

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева»**

На правах рукописи



Ульянова Юлия Вячеславовна

**Разработка подходов к созданию инъекционных депо-форм
рилпивиринна на основе полилактидов**

1.4.7. Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Научный руководитель: доктор химических наук
Гельперина Светлана Эммануиловна
РХТУ им. Д.И. Менделеева, заведующая научно-образовательной лабораторией систем доставки лекарственных веществ

Научный консультант: кандидат химических наук
Ермоленко Юлия Валерьевна
РХТУ им. Д.И. Менделеева, доцент кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов

Официальные оппоненты: доктор химических наук, доцент
Кусков Андрей Николаевич
РХТУ им. Д.И. Менделеева, заведующий кафедрой технологии химико-фармацевтических и косметических средств

доктор химических наук, профессор
Кильдеева Наталья Рустемовна
РГУ им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство), заведующая кафедрой химии и технологии полимерных материалов и нанокompозитов

кандидат химических наук
Колосова Ольга Юрьевна
Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, старший научный сотрудник лаборатории криохимии биополимеров

Защита диссертации состоится «23» ноября 2023 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета РХТУ.2.6.05 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева». (125047, г. Москва, Миусская пл., 9).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева и на официальном сайте: <http://www.muctr.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета РХТУ.2.6.05
кандидат химических наук



Биличенко Ю.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В последние годы наблюдается значительный рост исследований в области разработки инъекционных депо-форм лекарственных веществ (ЛВ) для терапии хронических заболеваний. Обеспечивая пролонгированное контролируемое высвобождение ЛВ и длительное поддержание терапевтических концентраций в крови, депо-формы позволяют снизить кратность дозирования ЛВ по сравнению с формами быстрого высвобождения. Важной – и сравнительно новой – областью применения инъекционных депо-форм является терапия инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекция). ВИЧ-инфекция – одна из наиболее острых проблем здравоохранения, что обусловлено как отсутствием радикальных методов лечения, так и несоблюдением пациентами режима лечения, что приводит к распространению инфекции. Актуальность этой проблемы послужила стимулом для развития принципиально новых подходов к ее решению.

Получение инъекционных депо-форм, таких как микросферы и имплантаты, на основе полилактидов – биodeградируемых и биосовместимых сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA), может стать отличным альтернативным подходом. Отличительной особенностью этих форм является контролируемое высвобождение ЛВ путем выбора полилактида с подходящими свойствами, а также их физико-химическая стабильность и отсутствие необходимости использования высоких концентраций поверхностно-активных веществ (ПАВ). Депо-формы на основе PLGA микросфер и имплантатов представляют собой сложные объекты, основная характеристика которых – скорость высвобождения ЛВ. Профиль высвобождения зависит от многих свойств носителя, включая скорость его деградации в организме и гидрофобность, которые, предопределяются его химической структурой, площадью поверхности, формой и пр. Именно вследствие разнообразия параметров, соблюдение которых необходимо для решения фармакологической задачи, подходы к разработке полилактидных депо-форм различных ЛВ остаются, как правило, эмпирическими. В связи с этим разработка депо-формы на основе полилактидов каждого конкретного ЛВ требует длительной и трудоемкой экспериментальной работы.

Степень разработанности научной проблемы. Первый инъекционный препарат длительного действия для терапии ВИЧ-инфекции – Cabenuva® был успешно введен в клиническую практику в 2021 году. Этот препарат представляет собой

комбинацию двух нанокристаллических суспензий антиретровирусных агентов: рилпивирин и каботегривира. Использование таких депо-форм рилпивирин и каботегривира позволило сократить режим дозирования до 6 инъекций в год. Поэтому поиск новых альтернативных депо-форм антиретровирусных агентов активно продолжается. К настоящему моменту накоплено значительное количество исследований по получению, свойствам, применению PLGA микросфер и имплантатов для лечения различных хронических заболеваний. Тем не менее, данных о включении нуклеозидных антиретровирусных агентов (рилпивирин и пр.) в PLGA микросферы и имплантаты не так много, причем в большей части исследовательских работ указаны только составы композиций без изучения взаимосвязи различных факторов со скоростью деградации полилактида и со скоростью высвобождения ЛВ. Несмотря на показанную в работах возможность включения рилпивирин в полимерные депо-формы, понимание механизма его высвобождения из полилактидных микросфер и имплантатов и оценка факторов, влияющих на процесс гидролитической деградации, остаются недостаточно изученными и требуют комплексного подхода.

Целью диссертационного исследования является разработка подходов к созданию инъекционных депо-форм на основе PLGA микросфер и *in situ* формирующихся имплантатов (далее *in situ* имплантатов) антиретровирусного агента рилпивирин.

Задачи исследования:

- 1) Разработать методы получения микросфер и *in situ* имплантатов на основе PLGA с различными профилями высвобождения рилпивирин.
- 2) Определить влияние параметров микрофлюидного процесса получения PLGA микросфер на их основные физико-химические характеристики.
- 3) Установить влияние состава макромолекулярного носителя на скорость высвобождения рилпивирин *in vitro* из разрабатываемых депо-форм для дальнейшего управления скоростью высвобождения ЛВ.
- 4) Установить влияние гидролитической деградации полилактидных носителей на разные фазы профиля высвобождения рилпивирин *in vitro*.
- 5) Оценить возможность использования полимерных депо-форм в качестве альтернативы нанокристаллической форме рилпивирин.

Научная новизна. 1) Впервые микрофлюидным методом получены

микросферы на основе PLGA, нагруженные антиретровирусным агентом рилпивирин. Выявлены основные параметры получения PLGA микросфер с высоким содержанием рилпивирин: содержание PLGA 2 масс.%, содержание рилпивирин 13,8 мг/мг микросфер, соотношение скоростей потоков водной и органической фаз 6,7.

2) Впервые установлено влияние молекулярной массы, природы концевой группы, стехиометрического соотношения мономерных звеньев лактид:гликолид и содержания PLGA (для имплантатов) на профиль высвобождения рилпивирин из PLGA депо-форм на основе микросфер и *in situ* имплантатов.

3) Установлено, что снижение молекулярной массы PLGA, наличие концевой гидрофобной сложноэфирной группы (-CH₃) и увеличение доли молочной кислоты в составе PLGA с 50 до 75% приводит к контролируемому монофазному высвобождению рилпивирин из *in situ* имплантатов на основе PLGA в соответствии с моделью Пеппаса-Сахлина и кинетикой нулевого порядка.

