ефектів та алергізації.

Отже, слід зазначити актуальність та перспективність розширення асортименту функціональних продуктів для оптимізації мікрофлори кишечника за рахунок синбіотичних продуктів. Застосування комплексу пробіотиків та пребіотиків дозволяє одночасно вирішити питання забезпечення високих споживчих властивостей і поліпшення технології виготовлення: досягти необхідної концентрації мікробних клітин відповідно до вимог нормативної документації та рекомендованих норм раціонального харчування; забезпечити високий ступінь стресостійкості мікробних клітин протягом товароруку та споживання шляхом регулювання тривалості фаз розвитку мікрофлори; розширити функціональні властивості даної групи продуктів.

Подальшими напрямками досліджень у цій галузі є розширення спектра речовин для стабілізації мікрофлори за рахунок синтезованих сполук, подальше вивчення структурних, сорбуючих та адгезійних властивостей природних пребіотиків, удосконалення методів їх прогнозованого синтезу.

4.1. Мікробна екологічна система людини

Обґрунтування підходів до відбору пробіотичних штамів для створення пробіотичних препаратів починається з опису функцій та стану мікробіоценозів, нормалізувати які покликані пробіотики. Беззаперечно першість у порушенні питання залежності здоров'я людини від стану кишкової мікрофлори

віддається російському вченому І. І. Мечнікову. Саме він вважав, що однією з головних причин передчасного старіння є хронічне отруєння макроорганізму різними продуктами гнилісного розпаду, які утворюються в процесі життєдіяльності гнилісних бактерій у кишечнику. Тому вчений пропонував уживання кисляку – кисломолочного продукту на основі лактобацил, який сприяє розвитку в кишечнику саме цих мікроорганізмів.

Фундаментальні дослідження складу та функцій мікрофлори організму людини проводились у кінці 80-х рр. ХХ ст. Результатом цих робіт є встановлення залежності кількісного і якісного складу пробіотичних штамів від фізіологічного стану організму-хазяїна. Подальшою метою розробок став пошук конкретних критеріїв оцінки пробіотичних штамів різних мікробіотопів людини в аспекті стану колонізаційної резистентності. Так, на думку ряду вчених, мікрофлору слід розглядати як інтегральну частину організму-хазяїна, як своєрідний метаболічний екстракорпоральний орган, що має важливе значення у фізіології людини і тварин.

Започаткована І.І. Мечниковим теорія переросла на рубежі ХХ – ХХІ ст. у нову галузь знань, яка отримала інтенсивний розвиток, – мікробну екологію людини. До того ж, інтерес до проблем мікробної екології людини і бактеріальної терапії в останні роки досягнув такого розмаху, що ХХІ ст. запропоновано називати «ерою пробіотиків».

На сучасному етапі мікробна екологічна система розглядається як особливий мікробно-метаболічний орган, який виконує широкий спектр життєво-важливих локальних і системних функцій, що має суттєвий вплив на структурно-функціональний стан внутрішніх органів, імунну систему, процеси регуляції життєво важливих функцій, а також сприяє гармонійній взаємодії макроорганізму з екзогенним мікробним світом. В організмі людини не існує органа, біохімічного процесу чи функції, в яких би не брали участь, прямо чи опосередковано, симбіотичні мікроорганізми. Тому збереження здоров'я людини цілком залежить від формування та підтримання нормальної мікробної екосистеми людини.

Мікробна екологічна система людини – це складний динамічний комплекс, сформований в процесі онто- та філогенезу. Він включає в себе макроорганізм та різні за кількісним складом і таксономічною приналежністю асоціа-

ції бактерій, вірусів, грибів, найпростіших (мікробіота), а також їх метаболіти, сконцентровані у відносно відкритих біологічних системах організму людини (біотопах). Гетерогенні мікробіоценози, локалізовані в різних біотопах (ротова порожнина, стравохід, шлунок, тонка і товста кишка, носові ходи, піхва, шкіра, верхні і нижні дихальні шляхи, кон'юктива очей), пов'язані між собою і з мікроорганізмом-симбіонтом міцними генетичними, регуляторними і енергетичними зв'язками. Отже, організм людини та його природна мікрофлора – це єдина екологічна система, яка характеризується здатністю до саморегуляції та пов'язана складними механізмами безперервної взаємодії окремих компонентів всередині системи, а також цілісної системи з навколишнім середовищем.

Фізіологічна доцільність унікального симбіозу організму людини з природною мікрофлорою підтверджується високою концентрацією мікробних клітин у приепітеліальному біошарі, які, окрім виконання широкого спектра різноманітних функцій, постачають в результаті своєї життєдіяльності слизовим оболонкам велику кількість пластичного матеріалу, необхідну для оновлення приепітеліального шару з максимальною великою швидкістю. Це є важливим фактором, який забезпечує високу бар'єрну функцію епітеліального шару.

Нормальну мікрофлору, асоційовану зі слизовими оболонками і шкірою (приепітеліальну біологічно активну плівку), слід розглядати як інтегральну, життєво необхідну частину тіла людини, своєрідний мікробний, багатофункціональний, життєзабезпечуючий орган, який самостійно та в кооперації з іншими органами та системами виконує колосальну кількість фізіологічних функцій, які забезпечують гомеостатичний стан організму в цілому. Ця специфічна біологічна структура є центральним органом мікробної екологічної системи і має суттєвий вплив на структурно-функціональний стан внутрішніх органів, імунну систему і процеси регуляції всіх життєво важливих функцій.

Біоплівка є продуктом кооперативної діяльності фізіологічної мікрофлори і організму людини, насамперед, імунної системи. Вона складається із шару слизу, в який імпантовані численні мікроколонії мікроорганізмів, а також широкий спектр різноманітних продуктів обміну макроорганізму і його мікрофлори, ферменти, імуноглобуліни, імунні клітини та інші продукти імунної системи (рис. 4.1).

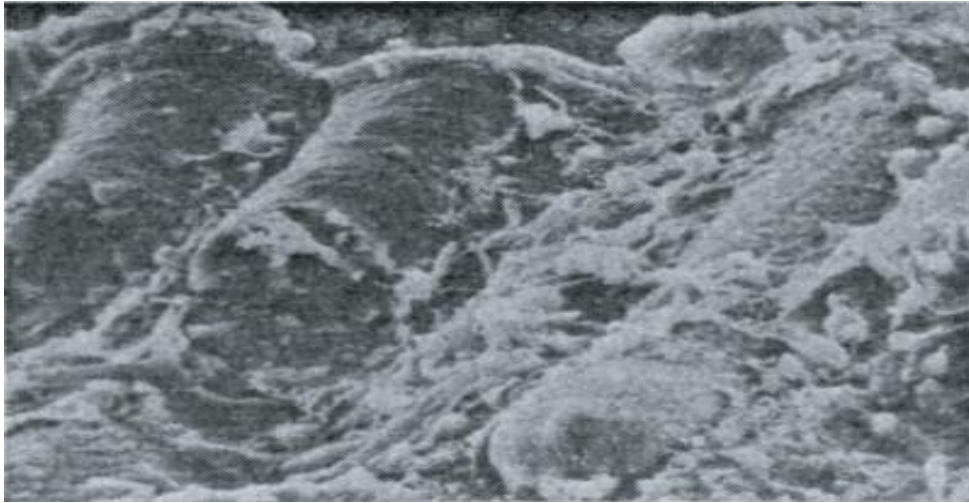


Рисунок 4.1 – Біоплівка на поверхні епітелію кишечника

У нормі біоплівка виконує велику кількість функцій (табл.4.1). Вона являє собою міцний біологічний бар'єр, специфічний «мікробний фільтр», який попереджає колонізацію епітелію патогенними та умовно патогенними мікроорганізмами і транслокацію їх клітин та токсинів у внутрішнє середовище організму. Крім того, біоплівка є важливою метаболічною системою, яка активно бере участь у синтезі та деградації великої кількості різноманітних біологічно активних речовин. Біоплівка здійснює регуляцію імунної відповіді на локальному та системному рівнях, сорбує і виводить з організму токсичні речовини, підтримує енергетичний і трофічний обмін слизових оболонок. Також вона є специфічним регулятором, який сприяє гармонійній взаємодії людини із власною мікрофлорою та навколишнім середовищем. Складний процес біоконструювання цього органа включається в дію з моменту народження дитини і оснований на кооперативній діяльності організму новонародженого, захисних та біфідогенних факторів грудного молока матері та її фізіологічної мікрофлори, транслокованої в організм дитини під час пологів. Роль сформованих у ранньому віці приепітеліальних біоплівок не втрачає свого значення протягом всього подальшого життя людини, сприяючи підтриманню гомеостазу організму в цілому і його мікроекологічного статусу зокрема. Значна антитоксична активність біоплівки дозволяє розглядати її як «другу печінку».

Таким чином, мікробна екологічна система є надзвичайно важливою системою організму людини.

Таблиця 4.1 – Фізіологічні функції нормальної мікрофлори

Функція	Механізм реалізації
Протиінфекційний захист (колонізаційна резистентність)	Антагоністична активність (синтез кислот, перекису водню, бактеріоцинів, лізоциму, конкуренція за поживні речовини та місця адгезії, висока швидкість росту популяції); противірусний захист; імуномодельюча активність
Біосинтетична	Синтез жирних кислот, амінокислот, вітамінів, пептидів, гормонів, екзополісахаридів, сигнальних молекул
Травна	Участь у метаболізмі вуглеводів, протеїнів, ліпідів, нуклеїнових кислот, холестерину; регуляція тонуусу м'язів та газового складу кишечника; регенерація епітеліальної тканини
Детоксикаційна	Інактивація та виведення отруйних сполук, розклад мутагенів, канцерогенів
Трофічна	Забезпечення епітелію субстратами глюконеогенезу та ліпогенезу
Енергетична	Участь у забезпеченні еукаріотичних клітин енергією
Фізико-хімічна	Підтримання в приепітеліальній зоні оптимальних значень рН, редокс-потенціалу, іонного складу, густини глікокаліксу
Процесінг харчових продуктів	Забезпечення первинної імунологічної толерантності до харчових антигенів
Терморегуляційна	Підтримання у біотопі оптимальної температури
Регуляторна	Регуляція рециркуляції жовчних кислот та інших макромолекул; регуляція поведінкових реакцій, а саме апетиту, сну, настрою; регуляція реплікації та фенотипічної експресії генів прокаріотичних та еукаріотичних клітин; регуляція апоптозу
Генетична	Збереження мікробного генетичного матеріалу

Біфідобактерії та лактобацили займають провідне місце у складі мікробної екологічної системи людини, підтримуючи баланс і стабілізуючи гомеостаз

за рахунок надійного закріплення на слизовій оболонці кишечника, визначаючи основні ніші співіснування для інших мікроорганізмів. Завдяки своїм адгезивним властивостям, пробіотичні штами бактерій не дають можливості колонізувати слизові оболонки патогенним та умовно-патогенним мікроорганізмам. Тому пробіотичні штами отримують селективну перевагу у порівнянні з менш пристосованими бактеріями. Біфідо- та лактобактерії є мукозасоційованими мікроорганізмами, що відіграє важливу роль для феномену колонізаційної резистентності кишечника.

Мікроорганізми кишечника прикріплюються до епітелію слизової оболонки за допомогою адгезинів (лігандів) – це біополімери, які складаються з унікальних для кожного виду субодиниць білкового, гліколіпідного або глікопротеїнового походження. Вони можуть бути лектинами і вибірково зв'язуватись з вуглеводневими детермінантами глікопротеїнів і гліколіпідів, при цьому кожному лектину відповідає певний вуглеводневий залишок. Це приблизно можна порівняти із взаємодією у системі антиген – антитіло.

Біологічна плівка, яка утворюється і має негативний заряд, виконує бар'єрну роль, захищає рецептори слизової та підслизової оболонок від проникнення катіонів, деяких антибіотиків, патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Вона захищає не тільки слизову оболонку, а й автохтонні бактерії від дії антибіотиків і антитіл.

Отже, антагоністичні властивості біфідобактерій та лактобацил з їх здатністю колонізувати епітелій ШКТ, закріплюючись на його ворсинках, є основою для застосування цих мікроорганізмів у лікуванні дисбактеріозів, гастритів, виразок ШКТ.

Обидва види бактерій продукують молочну та оцтову кислоти, тим самим визначаючи стан кислотності кишечника та проявляючи пряму цитотоксичну дію відносно патогенних штамів. Сприятливі умови для організму людини створюються при оптимальних кількісних та якісних взаємовідносинах мікроорганізмів. Дія кислот доповнюється і посилюється за рахунок зміщення загального рівня кислотності кишечника, оскільки низький рівень рН забезпечує існування недисоційованих форм кислот, які більш ефективно розчиняють клітинні структури, ніж дисоційовані кислоти.

Вагомими локальними та системними ефектами кишкової мікрофлори організму людини є трофічна та енергетична функції – теплове забезпечення організму, енергозабезпечення епітелію. Регулювання перистальтики кишечника, підтримання іонного гомеостазу, виведення екзогенних і ендогенних субстратів з організму, утворення сигнальних молекул, у тому числі нейротрансмітерів, стимуляція імунної системи, місцевого імунітету, утворення нормальних імунoglobulinів, забезпечення цитопротекції і колонізаційної резистентності епітеліальних клітин до мутагенів, зниження росту патогенів та адгезія їх до епітелію, підтримання фізико-хімічних параметрів гомеостазу приепітеліальної зони, поставка субстратів глюконеогенезу і ліпогенезу, участь у протипухлинному процесі, синтез і доставка вітамінів організму забезпечують травна, синтетична і захисна функції нормальної мікрофлори кишечника.

4.2. Засоби профілактики мікроекологічних порушень на фармацевтичному ринку України

Виходячи із великого переліку функцій, які виконує нормальна мікрофлора людини, є природним зростаючий інтерес до питань профілактики порушень її нормального функціонування, оскільки підтримання на фізіологічному рівні нормальної мікрофлори попереджає розвиток дисбіозів та багатьох інших захворювань.

Найефективнішим методом профілактики мікроекологічних порушень у дітей і дорослих є використання засобів мікробіологічної терапії на основі життєдіяльних клітин фізіологічних представників мікрофлори людини.

Успішне впровадження цього напрямку в практику профілактичної медицини вимагає значного вдосконалення існуючих препаратів і схем їх застосування. Постійне зростання факторів, які негативно впливають на мікробний статус людини, потребує розробки нових поколінь ефективних пробіотиків, які відрізняються широким спектром біоценозкоригуючих властивостей при максимальній безпечності для організму людини.

В наш час на фармацевтичному ринку для корекції порушень нормального функціонування мікрофлори пропонують пробіотичні препарати, пребіотики та пробіотичні продукти.

Пробіотики – біотехнологічні препарати, що містять живі мікроорганізми, які належать до нормальної фізіологічно та еволюційно обґрунтованої флори ШКТ.

Пробіотики представлені п'ятьма поколіннями:

I покоління – монокомпонентні препарати. Містять один штам бактерій (біфідобактерій, лактобактерій, колибактерій, аерококів та ін.);

II покоління – антагоністи, що самостійно елімінуються з організму. Складаються зі спорових бацил та дріжджеподібних грибів;

III покоління – комбіновані препарати. Містять кілька штамів бактерій. Бактерії, що входять до його складу, можуть належати до одного або різних видів та посилюють дію один одного;

IV покоління – синбіотики – комбінація пробіотичного і пребіотичного компонента;

V покоління – рекомбінантні або генно-інженерні пробіотики створені на основі генно-інженерних штамів мікроорганізмів, їх структурних компонентів та метаболітів, мають задані характеристики.

На фармацевтичному ринку України пробіотики представлені доволі широко. Проведений аналіз асортименту лікарських засобів досліджуваної групи показав, що переважно це препарати, які містять біфідо-, коли- та лактобактерії, дріжджі.

До Державного реєстру лікарських засобів України включено 30 пробіотиків.

Таблиця 4.2 – Перелік препаратів пробіотиків, зареєстрованих в Україні

Покоління пробіотиків	Назва препарату	Склад препарату	Форма випуску	Виробник
1	2	3	4	5
Монокомпонентні	Лактобактерин	Лактобактерії роду <i>L.plantarum</i> або <i>L.fermentum</i> не менше $2 \cdot 10^9$ КУО/дозу	Флакони з ліофілізатом №10; 2, 3 або 5 доз	ПрАТ «Біофарма», Україна
	Біфідумбактерин-Біофарма	Біфідобактерії роду <i>B.bifidum</i> №1 не менше 10^7 КУО/дозу	Флакони з ліофілізатом, №10; 5 або 10 доз	ПрАТ «Біофарма», Україна

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4	5
Полікомпонентні	Пробіокід	<i>L.helveticus</i> R0052, <i>B.infantis</i> R0033, <i>B.bifidum</i> R0071 не менше 3 млрд КУО, фруктоолігосахариди (ФОС) 750 мг	Саше №10	Lallemand S.A.S., Франція
	Лінекс	<i>L.acidophilus</i> не менше $4,5 \cdot 10^6$ КУО/дозу, <i>Enterococcus faecium</i> , не менше $4,5 \cdot 10^6$ КУО/дозу, <i>B.infantis</i> , не менше $3,0 \cdot 10^6$ КУО/дозу	Капсули тверді № 32	ЗАО «Sandoz», Словенія
Комбіновані (симбіотики)	Лактовіт форте	<i>L.sporogenes</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , не менше $1,2 \cdot 10^8$ КУО/дозу, вітамін В ₁₂ 15 мкг, фолієва кислота 1,5 мг	Капсули № 0	Mili Healthcare Limited, Велика Британія
	Лацидофіл	<i>L.acidophilus</i> не менше 10^7 КУО/дозу, <i>L.rhamnosus</i> , не менше $1,9 \cdot 10^9$ КУО/дозу, аскорбінова кислота	Капсули № 0	Institut Rosell, Канада
Рекомбінантні	Хілак	Містить водний субстрат продуктів обміну речовин <i>L.helveticus</i> 4183, <i>L. acidophilus</i> 4149, <i>Ent. faecalis</i> , <i>E.coli</i> .	Краплі оральні, розчин по 30 мл у флаконах №1	Merckle, Німеччина
	Ентерожерміна	Містить спори <i>Bacillus clausie</i> не менше $2 \cdot 10^9$	Оральна суспензія по 5 мл у флаконах № 10	SanofiAventis S.P.A., Італія

Аналіз речовин (пребіотиків), що здатні стимулювати ріст нормальної мікрофлори, привів до класифікації пребіотичних компонентів на такі групи:

- 1) моносахариди і спирти (ксилоза, ксилобіоза, рафіноза, сорбіт);
- 2) олігосахариди (лактоза, фруктоолігосахариди, галактоолігосахариди, ксилоолігосахариди);
- 3) полісахариди (пектини, декстрин, інουλін); ферменти (β -галактозидаза мікробного походження, протеази сахароміцетів); пептиди (соеві, молочні);
- 4) антиоксиданти (вітаміни групи В, вітамін Е, аскорбінова кислота).

Речовини, які належать до пребіотиків, повинні мати дві важливі властивості: не перетравлюватися у верхніх відділах травного каналу; селективно фер-

ментувати мікрофлору товстої кишки, викликаючи активний ріст корисних мікроорганізмів, насамперед, біфідобактерій та лактобацил.

Пребіотичну дію мають полісахариди рослин: наприклад, інулін (полімер фруктози), який міститься у коренях цикорію, плодах топінамбуру; рафіноза – міститься у квасолі та гороху.

Серед препаратів пребіотиків, зареєстрованих на території України, виділяють: Дуфалак, лактулоза (Solvay Pharma); Лактувіт, лактулоза (Юрія-фарм); Нормазе, лактулоза (Moltenis); Лактулак, лактулоза (Genom Biotech) та ін.

Ці препарати стимулюють ріст та метаболічну активність однієї чи кількох груп мікроорганізмів облігатної мікрофлори товстого кишечника. Під впливом цих препаратів знижується рН, відбуваються осмотичні зміни, які стимулюють перистальтику товстого кишечника і нормалізують консистенцію калових мас. Відбувається пригнічення росту протеолітичних бактерій за рахунок збільшення кількості ацидофільних бактерій, завдяки чому зменшується утворення аміаку та інших токсинів.

Серед пребіотиків на ринку України лактулоза має найвищий пребіотичний індекс та вважається золотим еталоном у класі препаратів-пребіотиків. Це пов'язано з її властивостями:

1) при щоденному вживанні з молоком 3 г лактулози протягом двох тижнів вміст біфідобактерій у мікрофлорі кишечника збільшується з 8,3 % до 47,4 %, а кількість клостридій значно зменшується;

2) значно знижує вміст токсичних метаболітів (аміак, скатол, індол) і ферментів (β -глюкоронідази, нітроредуктази, азоредуктази);

3) знижує абсорбцію кальцію, тому є одним із методів профілактики остеопорозу;

4) стимулює перистальтику кишечника, підвищує вміст води у товстій кишці і осмотичний тиск;

5) знижує секрецію жовчі у просвіт тонкої кишки;

б) має антиканцерогенну дію, пов'язану з активацією імунної системи клітинами біфідобактерій, компонентами клітинних стінок.

4.3. Клінічне застосування пробіотичних препаратів

Пробіотичні препарати, зареєстровані на фармацевтичному ринку України, належать до фармакотерапевтичної групи A07FA – антидіарейні мікробні препарати. Основний фармакотерапевтичний ефект визначають живі пробіотичні бактерії, які мають антагоністичну активність проти широкого спектра патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів; нормалізують діяльність ШКТ, поліпшують обмінні процеси, стимулюють функціональну діяльність травної системи, попереджають розвиток затяжних форм кишкових захворювань, підвищують неспецифічну резистентність організму, утворюють сприятливі умови для розвитку корисної мікрофлори кишечника.

Найбільш широко в клінічній практиці застосовують пробіотичні препарати на основі штамів біфідобактерій і лактобацил. Зазначені препарати застосовують *per os* і показані при:

- ✓ хронічних колітах різної етіології, зокрема неспецифічних виразкових колітах, соматичних захворюваннях, ускладнених дисбактеріозами;
- ✓ гострих кишкових інфекціях (дизентерія, сальмонельоз, ешерихіоз, вірусні діареї та ін.);
- ✓ в акушерсько-гінекологічній практиці для санації статевих шляхів при неспецифічних запальних захворюваннях геніталій та передпологовій підготовці вагітних групи "ризик" із порушенням чистоти вагінного секрету;
- ✓ лікуванні та профілактиці у дорослих і дітей з перших днів життя дисбіозу кишечника, що виникає внаслідок антибактеріальної, гормональної, променевої та інших видів терапії;
- ✓ лікуванні дисбіозів і запальних захворювань жіночої статевої сфери (бактеріальних вагінозів, у тому числі у вагітних, бактеріальних кольпітів, викликаних стафілококом та кишковою паличкою, сенільних кольпітів гормональної природи).

Слід зазначити, що препарати на основі пробіотичних штамів біфідобактерій і лактобацил застосовуються у неонатології, з метою нормалізації мікробіологічного фону ШКТ новонароджених.

Побічні реакції при застосуванні препаратів можливі за умови реакції гіперчутливості до компонентів препарату.

Для отримання препаратів, що містять пробіотики, необхідно здійснити кілька етапів:

- 1) провести відбір штамів пробіотиків і охарактеризувати культури;
- 2) визначити оптимальний склад збалансованих поживних середовищ для вирощування необхідних штамів мікроорганізмів;
- 3) розробити біотехнологічні основи отримання препаратів пробіотиків;
- 4) розробити методи контролю продукту на всіх стадіях виробництва і готового препарату;
- 5) вивчити стабільність лікарського препарату, що містить пробіотичні штами, і встановити термін придатності.

У літературі досить добре розглянуто перелік фізіологічних функцій корисних бактерій, які вони виконують в організмі людини та зазвичай використовуються при створенні нових видів пробіотиків. Нижче наведено узагальнені дані літератури щодо оцінки потенціалу пробіотичних штамів переважно *in vitro* (критерії відбору пробіотичних культур):

- 1) активне вибіркоче пригнічення росту патогенних культур мікроорганізмів. Штами у складі комплексних біопрепаратів повинні випробовуватись на симбіотичність з визначенням характеру бактеріоциноспосередкованих конкурентних взаємодій між ними *in vitro* та *in vivo* і характеризуватись взаємодоповнюючим спектром антагоністичної дії щодо широкого спектра патогенних мікроорганізмів. Вирізняється ще одна ознака, пов'язана із антагоністичним потенціалом молочнокислих бактерій, – вплив на фактори вірулентності та персистенції бактеріальної флори, а саме – антилізоцимну та антикомплементарну активність ентеробактерій;

- 2) цитоадгезивні властивості та колонізуюча здатність;

- 3) висока стійкість до несприятливих умов зовнішнього середовища (стійкість до жовчі, фенолу, шлункового соку, протеолітичних ферментів, лізоциму, хлориду натрію, високих значень рН) опосередковано свідчить про здатність штамів приживлюватись у кишечнику;

- 4) висока синтетична активність, зокрема продукція антимікробних речовин, холестеринемічна активність. Наявність ферментативної активності пов'язана зі здатністю пробіотичних мікроорганізмів активно засвоювати широкий спектр нутрієнтів (для оральних пробіотиків);

5) нешкідливість для макроорганізму і аутомікрофлори в цілому, що включає: генетичну віддаленість від патогенних бактерій, відсутність жодного фактора патогенності (вірулентність, токсичність, токсигенність), відсутність вираженої здатності до транслокації з кишечника у внутрішні органи, неінвазивність;

б) стимуляція специфічних та неспецифічних механізмів резистентності макроорганізму, антимутагенність, антиканцерогенність;

7) антибіотикостійкість;

8) генетична стабільність;

9) технологічність – висока швидкість росту, використання для життєдіяльності дешевих нехарчових субстратів, стійкість до забруднення сторонньою мікрофлорою; збереження властивостей під час виробництва, в готовому препараті;

10) походження продуценту пробіотику. Бажано, щоб продуцент був виділений з нормальної флори жителів тієї території, де буде застосовуватись препарат.

4.4. Характеристика пробіотичних штамів

На сьогоднішній день у різних країнах створено велику кількість біологічно активних добавок і лікарських препаратів, основу яких становлять культури представників нормальної мікрофлори людини. Як правило, використовуються різні штами біфідо- та лактобактерій, непатогенні штами кишкової палички та ентерококів.

Найвідоміші мікроорганізми, що використовуються як основа біопрепаратів – лактобацили. Відомо про використання *Lactobacillus plantarum*, *L. fennentum*, *L. casei*, *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. reuleri*, *L. lactis* для виробництва пробіотиків.

Біфідобактерії – інша група мікроорганізмів, на основі якої базуються багато пробіотиків. Застосовують *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. thermophilus*.

Кишкові палички почали вживати як основу біопрепаратів ще з 1918 року в складі Мутафлору. Для розробки пробіотиків, що містять кишкову паличку використовують штам *E. coli* M-17.

Для розробки пробіотиків використовують й інші мікроорганізми, що належать до роду *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. Найчастіше вони входять до складу заквасок для одержання ферментованих кисломолочних продуктів із пробіотичними властивостями (йогурти, м'які та тверді сири, кисляк тощо). Дотепер основою для виробництва йогурту є штам *S. salivarius* subsp. *termophilus*. До складу пробіотиків входять *Streptococcus faecium*, *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *S. intermedius*.

Повідомляють також про застосування дріжджів для виробництва пробіотиків. Препарат, до складу якого входили *Saccharomyces boulardii*, виявився ефективним при лікуванні кишкових інфекцій, зумовлених *Clostridium difficile*. Виражений клінічний ефект отримано також при використанні *Saccharomyces cerevisiae*.

В останні роки спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* як найяскравіші представники екзогенної мікрофлори привертають увагу дослідників. Досить великий арсенал видів цього роду випробували як терапевтичні засоби при лікуванні гострих і хронічних інфекцій: *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. laterosporus* тощо. Однак найповніше вивчені види *B. subtilis* і *B. licheniformis*.

4.4.1. Біфідобактерії

Біфідобактерії (ББ) становлять основу мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини. В наш час рід *Bifidobacterium* включає 32 види. Видовий склад біфідофлори визначається характером харчування. Найважливіше значення для ШКТ людини відіграють *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* та *B. adolescentis*. На сьогодні відкрито також нові різновиди – *B. lactis*, *B. inopinatum*, *B. denticolens*. Елімінація чи значне зниження їх кількості в ШКТ ведуть до глибоких порушень процесів травлення і всіх видів обміну. На фоні дефіциту біфідофлори найактивніше проявляється патогенна дія стафілококу,

протеїв, грибів роду *Candida*. ББ являють собою поліморфні палички з біфуркаціями на одному чи двох кінцях, які розташовуються у вигляді скупчень або окремих клітин, парами, ланцюгами, полісадом чи разетками. Нерухомі, спор не утворюють. Грампозитивні, забарвлення часто нерівномірне. Ці палички досить варіабельні. На ранніх стадіях розвитку в популяції спостерігаються переважно паличкоподібні клітини довжиною до 8 мкм, товщиною в середньому 0,4–0,5 мкм. Клітинна стінка однорідної густини, товщиною 16 нм, іноді зустрічаються ділянки нерівномірної товщини. Цитоплазматична мембрана має структуру з трьох шарів сумарною товщиною 9 нм. Розмноження відбувається шляхом формування поперечних перегородок. На рівні сформованої септи в поперечній перегородці клітинна стінка товща від бічної. Поступово в культурах з'являється сильно виражений поліморфізм бактеріальних клітин. Розмноження може відбуватися одночасно чи послідовно на деяких ділянках тіла однієї клітини чи її відростків, внаслідок чого утворюються ланцюги клітин нерівномірної довжини без ознак відокремлення особин, що входять у їх склад.

У пізніший термін культивування в популяціях переважають ланцюги чи конгломерати клітин, частина з подвоєними кінцями, які продовжують рости в довжину. Ці особливості морфології ББ можна вважати реакцією на умови середовища, в якому вони мешкають, що виявляється на клітинному і популяційному рівнях.

В 0,72 %-му печінковому і гідролізатно-молочному агарах ББ утворюють колонії у вигляді зерна гречки чи у вигляді дисків розміром до 3 мм у діаметрі. В рідких поживних середовищах ББ ростуть по всій висоті об'єму, крім зони аеробіозу. Пігмента не утворює. Деякі види можуть рости в атмосфері повітря, збагаченого 10 % CO₂. Не ростуть при рН < 4,5 чи > 8,5. Здатні рости при температурі від 20 °С до 45 °С, однак оптимальною є температура 38 °С. Вважаються непатогенними.

ББ мають ряд особливостей в енергетичному обміні, потребі в ростових факторах. Являючись анаеробами, вони можуть почати ріст лише у відсутності кисню і при достатньо низькому окисно-відновному потенціалу середовища. В тонкому відділі кишечника через низький рН і достатньо високий рівень кисню можливий лише незначний ріст мікроорганізмів. Вже в процесі формування захисних біоплівки відбувається більш стабільне розселення мікрофлори по спе-

цифічних для них локусах. ББ, як найбільш строгі анаероби, колонізують найближчу до епітелію зону, де завжди підтримується від'ємний окисно-відновний потенціал (причому не лише в товстій кишці, а й в інших, більш аеробних біотопах організму: в ротоглотці, піхві, на шкіряних покривах). Хемоорганотрофи. Активно зброджують вуглеводи з утворенням оцтової і молочної кислоти. Потребують вітаміни. Газоутворююча властивість, каталазоутворююча властивість, здатність розрідження желатину відсутні.

ББ стійкі до кананіцину, мономіцину. Чутливі до антибіотиків пеніцилінового ряду, гентаміцину.

ББ проявляють антагоністичну активність по відношенню до *Sh. sonnei*, *Sh. Flexneri*, ентеропатогенних кишечних паличок, стафілококів.

ББ недостатньо стійкі до шкідливих факторів середовища культивування і агресивних середовищ гастроінтестинального тракту (кислоти, протеолітичні ферменти).

Позитивний вплив біфідофлори на фізіологічні функції організму дітей і дорослих пов'язують з продукцією нею молочної та оцтової кислоти, які створюють в кишечнику кислу реакцію, що попереджає розмноженню патогенної, гнилісної та газоутворюючої мікрофлори. ББ здатні виділяти бактеріоцини (біфідин та біфілонг), які проявляють антимікробну активність по відношенню до багатьох видів ентеробактерій, вібріонів, стрептококів та стафілококів.

Існують дані, що ББ є постачальниками низки незамінних амінокислот, вітамінів, встановлена їх антиканцерогенна та антимутагенна активність, здатність знижувати рівень холестерину в крові. Кислоти, які продукують ББ, бактеріоцини попереджають проникнення мікробів у верхні відділи ШКТ та сприяють формуванню неспецифічної резистентності. Виражена протективна активність ББ обумовлена їх високою адгезивністю до слизової товстого кишечника.

Також слід зазначити, що *B. infantis* та *B. adolescentis* знижують утворення в кишечнику метаболітів (нітритів, нітрозамінів, крезолу, індолу, аміаку), які мають канцерогенний потенціал, а також нормалізують обмін стероїдних гормонів.

ББ мають протективну дію на синтез IgA та гальмують деградацію секреторного IgA в кишечнику, посилюють фагоцитоз, нормалізують співвідно-

шення CD4/CD8, підвищують утворення інтерлейкінів (IL-6, IL-1b), підвищують продукцію g-інтерферону.

Фізіологічне значення ББ суттєво доповнюють дані про те, що вони сприяють кращому засвоєнню солей кальцію, вітаміна D, заліза, отже, мають антирахітичні та антианемічні властивості.

