

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук

Гельперина Светлана Эммануиловна

Научный консультант:

кандидат химических наук, доцент

Ермоленко Юлия Валерьевна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Инъекционные формы длительного действия.....	10
1.2 Инъекционные депо-формы на основе масляных растворов.....	14
1.3 Инъекционные депо-формы на основе водных суспензий кристаллов	15
1.4 Инъекционные депо-формы на основе биodeградируемых полимерных носителей.....	18
1.4.1 Инъекционные депо-формы на основе PLGA микросфер	21
1.4.2 Инъекционные депо-формы на основе готовых имплантатов и имплантатов, формирующихся в месте введения (in situ)	23
1.5 Механизм высвобождения лекарственных веществ из депо-форм на основе PLGA.....	27
1.6 Инъекционные формы длительного действия в терапии инфекции вируса иммунодефицита человека.....	30
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Реактивы и расходные материалы	37
2.2 Оборудование	38
2.3 Получение PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринoм, с использованием микрофлюидной системы.....	39
2.4 Получение нанокристаллической формы рилпивирина.....	40
2.4.1 Получение суспензии нанокристаллов рилпивирина методом гомогенизации под давлением.....	40
2.4.2 Получение суспензии нанокристаллов рилпивирина методом ультразвуковой гомогенизации	40
2.4.3 Получение суспензии нанокристаллов рилпивирина методом механического диспергирования со стеклянными шариками.....	41
2.5 Получение полимерных растворов для формирования <i>in situ</i> имплантатов	41
2.6 Получение гидрогелевых фантомов	42
2.6.1 Получение полиакриламидных гелей	42
2.6.2 Получение агарозного геля и формирование в нем имплантата	42
2.7 Методы определения физико-химических характеристик исследуемых объектов.....	43
2.7.1 Определение молярного соотношения лактат:гликолят в PLGA методом капиллярного электрофореза.....	43
2.7.2 Определение молекулярной массы PLGA методом гель-проникающей хроматографии ...	44
2.7.3 Определение состава водорастворимой фракции PLGA методом ВЭЖХ-МС.....	44
2.7.4 Определение кислотного числа полимера	45

2.7.5	Определение температуры стеклования образцов.....	46
2.7.6	Определение размера микросфер и распределения по размерам.....	46
2.7.7	Определение содержания рилпивирин в PLGA микросферах и эффективности включения методом ВЭЖХ	47
2.7.8	Определение размеров нанокристаллов рилпивирин и распределения по размерам.....	48
2.7.9	Рентгенофазовый анализ полимеров и нанокристаллической формы рилпивирин	48
2.7.10	Определение модуля упругости гидрогелевых фантомов	49
2.7.11	Определение размера и структуры поверхности депо-форм рилпивирин с помощью сканирующей электронной микроскопии.....	49
2.8	Исследование скорости высвобождения рилпивирин <i>in vitro</i> из депо-форм	49
2.8.1	Изучение скорости высвобождения рилпивирин из PLGA микросфер, нагруженных рилпивирин, <i>in vitro</i>	50
2.8.2	Изучение скорости высвобождения рилпивирин из <i>in situ</i> имплантатов, нагруженных рилпивирин, <i>in vitro</i>	51
2.8.3	Изучение скорости растворения нанокристаллов рилпивирин <i>in vitro</i>	51
2.8.4	Изучение скорости высвобождения рилпивирин из <i>in situ</i> имплантатов с использованием гидрогелевого фантома.....	52
2.9	Изучение скорости гидролитической деградации PLGA микросфер и <i>in situ</i> имплантатов методом капиллярного электрофореза.....	53
2.10	Математическое описание кинетики высвобождения рилпивирин <i>in vitro</i>	53
2.11	Статистический анализ данных	54
	Глава 3 ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИЛАКТИДНЫХ ДЕПО-ФОРМ РИЛПИВИРИНА	55
3.1	Характеристика PLGA	55
3.2	Получение PLGA микросфер, нагруженных рилпивирин, с использованием микрофлюидной системы.....	57
3.2.1	Влияние типа и концентрации стабилизатора на характеристики PLGA микросфер, нагруженных рилпивирин.....	59
3.2.2	Влияние соотношения скоростей потоков водной и органической фаз на характеристики PLGA микросфер, нагруженных рилпивирин	61
3.2.3	Влияние концентрации PLGA на характеристики микросфер, нагруженных рилпивирин	63
3.2.4	Влияние содержания рилпивирин на характеристики PLGA микросфер	64
3.2.5	Получение PLGA микросфер, нагруженных рилпивирин.....	66
3.3	Получение составов для формирования <i>in situ</i> имплантатов, нагруженных рилпивирин .	69

Глава 4 ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЕЙ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ РИЛПИВИРИНА ИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДЕПО-ФОРМ.....	72
4.1 Разработка метода изучения скорости высвобождения рилпивирин из депо-форм	72
4.1.1 Оптимизация метода ВЭЖХ-анализа рилпивирин	73
4.1.2 Выбор состава модельной среды, имитирующей физиологические условия	75
4.1.3 Оценка стабильности рилпивирин в модельной среде	77
4.2 Изучение факторов, влияющих на профиль высвобождения рилпивирин, из полилактидных депо-форм <i>in vitro</i>	78
4.2.1 Высвобождение рилпивирин из PLGA микросфер.....	78
4.2.2 Высвобождение рилпивирин из PLGA <i>in situ</i> имплантатов.....	90
4.3 Оценка сопоставимости <i>in vitro</i> профилей высвобождения рилпивирин из полимерных депо-форм и растворения его референтной формы	104
4.3.1 Получение нанокристаллической формы рилпивирин.....	104
4.3.2 Профиль растворения нанокристаллической формы рилпивирин.....	110
4.3.3 Сравнение профилей высвобождения / растворения рилпивирин из депо-форм.....	111
4.4 Математическое описание скорости высвобождения рилпивирин из PLGA микросфер и имплантатов	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА (ТАБЛИЦЫ)	135
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА (РИСУНКИ).....	136
ПРИЛОЖЕНИЕ А	141

ВВЕДЕНИЕ

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 лекарств 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, в том числе и ее резистентных форм. 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 отличной альтернативной технологией. Отличительной особенностью этих форм является возможность контролируемого высвобождения ЛВ путем выбора полилактида с подходящими свойствами, а также их физико-химическая стабильность и отсутствие необходимости использования высоких концентраций поверхностно-активных веществ. 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, в свою очередь, предопределяются его химической структурой, площадью поверхности, формой и пр. Именно вследствие разнообразия параметров, соблюдение которых необходимо для решения фармакологической задачи, подходы к разработке 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 каботегравира, стабилизированных поверхностно-активными веществами. Использование инъекционных депо-

форм рилпивирин и каботегривира стало настоящей революцией в терапии людей, живущих с ВИЧ, и позволило сократить режим дозирования с ежедневного перорального применения в течение 365 дней до 6 инъекций в год [1]. В связи с таким успехом поиск новых альтернативных инъекционных 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 и патентов указаны только составы композиций без изучения взаимосвязи различных факторов со скоростью деградации полилактида и со скоростью высвобождения ЛВ, что является очень важным. 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 физико-химических характеристик полученных депо-форм проводили с применением следующих методов: оптическая микроскопия, динамическое светорассеивание, дифференциальная сканирующая калориметрия, рентгенофазовый анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез. Морфологию образцов и их структуру определяли с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Реологические свойства полимерных

растворов определяли с применением метода вискозиметрии. 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 исследования обеспечивается воспроизводимостью экспериментальных данных, а также статистической обработкой данных, применением стандартных методик аналитического контроля, а также современного оборудования для проведения экспериментальных работ.

Апробация результатов 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 Pharmaceuticals, 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.

Личный вклад автора. Автор непосредственно участвовал в планировании экспериментов и самостоятельно получил депо-формы рилпивиринна различных типов, определил их физико-химические параметры и изучил механизм высвобождения ЛВ. Автором лично проведены обработка, систематизация результатов, подготовка публикаций, написаны все разделы диссертационной работы. Совместно с научным руководителем и консультантом проанализированы и обобщены результаты, сформулированы выводы.

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

Благодарность. Автор выражает глубокую признательность и благодарность своему научному руководителю Гельпериной Светлане Эммануиловне, д.х.н., профессору кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов, руководителю научно-образовательной лаборатории систем доставки лекарственных веществ (НОЛ СДЛВ) РХТУ им. Д.И. Менделеева за общее руководство над диссертационной работой, всестороннюю помощь и поддержку в выполнении исследований.

Автор выражает особую благодарность своему научному консультанту Ермоленко Юлии Валерьевне, к.х.н., доценту кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов РХТУ им. Д.И. Менделеева, за неоценимую помощь в исследованиях и обсуждении экспериментальных данных, переданные знания, многочисленные советы и консультации, а также благодарность всему коллективу НОЛ СДЛВ РХТУ им. Д.И. Менделеева, в особенности, Осиповой Надежде Сергеевне за ценные советы, неоценимую поддержку и веру.

Автор выражает благодарность Куркину Александру Витальевичу, к.х.н., доценту, руководителю лаборатории органического синтеза кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза МГУ им. М.В. Ломоносова за предоставленную субстанцию рилпивиринна.

Автор выражает благодарность Трухану Владимиру Михайловичу, к.х.н., руководителю лаборатории органического синтеза Института трансляционной медицины и биотехнологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова за сотрудничество и возможность проведения исследований на микрофлюидной установке.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ на тему «Инъекционные депо-формы лекарственных веществ»

В данном обзоре рассмотрены основные типы инъекционных лекарственных форм длительного действия, которые нашли применение в клинической медицине. Особое внимание уделено инъекционным депо-формам на основе биodeградируемого сополимера молочной и гликолевой кислот. Освещены механизмы высвобождения лекарственных веществ из депо-форм на основе PLGA. Рассмотрены перспективы использования инъекционных форм длительного действия для терапии инфекции вируса иммунодефицита человека.

1.1 Инъекционные формы длительного действия

Поиск инновационных лекарственных препаратов для лечения хронических заболеваний без ущерба для безопасности и эффективности является сложной фармацевтической задачей. Несмотря на значительные успехи в исследовании новых лекарственных веществ, более 90% потенциальных фармакологически активных веществ, выявляемых с помощью скрининга, обладают низкой растворимостью в воде [2,3]. Как правило, при разработке препаратов на основе плохо растворимых в воде лекарственных веществ (ЛВ) возникают проблемы, связанные с низкой биодоступностью, коротким периодом полувыведения, большой вариабельностью *in vitro* / *in vivo* фармакокинетики. Низкая растворимость также ограничивает эффективность действия ЛВ, поэтому часто требуются высокие дозы препаратов для достижения терапевтических концентраций в плазме после перорального приема, и как следствие, появление нежелательных побочных эффектов. Кроме того, низкая растворимость ЛВ является препятствием для инъекционного внутривенного введения.

Важным шагом в решении вышеперечисленных ограничений стала концепция создания систем с контролируемым (замедленным) высвобождением ЛВ, возникшая в 50-60 годах XX века, благодаря развитию математических моделей для описания профилей высвобождения ЛВ из матричных систем, в том числе широко известная модель Хигучи [4]. Предложенная Хигучи модель позволила описать скорость высвобождения ЛВ из твердой матрицы носителя как процесс диффузии, основанный на законе Фика, но без учета деградации полимерной матрицы. Позднее Джуда Фолкман при исследовании искусственных клапанов сердца *in vitro* отметил, что силиконовый каучук (Silastic), из которого был изготовлен клапан, способен поглощать из

раствора определенные красители, а затем выделять эти красители обратно в приемную среду [5]. Фолкман предположил, что короткие герметичные сегменты силиконовой трубки, содержащие ЛВ, могут стать устройством для доставки лекарств с постоянной скоростью высвобождения. Он также показал, что скорость высвобождения ЛВ снижается по мере увеличения толщины трубки. Несмотря на то, что его исследование силиконовых трубок, нагруженных различными ЛВ, не показало эффективности при блокаде сердца, ввиду формирования вокруг места имплантации фиброзной капсулы, которая не пропускала ЛВ, его теория послужила началом исследований и разработок лекарственных форм с модифицированным высвобождением ЛВ.

Впоследствии первым успешным коммерческим препаратом с замедленным высвобождением стал Ocusert®, представляющий собой готовый имплантат на основе сополимера этилена и винилацетата (polyEVA), содержащий пилокарпин. Разработанный имплантат использовался для лечения глаукомы и высвобождал пилокарпин с постоянной скоростью в течение 1 недели. В то же время, на основе polyEVA были разработаны имплантаты с пролонгированным высвобождением прогестерона, используемые в качестве средств контрацепции [6]. Концепция контролируемого (замедленного) высвобождения ЛВ актуальна по сей день, особенно при лечении хронических заболеваний, таких как шизофрения, болезнь Альцгеймера, алкогольная зависимость, инфекция вируса иммунодефицита человека, где требуется длительное ежедневное лечение.

Согласно проведенному анализу литературы, инъекционная форма длительного действия или депо-форма представляет собой раствор, суспензию или имплантат для внутримышечного (в/м) или подкожного (п/к) введения, которые высвобождают действующее вещество непрерывно с контролируемой скоростью в диапазоне от нескольких дней до месяцев [7,8]. Помимо системного воздействия, которое ЛВ оказывает после всасывания и попадания в кровотоки при в/м или п/к введении депо-форм, высвобождение ЛВ также может происходить локально в случае введения депо-формы непосредственно в целевой орган или ткань (например, опухоль, сустав или глаз), что позволяет снизить системную токсичность. Например, пролонгированная форма паклитаксела Oncogel® на основе термочувствительного обратимого гидрогеля, состоящего из PLGA-PEG-PLGA, показала высокий противоопухолевый эффект в отношении модели глиосаркомы 9L у крыс как в монотерапии, так и в комбинации с темозоломидом и радиотерапией [9,10]. Термочувствительный гидрогель вводили в опухоль, после чего паклитаксел постепенно высвобождался из образующегося депо в течение шести недель и действовал локально в месте введения.

Одним из основных преимуществ инъекционных депо-форм ЛВ является улучшение терапевтической эффективности за счет поддержания концентрации ЛВ на постоянном

уровне в терапевтическом диапазоне, что также позволяет снизить побочные эффекты, возникающие при пероральном приеме препаратов (рисунок 1).

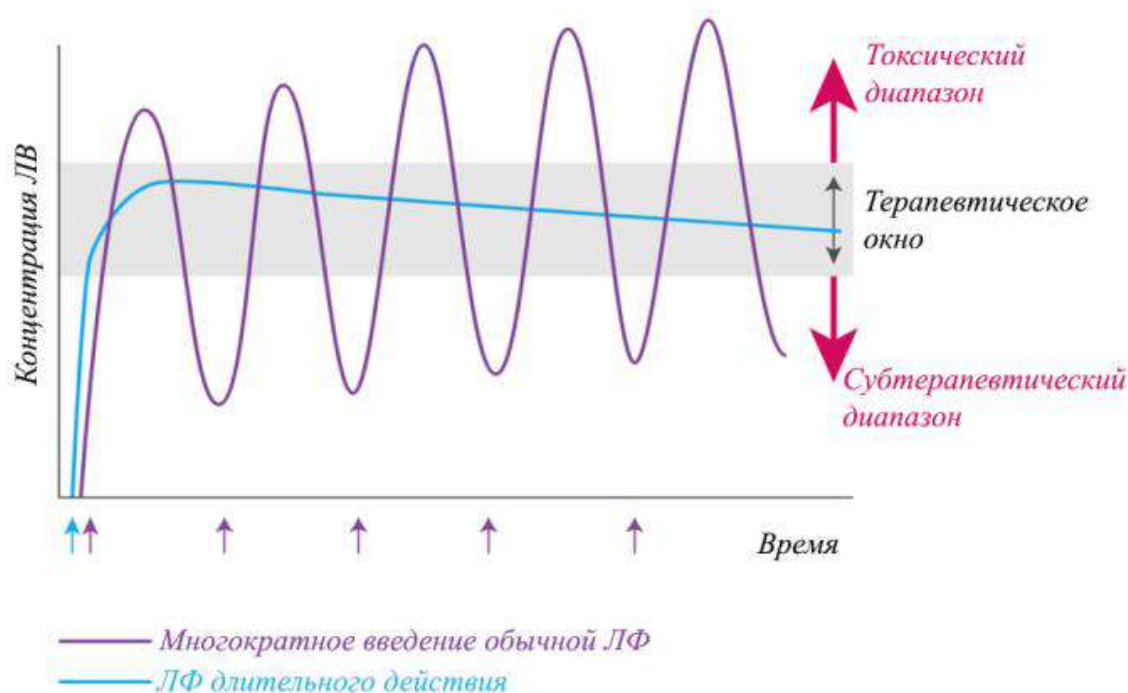


Рисунок 1 – Типичное изображение фармакокинетических профилей лекарственного вещества в плазме после многократного введения обычной лекарственной формы (ЛФ) (сиреневая линия) и однократного в/м введения системы пролонгированного высвобождения (голубая линия)

Применение инъекционных депо-форм также улучшает соблюдение пациентом режима лечения и приверженность к лечению вследствие уменьшения частоты дозирования. Тогда как увеличения продолжительности действия ЛВ обеспечивает дополнительное преимущество в сторону снижения общей дозы, необходимой для достижения терапевтического эффекта. Кроме того, инъекционные формы длительного действия повышают стабильность ЛВ в случае использования полимерного матрикса как резервуара, защищающего молекулу от внешнего воздействия, что также очень важно, поскольку при пероральном приеме ЛВ быстро метаболизируются и выводятся из организма [11].

