

На правах рукописи

ВЛАСОВ СЕРГЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**СИНТЕЗ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ
ДОКСОРУБИЦИНА НА ОСНОВЕ МИКРОЧАСТИЦ Fe(0)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,
доцент

Белоусов Михаил Валерьевич

Официальные оппоненты:

Катаев Валерий Алексеевич – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, институт дополнительного профессионального образования, кафедра фармации, заведующий кафедрой

Карпенко Юлия Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии, доцент кафедры

Ведущая организация:

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пятигорск

Защита состоится «24» декабря 2019 г. в _ : 00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Д 208.068.02, кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Несмотря на то, что химиотерапия является одним из наиболее эффективных методов консервативного лечения злокачественных новообразований, ее применение ограничивается серьезными побочными эффектами, причиной возникновения которых является неспецифическое воздействие химиотерапевтических агентов на здоровые клетки организма. Одним из путей решения данной проблемы является использование систем доставки лекарственных средств (СДЛС), которые уменьшают число возникающих побочных эффектов за счет селективного накопления в опухоли. Более того, высвобождение терапевтического агента в целевом участке может быть инициировано за счет воздействия таких факторов как температура, переменное магнитное поле или ультразвуковое (УЗ) излучение, что в свою очередь позволяет использовать индивидуальные режимы лечения.

Обладающие магнитными свойствами СДЛС могут быть использованы для магнитно-направленной доставки химиотерапевтических агентов, а также в качестве МРТ-контрастных средств. Для этой цели применяют нано- и микрочастицы на основе Fe(0), Fe₂O₃, Fe₃O₄, среди которых микроразмерные частицы имеют ряд преимуществ по сравнению с наночастицами. Так, за счет положительного воздействия локальных неоднородностей магнитного поля микрочастицы обладают большей интенсивностью контрастирования и менее восприимчивы к экстравазации или неспецифическому поглощению эндотелиальными клетками.

Однако, предложенные в литературе методы получения магнитных частиц являются многостадийными и не позволяют достичь оптимальных параметров для разработки эффективной СДЛС вследствие полимодального распределения размеров получаемых частиц, низкой емкости загрузки химиотерапевтического агента и нестабильности конъюгатов при физиологических значениях pH. Таким образом, разработка новых методик синтеза магнитных микрочастиц, обладающих оптимальными параметрами для создания эффективной системы доставки лекарственных средств на их основе, с возможностью ее применения в терапии и диагностике онкозаболеваний, является актуальной задачей.

Степень разработанности темы. За последние годы опубликован ряд исследований, посвященных разработке и изучению систем доставки лекарственных средств на основе микроразмерных носителей, среди которых микрочастицы ноль-валентного железа представляют наибольший интерес (Mc Ateer M.A. et al., 2007, Briley-Saebo K. et al., 2004). Однако, имеющиеся на сегодняшний день способы получения микрочастиц Fe(0) обладают рядом недостатков, основными из которых являются низкая экономическая эффективность и доступность методов, высокая токсичность используемых реактивов, а также широкий диапазон размеров получаемых частиц. Кроме того, в доступной литературе не представлены методики стандартизации гибридных СДЛС (металлическое ядро с органическим покрытием и терапевтическим агентом) с многокомпонентным составом.

Цель исследования. Разработка одnoreакторного синтеза и методик контроля качества микроразмерной системы доставки доксорубина на основе ноль-валентного железа (Fe-CS-ДОКС) для тераностики локализованных солидных опухолей.

Задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели:

1. Установить степень влияния параметров синтеза микрочастиц железа и определить их оптимальные значения.
2. Установить степень влияния параметров синтеза конъюгата с химиотерапевтическим агентом (Fe-CS-ДОКС) и определить их оптимальные значения.
3. Изучить высвобождение доксорубина (*in vitro*) из Fe-CS-ДОКС при воздействии стимулирующих факторов.
4. Изучить контрастные свойства (*in vivo*) полученного носителя (Fe-CS) в МРТ исследовании.
5. Разработать и валидировать методики стандартизации для включения в проект НД на лиофилизат для приготовления суспензии для внутривенного введения «Конъюгат Fe-CS-ДОКС».

Научная новизна:

1. Впервые разработана методика одореакторного («single tube») синтеза носителя на основе микрочастиц Fe(0) с мономодальным распределением и возможностью контроля размеров.
2. Установлено влияние параметров синтеза на размер микрочастиц Fe-COOH при восстановлении Fe³⁺ боргидридом натрия, с последующей стабилизацией 4-карбокисбензилдiazония тозилатом.
3. Впервые изучено высвобождение доксорубина из конъюгата Fe-CS-ДОКС под воздействием внешних (ультразвуковое излучение) и внутренних (рН среды) факторов.
4. Впервые исследованы *in vivo* МРТ-контрастные свойства полученного носителя Fe-CS.
5. Впервые определены показатели качества лиофилизата микрочастиц Fe-CS-ДОКС.

Научная новизна подтверждена патентом РФ на изобретение № 2696303 «Способ получения микрочастиц ноль-валентного железа, иммобилизованных терапевтическим агентом» (опубл. 01.08.2019).

Практическая значимость. Разработанный носитель на основе микрочастиц Fe(0) с мономодальным распределением (1-10 мкм) может быть использован в качестве контрастного агента для лучевой диагностики (МРТ), а также в качестве носителя химиотерапевтических лекарственных средств (ХТС), значительно повышая эффективность терапии онкологических заболеваний и снижая частоту возникновения побочных эффектов, за счет направленной доставки ХТС и его контролируемого высвобождения. Установленные закономерности получения микрочастиц Fe(0) могут быть использованы для создания на их основе ЛС для транскатетерной артериальной хемэмболизации или систем таргетной доставки ХТС.

На основе валидации разработанных методик стандартизации предложен проект нормативной документации на лекарственную форму «Конъюгат Fe-CS-ДОКС» для внутривенного введения. Результаты проведенных исследований внедрены в учебную работу кафедры фармацевтического анализа ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России и кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования основывается на значительном объеме экспериментальных данных, полученных с применением адекватных поставленным задачам методик на основе современных аналитических методов исследования. Полученные результаты обработаны соответствующими статистическими методами и представлены в виде рисунков и таблиц в тексте диссертации и в приложениях.

Результаты диссертационной работы представлены на конференциях: Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва (Томск, 2017, 2018); Всероссийской конференции молодых учёных-химиков с международным участием (Нижний Новгород, 2018); Всероссийской конференции с международным участием посвященной памяти академика А.Е. Фаворского: V научные чтения (Иркутск, 2017); Международной конференции «NANOCON: Conference on Nanomaterials» (Брно, 2017); Международной конференции «EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry» (Любляна, 2018).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Методика одnoreакторного синтеза носителя Fe-CS на основе микрочастиц Fe(0), позволяющая получить частицы с мономодальным распределением размеров.
2. Методика одnoreакторного синтеза конъюгата Fe-CS-ДОКС.
3. Результаты изучения (*in vitro*) высвобождения доксорубина при воздействии ультразвукового излучения и при различных значениях pH среды.
4. Результаты изучения (*in vivo*) МРТ-контрастных свойств носителя Fe-CS.
5. Стандартизация конъюгата Fe-CS-ДОКС и валидация разработанных методик контроля качества.

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов. Автор принимал непосредственное участие в планировании, получении экспериментальных данных, их обработке и систематизации, обобщении и обсуждении результатов диссертационной работы, а также написании текста диссертационной работы и всех опубликованных работ по тематике исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно, области исследований, соответствующей п. 2 – Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств и п. 3 – Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Публикация материалов исследования. Основные результаты исследования легли в основу 12 работ, в том числе 3-ех статей в журналах из перечня ВАК, 1-го патента Российской Федерации и 8 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях.