4.4.2. Лактобацили

Морфолого-цитологічні ознаки. Лактобацили (ЛБ) – безспорові, грам-позитивні паличкоподібні бактерії, зазвичай правильної форми, з розмірами (0,5–1,2) – (1,0–10,0) мкм. Як правило, палички довгі, але інколи можуть бути майже кокоподібної форми, у вигляді коротких ланцюгів. Грампозитивні, спор не утворюють; у рідких випадках рухомі за рахунок перитрихіальних джгутиків. Клітинна стінка являє собою гомогенний електронно-міцний шар товщиною 15–60 мкм. Розмножуються шляхом розділення клітин, іноді перешнуровуванням.

ЛБ – факультативні анаероби, іноді мікроаерофіли. Слабко ростуть на повітрі, краще при зниженому вмісті кисню; деякі при виділенні анаероби. Ріст звичайно стимулюють додаванням 5 % CO₂. Колонії на агаризованих середовищах мають діаметр 2–5 мм, випуклі, з цільними краями, непрозорі, не пігментовані. Хемоорганотрофи; потребують багатих складних поживних середовищ. Метаболізм бродильного типу, цукропластичний; майже половина вуглецю кінцевих продуктів бродіння випадає на лактат. Нітрати не відновлюють; желатин не розріджують; каталазонегативні; цитохромів не містять. Вирощування ЛБ проводять на середовищах МРС (молочне ростове середовище) та КД-5 (казеїново-дріжджове). Оптимальна температура росту ЛБ 37 °С. Показники кислотності середовища для штамів роду ЛБ відрізняються і знаходяться у межах 5,5–7,0.

Найважливішим джерелом енергії є моно- та дисахариди, органічні кислоти в концентрації 30–50 мкг/мл. Із жирних кислот ріст ЛБ стимулюють олеїнова, лінолева та ліноленова кислоти. Для нормального росту необхідними є ряд амінокислот: аргінін, цистеїн, глютамінова кислота, лейцин, фенілаланін, триптофан, тирозин, валін; вітаміни: пантотенова, нікотинова кислоти, біотин,

тіамін; сполуки міді, заліза, натрію, калію, фосфору, йоду, сірки, магнію та марганцю.

На основі продукції вуглекислоти із глюкози, необхідності у тіаміні, ферментації фруктози до маніту та продукції фруктозодифосфатаальдолази ЛБ поділяють на дві групи: гомо- та гетероферментативні. В наш час ЛБ поділяють на три філогенетичні групи: *L.delbrueckii*, *L.casei-Pediococcus*, *Leuconostos*. Рід *Lactobacillus* поєднує 56 видів і 11 родів.

ЛБ мають високу адгезію до слизових оболонок, що сприяє утворенню поверхневого захисного біошару, завдяки чому вони особливо важливі при патології ШКТ та уrogenетального тракту. Встановлено, що деякі види ЛБ знижують ризик утворення каменів у нирках завдяки оксалатмодифікуючій активності.

У процесі метаболізму ЛБ продукують органічні кислоти (головним чином молочну), перекиси, антибіотики та бактеріоцини. Утворення цих компонентів розцінюється як критерій антагоністичної активності ЛБ, що забезпечує їх антибактеріальний ефект по відношенню до представників патогенної та умовно-патогенної флори. Визначено участь ЛБ у протівірусному імунітеті, зокрема, при реалізації захисту від гепатотропних вірусів. Встановлено, що ЛБ можуть діяти як ад'юванти гуморальної імунної відповіді у людей та експериментальних тварин. Доведено безпосередню активізуючу дію ЛБ на Т-кілери та В-лімфоцити. Наведені дані, що ЛБ мають виражену здатність попереджати загострення виразкового коліту, мати виражений терапевтичний ефект при діарей новонароджених різної патології. Встановлений факт вираженого впливу *L.acidophilus* на імунну систему організму шляхом стимуляції міграції моноцитів, активації фагоцитарної активності. Імуностимулююча дія ЛБ пов'язана з присутністю в їх клітинній стінці пептидогліканів та тейхових кислот, з утворенням аргініну та окису азоту, а також попередженням адгезії сторонніх мікроорганізмів і утворення ними ендотоксину. В наш час ацидофільні ЛБ використовують або в монокультурі, або в комплексі з різними видами ББ у складі біологічно активних препаратів, харчових добавок та кисломолочних продуктів. ЛБ широко розповсюджені у навколишньому середовищі, особливо часто зустрічаються у харчових продуктах тваринного і рослинного походження. ЛБ знайдені протягом всього ШКТ, а також є основною мікрофлорою

пологових шляхів. Входять до складу нормальної мікрофлори ШКТ у птиць та ссавців. Не патогенні. Встановлено, що природним середовищем існування молочнокислих бактерій є ґрунт та ризосфера рослин.

4.4.3. *E.Coli*

До складу ряду препаратів входять бактерії роду *E. Coli*, зокрема штам *E. Coli M17*. Штам являє собою грамнегативну паличку довжиною 1,5-4 мкм, шириною 0,3-0,8 мкм, зі злегка закругленими кінцями. Галактозу, лактозу, маніт, глюкозу ферментує з утворенням кислоти і газу. Штам *E. Coli M17* на відміну від інших штамів *E. Coli* ферментує сахарозу, що використовується як відмінна ознака штаму при визначенні ступеня приживлення його в кишечнику. Штам є гетеротрофним факультативним аеробом, в умовах аерації активно дезамінує амінокислоти і здатний до переходу від бродіння до дихання, з активацією енергозабезпечення культури. Оптимальна температура росту 37 ± 1 °С. Препарати пробіотиків на основі штамів *E.Coli* (Біфікол, Колібактерин та ін.) відомі в медичній практиці.

4.4.4. *Bacillus*

Перспективним напрямком розробки нових біопрепаратів є використання бактерій роду *Bacillus*. Ці бактерії завдяки високим адаптаційним можливостям широко розповсюджені в природі, зокрема, в тих об'єктах, з якими людина контактує найчастіше (харчові продукти, вода, повітря та ін.). Завдяки цьому бацили постійно і в значних кількостях надходять до організму людини, і оскільки є стійкими до літичних і травних ферментів, зберігають свою життєздатність у всьому кишково-шлунковому тракті. Таким чином, аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* є одним із найважливіших компонентів екзогенної мікрофлори людини. Серед інших представників екзогенної мікрофлори бацили мають ряд переваг, що дозволяють їх використання для створення біопрепаратів, а саме: бацили (крім *B. anthracis* і *B. cereus*) нешкідливі для організму людини і тварин; ряд штамів мають високу анатогоністичну активність; характеризуються високою ферментативною активністю в процесах травлення; стабі-

льні при зберіганні; безпечні для довкілля. Здатність спороутворюючих бактерій проявляти пробіотичну дію привело до розробки на їх основі препаратів, віднесених до покоління «самоелімінуючихся антагоністів». Сьогодні у світі створено понад 50 лікувальних препаратів, які повністю або частково складаються із бацил. Біопрепарати на основі бактерій роду *Bacillus* – Біоспорин (Україна, Росія), Споробактерин (Росія) – *B. subtilis*, Бактиспорин (Росія) – *B. subtilis*, Ентерогермін (Італія) – *B. subtilis*, Бактисубтил (Франція) – *B. cereus* IP 5832, Лакбон (Японія) – *B. coagulans*, Флора-баланс (США) – *Brevibacillus laterosporus*, Натуріс (США) – із 42 штамів у тому числі: *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. pumilis*, *Br. Laterosporus*.

4.4.5. Пропіоновокислі бактерії

Незважаючи на переконливі дані, що свідчать про постійну присутність пропіоновокислих бактерій (ПКБ) в різних біотопах людини, досліджень, які присвячені фізіологічній значущості даної групи прокариот, як одного з найважливіших компонентів облігатної мікробіоти, значно менше, ніж аналогічних досліджень щодо ЛБ і ББ. ПКБ – грампозитивні, не утворюють спор, нерухомі, факультативно-анаеробні або аеротолерантні паличкоподібні бактерії від 0,5 мкм до 1,5 мкм. Зазвичай плеоморфні, дифтероїдні або булавоподібні палички з одним закругленим, іншим конусоподібним або загостреним кінцем. Клітини в молодих культурах – викривлені, злегка зігнуті палички, в старших – кокоподібної форми. У травному тракті здорових дорослих людей ПКБ присутні в кількості не менше 10^5 КУО/г фекалій.

У теперішній час достатньо даних, які свідчать про наявність пробіотичних властивостей у ПКБ. ПКБ стійкі до дії жовчних кислот і витримують низьку кислотність шлунка (рН 2,0). Класичні ПКБ здатні до біосинтезу нутрицевтиків (вітамінів В₂, В₇, В₉, В₁₂, К, кон'югованої ліноленової кислоти). Оздоровчі ефекти можуть бути пов'язані із впливом на склад кишкової мікробіоти, за винятком патогенів, модуляцією метабіотичної активності мікробіоти і хазяїна, імуномодуляцією. Основним продуктом життєдіяльності ПКБ є пропіонова кислота. Біосинтез пропіонової кислоти цими бактеріями включає в себе складний метаболічний цикл з кількома реакціями, в яких субстрати метаболізуються

до пірувату за гліколітичним шляхом, генеруючи АТФ і відновлені кофери-менти. Потім піруват декарбоксилюється до ацетату і CO_2 або до пропіонату. Вітамін B_{12} є незвичайним щодо свого походження. Практично всі вітаміни можуть бути виділені з різноманітних рослин або тварин, але жодна рослина чи тварина не здатна виробляти вітамін B_{12} . Джерелом цього вітаміну, за сучасними даними, є ПКБ. Біосинтез вітаміну B_{12} відбувається паралельно накопиченню їх біомаси. На синтез вітаміну сприятливо впливає наявність молочної кислоти, створюючи елективність умов. У той же час ПКБ значно стимулюють ріст біфідобактерій, оскільки є продуцентами ростових біфідогенних стимуляторів (РБС), що мають виражені пребіотичні ефекти. Дослідження показало, що концентрація РБС коливається в межах від 0,1 до 1 мкг/л. Такі штами ПКБ як *P. freudenreichii* ET-3, *P. shermanii* PZ-3, *P. acidipropionici* JCM 6432, *Propionibacterium jensenii* JCM 6433, продукують РБС в кількості 4–23 мг/л в анаеробних умовах культивування. Показано, що фільтрат культурального середовища ПКБ має виражений селективний стимулюючий ефект щодо зростання біфідобактерій. На відміну від пребіотиків вуглеводної природи, біфідогенний ефект яких пов'язаний зі стимуляцією росту пребіотичних мікроорганізмів шляхом збагачення живильного середовища джерелом вуглецю.

Представники класичних видів ПКБ утворюють ряд білкових бактеріоцинів. Види *P. thoenii* і *P. jensenii* утворюють термостійкі білки, які інгібують ряд грамнегативних і грампозитивних бактерій, дріжджів та цвілі. Експериментальні та клінічні випробування препаратів на основі ПКБ показали імуномодулюючу, антивірусну активність в клінічних дослідженнях, що пов'язують з активацією моноцит-макрофагової системи, індукцією синтезу інтерферону і активацією кілерних клітин. ПКБ відомі вираженою антимуутагенною дією. Метаболіти ПКБ підвищують активність ферментних систем, що беруть участь в детоксикації речовин, які надходять в клітину. Впливаючи на окисно-відновний потенціал організму, ці процеси приводять до зниження кількості мутацій. Важливу роль в організмі відіграють антиоксидантні ферменти, синтезовані ПКБ: супероксиддисмутаза і каталаза, що інактивують вільні радикали кисню, не даючи їм можливості запуснути ланцюгові процеси окислення, а глутатіонпероксидаза знешкоджує ліпідні перекиси.

Таким чином, пропіоновокислі бактерії та їхні метаболіти служать важливим фактором у підтримці балансу мікробної екосистеми людини, тому актуальною є розробка пробіотичних препаратів нового покоління з включенням ПКБ.

4.4.6. Рекombінантні штами пробіотиків

Вельми перспективним напрямком біотехнологічних досліджень є створення рекombінантних препаратів на основі пробіотиків. Після того як було встановлено, що ряд бактерій здатні виявляти пробіотичні властивості і позитивно впливати на здоров'я людини, почалося використання технології рекombінантних ДНК з метою отримання генетично змінених штамів і створення пробіотичних або виробничих культур із заданими унікальними властивостями.

Безсумнівний інтерес становить один з перших рекombінантних пробіотиків, розроблених фахівцями України та Росії, – Субалін. Запропоновано препарат, який, крім високої антагоністичної активності відносно патогенних і умовно-патогенних бактерій, проявляв антивірусну активність завдяки введенню генетичної інформації, яка кодує продукцію антивірусної субстанції – альфа-2-інтерферону. Для цього було відібрано декілька штамів *B.subtilis*. Трансформацію відібраних бактеріальних культур проводили плазмідами рВМВ, які кодують синтез секреторного (рВМВ 105) і внутрішньоклітинного (рВМВ 104) інтерферону. Зазначені плазміди містять ген інтерферону у вигляді хімічно-синтезованого аналога гена людського лейкоцитарного альфа-2-інтерферону. У структурі плазміди рВМВ 105 ген інтерферону пов'язаний з «геном» сигнального пептиду, гомологічного послідовності гена альфа-амілази, який забезпечує ефективну секрецію з клітин гетерологічного білку. Плазмида рВМВ 104 не має в своїй структурі такої послідовності нуклеотидів перед геном інтерферону, у зв'язку з чим продукований білок залишається всередині клітини. При вивченні стабільності плазмід у різних штаммах бацил встановлено, що максимальною стабільністю характеризується плазмида рВМВ 105 в штамі *B.subtilis* 3. Навіть через 10 пасажів виявлялося 100 % збереження плазміди. На різних експериментальних інфекціях тварин вивчена і підтверджена ефективність і безпечність препарату Субалін при пероральному введенні. Інтерферон альфа-2 лю-

дини був виявлений у всіх тестованих органах лабораторних тварин. Максимальна кількість інтерферону зареєстрована в печінці, легенях і кишечнику. Інтерес становлять дані, отримані щодо впливу Біоспорину та Субаліну на імунну відповідь при вакцинації. Встановлено, що навіть одноразове пероральне введення препаратів перед вакцинацією обумовлює триваліший і вищий рівень специфічної імунної відповіді на дифтерійний і правцевий антигени вакцини АКДС.

Плазмідні векторів використовують для створення рекомбінантних штамів ББ. Так, наприклад, в Японії здійснюються дослідження з використанням модифікованих генно-інженерними методами штамів ББ для терапії онкологічних захворювань. Підставою для цього є той факт, що штами ББ після системного введення здатні селективно локалізуватися і швидко проліферувати в межах солідних пухлин. Використовуючи анаеробні та непатогенні бактерії *B.longum* в експериментах, вдалося доставити в пухлину певні терапевтичні генетологічні гени, в тому числі компоненти системи «проліки-фермент-ліки». Для цього була сконструйована плазмідна рBLES100-S-eCD, що включає ген цитозиндезамінази. Трансформовані цією плазмідною *B.longum* були здатні продукувати цитозиндезаміназу в гіпоксичних пухлинах, що призводило до локальної конверсії нетоксичного 5-фторцитозину, який системно вводили в токсичну для тканин сполуку 5-фторурацил. Протипухлинний ефект від застосування цього продукту був продемонстрований на моделі щурів з пухлинами молочних залоз при введенні трансформованих *B.longum* безпосередньо в область пухлини або внутрішньовенно. При цьому анаеробна *B.longum* накопичується в гіпоксичних солідних пухлинах (анаеробне середовище пухлини). В наш час проходить випробування протипухлинного препарату рекомбінантних ББ (які продукують цитозиндезаміназу) під кодовою назвою APS001, що селективно накопичуються в гіпоксичному середовищі пухлини.

У роботах біотехнологів з Китаю для проведення терапії пухлин в *B.longum* була вбудована плазмідна рBV22210 для доставки за допомогою вектора ендостатину. Вказані плазмідні *B.longum* продемонстрували сильну гальмічну дію відносно росту перевитої пухлини в печінці щурів. Отриманими результатами автори підтвердили, що плазмідні можуть бути досить стабільним вектором, причому наявність плазмідні не впливає на біологічні характеристики

B.longum. Інтенсивно проводиться скрінінг плазмід, отриманих для ББ. Так, наприклад, плазміда рBC1 *Bifidobacteria catenulatum* L48 містить 2540 пар основ із вмістом G + C (гуанін+цитозин) – 64,0 %, а плазміда рMG1 *Bifidobacteria longum* містить 3682 пар основ з вмістом G + C – 65,1 %.

Слід зазначити, що фахівці, які займаються штамми пробіотиків, стурбовані проблемою, пов'язаною з можливою роллю молочно-кислих бактерій в поширенні генів лікарської стійкості. Так, при вивченні 187 культур, виділених із різних йогуртів, вироблених у 8 країнах Європейського союзу, виявлено стійкість до канаміцину у 79 % ізолятів, до ванкроміцину – у 65 %, тетрацикліну – у 26 %, пеніциліну – у 23 %, еритроміцину – у 16 %, хлорамфеніколу – у 11 %, при цьому велика частина культур (68,4 %) характеризувалася множинною лікарською стійкістю. Крім того, у досліджах *in vitro* показана можливість передачі R-плазмід від диких культур *Lactobacillus sp.* різних видів грампозитивних бактерій. Продемонстровано передачу плазмиди рAM-b від *L. reuteri* до *E. Faecflis* в процесі приготування молочної продукції.

Останнім часом молочнокислі бактерії широко вивчаються як засоби доставки поверхневих вакцин на слизову оболонку. Ця система має перевагу перед традиційними вакцинами в тому, що молочнокислі бактерії можуть колонізувати дихальні шляхи, шлунково-кишковий тракт, сечові шляхи і інші епітеліальні клітини слизової оболонки і індукувати сильну імунну відповідь слизової оболонки. Рекомбінантні штами *Lactobacillus acidophilus*, які використовуються як пероральні вакцинні штами, можуть запобігати шлунковій інфекції та забезпечити прямий контакт між антигеном та імунною системою.

Інтерес становить вакцина для профілактики захворювань, які викликає бактерія *Helicobacter pylori*. Серед білкових антигенів адгезин *H. pylori* A (HраА) є джгутиковим білком оболонки *H. pylori*, а також є одним з основних факторів адгезії бактерії. Попередні дослідження показали, що ген HраА міститься у всіх штаммах *H. pylori*. Крім того, геномні дослідження не виявили суттєвої гомології послідовностей HраА з іншими відомими білками, і антитіла проти HраА можна було знайти в сироватці майже всіх пацієнтів, інфікованих *H. pylori*. Взяті разом, ці дані показують, що HраА можна вважати потенційним вакцинним антигеном. *H. pylori* адгезин 0410 (Hр0410) є гомологом гена *H. Pylori* HраА сімейства і є висококонсервативним, розділяючи від 94 % до 95 %

його генної послідовності зі стандартними штамми *H. pylori*, такими, як J99 і ATCC 26695. В дослідженнях як антиген використовувався або розчинний нативний білок *H. pylori*, або білок еспресований в бактеріальних або дріжджових клітинах, наприклад, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*. Показано, що ці білки в їх нативній або рекомбінантній формі забезпечують захист від зараження *H. pylori* на експериментальних тваринних моделях. Однак не відомо, за допомогою яких ефекторних механізмів цей захист досягається. Необхідні додаткові дослідження, щоб зрозуміти імунологічні механізми, що лежать в основі імунного захисту.

Розглядаються можливості створення рекомбінантних ББ – продуцентів ферментів: альфа-амілази і глутаматдегідрогенази. Безсумнівний інтерес являють собою роботи зі створення штаму *B.longum* – продуцента бактеріоцини з *Pediococcus spp.*, активного відносно *Listeria monocytogenes*. При отриманні зазначених рекомбінантних штамів пробіотиків найчастіше використовують реплікон, отриманий безпосередньо з ББ. Шведські вчені розробили систему пасивної імунотерапії, в якій рекомбінантні ЛБ експресують нейтралізуючі фрагменти варіабельного домену важких ланцюгів антитіл проти ротавірусів, що викликають діарею. Важкі ланцюги експресуються *Lactobaccillus paracasei* як у вільній формі, так і зв'язані з клітиною. Автори вказують на можливість використання рекомбінантних пробіотиків для боротьби з вірусною формою діареї.

Таким чином, рекомбінантні бактерії на основі різних форм пробіотиків дозволяють розширити застосування цієї групи препаратів: створення протипухлинних лікарських препаратів; включення в пробіотики векторів, що дозволяють створювати противірусні та антибактеріальні продукти, в тому числі й створення оральних вакцинних препаратів.

4.5. Біотехнологічне отримання препаратів пробіотиків

Як приклад виробництва препаратів пробіотиків наводимо технологію отримання ББ, ЛБ і ПКБ. Вибір цих трьох штамів не випадковий і обумовлений складом ефективного препарату мультипробіотиків «Симбітер ацидофільний», що містить комплекс бактерій: ЛБ і лактококів ($6 \cdot 10^{10}$), ПКБ ($3 \cdot 10^{10}$), ББ ($1 \cdot 10^{10}$), оцтовокислих бактерій ($1 \cdot 10^6$).

Ми наводимо технологічну схему отримання даних мікроорганізмів. Всі наведені нижче технології обов'язково містять стадії:

Стадія 1. Санітарна підготовка виробництва, що включає такі операції:

- 1.1. Приготування дезінфікуючих розчинів.
- 1.2. Підготовка вентиляційного повітря.
- 1.3. Підготовка виробничих приміщень (виробництво препаратів здійснюють в приміщеннях В (з зоною А), С і Д класів чистоти).
- 1.4. Підготовка обладнання та інвентарю.
- 1.5. Підготовка технологічного одягу.
- 1.6. Підготовка персоналу до роботи.

Вимоги до проведення цих операцій наведені у главі 2. Всі проведені операції відображають в протоколі серії. На стадії 1 ведуть протокол серії, а після закінчення його передають на стадію 2.

Стадія 2. Приготування робочих розчинів

На даній стадії, за затвердженими стандартними операційними процедурами (СОП), проводиться приготування всіх необхідних робочих розчинів: натрію гідроксиду, кислоти хлористоводневої, аміаку, цукрів (лактози, мальтози, сахарози та ін.), желатину та ін. На стадії 2 ведеться протокол серії, після закінчення стадії протокол передається на наступну стадію 3.

Стадія 3. Приготування поживних середовищ

Для культивування штамів пробіотиків використовуються різні поживні середовища, до конструювання яких висувають такі вимоги:

- попередній вибір поживних субстратів із урахуванням критеріїв біологічної цінності, доступності та економічності;
- балансування поживних середовищ;
- отримання поживних основ і оцінка їхньої ефективності на моделі регламентованих поживних середовищ;
- розробка і оцінка способу отримання поживних основ з урахуванням критерію технологічності та трудомісткості.

Збалансований склад поживних середовищ гарантує необхідний ріст мікроорганізмів, стандартність і стабільність складів, відсутність в готовому препараті різних алергенів. Стерильне поживне середовище, що використовується,

містить воду, джерела азоту, вуглеводи, солі мікроелементи, необхідні для росту. Наприклад, ЛБ та ББ з точки зору потреб харчування для росту і продуктивності мають тенденцію до ауксотрофів по відношенню до деяких з 20 амінокислот і мають потребу в допоміжних речовинах, які необхідно вводити в поживне середовище. Складність цих ауксотрофів і споживання у середовищі поживних речовин часто пов'язана із середовищем, до якого штам було адаптовано і з якого його було отримано. Так, наприклад, *L. plantarum*, отриманий із рослинного матеріалу, має меншу кількість ауксотрофій і більшу біосинтетичну самодостатність у порівнянні з *L. johnsonii*, виділеним з верхньо-шлункового тракту людини, який є середовищем з більшою доступністю клітинних речовин, таких, як вільні амінокислоти, короткі пептиди і олігосахариди. До складу поживних середовищ входять дріжджові екстракти, дріжджові пептони, ферментативні гідролізати казеїну і молока, а також інші складні джерела азоту.

Поживні середовища готують у відповідності до затвердженої на підприємстві-виробникові нормативної документації.

Стадія 3.1. Отримання поживних середовищ для культивування біфідобактерій

Для вирощування штамів ББ використовують ряд поживних середовищ: середовище Блаурокка на екстракті яловичої печінки; казеїново-дріжджове середовище, що містить панкреатичний гідролізат казеїну, дріжджовий аутолізат, лактозу, натрію хлорид, агар-агар, L-цистин та ін. Поживне середовище стерилізують при температурі 120 ± 1 °C і тиску 0,11 МПа протягом 30 хв. У готовому середовищі контролюють вміст амінного азоту, натрію хлориду, рН та ін.

Стадія 3.2. Отримання поживних середовищ для культивування лактобацил

Для вирощування штамів ЛБ використовують кілька поживних середовищ. Для отримання генерацій ЛБ використовують середовища MRS-1,2 і 4 (автори de Mon, Rogossa та Sharpe), до складу яких входить: молоко за Богдановим (знежирене молоко, гідролізоване підшлунковою залозою), екстракт печінки, аутолізат дріжджів, марганець сірчаноокислий, магній сірчаноокислий, цистеїн соляноокислий, амоній лимонноокислий, натрій сірчаноокислий, калій фосфорноокислий, глюкоза, агар-агар, пептони, твін-80, вода очищена. Середовище MPC-1 не містить агар-агару, рН 6,6-6,8. Для приготування MPC 2 і MPC 4 в середо-

вище МРС-1 вносять агар-агар: МРС-2 – 0,2 % (рН 6,2-6,4) і в МРС-4 – 2,5 % (рН 6,2-6,4). Середовища МРС 1, 2 і 4 стерилізують в автоклаві при температурі 110 ± 2 °С і тиску 0,05 МПа протягом 20 хв. Для проведення посіву у ферментері використовують казеїново-дріжджове поживне середовище, що містить аутолізат дріжджів, гідролізат казеїну, екстракт печінки, марганець сірчаноокислий, магній сірчаноокислий, цистеїн соляноокислий, амоній лимоннокислий, натрій сірчаноокислий, калій фосфорнокислий, желатин, вода очищена. Середовище стерилізують в автоклаві за температури 112 ± 1 °С і тиску 0,06 МПа протягом 0,5 години. У поживних середовищах визначають: амінний азот, рН та ін.

Стадія 3.3. Отримання поживних середовищ для культивування пропіоновокислих бактерій

Для виготовлення препаратів ПКБ використовують поживні середовища на основі молочної сироватки, кукурудзяного екстракту, глюкози, хлориду магнію, хлориду кобальту, натрію лимоннокислого тризаміщеного, аскорбінової кислоти, пептону, агар-агару, калію фосфорнокислого однозаміщеного, амонію сульфату та ін. Поживне середовище стерилізують при температурі 115 ± 1 °С і тиску 0,12 МПа протягом 20 хв. У готовому середовищі контролюють вміст амінного азоту, натрію хлорид, рН та ін.

Необхідно зазначити, що важливу роль для росту бактерій відіграють буферні властивості середовища. Для підтримки оптимальної для росту буферної ємності використовують натрієві і калієві солі лимонної, фосфорної і оцтової кислот.

Ємності з поживними середовищами маркують етикеткою із зазначенням: назви середовища, номера серії, об'єму і дати виготовлення.

На стадії 3 ведуть протокол серії, після закінчення стадії протокол передають на стадію 4.

Стадія 4. Отримання інокуляту штаму пробіотика для виробничого посіву

Стадія 4.1. Отримання інокуляту біфідобактерій

Ліофілізований штам ББ, наприклад, *Bif. Bifidum* ЛВА-3 в асептичних умовах вносять у флакон із середовищем Блаурокка. Посіви інкубують в термостаті при температурі 38 ± 1 °С протягом 24-48 годин. Вирослу культуру з ємності з першою генерацією пересівають у ємності з більшим об'ємом середовища

Блаурокка. Посіви другої генерації інкубують в термостаті при температурі 38 ± 1 °C протягом 24 годин. Через 24 години, переконавшись у чистоті культури, проводять пересіви культури в ємності, що містять середу Блаурокка в об'ємі, що перевищує об'єм другої генерації. Посіви інкубують в термостаті при температурі 38 ± 1 °C протягом 24-48 годин. Через 24 години культуру контролюють. Зовнішній вигляд культури – пухкий зернистий осад. При мікроскопії мазків, забарвлених за Грамом, – характерні мікробні клітини у вигляді неструктурованих скупчень.

Під час проведення трьох генерацій проводять контроль на середовищах: м'ясо-пептонному агарі, агарі Сабуро і поживному агарі з 0,5 % глюкози. На таких середовищах, як м'ясо-пептонний агар (МПА) і поживний агар із глюкозою, не має спостерігатися росту сторонньої мікрофлори, на агарі Сабуро – росту грибів.

Після закінчення контролю отриману культуру використовують для виробничого посіву та отримання напівфабрикату ББ.

Стадія 4.2. Отримання інокуляту лактобацил

Ліофілізований штам ЛБ, наприклад, *L. plantarum* 8P-A3 в асептичних умовах вносять в середовище МРС-1. Отриману суспензію перемішують і переносять у 1–2 пробірки з середовищем МРС-1. Посіви першої генерації штаму витримують в термостаті при температурі 37 ± 1 °C протягом 20–24 годин. Після закінчення інкубації посівів першої генерації переглядають ріст у пробірках. За наявності характерного росту ЛБ (рівномірна муть і гомогенний білий осад на дні пробірки) і відсутності росту в контрольних посівах отриману культуру пересівають на кілька пробірок із середовищем МРС-2. Посіви другої генерації інкубують в термостаті при температурі 37 ± 1 °C протягом 20–24 годин.

Після закінчення інкубації посіви переглядають і за наявності характерного росту ЛБ і відсутності росту в контрольних посівах отриману культуру другої генерації розсівають петлею на чашки Петрі з середовищем МРС-4. Посіви витримують в термостаті при температурі 37 ± 1 °C протягом 46–48 годин ростовою поверхнею вниз. Після закінчення інкубації третьої генерації штаму колонії *L. plantarum* 8P-A3, які вирости, переглядають під мікроскопом. По кілька колоній у S-формі з кожної чашки платиновою петлею переносять у пробірки з середовищем МРС-1 і МРС-2. Засівають по 10 пробірок кожного сере-

довища. Інкують посіви в термостаті при температурі 37 ± 1 °С протягом 20–24 годин. Після закінчення інкубації і відповідного контролю вирощеної культури проводять її посів у ємності з середовищем МРС-1 (посівного матеріалу 10 %). Посіви інкують в термостаті при температурі 37 ± 1 °С протягом 6–8 годин. Після закінчення інкубації культуру пересівають у ємності зі збільшеним об'ємом середовища МРС-1. Інкують посіви в термостаті при температурі 37 ± 1 °С протягом 20–24 годин. Після закінчення інкубації з кожної ємності відбирають контрольну пробу. У контрольній пробі культуру перевіряють на мікробіологічну чистоту і визначають мутність мікробної суспензії (повинна бути в межах 17–25 одиниць каламутності).

Всі генерації ЛБ супроводжують контролем на поживному агарі з 9 % натрію хлориду (інкують при температурі 37 ± 1 °С) і на агарі Сабуро (інкують при температурі 22 ± 2 °С). На обох середовищах при інкубації протягом 8 діб не має бути росту.

Стадія 4.3. Отримання інокуляту пропіоновокислих бактерій

Ліофілізований штам ПКБ, наприклад, *Propionibacterium shermani* або *Propionibacterium freudenreichii* в асептичних умовах вносять в ємність (пробірки або флакони) з середовищем на основі молочної сироватки. Для посіву використовують активовану β-галактозидазою (виділену з *Sacch. fragilis*) культуру пропіоновокислих бактерій. Посіви інкують в термостаті при температурі 30 ± 1 °С протягом 24–30 годин. У контрольній пробі культури перевіряють мікробіологічну чистоту. Культуру пересівають в ємності, що містять кукурудзяно-глюкозне середовище. Посіви другої генерації інкують в термостаті при температурі 30 ± 1 °С протягом 24 годин. Через 24 години, переконавшись в чистоті культури проводять пересів культури в ємності, що містять більший об'єм кукурудзяно-глюкозного середовища. Посіви інкують в термостаті при температурі 30 ± 1 °С протягом 48 годин (третя генерація). При мікроскопії мазків, забарвлених за Грамом, – характерні мікробні клітини. При перегляді контрольних посівів – відсутність росту сторонньої мікрофлори, а на агарі Сабуро – росту грибів.

Після закінчення контролю культуру використовують для виробничого посіву та отримання напівфабрикату пропіоновокислих бактерій.

На стадії 4 (4.1; 4.2; 4.3) ведеться протокол серії. Після закінчення стадії протокол передають на стадію 5.

Стадія 5. Отримання напівфабрикату препарату пробіотиків

Для культивування приобіотиків використовують ферментери різної місткості з рядом опцій, що дозволяють в процесі культивування додавати розчини цукрів, речовин для коригування рН, контролювати і регулювати температуру, інтенсивність перемішування, рівень піни, рН, можливість охолодження бактеріальної маси і т.д. Ретельне перемішування культури необхідне, по-перше, для рівномірної доставки поживних речовин до клітин і, по-друге, для запобігання накопиченням токсичних продуктів метаболізму в якомусь одному відсіку реактора. Крім того, реактор повинен бути забезпечений опцією, що дозволяє проводити розлив препарату у флакони або спеціальні контейнери для проведення подальшої ліофілізації.