За последние несколько десятилетий было разработано огромное количество инъекционных форм с замедленным высвобождением для медицинского применения: на основе масляных растворов липофильных (про)лекарств [12–14] и липосом [15–17], полимерных микро- и наночастиц [18,19], готовых имплантатов [20] и имплантатов, формирующихся в месте введения (то есть *in situ*) [21–23], суспензий кристаллов ЛВ [24]. Некоторые одобренные Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) лекарственные препараты приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Примеры инъекционных лекарственных препаратов длительного действия, одобренные для клинического применения [25,26]

Торговое наименование	Действующее вещество	Режим дозирования	Показания к применению	Дата одобрения FDA
<i>Масляные растворы</i>				
Delestrogen®	эстрадиола валерат	1 x 4 недели	гормональная терапия, менопауза	
HALDOL® Decanoate	галоперидола деканоат	1 x 1-6 недель	Шизофрения	1986
<i>Водные суспензии</i>				
Depo-Provera®	медроксипрогестерона ацетат	1 x 12 недель	Рак эндометрия, рак молочной железы	1960
Invega Sustenna®	палиперидона пальмитат	1 x 1 месяц	Шизофрения	2009
Zyprexa Relprevv®	оланзапин	1 x 2-4 недели	Шизофрения	2009
Cabenuva®	рилпивирин + каботегравир	1 x 1-2 месяца	ВИЧ-инфекция	2021
<i>Полимерные микросферы</i>				
Sandostatin LAR®	октреотида ацетат	1 x 2 недели	Акромегалия	1998
Risperdal® Consta®	рисперидон	1 x 12 недель	Шизофрения	2003
Vivitrol®	налтрексон	1 x 1 месяц	Алкогольная зависимость	2006
Lupron® Depot	лейпролерина ацетат	1 x 4 месяца, 3-6 недель	Рак простаты	1989
<i>Готовые имплантаты и имплантаты, формирующиеся in situ</i>				
Zoladex®	гозерилина ацетат	1 x 28 дней	Рак простаты	1997
Ozurdex™	дексаметазон	1 x 6 месяцев	Глаукома	2009
Atridox®	доксциклин гиклат	1 x 7 дней	Пародонтит	1998
Eligard®	лейпролерина ацетат	1 x 1, 3, 4, 6 месяцев	Рак простаты	2004

1.2 Инъекционные депо-формы на основе масляных растворов

Масляные растворы, содержащие растворенное или суспендированное ЛВ, были одними из первых пролонгированных форм для парентерального введения. Изначально масляные растворы использовались в гормональной терапии и в терапии нейродегенеративных расстройств (таблица 1). Галоперидола деканоат (Haldol® Decanoate), который является самым известным нейролептиком, широко используется для лечения шизофрении с момента его одобрения в 1967 году [27]. После в/м введения галоперидола деканоата в кунжутном масле его максимальная концентрация в плазме крови (C_{max}) наблюдалась на 7-й день, а период полувыведения ($T_{1/2}$) составлял около 3 недель по сравнению с его пероральной формой.

При создании депо-форм на основе масляных растворов основным ограничивающим фактором является возможная низкая растворимость ЛВ в масле. Поэтому чаще всего в качестве подхода для повышения липофильности ЛВ используют химическую модификацию соединений жирными кислотами (этерификация) [28, 29]. В большинстве случаев этерификация исходного ЛВ не только увеличивает его растворимость в масляной фазе, но также улучшает его распределение в жировых тканях организма, которые выступают как вторичное «депо» и могут еще больше замедлить скорость высвобождения ЛВ. Поскольку гидролиз сложноэфирной связи пролекарств осуществляется за счет действия ферментов, например, карбоксилэстераз, которые в основном присутствуют в крови, пролекарство может долго оставаться интактным в месте инъекции [30]. Следовательно, высвобождение ЛВ из депо-форм на масляной основе можно контролировать как скоростью гидролиза сложноэфирной связи, так и высвобождением ЛВ из вторичного «депо». Так, в работе [29] были синтезированы и исследованы сложные эфиры опиоидного анальгетика бупренорфина: пропионат, энантат и деканоат бупренорфина. Внутримышечная инъекция полученных пролекарств в кунжутном масле в дозе 0,6 мкмоль/кг с увеличением липофильности пролекарств привела к увеличению $T_{1/2}$ от 0,93 ч для немодифицированного бупренорфина до $19,47 \pm 1,47$, $28,27 \pm 1,89$ и $60,33 \pm 4,56$ ч для пропионата, этаноата и деканоата, соответственно. Полученные фармакокинетические зависимости также коррелировали с антиноцицептивным (обезболивающим) действием пролекарств: пропионат, энантат и деканоат бупренорфина оказывали более длительное действие, которое было в 6, 10 и 14 раз больше по сравнению с действием бупренорфина гидрохлорида (5 ч).

В последнее время крайне мало работ, посвященных созданию классических инъекционных депо-форм на основе масляных растворов [31]. Вероятно, ограниченное количество текущих клинических исследований в этой области может быть связано с

трудностями контролирования скорости высвобождения ЛВ. Вязкость растворов, липофильность пролекарств, коэффициент распределения ЛВ между тканевой жидкостью и масляной фазой, площадь поверхности образующегося масляного «депо» - все эти факторы могут оказывать существенное влияние на диффузию ЛВ из масляной фазы в тканевую жидкость, а значит, и на скорость высвобождения [32]. Кроме того, при в/м введении распространение масляного раствора может происходить вдоль мышечных волокон, что может привести к нежелательному увеличению площади контакта поверхности, и, следовательно, к неконтролируемому ускоренному высвобождению ЛВ. Еще одним ограничением является то, что парентеральные депо-формы на основе масляных растворов не могут обеспечивать пролонгированное высвобождение веществ в течение нескольких месяцев без дополнительной модификации ЛВ или включения ЛВ в другой носитель.

1.3 Инъекционные депо-формы на основе водных суспензий кристаллов

Нанокристаллические лекарственные формы представляют собой водные суспензии нанокристаллов ЛВ, стабилизированных поверхностно-активными веществами (ПАВ) [3,33]. Средний размер частиц в суспензии составляет, как правило, от 200 до 800 нм (рисунок 2). Уменьшение размера частиц от микронного до наноразмерного диапазона приводит к увеличению площади поверхности, за счет чего увеличивается степень и скорость растворения ЛВ. Так, например, при сравнении гранул итраконазола, состоящих из сокристаллов итраконазола и адипиновой кислоты размером ~800 нм, с капсулами Sporanox®, содержащими аморфный итраконазол, показано, что при pH 1 доля растворенного итраконазола из капсул Sporanox® составила 15% и 35% через 20 и 60 мин, соответственно, тогда как гранулы итраконазола, состоящие из сокристаллов полностью растворялись уже через 20 мин [34]. Кроме того, в исследовании M. Bisrat и C. Nyström [35] показано, что уменьшение размера кристаллов привело к уменьшению диффузионного пути ЛВ в результате снижения толщины гидродинамического пограничного слоя, и, таким образом, к более быстрому растворению частиц меньшего размера. Наносуспензия лютеина с размером нанокристаллов 429 нм, полученная методом гомогенизации под высоким давлением, показала 26-кратное увеличение растворимости при насыщении по сравнению с растворимостью крупнодисперсного порошка [36]. Помимо повышения растворимости ЛВ, такие наносуспензии можно использовать для создания на их основе депо-форм для внутримышечного или подкожного введения. В этом случае скорость растворения нанокристаллов будет зависеть от пути абсорбции ЛВ в месте введения [37]. При внутримышечном введении лимитирующими стадиями могут быть скорость диффузии ЛВ в тканевую жидкость и дальнейшее попадание вещества в системный кровоток.

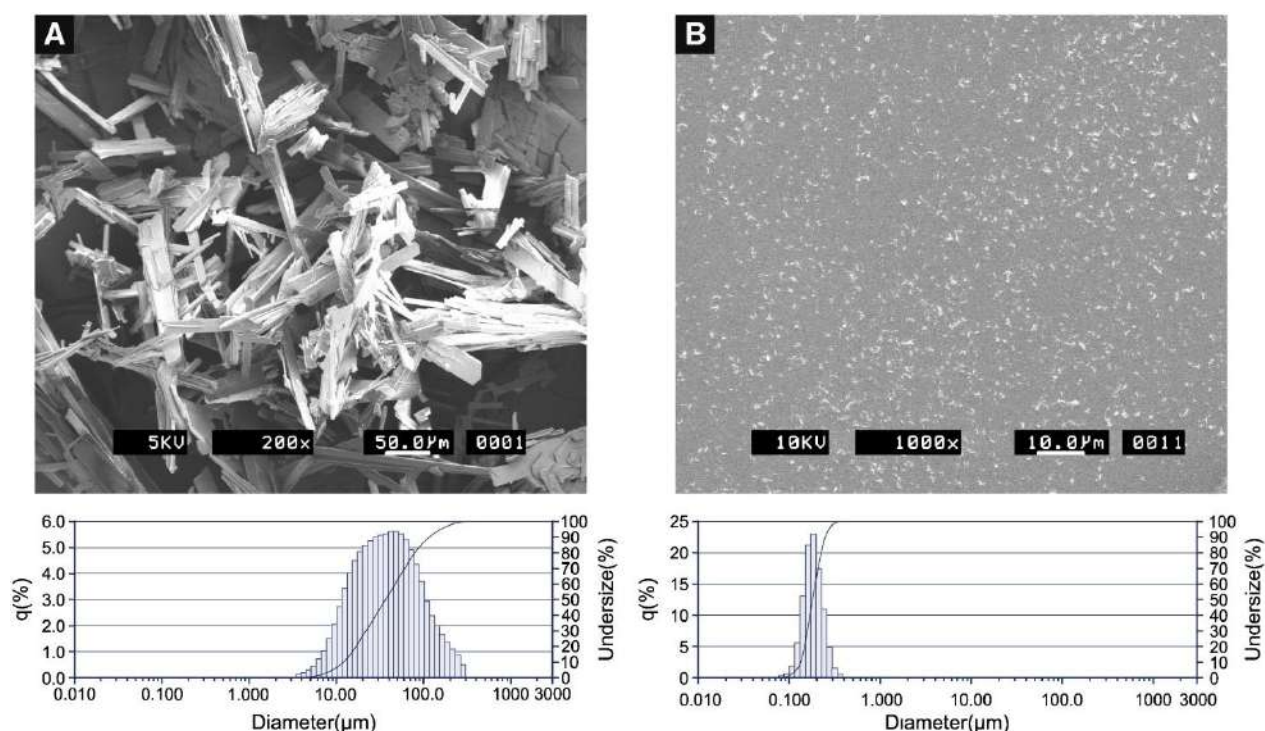


Рисунок 2 – СЭМ изображение частиц позаконазола, плохо растворимого в воде противогрибкового средства, до (слева) и после (справа) измельчения порошка субстанции с использованием технологии влажного помола. Также показаны кривые распределения частиц по размерам, полученные методом лазерной дифракции света: средний размер частиц до измельчения составлял ~ 53 мкм с широким распределением по размерам, после измельчения – $0,185$ мкм с узким распределением по размерам [38]

В отличие от микро- или макросуспензий, нанокристаллы значительно менее стабильны из-за дополнительного вклада свободной энергии Гиббса, связанной с большой площадью поверхности наночастиц, что объясняет их склонность к агломерации или агрегации [33]. Поэтому диспергированные в суспензии нанокристаллы необходимо стабилизировать с помощью низкомолекулярных или высокомолекулярных ПАВ. Например, Peng Liu и соавторы в своем исследовании [39] обнаружили, что амфифильные блок-сополимеры (полуксамеры 188 и 407) стабилизировали нанокристаллы более эффективно, чем низкомолекулярный ПАВ полисорбат 80: размер нанокристаллов индометацина и итраконазола, полученных методом мокрого помола, составил 340-370 нм для полуксамеров и 723 нм для полисорбата 80. Растворы различных полиэтиленгликолей, напротив, негативно повлияли на измельчение и стабильность нанокристаллов вследствие высокой вязкости раствора, которая создавала высокое внутреннее сопротивление движению частиц.

Примером создания инъекционной формы на основе микро- или нанокристаллов является препарат Zuprexa Relprevv® для лечения шизофрении. Препарат представляет собой

лиофилизат микрокристаллов оланзапина памоата, который перед инъекцией необходимо ресуспендировать в специальном буферном растворе. Главным механизмом абсорбции ЛВ в этом случае является медленная диссоциация соли оланзапина памоата на отдельные соединения: олананзапин и памовую кислоту [40]. Низкая скорость растворения соли при внутримышечном введении обеспечивает постепенное высвобождение оланзапина в кровоток, сохраняя концентрацию вещества на терапевтическом уровне, в течение 2–4 недель. Однако, наличие большого количества сосудов или капилляров рядом с местом введения может способствовать ускоренному растворению соли, что приводит к высоким уровням оланзапина в плазме крови, в результате чего у пациента может возникнуть постинъекционный делирий и/или седация [41].

Другим примером является препарат Invega Sustenna®, представляющий собой уже готовую водную суспензию нанокристаллов палиперидона пальмитата. В этом случае, увеличенная площадь поверхности нанокристаллов способствовала быстрому растворению и, следовательно, установлению равновесного состояния ЛВ в плазме крови за короткий период времени (терапевтический уровень палиперидона в плазме определялся с первого дня инъекции) [42]. Основным лимитирующим высвобождение палиперидона фактором является диффузия ЛВ в кровоток и дальнейший гидролиз сложноэфирной связи под действием ферментов. Исследования фармакокинетики инъекционной депо-формы палиперидона показали, что период полувыведения палиперидона составил от 25 до 49 дней при дозе от 39 до 234 мг, и от 84 до 139 дней в диапазоне доз от 273 до 819 мг [43]. Таким образом, длительный период полувыведения позволил снизить частоту дозирования с одного раза в день для пероральной формы до инъекции один или три раза в месяц.

Еще одним успешным примером является разработка комбинированного препарата Cabenuva® на основе нанокристаллов каботегравира (CAB-LA) и рилпивирина (RPV-LA), которая произвела революцию в современных методах лечения ВИЧ-инфекции. Обе инъекционные депо-формы представляют собой суспензию нанокристаллов ЛВ с размером частиц 200 нм [44]. Согласно результатам клинических исследований III фазы (ATLAS и FLAIR), в которых оценивалась эффективность инъекционных депо-форм каботегравира и рилпивирина у пациентов с ВИЧ-инфекцией, через 48 недель терапии схема, содержащая CAB-LA и RPV-LA, не уступала по эффективности комбинированной терапии, состоящей из трех препаратов (вирусная нагрузка находилась на неопределяемом уровне у 93% пациентов с ВИЧ) [45].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области получения и применения наносуспензий кристаллов ЛВ, существует ряд препятствий для их широкого применения в клинике, в основном связанных с технологическими аспектами их получения и стабильностью.

Например, одним из препятствий для стабилизации нанокристаллов является феномен рекристаллизации или, иными словами, созревание по Оствальду - явление, при котором более мелкие частицы растворяются и осаждаются на более крупных частицах для достижения термодинамически стабильного состояния за счет снижения отношения поверхности к площади [46]. Слишком высокое содержание стабилизатора в суспензии способствует рекристаллизации нанокристаллов как в процессе получения, так и при хранении. С другой стороны, слишком низкое содержание стабилизатора может привести к агломерации наночастиц. Еще одним недостатком нанокристаллических форм является возможность перехода ЛВ из кристаллического состояния в аморфное в процессе получения, а также переход из одного полиморфного состояния в другое под действием приложенного сдвига. Поэтому при разработке технологии получения нанокристаллов важно точно контролировать все перечисленные факторы.

1.4 Инъекционные депо-формы на основе биodeградируемых полимерных носителей

Еще одной перспективной и хорошо зарекомендовавшей себя фармацевтической технологией является создание депо-форм на основе полимерных материалов. Исследование полимеров в качестве носителей для депо-форм ЛВ началось с разработки имплантируемых устройств, состоящих из небiodeградируемого сополимера этилена и винилацета (polyEVA) или полиметилметакрилата [6]. Однако, данные системы имели несколько существенных недостатков: во-первых, большие размеры имплантатов доставляли неудобства при использовании, а во-вторых, существовала необходимость извлечения имплантата после полного высвобождения ЛВ. Позднее на смену небiorазлагаемым депо-формам пришли формы на основе бiorазлагаемых синтетических полимеров, в том числе полиэфиры. Выбор подходящего полимерного материала в качестве носителя ЛВ является первым шагом в процессе разработки лекарственной формы длительного действия. Физические, химические и биологические свойства полимеров, такие как биосовместимость и бiorазлагаемость (биodeградация), играют ключевую роль в характеристиках конечного продукта [47].

Сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) (рисунок 3) стал одним из наиболее часто используемых синтетических полимеров в фармацевтике. Сложные полиэфиры легко подвергаются деструкции вследствие гидролиза сложноэфирной связи. Продуктами биodeградации такого носителя являются естественные для живого организма вещества, которые включаются в метаболические циклы клеток. В данном случае это гликолевая и

молочная кислоты, которые, в конечном итоге, подвергаются в организме распаду до углекислого газа и воды и выводятся из организма дыхательной системой и с мочой [48].

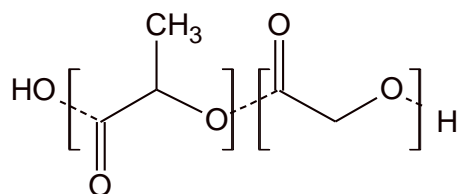


Рисунок 3 – Сополимер молочной и гликолевой кислот

Большое количество исследований свидетельствует об использовании этого полимера в качестве носителя ЛВ для систем с пролонгированным высвобождением ЛВ [49–53]. Благодаря своим хорошим механическим свойствам и возможности регулирования скорости деструкции PLGA путем варьирования состава полимера (молекулярной массы, соотношения мономерных звеньев молочной и гликолевой кислот, концевой группы), данный полимер стали часто использовать в тканевой инженерии [54,55]. Несмотря на более чем 60-летний прогресс в области контролируемой доставки лекарств, разработка инъекционных форм длительного действия идет медленно. С момента первого одобрения FDA препарата Lupron Depot® на основе PLGA в 1989 г., только 19 препаратов были выпущены в виде депо-форм с замедленным высвобождением (таблица 2). Тем не менее, депо-формы на основе PLGA занимают около 50% от всех одобренных инъекционных форм длительного действия [28].