Структура и объем работы. Материалы диссертационного исследования представлены на 166 страницах. Диссертационная работа включает введение, литературный обзор (глава 1), материалы и методы исследования (глава 2), обсуждение собственных исследований (глава 3),

изучение тераностических свойств разработанной системы (глава 4), заключение, список литературы, приложения. Диссертация содержит 28 таблиц и 34 рисунка. Список литературы состоит из 198 работ, 172 из них на иностранном языке.

Основное содержание работы

Объектами исследования являлись микрочастицы Fe-CS и конъюгат Fe-CS-ДОКС.

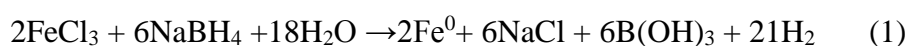
Подтверждение модификации поверхности микрочастиц осуществляли методом ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием с использованием спектрофотометра Nicolet iS 5 Infrared Spectrometer iD 5 (Thermo, США). Установление размеров частиц осуществляли методом лазерной дифракции с использованием дифрактометра Mastersizer 3000 (Malvern, Великобритания). Определение количественного содержания железа в конъюгате Fe-CS-ДОКС проводили методом гравиметрии. Установление содержания натрия трифосфата в конъюгате Fe-CS-ДОКС проводили методом УФ-спектроскопии с использованием спектрофотометра Unico 2800 (United Products & Instruments, США). Количественное определение хитозана осуществляли методом ВЭЖХ-УФ, с использованием жидкостного хроматографа Ultimate 3000 (Thermo, США). Разработанная методика включает в себя кислотный гидролиз хитозана и последующую дериватизацию образовавшегося глюкозамина с использованием 9-флуоренилметоксикарбонила гидрохлорида (FMOС-Cl). Количественное определение доксорубина и бензойной кислоты так же осуществляли методом ВЭЖХ-УФ. Изучение высвобождения доксорубина из конъюгата Fe-CS-ДОКС осуществляли под воздействием ультразвукового излучения и различных значений pH (3,3; 5,5; 7,4). Изучение контрастных свойств носителя Fe-CS проводили в МРТ-исследовании с использованием T1- и T2 - взвешенных спин-эхо режимах на приборе Toshiba Vantage Titan 1,5T (Toshiba, Япония).

Для проведения экспериментов использовались коммерчески доступные реактивы производства Sigma Aldrich (США), Fluka (США), ХПК ГРУПП (Россия), Wilke Resources (США), ЛенРеактив (Россия), Essentica (Болгария), Компонент реактив (Россия), Галополимер Кирово – Чепецк (Россия), М-газ (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Определение оптимальных параметров синтеза носителя на основе микрочастиц ноль-валентного железа (Fe-CS)

Синтез микрочастиц Fe-CS осуществляли в две стадии. Первая стадия заключается в восстановлении соли FeCl₃ с использованием NaBH₄ (уравнение 1) с последующей модификацией поверхности образовавшихся частиц 4-карбокисбензилдiazония тозилатом (4-КБДТ) (рисунок 1). На второй стадии, к полученным микрочастицам Fe-COOH осуществляли ковалентное присоединение хитозана (рисунок 2).



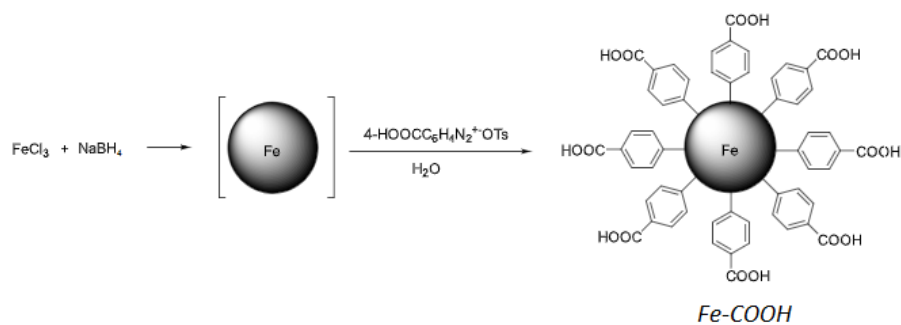


Рисунок 1 – Поверхностная модификация микрочастиц Fe(0) с использованием 4-карбокисбензилдiazония тозилата

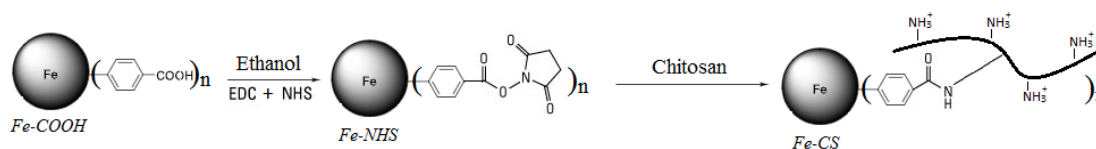


Рисунок 2 – Ковалентное присоединение хитозана к поверхности микрочастиц Fe-COOH

В ходе проведенных экспериментов установлены оптимальные значения параметров синтеза микрочастиц Fe-CS. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты определения оптимальных параметров синтеза микрочастиц Fe-CS

Параметры	Исследуемые значения	Оптимальные значения
1 стадия (Fe-COOH)		
Концентрация FeCl ₃ , моль/л	0,12-0,20	0,15
Концентрация NaBH ₄ , моль/л	0,36-0,60	0,45
Скорость подачи раствора NaBH ₄ , мл/мин	8,6-20,0	15,0
Концентрация 4-КБДТ, ммоль/л	31,0-78,0	47,0
Время стабилизации микрочастиц, мин.	20,0-50,0	40,0
Время синтеза микрочастиц, мин.	5,0-15,0	10,0
2 стадия (Fe-CS)		
Концентрация EDC, моль/л	0,07-0,560	0,028
Концентрация NHS, моль/л		
Время активации микрочастиц, час	0,5-3,0	1,0
Концентрация хитозана, мг/мл	0,25-2,0	1,0
Время присоединения хитозана, час.	3,0-24,0	12,0
Молекулярная масса хитозана, кДа	50,0-375,0	190-310

Определение оптимальной концентрации Fe³⁺.

Среди полученных образцов микрочастиц Fe-COOH наибольшее содержание целевой фракции (1-10 мкм) наблюдалось при начальной концентрации ионов Fe³⁺ равной **0,15 моль/л**

(95,3±0,3 %), а увеличение (0,18; 0,20 моль/л) или уменьшение (0,12 моль/л) начальной концентрации приводит к росту размеров частиц и, соответственно, к снижению содержания целевой фракции (≤ 89,7±0,2%).

Определение оптимальной концентрации и скорости подачи NaBH₄.

Увеличение (0,54; 0,60 моль/л) или уменьшение (0,36 моль/л) начальной концентрации NaBH₄ приводит к значительному снижению содержания целевой фракции (≤ 84,3±0,3 %). Более того, при низкой концентрации NaBH₄, происходит окисление образующихся частиц, о чем свидетельствует изменение окраски реакционной смеси с черной на светло-коричневую.