Стадія 5.1. Виробничий посів і вирощування культури біфідобактерій

У ферментер зі стерильним казеїново-дріжджовим середовищем вносять мікробну суспензію. Кількість посівного матеріалу становить 20 % від об'єму середовища. У ферментер з сумішшю поживного середовища і культури ББ додають стерильний 40 %-вий розчин лактози (140 мл розчину на 1 л середовища). Для піногасіння допускається додавання стерильного рослинного масла. Вміст ферментера перемішують і вирощують при температурі 38 ± 1 °C протягом 16–17 годин. Після зазначеного часу перевіряють рН, величина якого знаходиться у межах 3,7–4,5. Коректують рН 10 % розчином аміаку до показника $6,0 \pm 0,2$. Вирощування біомаси відбувається протягом 48–72 годин. Коригування рН проводять 3-4 рази на добу. Стабільність показника рН $6,0 \pm 0,5$ вказує на закінчення росту біфідобактерій.

Стадія 5.2. Виробничий посів і вирощування культури лактобацил

У ферментер зі стерильним казеїново-дріжджовим середовищем вносять мікробну суспензію ЛБ. Кількість посівного матеріалу становить 10-15 % від об'єму середовища. У реактор з сумішшю живильного середовища і культури ЛБ додають стерильний 40 % розчин глюкози (100 мл на 1 л середовища). Вміст ферментера перемішують і вирощують при температурі 37 ± 1 °C на 16-18 годин. Після зазначеного часу перевіряють рН, величина якого перебуває в

межах 3,7-4,3. Коректують рН 10 % розчином аміаку до показника $6,0 \pm 0,2$. За необхідності додають 40 % розчин глюкози (50-100 мл на 1 л середовища). Ріст біомаси відбувається протягом 24-28 годин. Коригування рН проводять через кожну годину. Стабільність показника рН $6,0 \pm 0,2$ вказує на закінчення росту лактобацил.

Стадія 5.3 Виробничий посів і вирощування культури пропіоново-кислих бактерій

У ферментер, що містить стерильне кукурудзяно-глюкозне середовище, переносять мікробну суспензію ПКБ. Кількість посівного матеріалу становить 5–15 % від об'єму середовища. Культивування у ферментері проводять при температурі 30 ± 1 °С протягом 24 годин. Через зазначений час перевіряють рН. Величина рН знаходиться в межах 5,3–5,7. Кориגують рН 10 %-вим розчином аміаку до показника $7,0 \pm 0,2$. Вирощування біомаси відбувається протягом 24–28 годин. Стабільність показника рН $7,0 \pm 0,2$ вказує на закінчення росту пропіоновокислих бактерій.

На стадії 5 ведеться протокол серії. Після закінчення стадії протокол передають на стадію 6.

Стадія 6. Отримання бактеріальної маси пробіотиків із стабілізатором

У ємності з культурами додають стерильні стабілізатори. Для стабілізації кінцевого продукту використовують кріопротектори – для захисту клітин від пошкодження при заморожуванні та / або ліопротектори для захисту клітин від пошкодження при ліофілізації. Ці речовини додають безпосередньо перед заморожуванням. Кріопротектори пригнічують швидкість росту льоду, збільшуючи в'язкість розчину і зберігаючи аморфну структуру льоду в безпосередній близькості від клітин. Ліопротектори стабілізують структуру ліпідного бішару клітинної мембрани за відсутності води. Найчастіше кріопротекторами і ліопротекторами є вуглеводи, пептиди, похідні молока та ін. Зазвичай висушування препаратів пробіотиків проводиться кілька днів. У реактор додають регламентоване захисне середовище у кількості 5–15 % (наприклад, сахарозу, трегалозу, лактозу, желатин, знежирене молоко та ін.).

Вміст ферментера перемішують і проводять контроль рН, стерильності, кількості життєздатних бактерій, роблять мазок для перевірки автентичності та

чистоти культури. На ферментер кріплять етикетку, на якій вказують: назву препарату, номер серії, кількість і дату виготовлення.

У контрольній пробі після додавання середовища висушування визначають: рН, мікробіологічну чистоту, кількість живих бактерій, кислотоутворення, морфологію бактерій, забарвлених за Грамом.

На стадії 6 ведеться протокол серії. Після закінчення стадії протокол передають на стадію 7.

Стадія 7. Наповнення первинної упаковки і ліофілізація бактеріальної маси. Дана стадія включає кілька операцій:

7.1. Мийка та стерилізація флаконів

7.2. Мийка гумових пробок / металевих ковпачків і їх стерилізація

Вимоги до проведення цих операцій наведено в розділі «Парентеральні лікарські форми».

7.3. Наповнення флаконів напівфабрикатом і ліофілізація препарату

Спосіб наповнення флаконів – шприцевий. Розлив препарату проводять при безперервному перемішуванні. Регулюванням величини ходу поршня насоса встановлюють дозу розливу на заданий об'єм. Після заповнення системи розливу препаратом і витіснення повітря перевіряють дозу розливу.

Об'єм наповнення флаконів перевіряють каліброваним шприцом. Після встановлення дози голки для наповнення закріплюють на тримачі апарату для наповнення. За допомогою регулюючого трансформатора на індивідуальному пульті керування машини встановлюють необхідну продуктивність залежно від властивостей наповнюваного препарату, об'єму, лінійних розмірів флакона і товщини його стінок. У процесі наповнення проводиться контроль стерильності первинної упаковки і наявності сторонньої мікрофлори в препараті пробіотиків. При отриманні ліофілізованої субстанції пробіотиків для виробництва деяких форм (капсул, супозиторіїв та ін.) наповнення проводять в асептичних умовах у спеціальні контейнери (лотки), які також як і флакони передають на ліофілізацію.

Касети з наповненими флаконами і контейнери з препаратом пробіотиків завантажують в ліофілізатор і доводять температуру продукту до мінус 50–60 °С. Заморожують препарат протягом 24–48 годин при регламентованій температурі. При цьому істотне значення має кількість бактеріальних клітин у сус-

пензії, її евтектичні параметри, а також характер впливу при заморожуванні та зневодненні. Час і режим ліофілізації визначається залежно від марки сублимаційного обладнання, товщини шару біомаси, використовуваних кріопротекторів, кількості бактерій та інших факторів. Отримані після ліофілізації флакони піддають герметизації гумовими пробками, перекривають алюмінієвими ковпачками і вальцюють. На касету з флаконами кріплять етикетку із зазначенням: назви, номера серії, кількості та дати ліофілізації. Одночасно відбирають зразки препарату для контролю на відповідність методам контролю якості (МКЯ). Ліофілізований пробіотик у контейнерах передають для виробництва інших форм лікарських препаратів.

Зберігають препарат під час контролю при температурі 6 ± 2 °С.

На стадії 7. ведеться протокол серії. Після закінчення стадії протокол передають на стадію 8.

Стадія 8. Упаковка та маркування флаконів з препаратами пробіотиків

Флакони з ліофільно висушеним препаратом надходять на перегляд для відбраковування. Перегляд флаконів з препаратом (100 % серії) проводять при висвітленні електролампами (60 Вт) на тлі екрана. Флакони бракують за показниками: погана таблетка, сторонні включення. Переглянуті флакони поміщають у касети. Кожну касету маркують етикеткою, де вказують: назву препарату, номер серії, кількість, дату і прізвище контролера. На флакони наклеюють етикетки, на яких вказують найменування препарату, місто, кількість доз у флаконі, номер серії та термін придатності. Промарковані флакони укладають в картонні пачки. Препарат передають у приміщення проміжного зберігання при 6 ± 2 °С.

Препарат контролюють у відділі контролю якості (ВКЯ) на відповідність вимогам МКЯ: розчинність, прозорість і кольоровість; рН; масова частка вологи; специфічна нешкідливість; специфічна активність: кількість живих бактерій і показник активності кислотоутворення; контамінація сторонньою мікрофлорою; антагоністична активність та ін.

Контроль пробіотичних препаратів із зазначенням методів контролю і їх інтерпретацією описаний в навчальному посібнику [1].

Одним з найважливіших завдань промисловості є забезпечення практичної охорони здоров'я високоефективними і доступними пробіотичними препаратами. Організація масового виробництва пробіотиків у вигляді порошків, таблеток, капсул, супозиторіїв, ліофільно висушеної маси або рідких суспензій вимагає рішення ряду технологічних питань: збереження адгезивних властивостей штамів; підбір штамів стійких до антибіотиків; підбір оптимального складу штамів, які доповнюють один одного, забезпечують максимальну біологічну активність препарату, високу виживаність мікроорганізмів та їхню антагоністичну активність щодо патогенної мікрофлори.

ПІДСУМОК

Таким чином, біфідобактерії, лактобактерії та ін. створюють біоплівку, яка активно витісняє патогенну мікрофлору. Крім того, біфідо- і лактобактерії виявлені на слизових оболонках в порожнині носа, рота, глотки, очей, вух, ШКТ, статевих органах.

Ряд функцій пробіотиків роблять їх незамінними для нормального існування організму: продукують травні ферменти (амілази, ліпази, протеази, пектиназу та ін.); продукують вітаміни, наприклад, рибофлавін, і амінокислоти, в тому числі і незамінні; мають імуномодулюючу дію (активація макрофагів, стимулювання вироблення інтерферону, синтез імуноглобулінів) та ін.

У теперішній час препарати, що містять живі штами пробіотиків, випускаються у різних формах (табл. 4.2):

1) флакони з ліофілізованими штамами пробіотиків («Біфідумбактерин», «Лактобактерин»);

2) супозитоїї для ректального і вагінального використання, що містять ліофілізовані штами пробіотиків;

3) таблетки на основі ліофілізованих штамів пробіотиків (Біон-3, таблетки, вкриті оболонкою, які містять *L. gasseri PA 16/8*, *B. longum*, *B. bifidum MF20/5*), в тому числі, і вагінальні таблетки;

4) капсули, що містять ліофілізовані штами пробіотиків («Лінекс», «Лактовіт-форте»);

5) мікрокапсули, що містять штами пробіотиків;

б) штами пробіотиків, сорбованих на різних носіях, наприклад, активоване вугілля («Біфідумбактерин», «Пробіофором» та ін.). У кишково-розчинних капсулах знаходяться життєздатні бактерії пробіотиків. У препаратах бактерії об'єднуються в невеликі колонії (120–180 живих клітин), які закріплені на активованому вугіллі. Сорбована форма дозволяє значно збільшити виживання штамів;

7) рідкі форми, що містять суспензійні культури пробіотиків («Ентержерміна»);

8) саше, що містять ліофілізовані штами пробіотиків для прийому всередину (Максілак – *L. acidophilus LA14*, *L. casei CBT*, *L. paracasei Lpc 37*, *L. plantarum LP115*, *L. rhamnosus G68*, *L. salvarius LS33*, *B. lactis BL04*).

На кафедрі біотехнології, біофізики і аналітичної хімії НТУ «ХП» протягом ряду років проводилися роботи зі створення комплексного симбіотичного препарату, що містить лактобацили і біфідобактерії. Запропоновано технологію, яка передбачає спільне культивування двох бактерій. Ліофілізований продукт представлений двома лікарськими формами: флакони з ліофілізованими штамми та кислотонерозчинні капсули, що містять ліофілізовані штами. З огляду на те, що ліофілізовані бактерії знаходяться в анабіозі, а для їхнього переходу в активний стан потрібен певний час, проводяться спроби отримати препарати в суспензійній формі. Крім того, такі препарати більшою мірою елімінуються з організму людини. Рідкі препарати проявляють дію безпосередньо після прийому. У той же час суспензійні пробіотичні продукти присутні на фармацевтичному ринку в мінімальній кількості, наприклад, «Ентержерміна».

Необхідно зупинитися ще на одному питанні. Ряд авторів для отримання препаратів пробіотиків пропонують проводити відділення біомаси від культуральної рідини. Для відділення пропонується використання центрифугування при 4–5 тис.об./хв протягом 20–40 хв. Осад суспендують в буферному розчині з рН 6,0–7,0, додають сахарозу і знежирене молоко. При цьому відокремлену культуральну рідину, що містить продукти метаболізму бактерій, видаляють. На нашу думку, такий підхід до отримання препаратів не виправданий, що пов'язано з тим, що в культуральній рідині містяться біологічно активні речовини: ферменти (амілаза, протеази, ліпази та ін.), імуномодулятори, замінні і незамінні амінокислоти, вітаміни і багато інших речовин. При ліофілізації бак-

терій в культуральній рідині в отриманому препараті також міститься весь комплекс отриманих продуктів метаболізму.

Важливу роль в ефективності препаратів пробіотиків відіграють пребіотики, що являють собою субстрати, які стимулюють природну мікрофлору, які в нормі надходять в організм людини і які не перетравлюються і не всмоктуються в шлунку і тонкому кишечнику, а, надходячи в товстий кишечник, використовуються як поживне середовище для нормальної мікрофлори. У людей в перші дні після народження основним пребіотиком є лактулоза, що входить до складу грудного молока.

Раціональна комбінація пробіотиків і пребіотиків – синбіотики.

Пребіотики представлені рядом фруктоолігосахаридів – коротколанцюгових полісахаридів, які є необхідним поживним субстратом (джерелом вуглецю), що покращують ріст сапрофітної мікрофлори, пригнічуючи ріст патогенних мікроорганізмів. Крім того, фруктоолігосахариди покращують синтез жирних кислот з коротким ланцюжком, нормалізують функцію печінки, знижують рівень холестерину в плазмі, покращують елімінацію токсичних сполук. Рекомендована доза очищених фруктоолігосахаридів 2-3 г на добу. Їх природними харчовими джерелами є ерусалимський артишок, ріпчаста цибуля, часник і спаржа. Збагачення продуктів харчування і біологічно активних добавок фруктоолігосахаридами можуть заповнити необхідну кількість.

Сприяє розмноженню нормальної мікрофлори кишечника лактулоза (Нормазе) – напівсинтетичний дисахарид, що складається з галактози і фруктози, який не розщеплюється в кишечнику, оскільки у людини відсутня лактулаза – фермент, необхідний для розщеплення лактулози, і в незмінному вигляді досягає попереочно-ободової кишки. Продукти з пробіотиками сприяють розщепленню лактулози в кишечнику з утворенням основних метаболітів: низькомолекулярних жирних кислот (молочної, оцтової, масляної і пропіонової), водню, діоксиду вуглецю. Результатом цього є зрушення рН кишкового вмісту в кислу сторону і посилення перистальтики. Крім того, лактулоза, розщеплюючись у товстій кишці, вивільняє іони водню, зв'язує аміак, зменшує утворення токсичних азотовмісних речовин в проксимальному відділі товстого кишечника та їх абсорбцію, збільшує дифузю аміаку з крові в кишечник і відповідно його виведення з організму. Лактулоза проявляє виражені фармакотерапевтичні

ефекти: має значну аміак-нейтралізуючу та антиендотоксичну активність, знижуючи в крові концентрацію вільного аміаку в 1,84 рази і зменшує рівень бактеріальних ендотоксинів в 7 разів у порівнянні з патологічним контролем. Показано, що ефект лактулози може бути пов'язаний із суттєвим покращенням мікроекології кишечника.

Для вирощування змішаних культур для біфідобактерій необхідна полідекстроза і олігоальгінати. Для змішаних культур лактобацил з біфідобактеріями важливою є стійкість біфідобактерій до кислих умов в культурі. Фруктоолігосахариди, інулін і манітол є кращими для продукції лактобацилами молочної, бутилової або мурашиної кислот відповідно. Бичачий лактоферин є потенціальним стимулятором росту змішаних культур лактобацил і біфідобактерій, а трансферинові білки теплокровних вибірково стимулюють ріст *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, але не *B. longum*. Трансглутамінази актиноміцетів в аеробних умовах до 12 разів збільшують біомасу пробіотичних лактококів. Олігосахариди з бета-глюканів високої в'язкості є стимуляторами росту лактобацил в тонкій кишці. Є дані про ефективність додавання в середовища селективного вирощування лактобацил стерилізованих фільтруванням овочевих соків і екстрактів часнику, що мають фунгіцидну дію. Підвищення оксидазного потенціалу пробіотика значно збільшує виживаність лактобацил в кишечнику, фунгіцидні властивості лактобацил і стійкість до стресу. Існує припущення, що пробіотичний штам з високим оксидазним потенціалом захищатиме і весь консорціум від різких зрушень метаболізму в організмі хазяїна, наприклад, лактобацилярний або лактобацилярно-біфідобактеріальний консорціум.

Таким чином, гарантією високої якості препаратів, що містять пробіотики, є збалансований склад штамів пробіотиків і пребіотика, технологія їх виробництва, що відповідає вимогам, які висуваються до виробництва біотехнологічних продуктів. За допомогою препаратів пробіотиків можна в комплексному лікуванні боротися з важкими інфекційними захворюваннями, відновлюючи імунітет, підтримувати різні системи організму.

Контрольні запитання

1. Яка роль пробіотиків у організмі людини та характеристика пробіотиків?

2. Що Вам відомо про мікробні системи організму? Фізіологічні функції нормальної мікрофлори.
3. Охарактеризувати пробіотичні штами: лактобацили. Технологічні вимоги культивування.
4. Охарактеризувати пробіотичні штами: біфідобактерії. Технологічні вимоги культивування.
5. Охарактеризувати пробіотичні штами: пропіоновокислі бактерії. Технологічні вимоги культивування.
6. Охарактеризувати пробіотичні штами: бацил та *E. coli*.
7. Що являють собою рекомбінантні штами пробіотиків?
8. Що таке пребіотики та синбіотики? Навести приклади.
9. Які технологічні вимоги проведення санітарної підготовки виробництва?
10. Охарактеризувати поживні середовища та технології їх одержання для біфідобактерій, лактобацил та пропіоновокислих бактерій. Вимоги до середовищ.
11. Навести основні вимоги до технології одержання інокуляту.
12. Які вимоги висуваються до технології одержання полуфабрикату біфідобактерій, лактобацил та пропіоновокислих бактерій? Навести критичні точки виробництва.
13. Описати технологію стабілізації комплексного препарату біфідобактерій, лактобацил та пропіоновокислих бактерій.
14. Описати вид та функції кріопротекторів для сублімації штамів пробіотиків. Основні стадії ліофілізації.
15. Які методи контролю пробіотиків допомагають стандартизувати пробіотичні препарати?
16. Які форми препаратів пробіотиків Вам відомі? Навести приклади (таблетки, флакони, супозиторії та ін.).

Список джерел інформації

1. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, М.И. Борщевская. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009. – 351 с.

2. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология биологически активных веществ: учебное пособие. Часть 1. / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.
3. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология биологически активных веществ: учебное пособие. Часть 2. / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2013. – 192 с.
4. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Основы лабораторных исследований: практикум. / Ю.М. Краснопольский, Л.В. Северина. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2017. – 208 с.
5. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая Биотехнология: Аспекты Фармацевтической химии: учебное пособие. / Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
6. Краснопольский Ю.М. Фармакопейные лекарственные средства для терапии и профилактики дисбактериозов кишечника / Ю.М. Краснопольский // Провизор. – 2007. – Т. 11.– С. 24–27.
7. Хижняк О.С. Біотехнологічні аспекти створення препаратів на основі пробіотиків / О.С. Хижняк, Ю.М. Краснопольський // Вісник НТУ «ХПІ». – 2012. – № 44 (950). – С. 72–78.
8. Хижняк О.С. Краснопольський Ю.М. Біотехнологічні аспекти отримання комплексного препарату, який містить різні штами пробіотичних культур/ О.С. Хижняк, Ю.М. Краснопольський // Вісник НТУ «ХПІ». – 2013. – № 4 (978). – С. 113–120.
9. Хижняк О.С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного про біотичного препарату. Дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм. н. – Харків, 2016. – 204 с.
10. Сорокулова И.Б. Сравнительное изучение биологических свойств биоспорина и других коммерческих препаратов на основе бацилл / И.Б. Сорокулова // Мікробіологічний журнал. – 1997. – Т. 59. – № 8. –С. 43–49.
11. Сорокулова И.Б. Изучение безопасности бацилл-пробиотиков / И.Б. Сорокулова., И.Г. Осипова, Н.В. Терешкина и др. // Вестник Рос. АМН. – 2006. – № 1. – С.50–54.

12. Сорокулова И.Б. Теоретическое обоснование и практика применения бактерий рода *Vacillus* для конструирования новых пробиотиков. Автореф. Ддс. на соиск. уч. степ. д. биол. н. – Киев, 1999. – 35 с.

13. Сорокулова И.Б. Влияние пробиотиков из бацилл на функциональную активность макрофагов / И.Б. Сорокулова // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – Т.43. – № 2. – С.20–23.

14. Подпорінова О.С. Вивчення антибактеріальної та імуностимулюючої активності продуктів метаболізму пробіотиків / О.С. Подпорінова, Ю.М. Краснопольський, М.Ф. Клещев // Біотехнологія. Наука. Освіта. Практика. Тези доповідей ІУ міжнародної научно-практичної конференції. – Дніпропетровськ, 2008. – С. 50–51.

15. Меркулова Ю.В. Вивчення аміакнейтралізуючих та анти-ендотоксичних властивостей лактулози за умов експериментальної гіперамонії / Ю.В. Меркулова, Л.О. Чайка, О.М. Гомон // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2008. – № 1–3. – С. 69–74.

16. Капрельянц Л.В. Пробиотичні властивості та біотехнологічний потенціал пропіоновокислих бактерій / Л.В. Капрельянц, Л.О. Коупицька // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – № 1 (37). – С. 6–16.

17. Гордиенко П.А. Научное обоснование создания новых лекарственных форм пробиотиков (обзор и результаты обоснования экспериментов). / П.А. Гордиенко, В.И. Чуешов, А.Д. Гордиенко, Е.В. Кудкоцева // Научные ведомости. Серия: Медицина. Фармация. – 2015. – № 22 (219). Вып. 32. – С. 121–127.

18. Чижаева А.В. Научный обзор: теоретические и практические аспекты конструирования пробиотических препаратов / А.В. Чижаева, Г.Н. Дудикова // Научное обозрение. Биологические науки. – 2017. – № 2. – С. 157–166.

19. Хамачаева И.С. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий / И.С. Хамачаева, Л.М. Качанина, С.М. Тумурева. – Улан-Уде, 2006. – 172 с.

20. Ушкалова Е.А. Роль пробиотиков в гастроэнтерологии / Е.А. Ушкалова // Фарматека. – 2007. – № 6. – 18–25.

21. Байбиков В.И. Новый высокопродуктивный производственный штамм бифидобактерий / В.И. Байбиков, А.В. Молокеев, Т.Л. Карих, Л.Р. Никулин // Биотехнология. Теория и практика. – 2000. № 3–4. –С. 55–56.

22. Калюжная Л.Д. Новый пребиотик в комплексной терапии атипического дерматита у детей / Л.Д., Калюжная Т.Т. Милорава, Н.В. Турик, Е.А. Уваренко // Мистецтво лікування. – 2006. – № 12. – С. 32–33.

23. Мазанкова Л.Н. Пробиотики на современном этапе – клинические подходы и области применения. Пособие для врачей / Мазанкова Л.Н., Шевелева С.А. Лыкова Е.А. – М., 2005. 40 с.

24. Бондаренко В.М. Пробиотики, пребиотики и симбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов / В.М. Бондаренко, Н.М. Гачева // Фарматека. – 2003. – № 7. – С. 56–63.

25. Анохина И.В. Характеристика поверхностных адгезинов лактобактерий, используемых при изготовлении препаратов пробиотиков / Анохина И.В., Кравцов Э.Г., Яшина Н.В. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141. – № 6. – С. 664–667.

26. Усенко Д.В. Применение пробиотического продукта, содержащего *Lactobacillus casei* Imunitass, в профилактике и лечении инфекционных заболеваний у детей / Д.В. Усенко // Инфекционные болезни. – 2007. – Т. 5. – № 2. – С. 82–85.

27. Австриевских А.Н., Вековцев А.А. Способ изготовления сухого препарата на основе бифидо- и/или лактобактерий и препарат, изготовленный этим способом. Патент РФ №2262530. 2005.

28. Лахтин В.М. Лектины, адгезины и лектиноподобные вещества лактобацилл и бифидобактерий / В.М. Лахтин, В.А. Алешкин, М.В. Лахтин и др. // Вестник Рос. АМН. – 2006. – № 1. – С.28–34.

29. Лахтин В.М. Стратегические аспекты конструирования пробиотиков будущего. / В.М. Лахтин, В.А. Алешкин, М.В. Лахтин и др. // Вестник Рос. АМН. – 2006. – № 2. – С.33–43.

30. Бондаренко В.М. Молекулярно-генетические и молекулярно-биологические исследования представителей родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* / В.М. Бондаренко // Вестник Рос. АМН. – 2006. – № 1. – С.18–24.

31. Ефимов Б.А. Плазмиды бифидобактерий и их использование в генетической инженерии / Б.А. Ефимов, А.Н. Шкопков, Е.В. Хохлова и др. // Вестник Рос. АМН. – № 2. – С. 16–21.

32. Блудова Н.Г. Лактобактерии, пробиотики и иммунная система кишечника / Н.Г. Блудова // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 4. – С. 115–120.
33. Collins I.K., O'Sullivan G.C., O'Mahony L., Shanahan F. Bifidumbacterium in the treatment of inflammatory disease. US Patent. № 7195906. – 2007.
34. Alvares-Martin P. Screening for plasmids among human bifidobacteria species sequencing and analysis of pBC1 from *B.catenulatum* L48. / P. Alvares-Martin, A.B. Flores, V. Mayo // Plasmid. –2007. – Vol. 57. – № 2. – P. 165-174.
35. Барановский А.Ю. Дисбактериоз кишечника / А.Ю. Барановский, Э.А. Кондрашина. – М.: «Питер», 2008. – 240 с.
36. Похименко В.Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В.Д. Похименко, В.В. Перелыгин // ВИНТИ. РАН. ФГУП «ЦНИИХМ». Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2–3. – С. 21–40.
37. Burns D. L. Oral Immunization with Recombinant *Lactobacillus acidophilus* Expressing the Adhesin Hp0410 of *Helicobacter pylori* Induces Mucosal and Systemic Immune Responses / D. L. Burns // Clinical and Vaccine Immunology. – 2014. – №21. – P. 126–132.
38. Корочинский А.В. Технологическая разработка иммобилизации лекарственных форм биоспорина и их исследования. Дис. на стиск. уч. степени канд. фарм. н. – Пятигорск, 2014. – 174 с.

ГЛАВА 5. ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ У ФОРМІ КАПСУЛ

5.1. Загальна характеристика капсул

Капсули – тверді лікарські препарати з твердою або м'якою оболонкою різної форми та місткості з дозованою кількістю діючої речовини.

Капсула (capsula – футляр або оболонка) – дозована лікарська форма, що складається з АФІ та допоміжних речовин, які поміщено в оболонку.

Оболонка капсули виготовлена з желатину або інших речовин, наприклад, для вегетаріанських капсул – з пуллулану. Консистенція оболонки забезпечується шляхом додавання таких речовин, як гліцерин або сорбіт. До складу оболонки можуть входити різні речовини, а саме поверхнево-активні, антимікробні консерванти, підсолоджувачі, барвники, ароматизатори (табл. 5.1). Вміст капсул може бути твердим, рідким і пастоподібним, складатися з однієї або декількох діючих речовин, а також допоміжних речовин, таких як розчинники, розпушувачі, ковзні речовини та ін. (табл. 5.1). Оболонка капсули не повинна руйнуватися під дією вмісту капсули. Вивільнення речовин з капсули відбувається під дією травних соків організму.

Поштовхом до розвитку такої лікарської форми, як капсули, став початок широкого застосування в медичній практиці антибіотиків, які характеризуються неприємним смаком. У наш час на світовому фармацевтичному ринку в капсулах різного складу випускаються тисячі лікарських препаратів. Найбільше популярні желатинові капсули, заповнені порошкоподібними гранульованими, пастоподібними або рідкими лікарськими речовинами.

Залежно від пластифікаторів і використаної технології розрізняють два види препаратів на основі желатину:

- тверді желатинові капсули з кришками;
- м'які желатинові капсули з цільною оболонкою.

Консистенція капсул залежить від трьох основних компонентів: желатину, гліцерину і води. Гліцерин частково може замінюватися на інші пластифікатори: сорбітол або цукровий сироп.

Тверді желатинові капсули призначені для дозування сипких порошкоподібних або гранульованих речовин. Вони мають форму циліндра з напівсферичними кінцями і складаються з двох частин: корпусу і кришки. Обидві частини повинні вільно входити одна в іншу, не утворюючи зазорів. Тверді желатинові капсули заповнюються після того, як повністю проходить технологічний процес їх формування і вони набувають пружності та жорсткості. Тверді желатинові капсули мають двосекційну будову і можуть бути виготовлені заздалегідь, а наповнення їх лікарським засобом здійснюється в міру необхідності.

М'які желатинові капсули призначені для рідких і пастоподібних лікарських речовин. Капсули мають різну форму: сферичну, яйцеподібну, довгасту або циліндричну. Місткість – від 0,1 до 1,5 мл. Шовні м'які желатинові капсули можуть містити до 7,5 мл. Ці капсули отримали свою назву через те, що в процесі їх виготовлення компоненти поміщаються ще в м'яку еластичну оболонку. Потім капсули піддаються подальшим технологічним процесам, в результаті яких початкова еластичність може частково або повністю зникати. Такі капсули мають цілісну оболонку, яка буває еластичною або жорсткою. Іноді до складу оболонки вводять діючу речовину.

Капсули призначені для орального застосування, рідше для ректального або вагінального застосування.

Капсули з модифікованим вивільненням мають у складі вмісту або оболонки специфічні допоміжні речовини, призначені для зміни швидкості або місця вивільнення діючої речовини. Кишково-розчинні капсули також належать до засобів із модифікованим вивільненням, які повинні бути стійкими у шлунковому соці та вивільняти діючі речовини в кишечнику. Вони можуть бути виготовлені покриттям твердих або м'яких капсул кислотостійкою оболонкою або шляхом заповнення капсул гранулами або пелетами, покритими кислотостійкою оболонкою.

Переваги капсул:

– висока точність дозування поміщених у них лікарських речовин – сучасне обладнання забезпечує високу точність наповнення капсул наповнювачем (відхилення не перевищує $\pm 3\%$) і мінімальні втрати;

– висока біологічна доступність – фармакологічна дія лікарського засобу проявляється через 4-5 хвилин;

– висока стабільність лікарської речовини – капсули захищають від різних несприятливих факторів (світло, повітря, волога, механічний вплив);

– корелююча здатність – виключається неприємний смак і запах лікарської речовини, особливо в педіатрії;

– кишкова розчинність – пролонговане вивільнення;

– менша кількість допоміжних речовин порівняно з таблетками.

Крім того, виготовлення капсул вимагає меншої кількості машинного обладнання у зв'язку зі зменшенням етапів виробництва і зниженням застосовуваних аналітичних методик. У м'які та тверді желатинові капсули препарати капсулюють у незмінному вигляді. При цьому препарат не піддають вологій грануляції, термічній обробці, тиску як при виробництві таблеток.

До недоліків капсул можна віднести:

– чутливість до вологи, що вимагає певних умов зберігання;

– можливість контамінації мікроорганізмами за рахунок присутності поживного компоненту – желатину.

Існує 8 стандартних розмірів: №5 – мінімальний і №000 – максимальний.

Поширеними є капсули типу Supro п'яти стандартних розмірів від А до Е.

5.2. Технологія приготування капсул

Виготовлення желатинових капсул проходить за такою схемою:

1 – приготування желатинової маси (може проходити з попереднім набуванням желатину або без нього);

2а – м'які желатинові капсули: формування оболонок та їх наповнення; промивка капсул; сушка капсул;

2б – тверді желатинові капсули: виготовлення корпусу і кришки, сушка частин капсули на штифтах, комплектація корпусу і кришки, наповнення капсул;

3 – контроль якості; фасування, пакування, маркування.

При виробництві желатинових капсул велика увага приділяється якості та технології приготування желатинової маси (основи), хімічні властивості якої залежать від якості желатину, складу капсульної основи і способу її приготування.

Існує два методи приготування капсульної основи: з процесом попереднього набухання та без набухання желатину.

У першому методі желатин поміщають у реактор і заливають холодною водою з температурою 15–18 °С для набухання протягом 1,5–2,0 годин. Набухлий желатин розплавляють при температурі 45–75 °С залежно від концентрації желатину і перемішують протягом 1 години. Після розчинення в желатин додають консерванти, пластифікатори та інші допоміжні речовини і продовжують перемішування протягом 30 хв. Після вимкнення мішалки та обігріву желатинову масу залишають у реакторі протягом 1,5–2 годин з підключенням вакууму для видалення з маси бульбашок повітря. Готову масу фільтрують і передають для стабілізації в термостатовану ємність із контролем температури, витримують при 45–60 °С (залежно від концентрації) протягом 2,5–3,0 годин. Перед початком капсулювання контролюють в'язкість маси. Така технологія пов'язана із високою концентрацією желатину і зазвичай застосовується для отримання м'яких капсул.

Для другого методу в реактор вносять розрахований об'єм води очищеної і прогрівають до 70–75 °С. У нагрітій воді послідовно розчиняють консерванти, пластифікатори та інші допоміжні речовини, після чого завантажують желатин при увімкненій мішалці. Перемішують до повного розчинення. Далі проводять процес аналогічно першому методу.

Процес капсулювання проходить переважно в умовах термостатування желатинової маси при постійній температурі 40–45 °С.

М'які желатинові капсули в промислових умовах виробляються двома методами: крапельним і пресуванням.