Таблица 2 – Инъекционные лекарственные препараты длительного действия на основе PLGA, одобренные для клинического применения [56]

Торговое наименование	Действующее вещество	Лекарственная форма	Режим дозирования	Дозировка	Дата одобрения FDA
Lupron Depot®	лейпролида ацетат	микросферы	1,3,4,6 месяцев	7,5 мг/месяц	1989, 1996, 1997, 2011
Zoladex® Depot	гозерелина ацетат	твердый имплантат	1,3 месяца	3,6 мг/месяц	1989
Sandostatin® LAR	октреотида ацетат	микросферы	1 месяц	10–30 мг/месяц	1998
Atridox®	доксциклин гиклат	имплантаты <i>in situ</i>	1 неделя	42,5 мг/неделю	1998
Nutropin Depot®	соматотропин	микросферы	1 месяц	13,5 мг/месяц	1999
Trelstar®	трипторелина памоат	микросферы	1,3,6 месяцев	3,75 мг/месяц	2000, 2001, 2010

Продолжение таблицы 2

Торговое наименование	Действующее вещество	Лекарственная форма	Режим дозирования	Дозировка	Дата одобрения FDA
Somatuline® Depot	ланреотид	микросферы	1 месяц	60 мг/месяц	2000
Arestin®	миноциклин гидрохлорид	микросферы	2 недели	0,5 мг/неделю	2001
Eligard®	лейпролид	<i>in situ</i> имплантаты	1,3,4,6 месяцев	7,5 мг/месяц	2002
Risperidal® Consta	рисперидон	микросферы	2 недели	12,5 мг/неделю	2003
Vivitrol®	налтрексон	микросферы	1 месяц	380 мг/месяц	2006
Ozurdex®	дексаметазон	твердый имплантат	3 месяца	0,23 мг/месяц	2009
Propel®	мометазона фуоат	твердый имплантат	1 месяц	0,37 мг/месяц	2011
Bydureon®	эксенатид	микросферы	1 неделя	2,0 мг/неделю	2012
Lupaneta Pack™	лейпролида ацетат	микросферы	3 месяца	3,75 мг/месяц	2012
Signifor® LAR	пасиреотид	микросферы	1 месяц	20–60 мг/месяц	2014
Zilretta®	триамцинолон ацетоамид	микросферы	3 месяца	32 мг/3 месяца	2017
Sublocade™	бупренорфин	<i>in situ</i> имплантаты	1 месяц	100, 300 мг/мес.	2017
Perseris™	рисперидон	<i>in situ</i> имплантаты	1 месяц	90, 120 мг/мес.	2018

В литературе также описаны различные формы депо-препаратов на основе поли-ε-капролактона [57,58], однако биодegradация этого полимера происходит гораздо медленнее, чем у PLGA. Помимо синтетических полимеров, интерес исследователей привлекают и природные полимеры, например, белки или полисахариды, благодаря их низкой токсичности, высокой биосовместимости, низкой стоимости и хорошей растворимости в воде. Thakkar и соавторы сообщили об использовании альбуминовых микросфер, нагруженных целикоксибом, для лечения артрита суставов [59]. Полученные микросферы имели размер до 5 мкм. Исследование биораспределения микросфер целикоксиба при внутривенном введении показало, что концентрация целекоксиба в воспаленных суставах крыс была значительно выше, чем в невоспаленных. Кроме того, включение целекоксиба в альбуминовые микросферы позволило увеличить период полувыведения целекоксиба в 8 раз при внутривенном введении, по сравнению с его инъекционной формой, что позволило продлить высвобождение ЛВ до 6

дней. В другом исследовании [60], были получены хитозановые микросферы размером до 5 мкм, нагруженные рутином. Исследование противовоспалительной активности микросфер рутина на клеточной линии NCTC 2544 при активации воспалительного ответа бактериальным липополисахаридом показало, что рутин, загруженный в микросферы, в дозе 5 и 10 мкМ эффективнее ингибировал уровень маркеров воспаления (интерлейкина ИЛ-1 β и ИЛ-6) по сравнению со свободным рутином. При концентрации 5 мкМ рутин, загруженный в микросферы, снижал количество ИЛ-1 β до 61%, ИЛ-6 до 49%, при концентрации 10 мкМ – ИЛ-1 β до 27%, ИЛ-6 до 31% по сравнению с контролем.

Тем не менее, несмотря на превосходную биосовместимость природных полимеров, они обладают рядом недостатков, которые значительно ограничивают их применение для крупномасштабного производства. В отличие от полиэфиров, большинство природных полимеров гидролизуются под действием ферментов. Соответственно, их деградация *in vivo* будет зависеть от ферментативной активности, что может препятствовать достижению желаемой кинетики высвобождения ЛВ. Кроме того, эти полимеры гидрофильны по своей природе, и поэтому носители на их основе обладают довольно высокой скоростью высвобождения ЛВ из-за высокого притока воды после введения. Также следует отметить, что в случае использования полисахаридов, существенный недостаток заключается в высокой вариабельности состава полимеров от партии к партии, что осложняет стандартизацию лекарственных форм [47].

Поэтому далее, ввиду вышеперечисленных ограничений, будут рассмотрены основные типы депо-форм, получаемых из биodeградируемого и биосовместимого полимера PLGA.

1.4.1 Инъекционные депо-формы на основе PLGA микросфер

Полимерные микросферы (рисунок 4) представляют собой сплошные сферические частицы размером от 1 до 1000 мкм, в которых активный ингредиент может быть инкапсулирован внутри полимерного ядра частицы, адсорбирован на ее поверхности или конъюгирован с ней ковалентной связью [61]. В отличие от рассмотренных ранее инъекционных депо-форм на основе масляных растворов и суспензий кристаллов ЛВ, микросферы позволяют включать как гидрофобные, так и гидрофильные ЛВ. От физико-химических свойств активного ингредиента будет зависеть выбор технологического подхода для получения PLGA микросфер. Первым одобренным FDA препаратом на основе PLGA микросфер для внутримышечного введения был препарат Lupron Depot®, используемый для

лечения рака простаты. В клинике применяют несколько дозировок Lupron Depot®, содержащих различные количества лейпролида ацетата: 7,5, 22,5, 30 и 45, предназначенные для дозирования через 1, 3, 4 и 6 месяцев, соответственно. Другие одобренные препараты на основе PLGA микросфер показаны в таблице 2.

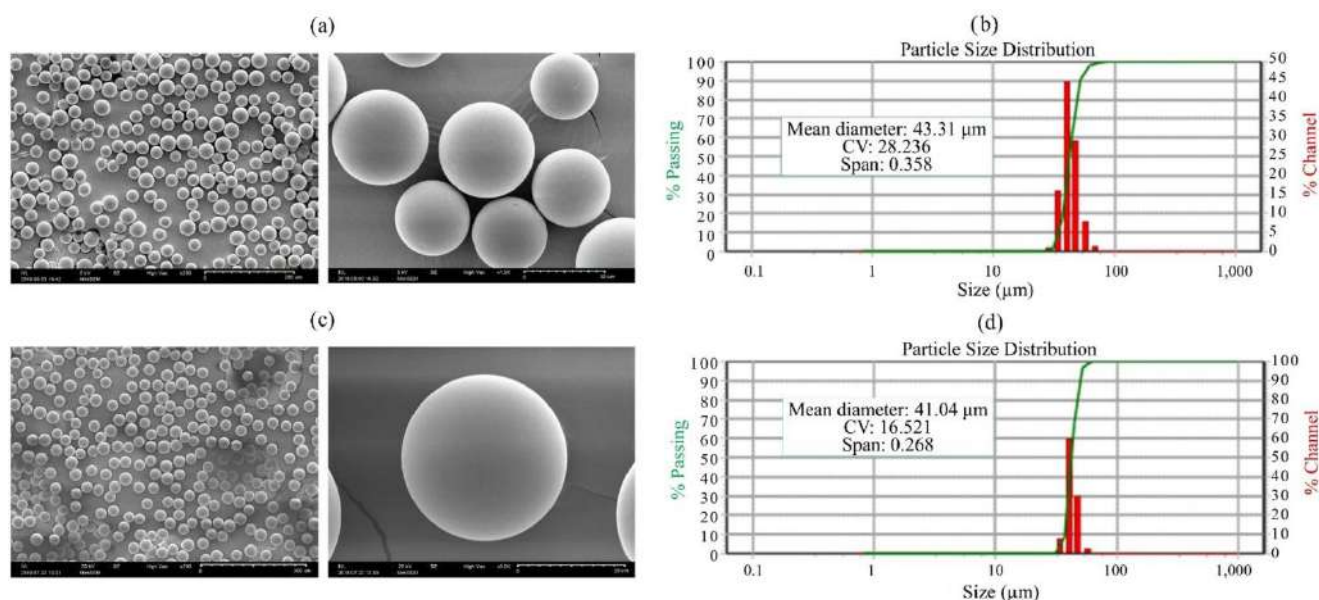


Рисунок 4 – СЭМ изображение PLGA микросфер, нагруженных ЛВ, полученных с использованием микрофлюидной системы: полученных из низкомолекулярного PLGA (0,16 – 0,24 дл/г, 50:50) (сверху); полученных из низкомолекулярного PLGA (0,16 – 0,24 дл/г, 75:25) (снизу); и распределение частиц по размерам [62]

Размер частиц и распределение по размерам являются важными показателями качества полимерных микросфер, которые необходимо учитывать при фармацевтической разработке, поскольку они влияют на площадь поверхности частиц, растворимость, биодоступность и профили высвобождения ЛВ [63]. Как правило, для использования PLGA микросфер в качестве инъекционных лекарственных форм рекомендуются частицы размером от 20 до 50 мкм. Это связано с тем, что частицы размером менее 10 мкм могут подвергаться фагоцитозу клетками иммунной системы, в то время как введение частиц диаметром более 70 мкм может быть болезненным или вызывать воспаление в месте инъекции [52,64]. В ряде работ также показано успешное использование микросфер меньшего размера для лечения внутриклеточных инфекций. Микросферы с размером менее 5 мкм способствуют избирательному транспорту антибиотика в очаг инфекции, то есть в альвеолярные макрофаги, и обеспечивают медленное и устойчивое высвобождение ЛВ в течение длительного времени [65–68]. В экспериментах *in vitro* на клеточных линиях макрофагов PLGA микросферы, нагруженные рифампицином, продемонстрировали высокую эффективность поглощения микросфер макрофагами. Кроме

того, поскольку крупные микросферы с трудом проходят через иглу, узкое распределение частиц по размерам позволяет использовать более тонкие иглы, тем самым снижая болезненные ощущения при введении. Следовательно, при разработке микросфер определенного размера также важен выбор технологического подхода. Традиционные технологии, в основе которых лежит эмульгирование, то есть получение простых O/W или двойных W/O/W эмульсий, обычно производят микросферы с относительно широким диапазоном размеров, что приводит к плохой инъекционной способности. Поэтому последние десятилетия большой интерес привлекают новые технологии, такие как мембранное эмульгирование или микрофлюидные технологии, позволяющие получать микросферы с узким распределением по размерам (коэффициент вариации (CV) < 10%) [18].

1.4.2 Инъекционные депо-формы на основе готовых имплантатов и имплантатов, формирующихся в месте введения (in situ)

Матричные имплантаты представляют собой твердые, жесткие полимерные структуры, как правило, цилиндрической формы длиной в несколько миллиметров и диаметром менее 1000 мкм [69]. Благодаря матричной структуре имплантаты обеспечивают контролируемое высвобождение ЛВ в течение длительного периода времени, составляющего месяцы или даже годы, в зависимости от типа полимера, используемого при их производстве. Основным путем введения таких имплантатов – подкожный, что требует использования иглы для подкожных инъекций или легкой хирургической операции. В то же время, матричные имплантаты также хорошо зарекомендовали себя в качестве систем для местной доставки ЛВ, например, при лечении заболеваний глаз [70]. Первые депо-формы с замедленным высвобождением ЛВ для лечения глаукомы были основаны на небиоразлагаемых полимерных материалах, таких как polyEVA [6]. Использование неразлагаемых полимеров привело к разработке резервуарных систем доставки, которые высвобождали ЛВ путем контролируемой диффузии через полимерную стенку имплантируемого устройства. Однако после полного высвобождения ЛВ в конце терапевтического периода пустой резервуар должен быть извлечен из организма, что накладывает некоторые неудобства в использовании таких систем, а также приводит к снижению результативности лечения. Поэтому последние несколько десятилетий особое внимание уделяется исследованиям в области создания биodeградируемых полимерных устройств [55,71–74]. Ряд препаратов на основе PLGA имплантатов уже одобрен для клинических применений (таблица 2).

Альтернативным подходом является разработка биodeградируемых композиций, которые способны образовывать имплантат в месте введения, то есть *in situ* (*in situ forming implants*, далее *in situ* имплантат) [75]. Впервые *in situ* имплантаты были описаны R.L. Dunn и соавторами в 1990 годах. Концепция заключается в приготовлении раствора из биоразлагаемого полимера и ЛВ в органическом растворителе. При введении этой системы в водную среду происходит осаждение полимера, в следствие диффузии органического растворителя в окружающие ткани, и образование депо-формы, удерживающей ЛВ в месте инъекции (рисунок 5). Так, первым одобренным FDA препаратом на основе *in situ* имплантата является препарат Atridox® для лечения пародонтита. Препарат получен по технологии Atrigel®, которая представляет собой систему с двумя шприцами: шприц А содержит 36,7% полимолочной кислоты, растворенной в N-метил-2-пирролидоне (NMP), шприц В содержит 50 мг доксицилина гиклата (эквивалентно 42,5 мг доксицилина). После смешивания шприцев, полученный раствор вводят в пародонтальный карман, где происходит инверсия фаз и раствор переходит в твердое депо [76]. Местное введение Atridox® позволило поддерживать концентрацию доксицилина в слюне и пародонтальном кармане на терапевтическом уровне в течение недели, что стало хорошей альтернативой хирургическим методам при лечении пародонтита.

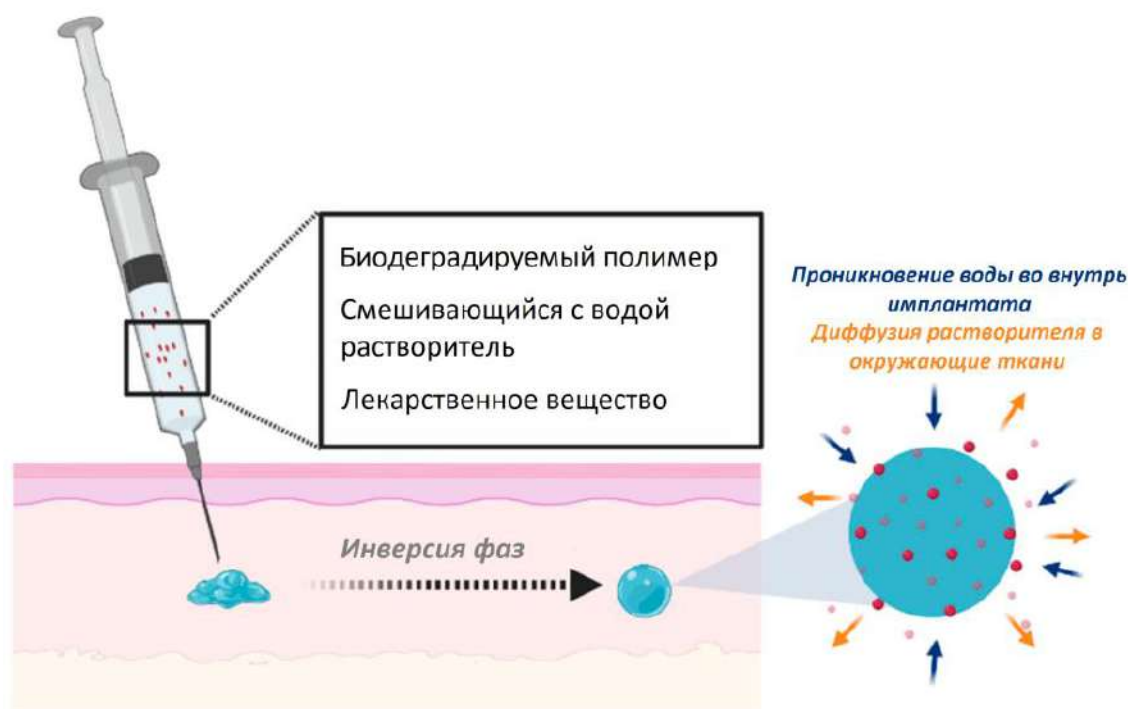


Рисунок 5 – Механизм формирования *in situ* имплантата [77]

Другим успешным препаратом является препарат для лечения рака предстательной железы Eligard®. Он также как и Atridox® состоит из двух шприцев, в одном из которых содержится PLGA в NMP, а в другом лиофилизат лейпролида ацетата. Клинические исследования показали, что Eligard® может поддерживать высвобождение лейпролида при внутримышечном введении в течение длительного периода (от 4 до 26 недель в зависимости от дозировки) с постоянной концентрацией лейпролида от 0,1–2 нг/мл для всех дозровок [28]. Тем не менее через 3–5 ч после введения Eligard® наблюдается резкое высвобождение лейпролида: от 25,3 нг/мл для 7,5 мг Eligard® до 150 нг/мл для 30 мг Eligard®. Такое резкое увеличение концентрации в крови, называемое бёрст-эффектом, является одним из нежелательных эффектов и главным недостатком *in situ* имплантатов.