4) Показана возможность использования полученных полилактидных депо-форм рилпивирин в качестве альтернативы нанокристаллической формы рилпивирин путем сопоставления экспериментальных профилей высвобождения *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость. Впервые предложен метод получения узкодисперсных полилактидных микросфер, нагруженных рилпивирин, с настраиваемой скоростью высвобождения ЛВ путем использования микрофлюидных технологий. Показано, что соотношение скоростей потоков фаз, содержание полилактида и рилпивирин в органической фазе являются критическими параметрами, определяющими физико-химические характеристики микросфер. Установлены параметры состава *in situ* имплантатов, позволяющие достигнуть монофазного высвобождения рилпивирин в соответствии с профилем растворения нанокристаллической формы рилпивирин в течение месяца.

Разработанные в настоящем исследовании подходы могут быть использованы для создания и изучения полилактидных депо-форм других трудно растворимых высокоактивных ЛВ, что открывает широкие возможности практического использования полученных результатов.

Методология и методы исследования. Для получения различных депо-форм рилпивирин использовали технологические подходы: микрофлюидные технологии,

УЗ гомогенизация, гомогенизация под давлением. Анализ депо-форм проводили с применением оптической микроскопии, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), динамического светорассеивания, дифференциальной сканирующей калориметрии, рентгенофазового анализа, высокоэффективной жидкостной хроматографии, капиллярного электрофореза. В работе использовалось оборудование Центра коллективного пользования РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ получения узкодисперсных полилактидных микросфер с высоким содержанием рилпивирин и регулируемые характеристиками путем использования микрофлюидной системы.

2. Условия формирования полилактидных *in situ* имплантатов, содержащих рилпивирин, с различным профилем высвобождения рилпивирин.

3. Ключевые факторы, оказывающие значимое влияние на скорость гидролитической деградации микросфер и имплантатов, и как следствие, на скорость высвобождения рилпивирин из полилактидных носителей.

4. Условия формирования *in situ* имплантатов рилпивирин с монофазным профилем высвобождения, соответствующим профилю растворения нанокристаллов рилпивирин и кинетике нулевого порядка.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечивается воспроизводимостью экспериментальных данных, а также статистической обработкой данных, применением методик аналитического контроля, а также современного оборудования для проведения экспериментальных работ.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы представлены на всероссийских и международных конференциях: Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2019» (Москва, 2019); «CRS 2020 Virtual Annual Meeting» (виртуально, 2020); VI Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Нижний Новгород, 2020); 4th Sechenov International Biomedical Summit 2020 (SIBS 2020) (Москва, 2020); 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (Вена, 2021); IX Международной научно-практической конференция «Биотехнология: наука и практика» (Крым, 2021); VII Междисциплинарная конференция «Молекулярные и

биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (Москва, 2021); 7th International Conference on Nanomedicine, Drug Delivery, and Tissue Engineering (Лиссабон, 2022); II школа молодых ученых «Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации» (Москва, 2022).

Публикации и источники финансирования. Основные материалы исследования отражены в 12 публикациях, среди которых 4 статьи в журналах, индексируемых в международных базах цитирования (Scopus и Web of Science), а также 8 тезисов докладов, представленных на международных и российских конференциях. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных проектов № 20-015-00291 и № 20-315-90104.

Объем и структура диссертации. Диссертация работа состоит из введения, четырех глав, заключения и списка работ, опубликованных автором. Работа изложена на 141 страницах, содержит 13 таблиц и 50 рисунков. Список литературы включает 214 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цели исследования, изложена научная новизна и практическая значимость.

В первой главе проведен обзор и анализ публикаций по теме диссертации. В обзоре рассмотрены основные типы инъекционных лекарственных форм длительного действия, которые нашли применение в клинической медицине. Освещены механизмы высвобождения лекарственных веществ из депо-форм на основе PLGA. Рассмотрены перспективы использования инъекционных форм длительного действия для терапии ВИЧ-инфекции.

Во второй главе приведено описание материалов, оборудования и экспериментальных методик получения депо-форм на основе PLGA микросфер и *in situ* имплантатов рилпивирин (РПВ), а также получения референтной формы – суспензии нанокристаллов РПВ. Перечислены основные методы анализа депо-форм.

Третья глава посвящена разработке методов получения полилактидных микросфер и *in situ* имплантатов с РПВ, а также их анализу.

Раздел 3.1 посвящен получению PLGA микросфер с РПВ. Для инъекционного введения рекомендуются частицы размером от 20 до 50 мкм с узким распределением

по размерам (коэффициент вариации $CV < 5\%$). Для этих целей использовали микрофлюидную установку. При разработке микрофлюидной технологии PLGA микросфер учитывали тип и концентрацию ПАВ в водной фазе, соотношение расходов фаз, содержание PLGA в органической фазе и загрузку РПВ (по полимеру). В результате использования различных ПАВ (додецилсульфат натрия, твин 80, полоксамер 188 и поливиниловый спирт (ПВС)) установили, что однородные капли эмульсии в микроканале формируются только в присутствии полоксамера 188 и ПВС, что можно объяснить более эффективным снижением межфазного натяжения в ряду Твин 80 ($2,7 \pm 0,2$ мН/м) > додецилсульфат натрия ($2,5 \pm 0,2$ мН/м) > полоксамер 188 ($2,2 \pm 0,2$ мН/м) > ПВС ($1,3 \pm 0,4$ мН/м). Независимо от концентрации полоксамера 188 и ПВС в интервале 0,5-3 масс.% микросферы характеризуются средним размером 28 мкм ($CV < 6\%$) и 26 мкм ($CV < 5\%$), соответственно. Для дальнейшей стабилизации эмульсий выбрали 2 масс.% раствор ПВС.

При изучении влияния соотношения расходов фаз и содержания PLGA в органической фазе на размер микросфер и эффективность включения РПВ расход органической фазы Q_o поддерживали 8,9 мкл/мин, расход водной фазы Q_v варьировали от 30 до 100 мкл/мин. Увеличение отношения Q_v/Q_o с 3,4 до 15,7 и уменьшение концентрации PLGA в диапазоне 3,0-0,5 масс.% привело к систематическому уменьшению размера микросфер для всех исследуемых концентраций (рисунок 1) и более монодисперсному распределению частиц меньшего размера (уменьшение CV от 10% до 3-5%).