«Крапельний метод» оснований на явищі утворення желатинової капсули з одночасним включенням в неї рідкої лікарської речовини, що досягається застосуванням двох концентричних форсунок. Розчинена желатинова маса надходить трубопроводом, який обігривається, у жихлерний вузол, який являє собою конічну трубчасту форсунку, звідки виштовхується, утворюючи «напівкраплю». Одночасно через дозуючий пристрій подається лікарський засіб, який заповнює капсулу в результаті двофазного концентрованого потоку за допомогою пульсатора, який являє собою систему для формування, охолодження і перемішування капсул. Сформовані капсули подають в охолоджене масло (14 °С), зазнаючи кругову пульсацію, вони набувають кулястої форми. Капсули відокремлюють від масла, промивають і сушать в спеціальних камерах (швидкість потоку повітря 3 м/с). Метод характеризується повною автоматизацією і високою продуктивністю від 28 до 100 тисяч капсул на годину. Метод обмежується розміром капсули до 300 мг.

М'які желатинові капсули використовують для жиророзчинних вітамінів А, Е, Д, К і неводних розчинів нітрогліцерину, валідолу, ментолу та ін. На цих капсулах відсутній шов.

«Метод пресування» полягає в отриманні желатинових стрічок, з яких штамнуються капсули. Отримані таким чином капсули мають горизонтальний шов. Дві безперервні желатинові стрічки, отримані шляхом пропускання через систему охолоджуваних роликів, подаються на барабани, що обертаються з протилежних боків. На поверхні барабана є матриці, на яких формують половину форми одержуваних капсул. Стрічки з желатину точно повторюють форму матриці та в міру того як протилежні форми матриці проходять через отвір клиновидного пристрою, проводиться дозування вмісту капсул. Цей метод отримав назву «ротаційно-матричного».

Для надання капсулам привабливого товарного вигляду або для захисту активних речовин від фітохімічних реакцій до складу желатинової маси вводять корегуючі допоміжні речовини.

Залежно від використовуваного барвника та пігментів, капсули поділяють: на натуральні прозорі, забарвлені прозорі, забарвлені непрозорі, двоколірні прозорі або непрозорі, поєднання прозорих і непрозорих частин. Колір –

один з найнадійніших способів ідентифікації ліків, однак він не повинен нести в собі фактор ризику.

Тверді желатинові капсули для забезпечення «замка» можуть мати спеціальні канавки і виступи.

Тверді желатинові капсули отримують методом «занурення». Суть методу полягає в тому, що формування оболонки здійснюється за рахунок занурення охолоджених, змазаних маслом рам зі штифтами в готову капсульну масу. Циліндричні форми – штифти на рамі утримувача занурюються за допомогою автоматичного пристрою в желатинову масу і, обертаючись навколо своєї осі, піднімаються, даючи стекти надлишку маси. Правильний розподіл желатинової плівки забезпечується точним регулюванням швидкості обертання рами, в'язкістю желатину і глибиною опускання. В результаті капсули мають однорідну стінку певної товщини. Отримані оболонки піддаються сушці при температурі повітря 26–27 °С і відносній вологості 45–50 %, а потім при температурі 18 °С до залишкової вологості 10–15 %. Із сушильної установки капсули подаються до автоматичного вузла, де оболонки капсул спочатку підрізають протакційним ножем, а потім знімаються механічними лапками і подаються до блоку комплектації. На автоматі для наповнення капсули наповнюють від 20 до 150 тис./год.

Активні речовини, інкапсульовані в тверді желатинові капсули, повинні відповідати таким вимогам: вміст має звільнитися з капсул, забезпечуючи високу біодоступність; при використанні автоматичних наповнювальних машин речовина має мати певні фізико-хімічні та технологічні властивості, такі як певна вологість і форма частинок; однорідність розміру частинок; вміст вологи; гомогенність суміші багатокomпонентного складу; здатністю до компактного формування під тиском.

Хотілося б зупинитися на питанні, так званих вегетаріанських капсул. Вегетаріанські капсули зареєстровані у фармакопеях США, Великобританії, Японії, Китаю. Сировиною для отримання вегетаріанських капсул служить гіпромелоза – напівсинтетичний продукт, який включає оболонку із целюлози. Інший матеріал, з якого виробляють вегетаріанські капсули, – це пуллулан – полісахаридний полімер, який одержують з крохмалю на основі гриба *Aureobasidium pullulans*. Ці капсули не мають в своєму складі гелеутворюючих компонентів і

ряду додаткових допоміжних речовин. Вегетаріанські капсули стабільні до змін зовнішнього середовища (рН, підвищена температура, підвищена вологість та ін.). Світовий лідер компанія Capsugel (США) випускає желатинові та вегетаріанські капсули. Популярною є двосекційна капсула Coni-Snap, а також капсули на рослинній основі Vcapsu і VcapsuPlus.

Практичне застосування отримали тверді капсули із рідким вмістом, які містять найчастіше вітаміни. Для запобігання витіканню проводять герметичне запечатування місця з'єднання корпусу і кришечки. Цього досягають різними способами: механічним, термічним, ультразвуковим зварюванням, нанесенням плівкового покриття на поверхню капсули та ін. Метод штампування – від 3 до 76 тис. капсул на годину.

«Крапельний метод» – метод, який виник у 60-ті роки ХХ століття. Принцип його полягає у витісненні під тиском з концентричної трубчастої форсунки одночасно розплавленої оболонки та рідкого наповнювача, який заповнює капсулу в результаті двофазного концентричного потоку, запечатування капсули відбувається за рахунок природного поверхневого натягу желатину.

Для м'яких желатинових капсул як пластифікатор використовують сорбітол: Sorbitol special, Sorbitol special MDF 85, призначений для зволоження, і пластифікатор для оболонки капсули – для забезпечення м'якості та пластичності, що робить капсулу стабільною. Ці якості необхідні для м'яких желатинових капсул, в яких використовується поліетиленгліколь (ПЕГ) як наповнювач для розчинення або суспендування лікарського засобу. Оскільки сорбітол не розчиняється в ПЕГ, він не буде вилугувати в ПЕГ наповнювачі капсул на відміну від гліцерину. Використовуючи сорбітол, вміст вологи в оболонці капсули добре регулюється і можна уникнути її руйнування. При розробці м'яких желатинових капсул матриця складається з желатину, води і пластифікатора. Співвідношення води до сухого желатину – від 0,7:1 до 1,3:1 залежно від вологості желатину. Початковий рівень використовуваного пластифікатора становить 20 %, але може змінюватися в межах ± 10 %, що дозволяє зробити м'яку желатинову капсулу більш м'якою або більш твердою.

Таблиця 5.1 – Перелік допоміжних речовин у складі капсульних препаратів

Назва компоненту	Функція компоненту в препараті	Речовини, які використовуються
1	2	3
Пластифікатори	Забезпечують м'якість та пластичність оболонки капсули, забезпечуючи її стабільність. У твердих желатинових капсулах міститься 0,3–1,0 % пластифікаторів, в м'яких – 20–40 %. Залежно від кількості пластифікатору капсулу можна зробити більш м'якою або більш твердою	Сорбіт, ПЕО-400, ПЕГ, поліпропілен
Консерванти	Оскільки желатин є поживним середовищем для мікроорганізмів необхідно вводити до складу препарату консерванти	Ніпагін (0,1–0,5 %), ніпазол (0,2 %), сорбінова кислота (0,1–0,2 %), суміш саліцилової кислоти (до 0,12 %) і калію (натрію) метабісульфіту (до 0,2 %), кислота бензойна і натрію бензоат (0,05–0,1 %)
Дезінтегратори	Використовують для збереження показника розпадання капсул при тривалому зберіганні	Амінокислоти, протеїни, казеїн, кроскармелоза, твін гідрокарбонат натрію та ін.
Модифікатори	Використовують при необхідності надати капсулам нових властивостей, наприклад, створення кишковорозчинної форми. Можна наносити покриття, як на капсули, так і безпосередньо на гранули, пелети, мікрокапсули. Нанесення плівкових покриттів проводять на готову і заповнену капсулу.	Для покриття капсул використовують спеціальні суміші, основним компонентом яких найчастіше є шелак, похідні целюлози (прості або складні ефіри) поліметакрилат, сополімери (стиролу і малеїнової кислоти, вінілацетат капронової кислоти) природні воски, альгінат натрію та ін.
Пролонгатори	Використовують для надання пролонгованих властивостей. Для капсул зазвичай застосовують комбінації речовин, що перешкоджають швидкому вивільненню діючих компонентів лікарської форми	Акрилові полімери, похідні целюлози (МКЦ, оксилпропіл-МЦ та ін.)

Продовження таблиці 5.1

1	2	3
Ковзні речовини	Використовують при необхідності покращення властивостей наповнювача	Аеросил (0,1–0,3 %); магній стеарат разом з тальком (0,5–1,0 %), D-маніт, D-сорбіт, ксиліт
Водопоглинаючі	Вводять до складу капсульної маси для запобігання можливості поглинання вологи з оболонки капсул гігроскопічними речовинами	Поліпептиди, олігосахариди, похідні крохмалю
Коректори смаку	Враховуючи, що ряд лікарських субстанцій мають неприємний смак (наприклад, антибіотики), до складу препарату вводять речовини, які покращують смак	Цукровий сироп, сахароза, глюкоза
Коректори кольору	Для надання кольору оболонкам капсул вводять барвники, які дозволені для медичного застосування	Еозин, еритрозин, кислотний червоний 2С, індиго. З пігментних барвників – оксид заліза, білий пігмент двоокису титану. Для захисту від світла для світлочутливих речовин використовують кольори: червоний, чорний, зелений, блакитний, оранжевий і коричневий, які найбільш підходять для захисту речовин від впливу світла. Використовують природні речовини: кармінова кислота, хлорофіл, β-каротин
Ароматизатори	Вводять при необхідності покращити запах препарату	Ефірні масла, фруктові есенції

5.3. Використання капсул з продуктами біотехнології

До продуктів біотехнології належить велика група препаратів, отриманих за допомогою використання мікробного синтезу, методів виділення та очищення. Ці продукти поміщають у капсули різного складу. Сьогодні добре зарекомендував себе ряд лікарських препаратів в капсульній формі: антибіотики, пробіотики, ферментні препарати, вітаміни, амінокислоти та ін. Склад капсул і тех-

нологія їх виготовлення, перш за все, залежить від фізико-хімічних властивостей субстанції, що використовується, її вологості та методу одержання. Це підтверджується тим, що навіть антибіотики з одним АФІ, одні й ті ж штами пробіотиків та інші продукти, що мають однакову фармакологічну дію отримані у вигляді капсул різного складу.

У таблиці 5.2 наведено характеристику капсул, які містять штами пробіотиків.

Таблиця 5.2 – Характеристика твердих желатинових капсул, які містять штами пробіотиків

Назва препарату	Вид капсул	Діюча речовина	Допоміжні речовини	Склад оболонки
1	2	3	4	5
Лінекс, Sandos, Німеччина, вироблено Польща / Словенія	Для прийому <i>per os</i> , білого кольору, заповнені порошком жовтого кольору і допоміжними речовинами	Ліофілізовані штами <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> .	Лактоза, крохмаль картопляний, декстрин, магнію стеарат	Титану діоксид, желатин
Лінекс-комплекс, Sandos, Німеччина	Для прийому <i>per os</i> , білого кольору, наповнені порошком жовтого кольору і допоміжними речовинами, кислотостійкі	Ліофілізований штам <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , рибофлавін, тіаміну гідрохлорид, піридоксину гідрохлорид, цинку глюконат	Полісахариди, мальтодекстрин кукурудзяний, ГПМЦ	Титану діоксид, желатин
Біоселак, Rotapharm Limited, Велика Британія	Інтравагінальні, білого кольору, наповнені порошком бежево-кремового кольору і допоміжними речовинами	Ліофілізовані штами <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 573	Молоко знежирене, сахароза, натрію глютомат, крохмаль картопляний, магнію стеарат, маніт	Титану діоксид, желатин

Продовження таблиці 5.2

1	2	3	4	5
Ентерожерміна, Doppel Farmaceutici, Італія	Для прийому <i>per os</i> , білого кольору, наповнені порошком світло-жовтого кольору і допоміжними речовинами	Ліофілізовані спори полірезистентного штаму <i>Bacillus clausii</i> .	Целюлоза мікрокристалічна, каолін, магнію стеарат	Титану діоксид, желатин
Біфіформ, Phizer, Австрія	Для прийому <i>per os</i> , білого кольору, наповнені порошком жовтого кольору і допоміжними речовинами, кислотостійкі	Ліофілізовані штами <i>Lactobacillus acidophilus NCFM</i> , <i>Lactobacillus paracasei Lpc-37</i> , <i>Bifidobacterium lactis Bi 07</i> , <i>Bifidobacterium lactis Bi04</i>	Наповнювач – глюкоза безводна, стабілізатор ГПМЦ, дезінтегратор – магнієві солі жирних кислот	Титану діоксид, желатин
Ентерол, Bicodex, Франція	Для прийому <i>per os</i> , білого кольору, наповнені порошком світло-жовтого кольору і допоміжними речовинами	Ліофілізовані штами <i>Saccharomyces boulardii</i>	Лактоза, магнію стеарат, фруктоза	Титану діоксид, желатин
Біо-Фімейл, Sup Herb, Ізраїль	Для прийому <i>per os</i> , білого кольору, наповнені порошком світло-жовтого кольору і допоміжними речовинами	Ліофілізовані штами <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Фруктоолігосахариди, магнію стеарат, ГПМЦ	Титану діоксид, желатин

Показаннями для призначення цих препаратів є лікування і профілактика ряду захворювань: діареї вірусної і бактеріальної етіології, синдрому подразнення кишечника, дисбактеріозу і запальних захворювань кишечника, розлад кишечника, порушення мікрофлори піхви. Препарати захищають від розвитку

патогенних мікроорганізмів. У наш час для застосування *per os* використовуються три види препаратів: рідкі у вигляді крапель (Хілак), порошки та ліофільновисушені препарати (Біфідумбактерин, Лактобактерин, Біфікол та ін.), а також капсули. Як приклад ще однієї форми наводимо препарат Флувір – порошок-саше, що містить 5 штамів по 2,5 млрд життєздатних бактерій кожного штаму: *Lactobacillus plantarum* – 2 штами; *Lactobacillus rhamnosus* – 2 штами, *Bifidobacterium lactis* – 5,0 млрд; допоміжні компоненти: фруктоолігосахаріди (пребіотики) – 300 мг, картопляні мальтодекстрини – 322 мг, нерозчинна клітковина – 225,9 мг, діоксид кремнію – 7,1 мг (виробник – Delta Medical Promotions, Швейцарія). Певна частина прийнятих людиною рідких і сухих продуктів гине, потрапляючи у середовище шлункового соку. Тільки пробіотичні штами в інкапсульованому вигляді зберігають свої морфологічні та біохімічні властивості, особливо поміщені у кислотостійкі капсули. Для пробіотиків використовують також вегетаріанські капсули, наприклад, штам *Acidophilus bifidus* – 60 капсул в упаковці, Канада.

Найчисленнішою групою препаратів біотехнологічного походження є антибіотики. У таблиці 5.3 представлені капсульні форми лікарських препаратів, отриманих шляхом мікробного синтезу, що містять антибіотики.

Таблиця 5.3 – Характеристика желатинових капсул, які містять антибіотики різної дії

Назва препарату	Вид капсул	Діюча речовина	Допоміжні речовини	Склад оболонки капсул
1	2	3	4	5
Тобраміцин, Тобі Подхалер, Novartis, Франція	Тверді прозорі	Тобраміцин – продуцент <i>Streptomyces tenebrarius</i>	Кислота сірчана, дистеароїлфосфатиділ-холін, кальцію хлорид	Гіпромелоза, карagenан, вода, натрію хлорид, друковані чорнило сині, (шеллак, алюмінієвий лак на основі індігокарміна, титану діоксиду, макрогол), віск карнаубський, желатин

Продовження таблиці 5.3

1	2	3	4	5
Циклосерин, Щелківський вітамінний завод, Росія	Тверді непрозо- рі, корпус – бі- лий, кришка – синя.	Циклосерин <i>Streptomyces orchidacens</i>	Тальк, магнію оксид легкий, магнію оксид важкий	Барвник жовтий «захід сонця», барв- ник хіноліновий жовтий, титану ді- оксид, желатин
Рифампіцин, Борщаговський ХФЗ, Україна	Тверді, оболон- ка оранжево- червона	Рифампіцин– <i>Streptomyces mediterranei</i>	Магнію карбо- нат, кальцію сте- арат, лактоза	Титану діоксид, же- латин, жовтий «за- хід сонця», лонсо
Такролімус, Medak, Німеччина	Тверда, корпус білий, кришка – жовта	Такролімус – <i>Streptomyces tsukubaensis</i>	Лактоза, винна кислота, гіпро- мелоза, кроскар- мелоза натрію, кремнію діоксид колоїдний, маг- нію стеарат	Корпус: титану ді- оксиду 2 %, жела- тину до 100 %; кришка: титану ді- оксид, 1.33, барвник жовтий хіноліновий 0,92 %, фарбник «захід сонця» 0,0044 %, желатин до 100 %
Неоміцин, Ністатин, Поліміксин В, Поліжинакс, Іннотек, Франція	М'які желати- нові, світло- жовтого ко- льору, інтрава- гінальні	Неоміцин – <i>Streptomyces fradiae</i> ; Ніста- тин – <i>Strepto- myces neurse</i> ; Поліміксин В – <i>Bacillus po- lymyxa</i>	Соева олія гідро- генізована, Тефоз 63, диметикон	Желатин, гліцерол, диметикон

Антибіотики представлені на світовому фармацевтичному ринку різним асортиментом лікарських форм: розчини і суспензії для ін'єкцій, супозиторії, мазі та група препаратів для орального прийому – таблетки і капсули. Антибіотики у формі капсул мають істотні переваги перед таблетками: їх легко ковтати, вони не подразнюють слизову оболонку шлунка, усувають неприємний смак і запах діючих речовин, дозволяють контролювати вивільнення діючої речовини, збільшуючи його ефективність, скорочують кількість допоміжних речовин, перебуваючи у вигляді порошку або гранул дозволяють діючій речовини значно

швидше розчинятися і т.д. Крім того, капсули дозволяють створювати комплексні препарати, які містять антибіотики різної дії з високою фармакологічною активністю, наприклад, капсули з поліміксином В, ністатином і неоміцином. Представлені антибіотики використовуються для боротьби з бактеріальними і грибковими інфекціями. Необхідно зазначити (табл. 5.3), що Такролімус (Medak, Німеччина) є імуносупресором і належать до макролідів. Його відкрито японськими вченими в 1987 році і використовують для профілактики відторгнення алотрансплантантів, резистентних до іншої імуносупресорної терапії.

За останні роки запропоновані препарати для імунопрофілактики інфекційних захворювань у формі капсул, в яких містяться полікомпонентні вакцини з антигенів умовно-патогенних мікроорганізмів (табл. 5.4)

Таблиця 5.4 – Характеристика капсул, які містять бактеріальні лізати (вакцини) – стимулятори імунної системи

Назва препарату	Вид капсул	Діюча речовина	Допоміжні речовини	Склад оболонки
Бронхо-Ваксом	Тверді желатинові, непрозорі білого кольору з блакитною кришкою	Ліофілізовані бактеріальні лізати: <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> і <i>ozaenae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> і <i>viridans</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> .	Пропілгалат безводний, натрію глутамат, маніт, крохмаль кукурудзяний модифікований, магнію стеарат	Індигодин, титану діоксид, желатин
Бронхо-Мунал, Lek Pharmaceuticals, Словенія	Тверді желатинові, непрозорі білого кольору з блакитною кришкою	Ліофілізовані бактеріальні лізати: <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> і <i>ozaenae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> і <i>viridans</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> .	Пропілгалат безводний, натрію глутамат, маніт, крохмаль кукурудзяний модифікований, магнію стеарат	Індигодин, титану діоксид, желатин

Одним з продуктів біотехнології є вітаміни, отримані за допомогою штамів-продуцентів: В2 (рибофлавін), В12 (ціанокобаламін), D (ергокальциферол), β -каротин, С (аскорбінова кислота), РР (нікотинова кислота) та ін. Крім вітамінів, у капсули вводять амінокислоти, фосфоліпідні компоненти, мікроелементи та ін. (табл. 5.5).

Таблиця 5.5 – Характеристика капсульних форм, що містять вітаміни і амінокислоти

Назва препарату	Вид капсул	Діюча речовина	Допоміжні речовини	Склад оболонки капсул
1	2	3	4	5
Моріаміна форте, Шаньчжень Ваньхе, Китай	Тверді капсули з корпусом білого кольору і темно-червоною кришкою	Вітаміни: С, В2, В12, фолієва кислота, D, ретинол, нікотинамід, тіамін, α -токоферол, Са-пантеонат; амінокислоти: лейцин, ізолейцин, лізин, фенілаланін, треонін, триптофан, валін, метіонін	Крохмаль картопляний, лактоза, МКЦ, кармелоза кальцію, діоксид титану, МЦ, макрогол, алюмінію силікат, барвник азорубін, барвник хіноліновий жовтий, барвник коричневий шоколадний	Корпус (титану діоксид, метилпарагідробензоат, пропілпарагідробензоат, оцтова кислота, желатин); кришка (титану діоксид, метилпарагідробензоат, пропілпарагідробензоат, желатин, барвник коричневий темно-червоний шоколадний)
Ліпорин, Індія	М'які желатинові капсули	Вітаміни: Е, В1, В2, В12, піридоксину гідрохлорид, фолієва кислота, вітамін К, Zn-сульфату моногідрат, селен в формеселен-L-метіоніну, есенціальні фосфоліпідни, силімарин, жир печінки тріски.	Рослинна олія гідрогенізована, очищена соєва олія, кремнію діоксид колоїдний безводний, МКЦ	Желатин, гліцерин, рідкий сорбітол, титану діоксид

Продовження таблиці 5.5

1	2	3	4	5
Аевіт, Білорусь	М'які желатинові капсули, з розчином від світло-жовтого до темно-жовтого кольору	Вітаміни А (ретинолу пальмітат) та Е	Олія соняшникова, метилгідроксibenzoлат	Желатин, гліцерин
Омега ПНЖК, Solgar, США	М'які желатинові капсули, з розчином світло-жовтого кольору	Риб'ячий жир (Омега 3,6,9 ПНЖК жирні кислоти): аліолева кислота Омега 3; ейкозопентанова кислота Омега 3; докозагексанова кислота, ліолева кислота Омега 6; гамма-ліолева кислота Омега 6; олеїнова кислота Омега 9	Масло бураника, масло льняне, вітамін Е – антиоксидант	Желатин, гліцерин

Відомі капсули, які містять амінокислоти: гліцин, триптофан, валін та ін. Капсули «Моріамін форте» (табл. 5.5) містять комплекс вітамінів і амінокислот і використовуються для поповнення дефіциту амінокислот і вітамінів при різних патологічних станах. Із зазначених діючих та допоміжних речовин отримані прозорі гранули різного кольору: жовтуватого, червоно-рожевого, оранжевого, темно-коричневого і білого. Цікавий препарат «Ліпорин», до складу якого входять вітаміни, мікроелементи і стабілізатори мембран, зокрема, печінки – есенціальні фосфоліпіди. Добре відомі м'які желатинові капсули, що містять жиророзчинні вітаміни: А, Е, D, β-каротин та ін., як у вигляді монопрепаратів, так і вигляді комплексних лікарських препаратів. У комплексі з ліпофільними вітамінами випускають розчини жирних кислот, наприклад, Омега-кислот у м'яких желатинових капсулах. Зазначені продукти використовують при дефі-

циті в організмі вітамінів, жирних кислот, мікроелементів, фосфоліпідів та інших фармакологічно-активних компонентів. У 2004 році FDA США підтвердила зниження ризику розвитку ішемічної хвороби серця у пацієнтів, які приймали поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) Омега 3,6,9.

Особливий інтерес становлять бактеріофаги. Вчені Росії (концерн «Имуноген») в 2018 році розробили перший в світі бактеріофаг у капсульній формі. Капсули містять комплекс бактеріофагів у ліофілізованому вигляді (склад капсул не наведено). Отримані капсули можуть використовуватися для лікування захворювань, викликаних одночасно декількома збудниками: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*. З огляду на те, що в наш час бактеріофаги використовуються для лікування кишкових інфекцій в формі суспензій для перорального прийому, використання цих інкапсульованих в оболонку бактеріофагів дозволить надати запропонованому продукту більшої ефективності.

Широко застосовуються препарати, які покращують засвоєння їжі, розвантажуючи підшлункову залозу, покращують роботу кишечника. Препарати містять переважно ферменти: амілазу, ліпазу і протеазу в різних співвідношеннях (табл. 5.6).

Таблиця 5.6 – Характеристика твердих капсул, які містять ферментні препарати

Назва препарату	Вид капсул	Діюча речовина	Допоміжні речовини	Склад оболонки капсул
1	2	3	4	5
Ерміталь, Nordmark Azzneimettel Gmbh, Німеччина	Кишково-розчинні, желатинові	Ліпаза, амілаза, протеаза	Вміст капсул: МКЦ, кросповідон, кремнію діоксид колоїдний безводний, магнію стеарат; Плівкове покриття: сополімер метакрилової кислоти і етакрилату (1: 1), триетилцитрату, тальку, симетикону 1000, полірувальна речовина – монтангліколевий віск	Кришки складаються з желатину, оксиду заліза чорного і оксиду заліза червоного, лаурилсульфату натрію, титану діоксиду; корпус: желатин, лаурилсульфат натрію

Продовження таблиці 5.6

1	2	3	4	5
Креон, Abbot Laboratories GmbH, Німеччина	Кишково-розчинні, желатинові, прозорий безбарвний корпус, коричнева, непрозора кришка	Ліпаза, амілаза, протеаза	Вміст капсул: Макрогол 400, гіпрофеллози фталат, спирт цетиловий, триетилцитрат, Симетикон 1000.; Плівкове покриття: сополімер метакрилової кислоти і етакрилату (1:1), триетилацетат	Желатин, заліза оксид, титану діоксид та лаурилсульфат натрію
Пангрол, Berlin Chemie, Німеччина	Кишково-розчинні, желатинові, непрозора жовто-зелена кришка і непрозорий світло-оранжевий корпус	Ліпаза, амілаза, протеаза	Вміст капсул: МКЦ, натрію кроскармелоза, касторове масло гідратована, кремнію діоксид колоїдний, магнію стеарат, ПЕГ-стеарат, моно-ди-і тригліцеридів, кислоти бензойної, натрію хлорид, води очищеної, кислоти сорбінової, кислота сірчана, октаметил циклотет расілікону; Плівкове покриття: сополімер метакрилової кислоти і етакрилату (1: 1)	Заліза оксид жовтий, заліза оксид червоний, желатин
Vital-Zymes forte, Klaize Labs, США	Капсули вегетаріанські, безбарвні	Рослинні компоненти і мікробні ферменти: амілаза, α -амілаза, глюкоамілаза, лактази, мальтаза, пуллуназа, пектиназа, фітаза, протеази: кисла і лужна; ліпазата ін.	L-лейцин, целюлоза	ГПМЦ, вода

Активні фармакологічні інгредієнти цих препаратів отримані з тканин тварин за допомогою біотехнологічних або інших процесів, використовуючи мікробний синтез, з подальшим виділенням і очищенням компонентів. Звертає на себе факт використання різних допоміжних компонентів для отримання вмісту капсул. З наведених у таблиці 5.6 активних фармакологічних інгредієнтів і допоміжних речовин отримують мінітаблетки (гранули), які покривають плівковим покриттям. Оброблені гранули вносять в капсулу. Капсули наповнені світло-коричневими блискучими гомогенними мінітаблетками. Важливим фактом є можливість використання рослинних компонентів для отримання вегетаріанських капсул, виключаючи тваринний компонент – желатин.

5.4. Контроль капсул

Відповідно до вимог ДФУ капсули повинна відповідати таким вимогам:

1. Однорідність дозованих одиниць (відхилення в кількості діючих речовин повинні складати при дозуванні: 1 мг ($\pm 15\%$), від 1 до 10 мг ($\pm 10\%$), від 10 до 100 мг ($\pm 7,5\%$), від 100 і вище ($\pm 5\%$))

2. Розчинність – випробування повинно бути проведено для підтвердження відповідного вивільнення діючої речовини або речовин. Контроль за тим, чи не модифіковані капсули (тверді і м'які) проводять, поміщаючи їх в рідке середовище. Для цього використовують воду або 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої або штучний шлунковий сік. Використовують диски. Включають прилад на 30 хвилин, а потім досліджують стан капсул – капсули не повинні змінювати форму і прилипати до дисків.

3. Капсули кишково-розчинні з модифікованим вивільненням повинні бути стійкі до дії шлункового соку і вивільняти діючу речовину або речовини в кишковому соці. Вони можуть бути виготовлені шляхом покриття твердих або м'яких капсул кислотостійкою оболонкою або шляхом заповнення капсул гранулами або частинками, покритими кислотостійкою оболонкою. Для капсул, заповнених гранулами або частинками з кислотостійкою оболонкою, проводять визначення вивільнення діючої речовини або речовин.

Для капсул з кишково-розчинною оболонкою проводять випробування у спеціальних середовищах: 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої. Час стійко-

сті в кислому середовищі коливається від 2 до 3 годин залежно від складу досліджуваних капсул, але не менше 1 години. Може бути використаний буферний розчин (рН 6,8) з додаванням панкреатину (0,35 % розчин). Капсули повинні залишатися непошкодженими і не прилипати до дисків.

4. Мікробіологічна чистота.

5. Маркування: вказують назву всіх антимікробних консервантів, що входять до складу препарату.

Контрольні запитання

1. Навести визначення, класифікацію та характеристику капсул.
2. Які властивості твердих та м'яких желатинових капсул Вам відомі?
3. Як одержують тверді та м'які желатинові капсули?
4. Навести переваги та недоліки капсул як лікарської форми.
5. Які критичні стадії входять до виробництва капсульної форми?
6. Які методи виготовлення капсул (крапельний метод та метод пресування)?
7. Навести вимоги до АФІ, що входять до капсул.
8. Що розуміють під вегетаріанськими капсулами?
9. Які допоміжні речовини входять до складу капсул. Навести їх властивості (пластифікатори, модифікатори, пролонгатори, ароматизатори, корегуючі речовини, коректори смаку та кольору)?
11. Які продукти біотехнології використовують для інкапсулювання? Переваги капсульної форми для біотехнологічних речовин?
12. Які капсульні форми відомі (антибіотики, вітаміни)?
13. Які капсульні форми відомі (стимулятори імунної системи, амінокислоти, ферменти)?
14. Які вимоги ДФУ до контролю капсул?

Список джерел інформації

1. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.

2. Перцев І.М. Допоміжні речовини в технології ліків / І.М. Перцев, Д.І. Дмитревський, В.Д. Рибачук та ін. – Харків: Золоті сторінки, 2010. – 599 с.
3. Чуешов В.И. Технология лекарств промышленного производства / В.И. Чуешов, Е.В. Гладух, И.В. Сайко и др. – Винница: Нова книга, 2014. 696 с.
4. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, М.И. Борщевская. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.
5. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология биологически активных веществ: учебное пособие. Часть 1. / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев – Харьков: НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.
6. Рубан Е.А. Практикум по промышленной технологии лекарственных средств / Рубан Е.А., Д.И. Дмитриевский, А.И. Хохлова и др. – Харьков: НФАУ, 2016. – 389 с.
7. Медетханов Д.Д. Изготовление лекарственных форм / Д.Д. Медетханов, А.П. Овсянников, Д.Д. Хайруллин. – Казань: Центр инновационной технологии, 2016. – 123 с.
8. Настанова СТ-Н міністерства охорони здоров'я 42-4.0. 2016. «Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Затверджено наказом МОЗ від 29.07. 2016.
9. Гладышев В.В. Биофармация: учебник для фармацевтических вузов и факультетов / В.В. Гладышев, И.А. Бирюк, И.Л. Кечин – Дніпро: ЧНП «Економика», 2018. – 250 с.

ГЛАВА 6. ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ У ФОРМІ ТАБЛЕТОК

6.1. Загальна характеристика таблеток

Таблетки – тверда лікарська форма, що містить одну дозу одного або більше АФІ. Таблетки отримують шляхом пресування, висушування, екструзії певного об'єму частинок. Таблетки призначені для орального застосування. При прийомі таблетки ковтають або в цілому вигляді, або в розжованому. Ряд таблеток розчиняють або диспергують у воді перед ковтанням або залишають у роті, де АФІ виділяється. Крім АФІ, в таблетки вводять речовини: зв'язуючі, розпушувачі, ковзні, що приводять до пролонгованої дії; фарбники та ароматизатори, дозволені до медичного застосування. За геометричною формою таблетки бувають круглі, циліндричні з плоскою верхньою і нижньою поверхнею, випуклі, зі скошеними краями. На поверхні таблеток можуть бути нанесені штрихи, риски поділу, написи і т.д.