Основным преимуществом *in situ* имплантатов перед другими полимерными депо-формами, такими как микросферы и готовые имплантаты, является простота технологии получения (небольшое количество стадий, простое и недорогое оборудование) и возможность быстрого и безболезненного введения через тонкие иглы и без использования микрохирургии [78]. Также, такие имплантаты, полученные по механизму диффузии растворителя в окружающие ткани, не требуют для формирования дополнительных воздействий, таких как температура, наличие ионов или изменение pH [78,79]. Кроме того, в случае возникновения воспалительной реакции или других побочных эффектов, имплантат можно легко извлечь, что нельзя сделать с нанокристаллами и микросферами.

Существует два механизма формирования *in situ* имплантатов: быстрая инверсия фаз и медленная. Скорость процесса определяется, прежде всего, скоростью диффузии органического растворителя и окружающей среды, а также их сродством друг к другу [78]. Поскольку полимерные растворы вводятся внутримышечно или подкожно, то в качестве окружающей/приемной среды выступает вода. Таким образом, механизм инверсии фаз зависит от физико-химических свойств растворителя.

Основной принцип фазовой инверсии заключается в том, что при введении полимерного раствора в водную среду происходит процесс взаимной диффузии органической и водной фаз, который приводит к осаждению полимера и формированию твердой полимерной матрицы - депо. В процессе диффузии концентрация полимера в месте введения растет, вследствие перехода растворителя в окружающую среду, и в определенный момент времени становится достаточно высокой для затвердевания [80,81]. В случае, если органический растворитель хорошо смешивается с водой (например, NMP или ДМСО), то при введении вязкого раствора в водную среду для инверсии фаз требуется небольшое количество воды. Следовательно, фазовая инверсия в этом случае протекает практически моментально (от секунд до минут). В начале процесса вокруг раствора образуется тонкая твердая полимерная оболочка, формирующая

барьер для диффузии воды, тогда как внутреннее ядро имплантата остается в виде гомогенной смеси полимера и растворителя [82]. Вода постепенно проникает во внутреннюю часть имплантата, инициируя дальнейшее разделение фаз и образование пор в затвердевающем полимере. Рост поры останавливается в результате затвердевания окружающей их фазы. Поскольку проникновение воды происходит быстро, то богатая полимером часть поры, расположенная близко к поверхности имплантата, будет затвердевать, в то время как часть, находящаяся ближе к ядру часть, будет более продолжительное время оставаться в виде раствора. В результате образуются «пальцеобразные» поры (Рисунок 6, а). Имплантаты, формирующиеся по механизму быстрой инверсии фаз, характеризуются высокой скоростью поглощения воды, образованием относительно твердых высокопористых полимерных матриц и высокой скоростью высвобождения ЛВ.

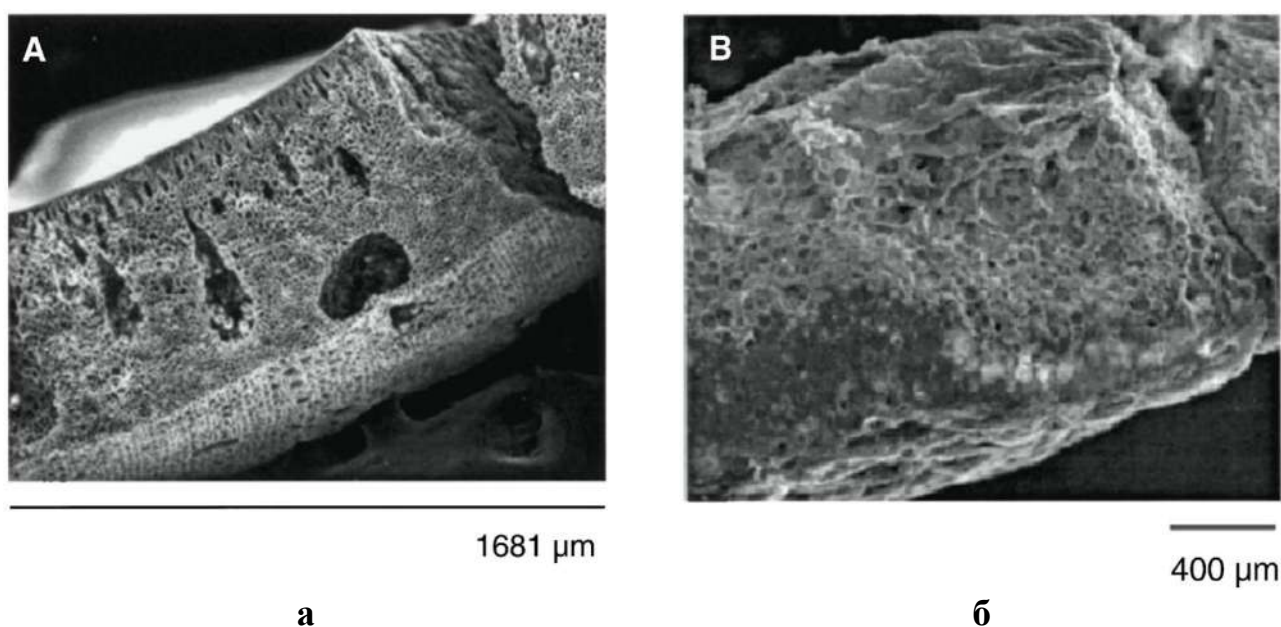


Рисунок 6 – СЭМ изображение внутренней структуры *in situ* имплантатов, сформированных по механизму быстрой (а) и медленной (б) инверсии фаз. Слева показан пример «пальцеобразных» пор (а), справа – «губчатых» пор (б). Имплантаты получали из 40 масс.% раствора PLGA (50:50, Mw 10 кДа) в NMP (а) или триацетине (б) [83]

При использовании плохо смешивающихся с водой растворителей (например, триацетина или бензилбензоата) процесс инверсии фаз происходит значительно медленнее и может длиться от нескольких дней до нескольких часов [82]. Вследствие снижения скорости диффузии растворителя процесс затвердевания внешнего слоя замедляется, а поры формируются быстрее, поскольку в обедненной полимерной фазе содержится меньше растворителя. Образующиеся имплантаты характеризуются меньшим количеством пор, низкой

скоростью высвобождения ЛВ, снижением начального неконтролируемого высвобождения ЛВ и «губчатой» морфологией внутренней структуры (Рисунок 6 б). Кроме того, имплантаты, формирующиеся по механизму медленной инверсии фаз, имеют ряд недостатков для применения в качестве лекарственных форм пролонгированного действия. Во-первых, использование гидрофобных растворителей приводит к образованию более вязких растворов, которые сложно вводить без предварительного эмульгирования или нагревания [79]. Во-вторых, гидрофобность растворителя может привести к сорбции белка на поверхности имплантата и, следовательно, к замедлению высвобождения ЛВ.

1.5 Механизм высвобождения лекарственных веществ из депо-форм на основе PLGA

Одной из основных целей фармацевтической разработки лекарственных форм длительного действия является создание носителей, обеспечивающих постепенное высвобождение ЛВ с постоянной скоростью в течение заданного периода времени. Инъекционные депо-формы на основе PLGA микросфер и имплантатов *in situ* с включенным ЛВ полностью отвечают этой задаче, благодаря возможности регулировать скорость высвобождения путем выбора полимера с нужными характеристиками [84]. Действительно, скорость высвобождения зависит от многих факторов, в том числе от состава (соотношение лактид : гликолид в сополимере), молекулярной массы, степени кристалличности полимера или структуры концевых групп. Таким образом, выбирая состав и молекулярную массу PLGA, можно регулировать скорость высвобождения ЛВ, обеспечивая необходимый фармакокинетический профиль.

Поскольку микросферы и имплантаты представляют собой матричные системы, то основным механизмом высвобождения ЛВ могут быть как диффузия ЛВ с поверхности или через образующиеся поры, так и гидролитическая деградация полимерной матрицы / эрозия [85]. Если поглощение воды матрицей носителя ЛВ происходит быстрее, чем скорость химического разрушения сложноэфирных связей полимера, то будет наблюдаться объемное разрушение, т.е. такое, при котором общий объем и форма носителя ЛВ остаются примерно постоянными, а свойства полимера (в первую очередь, молекулярная масса) изменяются однородно по всей полимерной матрице. Такой механизм получил название «объемная» деградация (рисунок 7). Именно он характерен для депо-форм на основе PLGA. На сегодняшний день известно большое число исследований как полилактидных микросфер [86–92], так и *in situ* имплантатов [78,93–98], которые посвящены изучению факторов, влияющих на

скорость высвобождения ЛВ и скорость деградации полилактидов. Однако из-за сложного механизма их гидролитической деградации и взаимосвязи свойств полимеров, полимер-ЛВ, ЛВ-ЛВ от которых также может зависеть гидролиз, не так просто выделить факторы, однозначно влияющие на процесс.

Объёмная эрозия

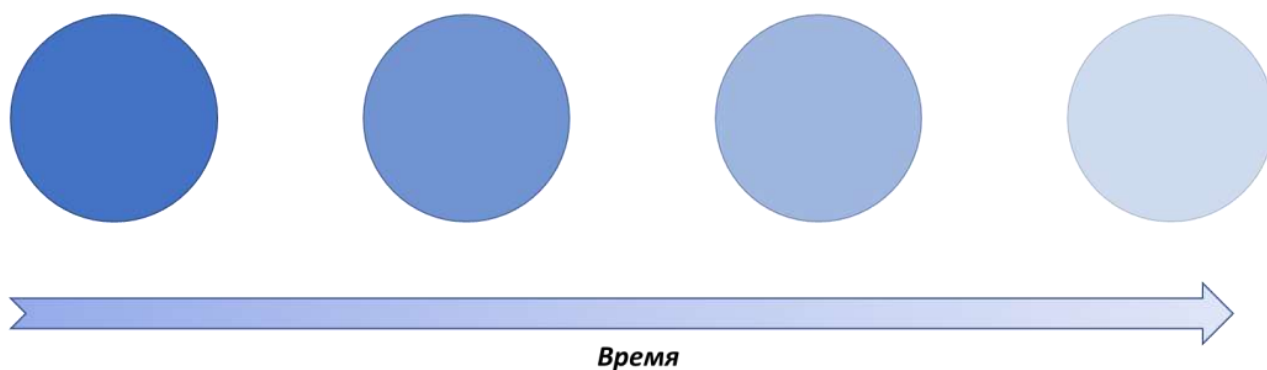


Рисунок 7 – Схема объёмной деградации полилактидной матрицы [84]

Понимание всех этих механизмов может способствовать, прежде всего, рациональному выбору полимера при фармацевтической разработке депо-формы. А возможность варьирования скорости высвобождения ЛВ из матрицы депо-формы ставит перед исследователями вопрос о том, как изменение профиля высвобождения ЛВ в условиях *in vitro* сказывается на фармакокинетическом профиле «концентрация в плазме – время», а именно какие различия *in vitro* приводят к значимым различиям *in vivo*.

Среди основных профилей высвобождения ЛВ из полилактидных депо-форм можно выделить четыре типа: монофазное (рисунок 8,а), импульсное двухфазное (рисунок 8,б), отсроченное двухфазное (рисунок 8,в), трехфазное (рисунок 8,г) высвобождение. Профиль высвобождения характеризует концентрацию ЛВ на каждой фазе этих процессов, его общее время и скорость.

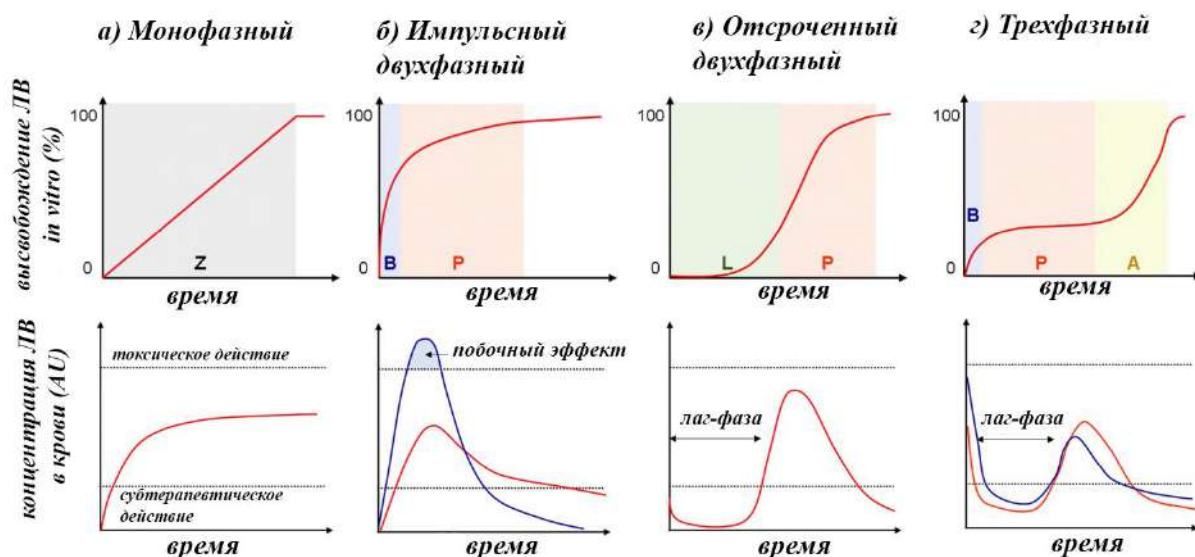


Рисунок 8 – Профили высвобождения ЛВ *in vitro* и *in vivo* для четырех различных высвобождений: а) монофазное, б) импульсное двухфазное, в) отсроченное двухфазное, г) трехфазное [99]

Существует 4 фазы высвобождения ЛВ. первая фаза - фаза немедленного высвобождения или бёрст-эффект (рисунок 8,б и г, синяя область (В)) характеризуется быстрым высвобождением ЛВ, связанным с переходом во внешнюю среду слабо удерживаемых веществ, сорбированных на поверхности или в приповерхностном слое. Часто это нежелательный эффект, поскольку он плохо поддается контролю и приводит к потенциальному проявлению токсического эффекта *in vivo*, а также к эффективному уменьшению дозы на следующих этапах. Такое немедленное высвобождение характерно для микросфер либо с очень широким распределением по размерам, либо небольшого размера [100], а также для *in situ* имплантатов, формирующихся по механизму быстрой инверсии фаз [79,101–103]. За этой начальной фазой резкого высвобождения часто следует следующая фаза, описываемая степенной зависимостью количества высвободившегося ЛВ от временем ($\Delta C \sim (\Delta t)^n$), где $n = 1/2$ для диффузии по Фику, и $1/2 < n < 1$ для остальных процессов, в которых может также участвовать деградация полимера (рисунок 8, красная область (P)) [104]. В случае, когда $n=1$, скорость высвобождения ЛВ становится постоянной (независимой от времени). Эта фаза высвобождения соответствует кинетике нулевого порядка (рисунок 8,а, серая область (Z)) и может длиться от нескольких дней до недель. В течение этого периода ЛВ постоянно высвобождается из полимерного депо посредством нефиковской диффузии. Также существует фаза ускоренного высвобождения (при $n > 1$) (рисунок 8,г, желтая область (A)), на которой высвобождение ЛВ ускоряется из-за деградации полимера, что в конечном итоге приводит к полному высвобождению ЛВ. Иногда для PLGA микросфер также характерна фаза отсроченного высвобождения или лаг-фаза

(рисунок 8,в, зеленая область (L)). Отсроченное высвобождение может происходить в том случае, когда PLGA микросферы имеют большой размер или покрыты дополнительными защитными слоями [105]. Так, например, применяемый препарат Risperidal® Consta для лечения шизофрении обладает фазой отсроченного высвобождения, поэтому перед введением этого препарата необходимо принимать пероральную форму рисперидона для создания терапевтических концентраций ЛВ в крови. Обычно, при разработке депо-формы желательно стремиться к монофазной кинетике высвобождения ЛВ (рисунок 8,а), поскольку изменение концентрации ЛВ в организме во времени полностью предсказуемо [106].

Анализ литературы показывает, что профиль высвобождения ЛВ можно модифицировать путем изменения свойств полимерной матрицы, например в результате изменения концентрации и молекулярной массы полимера [102,107] или введения дополнительных компонентов в том числе, гидрофобных растворителей (например, бензилбензоат, этилбензоат, триацетин) [108,109], ПАВ, полиэтиленгликоля различной молекулярной массы и пр. [101,110]. В случае микросфер, существенное влияние на профиль оказывает размер частиц и их распределение по размерам [86]. Кроме того, известно, что тип выбранного носителя также может влиять на фармакокинетику ЛВ. Так, D. Saltzstein и соавторы провели фармакокинетическое сравнение двух депо-форм лейпролида ацетата: PLGA микросферы (Lupron Depot®) и *in situ* имплантаты (Eligard®) [111]. Авторы установили, что максимальная концентрация лейпролида в плазме была выше при внутримышечном введении микросфер по сравнению с подкожным введением Eligard® (C_{max} 27±4.9 vs 19±8.0 нг/мл, соответственно), тогда как продолжительность действия была выше у Eligard® (56 vs 42 дня для Eligard® и Lupron Depot®, соответственно).

Таким образом, основная задача, связанная с разработкой полимерных депо-форм, как микросфер, так и имплантатов, заключается в поиске способов снижения фазы неконтролируемого высвобождения ЛВ и модификации профилей высвобождения ЛВ для соответствия кинетике нулевого порядка.