Установлено, что скорость подачи восстанавливающего агента **15 мл/мин** обеспечивает наиболее узкий диапазон распределения размеров (содержание целевой фракции 95,0±0,2 %). Снижение (до 8,6 мл/мин) или увеличение (до 20,0 мл/мин) скорости подачи NaBH₄, приводит к значительному укрупнению микрочастиц и, как следствие, к снижению содержания целевой фракции (≤ 89,3±0,3 %), вследствие неадекватного содержания NaBH₄ в реакционной смеси (нарушение баланса между процессами синтеза частиц и их укрупнения).

Определение оптимальной концентрации 4-карбоксибензилдiazоний тозилата и времени стабилизации микрочастиц Fe-COOH.

Наиболее однородное распределение размеров получаемых микрочастиц достигается при использовании начальной концентрации 4-КБДТ равной **47 ммоль/л** и их стабилизации в течение **40 минут** (95,6±0,4 %). При уменьшении (31 ммоль/л) или увеличении (62; 78 ммоль/л) концентрации 4-КБДТ наблюдается значительное снижение содержания целевой фракции (≤ 83,5±0,4 %). Изменение времени стабилизации (20; 30; 50 мин.) так же приводит к снижению однородности получаемых микрочастиц (≤ 93,9±0,3).

Подтверждение ковалентного присоединения бензойной кислоты осуществляли методом ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием (рисунок 3).

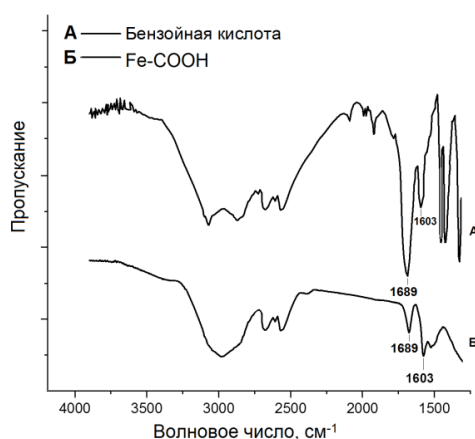


Рисунок 3 – ИК-спектры бензойной кислоты и микрочастиц Fe-COOH

При сравнении спектров поглощения микрочастиц Fe-COOH и бензойной кислоты наблюдаются общие полосы поглощения в диапазоне ν_{OH} 3200-2500 cm^{-1} и $\nu_{\text{C=O}}$ 1689 cm^{-1} , указывающие на присутствие карбоксильной группы (-COOH). Более того, полоса поглощения $\nu_{\text{C-C}}$ 1603 cm^{-1} , свидетельствует о присутствии бензольного кольца.

Определение оптимального времени синтеза микрочастиц.

При синтезе частиц в течение 5 минут наблюдалось самое низкое содержание целевой фракции ($43,2 \pm 0,4$ %), тогда как серия образцов, полученная при увеличенном до **10 минут** времени образования, напротив, характеризуется самым высоким ее содержанием ($95,0 \pm 0,3$ %). Дальнейшее увеличение времени синтеза частиц до 15 и 20 минут, приводило к значительному расширению диапазона их размеров и, соответственно, к снижению содержания целевой фракции ($\leq 87,0 \pm 0,3$ %).

Таким образом, в ходе всех проведенных экспериментов установлены оптимальные значения параметров синтеза микрочастиц Fe-COOH (таблица 1), позволяющие достичь содержания целевой фракции – не менее 95%.

На следующем этапе, осуществляли синтез носителя Fe-CS, путем ковалентного присоединения хитозана к поверхности полученных микрочастиц Fe-COOH с целью достижения максимальной значения емкости загрузки доксорубина (DLC) и повышения стабильности системы. Для этого проводили предварительную активацию карбоксильных групп с использованием N-гидроксисукцинимид (NHS) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорида (EDC). Изучено влияния таких параметров, как начальные концентрации EDC, NHS и CS, молекулярная масса CS, а также время проведения модификации микрочастиц на емкость загрузки доксорубина. Оценку емкости загрузки получаемых микрочастиц осуществляли с использованием параметров конъюгации, представленных в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры конъюгации микрочастиц Fe-CS с доксорубином

Параметры конъюгации	Значения
Концентрация доксорубина, мг/мл	1,0
Концентрация натрия трифосфата, мг/мл	1,0
Время конъюгации Fe-CS и ТФН, мин.	15,0
Время конъюгации Fe-CS-ТФН и ДОКС, мин.	15,0
pH среды	5,5

Определение оптимальной концентрации EDC.

Установлено, что использование начальной концентрации EDC равной **0,280 моль/л** позволяет достичь наибольшей емкости загрузки доксорубина ($0,61 \pm 0,01$ мг/мг) и, соответственно, является более рациональным. Снижение концентрации EDC ($0,070$; $0,140$ моль/л), в свою очередь, приводит к существенному уменьшению емкости загрузки ($\leq 0,56 \pm 0,04$ мг/мг), тогда как ее увеличение ($0,560$ моль/л) не способствует значительному повышению DLC ($0,63 \pm 0,02$ мг/мг).

Определение оптимальной концентрации NHS и времени активации.

Наиболее высокая емкость загрузки доксорубина наблюдалась при проведении активации в течение **1 часа** с использованием начальных концентраций NHS равных $0,280$ и $0,560$ моль/л ($> 0,71$ мг/мг). Снижение концентрации модифицирующего агента ($0,070$; $0,140$ моль/л), напротив, приводило к уменьшению содержания ДОКС в конъюгате Fe-CS-ДОКС ($\leq 0,68 \pm 0,03$ мг/мг), что можно объяснить зависимостью скорости протекания реакции модификации от соотношения концентраций EDC/NHS и карбоксильных групп. Более того, при

низких концентрациях, происходит снижение полноты функционализации, что обуславливает уменьшение количества, присоединившегося хитозана и, как следствие, уменьшение содержания терапевтического агента.

При исследовании влияния времени модификации установлено, что проведение реакции в течение **1 часа** обеспечивает достижение высокой емкости загрузки доксорубина, равной $0,71 \pm 0,03$ мг/мг. Дальнейшее увеличение времени модификации (до 3 часов) не приводит к существенному повышению DLC ($0,72 \pm 0,02$ мг/мг), что свидетельствует о достижении максимальной степени модификации микрочастиц. Уменьшение времени реакции (до 0,5 часа), в свою очередь, способствует неполной функционализации карбоксильных групп, что приводит к снижению содержания хитозана на поверхности микрочастиц и, соответственно, емкости загрузки доксорубина ($0,65 \pm 0,04$ мг/мг).

Определение оптимальной концентрации и времени присоединения хитозана.

Проведение реакции в течение 12 часов и начальной концентрации CS равной **1,0 мг/мл** позволяет достичь высокой емкости загрузки доксорубина ($0,71 \pm 0,02$ мг/мг) и является наиболее оптимальным. Дальнейшее увеличение концентрации хитозана (2,0 мг/мл) и времени его присоединения (24 часа) не приводит к существенному повышению DLC ($0,72-0,73$ мг/мг), что свидетельствует о максимальной полноте прохождения модификации. Снижение времени присоединения (3; 6 часа) и концентрации хитозана (0,25; 0,5 мг/мл), напротив, способствует значительному уменьшению содержания доксорубина в конъюгате ($\leq 0,65 \pm 0,02$ мг/мг), что объясняется образованием более тонкого и менее равномерного слоя хитозана вокруг поверхности Fe-COOH.

Подтверждение ковалентного присоединения хитозана к микрочастицам Fe-COOH осуществляли методом ИК-спектроскопии (рисунок 4).

