

ЦКП (научно-образовательный центр) РУДН: разработка инновационного лекарственного средства на основе биотехнологической субстанции российского производства «Тимодепрессин»

Биотехнологии все активнее входят в жизнь современной цивилизации. В настоящее время фармацию характеризует как минимум третья часть лекарственных средств от общего объема производимых лекарств, которая использует современные биотехнологии. Биотехнология значительно облегчает разработку новых лекарственных препаратов, делая их быстродействующими, безопасными и более эффективными.

Биотехнология белков и пептидов, родившаяся чуть более 50 лет назад, стала активно развиваться лишь в последние два десятилетия. Группой отечественных ученых в 2000 г. был разработан оригинальный регулирующий олигопептид — «Тимодепрессин».

Это первый и единственный в мире нетоксичный иммуносупрессор, селективно подавляющий аутореактивные процессы и разрешенный детям с двух лет. «Тимодепрессин» в малых дозах эффективно применяется для подавления иммунной системы при трансплантации костного мозга, органов и тканей, защиты клеток костного мозга и иммунной системы от вредного влияния химиотерапии или облучения, лечения аутоиммунных болезней, в том числе рецидивирующих аутоиммунных заболеваний в качестве монопрепарата при неэффективности других иммунодепрессантов и кортикостероидов. Он не оказы-



Рис. 1. Инновационная лекарственная форма

вает побочных действий на другие системы организма в отличие от практически всех остальных представленных на рынке иммунодепрессантов.

Препарат выпускается в виде раствора для внутримышечного введения с содержанием в 1 мл 0,001 г лекарственного вещества в виде назальных капель 0,1 % и спрея назального 0,25 % и 0,5 %.

На современном этапе развития фармацевтической науки актуально применение инновационных способов доставки лекарственных веществ.

Быструю системную доставку лекарств обеспечивает слизистая оболочка ротовой полости, которая богата кровеносными сосудами, обладает высокой проницаемостью и имеет определенные преимущества перед другими слизистыми. Поэтому инновационной лекарственной формой являются быстрорастворимые пленки (БРП), к которым относятся также трансбуккальные пленки.

Использование таких пленок особенно актуально в педиатрии и у людей, имеющих трудности при глотании.



Рис. 2. Комплекс оборудования для производства и упаковки БРП

Данная лекарственная форма имеет ряд преимуществ перед существующими пероральными формами, так как позволяет быстро достичь системного эффекта, минуя агрессивную среду желудка и ферментные системы печени. Кроме того, при ее использовании не требуется дополнительно запивать пленку водой или разжевывать.

Для разработки, исследования и наработки опытных партий инновационной лекарственной формы участок оснащен уникальным инновационным технологическим оборудованием.

Основным компонентом физико-химических и фармакологических свойств БРП является пленкообразующий полимер, обладающий мукоадгезивными свойствами и способный мгновенно растворяться в ротовой полости в незначительном количестве слюны.

Для успешной фармакотерапии заболеваний существенное значение имеют психофизические показатели лекарственной формы. В связи с этим в состав матрицы для получения БРП вводили подсластители в качестве корректирующих веществ.

Для уменьшения хрупкости и придания гибкости пленке, предохранения ее от высыхания и потери эластичности в процессе хранения, а также для улучшения профиля растворения в состав пленки вводили пластификатор.

В качестве растворителя для создания пленкообразующего раствора использовали воду очищенную.

Таким образом, состав матрицы для получения БРП на основе отечествен-

ного пептида «Тимодепрессина» должен включать: мукоадгезивный гидрофильный полимер, пластификатор, подсластитель и воду очищенную.

Для получения БРП пленкообразующий раствор полимера должен иметь оптимальную вязкость, которая зависит от его концентрации в растворе, и обладать оптимальной те-

В результате выполнения научно-исследовательской работы молодыми специалистами ЦКП (НОЦ) был получен лекарственный препарат на основе российской биотехнологической субстанции «Тимодепрессина в виде трансбуккальной пленки.

кучеством, обеспечивающей взаимопроникновение полимера и слюны.

Выбор концентрации полимера был обусловлен не только вязкостью раствора, но также зависел от концентрации фармацевтической субстанции, которая была чрезвычайно низкой.

В связи с этим содержание сухих веществ в пленке должно быть значительным. Исследования вискозиметрического анализа пленкообразующих растворов были проведены на ротационном вискозиметре «Реотест – 2» при комнатной температуре. В результате подбора различных концентраций и различных полимеров наиболее оптимальным оказался 3 %-ный раствор Na-KMЦ.

В качестве подсластителей в составе БРП на основании анализа данных литературы и по экономическим

На современном этапе развития фармацевтической науки актуально применение инновационных способов доставки лекарственных веществ.