1.6 Инъекционные формы длительного действия в терапии инфекции вируса иммунодефицита человека

Важной областью применения инъекционных форм длительного действия является лечение инфекции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекция). ВИЧ-инфекция остается одной из глобальных проблем всемирного масштаба в связи с отсутствием терапии, способной

предотвратить распространение и полностью подавить развитие ВИЧ-инфекции. Согласно последним данным ЮНЭЙДС (Объединенной программы ООН по ВИЧ/СПИДу), на сегодняшний день около 37,7 млн человек во всем мире живут с ВИЧ, из них около 28,2 млн людей уже получают лечение в рамках антиретровирусной терапии [Информационный бюллетень – глобальная статистика по ВИЧ 2021; <https://www.unaids.org/ru>]. Тем не менее за 2020 год число новых случаев заражения ВИЧ-инфекцией составило 1,5 млн человек и почти 0,7 млн человек умерли от ВИЧ и сопутствующих СПИДу болезней.

Хотя высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) достигла больших успехов в борьбе с эпидемией ВИЧ, превратив ВИЧ-инфекцию из неизлечимой болезни в управляемое хроническое заболевание [112], эффективность ВААРТ значительно снизилась из-за появления перекрестно-резистентных штаммов ВИЧ-1 и наличия в организме резервуаров инфекции [113]. Кроме того, в случае прекращения противовирусной терапии ВИЧ возобновляет репликацию, что впоследствии приводит к конечной стадии развития вируса - СПИДу. В связи с этим лечение приходится продолжать на протяжении всей жизни, что часто сопряжено с низкой приверженностью пациентов при длительном применении комбинированных препаратов и появлением побочных эффектов [114]. Таким образом, поиск стратегий разработки новых лекарственных препаратов против ВИЧ-инфекции, обладающих повышенной эффективностью, безопасностью, улучшенными фармакокинетическими свойствами и уменьшенными побочными эффектами весьма актуальна как с медицинской, так и с экономической точки зрения.

Обратная транскриптаза (ОТ) является важнейшим полифункциональным ферментом и играет решающую роль в репликации ВИЧ, поскольку отвечает за превращение вирусного генома одноцепочечной РНК в двухцепочечную ДНК, которая впоследствии включается в ДНК инфицированной клетки-хозяина [115]. Поэтому основу ВААРТ составляют ингибиторы ОТ двух видов – нуклеозидные (НИОТ) и нунуклеозидные (ННИОТ). НИОТ прерывают синтез вирусной цепи ДНК посредством конкурентного ингибирования ОТ, поскольку соединения этого класса структурно аналогичны эндогенным нуклеотидам. Тогда как ННИОТ ингибируют фермент, занимая индуцированный аллостерический сайт связывания, который очень близок к активному сайту, и поэтому ННИОТ являются более эффективными, чем НИОТ [116]. По сравнению с НИОТ, ННИОТ также не требуют внутриклеточной модификации для проявления активности против ВИЧ из-за своей низкой цитотоксичности, высокой специфичности и активности. ННИОТ занимают важное место в лечении ВИЧ-1-инфекции. На сегодняшний день существует 6 ННИОТ, одобренных FDA: первого (невирапин, делавирдин, эфавиренз) и второго (этравирин, рилпивирин, доравирин) поколения (Рисунок 9).

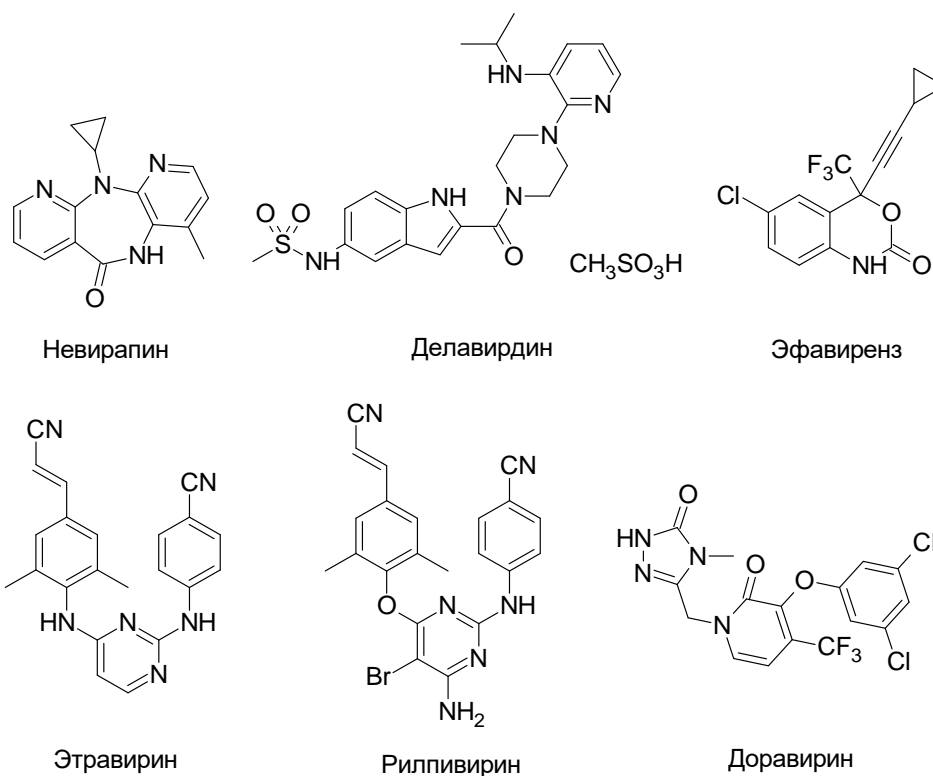


Рисунок 9 – Структуры ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, одобренные FDA

Появление устойчивых штаммов вируса ВИЧ является серьезной проблемой, ограничивающей использование всех ретровирусных лекарственных препаратов. Возникающая перекрестная резистентность среди одобренных препаратов значительно ограничивает использование ННИОТ, что побуждает исследователей к разработке новых подходов к созданию антиретровирусных препаратов, которые снижают перекрестную резистентность и эффективны против клинически значимых мутантных штаммов, обладают улучшенными профилями побочных эффектов и улучшенными характеристиками, влияющими на соблюдение режима лечения.

Так, совсем недавно препарат Cabenuva® - комбинация депо-форм антиретровирусных агентов каботегавира и рилпивирин получил одобрение FDA и EMA (2021) и Министерства здравоохранения Канады (2020). Данный подход позволил сократить кратность дозирования с ежедневного перорального применения до шести внутримышечных инъекций в год, что стало настоящей революцией в терапии людей, живущих с ВИЧ [1]. Одобренная депо-форма является бесполимерной нанокристаллической формой для внутримышечного введения. Фармакокинетическое исследование Cabenuva® по сравнению с пероральным приемом рилпивирин и каботегавира продемонстрировало увеличение кажущегося периода полувыведения $T_{1/2}$ каботегавира и рилпивирин, от 41 и 45 часов до примерно 8,5 и 20,5 недель, соответственно, хотя и со значительной межиндивидуальной вариабельностью [117].

Согласно результатам клинических исследований III фазы (ATLAS и FLAIR), в которых оценивалась эффективность инъекционных депо-форм каботегравира и рилпивирин у пациентов с ВИЧ-инфекцией, через 48 недель терапии схема, содержащая CAB-LA и RPV-LA, не уступала по эффективности комбинированной терапии, состоящей из трех препаратов (вирусная нагрузка находилась на неопределяемом уровне у 93% пациентов с ВИЧ) [45]. Следует также принять во внимание тот факт, что при внутримышечном введении CAB-LA и RPV-LA обе формы имеют длинный фармакокинетический «хвост» [118,119]. Во время этого длительного периода концентрации ЛВ в плазме снижаются, достигая субтерапевтических концентраций, что приводит к риску восстановления репликации вируса вместе с появлением лекарственно-устойчивых штаммов после прекращения лечения. В фармакокинетическом исследовании однократной дозы нанокристаллов рилпивирин пролонгированного действия у здоровых добровольцев рилпивирин обнаруживался в плазме крови через 84 дня после введения дозы. В клиническом исследовании RPV-LA для доконтактной профилактики ВИЧ-инфекции (исследование SSAT040), сообщается о случае одного участника, заразившегося ВИЧ-инфекцией в результате незащищенного полового акта через 41 день после однократной внутримышечной инъекции 300 мг рилпивирин [120]. Этот случай подчеркивает необходимость безопасной стратегии прекращения приема антиретровирусных препаратов длительного действия.

Еще одним из ограничений, которое может препятствовать широкому распространению препарата Cabenuva®, является довольно большой объем двух суспензий, которые в настоящее время необходимо медленно вводить внутримышечно по 3 мл каждой при первом введении, затем по 2 мл при последующих. Введение больших объемов при попытке увеличить интервал дозирования, вероятно, может привести к непереносимой боли и снижению приемлемости для пациента. Эту проблему можно преодолеть за счет создания пролекарств каботегравира [121,122] и рилпивирин [123] с улучшенными фармакокинетическими профилями. В исследовании Tian Zhou и соавторов [122] было получено пролекарство каботегравира путем его этерификации стеариновой кислотой, которое медленно гидролизует эстеразами в физиологических условиях с образованием каботегравира. Исследование фармакокинетики пролекарства каботегравира у мышей и макаков резус на 231-й день показало сохранение уровня концентрации CAB в плазме (170,8 нг/мл) выше RA-IC90 (откорректированная по связыванию с белком концентрация, ингибирующая репликацию 90% вирусов), а также увеличение $T_{1/2}$ до 131 дня. Аналогичным образом было получено пролекарство рилпивирин в виде N-ацилоксиалкильного производного. После однократной внутримышечной инъекции мышам пролекарство рилпивирин поддерживало концентрации свободного рилпивирин в плазме выше RA-IC90 в течение 25 недель [123]. Таким образом, изменение физико-химических и

фармакокинетических свойств посредством химической модификации структуры, способствующей повышению липофильности, может улучшить распределение в тканях, клеточное поглощение и удерживание в макрофагах [121]. Однако, поскольку оба этих пролекарства зависят от активности эстеразы для получения их активной формы, межиндивидуальные различия в ферментативной активности могут влиять на уровни активного лекарства и, следовательно, на терапевтические результаты.

Еще одной альтернативой суспензии нанокристаллов могут стать пластыри на основе микроигл, сформированных из нанокристаллов рилпивирин [124]. В исследованиях фармакокинетики у крыс средняя концентрация рилпивирин в плазме на 7-й день составляла 431 нг/мл и была примерно в десять раз выше, чем минимальная концентрация, наблюдаемая после однократной дозы RPV-LA. Интересно, что средняя концентрация рилпивирин в плазме в конце эксперимента через 56 дней ($118,9 \pm 54,2$ нг/мл) была эквивалента концентрации рилпивирин при внутримышечном введении RPV-LA. Таким образом, пластыри с микроиглами могут расширить доступ к лечению ВИЧ-инфекции и повысить приверженность пациентов в условиях ограниченного доступа к специально-обученному персоналу. Тем не менее, наноразмерные формы на основе нанокристаллов, обладают рядом недостатков, свойственным любым водным наносуспензиям ЛВ. Поэтому альтернативные стратегии, такие как внутримышечное введение полимерных микросфер, а также использование полимерных имплантатов, являются многообещающими.

Успешное использование полимерных имплантатов для увеличения продолжительности действия показано в ряде работ для тенофовира алафенамида [125–127]. Авторами [128] был разработан подкожный имплантат позволяющий высвободить тенофовира алафенамид в течение месяца. Имплантат представляет собой силиконовую трубку с отверстиями, внутрь которой утрамбован тенафовира алафенамид. Профиль высвобождения *in vitro* и *in vivo* соответствует кинетике нулевого порядка. В другом исследовании масляный раствор тенафовира алафенамида был загружен в трубку из биоразлагаемого полимера поли-ε-капролактона [126]. Исследование высвобождения *in vitro* показало линейную зависимость между суточной скоростью высвобождения и площадью поверхности имплантата: с увеличением толщины стенки от 45 до 200 мкм, скоростью высвобождения снижалась от 0,91 до 0,15 мг/день, соответственно. Так, было достигнуто устойчивое высвобождение тенофовира алафенамида в дозе $0,28 \pm 0,06$ мг/день в течение 180 дней *in vitro*. Аналогичный подход был применен для создания готовых имплантатов, содержащих либо суспензию нанокристаллов рилпивирин, либо микро- и наночастицы на основе PLGA с инкапсулированным рилпивирин. Например, в международном патенте [129] описана лекарственная форма на основе готового имплантата, состоящего из биосовместимого и биоразлагаемого полимера

PLGA, рилпивирин и одной или нескольких добавок, усиливающих высвобождение (полоксамеры, полисорбаты или сочетание диметилсульфоксида (ДМСО) и поливинилпирроллидона (ПВП)). При исследовании фармакокинетики у собак и крыс показано, что PLGA имплантаты, не содержащие в своем составе вспомогательных веществ, высвобождали рилпивирин в соответствии с отсроченным двухфазным профилем: длительность лаг-фазы составила от 7 до 21 дня. Напротив, имплантаты, в составе которых присутствовал полоксамер, показали отсутствие фазы отсроченного высвобождения. В другом патенте [130] предложена депо-форма рилпивирин на основе биоразлагаемого имплантата, которая представляет собой перфорированную трубку, содержащую микрочастицы с инкупсулированным рилпивирин. Диаметр отверстий в трубке (1-100 мкм) не позволяет пройти через них 85 масс.% микрочастиц, за счет этого обеспечивается замедленное высвобождение рилпивирин из депо-формы. Более того, для повышения растворимости рилпивирин и ускорения диффузии рилпивирин в окружающие ткани микрочастицы вводили внутрь трубки в составе полиакрилового гидрогеля с рН 2-3. Стоит принять во внимание, что дополнительное закисление среды может привести к ускоренному неконтролируемому высвобождению и возникновению в месте инъекции воспалительных реакций. Однако, при исследовании профилей высвобождения рилпивирин из полученных имплантатов *in vitro* было установлено крайне медленное высвобождение рилпивирин, тогда как в экспериментах *in vivo* в течение 35 дней концентрация рилпивирин в плазме крыс колебалась на уровне нижнего предела обнаружения, равного 0,4 нг/мл. Таким образом, все запатентованные технологии получения депо-форм рилпивирин на основе готовых имплантатов обладали отсроченным высвобождением рилпивирин до 21 дня, что является неудовлетворительным для применения в клинических исследованиях. Кроме того, твердые имплантаты изготавливают путем экструзии из расплава, литья под давлением или компрессионного формования, что требует высоких температур и усилий сдвига, или использования подкисленных гидрогелей в процессе изготовления. Все перечисленные выше недостатки могут привести как к возникновению сложностей при фармацевтической разработке депо-формы и ее хранении, так и возникновению у пациентов нежелательных побочных эффектов.

Депо-формы рилпивирин на основе *in situ* имплантатов могут стать хорошей альтернативой нанокристаллической форме и твердым имплантатам благодаря ряду преимуществ, в том числе: возможность варьирования интервалов дозирования путем изменения состава матрицы имплантата, обеспечение стабильности составов, относительно простая технология получения, менее инвазивная процедура введения и возможность извлечения имплантата в случае возникновения побочных реакций в месте инъекции [25,75]. Авторами [20,131] были получены *in situ* имплантаты на основе PLGA, нагруженные

рилпивирином и/или долутегравиром. Во-первых, они показали, что имплантаты хорошо переносились, и у мышей не возникало никаких признаков явной токсичности, изменений в поведении или потери веса. А во-вторых, было показано, что при однократном введении имплантаты обеспечивают концентрацию рилпивирин в плазме в течение 180 дней превышающую в несколько раз RA-IC90, которая для рилпивирин составляет 12 нг/мл [132]. Однако, исследований, посвященных влиянию различных факторов на механизм высвобождения рилпивирин и профилей гидролитической деградации микросфер и имплантатов, нагруженных рилпивирин, в литературе нет.

Таким образом, создание инъекционных форм антиретровирусных препаратов пролонгированного действия на основе биodeградируемых полимерных носителей, а также управление кинетикой высвобождения ЛВ путем регулирования свойств полимерной матрицы носителя представляется весьма актуальной, но сложной задачей.

Целью настоящего исследования явилась разработка подходов к созданию инъекционных форм длительного действия на основе PLGA микросфер и имплантатов, формирующихся в месте введения (*in situ*) антиретровирусного агента рилпивирин. Рилпивирин отличается низкой растворимостью в воде и высокой кишечной проницаемостью (II класс в соответствии с биофармацевтической классификацией [133]), и в то же время имеет низкую терапевтическую дозу (100 нг/мл) [24], что обуславливает возможность разработки технологии получения инъекционной формы, обеспечивающей длительное (1 месяц и более) равномерное высвобождение рилпивирин для постоянного поддержания концентрации в диапазоне терапевтического окна. Для решения поставленной цели необходимо выявление факторов, обеспечивающих возможность получения микросфер и *in situ* имплантатов на основе PLGA с заранее заданным профилем высвобождения из них рилпивирин *in vitro*. Анализ литературных данных показал актуальность поставленной цели и перспективность выбранного направления.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реактивы и расходные материалы

Для получения полимерных микросфер и *in situ* имплантатов, а также нанокристаллов использовали: рилпивирин (синтезирован по известной методике [134] лабораторией органического синтеза кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза МГУ им. М.В. Ломоносова); сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA) с соотношением мономерных звеньев лактид : гликолид 75:25 со сложноэфирными концевыми группами, в том числе Resomer® RG 752S с характеристической вязкостью 0,17 дл/г, Resomer® RG 755S с характеристической вязкостью 0,58 дл/г, Resomer® RG 756S с характеристической вязкостью 0,91 дл/г (предоставлены Evonik Röhm GmbH, Германия), сополимеры молочной и гликолевой кислот с соотношением мономерных звеньев лактид : гликолид 50:50 со сложноэфирными концевыми группами, в том числе Resomer® RG 502 с характеристической вязкостью 0,19 дл/г (Evonik Röhm GmbH, Германия), Purasorb PDLG 5004 с характеристической вязкостью 0,41 дл/г (Purac Biochem bv, Нидерланды), сополимеры молочной и гликолевой кислот с соотношением мономерных звеньев лактид : гликолид 50:50 с карбоксильными концевыми группами, в том числе Purasorb PDLG 5004A с характеристической вязкостью 0,38 дл/г (Purac Biochem bv, Нидерланды); поливиниловый спирт (ПВС, 9–10 кДа, степень гидролиза 80%, Sigma, Германия); поливиниловый спирт (ПВС, 9–10 кДа, степень гидролиза 80%, Sigma, Германия), полуксамер 188 и полуксамер 338 (Kolliphor® P188 и P338, BASF, Германия), додецилсульфат натрия (СДС, Sigma, Германия), Твин 80 (Sigma, Германия); органические растворители, в том числе этилацетат, дихлорметан, соответствовали квалификации ч.д.а., диметилсульфоксид (ДМСО, PanReac Applichem, Испания), N-метил-2-пирролидон (NMP, чистота $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, США). В качестве криопротекторов и стабилизаторов в процессе лиофилизации использовали: D-маннит, D(+)-трегалоза дигидрат (Диаэм, Россия); поливинилпирролидон (ПВП, 10 кДа, Sigma-Aldrich, США).