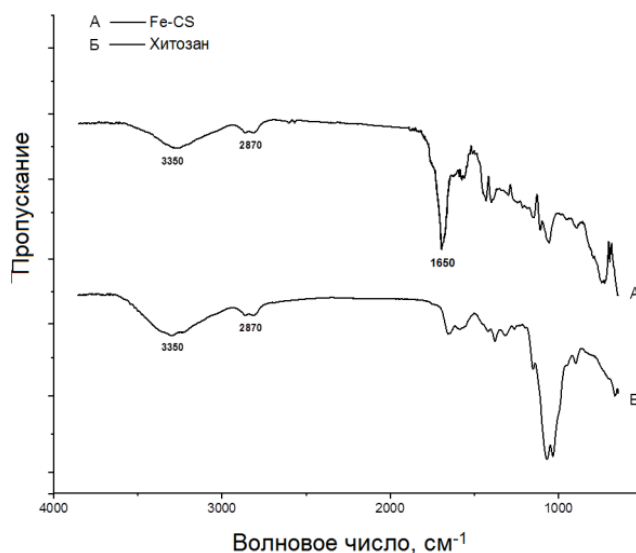


Рисунок 4 – ИК-спектры микрочастиц Fe-CS и чистого хитозана

Спектры микрочастиц Fe-CS и хитозана характеризуется наличием общих полос поглощения при длинах волн 3350 см^{-1} (ν_{OH}) и 2870 см^{-1} (ν_{CH}). Увеличение интенсивности полосы поглощения при 1650 см^{-1} ($\nu_{\text{-CONH-}}$) в спектре Fe-CS указывает на присутствие амидной связи, которая свидетельствует о ковалентном присоединении хитозана.

Определение влияния молекулярной массы CS на емкость загрузки ДОКС.

Значительное снижение емкости загрузки доксорубина ($0,60 \pm 0,02$ мг/мг) наблюдается при проведении модификации с использованием низкомолекулярного хитозана (50-190 кДа). Использование хитозана со средней (**190-310 кДа**) и высокой (310-375 кДа) молекулярной массой позволяет значительно увеличить емкость загрузки ($0,71 \pm 0,03$ мг/мг), однако, в связи с высокой стоимостью и низкой скоростью растворения CS с высокой M_w , применение среднемолекулярного хитозана является наиболее рациональным.

В результате проведенных экспериментов предложен оптимальный алгоритм получения носителя Fe-CS, с содержанием фракции 1-10 мкм не менее 93 % (таблица 1 и 2).

2. Определение оптимальных параметров синтеза конъюгата Fe-CS с ДОКС

Проведено изучение влияния параметров конъюгирования Fe-CS и ДОКС (начальные концентрации ТФН и ДОКС, pH, время проведения конъюгации) на емкость загрузки доксорубина, а также разработана одnoreакторная методика получения конъюгата Fe-CS-ДОКС (рисунок 5). Отработку параметров синтеза осуществляли с использованием их значений, представленных в таблице 3.

Таблица 3 – Параметры получения конъюгата Fe-CS-ДОКС

Исследуемые параметры конъюгирования	Значения параметров конъюгирования				
	С (ТФН), мг/мл	С (ДОКС), мг/мл	t ТФН, мин.	t докс, мин.	pH среды
С (ТФН), мг/мл	0,5-2,0	1,0	15	15	5,5
С (ДОКС), мг/мл	1,0	0,5-2,0	15	15	5,5
t ТФН, мин.	1,0	1,0	15-60	15	5,5
t докс, мин.	1,0	1,0	30	15-60	5,5
pH среды	1,0	1,0	30	30	3,3-7,4

С (ТФН) – концентрация натрия трифосфата, мг/мл

С (ДОКС) – концентрация доксорубина, мг/мл

t ТФН – время проведения конъюгации с натрия трифосфатом;

t докс – время проведения конъюгации с доксорубином;

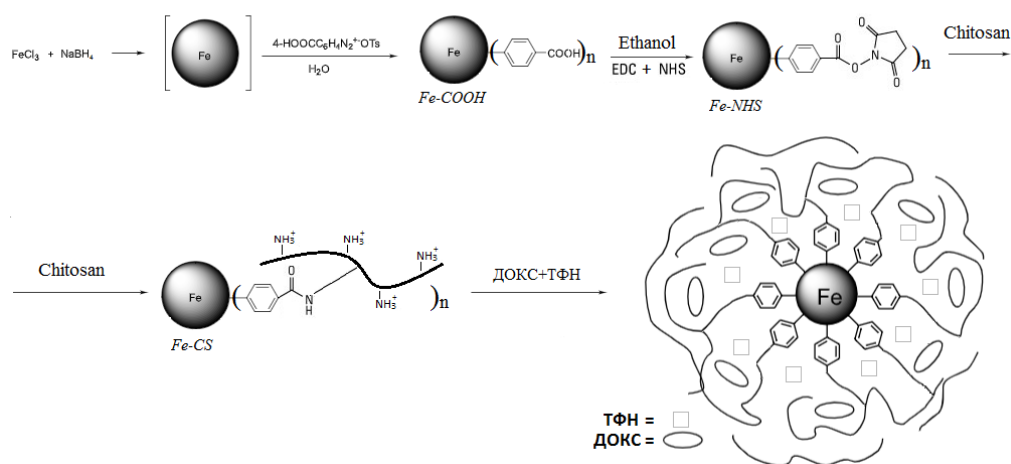


Рисунок 5 – Схема одnoreакторного синтеза конъюгата Fe-CS-ДОКС

Определение влияния концентрации ТФН на емкость загрузки ДОКС.

В ходе экспериментов установлено оптимальное значение начальной концентрации ТФН, равное **1,0 мг/мл**, емкость загрузки ДОКС при котором составляет $0,71 \pm 0,02$ мг/мг. Дальнейшее повышение концентрации ТФН (2,0 мг/мл) не приводит к существенному увеличению содержания ДОКС в конъюгате ($0,73 \pm 0,05$ мг/мг), тогда как ее уменьшение (0,75; 0,5 мг/мл) способствует значительному снижению количества конъюгированного ХТС ($\leq 0,57 \pm 0,03$ мг/мг).

Определение оптимальной концентрации доксорубицина.

Исходя из полученных результатов, использование начальной концентрации доксорубицина, равной **1 мг/мл** позволяет достичь высокой емкости загрузки ($0,72 \pm 0,02$ мг/мг). Дальнейшее увеличение концентрации (2,0 мг/мл) не приводит к существенному повышению содержания доксорубицина ($0,73 \pm 0,03$ мг/мг), в связи с прямой зависимостью конъюгирующей способности Fe-CS-ТФН от количества остатков -CS-ТФН, обеспечивающих электростатическое связывание ДОКС. В связи с этим, снижение начальной концентрации (0,75; 0,5 мг/мл) приводит к существенному снижению емкости загрузки ($\leq 0,63 \pm 0,02$ мг/мг).

Определение оптимального времени конъюгации Fe-CS и ТФН.

В ходе эксперимента установлено, что серии конъюгатов Fe-CS-ТФН полученные при проведении реакции в течение 30 и 60 минут обладают большей емкостью загрузки доксорубицина ($0,79 \pm 0,03$ и $0,80 \pm 0,02$ мг/мг, соответственно), что объясняется зависимостью полноты протекания данного процесса от времени его проведения, вследствие чего, при осуществлении конъюгации в течение 15 минут наблюдается самое низкое значение DLC ($0,70 \pm 0,03$ мг/мг). Исходя из полученных данных, оптимальным является проведение конъюгации в течение 30 минут, так как дальнейшее увеличение времени реакции не приводит к значимому росту емкости загрузки доксорубицина.