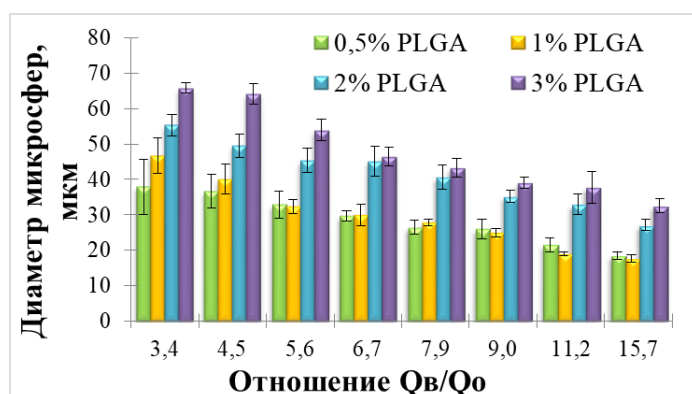


Рисунок 1 – Зависимость диаметра микросфер от соотношения расходов водной и органической фаз Q_v/Q_o и содержания PLGA

Для получения PLGA микросфер с различной загрузкой (по полимеру) и эффективностью включения РПВ использовали 2 масс.% раствор PLGA, 2 масс.% раствор ПВС и соотношение расходов фаз 6,7. Концентрацию РПВ варьировали от 1,0 до 3,2 мг/мл. В результате, максимальная загрузка (по полимеру), равная $12,7 \pm 0,1$

масс.%, и максимальная эффективность включения, равная $97,5 \pm 1,2$ масс.%, достигались при концентрации РПВ 3,2 мг/мл, что соответствует соотношению РПВ-PLGA 1/6.

Для дальнейшего изучения профилей высвобождения РПВ получали микросферы из различных полимеров PLGA, отличающиеся по природе концевой группы: $-\text{COOH}$ или $-\text{COOCH}_3$, средневесовой молекулярной массе: 64,7 и 117 кДа, стехиометрическому соотношению лактид/гликолид: 50:50 и 75:25. Органическая фаза состояла из 2 масс.% раствора PLGA в этилацетате, водная фаза состояла из 2 масс.% раствора ПВС, соотношение расходов фаз 6,7. В результате были получены PLGA микросферы (PLGA-RPV-6 - PLGA-RPV-9) со средним размером 40 мкм ($\text{CV} < 5\%$) и высокой эффективностью включения РПВ более 90%. Частицы имели узкое распределение по размерам, сферическую форму и плотную структуру (рисунок 2).

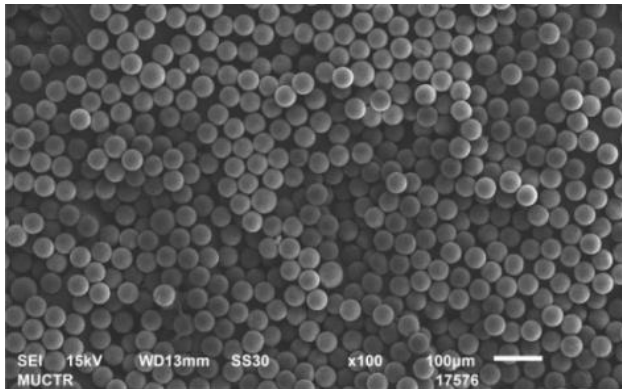


Рисунок 2 – Типичные микрофотографии PLGA микросфер, нагруженных рилпивирином, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина)

Раздел 3.2 посвящен получению полилактидных *in situ* формирующихся имплантатов с РПВ. Такие полимерные имплантаты образуются непосредственно в месте внутримышечного или подкожного введения вязкого полимерного раствора, состоящего из полимера, ЛВ и растворителя, в результате диффузии растворителя в окружающие ткани. Важным преимуществом имплантатов этого типа являются относительно простая технология получения и менее инвазивная процедура введения. В качестве органического растворителя выбрали N-метил-2-пирролидон (NMP), поскольку он одобрен FDA как вспомогательное вещество и широко используется на практике в таких препаратах как Eligard®, Atridox®, Perseris®. Важно, что NMP обладает невысокой вязкостью 1,66 мПа·с, которая играет существенную роль при формировании имплантата, а растворимость РПВ в NMP составляет 228 ± 5 мг/мл. Имплантаты получали путем обращения фаз по механизму быстрой инверсии фаз при

введении раствора PLGA в NMP в приемную среду, состоящую из 0,15 М буферного раствора (рН 7,4) с добавлением 20 мг/мл Твин 20.

При разработке состава имплантатов, главным образом, учитывали вязкость полимерных растворов. Для комфортного введения таких растворов через иглу для инъекций динамическая вязкость должна лежать в пределах от 100 до 1500 мПа·с. При концентрациях PLGA (L/G 50:50, $\eta = 0,41$ дл/г, эфирная концевая группа) 20, 30 и 40 масс.% вязкость растворов составила 794,42 мПа·с, 1422,84 мПа·с и 5677,54 мПа·с, соответственно. Анализ срезов имплантатов (рисунок 3) показал, что увеличение вязкости растворов повлияло на плотность оболочки имплантата и объем внутренней полости. Имплантаты, полученные из 30 и 40 масс.% растворов PLGA, характеризовались более плотной и широкой оболочкой с «пальцеобразными» порами.

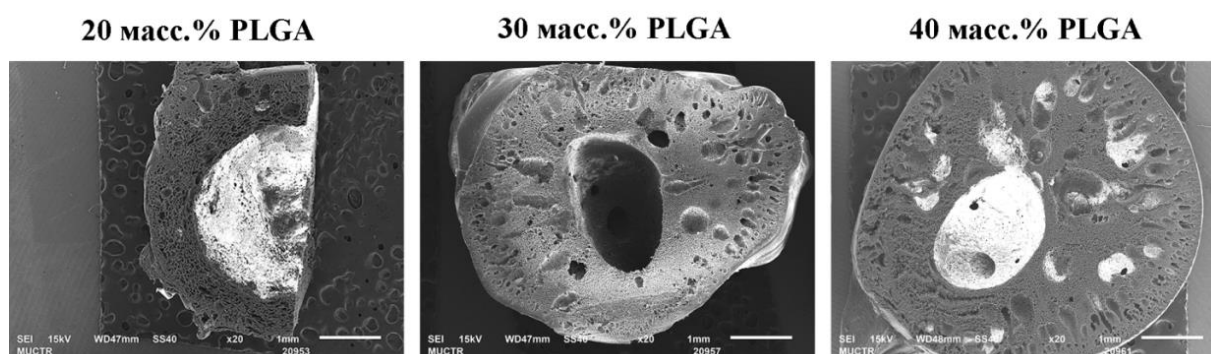


Рисунок 3 - Микрофотографии PLGA имплантатов, нагруженных рилпивиринном, полученные с помощью СЭМ

Для дальнейшего изучения профилей высвобождения РПВ получали *in situ* имплантаты (ISFI_1 - ISFI_8) из различных полимеров PLGA, отличающиеся по природе концевой группы: $-\text{COOH}$ или $-\text{COOCH}_3$, молекулярной массе: 7-17, 38-54 и 64,7 кДа, стехиометрическому соотношению лактид/гликолид: 50:50 и 75:25. Содержание PLGA в NMP составило 30 масс.%, содержание РПВ – 1,6 мг.