Для изучения скорости высвобождения и скорости растворения *in vitro* использовали буферные растворы, приготовленные из: таблеток PBS (MP Biomedicals, LLC, США), натрия ацетата безводного (Химмед, Россия), (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES, 1 М, pH 7,0-7,6, Sigma-Aldrich, США), 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES, Sigma-Aldrich, США). Для увеличения растворимости рилпивирин использовали Твин 20 (PanReac Applichem, Испания).

Для получения гидрогелевых фантомов использовали: акриламид (AAm, Acros Organics, Бельгия), N,N'-метиленабисакриламид (MBA, Acros Organics, Бельгия), персульфат аммония

(APS, Applichem, Германия), тетраметилэтилендиамин (TEMED, Sigma-Aldrich, США), агароза (34.5–37.5 °C, Sigma-Aldrich, США).

Для ВЭЖХ анализа использовали: ацетонитрил (HPLC grade, Chem-lab, Бельгия), трифторуксусную кислоту (ТФУ, 99%, Кемстор, Россия). В качестве стандарта использовали рилпивирин (Carbosynth, Великобритания).

Для приготовления растворов ведущих электролитов для КЭ использовали: бензойную кислоту (99%, Sigma-Aldrich, США); диэтаноламин (Sigma-Aldrich, США); гидроксид цетилтриметиламмония, 10% водный раствор (Люмэкс, Россия). Стандартные растворы для построения калибровки готовили из лактата лития (95%, Sigma-Aldrich, США) и гликолевой кислоты (Sigma-Aldrich, США). Пики анионов на электрофореграмме идентифицировали с использованием солей гликолята натрия и лактата лития (Sigma-Aldrich, США), карбоната натрия (Химмед, Россия); ацетата натрия, дигидрата гидрофосфата натрия, хлорида натрия (Panreac, Испания).

2.2 Оборудование

Исследования были выполнены на базе научно-образовательной лаборатории систем доставки лекарственных веществ ФГБОУ ВО «РХТУ им. Д.И. Менделеева» и Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России.

В работе использовали следующее оборудование: электронные аналитические весы Sartorius Quintix215D-1ORU (Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Германия), pH-метр OHAUS Starter ST2100-E (OHAUS, США), диспергатор Ultra-Turrax T18 Basic (IKA Werke GmbH, Германия), ультразвуковой гомогенизатор мощностью 70 Вт SONOPULS HD 2070 (Bandelin, Германия), гомогенизатор высокого давления Microfluidizer LM10 (Microfluidics, США), микрофлюидная система (Dolomite Microfluidics, Великобритания), ротационный испаритель Hei-VAP Core (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия), анализатор размеров наночастиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания), лиофильная сушка Alpha Christ 1-6 (Martin Christ GmbH, Германия), центрифуга 5804R (Eppendorf, Германия), центрифуга MiniSpin® (Eppendorf, Германия), шейкер-инкубатор KS 4000 i control (IKA Werke GmbH, Германия), центрифуга Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, США), вортекс-шейкер Reax top (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия), ультразвуковая ванна Elmasonic S30 (Elma, Германия), магнитная мешалка MULTI-HS 6/15 Digital (VELP Scientifica,

Италия), система очистки воды Milli-Q (Merck Millipore, Германия); система капиллярного электрофореза Капель 105М (Люмэкс, Россия) с программным обеспечением Эльфоран® (Люмэкс, Россия); высокоэффективный жидкостной хроматограф LC-2030C 3D Plus (Shimadzu, Япония), оснащенный диодно-матричным детектором.

Размер и морфологию нанокристаллов рилпивирин, полилактидных микросфер и *in situ* имплантатов исследовали в центре коллективного пользования имени Д.И. Менделеева с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) JSM-6510LV (JEOL, Япония).

Для оценки модуля Юнга гидрогелевых фантомов использовали ротационный реометр RheoStress RS600 (Thermo HAAKE, США). Исследование проводили в Институте нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук (ИНХС РАН).

Анализ фазового состава исследуемых объектов проводили с использованием настольного дифрактометра для фазового анализа Rigaku MiniFlex 600 (Rigaku, Япония) на кафедре физического материаловедения Национального исследовательского технологического университета «МИСиС».

2.3 Получение PLGA микросфер, нагруженных рилпивирин, с использованием микрофлюидной системы

PLGA микросферы, нагруженные рилпивирин, получали методом эмульгирования с использованием микрофлюидной установки (Dolomite Microfluidics, Великобритания). Для приготовления органической фазы навеску полимера (140 мг) и рилпивирин растворяли в 7 мл этилацетата. В качестве водной фазы использовали 2 масс.% водный раствор стабилизатора. Полученные растворы фильтровали через мембранный фильтр из политетрафторэтилена с размером пор 0,45 мкм. Формирование микросфер проводили в режиме фокусировки потока в стеклянном чипе с шириной канала в месте пересечения 100 мкм. Скорость потока органической фазы (Q_o) поддерживали 8,9 мкл/мин, скорость потока ВФ (Q_v) – 60 мкл/мин. Контроль скорости потока органической и водной фаз и размера капель осуществляли с помощью программного обеспечения The Dolomite Flow Control Center Advanced. Микросферы собирали в приемник с 1 масс.% водным раствором поливинилового спирта при комнатной температуре и постоянном перемешивании 120-150 об/мин в течение 3-4 ч. Остаточный органический растворитель удаляли под вакуумом с использованием ротационного испарителя (30 °С, 20 мбар). Полученную суспензию промывали дистиллированной водой 3×25 мл методом центрифугирования (5000 об/мин, 10 мин). После этого суспензию замораживали (-80 °С) и

высушивали лиофильно (лиофильная сушилка Alpha Christ 1 – 6, Германия) по схеме: основная сушка в течение 24 ч, давление 0,340 мбар; окончательная сушка в течение 4 ч, давление 0,035 мбар. Лиофилизированные образцы хранили при 4 °С.

При оптимизации параметров получения PLGA микросфер варьировали тип (поливиниловый спирт (9-10 кДа), додецилсульфат натрия, полоксамер 188, Твин 80) и концентрацию (0,5, 1, 2 и 3 масс.%) стабилизатора, концентрацию PLGA в органической фазе (0,5, 1, 2 и 3 масс.%), соотношение скоростей потоков водной и органической фаз (Q_v/Q_o) от 3,4 до 15,7. Для получения PLGA микросфер с разной степенью включения рилпивирин варьировали массовое соотношение рилпивирин – PLGA (от 1/20 до 1/6).

Для получения PLGA микросфер с разной скоростью высвобождения рилпивирин варьировали состав полимера, в том числе молекулярный вес PLGA (68 кДа и 76-115 кДа, вязкость 0,58 и 0,91 дл/г, соответственно), природа концевых группы в молекулах PLGA (карбоксовая и сложноэфирная (-CH₃)), доля молочной кислоты в молекулах PLGA (50% и 75%), а также размер микросфер от 30 до 66 мкм.

2.4 Получение нанокристаллической формы рилпивирин

2.4.1 Получение суспензии нанокристаллов рилпивирин методом гомогенизации под давлением

К навеске рилпивирин (50 мг) добавляли 30 мл водного раствора полоксамера 338 с концентрацией 0,42 мг/мл. Массовое соотношение рилпивирин – полоксамер составляло 4:1. После чего смесь диспергировали с помощью диспергатора Ultra-Turrax T18 Basic (IKA, Германия) в течение 1 минуты при скорости 23600 об/мин. Полученную суспензию дополнительно гомогенизировали с использованием гомогенизатора высокого давления Microfluidizer LM10 (Microfluidics, США) при 20 000 psi в течение 11 ч при охлаждении. Далее наносуспензию концентрировали под вакуумом (20 мбар) с использованием ротационного испарителя при температуре водяной бани 30 °С. Затем в суспензию добавляли криопротектор, замораживали (-80 °С) и высушивали лиофильно (лиофильная сушилка Alpha Christ 1 – 6, Германия) по аналогичной схеме (п. 2.3.). Лиофилизированные образцы хранили при 4 °С.

2.4.2 Получение суспензии нанокристаллов рилпивирин методом ультразвуковой гомогенизации

К навеске рилпивирин (50 мг) добавляли 2 мл водного раствора полоксамера 338 с концентрацией 6,25 мг/мл. Массовое соотношение рилпивирин – полоксамер составляло 4:1. После чего суспензию гомогенизировали с использованием ультразвукового гомогенизатора SONOPULS HD 2070 (Bandelin, Германия) мощностью 70 Вт в течение 6 ч при охлаждении. Через определенные промежутки времени отбирали по 50 мкл суспензии для определения размеров частиц. Затем в суспензию добавляли криопротектор, замораживали (-80 °С) и высушивали лиофильно (лиофильная сушилка Alpha Christ 1 – 6, Германия) по аналогичной схеме (п. 2.3.). Лيوфилизированные образцы хранили при 4 °С.

2.4.3 Получение суспензии нанокристаллов рилпивирин методом механического диспергирования со стеклянными шариками

Нанокристаллы получали по модифицированной методике согласно [135]. К навеске рилпивирин (40 мг) добавляли 1 мл водного раствора полоксамера 338 с концентрацией 10 мг/мл. Массовое соотношение рилпивирин – полоксамер составляло 4:1. После чего смесь гомогенизировали с использованием ультразвукового гомогенизатора SONOPULS HD 2070 (Bandelin, Германия) мощностью 70 Вт в течение 60 мин. Затем в полученную первичную суспензию добавляли 357 мг стеклянных шариков диаметром 1 мм и три мешалки диаметром 5 мм и длиной 9 мм, размещенных друг над другом. Суспензию перемешивали на магнитной мешалке при 1500 об/мин в течение 24 ч. в суспензию добавляли криопротектор, замораживали (-80 °С) и высушивали лиофильно (лиофильная сушилка Alpha Christ 1 – 6, Германия) по аналогичной схеме (п. 2.3.). Лيوфилизированные образцы хранили при 4 °С.

При оптимизации параметров лиофилизации суспензии нанокристаллов варьировали тип криопротектора: маннит, поливинилпирролидон или их соотношение, трегалоза.

2.5 Получение полимерных растворов для формирования *in situ* имплантатов

Навеску рилпивирин (3-9 мг) растворяли в 0,6 мл N-метил-2-пирролидона (NMP). Затем к полученному раствору добавляли PLGA (150-400 мг) и оставляли перемешиваться в темноте при комнатной температуре в течение 24 ч до полного растворения. Полученные растворы

переносили в шприц объемом 1 мл с иглой 18G, после чего вводили в буферный раствор для формирования *in situ* имплантата.

Для получения имплантатов с разной скоростью высвобождения рилпивирин варьировали состав полимера, в том числе молекулярный вес PLGA (7-14 кДа и 68 кДа, вязкость 0,17 и 0,58 дл/г, соответственно), природа концевых групп в молекулах PLGA (карбоксильная и сложноэфирная (-CH₃)), доля молочной кислоты в молекулах PLGA (50% и 75%), а также содержание PLGA в растворе (20, 30 и 40 масс.%).

2.6 Получение гидрогелевых фантомов

2.6.1 Получение полиакриламидных гелей

Полиакриламидные гели PAA_1, PAA_2 и PAA_3 получали методом радикальной полимеризации, путем добавления акриламида AAm (31%, 32% и 11%), N,N'-метиленабисакриламида MBA (2,7%, 1,4%, 20% от AAm), тетраметилэтилендиамина TEMED (0,02%, 0,02, 0,1%) и персульфата аммония APS (0,02%, 0,02%, 0,1%) в фосфатно-солевой буфер (pH 7,4). Раствор разливали по формам и оставляли на 24 часа для гелеобразования. Криогель PAA_3б получали методом криотропного гелеобразования согласно [136]. Раствор AAm (11%), MBA (20% от AAm) и TEMED (0,1%) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) охлаждали при 7 °С. Затем для инициации полимеризации к нему добавляли раствор APS (0,1%). Полученный раствор быстро переносили в форму и замораживали при -25 °С в течение 24 ч. Полученные гидрогели промывали дистиллированной водой в течение 3 дней со сменой среды три раза в день.

2.6.2 Получение агарозного геля и формирование в нем имплантата

1 масс.% агарозный гель получали согласно [137]. Навеску агарозы (0,3 г) добавляли к 30 мл воды при нагревании до 90 °С и перемешивании 300 об/мин до полного растворения агарозы. Затем 2 мл 1 масс.% вязкого раствора агарозы заливали в цилиндрическую форму с диаметром 15 мм и помещали форму на ледяную подложку. В процессе остывания в течение 2 мин в геле формировали емкость, после чего в емкость вводили 0,2 мл полимерных растворов и сверху заливали 1 мл теплого раствора агарозы. Форму оставляли при -4 °С в течение 10 минут

для формирования плотного геля. Полученный гель извлекали из формы и изучали скорость высвобождения рилпивирин.

2.7 Методы определения физико-химических характеристик исследуемых объектов

2.7.1 Определение молярного соотношения лактат:гликолят в PLGA методом капиллярного электрофореза

Для анализа PLGA применяли капиллярный зонный электрофорез (КЭ) с косвенным УФ детектированием. Анализ КЭ проводили на приборе «Капель 105М» («Люмэкс», Россия), оснащенном спектрофотометрическим детектором, по разработанной нами ранее методике [138]. Длина капилляра 60 мм, эффективная длина 50 мм, внутренний диаметр капилляра 75 мкм. Для сбора и обработки данных использовали программу «Эльфран» («Люмэкс», Россия). В качестве раствора ведущего электролита использовали раствор 10 мМ бензойной кислоты с 0,5 мМ гидроксида цетилтриметиламмония. До нужного значения рН буферный раствор доводили диэтаноламином (рН 8,6 для определения лактата и рН 5,3 – гликолята). Растворы ведущих электролитов центрифугировали в течение 5 минут при 12000 об/мин.

Ежедневно перед использованием капилляр последовательно промывали раствором 0,5 М соляной кислоты (5 мин), дистиллированной водой (5 мин), раствором 1 М гидроксида натрия (5 мин) и снова водой (5 мин). Далее перед анализом капилляр промывали раствором ведущего электролита (5 мин). Ввод пробы (гидродинамический) осуществляли под давлением 30 мбар в течение 10 сек. Детектирование осуществляли при 254 нм. Температуру капилляра поддерживали на уровне 25 °С. Рабочее напряжение составляло –25 кВ. Время анализа 4 мин. В конце анализа капилляр последовательно промывали водой (2 мин), 30% раствором этилового спирта в 1 М гидроксиде натрия (8 мин) и снова водой (2 мин). В конце рабочего дня капилляр промывали водой (5 мин), раствором 1 М гидроксида натрия (5 мин), водой (5 мин), раствором 0,5 М соляной кислоты (5 мин), и снова водой (5 мин).

Для установления молярного соотношения лактата и гликолята в полимере к навеске полимера (50 мг) добавляли 2 мл 1,0 н раствора NaOH. Далее суспензию инкубировали 24 часа (37 °С, 200 об/мин) до полного гидролиза полимера. После чего содержимое флаконов разбавляли водой в мерной колбе до 100 мл. Перед анализом растворы разбавляли водой еще в 10 раз. Содержание в полимере лактата и гликолята определяли при различных рН ведущего электролита: 8,6 (лактат) и 5,3 (гликолят). Использовали градуировочные зависимости, построенные по площадям пиков стандартных растворов лактата лития и гликолевой кислоты, в

пересчете на анион. По данным количественного анализа рассчитывали молярное соотношение лактат : гликолят в PLGA.

2.7.2 Определение молекулярной массы PLGA методом гель-проникающей хроматографии

Молекулярные массы полимеров определяли с помощью метода гель-проникающей хроматографии (ГПХ). ГПХ проводили на хроматографе высокого давления Waters (Waters Corporation, США), оснащенный колонкой Styragel HR 4E+1E THF 300x7,8 мм, рефрактометрическим и УФ-детектором с регистрацией при 264 нм, и инжектором Rheodyne с петлей 200 мкл. В качестве растворителя использовали тетрагидрофуран. Скорость потока 1 мл/мин. Концентрация образцов в растворах составляла 1 мг/мл, объем вводимой пробы 100 мкл. Калибровку системы проводили по полистирольным стандартам. Образцы анализировали после фильтрования через фильтр CHROMAfil Xtra PTFE 2,0 мкм.