Определение оптимального времени конъюгации Fe-CS-ТФН и ДОКС.

В ходе проведенных экспериментов установлено, что серии конъюгатов Fe-CS-ДОКС полученные при проведении реакции в течение 30 и 60 минут характеризуются большим содержанием доксорубицина ($0,90 \pm 0,03$ и $0,91 \pm 0,04$ мг/мг, соответственно), что также, как и в предыдущем эксперименте обусловлено различной полнотой протекания процесса. При осуществлении конъюгирования в течение 15 минут, так же наблюдалось значительное снижение DLC ($0,78 \pm 0,04$ мг/мг). Исходя из полученных данных, оптимальным является проведение процесса в течение 30 минут, так как дальнейшее увеличение времени реакции не приводит к значимому изменению емкости загрузки доксорубицина.

Изучение влияния pH среды на содержание доксорубицина в конъюгате Fe-CS-ДОКС.

Кислотность среды оказывает существенное влияние на емкость загрузки доксорубицина, что объясняется зависимостью прочности электростатических взаимодействий от величины электрического заряда каждого из компонентов системы (ДОКС, ТФН, хитозан) вследствие протонирования и депротонирования их функциональных групп при различных значениях pH. Так, наибольшая емкость загрузки ДОКС достигалась при pH равном 5,5 ($0,90 \pm 0,03$ мг/мг). Смещение значений pH в кислую (3,3) или нейтральную (7,4) сторону

приводило к значительному снижению DLC ($0,81 \pm 0,03$ и $0,34 \pm 0,02$ мг/мг, соответственно).

Таким образом, разработан однореакторный метод получения конъюгата Fe-CS-ДОКС с мономодальным распределением размеров и емкостью загрузки доксорубина не менее $0,9$ мг/мг. Схема получения конъюгата Fe-CS-ДОКС представлена на рисунке 6.

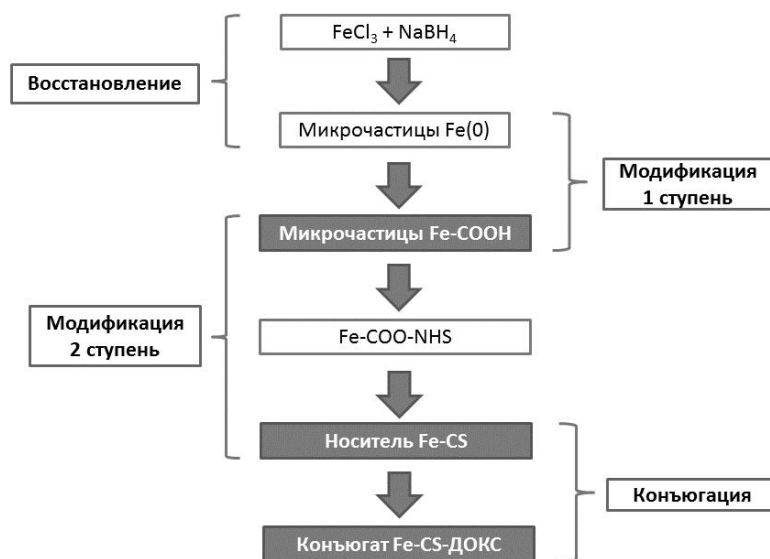
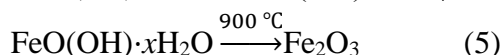
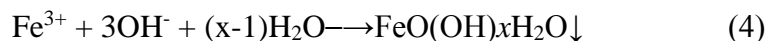
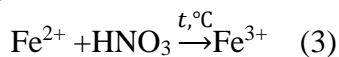
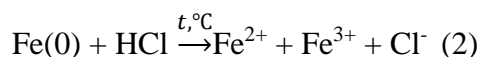


Рисунок 6 – Схема получения конъюгата Fe-CS-ДОКС

3. Стандартизация микрочастиц Fe-CS и Fe-CS-ДОКС

Определение содержания Fe(0).

Определение содержания железа в конъюгате Fe-CS-ДОКС проводили гравиметрическим методом. В ходе проведенных экспериментов проанализировано три серии образцов конъюгата. Химизм основных этапов проведения данного процесса включающих в себя растворение, окисление, осаждение и термическую обработку протекает в соответствии с уравнениями 2-5:



Таким образом, установлено количественное содержание железа в конъюгате Fe-CS-ДОКС, которое составило $16,69 \pm 0,04\%$.

Определение содержания трифосфата натрия.

Для разработки методики количественного определения трифосфата взяли за основу ОФС 1.2.3.0020.15 «Спектрофотометрическое определение фосфора». Поскольку трифосфат-ион не вступает в реакцию с молибдатами, основной задачей разработки методики являлся подбор условий кислотного гидролиза и перевода в PO_4 -форму. Для отработки условий использовали раствор трифосфата натрия (20 мкг/мл) и трифторуксусную кислоту 4 М в

соотношении 1:1 при нагревании (90 и 100 °С). Время гидролиза составляло от 0,2 до 10 минут. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты определения оптимальных параметров гидролиза натрия трифосфата

	PO ₄ 20 мкг/мл	P ₃ O ₁₀ 20 мкг/мл							
T, °C	-	-	90	90	100	100	100	100	100
t, мин	-	-	0,2	1	1	2	5	10	10
A, mAU	0,068	0,001	0,003	0,007	0,011	0,014	0,085	0,160	0,159

Таким образом показано, что 10-минутное нагревание на кипящей водяной бане приводит к полному переходу трифосфат-иона в форму фосфата. Правильность методики проверена методом введено-найдено (таблица 5). Калибровочный график представлен на рисунке 7.

Таблица 5 – Результаты оценки правильности методики количественного натрия трифосфата (n=6)

Исходная концентрация ТФН, мг/мл	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	Θ _i , мг/мл	t _i	t _{табл}	Δ _{c,i} *
0	0,15	0,142±0,03	0,008	1,44	2,57	0,011
	0,1	0,091±0,02	0,009	2,15		0,007
	0,05	0,042±0,007	0,008	1,98		0,009

Θ – значение смещения; t_i – критерий Стьюдента;

Δ_{c,i}* – критерий правильности;

Для исследуемых концентраций t_i ≤ t_{табл}, следовательно, оценка смещения незначима на фоне случайного разброса, в результате чего, подтверждено отсутствие систематической погрешности, при использовании предложенной методики.

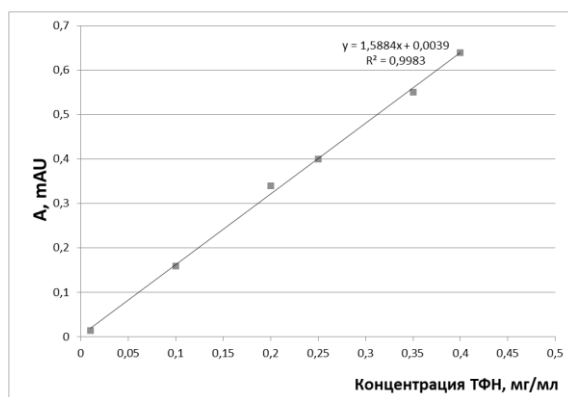


Рисунок 7 – График зависимости величины оптической плотности анализируемых растворов ТФН от его содержания

В ходе проведенного эксперимента разработана методика количественного определения натрия трифосфата, а также установлено его количественное содержание в конъюгате Fe-CS-ДОКС, которое составило **19,15±0,09%**.

Определение содержания доксорубина, хитозана и бензойной кислоты.