Рис. 4. Диаграмма высвобождения «Тимодепрессина» из пленок

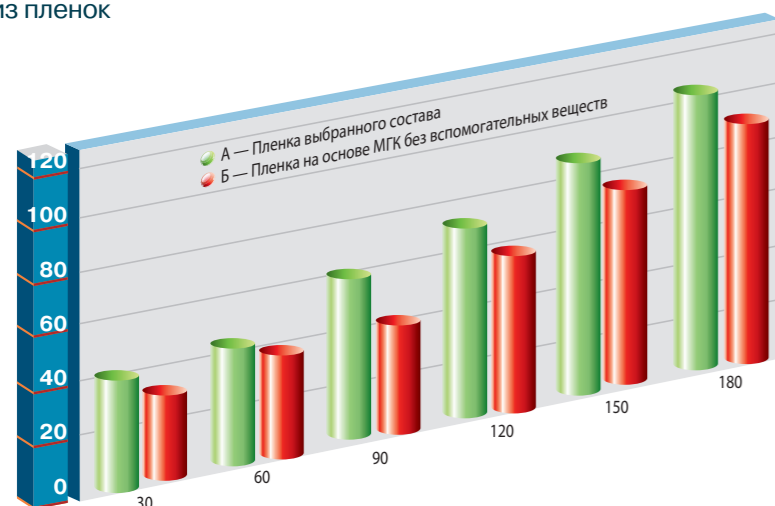


Рис. 5. Типичный масс-спектр тимодепрессина при ионизации электрораспылением с напряжением на входном конусе 23 В

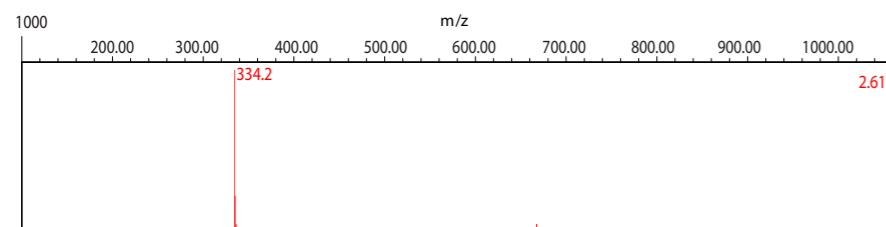
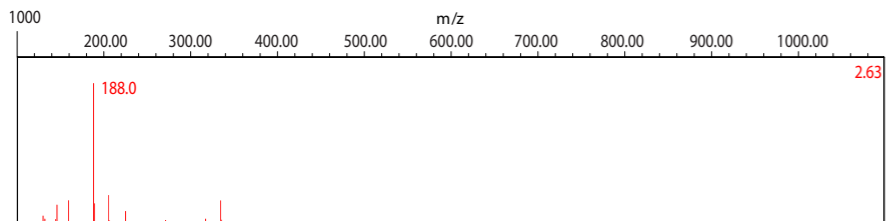


Рис. 6. Типичный масс-спектр тимодепрессина при ионизации электрораспылением с напряжением на входном конусе 54 В



соображениям было использовано сочетание сорбита и сахарината натрия.

Были приготовлены пленкообразующие растворы, содержащие выбранные концентрации полимера и различные концентрации подсластителей.

Изучалось влияние подсластителей на вкусовые качества пленки и на структурно-механические свойства пленкообразующего раствора.

По вкусовым характеристикам оптимальной явилась комбинация подсластителей сорбита и сахарина

натрия в концентрации 0,5 % и 12 % соответственно.

На основании проведенных исследований было выбрано оптимальное сочетание сорбита в концентрации 12 % в пленкообразующем растворе и натрия сахарината в концентрации 0,5 %. В дальнейших исследованиях изучалась способность пленкообразующих растворов формировать быстрорастворимые пленки. Было установлено, что свойства пленок, полученных на выбранных полимерах, существенно отличаются.

На основании проведенных исследований в качестве пленкообразователя выбран гороховый крахмал.

В связи с тем, что пленка на гороховом крахмале была хрупкой, легко ломалась при первом же складывании пленки пополам, в рецептуру пленкообразующего раствора необходимо введение пластификатора, в качестве которого использовали Твин-80. Концентрацию Твина-80 определяли по оценке качества пленки по показателю прочности на излом.

Увеличение концентрации Твина-80 улучшает прочность пленки на излом.

Однако увеличение концентрации Твина-80 свыше 0,2 % ухудшало внешний вид пленки, изменялась ее прозрачность и однородность. Поэтому 0,2 % Твина-80 является оптимальной концентрацией.