Таблетки для прийому *per os* класифікують:

- 1) на таблетки без оболонки;
- 2) таблетки, вкриті оболонкою;
- 3) таблетки «шипучі» (таблетки без оболонки, основну масу яких становлять кислоти, гідрокарбонати, карбонати, які швидко реагують в присутності води з виділенням вуглекислого газу; ці таблетки призначені для розчинення або диспергування у воді перед використанням);
- 4) таблетки дисперговані (таблетки без оболонки або таблетки, вкриті плівковою оболонкою, які перед застосуванням диспергують у воді до отримання гомогенної суспензії);
- 5) таблетки дисперговані в ротовій порожнині (таблетки без оболонки, які поміщають в ротову порожнину, в якій вони швидко диспергуються до проковтування);

б) таблетки з модифікованим звільненням (таблетки, вкриті оболонкою або без оболонки, до складу яких входять спеціальні допоміжні речовини або виготовлені спеціальними методами, які призначені для регулювання швидкості, місця або часу вивільнення АФІ; до них належать таблетки з пролонгованим, відстроченим і пульсуючим звільненням) ;

7) таблетки кишково-розчинні (таблетки з відстроченим звільненням, які повинні бути стійкими в шлунковому соку; ці таблетки виготовляють покриттям ядер таблеток оболонкою, стійкою до шлункового соку (кишково-розчинною оболонкою) або виготовляють з гранул або частинок з попередньо нанесеною на них оболонкою стійкою до шлункового соку);

8) таблетки для застосування в ротовій порожнині (звичайні таблетки без оболонки, склад яких забезпечує повільне звільнення і місцеву дію АФІ, а також всмоктування АФІ в певних ділянках ротової порожнини);

9) оральні ліофілізати (тверда лікарська форма, призначена для поміщення в ротovu порожнину або диспергування (розчинення) у воді перед використанням; оральні ліофілізати отримують ліофілізацією).

Залежно від фізико-хімічних властивостей АФІ, їх дозування і методів виготовлення таблеток використовують ряд допоміжних речовин відповідно до їх призначення: розпушувачі, зв'язуючі, антифрикційні, коригенти, пластифікатори, пролонгатори, розчинники.

1. Розпушувачі (наповнювачі) застосовують для забезпечення необхідної маси таблеток, якщо до їхнього складу входить незначна кількість АФІ (0,01–0,001 г), а також при таблетуванні сильнодіючих, отруйних та інших речовин. З метою покращення біодоступності погано розчинних і гідрофобних АФІ використовують переважно водорозчинні розпушувачі. Розпушувачі додають до таблеток для покращення їх розпадання в середовищі шлунково-кишкового тракту і вивільнення АФІ для створення необхідно терапевтичного ефекту Розпушувачі можна використовувати з метою регулювання ряду технологічних показників (міцність, розпадання і т.д.). У «шипучих» таблетках як розпушуючі компоненти використовують газоутворюючу суміш натрію гідрокарбонату з кислотою винною або лимонною. Наповнювачі визначають технологічні властивості маси для таблетування і фізико-хімічні властивості готових таблеток. До групи розпушувачів можна віднести три групи речовин:

1) набухаючі – крохмаль (пшеничний, рисовий, картопляний, кукурудзяний), пектин, желатин, мікрокристалічна целюлоза (МКЦ), агар-агар, альгінова кислота, калію і натрію альгінати, аеросил, лактоза, поліплазони, що являють собою поперечно-зшиті полімери. До складу таблеток для розжовування вводять маніт, сорбіт, сахарозу;

2) газоутворюючі – суміш натрію гідрокарбонату з лимонною або винною кислотами;

3) речовини, які покращують змочуваність і водопроникність – крохмаль (пшеничний, рисовий, картопляний, кукурудзяний), сахароза, глюкоза, Твін -80.

При пресуванні лікарських речовин зменшується пористість і тим самим ускладнюється проникнення рідини всередину таблетки. Для покращення розпадання або розчинення застосовують розпушуючі речовини, що забезпечують механічне пошкодження таблеток у рідкому середовищі, яке необхідне для якнайшвидшого вивільнення АФІ. Розпушувачі додають до складу таблеток також в тому випадку, якщо препарат не розчиняється у воді або якщо таблетка здатна «твердіти» при зберіганні.

У разі прямого пресування суміші, наприклад, при використанні МКЦ вона може проявляти також зв'язуючі та покращуючі властивості. При цьому МКЦ завдяки високій хімічній чистоті і низькому вмісту вологи забезпечує отримання таблеток, що характеризуються високою хімічною стійкістю і стабільністю забарвлення. МКЦ випускається сьогодні низкою фірм, наприклад, марки Avicel (фірма Avicel PH): Avicel pH-101 і Avicel pH-102, що відрізняються розміром частинок 50 і 90 мкм відповідно. Avicel pH-101 використовують досить часто при виготовленні таблеток прямим пресуванням або з використанням вологого гранулювання. Avicel pH-102 покращує плинні властивості порошків, що сприяє повнішому заповненню матриці гранулятора в процесі таблетування. Зв'язуючі речовини використовують для грануляції і забезпечення необхідної міцності таблеток при пресуванні. Їх додають у вигляді розчинів або в сухому вигляді. Частинки більшості лікарських речовин мають невелику силу зчеплення між собою, тому при їх таблетуванні потрібно використовувати високий тиск. Останнє часто є причиною несвоєчасного зносу прес-інструменту таблеткової машини і, в результаті, отримання неякісних таблеток. Для досягнення необхідної сили зчеплення при порівняно невеликих тисках до таблето-

ваних речовин додають зв'язуючі речовини, які заповнюють простір між частинками, збільшують контактну поверхню частинок і когезійну здатність. Особливе значення мають зв'язуючі речовини при пресуванні складних порошків, які в процесі роботи таблеткової машини можуть розшаровуватися, що призводить до отримання таблеток з різним вмістом вхідних інгредієнтів. Застосування виду в'язуючих речовин та їх кількість залежать від фізико-хімічних властивостей пресованих речовин. До цих речовин можна віднести альгінову кислоту та її натрієві солі, бентоніти, гуміарабік, желатин, сахарозу, полівінілпіролідон (ПВП), природна камедь, макрогол, метилцелюлозу (МЦ), карбоксиметилцелюлозу (КМЦ), декстрин, полівініловий спирт. При отриманні таблеток методом прямого пресування як зв'язуючу речовину найчастіше використовують МКЦ.

2. Антифрикційні речовини (ковзні, змащувальні). Однією з проблем виробництва таблеток є отримання хорошої плинності грануляту в живильних пристроях (воронках або бункерах). Отримані гранули або порошок мають шорстку поверхню, що ускладнює їх всмоктування із завантажувальної воронки в матричні гнізда. Крім того, гранули можуть прилипати до стінок матриці і пуансонів внаслідок тертя, яке розвивається в контактних зонах із прес-інструментом таблеткової машини. Для усунення або зменшення цих небажаних явищ застосовують антифрикційні речовини, які представлені групою ковзних і змащувальних. Ковзні речовини, адсорбуються на поверхні частинок (гранул), усувають або зменшують їх шорсткість, підвищуючи їх плинність (сипкість). Найбільшу ефективність мають частинки сферичної форми. Більшість ковзних і змащувальних речовин є гідрофобними. До ковзних речовин можна віднести крохмаль, аеросил, тальк, ПЕО-400. До змащувальних речовин можна віднести масло какао, стеаринову кислоту та її кальцієві і магнієві солі. Допоміжні речовини уповільнюють швидкість розпадання таблетки і розчинення діючої речовини, тому не рекомендується перевищувати вміст полісорбату 80, кислоти стеаринової, кальцію або магнію стеарату більше 1,0 %, тальку – 3,0 %, аеросилу – 10 % від маси таблетки. Макрогол і натрію лаурилсульфат використовують як водорозчинні ковзні речовини. Змащувальні речовини полегшують виштовхування таблеток з матриці. Ці речовини називають також антиадгезивними або протисклеювальними. Функції змащувальних речовин спрямовані не тільки на

зниження тертя на контактних ділянках, а й на значне полегшення частинок внаслідок адсорбційного зниження їхньої міцності за рахунок проникнення до мікрощілин.

3. Коригуючі речовини додають до складу таблеток з метою покращення їх смаку, кольору і запаху. Барвники та коректори смаку використовують для надання таблеткам необхідного кольору і смаку. Речовини, що використовуються для нанесення оболонки діляться на кілька груп, залежно від методу покриття. При нанесенні цукрової оболонки використовують гуміараб'як, желатин, магнію карбонат, крохмаль, рослинні масла, МЦ, пшеничне борошно, кальцію стеарат, тальк, натрію альгінат, кальцію карбонат, магнію оксид, титану діоксид та ін. При нанесенні плівкової оболонки зазвичай використовують водорозчинні або дисперговані у воді речовини, такі, як ГПМЦ, МЦ, гідроксипропілцелюлоза (ГПЦ), Na-КМЦ, сополімери метакрилової кислоти та її ефіри, макрогол, ПВП. У деяких випадках використовують неводні розчинники. При нанесенні оболонки пресуванням використовують глюкозу, МКЦ та інші речовини. Барвники можна розділити на три групи: мінеральні пігменти (оксид титану, оксид заліза та ін.); барвники природного походження (хлорофіл, каротиноїди та ін.); синтетичні барвники (індигокармін, тартразин, кислотний червоний та ін.). Для корекції запаху застосовують ефірні масла, ментол, ванілін, концентрати фруктових соків. Для коригування смаку використовують ксиліт, маніт, цукор, глюкозу, фруктозу та ін.

4. Пролонгатори необхідні для створення пролонгованої дії таблеток. До цих речовин належать: білий віск, парафін, олія соняшникова, масло бавовняне, монопальмітин та ін.

5. Пластифікатори. Введення пластифікаторів дозволяє покращити еластичність покриття, зменшити утворення тріщин, знизити ризик механічних пошкоджень і потенційно покращити адгезію плівкового покриття до ядра. Як пластифікатори використовують гліцерин, твін 80, ПЕО-400, кислоту олеїнову та ін.

6. Розчинники. Як розчинники застосовують спирт етиловий, воду очищену, хлороформ, ацетон, соляна кислота, аміак та ін.

Для покриття таблеток використовують дисперсні покриття, до складу яких вводять полімер, барвник та / або пігмент, ковзні речовини. У наш час у

виробництві таблеток широко використовується покриття Opadry II. До складу даного покриття входить як плівкоутворювач – ГПМЦ; як пластифікатор – ПЕГ, що надає таблетці, крім пластифікуючого ефекту, блиск; трицетин, що характеризується як пластифікуючою дією, так і сприяє зменшенню утворення піни в процесі виготовлення суспензії; пігменти – титану діоксид, а також полісахариди: лактоза, мальтодекстрин, полідекстроза та ін. Перевагою використання Opadry II є швидкість і легкість виготовлення суспензії, а також відсутність у складі покриття консервантів і збільшення терміну придатності таблеток при використанні Opadry II. Існують модифікації покриття Opadry II, до складу якого вводять: спирт полівініловий, частково гідролізований тальк, макрогол, лецитин соєвий. Така модифікація використовується для отримання біотехнологічного продукту – антибіотику ністатину.

6.2. Технологія виробництва таблеток

Вибір оптимальної технологічної схеми виробництва таблеток залежить від фізико-хімічних і технологічних властивостей лікарських речовин, їх кількості у складі таблеток, стійкості до впливу факторів зовнішнього середовища. Відомі дві основні технології одержання таблеток: шляхом прямого пресування речовин і через попереднє гранулювання.

У наш час для отримання таблеток застосовують кілька методів, що складаються з різних технологічних стадій. :

1. Пряме пресування (стадії: подрібнення інгредієнтів, змішування інгредієнтів, таблетування, стадія А (контроль якості, фасування, упаковка, маркування)).

2. Суха грануляція (стадії: подрібнення інгредієнтів, змішування інгредієнтів, комплектування, подрібнення, калібрування, опудрювання, таблетування, стадія А).

3. Волога грануляція продавлюванням (стадії: подрібнення інгредієнтів, приготування зволожувача, змішування і зволоження інгредієнтів, волога грануляція, сушка гранул, калібрування, опудрювання, таблетування, стадія А).

4. Волога грануляція у високошвидкісному змішувачі грануляторі (стадії: подрібнення, приготування зволожувача, змішування, зволоження і грануляція, сушіння гранул, калібрування, опудрювання, таблетування, стадія А).

5. Структурна грануляція (стадії: подрібнення, приготування зволожувача, змішування, грануляція та сушка, калібрування, опудрювання, таблетування, стадія А).

6. Змішана грануляція (стадії: подрібнення, приготування зволожувача, змішування і зволоження інгредієнтів, сушка маси, суха грануляція, опудрювання, таблетування, стадія А).

Лікарські і допоміжні речовини просівають на машинах з вібраційним принципом дії. Останні роки на фармацевтичні підприємства надходить сировина в подрібненому і просіяному вигляді, тому його підготовка зводиться тільки до розфасовки і зважування.

Подрібнення використовується для досягнення однорідності змішування, усунення великих агрегатів в матеріалах, які грудкуються і склеюються, збільшення технологічних і біологічних ефектів. Подрібнення інгредієнтів приводить до певного збільшення міцності і числа контактів між частинками і в результаті до утворення міцних конгломератів. Використовуючи цю властивість, з деяких подрібнених компонентів методом обкатки можна отримати міцні гранули. Тонке подрібнення лікарських субстанцій, незважаючи на можливі переваги, не знайшло широкого застосування в технології виробництва твердих лікарських форм. Це обумовлено тим, що кристали являють собою жорстко сформовану структуру з максимальною свободою і високою внутрішньою енергією. Тому для їх руйнування потрібні значні зусилля. При цьому в системі кристалів одночасно з подрібненням посилюється тертя, яке зменшує прикладене зовнішнє навантаження до величин, здатних викликати тільки еластичну і незначну пластичну деформацію. Тому ефективність подрібнення, особливо в кристалічних речовинах з високою температурою плавлення, швидко падає. Для дрібного і тонкого подрібнення сировини застосовують дисмембратор і мікрмлини.

Змішування просіяних інгредієнтів (АФІ і допоміжні речовини) проводиться з метою досягнення однорідної маси і рівномірності розподілу діючої речовини в таблетках. Для змішування повинні застосовуватися змішувачі різних конструкцій: змішувачі з обертовим корпусом і змішувачі з обертовими

лопатями. До змішувачів з обертовим корпусом належать барабанні системи: циліндричний горизонтальний з діагональною віссю або похилий (типу «п'яної бочки»), двоконусні, кубічні та ін. В барабанних циліндричних горизонтальних змішувачах проводять змішування компонентів шляхом переміщення матеріалів по внутрішній поверхні барабана змішувача, зустрічаючи на своєму шляху лопаті, укріплені всередині камери змішувача. Піднімаючись на певну висоту, продукти перемішуються зверху вниз барабана. Відбувається інтенсивна циркуляція сипучого матеріалу, який вивантажують через завантажувальний люк змішувача.

У змішувачах типу «п'яна бочка» при кожному оберті барабана, що знаходиться під нахилом, продукт двічі пересипається на вертикальній площині, зміщуючись при цьому в осьовому напрямку, і тим самим забезпечується якісне і акуратне перемішування.

До змішувачів з обертовими лопатями належать лопатеві і стрічкові, придатні для перемішування як зв'язаних малорухомих сипучих, так і вологих пластичних мас. Робочими органами змішувачів можуть бути лопаті та спіральні стрічки, закріплені на валу.

При змішуванні подрібнених компонентів необхідно дотримуватися таких правил:

- 1) до більшої кількості додають меншу кількість;
- 2) отруйні та сильнодіючі речовини застосовуються в малих кількостях (0,01 г і менше), їх попередньо просівають через сита, додають до маси окремими порціями у вигляді тритурацій, тобто в розведенні з наповнювачем в концентрації 1:100;
- 3) забарвлені речовини і речовини з великою густиною завантажують в змішувач в останню чергу;
- 4) легколеткі ефірні масла вводяться в суху гранульовану масу перед пресуванням на стадії опудрювання, щоб уникнути їх випаровування.

Метод прямого пресування має ряд переваг: він дозволяє досягти високої продуктивності, значно скоротити час технологічного циклу за рахунок усунення ряду стадій і операцій, знизити собівартість. Пряме пресування дає можливість отримати таблетки з термолабільних і несумісних речовин. Однак сьогодні цим методом отримують незначну кількість таблеток. Це пояснюється

тим, що більшість діючих та допоміжних речовин не мають властивостей, які забезпечують безпосереднє пресування. До цих властивостей належать: ізодіаметрична форма кристалів, хороша плинність і пресованість, низька адгезивна здатність до прес-інструментів таблеткових машин. Пряме пресування – це сукупність різних технічних прийомів, що дозволяють покращити основні технологічні властивості таблетованого матеріалу (плинність і пресованість) і отримання з нього таблеток, минаючи стадію грануляції.

У теперішній час пряме пресування здійснюється:

- 1) шляхом безпосереднього таблетування сипучих лікарських речовин з хорошою пресованістю;
- 2) додаванням допоміжних речовин, які покращують технологічні властивості матеріалу;
- 3) з примусовою подачею таблетованого матеріалу із завантажувальної воронки таблеткової машини в матрицю;
- 4) з попередньою спрямованою кристалізацією пресованої речовини.

Велике значення для прямого пресування має величина, міцність частинок, пресованість, плинність, вологість та інші властивості речовин. Так для отримання таблеток з натрію хлориду придатною є довгаста форма частинок, а інша форма цієї речовини майже не піддається пресуванню. Максимальна плинність відзначається у крупнодисперсних порошків з рівноосьовою формою частинок і малою пористістю, таких, як лактоза, фенілсаліцилат та ін. Тому такі препарати можуть бути спресовані без попереднього гранулювання. Найкращими зарекомендували себе лікарські порошки з розміром частинок 0,5–1,0 мм, кутом природного укусу менше 42° , густиною після усадки більше 330 кг/м^3 , пористістю менше 37 %. Вони складаються з достатньої кількості ізодіаметричних частинок приблизно однакового фракційного складу (як правило, не містить великої кількості дрібних фракцій). Їх об'єднує здатність рівномірно висипатися з воронки під дією власної маси, тобто здатність мимовільного об'ємного дозування, а також досить гарна пресованість.

Однак переважна більшість лікарських речовин не здатні до спонтанного дозування внаслідок значного (понад 70 %) вмісту дрібних фракцій і нерівномірної поверхні частинок, що викликають тертя між частинками. У цих випадках додають ковзні допоміжні речовини. Таким методом отримують таблетки

вітамінів, алкалоїдів, глікозидів, аскорбінової кислоти, фенобарбіталу. Попередня спрямована кристалізація один з найскладніших способів отримання лікарських засобів, придатних для безпосереднього пресування. Цей спосіб здійснюється двома методами:

- перекристалізацією готового продукту в необхідних умовах;
- підбором певних умов кристалізації при синтезі продукту.

Застосовуючи цей метод, отримують кристали лікарської речовини з кристалами досить ізодіаметричної (рівноосьової) структури, яка здатна висипатися з воронки і внаслідок цього легко піддається мимовільному об'ємному дозуванню, що є неодмінною умовою прямої пресованості. Цим методом отримують таблетки кислоти аскорбінової і ацетилсаліцилової.

Для підвищення пресованості лікарських речовин при прямому пресуванні до складу порошкової маси вводять сухі речовини: МКЦ, макрогол, Плаздон S-630. Для покращення розпадання таблеток з МКЦ рекомендують додавати ультра-амілопектин. При прямому пресуванні показано застосування модифікованих крохмалів. Останні вступають у хімічну взаємодію з лікарськими речовинами, значно впливаючи на вивільнення і їхню біологічну активність. Часто використовують молочний цукор як речовину, що покращує сипучість, а також гранульований кальцію сульфат, який має гарну плинність і забезпечує таблетки достатньою механічною міцністю. Застосовують також циклодекстрин, що сприяє збільшенню механічної міцності таблеток та їх розпадання.

Оскільки основу твердих дисперсій підбирають таким чином, щоб вона мала гарну розчинність у воді, то вивільнення після розчинення матриці мікрокристалів і молекули АФІ мають значно більшу поверхню контакту з водою, і розчинність підвищується. Деякі АФІ проявляють кислотні або основні властивості, і, як наслідок, їхня розчинність буде залежати від рН середовища. Введення до складу рецептури солюбілізаторів, які проявляють властивості ПАВ, забезпечує формування навколо АФІ шару, який знижує хімічний потенціал молекули, отже, для досягнення рівності вільних енергій розчинів і АФІ необхідна його більш висока концентрація, тобто більша кількість АФІ розчиняється в такому ж об'ємі середовища. Для підвищення розчинності до складу рецептури можуть бути введені циклодекстрини, які можуть утворювати комплекси з погано розчинним АФІ. Циклодекстрини належать до циклічних

олігосахаридів і являють собою сполуки у формі «відра», що включає в себе гідрофобні молекули.

При прямому пресуванні рекомендована мальтоза, що забезпечує рівномірну швидкість засипання та як речовина, яка характеризується незначною гігроскопічністю. Також застосовують гранулят «Лудіпрес» – суміш лактози моногідрату та двох полімерів: Колідону 30 і Колідону CL – використовується як наповнювач, зв'язуючий, ковзний і розпушуючий засіб.

Технологія виготовлення таблеток полягає в тому, що лікарські препарати ретельно змішують з необхідною кількістю допоміжних речовин і пресують в таблеткових машинах. Недоліком цього способу є можливість розшарування таблеткової маси, зміни дозування при пресуванні з незначною кількістю діючих речовин і використання високого тиску. Деякі з цих недоліків зводяться до мінімуму при таблетуванні шляхом примусової подачі пресованих речовин в матрицю. Це досягається деякими конструктивними змінами деталей машини, тобто вібрацією живильників дозувань, поворотом матриці на певний кут в процесі пресування, а також встановленням в завантажувальну воронку зіркоподібних мішалок різних конструкцій, засмоктуванням матеріалів в матричні отвори за допомогою самоутворюваного вакууму або спеціальних з'єднань. Найперспективнішим є примусова передача пресованих речовин на основі вібрації завантажувальних воронок в поєднанні з прийнятною конструкцією переґрібача.

Грануляція спрямована на укрупнення частинок, тобто це процес перетворення порошкоподібного матеріалу в агрегати певної величини. Грануляція необхідна для покращення плинності таблетованої маси, що відбувається в результаті значного зменшення сумарної поверхні частинок при їх склеюванні в гранули і, отже, відповідного зменшення тертя, що виникає між цими частками при русі. Розшарування багатокомпонентної порошкоподібної суміші зазвичай відбувається за рахунок різниці в розмірах частинок і значеннях питомої густини АФІ та допоміжних компонентів, що входять до її складу. Таке розшарування відбувається при різного роду вібраціях таблеткової машини або її воронки. Розшарування таблеткової маси – це небезпечний неприпустимий процес, що викликає в ряді випадків майже повне виділення компонента з найбільшою питомою густиною із суміші і порушення її дозування. Грануляція запобігає

цьому, оскільки в ній відбувається злипання частинок різної величини і питомої густини. Утворений при цьому гранулят за умови рівності розмірів одержуваних гранул, набуває досить постійної насипної густини. Велику роль відіграє також міцність гранул: міцні гранули менше підлягають стиранню і мають кращу сипучість.

У наш час у фармацевтичній промисловості використовують такі методи грануляції: суха грануляція; волога грануляція; змішана грануляція; структурна грануляція.

Метод сухої грануляції. Полягає в перемішуванні АФІ і допоміжних речовин, їх ущільненню з подальшим помелом у крупний порошок або гранули. Отримані гранули фракціонують за допомогою сит, опудрюють антифрикційними речовинами, а потім пресують на таблетковій машині таблетки заданої маси і діаметра, тобто проводять вторинне ущільнення. Суха грануляція використовується в тих випадках, коли АФІ в присутності води або при підвищеній температурі розкладаються, вступають в хімічні реакції взаємодії або піддаються фізико-хімічним змінам (плавлення, розм'якшення, зміна кольору).

При сухому методі грануляції до складу таблеткової маси порошоків можуть вводити сухі зв'язуючі речовини (МКЦ, макрогол, Плаздон S-630), забезпечуючи під тиском зчеплення частинок, як гідрофільних, так і гідрофобних речовин. Але цей прийом не завжди приводить до отримання таблеток.

Методу вологої грануляції піддаються порошки, які мають погану плинність і недостатню здатність до зчеплення між частинками. В обох випадках в масу додають розчини в'язучих речовин, які покращують зчеплення між частинками. Виділяють два види вологої грануляції: грануляція продавлювання і грануляція у високошвидкісному змішувачі – грануляторі. Волога грануляція – включає такі операції: змішування і зволоження порошоків, грануляція вологої маси, сушка вологих гранул, отримання сухих гранул, опудрювання сухих гранул.

Змішана грануляція. У виробництві таблеток для деяких гідрофобних матеріалів, що утворюються після зволоження і висушування крихкої маси, часто застосовують змішану грануляцію, яка полягає в перемішуванні порошоків, їх зволоженні розчином зв'язуючої речовини в змішувачах, висушуванням до грудкуватої маси в повітряних сушарках з подальшим протиранням через пер-

форовану пластину гранулятора. Отримані сухі гранули опудрюють і відправляють на таблетування.

Структурна грануляція – грануляція розпилювальним висушуванням. Такий вид грануляції особливо прийнятний при виробництві біотехнологічних продуктів: антибіотиків, ферментів, продуктів тваринного і рослинного походження, тобто для продуктів термолабільних, для яких тривалий контакт гранул з повітрям небажаний. Отримання гранул здійснюють таким чином: спочатку готують суспензію або розчин з допоміжних компонентів і зволожувача. Суміш подають через форсунки у вигляді дрібних крапель в камеру розпилювальної сушки. Висушування проводиться повітрям при температурі 150 °С протягом декількох секунд. Розпилені частки мають досить велику поверхню, внаслідок чого відбувається інтенсивний масо- і теплообмін. Частинки швидко втрачають вологу і утворюють всього за кілька секунд сферичні пористі гранули розміром 10–70 мкм. Отримані гранули змішують з АФІ. Гранули мають хорошу плинність і пресованість, є однорідними за розміром при виконанні певних умов. У разі необхідності допускається додавання допоміжних компонентів, які спочатку не вводили. Тому таблетки, отримані з такого грануляту, мають високу міцність і пресованість при низькому тиску.

Отримання сухих гранул та їх опудрювання. У процесі сушіння гранул можливе спікання в окремі грудки. З метою забезпечення рівномірного фракційного складу висушені гранули пропускають через гранулятор з розмірами отворів сіток 1,5 мм, що значною мірою забезпечує постійну масу таблеток. Після цього гранули опудрюють в змішувачах з обертовим корпусом, додаючи антифрикційні речовини і передають на стадію таблетування.

Змішування і зволоження порошків. Змішування сухих АФІ з допоміжними речовинами з подальшим зволоженням суміші розчином зв'язуючих речовин проводиться у змішувачах з лопатями, які обертаються. Зволожувач додають до маси окремими порціями з безперервним перемішуванням, що необхідно для запобігання грудкуванню її компонентів. Оптимальна кількість зволожувача визначається експериментально виходячи з фізико-хімічних властивостей порошків. Маса з оптимальною вологістю являє собою вологу компакту суміш, що не прилипає до рук, але розсипається при стисненні на окремі грудочки. АФІ вводять у вигляді тритурацій як в процесі підготовки маси до

таблетування, так і при опудрюванні готового грануляту. Грануляція вологої маси – волога маса гранулюється на спеціальних машинах – грануляторах, принцип яких полягає в тому, що матеріал протирається між лопатями, валиками, які пружинять, через перфорований циліндр або сітку. Гранулятори бувають вертикальними і горизонтальними. Вибір гранулятора має велике значення. Встановлено, що вологу масу необхідно пропустити через сито з діаметром отворів 3–5 мм, а вже сухі гранули через – сито з діаметром отворів 1–2 мм.

Незважаючи на покращення технічних властивостей таблетованих матеріалів, волога грануляція має ряд недоліків:

- ✓ тривалість впливу вологи на лікарські та допоміжні речовини;
- ✓ погіршення розпадання і розчинності таблеток;
- ✓ використання низки спеціальних машин і апаратів для кожної стадії;
- ✓ тривалість і трудомісткість процесу, оскільки необхідне перевантаження продукту з однієї одиниці обладнання в іншу;
- ✓ великі втрати оброблюваного матеріалу.

Сушка вологих гранул. Найпоширенішою є сушка в псевдорозрідженому шарі. Принцип дії сушарок полягає в розпушуванні продукту повітряним потоком і приведення його у підвішений стан.

Грануляція в псевдорозрідженому шарі проводиться двома методами:

- 1) розпиленням розчину або суспензії, що містить допоміжні та лікарські речовини, в псевдорозрідженій системі до дрібних сферичних ядер;
- 2) розпиленням розчину зв'язуючих речовин на порошкоподібні речовини, що знаходяться у псевдорозрідженому шарі.

При застосуванні способу 1 на поверхню спочатку введених в камеру ядер, приведених у стан псевдорозрідження, розпиленням наносять розчин або суспензію, утворюючи гранули з наступним сушінням. У даному випадку ядра є штучними зародками майбутніх гранул. Ядром може бути як АФІ, так і допоміжні речовини, наприклад, цукор. Таким способом отримують тверді та щільні гранули, які мають близькі розміри, округлу форму, високу насипну густину і плинність.

Спосіб 2. Отримання гранул полягає в тому, що порошок знаходиться в камері апарату в псевдорозрідженому шарі (де підтримується в підвішеному стані потоком повітря) і на нього через форсунку розпилюється гранулююча

рідина. Псевдорозріджений шар забезпечує короткочасну взаємодію АФІ з рідиною і нагрітим повітрям, що є сприятливим для нестабільних АФІ. Отримані гранули відрізняються великою міцністю і хорошою плинністю, що є наслідком майже правильної геометричної форми гранули, яка наближається до шароподібної. При цьому утворюються більш м'які і пористі агломерати зі збалансованим фракційним складом, на відміну від гранул, отриманих вологою грануляцією продавлювання, коли утворюються великі агломерати, що підлягають наступному подрібненню.

6.3. Контроль таблеток

Контроль таблеток проводять відповідно до вимог монографій ДФУ: опис, ідентифікація, середня маса і однорідність дозованих одиниць; розчинність – проводять для підтвердження вивільнення АФІ; розпадність; стиранисть, стійкість до розчавлення, втрата в масі або вода; супутні домішки, залишкові кількості органічних розчинників (при використанні їх у технології); мікробіологічна чистота, кількісне визначення та ін.

6.4. Таблетки з продуктами, отриманими за допомогою біотехнології

6.4.1. Препарати, що містять антибіотики

Використання речовин, отриманих шляхом біотехнологічного синтезу, в складі таблеток обмежене. Основним продуктом біотехнології, що входить до складу таблеток, є – антибіотики, отримані шляхом мікробного синтезу. Таблетки з рядом антибіотиків активно використовуються в сучасній бактеріотерапії та хіміотерапії: рифампіцин, ністатин, джозаміцин, неоміцин, ідарубіцин, еритроміцин та ін. Наводимо ряд прикладів, що підтверджують виробництво таблеток з біотехнологічними препаратами (табл. 6.1).

Таблиця 6.1 – Характеристика таблеток, які містять природні антибіотики

Назва препарату	АФІ / штамп-продуцент	Допоміжні речовини
Вільпрафен (плівкова оболонка)	Джозаміцин / <i>Streptomyces narbonensis</i> – макролід	МЦ, кремнію діоксид колоїдний безводний, полісорбат 80, натрію КМЦ, тальк, магнію стеарат, ПЕГ, титану діоксид, алюмінію гідроксид, сополімер метакрилової кислоти
Пімафуцин (кишково-розчинний)	Натаміцин / <i>Streptomyces natalensis</i> – полієновий	Повідон, магнію стеарат, лактоза, желатин, гуміарабік, метилпарагідроксибензоат, каолін, кальцію карбонат, тальк, триацетин, ацетилфталат целюлози (АФЦ), сахароза, титану діоксид
Еритроміцин (кишково-розчинні) 100 мг	Еритроміцин (<i>Streptomyces erythreus</i>) – макролід	Повідон, кросповідон, кальцію стеарат, тальк, крохмаль картопляний. Оболонка: АФЦ, титану діоксид, олія рицинова
Еритроміцин (кишково-розчинні) 500 мг	Еритроміцин (<i>Streptomyces erythreus</i>) – макролід	Повідон, кросповідон, кальцію стеарат, коллідон СLM, тальк, крохмаль картопляний, кросповідон, твін 80, Оболонка: АФЦ, титану діоксид, олія рицинова
Ністатин	Ністатин (<i>Streptomyces noursei</i>) – полієновий	Целюлоза мікропротамін, повідон, натрію кроскармелоза, магнію стеарат, ГПМЦ, ко-повідон, ПЕГ, тригліцериди, полідекстроза, діоксид титануа, заліза оксид червоний, заліза оксид жовтий
Тетрациклін, (вкриті оболонкою) 100 мг	Тетрациклін / (<i>Streptomyces aureofaciens</i>) – напівсинтетичний антибіотик	<u>Склад оригінального препарату:</u> цукор, желатин, кальцію стеарат, тальк, крохмаль картопляний, твін-80. Для плівкоутворення: полівініловий спирт, діоксид титану, ПЕГ 3350, тальк, барвники: кармін, жовтий захід, червоний чарівний
		<u>Склад препарату генерика:</u> ЦМК, тальк, кальцію стеарат, натрію кроскармелоза Для плівкоутворення: спирт полівініловий, макрогол / ПЕГ 3350, діоксид титану, тальк, барвники: жовтий захід і спеціальний червоний

Вибір технології та складу для отримання таблеток, які містять антибіотики, насамперед залежить від технологічних властивостей АФІ, використовуваної технології і обладнання, допоміжних речовин та інших чинників. Так, на-

приклад, експериментально встановлено, що метод прямого пресування не придатний для субстанції левофлораксацину (протимікробний, антибактеріальний засіб) через його технологічні властивості (відсутність плинності і високий вміст антибіотика в таблетці). У зв'язку з цим використовують метод вологого гранулювання. Як зволожувач експериментально була обрана ГПМЦ. Таким же методом були отримані таблетки з кларитроміцином. Для виготовлення таблеток з еритроміцином як зволожувач використовується ПВП (табл. 6.1). Вибір складу також визначається кількістю речовини в таблетці. Так, наприклад, (табл. 6.1) при отриманні еритроміцину з 100 мг і 500 мг антибіотика в таблетці використовуваний склад представлений різними допоміжними компонентами. При порівнянні двох препаратів тетрацикліну по 100 мг різних виробників (табл. 6.1) видно, що обидва препарати з одним АФІ і ідентичною масою містять різні склади допоміжних інгредієнтів. Для розуміння технології отримання препаратів у формі таблеток наводимо опис стадій технологічного процесу отримання таблеток, вкритих оболонкою кишковорозчинних, наприклад, таблеток, що містять антибіотики. Кишковорозчинне покриття приводить до захисту лікарського препарату, що міститься в таблетці від дії кислого середовища шлункового соку. Для отримання кишковорозчинного покриття необхідно використання плівкоутворювача – високомолекулярної сполуки з властивостями поліелектролітів. Ці сполуки з великим числом карбоксильних груп здатні до дисоціації в нейтральному і лужному середовищі. У складі покриття використовують як природні речовини (казеїн, шелак, кератин, цетиловий спирт та ін.), так і синтетичні сполуки (АФЦ, бутилстеарат, фталати декстрину, стеаринова кислота та ін.).