На данном этапе, разработана хроматографическая методика и определены условия пробоподготовки, позволяющие проводить количественное определение доксорубина, хитозана и бензойной кислоты в условиях одновременного присутствия ионов Fe^{3+} . Пробоподготовка включает в себя кислотный гидролиз хитозана, в связи с чем, проведено изучение возможности применения концентрированной трифторуксусной кислоты и ее смеси с соляной кислотой, для интенсификации процесса. Для устранения мешающего влияния Fe^{3+} в гидролизат предложено делать добавку 10 эквивалентов ЭДТА для комплексообразования. В эксперименте использовали соляную и трифторуксусную кислоту (ТФУ) в объеме 10 мл, соответственно, и смесь HCl+ТФУ, объемом 10 мл в соотношении 1:1. Результаты эксперимента представлены в таблице 6 (GC-степень гидролиза).

Таблица 6 – Определение оптимальных параметров гидролиза хитозана

CS2	Т, час	HCl, моль/л			ТФУ, моль/л			HCl (10M)+ТФУ, моль/л		
		8	10	12	2	4	6	2	4	6
GC, %	2	22	58	99	-	5	7	64	81	87
	4	56	93	80	-	7	8	94	95	95
	6	79	95	50	-	8	8	95	95	95

В результате определены оптимальные параметры гидролиза хитозана, при которых достигается его полная конверсия до глюкозамина при меньшем времени проведения процесса, а также высвобождение связанных бензойной кислоты и доксорубина, что позволяет предложить единую хроматографическую методику для их одновременного определения.

Следующей задачей являлась оптимизация элюирования в условиях градиентного режима для одновременного определения трех аналитов. Для решения поставленной хроматографической задачи использована система подвижной фазы на основе водно-ацетонитрильного градиента с добавлением трифторуксусной кислоты.

В работе использовано 4 градиентных режима, отличающихся профилем возрастания содержания органической фазы (рисунок 8). В качестве элюента В использован ацетонитрил, в качестве фазы D – 0,1 % уксусная кислота в воде деионизированной.

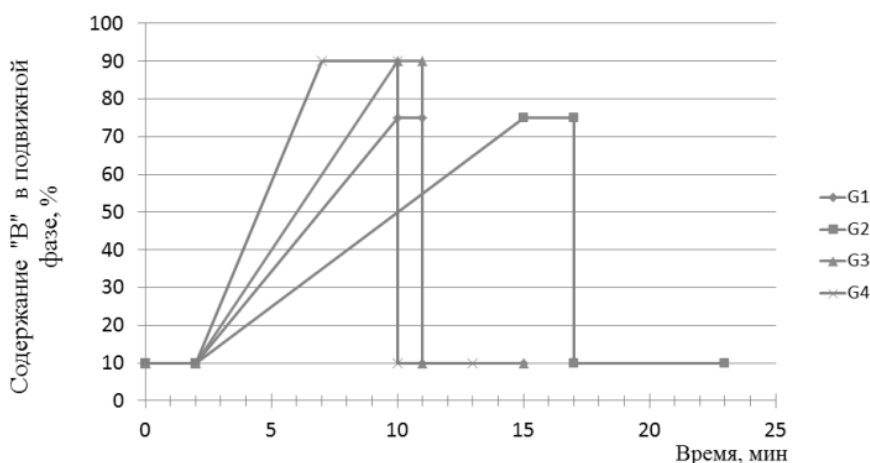


Рисунок 8 – Профили градиентного элюирования при отработке ВЭЖХ параметров

Используемые градиентные режимы отличались как по крутизне возрастания

содержания органического модификатора, так и по абсолютному его значению (от 75 до 90 % «В»), что позволило оценить влияние данных параметров на хроматографические параметры аналитического сигнала аналитов (ДОКС-АГ, GluN-FМОС и ВА), представленные в таблице 7.

Таблица 7 – Хроматографические параметры пиков при различных градиентах элюирования

Градиент	Аналит	t_r	R_s	A_s
G1	ДОКС-АГ	13,116	3,98	1,83
	α GluN-FМОС	10,089	2,11	1,24
	β GluN-FМОС	10,298		1,45
	ВА	10,470	0,86	1,54
G2	ДОКС-АГ	н/о	н/о	н/о
	α GluN-FМОС	12,267	2,71	1,66
	β GluN-FМОС	12,580		1,53
	ВА	12,277	н/о	1,66
G3	ДОКС-АГ	12,010	1,66	2,08
	α GluN-FМОС	9,378	1,79	1,24
	β GluN-FМОС	9,556		1,36
	ВА	9,797	1,21	2,00
G4	ДОКС-АГ	10,936	3,41	1,13
	α GluN-FМОС	8,117	1,34	1,14
	β GluN-FМОС	8,244		1,18
	ВА	9,127	2,08	1,38

Снижение скорости подъема органического модификатора (градиент G2) приводит к ухудшению разделения пиков аналитов, снижая разрешение между пиками бензойной кислоты и производных глюкозамина до нуля, к тому же пик доксорубинона (ДОКС-АГ) сливается с пиком остаточного FМОС-Cl, что делает градиент G2 не пригодным для одновременного определения всех трех компонентов пробы. В свою очередь абсолютное максимальное содержание органического модификатора, как и увеличение скорости подъема приводит к снижению времен удерживания и асимметрии пиков аналитов, тем самым достигается оптимум времени, затрачиваемого на анализ. Поэтому в дальнейшей работе использовали режим элюирования G4 градиента (рисунок 9).

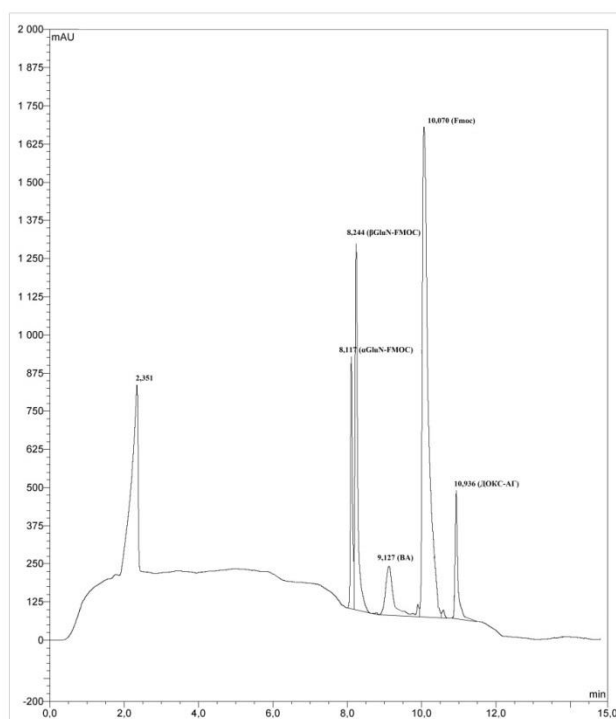


Рисунок 9 – Хроматограмма стандартного раствора ДОКС-АГ в режиме элюирования G4 ($\lambda = 240$ нм)

Для определения аналитической области построены калибровочные зависимости для каждого аналита, причем для производного GluN-FMOC зависимость строили по сумме площадей пиков двух аномеров.

Показана аналитическая область методики для бензойной кислоты – 0,002-0,1 мг/мл; для доксорубина и глюкозамина – 0,01-0,5 мг/мл. Основные валидационные характеристики методики количественного определения хитозана, доксорубина и бензойной кислоты методом ВЭЖХ-УФ с предколоночной дериватизацией (таблица 8).