2.7.3 Определение состава водорастворимой фракции PLGA методом ВЭЖХ-МС

Состав водорастворимой фракции определяли методом ВЭЖХ-МС. Анализ проводили на жидкостном хроматографе Surveyor LC (Thermo Finnigan, США) с использованием спектрофотометрического детектора с диодной матрицей Surveyor PDA Plus, рефрактометрического детектора Surveyor RI Plus и масс анализатора MSQ (Thermo Fisher Scientific, США), колонка Phenomenex Onyx Monolithic C18 25x4,6 мм. Подвижная фаза: А - 0,1% раствор муравьиной кислоты, В – ацетонитрил. Температура 25°C. Скорость потока подвижной фазы 1,5 мл/мин. Объем пробы 5 мкл. Режим элюирования, А:В: 0,0-0,1 мин 100:1, от 0,1 до 2,1 мин градиент от 5 до 95% В, от 2,1 до 2,5 мин 5:95, от 2,6 до 5,0 мин 100:0. Ионизация химическая при атмосферном давлении. Напряжение на конце иглы 3 кВ.

Для анализа готовили лиофилизат водорастворимой фракции PLGA. Для этого навеску полимера (350 мг) растворяли в 3,5 мл хлористого метилена, добавляли 8,75 мл очищенной воды, стряхивали для эффективной экстракции в водную фазу, оставляли на 24 ч. Отбирали сверху водный слой и лиофильно высушивали. Лиофилизат ресуспендировали в 0,5 мл ацетонитрила, добавляли 0,5 мл воды и анализировали. Результат анализа в Приложении А.

2.7.4 Определение кислотного числа полимера

Для определения кислотного числа полимеров использовали метод кислотно-основного неводного индикаторного титрования.

Приготовление растворов

Спиртовой раствор гидроксида калия готовили следующим образом: навеску (1,75 г) переносили во флакон, добавляли 1 мл дистиллированной воды, далее добавляли 96 об.% этиловый спирт до объёма 250 мл. Непосредственно перед титрованием данный раствор разбавляли в необходимое количество раз 96 об.% этиловым спиртом и стандартизовали титрованием раствора янтарной кислоты.

Раствор янтарной кислоты готовили по точной навеске: 29,5 мг растворяли в 25 мл дистиллированной воды. При необходимости данный раствор разбавляли водой в нужное количество раз.

1% раствор фенолфталеина в этаноле: 100 мг фенолфталеина растворяли в 10 мл 96 об.% этилового спирта.

Стандартизация раствора щёлочи

Перед началом работы каждый раз проводили стандартизацию раствора гидроксида калия ($M = 56,1$ г/моль, $f_{\text{экв}} = 1$) по раствору янтарной кислоты ($M = 118$ г/моль, $f_{\text{экв}} = 1/2$). Для этого в колбу для титрования вносили аликвотную часть раствора янтарной кислоты, воду и раствор фенолфталеина. Титровали полученный раствор раствором гидроксида калия до появления устойчивой бледно-розовой окраски. Концентрацию раствора гидроксида калия рассчитывали по формуле 1:

$$c_{\text{н}}(\text{KOH}) = \frac{c_{\text{н}}(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4) \cdot V(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4)}{V(\text{KOH}) \cdot f_{\text{экв}}(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4)} \quad (1)$$

где $c_{\text{н}}(\text{KOH})$ – нормальная концентрация раствора гидроксида калия, (моль экв/л);

$c_{\text{н}}(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4)$ – нормальная концентрация раствора янтарной кислоты, (моль экв/л);

$V(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4)$ – объём исходного раствора янтарной кислоты, мл;

$V(\text{KOH})$ – объём израсходованного на титрование раствора гидроксида калия, мл;

$f_{\text{экв}}(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4)$ – фактор эквивалентности янтарной кислоты, 1/2;

Титрование проводили до получения 3 значений объёма раствора щёлочи, различающихся не более, чем на 0,05 мл. Исходя из них определяли среднее значение объёма и рассчитывали концентрацию по формуле (1).

Навеску полимера (50 мг) растворяли в 4 мл хлористого метилена, добавляли 25 мкл раствора фенолфталеина, титровали раствором KOH. Конечной точкой титрования считали

момент установления розовой окраски раствора, устойчивой в течении нескольких секунд, далее рассчитывали кислотные числа по формуле 2:

$$KЧ = \frac{56,1 \cdot V(\text{KOH}) \cdot c_n(\text{KOH})}{m}, \quad (2)$$

где KЧ – кислотное число исследуемого соединения или объекта, мг KOH/г;

56,1 – молярная масса эквивалента гидроксида калия, (г/моль экв);

V(KOH) – объём израсходованного на титрование раствора гидроксида калия, мл;

C_n (KOH) – нормальная концентрация раствора гидроксида калия, (моль экв/л);

m – масса исследуемого соединения или объекта, г.

2.7.5 Определение температуры стеклования образцов

Температуру стеклования PLGA определяли методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с использованием дифференциального сканирующего калориметра DSC 3 STARe System (METTLER TOLEDO, Германия). Образцы взвешивали в алюминиевых тиглях, герметично закрывали и подвергали нагреву от 20 до 120 °С со скоростью нагрева 10 °С/мин, затем охлаждению до 20 °С со скоростью -15 °С/мин, и снова нагреву от 20 до 300 °С со скоростью нагрева 10 °С/мин. В случае чистого полимера второй нагрев осуществляли до 160 °С.

2.7.6 Определение размера микросфер и распределения по размерам

Размер микросфер определяли с использованием оптического микроскопа High Speed Digital Microscope (Dolomite Microfluidics, Великобритания). Суспензию микросфер наносили на предметное стекло и помещали в микроскоп. Анализ полученных данных проводили в программе ImageJ и Microsoft Excel 2010. Статистические данные получали при обработке не менее 200 микросфер.

Коэффициент вариации (CV, %) определяли по формуле 3:

$$CV(\%) = \frac{\sigma}{D_{\text{ср}}} \times 100\%, \quad (3)$$

где σ – стандартное отклонение,

$D_{\text{ср}}$ – средний диаметр микросфер, мкм.

2.7.7 Определение содержания рилпивирин в PLGA микросферах и эффективности включения методом ВЭЖХ

Для определения общего содержания рилпивирин в PLGA микросферах к 5 мг лиофилизата добавляли 25,0 мл ацетонитрила, тщательно встряхивали на Vortex до полного растворения. Содержание рилпивирин определяли методом ВЭЖХ. Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-2030C 3D Plus (SHIMADZU, Япония) с использованием детектора с диодной матрицей. Удерживание рилпивирин изучали на колонке Purospher® STAR RP-18 endcapped (120 × 4 mm, 3 μm) с C18 пред-колонкой. Подвижная фаза А (ПФ А) состояла из 0,1% водного раствора трифторуксусной кислоты, подвижная фаза Б (ПФ Б) состояла из 0,1% раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле. Режим линейного градиентного элюирования: от 10% до 60% ПФ Б – 25 мин, от 60% до 10% ПФ Б – 10 мин. Скорость потока 1 мл/мин, объем пробы 20 мкл, температура колонки 35 °С, длина волны детектирования 280 нм. Анализ данных проводили в программе LabSolutions.

Градуировочный график для расчета содержания рилпивирин в анализируемых образцах строили с использованием стандарта рилпивирин в диапазоне концентраций от 2 до 50 мкг/мл. Уравнение калибровочной кривой $S = 155894 \times C$; $R^2 = 0,9961$.

Содержание рилпивирин (загрузку) в PLGA микросферах (*drug loading*, DL, %) рассчитывали по формуле 4:

$$DL(\%) = \frac{C_{\text{рпв}} \times V}{m_{\text{мсф}}} \times 100\%, \quad (4)$$

где $C_{\text{рпв}}$ – концентрация рилпивирин в растворе, мг/мл;

V – объем ацетонитрила, мл;

$m_{\text{мсф}}$ – масса микросфер, мг.

Эффективность включения рилпивирин в PLGA микросферы (*encapsulation efficiency*, EE, %) вычисляли по формуле 5:

$$EE (\%) = \frac{DL_{\text{практ}}}{DL_{\text{теор}}} \times 100\%, \quad (5)$$

где $DL_{\text{практ}}$ – содержание рилпивирин в микросферах, рассчитанное по формуле 2, мг/мг;

$DL_{\text{теор}}$ – содержание рилпивирин в микросферах исходя из загрузки, мг/мг.

Каждое измерение проводили 3 раза, результат усредняли.

2.7.8 Определение размеров нанокристаллов рилпивирин и распределения по размерам

Средний размер нанокристаллов и распределение частиц по размерам (PDI) определяли методом динамического светорассеивания на анализаторе Zetasizer Nano ZS, (Malvern Instruments, Великобритания). Размер частиц определяли до и после лиофилизации при разведении суспензии нанокристаллов в воде Milli-Q в 100-200 раз (угол рассеивания света 173 °, температура 25 °С, время термостатирования 120 сек, время измерения 60 сек). Все измерения проводили четыре раза, результат усредняли.

2.7.9 Рентгенофазовый анализ полимеров и нанокристаллической формы рилпивирин

Анализ фазового состава используемых полимеров и нанокристаллов рилпивирин проводили с использованием настольного дифрактометра для фазового анализа Rigaku MiniFlex 600 (Rigaku, Япония) на кафедре физического материаловедения Национального исследовательского технологического университета «МИСиС». Съемку проводили в следующих условиях: длина волны $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$, CuK α – излучение, в интервале углов 2θ от 10° до 30° для рилпивирин и нанокристаллов, до 120° для полимера.

2.7.10 Определение модуля упругости гидрогелевых фантомов

Для оценки модуля Юнга (упругости) гидрогелевых фантомов использовали ротационный реометр RheoStress RS600 (Thermo HAAKE, США). Исследование проводили в Институте нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук (ИНХС РАН). Образцы помещали в зазор между двумя стальными измерительными плоскостями диаметром 20 мм (поверхности рифленые) и задавали колебания в диапазоне от 0.1 до 100 Гц с постоянной амплитудой деформации 0,1%.

2.7.11 Определение размера и структуры поверхности депо-форм рилпивирин с помощью сканирующей электронной микроскопии

Размер и морфологию нанокристаллов рилпивирин, полилактидных микросфер и имплантатов *in situ* исследовали в центре коллективного пользования имени Д.И. Менделеева с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) JSM-6510LV (JEOL, Япония). Микрофотографии поверхности частиц были получены при ускоряющем напряжении 15 кВ в режиме регистрации вторичных электронов. Перед проведением измерений поверхность образцов была покрыта слоем платины толщиной около 5 нм на установке магнетронного напыления JFC-1600 (JEOL, Япония) при давлении 3-5 Па.

2.8 Исследование скорости высвобождения рилпивирин *in vitro* из депо-форм

Для количественной оценки скорости высвобождения / растворения рилпивирин из депо-форм был проведен подбор состава приёмной среды: исследовали влияние состава буферного раствора (0,15 М фосфатно-солевой буфер (рН 7,4), 0,1 М HEPES буфер (рН 7,4), 0,1 М MES буфер (рН 6,5), 0,1 М ацетатный буфер (рН 4,5)) на кажущуюся растворимость рилпивирин (далее растворимость), а также влияние концентрации солюбилизатора Твин 20 (0,5 и 2 масс.%). Для оценки скорости растворения нанокристаллов рилпивирин также изучили два метода: метод центрифугирования и диализа.

Для приготовления фосфатно-солевого буферного раствора 1 таблетку PBS растворяли в 100 мл деионизованной воды, рН довели до 7,4 при помощи 1н NaOH или 0,1н HCl. Для приготовления HEPES буфера к 10 мл 1М буферного раствора HEPES (1 М, рН 7,0-7,6) прибавляли 80 мл деионизованной воды, довели рН до 7,4 при помощи 1н NaOH, а затем водой до 100 мл. Для приготовления MES буфера 1,952 г MES растворяли в 80 мл деионизованной воды, довели рН до 6,5 при помощи 1н NaOH, затем довели водой до 100 мл. Для приготовления ацетатного буфера 1,846 г безводного ацетата натрия растворяли в 400 мл деионизованной воды, прибавляли 1,57 мл ледяной уксусной кислоты ($\rho=1,0492 \text{ г/см}^3$, то есть 1,651 г), довели до рН 4,5 при помощи 1 н NaOH, затем водой до 0,5 л.

2.8.1 Изучение скорости высвобождения рилпивирин из PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринном, in vitro

Определяли в условиях, имитирующих физиологическую среду: 0,15 М фосфатно-солевой буфер при рН 7,4, с добавлением 20 мг/мл Твин 20. К навеске микросфер (лиофилизат) добавляли 25 мл модельного буферного раствора. «Условия бесконечного разбавления» поддерживали исходя из растворимости рилпивирин в 0,15 М фосфатно-солевом буфере при рН 7,4, с добавлением 20 мг/мл Твин 20 ($15,12 \pm 0,12 \text{ мкг/мл}$). Затем суспензию помещали в шейкер-инкубатор KS 4000 i control (ИКА, Германия) и инкубировали при температуре 37 °С и орбитальном перемешивании 100-120 об/мин. Отбор аликвот по 0,6 мл производили через заданные интервалы времени (1, 2, 3, 5, 8 ч в течение первых суток, затем через каждые 24-48 ч и т.д.). Через каждые 7-8 дней приемную среду полностью заменяли. Микросферы отделяли от буфера центрифугированием (5000 об/мин; 18 °С, 10 мин) на центрифуге Eppendorf 5804R (Eppendorf, Германия).

Содержание рилпивирин в супернатанте определяли методом ВЭЖХ по предварительно построенному градуировочному графику (п.2.7.7). Каждое измерение проводили параллельно для 3 образцов. Степень высвобождения рилпивирин (%) в каждой временной точке рассчитывали по отношению количества рилпивирин в супернатанте к общему количеству рилпивирин по формуле 6:

$$\text{Степень высвобождения (\%)} = \frac{M_i}{M_{\infty}} \times 100\% \quad (6)$$

где M_i – количество высвободившегося из микросфер рилпивирин на момент времени i , мкг;

M_∞ –общее содержание рилпивирин в навеске микросфер микросфер, мкг.

Относительное стандартное отклонение степени высвобождения рилпивирин (RSD) рассчитывали по трем параллельным определениям для уровня значимости $P = 0,95$. Статистическую обработку данных и построение графиков производили в Microsoft Excel.

2.8.2 Изучение скорости высвобождения рилпивирин из in situ имплантатов, нагруженных рилпивирин, in vitro

Определяли в условиях, имитирующих физиологическую среду: 0,15 М фосфатно-солевой буфер при pH 7,4, с добавлением 20 мг/мл Твин 20. 0,2 мл раствора PLGA и рилпивирин в NMP вводили в 220 мл приемной среды, помещали в шейкер-инкубатор KS 4000 i control (ИКА, Германия) и инкубировали при температуре 37 °С и орбитальном перемешивании 100-120 об/мин. «Условия бесконечного разбавления» условия поддерживали исходя из растворимости рилпивирин в 0,15 М фосфатно-солевом буфере при pH 7,4, с добавлением 20 мг/мл Твин 20 (15,12±0.12 мкг/мл). Отбор аликвот по 0,6 мл производили через заданные интервалы времени (1, 2, 3, 5, 8 ч в течение первых суток, затем через каждые 24-48 ч и т.д.). Через каждые 7-8 дней приемную среду полностью заменяли.

Содержание рилпивирин в супернатанте и степень высвобождения (%) определяли аналогично условиям, описанным в п.2.8.1.

2.8.3 Изучение скорости растворения нанокристаллов рилпивирин in vitro

2.8.3.1 Метод центрифугирования

Скорость растворения определяли в условиях, имитирующих физиологическую среду: 0,15 М фосфатно-солевой буфер при pH 7,4, с добавлением 20 мг/мл Твин 20. Лиофилизат нанокристаллов ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды с использованием вортекса, после чего аликвоту переносили в 220 мл приемного раствора, помещали в шейкер-инкубатор KS 4000 i control (ИКА, Германия) и инкубировали при температуре 37 °С и орбитальном перемешивании 100-120 об/мин. «Условия бесконечного разбавления» условия поддерживали

исходя из растворимости рилпивирин в 0,15 М фосфатно-солевом буфере при pH 7,4, с добавлением 20 мг/мл Твин 20 (15,12±0,12 мкг/мл). Отбор аликвот по 0,6 мл производили через заданные интервалы времени (1, 2, 3, 5, 8 ч в течение первых суток, затем через каждые 24-48 ч и т.д.). Через каждые 7-8 дней приемную среду полностью заменяли. Нанокристаллы отделяли от буфера центрифугированием (24000 об/мин; 5 °С, 30 мин) на центрифуге Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, США).

Содержание рилпивирин в супернатанте и степень растворения (%) определяли аналогично условиям, описанным в п.2.8.1.

2.8.3.2 Метод диализа

Скорость растворения определяли в условиях, имитирующих физиологическую среду: 0,15 М фосфатно-солевой буфер при pH 7,4, с добавлением 20 мг/мл Твин 20. Лиофилизат нанокристаллов ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды с использованием вортекса, после чего аликвоту переносили в диализную мембрану VISKING dialysis tubing (12 -14 кДа, объем 2 мл/см, диаметр 16 мм, SERVA Electrophoresis GmbH, Германия). Предварительно оценивали сорбцию рилпивирин на мембране, которая составила 4%. После чего мембрану помещали в 220 мл приемной среды и инкубировали при температуре 37 °С и орбитальном перемешивании 100-120 об/мин в шейкере-инкубаторе KS 4000 i control (IKA, Германия). Отбор аликвот по 0,6 мл производили через заданные интервалы времени (1, 2, 3, 5, 8 ч в течение первых суток, затем через каждые 24-48 ч и т.д.). Через каждые 7-8 дней приемную среду полностью заменяли.

Содержание рилпивирин в супернатанте и степень растворения (%) определяли аналогично условиям, описанным в п.2.8.1.