В четвертой главе проведен комплексный анализ влияния гидролитической деградации полилактидных носителей на разные фазы профиля высвобождения рилпивиринна *in vitro* путем сравнения профилей высвобождения и гидролиза PLGA, а также оценка профилей высвобождения РПВ с использованием математических моделей.

Раздел 4.1 посвящен разработке метода изучения скорости высвобождения РПВ из полимерных микросфер и имплантатов. Для изучения высвобождения РПВ *in vitro* выбрали наиболее широко используемый буферный раствор: фосфатно-солевой

буферный раствор pH 7,4 с содержанием 20 мг/мл Твин 20, который добавляли для увеличения растворимости РПВ. Растворимость РПВ составила $16,12 \pm 0,12$ мкг/мл, что позволило поддерживать «условия бесконечного разведения». Через каждые 7-8 дней проводили полную замену среды.

В разделе 4.2 исследовано влияние различных факторов, в том числе молекулярная масса, природа концевой группы, соотношение мономеров, а также размер (для микросфер) и содержание PLGA (для *in situ* имплантатов) на скорость высвобождения РПВ из PLGA носителей. При изучении скорости высвобождения РПВ сравнивали профили высвобождения ЛВ с профилями гидролитической деградации носителей в буферном растворе при 37 °С. Доза РПВ для всех депо-форм составляла 1,6 мг. Выбирая полимерный состав депо-форм РПВ стремились к получению монофазного профиля высвобождения.

Высвобождение рилпивирин из PLGA микросфер

Для узкодисперсных PLGA микросфер разного размера: PLGA-RPV-1 ($66,8 \pm 3,3$ мкм), PLGA-RPV-2 ($42,7 \pm 0,6$ мкм) и PLGA-RPV-3 ($33,6 \pm 0,9$) существенной разницы в скоростях высвобождения РПВ из микросфер не наблюдали. Также не установлено существенного влияния молекулярной массы PLGA в диапазоне от 64,7 до 117 кДа на профиль высвобождения РПВ из микросфер со средним размером 40 мкм. Поэтому для изучения влияния остальных факторов выбрали микросферы с размером 40-45 мкм и CV <5%, полученные из полимеров в близком диапазоне молекулярных масс.

В результате установили, что высвобождение РПВ из узкодисперсных PLGA микросфер соответствует профилю отсроченного двухфазного высвобождения (рисунок 4 а). Длительность отсроченной первой фазы составила около 21 дня (высвободилось не более 14% РПВ), на второй фазе отмечено более интенсивное высвобождение. При этом с 21 по 49 день инкубации из микросфер PLGA-RPV-8 с содержанием лактида в полимере 50 % высвободилось на 24% больше РПВ, чем из микросфер PLGA-RPV-7 (75% лактида). Сопоставление полученных данных с профилем гидролитической деградации микросфер (рисунок 4 в) показало, что в первые три недели не происходило интенсивного гидролиза полимера и в этом случае высвобождение РПВ контролировалось диффузией ЛВ через полимерный слой. На второй фазе (с 21 по 70 день) произошел скачок скорости гидролитической деградации образца PLGA-RPV-8, связанный с более интенсивной объемной эрозией менее

гидрофобного полимера, что, соответственно, привело к ускорению высвобождения РПВ. Деградация и изменения структуры микросфер, происходящие в результате объемной эрозии, подтверждены методом СЭМ и показаны на рисунке 5.

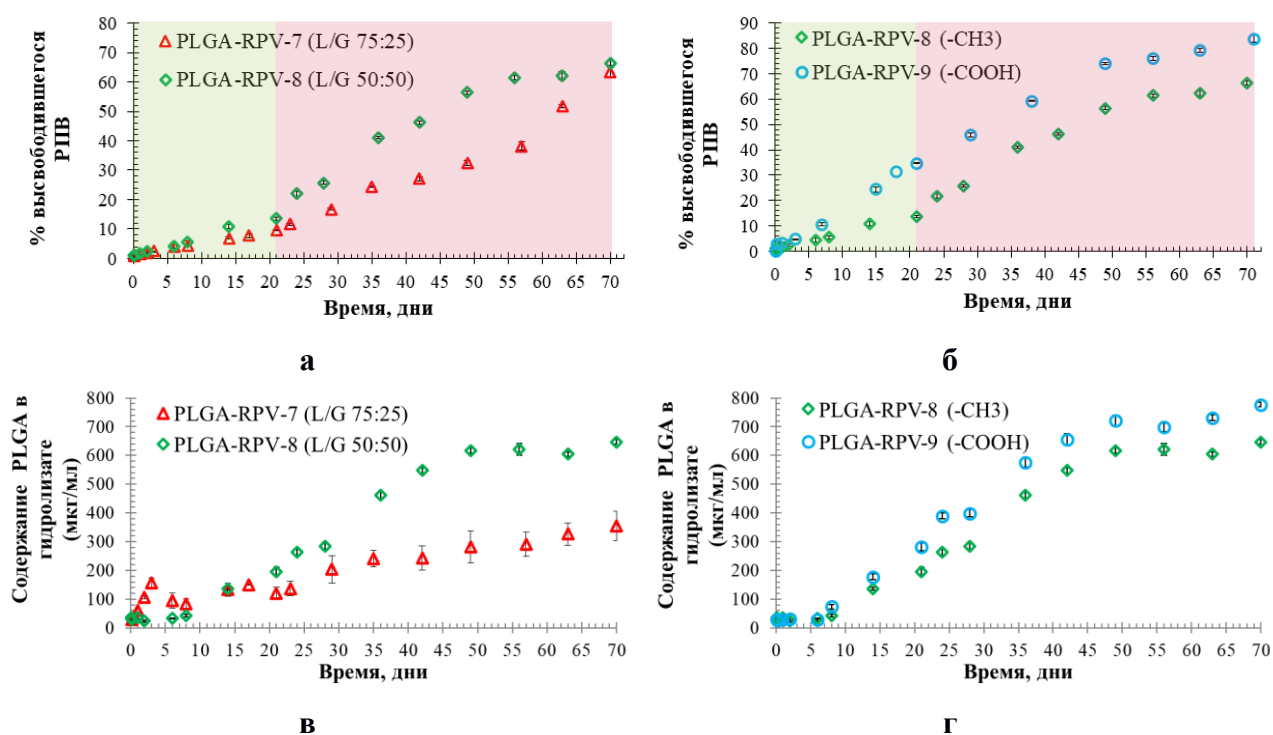


Рисунок 4 – (а) и (б) Профили высвобождения рилпивиринна из PLGA микросфер, полученных из различных по составу PLGA, n=3. (в) и (г) Профили гидролиза PLGA микросфер, полученных из различных по составу PLGA, n=3