Таблица 8 – Результаты валидации методики количественного определения хитозана, доксорубина и бензойной кислоты

Показатель	Значение валидационного параметра для аналита		
	Бензойная кислота	Доксорубин	Глюкозамин
Специфичность	да	да	да
Линейность	0,002-0,1 мг/мл	0,01-0,5 мг/мл	0,01-0,5 мг/мл
Повторяемость	0,96 – 1,78 %	0,60 – 3,19 %	2,41 – 3,12 %
Воспроизводимость	0,93 – 1,55 %	0,51 – 2,38 %	2,02 – 2,95 %
Правильность	99,10 – 99,36 %	97,53 – 99,48 %	98,17– 99,37%

Таким образом, на данном этапе работы разработана методика стандартизации конъюгата Fe-CS-ДОКС и определено количественное содержание доксорубина ($38,30 \pm 0,29\%$), хитозана ($8,34 \pm 0,21\%$) и бензойной кислоты ($17,52 \pm 0,14\%$) в конъюгате Fe-CS-ДОКС.

Определение размеров частиц носителя Fe-CS и конъюгата Fe-CS-ДОКС.

Определение размеров частиц проводили с использованием метода динамического

рассеивания света. В ходе анализа установлено количественное содержание основной фракции (1-10 мкм) в образцах Fe-CS и Fe-CS-ДОКС, которое составило $93,2 \pm 0,22$ и $91,8 \pm 0,29$ %, соответственно.

4. Изучение тераностических свойств микрочастиц Fe-CS-ДОКС

Высвобождение доксорубицина под воздействием внешних и внутренних факторов среды.

Изучение кинетики высвобождения ДОКС проводили при значениях pH равных 3,3; 5,5 и 7,4 без ультразвукового воздействия (рисунок 10) и с таковым (рисунок 11).

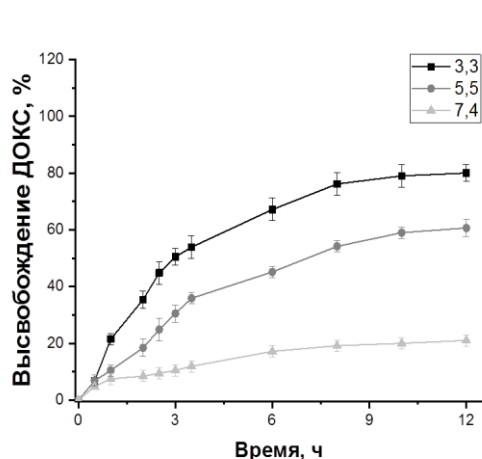


Рисунок 10 – График высвобождения доксорубицина из конъюгата без воздействия УЗ поля

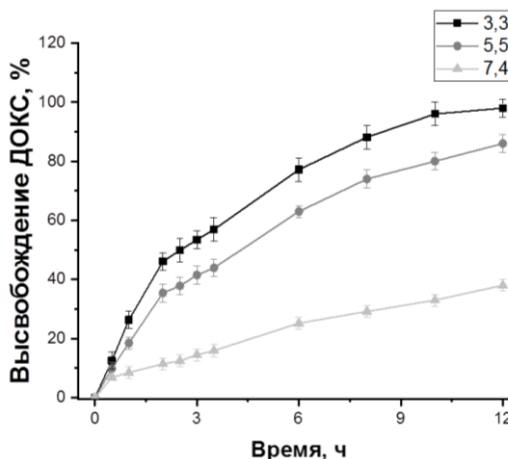


Рисунок 11 – График высвобождения доксорубицина из конъюгата под воздействием УЗ поля

При значении pH равном 3,3 более 50% полезной загрузки высвободилось через 3 часа, затем следовало значительное снижение интенсивности процесса (67% через 6 часов), вызванное постепенным уменьшением разности концентраций доксорубицина в системе Fe-CS-ДОКС и среде высвобождения. Максимальное количество высвободившегося ЛС составляло 80% за 12 часов. При увеличении pH до 5,5 через 3 часа количество высвободившегося доксорубицина составило 30,5 %. Дальнейшее увеличение pH до 7,4 приводило к существенному снижению интенсивности высвобождения (10,5% полезной загрузки за 3 часа). Также установлено существенное влияние ультразвука на интенсивность высвобождения ДОКС вне зависимости от pH среды. Так, при pH равных 3,3 и 5,5 показано значительное увеличение интенсивности высвобождения, в результате чего, общее количество высвободившегося доксорубицина через 12 часов составляло 98 и 86 %, соответственно.

Изучение контрастных свойств микрочастиц Fe-CS.

Определение контрастных свойств полученной системы проводили в МРТ-исследовании с использованием T1 и T2 последовательностей. Результаты проведенного эксперимента представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты экспериментов по оценке контрастных свойств носителя Fe-CS в T1 и T2 режимах.

Исследуемая область/орган	Индекс усиления T1 и T2-взв. МРТ - изображения, как среднее \pm ошибка среднего	
	T1-последовательность	T2-последовательность
Периферия опухоли	1,39 \pm 0,06(p<0,01)	0,65 \pm 0,07 (p<0,005)
Паренхима печени	2,07 \pm 0,21(p<0,001)	0,32 \pm 0,09 (p<0,0002)
Паренхима селезенки	1,78 \pm 0,17(p<0,001)	0,81 \pm 0,04 (p<0,05)

Достоверность изменения p – по сравнению с исходным «доконтрастным» значением.

В ходе эксперимента в T1-взвешенном режиме с подавлением изображения жировой ткани, установлено выраженное усиление изображения в печени и селезенке, а также по периферии перевитой опухоли. При исследовании контрастных свойств микрочастиц Fe-CS в T2-взвешенном режиме наблюдалось выраженное подавление изображения в области печени, селезенки и опухоли, что так же подтверждает накопление микрочастиц в этих органах.

ВЫВОДЫ

1. Установлены оптимальные параметры синтеза микрочастиц железа ноль-валентного: концентрация FeCl_3 – 0,15 моль/л; NaBH_4 – 0,45 моль/л; 4-КБДТ – 47 ммоль/л; время стабилизации, 40 минут; время образования частиц 10 минут; скорость подачи NaBH_4 – 15 мл/мин.

2. Определены оптимальные параметры модификации микрочастиц Fe^0 и синтеза конъюгата Fe-CS-ДОКС: концентрация EDC и NHS – 0,28 моль/л; концентрация CS – 1,0 мг/мл; время модификации – 1,0 час; время присоединения хитозана – 12 часов; молекулярная масса хитозана – 190-310 кДа; концентрация ТФН и ДОКС – 1,0 мг/мл; время конъюгации ТФН и ДОКС – 30 минут; значение pH – 5,5.

3. Определено влияние параметров (pH среды и ультразвукового излучения) на скорость и степень высвобождения доксорубина из системы Fe-CS-ДОКС. Подтверждена высокая стабильность исследуемой системы при нейтральном значении pH (21 % за 12 часов), а также возможность интенсивного высвобождения полезной загрузки при pH 3,3 (80 % за 12 часов) и 5,5 (61 % за 12 часов). Ультразвуковое излучение низкой частоты оказывает существенное влияние на конъюгат, значительно увеличивая высвобождение доксорубина при кислых значениях pH (98 и 86 % при pH 3,3 и 5,5, соответственно за 12 часов).