На основании разработанной матрицы была получена трансбуккальная пленка с «Тимодепрессин», которая растворялась в течение 3 мин. В опытах *in vitro* определен профиль растворения «Тимодепрессина» из пленки в приборе «вращающаяся корзинка».

Показано, что за 30 сек в раствор искусственной слюны переходит 40 % пептида, а за 3 мин тимодепрессин полностью переходит в раствор.

В объеме проведения доклинических исследований лекарственной формы «Тимодепрессина» в виде трансбуккальных пленок была разработана методика количественного определения «Тимодепрессина» в сыворотке крови и определение его концентрации у кроликов.

Метод количественного анализа

Для определения неизменного «Тимодепрессина» в сыворотке крови использовали метод абсолютной калибровки:

- Хроматографическая система Dionex ultimate 3000 с масс-детектором Bruker micrOTOF-Q II.
- Колонка Dionex Acclaim PA C16 3 мкм 2,1×150 мм.

- Элюент — раствор ацетонитрил — вода — муравьиная кислота (16:84:0,05).

- Поток подвижной фазы — 0,3 мл/мин.

- Объем вводимой пробы — 10 мкл.

- Масс-детектор напряжение на игле — 4000 В.

- Температура источника — 180 °С.

- Расход осушающего газа — 6 л/мин.

- Давление распыляющего газа — 1,5 бар.

- Ионизация электрораспылением.

- Регистрация положительных ионов газа для диссоциации аргон.

- Родительский ион — 334 (M+H).

- Режим SRM 334→188 — наиболее активный процесс распада.

- Время удерживания тимодепрессина в этих условиях — 3 минуты.

Методика извлечения препарата

Сыворотку крови (200 мкл) помещали в пробирку эппендорф.

Проводили осаждение сывороточных белков 600 мкл метанола, перемешивали на вихревой мешалке 5 сек, центрифугировали 5 мин. при 14000 об/мин. 500 мкл надосадочного раствора отбирали во флаконы 1,5 мл для дальнейшего анализа на ВЭЖХ/МС/МС.

Метод расчета концентраций, калибровка

Для расчета концентрации «Тимодепрессина» в сыворотке использовали калибровочный график, построенный методом абсолютной калибровки с использованием стандартных растворов «Тимодепрессина».

Разработанный метод был применен для определения концентрации «Тимодепрессина» в сыворотке крови кроликов шиншилла, массой тела, в среднем, 3,5 кг при трансбуккальном применении быстрорастворимых пленок с дозировкой 1 мг.

В таблице 1 представлены концентрации неизменного «Тимодепрессина», обнаруженные в сыворотке крови кроликов.

Таблица 1. Концентрации «Тимодепрессина» (мкг/мл) при трансбуккальном применении быстрорастворимых пленок в дозе 0,3 мг/кг

№ крол.	0.17 час	0.5 час	1 час	3 час	5 час	24 час
1	0,05	0,07	0,45	0,04	0,07	0,02
2	3,70	1,23	0,37	0,34	0,22	0,14
3	2,24	0,07	0,07	0,04	0,02	0,02
4	0,07	0,39	2,99	0,16	0,07	0,03
5	0,34	0,04	0,01	0,25	0,07	0,02
6	0,84	0,07	0,02	0,04	0,03	0,02
Средн. ст.ош.	1,21	0,31	0,65	0,15	0,08	0,04
95%	1,17	0,37	0,92	0,10	0,06	0,04

Видно, что при трансбуккальном применении быстрорастворимых пленок в дозе 0,3 мг/кг «Тимодепрессин» из слизистой ротовой полости быстро проникает в системный кровоток.

У четырех кроликов из шести максимальные концентрации фиксируются уже в первые 10 минут и определяются в микрограммовых количествах. Через 24 часа после применения пленок «Тимодепрессин» определяется в крови в незначительных количествах (падение концентрации по отношению к максимальной примерно в 50 раз).

Таким образом, проведенные исследования показали:

1. Метод ВЭЖХ/МС/МС может успешно применяться в дальнейших исследованиях фармакокинетики и биодоступности различных лекарственных форм синтетического пептида «Тимодепрессина»;

2. При трансбуккальном применении быстрорастворимых пленок «Тимодепрессин» из слизистой ротовой полости кроликов быстро проникает в системный кровоток.

В результате выполнения научно-исследовательской работы молодыми специалистами ЦКП (НОЦ) был получен лекарственный препарат на основе российской биотехнологической субстанции «Тимодепрессина» в виде трансбуккальной пленки.

Для успешной фармакотерапии заболеваний существенное значение имеют психофизические показатели лекарственной формы.