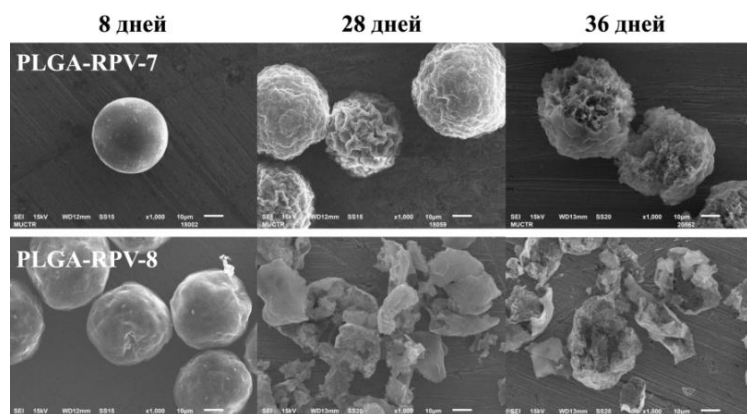


Рисунок 5 – Микрофотографии образцов PLGA-RPV-7 (L/G 75:25) и PLGA-RPV-8 (L/G 50:50), полученные с помощью СЭМ, при инкубации в течение 36 дней

При сравнении профилей высвобождения РПВ из образцов PLGA-RPV-8 (-CH₃) и PLGA-RPV-9 (-COOH) с профилями гидролитической деградации PLGA с различной структурой концевой группы установлено, что на первой стадии высвобождение РПВ также контролируется диффузией ЛВ через полимерную оболочку, что подтверждается низкой скоростью гидролиза полимера (рисунок 4 г) и сохранением формы микросфер на начальном этапе инкубации (рисунок б). В то же время, увеличение доли карбоксильных концевых групп в полимере, способствовало

сокращению длительности лаг-фазы с 21 дня (13% РПВ, PLGA-RPV-8) до 7 дней (10% РПВ, PLGA-RPV-9). Кроме того, образец PLGA-RPV-9, полученный из менее гидрофобного полимера с -COOH группами, подвергался объемной эрозии быстрее (рисунок 6), что привело к более интенсивному высвобождению РПВ на всем временном участке (84% vs 67% на 70 день, рисунок 4 б). В данном случае общий вид профилей гидролитической деградации микросфер совпадает с видом профилей высвобождения РПВ.

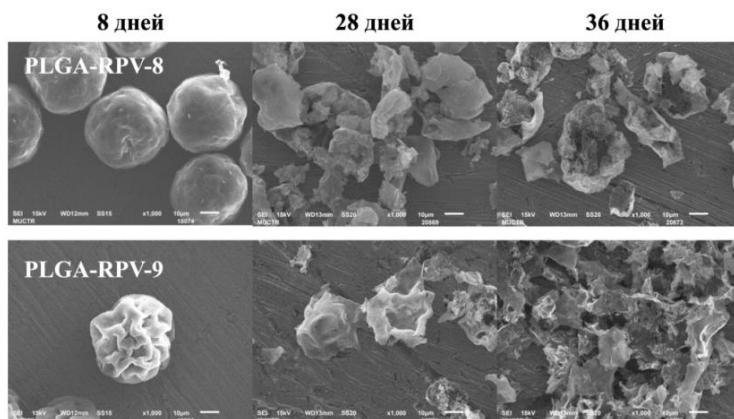


Рисунок 6 – Микрофотографии образцов PLGA-RPV-8 (-CH₃) и PLGA-RPV-9 (-COOH), полученные с помощью СЭМ, при инкубации в течение 36 дней

Таким образом, наиболее значимыми факторами, оказывающими влияние на скорость деградации полимера, и следовательно, высвобождение РПВ являются доля молочной кислоты в сополимере и природа концевой группы. Установлено, что доля молочной кислоты 75% и наличие концевой сложноэфирной (-CH₃) группы в сополимере позволили замедлить процесс деградации макромолекулярного носителя и снизить скорость высвобождения РПВ в течение 70 дней.

Высвобождение рилпивирин из PLGA имплантатов

Известно, что в течение первых 24 часов после введения высвобождение ЛВ из имплантатов, сформированных методом инверсии фаз, сопровождается высоким бёрст-эффектом (взрывным эффектом первоначального выброса), который может привести к возникновению побочных эффектов вследствие превышения токсических концентраций ЛВ в крови. Поэтому основная задача, связанная с получением таких имплантатов, заключается в поиске способов снижения бёрст-эффекта.

При изучении скорости высвобождения РПВ из имплантатов с содержанием PLGA от 20 до 40 масс.% установлено, что высвобождение РПВ во всех случаях соответствует трехфазному профилю (рисунок 7). В первые 24 ч бёрст-эффект составил от 20 до 40%. Затем с 2 по 18 день следовало медленное высвобождение РПВ. На 20 день отмечено более интенсивное высвобождение. При сопоставлении профилей

деградации PLGA с профилями высвобождения РПВ установлено, что в течение первых 18 дней гидролитическая деградация незначительно участвует в процессе высвобождения РПВ (гидролизовалось менее 18% PLGA, рисунок 7 б), следовательно бёрст-эффект на первой фазе обусловлен исключительно процессом инверсии фаз и диффузией РПВ вместе с NMP. При этом, в течение первых трех недель (21 день) увеличение содержания PLGA привело к снижению доли высвободившегося РПВ на 25% (55% для 20 масс.% PLGA vs 30% для 40 масс.% PLGA).