Нижче наведено технологічну схему отримання таблетованої форми, отриманої методом пресування з попередньою вологою грануляцією.

Як і при виготовленні розчинів для парентерального введення, у відповідності до вимог GMP, проводять ряд допоміжних стадій (глава 2).

Стадія 1. Санітарна підготовка виробництва

Операції технологічного процесу виробництва таблеток проводять у приміщеннях класу чистоти D. Для досягнення класу чистоти D в приміщеннях проводять санітарну підготовку виробництва, згідно з відповідними СОП, яка включає: приготування і використання дезінфікуючих розчинів; підготовку

вентиляційного повітря; підготовку приміщень; підготовку обладнання; підготовку технологічного одягу, підготовку персоналу.

Санітарна підготовка фіксується в протоколах очистки. Виробничі приміщення, обладнання маркуються ідентифікаційною етикеткою «Очищено».

На всіх стадіях технологічного процесу роботу проводять при постійно діючій припливно-витяжній вентиляції.

Для запобігання мікробній контамінації таблеток у процесі виготовлення та фасування персонал проводить обробку рук згідно з СОП. Мікробіологічний контроль технологічного одягу і рук персоналу проводять відповідно до СОП. На кожній стадії заповнюють протокол проведення процесу.

Стадія 2. Підготовка сировини, яка використовується при виготовленні таблеток

Приготування води очищеної проводять згідно з СОП. Мікробіологічний контроль води очищеної проводять згідно з ДФУ.

Відбір проб сировини здійснюють співробітники ВКЯ згідно з відповідними діючими стандартними методиками. За відповідності всіх показників якості сировини і матеріалів вимогам нормативної документації відбувається передача сировини і матеріалів до виробничого підрозділу (цех). При цьому необхідно промаркувати сировину і матеріали ідентифікаційними етикетками зі статусом «Дозволено до виробництва». Сировина і матеріали, які не пройшли контроль, передаються до ізолятора браку.

Стадія 2.1. Просіювання сировини

Просіювання сировини проводять в цеху для отримання таблеток. На початку операції необхідно перевіряти, щоб обладнання і робоча зона були очищені від попередньої продукції і матеріалів. Перед початком процесу проводять контроль маркування приміщення і обладнання з відповідною відміткою в протоколі просіювання.

На приміщенні і обладнанні замінюють етикетку з маркуванням статусу «Очищено» на етикетку з маркуванням статусу «Виготовлення таблеток», на якій вказують назву препарату. Компоненти таблеток: наприклад, субстанції антибіотиків, крохмаль картопляний, кальцію стеарат (ковзна речовина) та ін. зважують. Робота з просіювання проводиться в респіраторних при постійно діючій вентиляції.

Зазначені компоненти просівають на ситах відповідного розміру. Сировина після просіювання має бути однорідною, не містити включень і грудок. Після просіювання проводять зважування компонентів. Крохмаль використовується на двох стадіях: для приготування крохмального клейстеру і для приготування грануляту.

Стадія 2.2. Приготування розчину зв'язуючої речовини

Приготування розчину ПВП або ГПМЦ проводять в цеху отримання таблеток.

У ємність завантажують воду очищену. При постійному перемішуванні завантажують зв'язуючу речовину і продовжують перемішувати до повного розчинення. Отриманий розчин фільтрують через сито необхідного розміру в підготовлену ємність. Розчин повинен бути однорідний, не містити грудок, механічних домішок або згустків. Ємність закрити кришкою, промаркувати етикеткою і передати на операцію 2.4.

Стадія 2.3. Приготування крохмального клейстеру

Необхідно визначити масу крохмального клейстеру, яку потрібно приготувати для виготовлення регламентної маси таблеток-ядер. Зважують необхідну кількість просіяного крохмалю картопляного і завантажують в ємність, в яку додають воду очищену і ретельно перемішують до отримання однорідної маси, без грудочок. Ще в одну ємність доливають воду очищену і нагрівають до кипіння, при постійному перемішуванні додають суспензію крохмалю. Вміст ємності при постійному перемішуванні довести до кипіння. Отриманий крохмальний клейстер доводять до кипіння, охолоджують і фільтрують на ситі в ємність. Отриманий клейстер повинен бути однорідним, не мати грудок, згустків і механічних включень. Клейстер передають на стадію 2.4.

Стадія 2.4. Приготування гранулюючого розчину

У ємність з профільтрованим крохмальним клейстером завантажують профільтрований розчин ПВП та Твін-80 в необхідних кількостях. Ретельно перемішують компоненти до отримання однорідної маси гранулюючого розчину. Ємність з гранулюючим розчином закривають кришкою, маркують етикеткою встановленого зразка, і передають на стадію 3.1.

Стадія 3.1. Приготування грануляту

Перед початком процесу проводять контроль маркування приміщення і обладнання з відповідною відміткою в протоколі виготовлення серії.

На приміщенні і обладнанні замінюють етикетку з маркуванням статусу «Очищено» на етикетку з маркуванням статусу «Виготовлення таблеток» із зазначенням назви таблеток.

Необхідну масу просіяного АФІ (антибіотика), просіяний крохмаль картопляний, який залишився, завантажують до ємності апарату для гранулювання. Суміш прогрівають 20 хв до досягнення температури гранульованої суміші 45 ± 5 °С. У ємність подають гранулюючий розчин з регламентованою витратою розчину (мл/хв). Після подачі всього гранулюючого розчину гранулят досушують і охолоджують до температури продукту – 25 ± 5 °С. ВКЯ відбирає пробу грануляту згідно з МКЯ для визначення залишкової вологи в грануляті згідно з СОП. У разі невідповідності показника залишкової вологи встановленим нормативам гранулят досушують. При позитивному результаті аналізу ВКЯ гранулят просівають через сита з встановленим діаметром отворів в проміжні ємності. Проміжні ємності з гранулятом закривають кришками, маркують етикетками і передають на стадію 3.2.

Стадія 3.2. Отримання таблеткової маси

У змішувач завантажують отриманий гранулят з відомою масою, просіяний крохмаль і просіяний кальцію стеарату. Перемішують завантажені компоненти до отримання однорідної маси. Проводять контроль зовнішнього вигляду таблеткової маси. ВКЯ відбирають пробу таблеткової суміші згідно з МКЯ і визначають зміст основної речовини в таблетковій масі. До отримання результатів аналізу таблеткову масу зберігають у змішувачі або при необхідності вивантажують зі змішувача в чисті сухі ємності, закривають кришками. Ємності маркують. При отриманні позитивних результатів таблеткову масу передають на стадію 4 для отримання таблеток-ядер.

На приміщенні і обладнанні замінити етикетку з маркуванням статусу «Очищено» на етикетку з маркуванням статусу «Виготовлення таблеток».

Стадія 4. Отримання ядер таблеток

Таблетування здійснюють на роторній таблетковій машині двовігнутими пуансонами. Під напрямлюючі потоки преса ставлять чисті ємності. Під час

пресування таблеток стежать за рівномірним надходженням маси в живильник машини. Пресують ядра таблеток заданих геометричних розмірів: діаметр (мм), висота (мм) з двоопуклою поверхнею. ВКЯ відбирає пробу таблеток згідно з МКЯ і контролюють: зовнішній вигляд, середню масу і відхилення середньої маси, однорідність маси, розпадання, вміст основної речовини. В процесі таблетування необхідно періодично контролювати зовнішній вигляд, середню масу таблеток. Отримані таблетки знепильють на ручному ситі з необхідними отворами. При позитивних результатах аналізів ВКЯ, таблетки передають на стадію 5.2.

Стадія 5.1. Приготування плівкоутворюючої суспензії

На приміщенні і обладнанні замінюють етикетку з маркуванням статусу «Очищено» на етикетку з маркуванням статусу «Виготовлення таблеток» із зазначенням назви препарату.

У реактор завантажують ацетон або спирт етиловий, АФЦ. Перемішують полімер у суміші розчинників до повного розчинення АФЦ. Отриманий розчин фільтрують в реактор з мішалкою. Встановлюють величину вакууму від 80 кПа до 60 кПа. У реактор, що містить профільтрований розчин АФЦ, завантажують масло касторове і перемішують.

У реактор завантажують розчин, що містить розтертий діоксид титану на розчині полімеру АФЦ (в співвідношенні 1: 1). У реактор додають розчин тропеоліну, попередньо розчиненого у воді очищеній. Утворену суспензію в реакторі перемішують. Приготовлена суспензія повинна бути однорідною, без грудок, згустків і механічних домішок, яскраво жовтого кольору.

Стадія 5.2. Нанесення плівкового покриття на ядра таблеток

Процес нанесення плівкового покриття проводять у дражувальному котлі установки для покриття таблеток. У дражувальний котел установки завантажують ядра таблеток, які надійшли зі стадії 4. Закривають люк котла. Включають подачу пари на установку, надають котлу обертання і прогрівають таблетки. Після прогріву в дражувальний котел додають масло вазелінове, після чого проводять вакуумування системи і заповнюють її інертним газом (азотом). Тиск азоту в системі має бути 50 ± 10 кПа. Встановлюють робочі параметри установки для нанесення покриття: температуру вхідних газів 40 ± 5 °С, температуру вихідних газів 35 ± 5 °С, температуру в барботажній пастці 20 ± 5 °С і швидкість

подачі плівкоутворюючої суспензії близько 300 мл/хв. Включають подачу суспензії з реактора в дражувальний котел установки, при цьому мішалка реактора повинна працювати безперервно. Після подачі усієї кількості плівкоутворюючої суспензії відключають насос-дозатор і підсушують таблетки протягом 15–20 хв, відключають подачу пари і остижують установку до температури 25 ± 5 °С. Сушку здійснюють в замкнутому циклі осушуючого агента – азота.

Після охолодження таблетки вкриті кишковорозчинною оболонкою вивантажують з котла в проміжну ємність, яку закривають кришками, маркують. При отриманні дозволу ВКЯ на фасовку передають таблетки на стадію 6.

Стадія 6. Фасовка, упаковка, маркування

На цій стадії проводять фасовку таблеток в контурні ячейкові упаковки, упаковку в пачки, упаковку пачок у коробки.

Таким чином, представлена технологія складається з таких стадій: просіювання сировини, приготування зв'язуючих речовин, приготування крохмального клейстеру, приготування гранулюючого розчину, приготування грануляту, приготування таблеткової маси, приготування ядер таблеток, приготування плівкоутворюючої суспензії і нанесення кишковорозчинної оболонки на ядра таблеток, фасування, маркування і упаковка.

При отриманні таблетованої форми з антибіотиками часто використовують метод пресування з попередньою вологою грануляцією (для отримання гранулюючого розчину використовують желатин, при отриманні грануляту – цукор, кроскармелозу, МКЦ та ін.).

6.4.2. Препарати, що містять протективні антигени

Встановлено, що введення ряду препаратів, що містять антигени, здатні викликати захисну імунну реакцію проти ряду інфекційних агентів:

1. Рибомуніл: таблетки по 250 мг і 750 мг в блістерах. У складі яких містяться антигени *Klebsiella pneumoniae* – 35 %; *Streptococcus pneumoniae* – 30 %; *Streptococcus pyogenes* – 30 %; *Haemophilus influenzae* – 5,0 %. Допоміжні компоненти: протеоглікани *Klebsiella pneumoniae* – 125 мг, кремнію діоксид колоїдний гідрофільний – 1,5 мг, магнію стеарат – 6 мг, сорбітол – до 294 мг. У складі препарату знаходяться рибосоми мікроорганізмів, які містять антигени,

ідентичні поверхневим антигенам бактерій, і при введенні в організм викликають утворення специфічних антитіл до цих збудників. Призначення: профілактика і лікування рецидивів інфекцій ЛОР-органів (отит, риніт, синусит, фарингіт, ларингіт, ангіна) і дихальних шляхів (трахеїт, хронічний бронхіт, пневмонія, інфекційно-залежна бронхіальна астма та ін.). Виробник: Progriparm, Франція.

2. Вакцина чумна жива, таблетки для розсмоктування – являє собою ліофілізовану живу культуру вакцинного штаму *Yersinia pestis EV* (40 млрд живих клітин у таблетці). У таблетці міститься стабілізатор (декстрин) – 6 мг, кислота аскорбінова – 6 мг, лактоза – 60 мг, тіосечовина – 6 мг. Наповнювачі: ванілін – 2 мг, глюкоза – 0,44 мг, какао порошок – 11,4 мг, кальцію стеарат – 12 мг, крохмаль картопляний – 11,4 мг, ментол – 2 мг, сахарин – 1 мг. Призначення: профілактика чуми людей. 1 таблетка – 1 доза щеплення. Виробник: НВО «Вектор», Новосибірськ, Росія.

3. Вакцина проти віспи жива, «ТЕОВАК», таблетки, вкриті оболонкою для розсмоктування, – являє собою ліофілізовану живу культуру вакцинного штаму віспи *Variolae* (10^6 - 10^7 живих клітин у таблетці), вирощеного в хоріонал-алантоїсній оболонці ембріонів курей. В таблетці міститься висушена біомаса вірусу віспи – не менше 30 %; наповнювачі – не більше 70 %: лактоза – 87,8 %, сахароза – 10,0 %, стеарат кальцію – 2,0 %, ванілін – 0,2 %. Склад оболонки: АФЦ – 83 % і масло касторове – 17,0 % або шелак – 83 % і олеїнова кислота – 17,0 %. Призначення: профілактика віспи людей. 1 таблетка – 1 доза щеплення. Виробник: м. Кіров, Росія.

У наш час розвивається науковий напрямок зі створення вакцин для перорального застосування в таблетках. Так, наприклад, групою вчених із Данії та Бразилії запропонована пероральна вакцина в таблетках проти гепатиту В, що містить HBs-Ag. Автори запропонували безпечний матеріал із кремнезему SBA-15, в якому інкапсульований антиген. Проводяться роботи зі створення у таблетованій форми вакцини проти дифтерії, правця та кашлюку. Запропонована вакцина проти віспи в таблетках. Інтерес представляють роботи з отримання таблетованих форм препаратів фагів. Фаги після ліофілізації змішують з наповнювачем і проводять таблетування. Як допоміжні речовин додають пек-

тин, кальцію глюконат, глюкозу, тальк, кальцію стеарат. У формі таблеток відомі препарати бактеріофагів.

ПІДСУМОК

У сучасній фармації таблетки займають 35–40 % від усіх лікарських форм та їх чисельність постійно зростає. Дослідження спрямовані у кількох напрямках: введення в таблетки оригінальних АФІ, вдосконалення технологічних схем отримання таблеток, розробка та використання нових допоміжних компонентів, розробка і виведення на ринок досконалішого технологічного обладнання. В останні роки проводиться розробка принципово нових технологій отримання таблеток: цифрові таблетки, таблетки, отримані 3D технологією, та ін.

У 2019 році одна з компаній «Силіконової долини» повідомила про те, що вони почали реалізувати програму для створення цифрових таблеток. Препарат призначений для лікування хворих на рак 3-тньої і 4-тої стадії. Ідея дослідників полягає в тому, що лікарі можуть відстежувати прийом ліків цими хворими. Це дозволить забезпечувати дотримання режиму прийому ліків і давати необхідні рекомендації з лікування хворих з метою покращення результатів лікування. Після того як хворий проковтує препарат і він потрапляє у шлунок, наявний у таблетці датчик активізується і посилає сигнали на пластр, який прикріплений до тіла пацієнта. Датчик передає сигнали про час доби, розмір дози і типу ліків. Всі ці дані надходять на online портал. Наприклад, фірма «Proteus», США розробила технологічну платформу «Abilify Mylite» для отримання цифрових таблеток: в листопаді 2017 року запропонувала першу цифрову таблетку для лікування пацієнтів з шизофренією і біполярними розладами. Препарат був схвалений FDA. Датчик, вбудований у таблетку, після активізації передає інформацію про частку АФІ в організмі хворого.

Вельми перспективною є можливість створення таблеток за допомогою 3D технологій. Для фармації 3D друк відкриває дорогу до персоналізованих лікарських препаратів. Так, наприклад, деяким групам пацієнтів критично важливо, щоб ліки були швидкодіючим. Вчені біотехнологічної компанії FabRx, яка спеціалізується на 3D технологіях, встановили, що АФІ з таблеток у формі піраміди поглинаються швидше, ніж з таблеток класичної циліндричної форми.

Змінюючи форми і розміри таблеток, фармацевти отримують можливість враховувати індивідуальні особливості організму хворого і створювати таблетки під конкретного хворого. Перевагою використання 3D технологій при виготовленні лікарської форми є можливість точного контролю просторового розподілу АФІ, відтворення складної геометричної форми, вміщаючи в них дуже маленьку кількість АФІ, зменшення кількості відходів, можливість швидкого виготовлення лікарської форми різного складу і, що дуже важливо, – отримання індивідуалізованого лікарського препарату, а також препаратів, що містять сильнодіючі АФІ.

З'явилися повідомлення про розробку (США) таблеток, здатних залишатися в шлунку протягом тривалого часу з повільним вивільненням АФІ в організм людини, наприклад, таблетки для запобігання вагітності, містять синтетичний гормон левоноргестрол. Фахівці розробляють препарат, покриваюча капсула якого розчиняється, потрапляючи в шлунок, і розкривається 6-кінцева «зоряна структура», яка поступово вивільняє синтетичний гормон. Ці таблетки розроблені таким чином, що розкрита зірка була ширша, ніж отвір між шлунком і тонкою кишкою, і триваліший час залишалась у шлунку. Експерименти були вже проведені на свинях, і препарат залишався в шлунку протягом 30 днів. Одночасно проводили контроль присутності гормону в крові. Після 30 днів в шлунку від «зірки» відривалися 2 вирости і препарат звільняв шлунок. Проводяться дослідження зі створення таблеток з аналогічною формою і дією, наприклад, з інсуліном для лікування хворих на діабет 1-го типу.

Однією з інноваційних технологій є промислове виробництво мультипартикуляційних таблеток з АФІ, що містять частинки (100–1000 мкм) з модифікованим вивільненням: швидким, уповільненим і відстроченим у часі. Мультипартикуляційні системи мають ряд переваг: фармакокінетичних, фармакодинамічних і споживчих, у порівнянні з «класичними» одиночними таблетками з модифікованим вивільненням і з твердими желатиновими капсулами, наповненими пелетами. На відміну від «класичних» таблеток, в мультипартикуляційних системах, які швидко дезінтегруються, вивільнення АФІ залежить від кожної мікрочастинки окремо, а в тих, які повільно дезінтегруються, – також від швидкості ерозії таблеток.

Для отримання мікрочастинок запропоновані такі технології:

1) компактування маси з подальшим відділенням на ситах необхідної фракції; волога грануляція, як правило, в грануляторах з високим зусиллям зсуву або екструзія – сферонізація маси, що включає АФІ і необхідні допоміжні речовини;

2) нанесення функціональних оболонок на кристали АФІ (на сфери плацебо), наприклад, в умовах псевдорозрідженого шару.

Потім для отримання мультипартикуляційних систем мікрочастинок змішують з допоміжними речовинами і спресовують в таблетку.

Підсумовуючи, хотілося б відзначити, що з представлених даних видно, що технології одержання таблеток постійно розвиваються і удосконалюються.

Контрольні запитання

1. Навести опис таблеток та їх класифікацію.
2. Наведіть допоміжні речовини та оцініть їхній вплив на технологічні параметри (розпушувачі та антифрикційні речовини).
3. Наведіть допоміжні речовини та оцініть їх вплив на технологічні параметри (коригенти, пролонгатори, платифікатори).
4. Поняття грануляції: суха грануляція, волога грануляція, волога грануляція у високошвидкісному змішувачі-грануляторі, структурная грануляція, змішана грануляція. Охарактеризувати технології грануляції.
5. Навести характеристику технологічних процесів: подрібнення та змішування.
6. Охарактеризуйте технології одержання сухих гранул та їх опудрювання.
7. Навести технологію змішування та зволоження порошків. Сушка вологих гранул.
8. Навести основні технологічні стадії одержання таблеток – антибіотиків з плівковим покриттям.
9. Навести контроль таблеток відповідно до вимог ДФУ.
10. Підготовка сировини, що використовується при виробництві таблеток.
11. Охарактеризуйте основні критичні стадії виробництва таблеток (виготовлення зв'язуючої речовини, виготовлення крахмального клейстеру для вироб-

ництва таблеток-ядер, виготовлення гранулюючого розчину, виготовлення гранул).

12. Охарактеризуйте основні критичні стадії виробництва таблеток (одержання таблеткової маси, виготовлення ядер таблеток, виготовлення плівкоутворюючої суспензії та її нанесення).

13. Характеристика таблеток, які містять антибіотики, отримані біотехнологією.

14. Характеристика таблеток, які містять протективні антигени, отримані біотехнологією.

Список джерел інформації

1. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-ге вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.

2. Перцев І.М. Допоміжні речовини в технології ліків / І.М. Перцев, Д.І. Дмитрівський, В.Д. Рибачук та ін. – Харків: Золоті сторінки, 2010. – 599 с.

3. Чуешов В.И. Технология лекарств промышленного производства / В.И. Чуешов, Е.В. Гладух, И.В. Сайко и др. – Винница: Нова книга, 2014. – 696с.

4. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, М.И. Борщевская. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.

5. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология биологически активных веществ: учебное пособие. Часть 1. / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев - Харьков: НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.

6. Рубан Е.А. Практикум по промышленной технологии лекарственных средств / Е.А. Рубан, Д.И. Дмитриевский, А.И. Хохлова и др. – Харьков: НФАУ, 2016. – 389 с.

7. Медетханов Д.Д. Изготовление лекарственных форм / Д.Д. Медетханов, А.П. Овсянников, Д.Д. Хайруллин. – Казань: Центр инновационной технологии, 2016. – 123 с.

8. Настанова СТ-Н міністерства охорони здоров'я 42-4.0. 2016. «Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Затверджено наказом МОЗ від 29.07. 2016.

9. Гладышев В.В. Биофармация: учебник для фармацевтических вузов и факультетов / В.В. Гладышев, И.А. Бирюк, И.Л. Кечин – Дніпро: ЧНП «Економика», 2018. – 250 с.

10. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая біотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, Дудниченко А.С., Швец В.И. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2011. – 228 с.

11. Краснюк И.И. Фармацевтическая технология. Технология лекарственных форм: учебник / И.И. Краснюк, Г.В. Михайлова, Т.В. Денисова, В.И. Складенко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 656 с.

12. Наркевич И.А. Аддитивные технологии в фармации / И.А. Наркевич, Е.Р. Флисюк, О.А. Терентьева и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51. – № 11. – С. 40–44.

13. Могилюк В. Мультипартикулярные таблетки / В. Могилюк // Фармацевтическая отрасль. – 2014. – №2 (43). – С. 36–39.

ГЛАВА 7. ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ У ФОРМІ СУСПЕНЗІЙ

7.1. Загальна характеристика суспензій

Суспензії (від лат. *suspensio* – підвішування) – рідка лікарська форма, що містить як дисперсну фазу одне або кілька подрібнених порошкоподібних лікарських речовин, розподілених у рідкому дисперсійному середовищі. Розмір частинок у суспензії становить 0,1–50 мкм (іноді до 100 мкм). Вони видимі в оптичний мікроскоп, практично не беруть участь у броунівському русі та дифузії. Суспензії – мікрогетерогенні дисперсні непрозорі системи, каламуті в прохідному і відбитому світлі, нестійкі – при зберіганні спостерігається седиментація частинок (випадання осаду). Стійкість частинок залежить від багатьох чинників: форми частинок, їх моно- або полідисперсності, розміру, величини вільної поверхневої енергії (енергія Гіббса), в'язкості середовища; співвідношення густини дисперсної фази і дисперсійного середовища. Наявності адсорбційного шару поверхнево активних речовин і густини електричного заряду, їх потенціалу (потенціал Штерна); величини міжфазного натягу.

Для забезпечення високої ефективності препаратів лікарська форма «суспензії» повинна характеризуватися агрегативною і кінетичною стійкістю, а також низькою швидкістю седиментації.

Агрегативна стійкість – здатність протистояти укрупненню частинок і утворенню агрегатів, що залежить від густини, поверхневого електричного заряду частинок, потенціалу, товщини подвійного електричного шару, інтенсивності взаємодії частинок із середовищем суспензій.

Седиментаційна стійкість – здатність системи протистояти осіданню частинок по всьому об'єму та масі суспензії, що залежить від розміру частинок, співвідношення густини дисперсної фази і дисперсійного середовища, в'язкості дисперсійного середовища. Вона може бути з певним ступенем наближення і

охарактеризована швидкістю седиментації (V , кг/Па·с³), описаної законом Стокса, математичний вираз якого має такий вигляд:

$$V = 2r^2 (p_1 - p_2) \cdot g + 9\eta,$$

де r – радіус частинок, м; $(p_1 - p_2)$ – різниця густини дисперсної фази і дисперсійного середовища, кг/м³; g – прискорення вільного падіння, м/с²; η – в'язкість середовища, Па·с.

Швидкість седиментації (або вспливання) відповідно до закону Стокса залежить від ряду факторів, вона прямо пропорційна квадрату розміру частинок, різниці густини дисперсної фази і дисперсійного середовища і обернено пропорційна в'язкості. На практиці часто використовують поняття гідравлічної крупності суспензії, що характеризує швидкість осідання частинок (мм/с) в нерухомому рідкому середовищі. Залежно від різниці густини частинки можуть осідати ($p_1 > p_2$) або вспливати, ($p_1 < p_2$), або перебувати у підвішеному стані ($p_1 = p_2$). Підбір середовища, близького за густиною до дисперсної фази, додавання речовин, що підвищують в'язкість (сиropи, гліцерин, пропіленгліколь та ін.), має значення при розробці препаратів. Частинки повинні осідати настільки повільно, щоб суспензію можна було точно дозувати при прийомі

Щоб підвищити стійкість суспензії можна зменшити розмір частинок або змінити послідовність додавання інгредієнтів. Однак малий розмір частинок обумовлює велику питому поверхню, що приводить до збільшення вільної поверхневої енергії (енергії Гіббса). Зміна вільної поверхневої енергії ΔG , Н·м, виражається формулою:

$$\Delta G = \Delta S \cdot \sigma,$$

де S – зміна площі поверхні розриву (розділу фаз), м²; σ – міжфазний натяг, Н/м.

Збільшення вільної поверхні при подрібненні веде до збільшення енергії Гіббса, яка, прямуючи до мінімуму, буде сприяти зворотній агрегації частинок. Щоб зберегти високу дисперсність суспензії, потрібно домогтися того, щоб зменшення енергії Гіббса не відбувалося за рахунок зменшення питомої поверхні (тобто за рахунок агрегації, укрупнення частинок). Цього досягають

шляхом зниження міжфазного натягу (додавання поверхнево-активних речовин, сольватації та ін.).

Встановлено, що при різних розмірах частинок в межах 1–10 мкм (за умови низьких значень питомої міжфазної енергії), їх осідання може тривати не тільки десятками хвилин, але навіть і годинами.

У порівнянні з іншими лікарськими формами суспензії мають такі переваги: зручність лікарської форми для пацієнтів, особливо дітей, які не можуть ковтати таблетки і капсули; ряд лікарських речовин є більш стабільними у формі суспензій, ніж у таблетках, що особливо важливо для антибіотиків. До недоліків суспензій можна віднести: необхідність перед застосуванням інтенсивно перемішувати суспензії для відновлення однорідного стану; фізична нестабільність: осадження (седиментація), з'єднання і збільшення розміру частинок (агрегація), з'єднання твердої і рідкої фази (конденсація).

7.2. Технологія отримання суспензій

У фармацевтичній технології використовуються два методи отримання суспензійних препаратів:

- конденсаційний (шляхом регульованої кристалізації);
- дисперсійний (шляхом подрібнення частинок лікарської речовини механічним способом, ультразвуковою обробкою або іншим способом). При виготовленні суспензій цим методом особливу увагу необхідно приділяти ступеню подрібнення лікарської речовини, як найбільш визначального фактору стабільності лікарської суспензії. Для отримання суспензії лікарська речовина (тверда фаза) попередньо подрібнюється до дрібно-дисперсного стану. При отриманні суспензії суміш лікарських речовин і допоміжних компонентів, що входять до складу суспензії, перед розчиненням у воді подрібнюють кожен окремо, просівають через сито, об'єднують, перемішують і знову просівають.

Отримання суспензій дисперсійним методом проводять в декілька стадій. Як правило, крім лікарської речовини до складу суспензій вводять допоміжні речовини, розчинні в ній. У зв'язку з цим при отриманні суспензій необхідно враховувати технологічні стадії приготування водних і неводних розчинів, розчинення і проціджування. Технологічне отримання суспензій дисперсним мето-

дом можна представити такими стадіями: зважування сировини, подрібнення, змішування, упаковка і контроль. Для отримання стабільних суспензій гідрофобних речовин використовують стабілізатори, за які застосовують високомолекулярні сполуки і поверхнево-активні речовини (полісорбат (твін 80), полівініловий спирт, ефіри целюлози, детергенти та ін.). Вибір конкретного стабілізатора і його кількість обумовлені властивостями стабілізатора і ступенем його гідрофобності. Для стабілізації лікарської речовини з різко вираженими гідрофобними властивостями використовують желатозу.

Техніка виготовлення суспензій конденсаційним методом передбачає, що дана речовина добре розчинна. Після цього розчин лікарського засобу додають при безперервному перемішуванні до дисперсної фази, яка часто подана водою для ін'єкцій. За необхідності додатково створюють умови, що призводять до зменшення розчинності лікарської речовини, наприклад, додавання допоміжних речовин або корекція рН. При безперервному перемішуванні дисперсійної фази відбувається процес кристалізації з розмірами, що залежать від умов проведення процесу.

Як приклад отримання суспензії конденсаційним методом наводимо одну з технологій отримання суспензії гідрокортизону ацетату для ін'єкцій. До складу препарату входить субстанція гідрокортизону ацетату як діюча речовина та допоміжні речовини: D-сорбіт, пропіленгліколь, натрію хлорид, бензиловий спирт, полівінілпіролідон, вода для ін'єкцій. Як розчинник для гідрокортизону ацетату використовують диметилсульфоксид, який в процесі технологічного процесу видаляється повністю. Технологію можна представити такими стадіями:

- ✓ приготування стерильних розчинів D-сорбіту, натрію хлориду, бензилового спирту, полівінілпіролідону шляхом їх розчинення у воді для ін'єкцій і стерилізуючої фільтрації через мембрани (0,22 мкм). Пропіленгліколь стерилізують у автоклаві;

- ✓ отримання стерильного розчину гідрокортизону ацетату в диметилсульфоксиді та проведення стерилізуючої фільтрації через мембрани (0,22 мкм);

- ✓ перекристалізація гідрокортизону ацетату шляхом додавання розчину гідрокортизону в диметилсульфоксиді у воду для ін'єкцій. Осад відокремлюють

на фільтрі 1,2 мкм і багаторазово промивають водою для ін'єкцій. Осад перекристалізованого гідрокортизону ацетату після промивання переносять до стерильної ємності з електричною мішалкою (режим 14-15 тис. об./хв);

✓ додавання допоміжних компонентів: в ємність з осадом подають стерильні розчини D-сорбіту, натрію хлориду, бензилового спирту, полівінілпіролідону і продовжують перемішування за допомогою мішалки ще протягом 1 години (для отримання суспензійних препаратів можливе використання турбінних або пропелерних мішалок, не виключається використання ультразвукової обробки);

✓ контроль отриманої суспензії: розмір частинок, стерильність, рН, кількісне визначення та ін.;

✓ наповнення первинної упаковки (проводять при постійному перемішуванні);

✓ контроль готового препарату відповідно до вимог ДФУ до суспензій і вимог монографії на конкретний препарат (справжність, рН, розмір частинок, кількісне визначення, стерильність, суспензія повинна вільно проходити через голку №0840, стійкість суспензії протягом певного часу, об'єм суспензії та ін.). Технологічний процес отримання суспензій для ін'єкційного введення необхідно проводити в асептичних умовах. Як видно з наведеної технології при її проведенні використовуються співрозчинники, консерванти, стабілізатори та інші компоненти.