4. Полученные микрочастицы проявляют выраженные контрастные свойства при МРТ исследовании в T1 и T2-взвешенных режимах, а также специфически накапливаются в области печени ($\text{ИУ}_{(T1/T2)} = 2,07 \pm 0,21 / 0,32 \pm 0,09$), селезенки ($\text{ИУ}_{(T1/T2)} = 1,78 \pm 0,17 / 0,81 \pm 0,04$) и по периферии опухоли ($\text{ИУ}_{(T1/T2)} = 1,39 \pm 0,06 / 0,65 \pm 0,07$), что обуславливает возможность их применения в качестве МРТ-контрастного средства при диагностике солидных опухолей.

5. Разработан алгоритм подготовки проб для количественного определения железа методом гравиметрии, натрия трифосфата методом спектрофотометрии, а также доксорубина, бензойной кислоты и хитозана методом ВЭЖХ-УФ при совместном присутствии всех компонентов конъюгата. По разработанным методикам установлено количественное содержание всех компонентов в составе конъюгата Fe-CS-ДОКС (Fe – $16,69 \pm 0,04\%$; натрия трифосфат – $19,15 \pm 0,09\%$; доксорубин – $38,30 \pm 0,29\%$; бензойная кислота – $17,52 \pm 0,14\%$; хитозан – $8,34 \pm 0,21\%$). Проведена валидация разработанной ВЭЖХ методики количественного определения доксорубина, хитозана и бензойной кислоты в образцах лекарственного средства (лиофилизат для приготовления суспензии для внутривенного введения), результаты которой подтверждают возможность ее применения в фармацевтическом анализе разработанной СДЛС.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПРЕДСТАВЛЕНО В РАБОТАХ:

1. Кривошеков, С.В. Валидация методики количественного определения гексафторида серы в новом контрастном препарате методом газовой хроматографии / С.В. Кривошеков, М.С. Ларькина, **С.С. Власов**, Л.А. Дрыгунова, А.М. Гурьев, М.В. Белоусов, М.С. Юсубов // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2017. – № 3(51). – С. 41-44.
2. **Власов, С.С.** Изучение кинетики высвобождения доксорубина под воздействием ультразвукового излучения при различных значениях pH из носителя на основе микрочастиц Fe(0) / С.С. Власов, А. Ди Мартино, М.С. Юсубов, А.М. Гурьев, С.В. Кривошеков, Е.В. Свиридова, П.С. Постников, М.В. Белоусов // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2019. – №5. – С. 15-19.
3. **Власов, С.С.** Оценка влияния параметров синтеза на размер магнитных микрочастиц Fe(0) / С.С. Власов, М.С. Юсубов, С.В. Кривошеков, Е.А. Безверхняя, Е.В. Свиридова, П.С. Постников, М.В. Белоусов // **Медицинский вестник Башкортостана**. – 2019. – №1(79). – С. 53-59.
4. Пат. 2696303 РФ. Способ получения микрочастиц ноль-валентного железа, иммобилизованных терапевтическим агентом / **С.С. Власов**, В.В. Куртуков, М.В. Белоусов [и др.]. – № 2018122604; заявл. 19.06.2018; опубл. 01.08.2019.
5. Разработка мультимодальной системы для терапии злокачественных новообразований / **С.С. Власов**, В.В. Куртуков, А.С. Швыркова // **Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва**. – Томск, 2017. – С. 249-250.
6. Синтез противоракового препарата методом поверхностной модификации микронных частиц ноль-валентного железа арендиазоний тозилатами / А.С. Швыркова, В.В. Куртуков, **С.С. Власов** // **Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва**. – Томск, 2017. – С. 176-177.
7. Synthesis of multifunctional modified particles of zerovalent iron using diazonium salts / V.V. Kurtukov, A.S. Shvyrkova, **S.S. Vlasov** // **Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва**. – Томск, 2017. – С. 436-437.
8. Ultrasound irradiation to visualize and trigger the release of doxorubicin from hybrid microparticles / P.S. Postnikov, A. Di Martino, **S.S. Vlasov**, V.V. Kurtukov, V. Sedlarik // **NANOCON 2017 – Conference Proceedings, 9th International Conference on Nanomaterials – Research and Application 9**. – Brno, Czech Republic, 2017. – P. 485-488.
9. Арендиазоний тозилаты как субстрат для создания мультифункциональных частиц ноль-валентного железа / В.В. Куртуков, А.С. Швыркова, **С.С. Власов**. // **V научные чтения, посвященные памяти академика А.Е. Фаворского: тезисы докладов школы-конференции молодых учёных с международным участием**. – Иркутск, 2017. – С. 79.
10. Мультимодальная система для терапии злокачественных новообразований: технология получения, исследование высвобождения IN VITRO / **С.С. Власов**, В.В. Куртуков, А.С. Швыркова // **Материалы XXI Всероссийской конференция молодых учёных-химиков (с международным участием)**. – Нижний Новгород, 2018. – С. 65.
11. Исследование высвобождения доксорубина in vitro из новой мультимодальной системы на основе железа (0) валентного для терапии онкозаболеваний / **С.С. Власов**, В.В. Куртуков //

Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л. П. Кулёва. – Томск, 2018. – С. 310-311.

12. Hybrid microparticles based on zero-valent iron for simultaneous drug delivery and ultrasonography visualization / **S.S. Vlasov**, M.V. Belousov, M.S. Yusubov, A. Di Martino, P.S. Postnikov // EFMC-ISMIC 2018-XXV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry. – Ljubljana, Slovenia, 2018. – P. 345.

Автор выражает глубокую благодарность к. х. н. С.В. Кривошекову и д. х. н., профессору М.С. Юсубову за организацию и помощь в проведении исследований; к. х. н., доценту П.С. Постникову и Ph.D. А. Ди Мартино за консультативную помощь, и ценные рекомендации при изучении тераностических свойств разработанной системы, а также д. мед. наук, профессору В.Ю. Усову за проведение МРТ-исследования полученного носителя и анализ результатов.

Власов Сергей Сергеевич (Россия)

Синтез и контроль качества системы доставки доxorубина на основе микрочастиц Fe(0)

Установлены оптимальные параметры синтеза носителя Fe-CS и его конъюгата с доxorубином (Fe-CS-ДОКС), а также изучено их влияние на распределение размеров получаемых микрочастиц и емкость загрузки терапевтического агента. Разработаны и валидированы методики количественного определения компонентов конъюгата (железа, натрия трифосфата, хитозана, доxorубина и бензойной кислоты) при их совместном присутствии, которые включены в проект нормативной документации на лиофилизат для приготовления суспензии для внутривенного введения «Конъюгат Fe-CS-ДОКС». Высвобождение доxorубина из полученного конъюгата исследовано при воздействии ультразвукового излучения и различных значений pH. Контрастные свойства носителя Fe-CS изучены в МРТ-исследовании с использованием T1- и T2- взвешенных режимов.

Vlasov Sergei Sergeevich (Russia)

Synthesis and quality controlling of drug delivery system of doxorubicin based on Fe(0) microparticles.

Optimal synthesis parameters of Fe-CS carrier and its conjugate with doxorubicin Fe-CS-ДОКС were determined and also their influence on size distribution and drug loading capacity of obtained microparticles was investigated. Methods of quantitative determination of conjugate components (iron, sodium triphosphate, chitosan, doxorubicin and benzoic acid) during their simultaneous presence, which were included in project of normative documentation for lyophilisate for preparation of suspension for intravenous injection “Conjugate Fe-CS-ДОКС” were developed and validated. Doxorubicin release from obtained conjugate was investigating under ultrasound irradiation and different values of pH. Contrast properties of Fe-CS carrier were investigating in MRI-tests using T1- and T2- regimens.