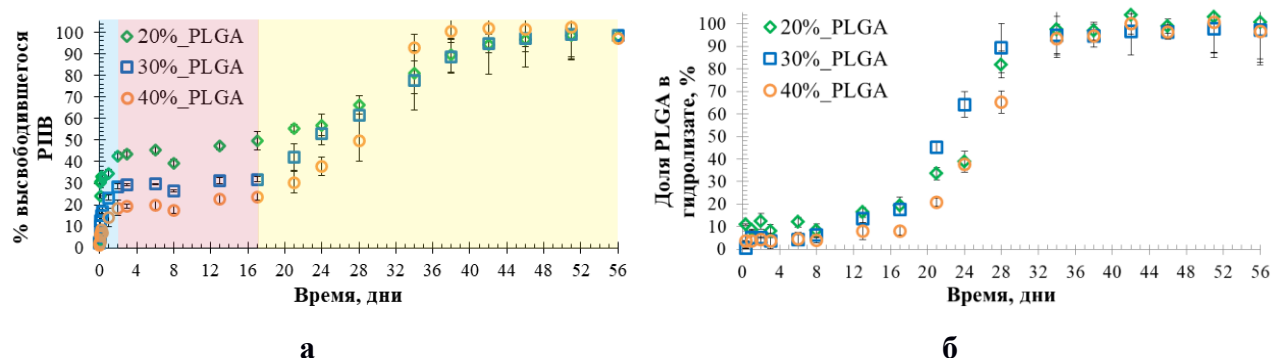


Рисунок 7 – а) Профили высвобождения рилпивиринна из PLGA имплантатов, отличающие содержанием PLGA, n=3. б) Профили гидролиза PLGA имплантатов, отличающие содержанием PLGA, n=3

После трех недель инкубации, согласно рисунку 6 б, скорость гидролитической деградации имплантатов начала возрастать, что способствовало ускоренному высвобождению РПВ на третьей фазе (рисунок 7 а). Анализ срезов имплантатов методом СЭМ (рисунок 8) также показал, что через 24 дня инкубации все имплантаты обладали развитой пористостью с увеличенным размером пор, что указывает на начало процесса деградации макромолекулярного носителя. Таким образом, после 21 дня инкубации, высвобождение РПВ происходит в результате объемной эрозии имплантата.

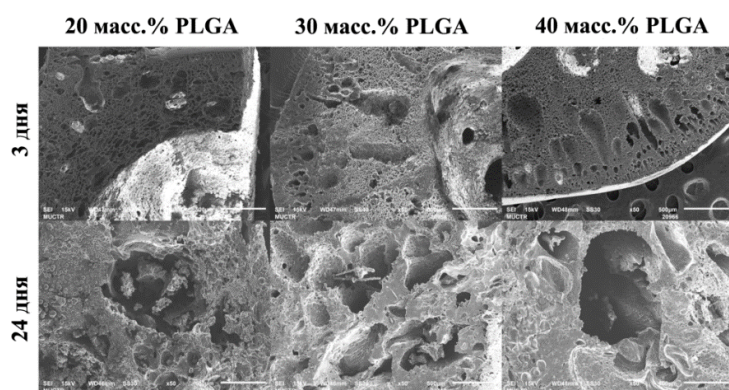


Рисунок 8 – Микрофотографии PLGA имплантатов, полученные с помощью СЭМ, при инкубации в течение 24 дней

Для установления влияния молекулярной массы PLGA на скорость высвобождения РПВ имплантаты получали из PLGA с молекулярной массой 7-17 кДа и 64,7 кДа. Снижение молекулярной массы PLGA привело к уменьшению доли высвободившегося РПВ с 39,1 до 27,7% к 42 дню (рисунок 9). Важно, что в случае использования низкомолекулярного PLGA удалось также снизить бёрст-эффект с 18,6 до 6,3% за счет замедления скорости инверсии фаз. Это привело к получению монофазного профиля высвобождения РПВ. В результате сравнения профилей высвобождения РПВ и гидролитической деградации имплантата можно предположить, что в течение 42 дней высвобождение РПВ из ISFI_6 происходило, главным образом, за счет его диффузии, тогда как в ISFI_7 к процессу диффузии после 12 дней инкубации добавляется еще процесс деградации PLGA.

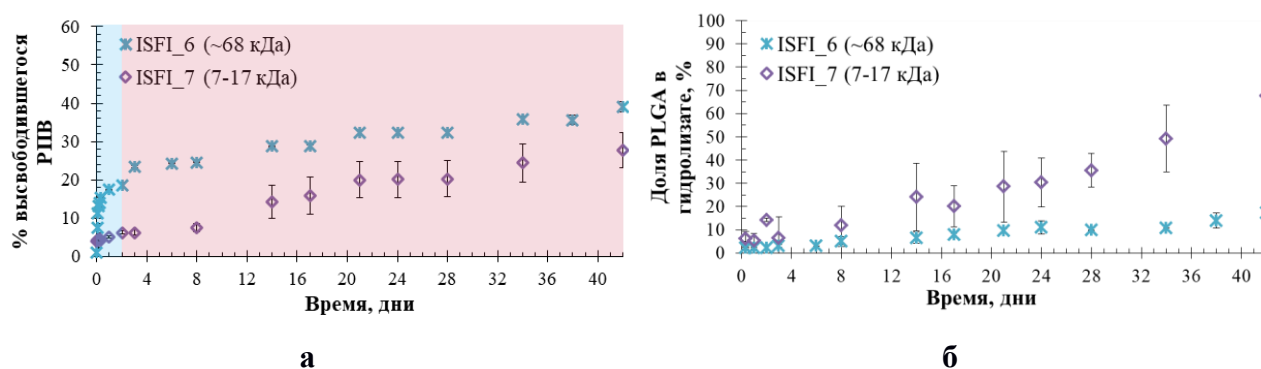


Рисунок 9 – Профили высвобождения рилпивирина (а) и профили гидролиза PLGA (б) из имплантатов, полученных из полимеров с разной молекулярной массой, n=3

При изучении влияния природы концевой группы имплантаты получали из PLGA с близкими молекулярными массами (38-54 кДа), но разными концевыми группами: сложноэфирной (ISFI_4) и карбоксильной (ISFI_5). Установлено, что полученные имплантаты высвобождали РПВ в соответствии с трехфазным профилем (рисунок 10 а): в первые 24 ч бёрст-эффект составил до 20%. Затем с 2 по 19 день следовало медленное высвобождение РПВ около 30%. Существенные различия в высвобождении отмечены только после 20 дня на стадии деградации полимера. Использование полимера с карбоксильной концевой группой вместо эфирной позволило ускорить гидролитическую деградацию PLGA (50:50, Mw 38-54 кДа), и как следствие, увеличить долю высвободившегося РПВ. Это привело к сокращению периода высвобождения РПВ во время третьей фазы на 6 дней: около 80% РПВ высвободилось из ISFI_4 к 35 дню, тогда как из ISFI_5 к 28 дню.