Аналізуючи закон Стокса швидкість седиментації прямо пропорційна квадрату радіуса частинок, різниці густини дисперсійної фази і дисперсійного середовища і обернено пропорційна в'язкості. У цьому випадку стійкість суспензії залежить від ряду факторів: розміру частинок і пов'язаної з цим величини вільної поверхневої енергії Гіббса; в'язкості середовища; співвідношення густини дисперсійної фази і дисперсійного середовища; величини міжфазної напруги; наявності адсорбційного захисного шару ПАР і електричного заряду на поверхні частинок; ступеня спорідненості частинок дисперсійної фази до дисперсійного середовища.

7.3. Суспензійні форми препаратів, що містять продукти біотехнології

У наш час кількість суспензійних форм препаратів, що містять отримані біотехнологією продукти, невелика. У суспензійній формі відомі препарати антибіотиків, вакцини різної спрямованості, препарати пробіотиків, гормони.

Антибіотики випускаються в різних формах: ін'єкційні (розчини і суспензії), таблетки, супозиторії, капсули, суспензії для перорального застосування та ін.

Наводимо приклади суспензій, що містять антибіотики, як для перорального, так і для ін'єкційного застосування.

Азимед – порошок для отримання суспензії. Містить макролідний антибіотик азитроміцин. Молекула утворюється в результаті введення атома азоту в лактонне кільце еритроміцину А. Антибіотик пригнічує синтез білка, зв'язуючись із 50S субодиницею бактеріальних рибосом. Суспензія використовується для перорального застосування.

Для перорального застосування використовуються суспензії й інших антибіотиків: амоксіклав (амоксицилін, який порушує синтез пептидоглікану, + клавуланова кислота, будучи бета-лактамом пригнічує бета-лактамазу, запобігаючи інактивації амоксициліну) та ряд інших.

У медичній практиці використовуються суспензії антибіотиків для ін'єкційного введення, наприклад, Кирин / Тробіцин – порошок для отримання суспензії, містить спектиноміцин – антибіотик широкого спектру дії, отриманий шляхом ферментації грибків роду *Streptomyces*. Взаємодіючи з 30S субодиницею бактеріальних рибосом, пригнічує синтез білка. Отриману суспензію вводять внутрішньом'язово. Біцилін 3 / Біцилін 5 – порошок для отримання суспензії. Містять бензатин пеніцилін, бензилпеніцилін натрію, бензилпеніциліну новокаїнову сіль. Зазначений склад забезпечує стійку пероральну емульсію. Препарат пригнічує синтез пептоглікану клітинної стінки бактерій. Отриману суспензію вводять внутрішньом'язово.

Ряд вакцинних препаратів представлені суспензійними формами. Структура суспензії визначається присутністю у вакцині ад'юванту – сорбенту, представленого гідроксидом алюмінію або фосфатами алюмінію. Добре зарекомен-

дували себе вакцини, які використовуються для профілактики дифтерії, правця, кашлюку, гепатитів А і В, вірусу папіломи людини і ряду інших вакцин, представлених суспензійними формами (табл. 7.1).

Таблиця 7.1 – Характеристика вакцин у суспензійній формі для профілактики інфекційних захворювань

Назва препарату	Форма випуску	Антигени у складі препарату	Допоміжні речовини
Гардасил, вакцина проти папіломи людини, рекомбінантна	Суспензія для в/м введення	Антигени 4-х типів вірусу (6–20 мкг, 11–40 мкг, 16–40 мкг, 18–20 мкг)	Натрію хлорид, алюмінію гідроксифосфатсульфат амфотерный, L-гістидин, твін 80, натрію борат, вода для ін'єкцій
Цервікал, вакцина проти папіломи людини, рекомбінантна	Суспензія для в/м введення	Антигени 2-х типів вірусу (16–20 мкг, 18–20 мкг)	Алюмінію гідроксид, натрію хлорид, натрій дигідрофосфатдигідрат, 3-0-дезацил-4-монофосфорил ліпід А, вода для ін'єкцій
Гексасим	Суспензія для в/м введення	Правцевий анатоксин >40 МЕ; дифтерійний анатоксин >40 МЕ; кашлюковий анатоксин – 25 мкг; філаментозний гемаглютинін – 25 мкг; антигени вірусу поліомієліту – 3 штами (8, 32, 40 ОД); полісахарид Hib – 12-36 мкг	Гідроксид алюмінію, сахароза, L- фенілаланін, гідрофосфат натрію, дигідрофосфат калію, трометамол, вода для ін'єкцій

Сорбційні властивості гідроксиду залежить від багатьох факторів: природи реагентів, їх концентрації, швидкості змішування вихідних розчинів, температури і рН середовища при утворенні гідроксиду. Технологія отримання гідроксидів визначає їх в'язкість, дисперсність і сорбційну активність, яка значною мірою визначає кількість адсорбованих на гідроксиді протективних антигенів. Сьогодні в одних вакцинах використовують як ад'ювант гелі гідроксиду алюмінію, а в інших – фосфатні гелі. Показано, що гель гідроксиду алюмінію

схильний до «старіння» і з аморфного α -стану переходить в інші модифікації (β і γ), в частинки електронно-щільного стану. Поява щільних утворень і дрібно кристалічних форм у структурі гелю гідроксиду алюмінію призводить до погіршення фізико-хімічних властивостей, а саме до часткового зниження сорбційної активності, зміни показника осідання, дисперсності, густини і в результаті призводить до десорбції антигенів з сорбенту. Стійкість дисперсних систем визначається властивостями дисперсної фази, зокрема, розміром частинок і дисперсійного середовища, її агрегатного стану. Крім того, необхідно взяти до уваги наявність зовнішніх впливів, які впливають на збереження частинками агрегативної стійкості, наприклад, положення зовнішнього електричного поля.

Відомі суспензійні форми гормонів – генно-інженерний інсулін, наприклад, Хумулін, суспензія для підшкірного введення, що містить кристали інсуліну і цинку. Суспензія отримана шляхом обробки інсуліну хлоридом цинку.

Бактеріофаги – препарати являють собою моновалентні і полівалентні суспензії живих бактеріофагів. Їх використовують для лікування і профілактики різних форм гнійно-запальних і ентеральних захворювань при прийомі *per os*. Продукти представлені стерильними фільтратами фаголізатів стафілококів, стрептококів, ентерококів, протея, клебсієл, синегнійної та кишкової палички, що містять живі бактеріофаги. Препарати специфічно лизують патогенні бактерії: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

Багато препаратів пробіотиків являє собою ліофілізовані форми для перорального застосування, які приймають після розчинення у водному середовищі для отримання суспензії мікробних клітин (біфідумбактерії, лактобацили, бацили та ін.). Препарати пробіотиків, що випускаються в рідкій формі, представлені суспензіями. Наприклад, один з найефективніших пробіотичних препаратів «Ентержерміна», являє собою оральну суспензію, яка містить спори *Bacillus clausii*.

Таким чином, використання суспензійної лікарської форми знаходить широке застосування. Ряд готових лікарських форм у вигляді суспензій містить препарати, одержані біотехнологічними або іншими шляхами: антибіотики, протективні антигени у складі вакцин, гормони та ін.

7.4. Контроль суспензій

Суспензійні форми препаратів контролюють відповідно до вимог ДФУ за такими показниками: опис, ідентифікація, сторонні домішки, розмір частинок, рН, час стійкості суспензії, стерильність, токсичність, ендотоксини, визначення номінального об'єму (для ін'єкційних форм), мікробіологічна чистота (для нестерильних форм), кількісне визначення (АФІ і допоміжних компонентів, наприклад, пропіленгліколю, бензилового спирту D-сорбіту та ін.). Суспензії бактеріофагів додатково контролюють за допомогою тесту на специфічну активність за методом Аппельмана або за методом Грація.

Контрольні запитання

1. Характеристика суспензій.
2. Фактори, які впливають на технологічні параметри (агрегаційна та седиментаційна стійкість).
3. Закон Стокса і характеристика суспензій.
4. Навести технологічну схему одержання суспензії на прикладі препарату гідрокортизону ацетату.
5. Охарактеризувати склад препарату, роль кожного компоненту та їх вплив на властивості суспензії гідрокортизону
6. Навести основні критичні стадії технології одержання суспензії на прикладі препарату гідрокортизону ацетату.
7. Навести приклади суспензій з вмістом антибіотиків та їх використання в медицині.
8. Характеристика вакцин як суспензійних лікарських форм.
9. Які вимоги до контролю суспензій відповідно до ДФУ?

Список джерел інформації

1. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-ге вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.

2. Перцев І.М. Допоміжні речовини в технології ліків / І.М. Перцев, Д.І. Дмитревський, В.Д. Рыбачук та ін. – Харків: Золоті сторінки, 2010. – 599 с.
3. Чуешов В.И. Технология лекарств промышленного производства / В.И. Чуешов, Е.В. Гладух, И.В. Сайко и др. – Винница: Нова книга, 2014. – 696 с.
4. Рубан Е.А. Промышленная технология лекарственных средств / Е.А. Рубан, В.Д. Рыбачук, Л.Н. Хохлова и др. – Харьков: НФАУ, 2015. – 240 с.
5. Рубан Е.А. Практикум по промышленной технологии лекарственных средств / Е.А. Рубан, Д.И. Дмитриевский, А.И. Хохлова и др. – Харьков: НФАУ, 2016. – 389 с.
6. Медетханов Д.Д. Изготовление лекарственных форм / Д.Д. Медетханов, А.П. Овсянников, Д.Д. Хайруллин. – Казань: Центр инновационной технологии, 2016. – 123 с.
7. Настанова СТ-Н міністерства охорони здоров'я 42-4.0. 2016. «Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Затверджено наказом МОЗ від 29.07. 2016.
8. Байрамишвили Д.И. Генно-инженерный инсулин человека: успехи и перспективы. / Д.И. Байрамишвили // Российский химический журнал. – 2005. – Т. XLIX. – № 1. – С. 34–45.
9. Гладышев В.В. Биофармация: учебник для фармацевтических вузов и факультетов / В.В. Гладышев, И.А. Бирюк, И.Л. Кечин – Дніпро: ЧНП «Економика», 2018. – 250 с.
10. Краснюк И.И. Фармацевтическая технология. Технология лекарственных форм: учебник / И.И. Краснюк, Г.В. Михайлова, Т.В. Денисова, В.И. Скляреноко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 656 с.

ГЛАВА 8. ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ У ФОРМІ СУПОЗИТОРІЇВ

8.1. Загальна характеристика супозиторіїв

Супозиторії – лікарські форми, які є твердими при кімнатній температурі і розплавляються або розчиняються при температурі тіла; це дозовані лікарські форми, які вводяться в порожнини тіла. Виділяють супозиторії:

- 1) ректальні у формі конуса, циліндра із загостреним кінцем, сигароподібні або торпедовидні (маса 1,1–4,0 г) із максимальним діаметром 1,5 см;
- 2) вагінальні, що мають сферичну, яйцеподібну форму і т.д. (маса 1,5–6,0 г);
- 3) палички товщиною 2–5 мм і довжиною до 10 см, які вводять у вузькі канали: сечовивідний канал, шийку матки, свищеві та ранові ходи, слуховий прохід.

Супозиторії мають такі переваги порівняно з іншими лікарськими формами:

- 1 – здатні забезпечувати як місцеву, локальну дію (наприклад, проносну, протизапальну), так і загальний фармакологічний ефект;
- 2 – є дозованою лікарською формою, що дозволяє призначати супозиторії з речовинами різних груп (наприклад, наркотичні);
- 3 – до їхнього складу можна включати речовини, що знаходяться в різних агрегатних станах (консистенції), та речовини, несумісні в інших формах;
- 4 – дозволяють вводити речовини, які руйнуються травними ферментами (антибіотики, гормони, вітаміни і т.д.);
- 5 – у вигляді супозиторіїв досить ефективним є прийом снодійних речовин, діуретиків, серцевих глікозидів;
- 6 – застосовують при токсикозі вагітних;

7 – дозволяють уникнути блювоти, відчуття гіркоти, забезпечують зниження алергічних реакцій;

8 – зручні в педіатрії;

9 – забезпечують швидке надходження АФІ у велике коло кровообігу, відсутність травмування шлунково-кишкового тракту і печінки.

Основи для супозиторіїв повинні відповідати таким вимогам:

1 – забезпечувати необхідний фармакологічний ефект (місцеву або загальну дію АФІ);

2 – здатні включати в себе АФІ і вивільняти їх при застосуванні;

3 – не змінюватися під дією повітря, світла і не реагувати з АФІ, що вводяться в них;

4 – має не бути токсичними, не викликати алергічних реакцій, бути біологічно нешкідливими;

5 – забезпечувати геометричну форму, певні структурно-механічні та фізичні властивості: здатність плавитися або розчинятися при температурі тіла, забезпечуючи максимальний контакт між АФІ і слизовою оболонкою.

Найчастіше використовують такі основи:

1. Ліпофільні:

➤ масло какао – суміш природних тригліцеридів: складних ефірів гліцерину з пальмітиновою, олеїною, стеариною та іншими жирними кислотами;

➤ гідрогенізовані жири і їх сплави, наприклад, бутирол – гідрогенізований жир з температурою плавлення 36 °С – 50 %, гідрогенізований жир з температурою плавлення 49 °С – 10 %, парафін – 10 % (вуглеводень), масло какао – 30 %;

➤ твердий жир – щільна маса білого або білого з кремовим відтінком кольору, у розплавленому стані – прозора рідина.

2. Гідрофільні: поліетиленоксидні – консистенція залежить від ступеня полімеризації: ПЕО-400 (ступінь полімеризації – 9) – рідина; ПЕО-1500 (ступінь полімеризації – 35) і ПЕО-4000 (ступінь полімеризації – 90) – мають тверду консистенцію. ПЕО основи використовують для отримання гідрофільних лікарських препаратів. До недоліків ПЕО основ можна віднести: подраз-

нюючий ефект за рахунок зневоднення слизової оболонки; можливість витікання з прямої кишки.

3. Дифільні основи – здатні плавитися при температурі тіла або розчинятися в секретах слизової оболонки. Основи цієї групи являють собою сплав ліпофільної та гідрофільної основи з ПАР, складні ефіри гліцерину з вищими жирними кислотами, складні ефіри високомолекулярних спиртів з фталевою або іншими кислотами.

8.2. Технологія отримання супозиторіїв

Виготовлення супозиторіїв проводять з дотриманням правил санітарії, гігієни, GMP. Виробництво супозиторіїв проводять в декілька стадій:

1) підготовка основи – вибір основи та її підготовка залежить від способу приготування супозиторіїв. Наприклад, масло какао подрібнюють після охолодження (при 10–12 °С воно стає крихким) з використанням пристосування для подрібнення жирових основ. ПЕО основи сплавляють на водяній бані з урахуванням температури плавлення;

2) введення АФІ в основу і отримання супозиторної маси – спосіб введення АФІ залежить від характеру основи, фізико-хімічних властивостей АФІ (характеристика кристалів, розчинність в основі, взаємного змішування) та їх концентрацій. Речовини, розчинні в ліпофільній основі або ліпофільних компонентах дифільних основ (камфора, хлоралгідрат, фенол, анестезин в концентрації не більше 2 %, деякі жиророзчинні гормони і вітаміни) розплавляють в частині або у всій кількості розплавленої основи. При цьому можливе зниження температури плавлення маси (утворення евтектичної суміші). Найсильніше знижують температуру плавлення масло какао, хлоралгідрат, камфора, фенол. У цих випадках необхідно додавати речовини, що підвищують температуру плавлення маси, наприклад, віск або парафін. АФІ, які легко розчиняються у воді та входять до складу супозиторіїв в малих концентраціях (солі алкалоїдів, азотистих основ (новокаїн), нітрат срібла, кислота лимонна та ін.), розчиняють у мінімальній кількості води, незалежно від основи (з урахуванням її водопоглинаючої здатності). Замість води очищеної розчинниками можуть бути гліцерин, етанольно-водно-гліцеріновий розчин (1:3:6). У випадку ліпофільних і

дифільних основ водорозчинні речовини утворюють емульсійні композиції. Як емульгатори в супозиторіях із маслом какао можливе застосування ланоліну. Виготовлення супозиторної маси продовжують до тих пір, поки маса не стане однорідною. Супозиторна маса повинна бути упругопластичною, однорідною, без видимих блискіток, вкраплень речовин і основи. Розчинення має забезпечувати рівномірний розподіл малих доз АФІ в основі, точності дозування і покращувати всмоктування АФІ в слизову оболонку прямої кишки, природних і патологічних порожнин організму. Потім формують супозиторії;

3) приготування супозиторіїв методом пресування – виготовлену суміш АФІ з компонентами основи злегка охолоджують до температури 41–42 °С, постійно перемішуючи (щоб уникнути розшарування), розливають в супозиторні форми і поміщають в морозильну камеру холодильника на 10–15 хв для застигання (форми попередньо охолоджують у морозильній камері). Супозиторну масу, вміщену в циліндр преса, поршнем через канали під тиском подають у порожнину матриці. Після їх заповнення (про це дізнаються за виділенням надлишку маси через отвори заслонки і припиненням руху гвинта), відкривають упор (заслінку) і відпресовані супозиторії при легкому натиску поршня виходять з матриці преса. Форму охолоджують в холодильнику до 4–8 °С.

Таким чином, супозиторії є твердими однодозовими лікарськими засобами. Форма, об'єм і консистенція супозиторіїв повинні відповідати вагінальному і ректальному використанню. Вони містять одне або декілька діючих речовин, диспергованих або розчинених у відповідній основі. Супозиторії повинні розчинятися або плавиться при температурі тіла. За необхідності до складу супозиторіїв вводять допоміжні речовини: розріджувачі, адсорбенти, поверхнево-активні і змащувальні речовини, антимікробні консерванти, а також барвники, дозволені до медичного застосування.

Супозиторії готують методом пресування або виливання. У разі необхідності діючі речовини подрібнюють і просіюють через сита. Якщо супозиторії готують методом виливання, приготовлену масу попередньо розплавляють при нагріванні і розливають у відповідні форми. Супозиторії твердіють при охолодженні. З метою забезпечення процесу затвердіння до складу супозиторіїв вводять допоміжні речовини: твердий жир, макроголи, масло какао, різні гелеутворюючі суміші, які містять, наприклад, желатин, воду і гліцерин.

Супозиторії піддають контролю за такими параметрами: визначення розміру частинок, пролонгованість місцевої дії або вивільнення діючих речовин, розпадність супозиторіїв (стан супозиторіїв на жировій основі досліджують через 30 хв, а на гідрофільній основі – через 60 хв).

8.3. Супозиторії, які містять продукти, одержані біотехнологічним шляхом

За останні роки збільшилася кількість вагінальних та ректальних супозиторіїв, до складу яких входять АФІ, отримані з використанням біотехнологічних методів: антибіотики, штами пробіотиків, цитокіни, антигени різної структури та ін.

Штами пробіотиків. Пробіотики – імунобіологічні препарати, які містять живі бактерії, що мають антагоністичну активність відносно патогенних і умовно-патогенних бактерій. Пробіотики призначені для лікування та профілактики гострих і хронічних захворювань шлунково-кишкового тракту, порожнини рота, урогенітального тракту та інших інфікованих органів, що супроводжується порушенням нормальної мікрофлори у дітей і дорослих. При виробництві пробіотиків для медичного застосування використовуються виробничі штами з підтвердженою клінічною ефективністю, які ідентифіковані за фенотипічними та генотипічними ознаками; за фізіологічно-біохімічними властивостями, спектром антагоністичної активності до тест штамів патогенних і умовно-патогенних бактерій. Штами пробіотиків повинні бути апатогенними і нешкідливими, не продукувати ферменти патогенності (каталазу, гіалуронідазу, лецитиназу С, нейрамінідазу та ін.).

У теперішній час промисловістю випускаються два види супозиторіїв: лікарські препарати та біологічно активні добавки. До складу супозиторіїв вводять переважно штами *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*. Відомі десятки препаратів супозиторіїв, які містять штами пробіотиків. Розглянемо кілька прикладів (табл.8.1).

Таблиця 8.1 – Препарати пробіотиків у формі супозиторіїв

Назва препарату	Штами пробіотиків	Склад основи	Призначення
Біфідобактерин, вагінальні супозиторії, Ланафарм, Росія	<i>Bifidobacterium bifidum</i> 10 ⁷ у супозиторії	Твердий кондитерський жир – 75-80 %, парафін – 5-10 %, емульгатор Т2 – 5-10 %	Лікування і профілактика дисбіозів піхви та запальних процесів жіночих статевих органів, вагінози
Ацилакт, вагінальні супозиторії Ланафарм, Росія	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 100Н, NK11, K3M24	Твердий кондитерський жир – 75-80 %, парафін – 5-10 %, емульгатор Т2 – 5-10 %	Лікування і профілактика дисбіозів піхви і запальних процесів жіночих статевих органів
Лактоваг, вагінальні супозиторії, Лекхім, Україна	<i>Lactobacillus</i> 5·10 ⁷	Твердий жир	Профілактика і лікування захворювань жіночих статевих органів
Фітосвічки, супозиторії вагінальні / ректальні, Гірудекс, Україна	<i>L. rhamnose</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. reuteri</i>	Масло какао	Відновлення мікрофлори кишечника
Лактонорм, вагінальні супозиторії, Авіцена, Україна	<i>L. plantarum</i> 8P-173, <i>L. fermentum</i> 90T, <i>L. fermentum</i> 39	ПЕО-400, ПЕО-1500, ланолін.	Профілактика і лікування захворювань жіночих статевих органів
Floral Femme, вагінальні, вегетаріанські супозиторії, США	15 штамів пробіотиків – в 1 супозиторії 52·10 ⁹ КУО: <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. bulgarius</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>B. longae</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. infantum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Гіпромелоза	Профілактика і лікування вагінальної мікрофлори
SynBio, вагінальні супозиторії, Synbio, Італія	<i>L. rhamnose</i> – IMC-501, <i>L. paracasei</i> – IMC 502	Дані відсутні	Підтримка вагінальної мікрофлори

Останнім часом проводяться інтенсивні дослідження супозиторіїв, особливо вагінальних для нормалізації мікрофлори піхви. З'являються роботи зі створення комплексних препаратів супозиторіїв. Так, запропоновані ректальні супозиторії, що містять L-глутатіон і пробіотичні штами. Ректальна доставка глутатіону усуває втрати у травному тракті та метаболізмі печінки, забезпечується висока біодоступність (на 40–50 %) за рахунок ректальної судинної системи. Комплекс із пробіотиками характеризується синергізмом, забезпечуючи антиоксидантні та протизапальні властивості.

Антибіотики. Відомі супозиторії, що містять антибіотики: еритроміцин (*Streptomyces erythreus*), хлорамфенікол (*Streptomyces venezuelae*), кліндаміцин (полусинтетичний антибіотик групи лінкозамідів), стрептоміцин та ін. Наприклад, «Далацин» супозиторії вагінальні з кліндаміцином, «Синтоміцин» супозиторії вагінальні з хлорамфеніколом (склад основи – твердий жир).

Цитокіни. До складу супозиторіїв вводять рекомбінантний інтерферон α -2b, що застосовується для лікування вірусно-бактеріальних інфекцій. Наприклад, «Лаферобіон-Фармбіотек» супозиторії ректальні (Інтерфармбіотек, Україна) містить рекомбінантний інтерферон α -2b – 150000, 500000 МО. Допоміжні речовини основи: твердий жир, токоферолу ацетат (вітамін Е), аскорбінова кислота (вітамін С). Препарат використовують при папіломній вірусній інфекції, при уrogenітальних міксінфекціях; що передаються статевим шляхом; при бактеріальних, вірусних і змішаних інфекціях; при передпухлинних захворюваннях шийки матки.

«Кіпферон» супозиторії вагінальні / ректальні (ТОВ, Алфарм, Росія). Супозиторії містять рекомбінантний інтерферон α -2b – 500000 МО і протеїни плазми людини 60-200 мг (у тому числі імуноглобуліни IgM, IgA, IgG). Допоміжні речовини основи: твердий жир – 0,838г, парафін – 0,085 г, емульгатор Т2 – 0,085 г. Препарат має імуномодельючу, противірусну, антихламідійну активність.

«Вагіферон» супозиторії вагінальні (ТОВ Фірн, Росія). Супозиторії містять рекомбінантний інтерферон α -2b – 5000000 МО, метронідазол – 250 мг, флуконазол – 150 мг. Допоміжні речовини основи: макрогол 1500 – 92 %, макрогол 400 – 8,0 %. Використовується для лікування вагінального кандидозу, ас

протигрибкову, протимікробну, протизапальну, імуномодельючу, протівірусну активність.

«Генферон» супозиторії вагінальні / ректальні (Біокад, Росія). Супозиторії містять рекомбінантний інтерферон α -2b - 2500000, 5000000, 1 млн. МО, таурин – 0,01 г, бензокаїн – 0,055 г. Допоміжні речовини основи: твердий жир, макрогол 1500, декстран 60000, полісорбат 80. Має антиоксидантну, імуномодельючу, протівірусну активність.

Відомі багато інших препаратів супозиторіїв, що містять рекомбінантний інтерферон α -2b («Лаферомакс», Біофарма, Україна).

Протективні антигени. До складу супозиторіїв вводять антигени різних інфекційних агентів, які стимулюють імунні захисні реакції:

«Постерізан», супозиторії ректальні (Dr. Kade, Німеччина). Супозиторій містить 387 мг стандартизованої суспензії культури бактерій *E. Coli* ($6,6 \cdot 10^8$), інактивованою обробкою фенолом (6,6 мг). Допоміжні речовини основи: твердий жир, масло касторове гідрогенізоване. Препарат являє собою засіб для лікування геморою та анальних тріщин. Супозиторії стимулюють процеси місцевого імунітету за рахунок антигенної дії, викликаючи як специфічні, так і неспецифічні імунні реакції. Застосування приводить до протизапального ефекту.

Серед перспективних розробок вірусних вакцин перевага віддається створенню мукозальних препаратів, тобто препаратів, що вводяться в слизову оболонку. Створюють ректальні живі вакцини проти вірусних інфекцій на основі атенуйованих рекомбінантних штамів сальмонел, що мають протективні вірусні антигени. Супозиторії для імунопрофілактики вірусних інфекцій містять на одну свічку масою 2.0 г мас % такі компоненти: суспензія клітин рекомбінантних атенуйованих штамів *Salmonella*, трансформованих рGEX-2T-BI, рсDNA-TSI або рКНВс, що мають гени проти вірусних антигенів, входять в супозиторну основу в кількості 10^6 - 10^9 живих клітин, жирова основа – 94 % і емульгатор Т2 – 6,0 %. При цьому як жирова основа може бути використаний твердий кулінарний жир або гідролізоване бавовняне масло. До складу можливе введення маслв какао і парафіну. Застосування супозиторіїв дозволяє індукувати специфічний гуморальний і клітинний імунітет у відповідь на відповідні антигени.

Показано, що непатогенні атенуйовані штами *Salmonella* здатні інвазувати слизову оболонку і деякий час жити в клітинах лімфоїдної тканини орга-

нізму ссавців. Клітина-вектор, будучи природним депо і ад'ювантом для антигену, представляє його в максимально імуногенній формі, збільшує час персистенції і сприяє накопиченню антигену в імунокомпетентних клітинах.

В клітинну культуру *S. enteritidis* і *S. typhimurium* шляхом електропорації вводять плазмідні з обов'язковою наступною перевіркою трансформованих бактерій на наявність плазмід. У супозиторій вводяться ліофілізовані культури бактерій і контролюють в супозиторіях їхню життєздатність. Розробляються препарати супозиторіїв, що містять антигени до ВІЛ, гепатитів В і С.

8.4. Контроль супозиторіїв

Препарати у формі супозиторіїв контролюють відповідно до вимог ДФУ за такими показниками: опис (відсутність вкраплень, однорідність маси), ідентифікація, розмір частинок (у разі введення в супозиторну масу АФІ у вигляді суспензій), розчинення, однорідність маси, розпадання, температуру плавлення, однорідність дозування, мікробіологічна чистота та ін.

Контрольні запитання

1. Що являють собою лікарські форми супозиторіїв та їх класифікація ?
2. Які переваги мають супозиторні форми?
3. Які основи використовують для супозиторіїв? Які властивості притаманні основам та які основи використовують найчастіше?
4. Охарактеризуйте основні стадії виробництва супозиторіїв?
5. Навести вимоги до супозиторної маси.
6. Навести перелік продуктів біотехнології, які входять до складу супозиторіїв.
7. Охарактеризуйте склад і властивості супозиторіїв з вмістом антибіотиків.
8. Які Вам відомі супозиторії, до складу яких входять цитокіни та протективні антигени?
9. Які методи рекомендує ДФУ для контролю супозиторіїв?

Список джерел інформації

1. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-ге вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.
2. Перцев І.М. Допоміжні речовини в технології ліків / І.М. Перцев, Д.І. Дмитрівський, В.Д. Рибачук та ін. – Харків: Золоті сторінки, 2010. – 599 с.
3. Чуешов В.И. Технология лекарств промышленного производства / В.И. Чуешов, Е.В. Гладух, И.В. Сайко и др. – Винница: Нова книга, 2014. – 696 с.
4. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, М.И. Борщевская. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.
5. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине: учебное пособие / Ю.М. Краснопольский, Дудниченко А.С., Швець В.И. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2011. – 228 с.
6. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Технология биологически активных веществ: учебное пособие. Часть 1 / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев - Харьков: НТУ «ХПИ», 2012. - 303 с.
7. Рубан Е.А. Практикум по промышленной технологии лекарственных средств / Е.А. Рубан, Д.И. Дмитриевский, А.И. Хохлова и др. – Харьков: НФАУ, 2016. – 389 с.
8. Медетханов Д.Д. Изготовление лекарственных форм / Д.Д. Медетханов, А.П. Овсянников, Д.Д. Хайруллин. – Казань: Центр инновационной технологии, 2016. – 123 с.
9. Настанова СТ-Н міністерства охорони здоров'я 42-4.0. 2016. «Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Затверджено наказом МОЗ від 29.07.2016.
10. Краснюк И.И. Фармацевтическая технология. Технология лекарственных форм: учебник / И.И. Краснюк, Г.В. Михайлова, Т.В. Денисова, В.И. Складенко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 656 с.

ГЛАВА 9. ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ У ФОРМІ МАЗЕЙ

9.1. Загальна характеристика мазей

Мазі – м'яка лікарська форма призначена для нанесення на шкіру, рани, опіки або слизові оболонки. Застосовуються в дерматології, офтальмології, стоматології, хірургії, урології, проктології та ін.

Існують різні способи застосування мазей:

- нанесення безпосередньо на шкіру або слизові оболонки з утворенням на поверхні рівної суцільної плівки;
- у вигляді пов'язок або тампонів з тканини або нетканинних, у тому числі полімерних, матеріалів, з попередньо нанесеною маззю;
- у вигляді аерозолів.

Мазі забезпечують контакт із поверхнею і тим самим сприяють всмоктуванню речовин, особливо під пов'язкою. Проникність шкіри різко підвищується при мацерації (гідратації) шкіри зігріваючими компресами, теплими ваннами, при змазуванні подразнюючими речовинами, що пов'язано з посиленням кровотоку в шкірі.

За складом розрізняють прості мазі, які містять один компонент (рослинні або мінеральні масла, вазелін, ланолін та ін.), і складні багатоконпонентні – основна речовина і допоміжні компоненти (носії лікарських речовин), консерванти, антиоксиданти, поверхнево-активні речовини різної структури.

Класифікація мазей: медичні (лікувальні та лікувально-профілактичні) і косметичні (лікувальні, профілактичні, захисні, гігієнічні, декоративні).

Вимоги до мазей:

- ✓ забезпечення необхідного фармакологічного ефекту – оптимальна дисперсність лікарських речовин, рівномірний розподіл лікарської речовини по всій масі мазі;

- ✓ однорідність;
- ✓ відсутність небажаної взаємодії інгредієнтів мазі;
- ✓ м'яка консистенція; стабільність мазі при зберіганні.
- ✓ відсутність мікробної контамінації;
- ✓ відсутність алергічних і токсичних реакцій;
- ✓ хороший товарний вигляд;
- ✓ для косметологічних мазей запах, колір, зовнішній вигляд.

У мазях застосовують речовини практично всіх фармакологічних груп: антисептики, місцеві анестетики, протизапальні, протигрибкові, протизапальні та ін. У тому числі і продукти біотехнології: гормони, вітаміни, антибіотики, фаги та ін. У мазях широко застосовують ряд речовин: сірку, вісмут, цинку оксид, тальк, бензилбензоат, іхтіол, настоянки та екстракти рослин валеріани, шипшини та ін.

Залежно від консистенції (складу, в'язкості і характеру внутрішньої структури) розрізняють:

- ✓ власне мазі (гомогенні і гетерогенні системи на різних основах (ліпофільних і гідрофільних));
- ✓ пасти (суспензійні чи комбіновані мазі з вмістом твердої фази);
- ✓ мазі на емульсійних основах;
- ✓ гелі (мазі переважно на гідрофільних основах);
- ✓ лініменти (рідкі мазі).

До мазей прийнято відносити мазеві олівці.

За типом лікарської системи (розміром частинок лікарських речовин і характеру розподілу їх у мазі) розрізняють мазі гомогенні (мазі-сплави, мазі розчини, екстракційні мазі) і гетерогенні (суспензійні, емульсійні, і комбіновані).

Всі мазеві основи можна розділити на такі:

✓ гідрофільні основи: гелі білків, карбополу, колагену, олігоефірів, полісахаридів, поліетиленоксиду (ПЕО).