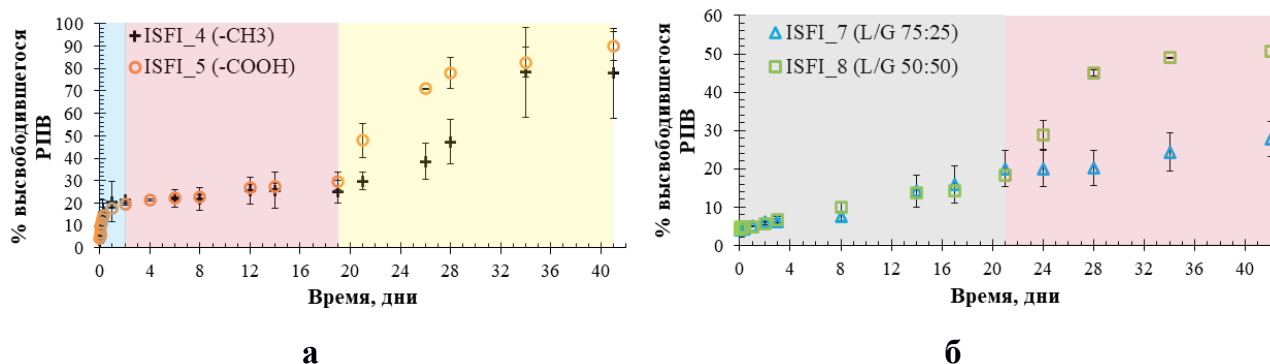


Рисунок 10 – Профили высвобождения рилпивирина из имплантатов, полученных из полимеров с разной концевой группой (а) и разной долей молочной кислоты (б), $n=3$

Влияние стехиометрического соотношения мономерных звеньев лактида и гликолида изучали при сравнении имплантатов, полученных из низкомолекулярных PLGA с разной долей молочной кислоты в молекуле сополимера: ISFI_7 (L/G 75/25) и ISFI_8 (L/G 50/50). Значимых различий в высвобождении РПВ в течение первых 3 недель из обоих имплантатов не наблюдали (рисунок 10 б). Доля высвободившегося РПВ через 21 день составила 18%. Сравнение профилей высвобождения и гидролитической деградации показало, что увеличение доли молочной кислоты в PLGA с 50 до 75% привело к замедлению скорости гидролиза сополимера, начиная с 17 дня, тем самым замедляя скорость высвобождения РПВ.

Таким образом, наиболее значимыми факторами, оказывающими влияние на фазу бёрст-эффекта, являются содержание PLGA и молекулярная масса. Тогда как скорость деградации полимера, и, следовательно, высвобождение РПВ на третьей фазе зависят в значительной степени от доли молочной кислоты в сополимере и природы концевой группы. При этом, использование PLGA меньшей молекулярной массы, с концевой сложноэфирной группой и долей молочной кислоты в сополимере 75% позволило получить монофазный профиль высвобождения РПВ из имплантата.

Раздел 4.3 посвящен оценке сопоставимости *in vitro* профилей высвобождения РПВ из полимерных депо-форм и растворения его референтной формы (препарат сравнения – аналог препарата Cabenuva®). Скорость высвобождения ЛВ считается эквивалентной в случае, если фактор сходимости f_2 находится в интервале от 50 до 100. Для сравнительной оценки получили суспензию нанокристаллов РПВ с такими же физико-химическими характеристиками, как в оригинальном препарате: размер нанокристаллов около 200 нм, соотношение РПВ-полоксамер 338 4:1, концентрация полоксамера 338 10 мг/мл. Наиболее близкие к препарату характеристики удалось

получить методом механического истирания со стеклянными шариками: размер нанокристаллов 226 нм и PDI 0,145. В качестве криопротектора выбрали 5 масс.% трегалозу. По результатам сравнительных тестов кинетики высвобождения/растворения РПВ наилучшая сходимость ($f_2 = 74$; $R^2 0,9924$) была достигнута в течение 42 дней в случае имплантата, полученного из PLGA с молекулярной массой 7-17 кДа, L/G 75:25, с концевой сложноэфирной группой, с содержанием рилпивирин (DL) 2,4%.

Таким образом, сопоставимость профилей указывает на то, что *in situ* имплантаты могут стать хорошей альтернативой нанокристаллической форме РПВ с режимом дозирования раз в месяц и более. Тем не менее, для наиболее точного утверждения необходимо дальнейшее проведение фармакокинетических исследований *in vivo*.

Раздел 4.4 посвящен оценке профилей высвобождения РПВ из полимерных депо-форм, которые показали хорошую корреляцию с профилем растворения нанокристаллов, с помощью методов математического моделирования. Для описания применяли следующие математические модели: модель нулевого ($M_t/M_\infty = k_0 \times t$) и первого порядка ($\ln(1 - M_t/M_\infty) = -k_1 \times t$), Хигучи ($M_t/M_\infty = k_H \sqrt{t}$), Хиксона-Кроуэлла ($(1 - M_t/M_\infty)^{1/3} = 1 - k_\beta \times t$), Корсмейера-Пеппаса ($M_t/M_\infty = k_{KP} \times t^n$), Пеппаса-Сахлина ($M_t/M_\infty = k_1 \times t^m + k_2 \times t^{2m}$) и Хопфенберга ($M_t/M_\infty = 1 - [1 - k_1 \times t \times (t - 1)]^n$). Выбор подходящей модели проводили при сравнении коэффициентов корреляции R^2 .

В результате математической обработки экспериментальных данных наилучшая аппроксимация, как для микросфер, так и для имплантатов, получена при применении модели Пеппаса-Сахлина, учитывающая также деградацию полимерной матрицы: $R^2 0,9944$ и $0,9902$, соответственно. При этом установлено, что процесс диффузии преобладает над процессом разложения полимерной матрицы ($k_1 \gg k_2$). Совокупность двух этих процессов позволила высвобождать РПВ из имплантата в соответствии с моделью нулевого порядка ($R^2 0,9916$), то есть с постоянной скоростью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан микрофлюидный метод получения узкодисперсных микросфер (40-45 мкм) на основе PLGA, нагруженных антиретровирусным агентом РПВ. Показано, что для образования микросфер с узким распределением по размерам и эффективностью включения РПВ более 98%, необходимо: соотношение скоростей потоков $Q_v/Q_o = 6,7$, концентрация PLGA в органической фазе 2 масс.%, концентрация РПВ – 3,2 мг/мл, концентрация ПВС в водной фазе – 2 масс.%.