✓ гідрофобні основи: вуглеводні, жири, силіконвмісні, поліетиленові і поліпропіленові гелі.

✓ гідрофільно-ліпофільні (дифільні) основи: емульсії типу масло/вода, типу вода/масло, силіконвмісні, вуглеводні.

9.2. Технологія отримання мазей

9.2.1. Класифікація мазей та їх компонентів

Для отримання мазей використовують лікарські речовини (фармакологічно активні інгредієнти) і різні основи.

Основи для мазей необхідні для надання їм певного об'єму, консистенції, забезпечення необхідної концентрації лікарської речовини. Від підбору поєднання лікарської речовини і компонентів основи залежить швидкість вивільнення лікарської речовини, а отже, і фармакологічний ефект мазі.

Основи повинні відповідати таким вимогам:

- ✓ забезпечувати прояв специфічної активності мазі;
 - ✓ не порушувати фізіологічних функцій шкіри, не викликати алергічних реакцій, не чинити токсичної, подразнюючої, сенсibiliзуючої дії на організм;
 - ✓ бути хімічно індиферентними, не взаємодіяти з лікарськими речовинами, не змінюватися під дією факторів зовнішнього середовища (світло, кисень, волога);
 - ✓ забезпечувати необхідну консистенцію, оптимальні реологічні властивості (здатність легко намазувати на шкіру або слизові оболонки, не розшаруватися, легко видавлюватися з туб);
 - ✓ легко змішуватися з лікарськими речовинами і вивільняти їх при контакті зі шкірою та слизовими оболонками;
 - ✓ не піддаватися мікробній контамінації;
 - ✓ легко видалятися зі шкіри, волосся і білизни;
 - ✓ мати гарний товарний вигляд, бути доступною і економічно доцільною.
- Основи (носії), які використовуються у складі мазей відповідно до ДФУ, можна класифікувати з урахуванням їх функціонального призначення:
- ✓ м'які основи-носії (вазелін, ланолін та ін.);
 - ✓ речовини, що підвищують температуру плавлення і в'язкість основ (парафін, спермацет, гідрогенізовані рослинні олії, воски, ПЕГ з високою молекулярною масою та ін.);
 - ✓ гідрофобні розчинники (мінеральні і рослинні масла, ізопропілпальмітат, ізопропілміристан, поліалкілсиліксани та ін.);

✓ гідрофільні розчинники (спирти етиловий та ізопропіловий, ПЕО 200-600, пропіленгліколь, гліцерин, димексид та ін.);

✓ емульгатори типу масло/вода (натрію лаурилсульфат, твіни, поліетиленгліколеві ефіри вищих жирних спиртів, цетилпіридинію хлорид, солі вищих жирних кислот, оксиетильоване касторове масло, поліоксиетиленгліколеві ефіри стеаринової кислоти та ін.);

✓ емульгатори типу масло/вода (вищі жирні спирти, холестерин, спирти вовняного воску, гліцерилмоностеарат та ін.);

✓ гелеутворювачі (карбомер, альгінова кислота та її солі, похідні целюлози, поліетилен, поллоксамер або проксанол, ПЕО 1500-8000, колоїдний діоксид кремнію, желатин та ін.);

✓ антимікробні консерванти (бензалконію хлорид, хлоргістидин, бензойна і сорбінова кислоти та їх солі, спирт бензиловий, парабени, крезол, імідо-сечовина, пропіленгліколь, спирт етиловий, цетилпіридинію хлорид, фенокси-етанол та ін.);

✓ антиоксиданти (α -токоферол, аскорбінова кислота та її похідні, лимонна кислота, пропілгалат, натрію метабісульфіт, бутилгідроксіанізол і бутилгідрокситолуол, етилендіамінтетраоцтова кислота та/або її сіль та ін.);

✓ солюбілізатори (β -циклодекстрин, гідрофільні поверхнево-активні речовини та ін.);

✓ віддушки (ментол, ефірні масла, фенілетиловий спирт);

✓ стабілізатори рН (лимонна кислота, фосфорнокислі солі натрію та ін.).

До гідрофобних основ належать жири, вуглеводневі, силіконові, поліетиленові основи.

До жирових основ належать (тваринні жири – гусячий, курячий, свинячий, жир бабака; рослинні олії – масло какао (найчастіше), соняшникова, арахісова, кукурудзяна, оливкова, персикова, касторова. Ці основи найчастіше використовуються в лініментах для лікування виразок, ран, опіків і як самостійні лікарські засоби. Фармакопеї багатьох країн обмежують їх застосування. У США та Англії природні жири повністю виключені, але Фармакопеї Японії та Скандинавських країн пропонують використовувати тільки жири гідрогенізовані – насиченні воднем ненасичених зв'язків жирних кислот гліцеридів. Жири гідро-

генізовані використовуються досить часто у зв'язку з їх стабільністю та стійкістю при зберіганні.

Вуглеводневі основи – отримують шляхом перегонки нафти. Вони стійкі при зберіганні, хімічно індиферентні. До цих основ належать:

Вазелін – суміш рідких, напіврідких і твердих вуглеводнів граничного ряду (алканів), що являє собою однорідну масу без запаху. Структуру вазеліну створює тривимірна сітка, утворена твердою фракцією вазеліну, яка утримує в'язкі та рідкі вуглеводні. Температура плавлення вазеліну знаходиться в межах 37–50 °С. Вазелін легко змішується з жирами, рослинними оліями (виняток становить касторове масло). У вазеліні при нагріванні розчиняються деякі лікарські речовини: ментол, камфора, тимол, йод, сірка та ін.

Парафін – суміш насичених високомолекулярних вуглеводнів. Біла жирна на дотик кристалічна маса, плавиться при температурі 50–57 °С.

Вазелінове масло – рідкий парафін, безбарвна масляниста рідина без смаку і запаху, погано всмоктується шкірою, залишає на ній тонку плівку. Вазелінове масло застосовують як основу лініментів, допоміжну речовину для попереднього подрібнення твердих речовин у мазі суспензійного типу, для розрідження густих основ.

Озокерит – воскоподібний природний мінерал темно-коричневого або чорного кольору із запахом нафти, плавиться при температурі 50–65 °С. Являє собою суміш високомолекулярних парафінових вуглеводнів, містить також смоли, сірку.

Віск – рафінований озокерит. Аморфна, безбарвна тверда липка маса з температурою плавлення 68–72 °С.

Парафін, озокерит і віск застосовують для загустіння м'яких основ, отримання мазей стабільних при жаркому кліматі.

До недоліків вуглеводневих основ можна віднести: порушення фізіологічних властивостей шкіри (викликають сенсibiliзацію шкіри і переродження епідермісу), важко розподіляється на поверхні слизових оболонок; погано змиваються з поверхні шкіри та волосяних частин тіла.

Силіконові основи. Найчастіше застосовують есилон-аеросильну основу (під назвою «вазелін-Е/16»). Силіконові основи отримують шляхом загущення силіконових рідин оксиллом; сплавом силіконових рідин з іншими ліпофільними

компонентами; сплавом із ПАР (отримання абсорбційних основ) з подальшим отриманням емульсійних композицій.

При використанні силіконових основ потрібно пам'ятати, що вони не змішуються або обмежено змішуються із воском, парафіном, гліцерином, ПЕГ, несумісні з рослинними оліями і вазеліновим маслом. Найчастіше використовується есилон-аеросильна основа («вазелін-Е/16»), яка включає в себе: рідину «есилон 5» – 84 г та оксил (аеросил) – 16,0 г .

Поліетиленові основи – отримують з поліетилену низького і високого тиску. Хімічно нейтральні, сумісні з речовинами гідрофільного характеру, погано змиваються водою. Входять до складу мазей захисного характеру, наприклад, для захисту шкіри рук від розчинів кислот і лугів.

Гідрофільні основи. Гелі білків представлені желатино-гліцериновими гелями, колагеновими основами. Містять до 1–3 % желатину, 30 % гліцерину і 70–80 % води очищеної. Гелі при цьому виходять ніжні, легко розм'якшуються на шкірі. Гелі не стійкі – додають консерванти. У косметичці використовують кислоти: борну, саліцилову і натрію бензоат в концентрації 0,1–0,2 %.

Колагенові основи – у вигляді 3–5 % гелів. На цей час знаходяться на стадіях розробки ранозагоювальні, анестетики, цитостатики, антисептики. Застосування колагенових гелів у складі препаратів ґрунтується на їх вираженій стимулюючій дії фібрилоутворення і поновлення уражених тканин. Гелі біодеградуючі. Найчастіше колагеновий гель має такий склад: колаген – 2-5 %, гліцерин – 6,0 %, цетилпіридинію хлорид – 0,01 %, вода очищена до 100 %.

Гелі полісахаридів – найчастіше похідні целюлози – МЦ і Na-КМЦ (у кількості 3–8 %, в очних мазях – 3 %). Це порошки або волокнисті маси без кольору і запаху. Гелі ефірів целюлози м'які, прозорі, без запаху, добре вивільняють лікарські речовини, біологічно нешкідливі, забезпечують резорбцію. Широко застосовуються мікробні полісахариди, які є ефективними емульгаторами та стабілізаторами. Найбільш перспективним є аубазидан (стійкий при обробці 120 °С, після набухання у воді протягом 2 годин і нагріванні до 80 °С розчиняється, рН водних розчинів 6,8–7,4). В концентрації 0,6 % використовуються як основа для мазей. Як полісахаридні гелі використовуються пектин і пектинові речовини – полісахариди, молекули яких складаються із залишків D-галактуранової кислоти, частина карбоксильних груп етерифікована метано-

лом, а гідроксильні групи можуть служити точками приєднання бокових розгалужених ланцюгів із залишків D-галактози, L-арабінози, D-ксилози, L-рамнози. Водні розчини полісахаридів здатні утворювати стійкі гелі, особливо при підкисленні в присутності сахарози.

Гелі аквасорбу. Аквасорб – гранульований порошок кремового кольору, аморфний без запаху, використовують для мазей з антисептиками для лікування ран і опіків.

Гелі агару 1,5 % отримують з водоростей. Гелі фітостерину – одержують лужним гідролізом деревини сосни. Здатний утримувати 20-кратний об'єм води.

Гелі альгінату (кислота альгінова та її натрієва та кальцієва солі). Альгінати – природні високомолекулярні сполуки, які одержують з бурих морських водоростей (ламінарій, фукусів, цистозер). Це блок-сополімери D-мануронової та L-гулууронової кислот, з'єднаних між собою β-глікозидними зв'язками. Альгінова кислота у воді погано розчиняється. Водорозчинні солі альгінової кислоти використовуються в концентрації 5–10 %. Альгінати при виробництві лікарських препаратів використовуються як емульгатори, стабілізатори, загущувачі (креми, мазі, стійкі емульсійні системи). Лікарські препарати на основі альгінатів найбільш стабільні в зоні рН від 4,0 до 10,0.

Гелі глинистих мінералів (бентоніт глина) – це алюмогідроксилати – полімери неорганічної природи. Містять домішки оксидів кальцію, натрію, калію, магнію, титану. Алюміній може бути частково заміщений залізом або магнієм. До складу гелю входить 13–20 % бентоніту, 10 % гліцерину, 70–77 % води очищеної. Консервант – 0,5 % фенолу. Використовують в дерматології: мазі стрептоциду, окису цинку, прополісу, іхтилової та борної кислоти.

Гелі синтетичних високомолекулярних речовин – поліетиленоксиди рідкі (ПЕО-200, 300, 400, 600), м'якої консистенції (ПЕО 1000, 1500), тверді (ПЕО 2000, 4000, 6000). Зі збільшенням маси збільшується в'язкість, зменшується гігроскопічність, знижується розчинність у воді. До складу гелів входять антибіотики, вітаміни, ферменти, гормони, сульфаніламід.

Гелі полівінілового спирту, полівінілпіролідону (ПВП).

Гелі сополімерів акрилової кислоти – знайшли широке застосування в медицині і косметичі. Являють собою лінійні та зшиті сополімери акрилової

кислоти. Застосовують сополімер метилакрилату і метакрилової кислоти Еудисперт (Німеччина), Карбпол (США) і Карбомер (Франція). Карбопол –дрібнодисперсний порошок, добре диспергується у воді з утворенням в'язких дисперсій. Низьке значення рН дисперсій нейтралізують додаванням триетаноламіну, натрію тетраборату, лугу. Дані основи використовують для отримання мазей з антибіотиками, (неоміцин, полімексин), гормонами (дексаметазон, гідрокортизон), вітаміни (А, В₂, В₆, Е, Д та ін.). Гелі карбополу не мають подразнюючої та сенсibiliзуючої дії. Карбопол застосовують у виробництві мазей, очних крапель, супозиторіїв, емульсій, суспензій, таблеток, драже, мікрокапсул.

Ліофільно-гідрофільні і гідрофільно-ліпофільні основи – штучно підібрані системи, які мають одночасно ліпофільні та гідрофільні властивості. Їх використовують як для жиророзчинних, так і для водорозчинних лікарських речовин.

9.2.2. Вибір складу мазі та технології

При виборі оптимального варіанта технології враховують фізико-хімічні властивості лікарських і допоміжних речовин (компонентів основ):

- ✓ характер кристалів лікарських речовин;
- ✓ здатність лікарських речовин розчинятися в різних середовищах (воді, гліцерині, димексиді, рослинних і мінеральних маслах, ПЕО, силіконових рідинах, етанолі, розплавленому вазеліні, ланоліні та ін.);
- ✓ здатність інгредієнтів змішуватися між собою і мати властивості міжфазного розподілу;
- ✓ можливість фізико-хімічної або хімічної взаємодії між інгредієнтами композиції;
- ✓ властивості допоміжних речовин (розчинюючу, диспергуючу, емульгуючу здатність, антимікробні властивості);
- ✓ склад основи та її походження, основні властивості (температура плавлення, затвердіння, в'язкість, здатність змішуватися з водою та іншими середовищами);

Фармакологічний ефект мазі значною мірою залежить від дисперсності лікарських речовин в мазі. Найактивнішими є мазі, які містять лікарські речо-

вини в розчиненому або тонко подрібненому стані. Вибираючи розчинник, необхідно керуватися принципом «подібне розчиняється в подібному».

Залежно від фізико-хімічних властивостей лікарської речовини і характеру (типу) основи попередню підготовку здійснюють таким чином:

- ✓ розчиняють в основі або у споріднених основі рідинах для отримання гомогенних мазей;

- ✓ розчиняють в рідинах, які не змішуються з основою, для отримання емульсійних мазей;

- ✓ попередньо диспергують з урахуванням правил подрібнення і змішування порошків, а потім – у присутності допоміжної спорідненої основі рідини для отримання суспензійних мазей.

Найбільший диспергуючий ефект забезпечується при додаванні допоміжної рідини в кількості 50 % від маси диспергованої речовини (правило оптимального подрібнення).

До складу водоемульсійних мазей може бути включено значну кількість води, і при цьому утворюється емульсія «вода у маслі» або «масло у воді» залежно від типу емульгатора. Для отримання емульсійних мазей можуть бути використані: емульгатори типу вода/масло, такі, як спирти вовняного воску, ефіри сорбіту, моногліцериди і жирні спирти; емульгатори типу масло/вода, такі як сульфатовані жирні спирти, полісорбати, цетостеарилові ефіри макроголу або ефіри жирних кислот з макроголами. Їх основи аналогічні основам гідрофобних мазей.

До складу гідрофільних мазей входять основи, які змішуються з водою. Як правило, до їхнього складу входить суміш рідких і твердих макрополів (поліетиленгліколей).

Гелі складаються з рідини, в якій досягнуто гелеутворення за рахунок певних гелеутворювачів. Ліпофільні гелі (олеогелі) – лікарські препарати, основа яких складається з вазелінового масла з поліетиленом або з жирними маслами і таких гелеутворювачів, як колоїдний діоксид кремнію, алюмінієве або цинкове мило.

Гідрофільні гелі (гідрогелі) – лікарські препарати, основа яких складається з води, гліцерину або пропіленгліколю і таких гелеутворювачів, як крохмаль, похідні целюлози, карбомер і магній-алюмінієві силікати.

Обґрунтування оптимального складу м'яких лікарських форм передбачає наукові дослідження з підбору діючих та допоміжних речовин. Підбір основи лікарської форми з пружно-пластичним дисперсійним середовищем має здійснюватися з урахуванням ділянки нанесення, глибини впливу на тканини шкіри і тривалості аплікації. Швидкість вивільнення і penetрації діючих речовин з м'якої лікарської форми залежить від виду основи, структурно-механічних властивостей, присутності активаторів всмоктування, солюбілізаторів, значення рН, ступеня дисперсності, технології виготовлення препарату. Спочатку для отримання мазі необхідно підібрати основу, яка відповідала б таким вимогам: легко вивільняла активну фармацевтичну субстанцію через поверхневий шар шкіри; дозволяла вводити до складу мазі діючі речовини з різними фізико-хімічними властивостями; не містила високої концентрації емульгаторів, які впливають ліпідний бар'єр шкіри; не впливала на фізіологічні процеси екскреції і дихання шкіри; проявляла зволожуючу, пом'якшуючу і живильну дію.

Самостійним питанням є отримання емульсійних кремів. Асортимент допоміжних речовин, які використовуються в складі емульсійних кремів, досить великий. Допоміжні компоненти гетерогенних емульсійних основ відрізняються джерелом отримання (природні, напівсинтетичні і синтетичні), хімічною будовою та функціональним призначенням. Незважаючи на велику кількість носіїв різного складу, всі носії складаються з гідрофільної і гідрофобної фаз, які рівномірно розподілені одна в одній за допомогою емульгаторів. Тому розробка емульсійних основ-носіїв передбачає підбір раціональної природи, співвідношення і концентрації масляної і водної фази. Масляна фаза містить рослинні та тваринні жири, масла й віск, жирні кислоти і спирти, мінеральне вазелінове масло та інші вуглеводневі (вазелін, парафін та ін.), синтетичні силіконові сполуки різної консистенції.

Гідрофобні компоненти в складі основ виконують ряд функцій:

- ✓ технологічні (формоутворювачі, солюбілізатори, розчинники, емульгатори, згущувачі),
- ✓ біофармацевтичні (рослинні масла, жири і воски, проникаючі в тканини шкіри і є активними носіями активних фармакологічних інгредієнтів),
- ✓ споживчі (відповідна консистенція, можливість звільнення з тари, можливість намазування);

✓ біологічні (пом'якшення, підтримання або відновлення водно-ліпідного балансу, харчування і регенерація тканини шкіри).

Емульсійні основи залежно від виду емульгатора і поділу фаз поділяють на носії першого (масло/вода) або другого (вода/масло) роду, а також множинні емульсії (вода/масло/вода або масло/вода/масло). Дані носії містять незначну частину гідрофобних компонентів, серед яких завжди присутні рослинні або мінеральні масла. Гідрофобні речовини, крім формоутворюючої функції, виконують роль емоментів (пом'якшуюча дія) і затримують вологу, перешкоджаючи надмірному висушуванню шкіри.

9.2.3. Промислова технологія виготовлення мазі

Мазі виготовляють в умовах, які зводять до мінімуму їх мікробну контамінацію. Стерильними повинні бути: мазі очні, мазі, які вводяться в порожнини (середнє вухо, матка, сечовий міхур) і пошкоджену слизову (рани, опіки), мазі, які призначаються новонародженим, містять антибіотики та інші антимікробні агенти.

Технологія мазей включає кілька стадій: плавлення; розчинення, емульгування, подрібнення, змішування, упаковку, маркування.

Підготовка основи: на цій стадії подрібнюють основу або її компоненти (наприклад, парафіни, масло какао та ін.), плавлять основу або її компоненти (ланолін, вазелін, віск, парафін та ін.); ряд компонентів для кращого подрібнення охолоджують.

Введення лікарських речовин в основу. Відповідно до вимог речовини, які розчинні в основі, розчиняють в ній. Лікарські речовини, легко розчинні у воді, розчиняють в мінімальній кількості води і змішують з основою. Речовини, не розчинні ні в основі, ні у воді розтирають, використовуючи «правило оптимального подрібнення» і у вигляді дрібних порошоків ретельно змішують. Леткі рідини додають в останню чергу. Екстракти сухі і густі розчиняють у рівній кількості суміші етанолу, гліцерину і води, взятих у співвідношенні 1:3:6 і змішують з основою.

Вихідна сировина з приміщення підготовки сировини після зважування передається в ємностях з нержавіючої сталі, закритих кришками, в приміщення

для приготування мазей. Вихідна сировина завантажується в реактори через люки і гнучкі армовані трубопроводи за допомогою вакууму, завантажувальні люки реакторів закриваються кришками. В процесі виготовлення мазей використовується таке обладнання (наводимо приклади обладнання, встановлені на одному з українських підприємств):

- ✓ реактор для плавлення компонентів CP-500 A (фірма OLSA, Італія);
- ✓ реактори для розтирання і змішування речовин CP-500A (фірма OLSA) і 200 LTR (фірма KINEMATICA, Швейцарія);
- ✓ реактори – вакуумні міксери-гомогенізатори MACEF PH - 500 B (фірма OLSA) і 50LTR (фірма KINEMATICA);
- ✓ диспергатор MT-1-61 MEGATRON (фірма KINEMATICA).

Все обладнання з'єднується змінними трубопроводами для транспортування проміжної продукції. Наприклад, нерозфасована мазь з вакуумного міксера-гомогенізатора під тиском стисненого очищеного повітря передавлюється в «мюллерівську бочку» (The Muller drum-emptying system), призначену для тимчасового зберігання і транспортування проміжної продукції (фірма MULLER, Німеччина). Наповнена бочка герметично закривається і транспортується в приміщення для фасування мазі. На ділянці фасування до «мюллерівської бочки» приєднується система подачі мазі в бункер тубонаповнюючого автомату TFS-10M (фірма IWKA, Німеччина).

Реактори повинні використовуватися тільки для приготування м'яких лікарських форм та бути укомплектовані мішалками різних типів:

- ✓ скребково-якірної, яка попереджує локальний перегрів і прилипання маси до стінок реактора;
- ✓ лопатевої, що забезпечує ефективне перемішування маси;
- ✓ турбінного типу для емульгування або суспендування мікронізованих порошків.

Диспергатор типу MEGATRON застосовується для виробництва мазей суспензійного типу, коли використовуються немікронізовані порошки. Він з'єднаний з реактором 50LTR, що дозволяє здійснити диспергування в рідкому середовищі в замкнутому циклі.

Виробництво мазей здійснюється з використанням вищезгаданого обладнання, яке щільно закривається, що виключає випаровування рідини або погли-

нання вологи. Необхідно враховувати, що розшарування дисперсних систем і порушення їх стабільності може призвести до неоднорідного дозування в туби.

До складу гідрофобних мазей може бути включена тільки незначна кількість води або водних розчинів. Основами, які використовуються в складі гідрофобних мазей, є вазелін, вазелінове масло, рослинні олії, тваринні жири, синтетичні гліцериди, воски та рідкі поліалкілсилоксани.

9.3. Контроль мазей

Мазеві форми препаратів контролюють відповідно до вимог ДФУ (з урахуванням виду мазі) за такими показниками: опис, колір, запах, ідентифікація, кількісне визначення (вказують в мг одиницях дії (ОД) в 1 г лікарського препарату), розмір частинок (для суспензійних мазей), рН, герметичність упаковки, кислотне і перекисне число, однорідність, визначення структурно-механічних властивостей, дисперсності, ступеня вивільнення лікарського засобу, стерильність (для стерильних форм), мікробіологічна чистота, відсутність механічних включень та ін. М'язі лікарські форми, призначені для застосування на шкірі з важкими ушкодженнями, повинні бути стерильні. Для консервантів регламентують верхню і нижню межу вмісту. Якщо допоміжна речовина впливає на біодоступність діючої речовини, також регламентують верхню і нижню межу вмісту і проводять кількісне визначення.

9.4. Мазі, що містять продукти біотехнології

До складу мазей як активний фармакологічний інгредієнт вводять продукти, отримані методами біотехнології. Основна маса препаратів, які активно використовуються в наш час, представлені мазями з антибіотиками. У той же час реалізовані технології з отримання мазей з вітамінами, бактеріофагами, цитокінами та іншими продуктами. У табл. 9.1 наведені приклади мазей, що містять антибіотики, які отримані шляхом біосинтезу.

Таблиця 9.1 – Мазі, які містять антибіотики

Назва препарату	Антибіотик та штамп-продуцент	Допоміжні речовини	Механізм дії антибіотика
Бактробан, Glaxo SmithKline	Мупіроцин (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	ПЕГ-400, ПЕГ-3350	Інгібує ізолейцил-трансфер-РНК-синтетазу: інгібує синтез білка в бактеріальній клітині
Банеоцин, Sandos	Комплекс неоміцинів А, В,С (<i>Streptomyces fradiae</i>) і Бацитрацин цинку (<i>Bacillus subtilis</i>)	Ланолін, парафін м'який білий	Поліпептидний антибіотик інгібує синтез білка в бактеріальній клітині
Тобрадекс, Novartis Pharma	Тобраміцин (<i>Streptomyces tenebrasius</i>)	Хлорбутанол, парафін рідкий, вазелін білий	Блокує 30S субодиницю рибосом – блокує синтез білка
Амфотерицин Б - мазь, Біохімік	Амфотерицин Б	Тввн 80, вазелінове масло, вазелін білий	Зв'язування зі стероловим компонентом цитоплазматичної мембрани, порушуючи її бар'єрні функції та викликає лізис грибів
Фузидерм, Pharma International	Фузицилова кислота (<i>Fusidium coccineum</i>)	Віск білий, спирт цитостеариловий, вазелін білий, масло мінеральне	Порушення синтезу білка у мікробній клітині
Гентаміцинова мазь, 1)АКОС, Росія; 2)Белмедпрепарати, Білорусь; 3)Декса, Німеччина	Гентаміцин (<i>Micromonospora purpurea</i>)	1)парафін, вазелін; 2) парафін твердий, парафін рідкий, парафін м'який, білий; 3) вазелін білий, парафін рідкий, ланолін	Блокує 30S субодиницю рибосом: блокує синтез білка

Як видно з даних таблиці 9.1, до складу мазей із зазначеними антибіотиками входять різні допоміжні речовини (вазелін білий, парафін, ланолін, хлорбутанол, вазелінове масло, твін 80, поліетиленгліколи та ін.). Їх номенклатура і кількість визначаються фізико-хімічними та біологічними властивостями антибіотика. Крім того, важливу роль відіграє використовувана для отримання ма-

зей технологія. Це підтверджується тим, що мазь, яка містить аналогічний антибіотик (гентаміцин), у різних виробників містить різні допоміжні речовини при ідентичній кількості гентаміцину сульфату. У ряді мазей введені й інші допоміжні речовини. Так, наприклад, у мазь, яка містить лінкоміцин (продуцент - *Streptomyces lincolnieensis*), внесені цинку оксид, крохмаль, парафін твердий, вазелін.

Відомі мазі, що містять жиророзчинні вітаміни, наприклад, «Радевіт», до складу якої як діючі речовини входять ретинол пальмітат (вітамін А), альфа-токоферол (вітамін Е), ергокальциферол (вітамін D2). Які допоміжні речовини вводять бутилгідрокситолуол, бутилгідроксіанізхол, віск емульсійний, олія вазелінова, гліцерин, етиловий спирт, вода очищена. В мазь «Retima-1500», що містить ретинолу пальмітат (вітамін А), як допоміжні речовини входять ланолін, мінеральне масло, парафін, стеарат магнію.

У Росії запропоновані кілька мазей, до складу яких введено цитокіни, наприклад, рекомбінантний інтерферон-альфа-2b. Як допоміжні речовини в одному препараті використані гель гідроксиду алюмінію і полівініловий спирт, а в іншому – ланолін безводний, вазелін, масло персикове, токоферолу ацетат, вода очищена. Їх пропонують як протизапальні, імуномоделюючі, противірусні та протипухлинні засоби. Однак клінічна ефективність даних препаратів доведена недостатньо. У той же час проводяться інтенсивні роботи зі створення і вивчення мазей, в яких як АФІ використовуються цитокіни – інтерлейкіни: ІЛ1 α , ІЛ1 β , ІЛ2 і ряд інших. Як допоміжні речовини використовують: ланолін, вазелінову олію, воду очищену. Дані мазі продемонстрували підвищення репаративних процесів, що сприяло успішному загоєнню ран у хворих, у яких рани та трофічні виразки довго не загоюються.

Необхідно зупинитися ще на одному напрямку створення мазей як лікувальних, так і косметичних – мазевих формах з включеними в них наночастинками – ліпосомами. Ліпосоми дозволяють ввести всередину частинки гідрофільні сполуки, а в ліпідний бішар – гідрофобні сполуки. Відома ліпосомальна трансдермальна мазь, яка містить пропіленгліколь, фосфоліпіди, сахарозу, фруктозу, глюкозу, вітаміни А, Е, F, екстракт алое вера, сквален, масло Ши, етоксидигліколь. Мазь має антиоксидантну і протизапальну активність, при-

скорює регенерацію шкіри. Отримано сублінгвальну мазь, яка містить гормон інсулін в ліпосомальних наночастинках.

Таким чином, лікарська форма у вигляді мазі дозволяє розробляти і використовувати в клініці ефективні мазі на основі продуктів, отриманих біотехнологічним шляхом: антибіотиків природних і напівсинтетичних, цитокінів, різних вітамінів, продуктів нанобіотехнології – ліпосом та ін.

Контрольні запитання

1. Що являють собою мазі. Навести визначення мазі як лікарської форми. Переваги цієї форми. Фармакологічна дія мазей.
2. Які вимоги до мазей відомі? Класифікація мазей за складом та основою.
3. Охарактеризувати вимоги до мазевих основ.
4. Навести основні допоміжні речовини, які використовують при виробництві мазей.
5. Які основи для виробництва мазей відомі та їх властивості (гідрофільні, силіконові)?
6. Які основи для виробництва мазей відомі та їх властивості (поліетиленові, гелі білків та полісахаридів)?
7. Наведіть перелік технологічних стадій виготовлення мазей. Яка послідовність виробництва цієї лікарської форми?
8. Яке обладнання використовують на кожній стадії виробництва мазей?
9. Навести вимоги до виробництва мазей.
10. Одержання кремів та вимоги до них.
11. Навести перелік мазей, до складу яких входять продукти біотехнології: антибіотики, вітаміни, ліпосоми та ін.
12. Які методи рекомендує ДФУ для контролю мазей?

Список джерел інформації

1. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-ге вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.

2. Перцев І.М. Допоміжні речовини в технології ліків / І.М. Перцев, Д.І. Дмитревський, В.Д. Рыбачук та ін. – Харків: Золоті сторінки, 2010. – 599 с.
3. Чуешов В.И. Технология лекарств промышленного производства / В.И. Чуешов, Е.В. Гладух, И.В. Сайко и др. – Винница: Нова книга, 2014. – 696 с.
4. Рубан Е.А. Промышленная технология лекарственных средств / Е.А. Рубан, В.Д. Рыбачук, Л.Н. Хохлова и др. – Харьков: НФАУ, 2015. – 240 с.
5. Рубан Е.А. Практикум по промышленной технологии лекарственных средств / Е.А. Рубан, Д.И. Дмитриевский, А.И. Хохлова и др. – Харьков: НФАУ, 2016. – 389 с.
6. Медетханов Д.Д. Изготовление лекарственных форм / Д.Д. Медетханов, А.П. Овсянников, Д.Д. Хайруллин. – Казань: Центр инновационной технологии, 2016. – 123 с.
7. Настанова СТ-Н міністерства охорони здоров'я 42-4.0. 2016. «Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Затверджено наказом МОЗ від 29.07. 2016.
8. Байрамишвили Д.И. Генно-инженерный инсулин человека: успехи и перспективы. / Д.И. Байрамишвили // Российский химический журнал. – 2005. – Т. XLIX. – № 1. – С. 34–45.
9. Гладышев В.В. Биофармация: учебник для фармацевтических вузов и факультетов / В.В. Гладышев, И.А. Бирюк, И.Л. Кечин – Дніпро: ЧНП «Економика», 2018. – 250 с.
10. Краснюк И.И. Фармацевтическая технология. Технология лекарственных форм: учебник / И.И. Краснюк, Г.В. Михайлова, Т.В. Денисова, В.И. Складенко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 656 с.
11. Перцев И.М. Фармацевтические и биологические аспекты мазей / И.М. Перцев, А.М. Котенко, О.В. Чуешов, Е.Л. Хапеева. – Харьков: Изд-во НФаУ «Золотые страницы», 2003. – 288 с.

Навчальне видання

**КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович
ПИЛИПЕНКО Дар'я Михайлівна**

**ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ:
БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ГОТОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ**

Навчальний посібник
для студентів спеціальності «Біотехнології та біоінженерія»

Відповідальний за випуск проф. Близнюк О. М.
Роботу до видання рекомендував проф. Циганков О. В.
Редактор Самініна О. С.

План 2020 р., поз. 58

Підп. до друку 30.09.20. Формат 60×84 1/16. Папір офсетний.
Друк цифровий. Гарнітура шкільна. Ум. друк. арк.17,6.
Наклад 50 прим. Зам. № 2682. Ціна договірна.

Підготовлено до друку
Видавничий центр НТУ «ХПІ».
Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 5478 від 21.08.2017 р.
61002, Харків, вул. Кирпичова, 2

Видавець і виготовлювач ТОВ «Друкарня Мадрид»
61024, м. Харків, вул. Максиміліанівська, 11
Тел.: (057) 756-53-25
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
Серія ДК, № 4399 від 27.08.2012 р.
www.madrid.in.ua e-mail: info@madrid.in.ua