2. Установлены различия профилей высвобождения РПВ из депо-форм на основе PLGA: для микросфер – двухфазный процесс, для имплантатов – трехфазный процесс. Установлено, что общими факторами, влияющими в большей степени на скорость высвобождения РПВ во время фазы деградации полимерной матрицы, являются природа концевой группы PLGA и стехиометрическое соотношение мономерных звеньев лактид:гликолид. Для имплантатов установлено, что молекулярная масса PLGA и его содержание в сформированном имплантате существенно влияли на фазу немедленного высвобождения в первые 48 ч.

3. Разработана методика получения *in situ* формирующихся имплантатов. Установлено, что требуемая вязкость растворов достигается при содержании PLGA в N-метил-2-пирролидоне 30 масс.%. Использование PLGA с низкой молекулярной массой (12,5 кДа), с концевой сложноэфирной ($-CH_3$) группой вместо карбоксильной и с стехиометрическим соотношением мономерных звеньев лактид:гликолид 75:25 позволило добиться необходимого монофазного профиля высвобождения РПВ из имплантата, эквивалентного ($f_2 = 74$, $R^2 = 0,9924$) профилю растворения нанокристаллов РПВ (аналог препарата Cabenuva®).

4. Высвобождение РПВ из полученных полимерных микросфер и имплантатов подчиняется модели Пеппаса-Сахлина ($R^2 > 0,99$), учитывающей вклад диффузии и гидролитической деградации полимерной матрицы.

Результаты диссертационного исследования позволяют заложить основу для дальнейшего изучения фармакокинетики депо-форм РПВ, а также могут быть полезны при поиске *in vitro/in vivo* корреляций (IVIVC). Выявленные при этом закономерности помогут прогнозировать фармакокинетику депо-форм РПВ на основе PLGA с определенным известным профилем высвобождения *in vitro*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ

1. Ермоленко Ю.В. Роль гидролитической деградации полилактидных носителей при разработке нано- и микроразмерных лекарственных форм на их основе / Ю.В. Ермоленко, А.С. Семенкин, **Ю.В. Ульянова**, Т.С. Ковшова, О.О. Максименко, С.Э. Гельперина // Журнал известия академии наук. Серия химическая. – 2020. – №8. – С. 1-12. **DOI:** 10.1007/s11172-020-2918-0. (*Scopus, Web of Science*)
2. **Ulianova Y.** Tuning the release rate of rilpivirine from PLGA-based in situ forming implants / Y. Ulianova, Y. Ermolenko, S. Tkachenko, V. Trukhan, A. Morozov, S. Gelperina // Polymer Bulletin. – 2022. **DOI:** 10.1007/s00289-022-04623-2. (*Scopus, Web of Science*)
3. Ermolenko Yu. Potential of the capillary electrophoresis method for PLGA analysis in nano-sized drug formulations / Yu. Ermolenko, N. Nazarova, A. Belov, A. Kalistratova, **Ulyanova Yu**, N. Osipova, S. Gelperina // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2022. – V.70. – P. 103220. **DOI:** 10.1016/j.jddst.2022.103220. (*Scopus, Web of Science*)
4. **Ulianova Y.** Development of a long-acting injectable formulation of rilpivirine based on PLGA microspheres / Y. Ulianova, Y. Ermolenko, V. Trukhan, V. Ivanov, I. Iusupov, A. Kurkin, S. Gelperina // The World Congress on Recent Advances in Nanotechnology. – 2022. – №NDDTE 143. – P.1-6. **DOI:** 10.11159/nddte22.143. (*Scopus, Web of Science*)
5. **Ульянова Ю.В.** Влияние параметров микрофлюидного процесса на характеристики микросфер на основе высокомолекулярного сополимера молочной и гликолевой кислот / Ю.В. Ульянова, Ю.В. Ермоленко, Р.А. Карманова, Н.Н. Гридина, О.О. Максименко, С.Э. Гельперина // Успехи в химии и химической технологии. – 2019. – Т. 5. – С. 44–46.
6. **Ulianova Y.V.** Towards the development of injectable depot formulations of antiretroviral drugs / Y.V. Ulianova, O.O. Maksimenko, Y.V. Ermolenko, V.N. Ivanov, A.V. Kurkin, S.E. Gelperina // 47th (Virtual) Annual Meeting of the Controlled Release Society «2020 Vision for Global Impact» – 2020.
7. **Ульянова Ю.В.** Получение микросфер на основе сополимера молочной и гликолевой кислот, нагруженных рилпивирином / Ю.В. Ульянова, О.О. Максименко, Ю.В. Ермоленко, С.Э. Гельперина // Сборник тезисов докладов VI Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». – 2020. – С.240.

8. **Ulianova Yu.** Development of poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles containing rilpivirine for long-acting HIV therapy / Yu. Ulianova, O. Maksimenko, Yu. Ermolenko, V. Trukhan, A. Kurkin, S. Gelperina // Abstracts book Sechenov International Biomedical Summit. – 2020. – P. 44.

9. **Ulianova Yu.** PLGA-based in situ forming implants for controlled release of rilpivirine / Yu. Ulianova, Yu. Ermolenko, S. Gelperina // 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. – 2021.

10. **Ульянова Ю.В.** Исследование кинетики высвобождения in vitro с использованием гелевых фантомов, имитирующих мышечную ткань / Ю.В. Ульянова, Е.О. Панина, Ю.В. Ермоленко, Л.В. Ванчугова, А.В. Митюков, М.Ю. Горшкова, С.Э. Гельперина // Сборник тезисов докладов VII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». – 2021. – С. 108.

11. **Ульянова Ю.В.** Влияние структуры сополимера молочной и гликолевой кислот на скорость высвобождения рилпивирин из имплантатов, формирующихся в месте введения / Ю.В., Ульянова, Е.О. Панина, Ю.В. Ермоленко, С.Э. Гельперина // Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации: тезисы докладов. – 2022. – С. 49.

12. **Ульянова Ю.В.** Изучение влияния параметров микрофлюидного процесса на характеристики полимерных микросфер, нагруженных антиретровирусным агентом / Ю.В. Ульянова, Ю.В. Ермоленко, В.Н. Иванов, А.В. Куркин, С.Э. Гельперина // Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации: тезисы докладов. – 2022. – С. 50.