2.8.4 Изучение скорости высвобождения рилпивирин из in situ имплантатов с использованием гидрогелевого фантома

Формирование гидрогелевого фантома и имплантата проводили согласно методике п.2.6.2. После чего гидрогелевый фантом переносили в 220 мл приемной среды, помещали в шейкер-инкубатор KS 4000 i control (IKA, Германия) и инкубировали при температуре 37 °С и

орбитальном перемешивании 100-120 об/мин. «Условия бесконечного разбавления» условия поддерживали исходя из растворимости рилпивирин в 0.15 М фосфатно-солевом буфере при pH 7,4, с добавлением 20 мг/мл Твин 20 ($15,12 \pm 0,12$ мкг/мл). Отбор аликвот по 0,6 мл производили через заданные интервалы времени (1, 2, 3, 5, 8 ч в течение первых суток, затем через каждые 24-48 ч и т.д.). Через каждые 7-8 дней приемную среду полностью заменяли.

Содержание рилпивирин в супернатанте и степень высвобождения (%) определяли аналогично условиям, описанным в п.2.8.1.

2.9 Изучение скорости гидролитической деградации PLGA микросфер и *in situ* имплантатов методом капиллярного электрофореза

Скорость гидролитической деградации полимерных объектов изучали методом КЭ (косвенное спектрофотометрическое детектирование) по разработанной нами ранее методике [138] с некоторыми модификациями. Процесс деградации изучали в 0,15 М фосфатно-солевом буфере при pH 7,4, с добавлением 20 мг/мл Твин 20 параллельно с изучением скорости высвобождения рилпивирин *in vitro*, как описано в п. 2.8. К 100 мкл супернатанта добавляли 10 мкл 1,0 н раствора NaOH; смесь инкубировали 24 ч при 37 °С при перемешивании 200 об/мин. Гидролизат разбавляли в 20 раз водой Milli-Q и определяли содержание продуктов деградации по количеству молочной кислоты, образующейся в результате гидролиза, методом КЭ (п.2.7.1). Калибровочную кривую по молочной кислоте получали, анализируя растворы, полученные при полном гидролизе точных навесок соответствующих полимеров PLGA.

Степень деградации полимера (%) определяли по отношению концентраций PLGA в супернатанте к общему содержанию PLGA в образце микросфер или *in situ* имплантатов.

2.10 Математическое описание кинетики высвобождения рилпивирин *in vitro*

Математическое описание профилей высвобождения рилпивирин из *in situ* имплантатов и микросфер проводили с помощью основных математических моделей, описывающих кинетику высвобождения ЛВ из полимерной матрицы, в том числе модели нулевого и первого порядка, Хигучи, Хиксона-Кроуэлла, Корсмейера-Пеппаса, Пеппаса-Сахлина и Хопфенберга.

Модель Хопфендерга применима для ЛФ с фазой задержки. Уравнения для расчета кинетических констант приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Математические модели для расчета кинетики высвобождения ЛВ

Модель нулевого порядка	$M_t/M_\infty = k_0 t$
Модель 1-го порядка	$\ln(1-M_t/M_\infty) = -k_1 t$
Модель Хигуччи	$M_t/M_\infty = k_H \sqrt{t}$
Модель Хиксона-Кроуэлла	$(1-M_t/M_\infty)^{1/3} = 1-k_\beta t$
Модель Корсмейера-Пеппаса	$M_t/M_\infty = k_{KP} t^n$
Модель Пеппаса-Сахлина	$M_t/M_\infty = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$
Модель Хопфенберга**	$M_t/M_\infty = 1-[1-k_1 t (t-1)]^n$

*K – константа скорости, n и m – коэффициенты диффузии, R² – коэффициент корреляции
**для ЛФ сферической формы n=3*

Экспериментальные данные обрабатывали нелинейным методом наименьших квадратов (NLSF) с использованием Microsoft Excel и Excel Solver. Для получения набора значений параметров, наилучшим образом описывающих экспериментальные данные в определенной модели, сумма квадратов отклонений минимизировалась с использованием программы Excel Solver. Выбор модели, наилучшим образом описывающей экспериментальные данные, осуществляли путем сравнительной оценки значений коэффициентов корреляции R².

2.11 Статистический анализ данных

Статистический анализ данных был выполнен с помощью программного обеспечения Microsoft Excel (Microsoft, США) с использованием t-критерия Стьюдента; Уровень статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$. Определение размера нанокристаллов и распределения по размерам проводили в четырех повторностях, тогда как определение размеров микросфер и коэффициента вариации проводили при обсчете не менее 200 частиц. Все остальные измерения *in vitro* проводили в трех повторностях.

Глава 3 ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИЛАКТИДНЫХ ДЕПО-ФОРМ РИЛПИВИРИНА

Парентеральные формы антиретровирусных агентов длительного действия (депо-формы), такие как полимерные микросферы, а также *in situ* имплантаты на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), представляются перспективной альтернативой пожизненному ежедневному приему пероральных лекарственных форм для поддерживающей терапии ВИЧ-инфекции [113]. Такие формы, помимо пролонгированного действия, способны обеспечивать контролируемое высвобождение ЛВ за счет изменения свойств полимерной матрицы. Как описано выше, в ранее проведенных исследованиях были предприняты попытки создания депо-форм рилпивиринна на основе биodeградируемых полимеров [129,130], однако полученные депо-формы обладали отсроченным профилем высвобождения рилпивиринна (до 21 дня). В то же время влияние физико-химических характеристик парентеральных форм рилпивиринна (микросферы и *in situ* имплантаты) на профиль его высвобождения *in vitro* оставался недостаточно изученным.

В рамках настоящей работы проведено комплексное исследование, позволяющее выявить факторы, обеспечивающие возможность получения микросфер и *in situ* имплантатов на основе PLGA с контролируемым профилем высвобождения из них рилпивиринна. При этом был оптимизирован метод получения полилактидных микросфер, нагруженных рилпивиринном, и установлены основные параметры, влияющие на физико-химические характеристики микросфер, в том числе размер, полидисперсность, эффективность включения рилпивиринна. Выявлены основные факторы, позволяющие управлять профилем высвобождения рилпивиринна из депо-форм на основе микросфер и *in situ* имплантатов.

3.1 Характеристика PLGA

Важную роль в процессе создания и изучения полимерных депо-форм играет выбор основного компонента полимерных композиций. В этом случае, основное предпочтение отдают биосовместимым и биоразлагаемым гидрофобным полимерам, среди которых наиболее популярны полилактиды - сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA, рисунок 3), одобренные FDA для парентерального введения [49–53]. Столь широкое использование обусловлено способностью полилактидов к деградации в физиологических условиях до нетоксичных метаболитов [48], а также возможностью регулировать скорость деградации путем

выбора полимера с нужными характеристиками. Действительно, скорость деградации полилактидов зависит от многих факторов, в том числе: состав (соотношение лактид:гликолид в сополимере), молекулярная масса или природа концевых групп, степень кристалличности. Поэтому на начальном этапе исследований, используемые полилактиды были охарактеризованы по следующим параметрам: средневесовая молекулярная масса (ГПХ); кислотное число (кислотно-основное неводное титрование); соотношение мономерных звеньев (капиллярный электрофорез); степень кристалличности (РФА); температура стеклования T_g (ДСК). Для изучения состава статистических полилактидов и скорости гидролиза сложноэфирной связи полилактидов представлялся интерес использовать для этих целей метод КЭ. Разработанная нами методика [138] позволила селективно определять ионы лактата в присутствии прочих ионов, находящихся в инкубационной среде: ионов хлора, фосфата, карбоната, ацетата и гликолята.

По результатам проведенных исследований были установлены основные характеристики используемых полилактидов (таблица 4).

Таблица 4 – Характеристика PLGA

	Mw, Да		L/G, мол.%		Концевая группа	Кислотное число (мг KOH/г)	Tg, °C
	Теор.	Эксп.	Теор.	Эксп.			
PLGA-1	76000-115000	117000	75:25	77:27	-CH ₃	-	52,42
PLGA-2	50000-75000	64700	75:25	76:24	-CH ₃	0,1	48,74
PLGA-3	38000-54000	44100	50:50	53:47	-CH ₃	0,1	47,68
PLGA-4	38000-54000	42200	50:50	51:49	-COOH	3,7	46,30
PLGA-5	7000-17000	12500	75:25	76:24	-CH ₃	0,3	35,82
PLGA-6	7000-17000	10300	50:50	51:49	-CH ₃	0,2	32,74

Анализ фазового состава образцов полилактидов методом рентгенофазового анализа (РФА) показал, что в исследуемых полимерах отсутствует набор дифракционных линий, характеризующих кристаллическую структуру полилактидов (рисунок 10 а). Отсутствие пиков указывает на аморфный характер исследуемых полимеров. Аналогичные выводы были сделаны на основании данных ДСК (рисунок 10 б). На термограммах ДСК наблюдали характерный перегиб в области стеклования полилактидов, а также отсутствие экзотермических переходов, характерных для кристаллизации.

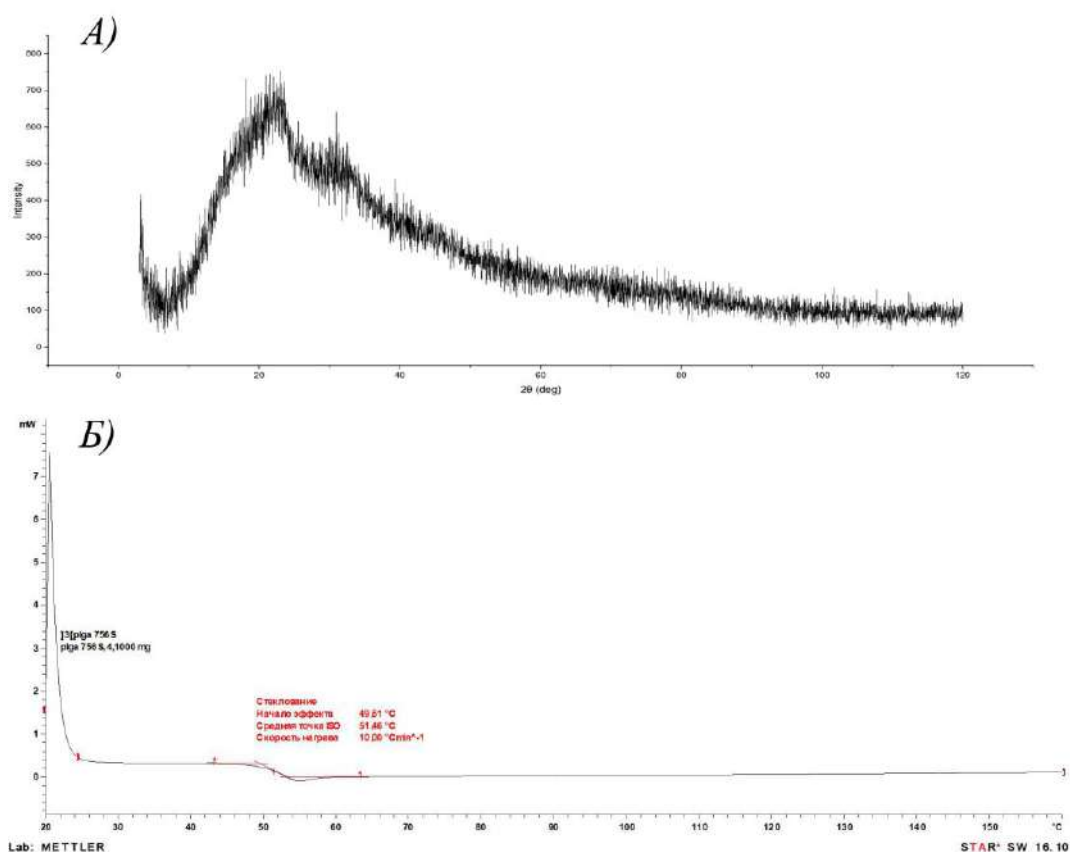


Рисунок 10 – Типичные дифрактограмма (а) и ДСК термограмма (б) образца PLGA (76-115 кДа) с соотношением лактид:гликолид 75:25

3.2 Получение PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринном, с использованием микрофлюидной системы

Результаты, изложенные в настоящем разделе, описаны в статье [139]. Размер частиц и распределение по размерам являются важными показателями качества полимерных микросфер, которые необходимо учитывать при фармацевтической разработке, поскольку они влияют на площадь поверхности частиц, растворимость, биодоступность и профили высвобождения лекарственного вещества [63]. Как правило, для использования PLGA микросфер в качестве инъекционных лекарственных форм рекомендуются частицы размером от 20 до 50 мкм. Это связано с тем, что частицы размером менее 20 мкм могут быть фагоцитированы защитной системой организма, в то время как частицы диаметром более 70 мкм могут вызвать боль во время инъекции или засорение иглы во время введения суспензии [52,64]. Поэтому разработка технологического подхода, обладающего хорошей воспроизводимостью физико-химических характеристик микросфер, а также минимальными затратами на использование реагентов и

расходных материалов, является необходимым этапом в фармацевтической разработке депо-форм. В зависимости от поставленных задач, существует большое количество технологических подходов, направленных на получение микросфер различного состава (в том числе полимера и вспомогательных веществ), размера и полидисперсности, плотности, формы, морфологии поверхности [19]. В основе большинства методов лежит эмульгирование, то есть получение «простых» (O/W) или «двойных» ($W_1/O/W_2$) эмульсий, с последующим выпариванием / удалением органического растворителя. Традиционные методы приводят к получению микросфер в широком диапазоне размеров, и как следствие, к сложностям при масштабировании и снижению общего выхода продукта. Последнее время особый интерес представляют микрофлюидные системы, использование которых позволяет точно контролировать поток жидкости в микромасштабе, преодолевая вышеуказанные ограничения [139,140]. Принципиальная разница между методами заключается в технологическом подходе: в микрофлюидном чипе капля первичной эмульсии формируется в условиях ламинарного потока, что приводит к получению частиц одного размера, за счет увеличенного массо- и теплопереноса ввиду большой площади поверхности, в отличие от метода эмульгирования, где условия интенсивного перемешивания системы не всегда позволяют обеспечить узкое распределение капель эмульсии по размерам [141,142]. Формирование капель в микрофлюидных устройствах зависит от геометрии каналов, реологических свойств эмульгируемых жидкостей и характеристик течения фаз [143].

В рамках настоящей работы PLGA микросферы, нагруженные рилпивиринном, были получены методом O/W эмульгирования с использованием микрофлюидной системы. Образование капель в микрофлюидном чипе осуществляли методом фокусировки потока с режимом течения – «выдавливание». Процесс получения PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринном, показан на рисунке 11. В случае формирования O/W эмульсии в режиме «выдавливание» отрыв капель происходит в результате возникновения равновесия между силами межфазного натяжения и внешними силами вязкого трения [144,145]. В связи с этим важный вклад в формирование капель вносит сила межфазного натяжения и разница давлений, создаваемая за счет изменения расходов фаз [146].

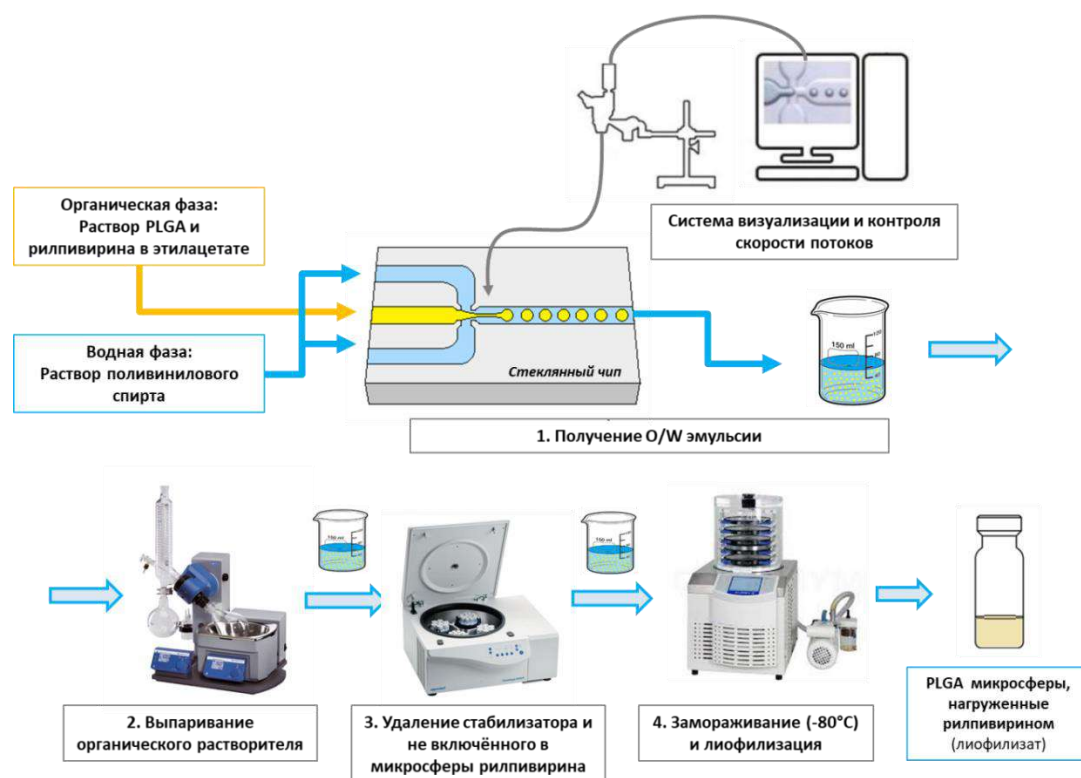


Рисунок 11 – Схема получения PLGA микросфер, нагруженных рилпивирин, с использованием микрофлюидной системы

Так, для оптимизации метода получения PLGA микросфер исследовали влияние таких технологических параметров, как соотношение скоростей потоков водной и органической фаз, тип и концентрация поверхностно-активного вещества (ПАВ) и содержание PLGA на основные физико-химические характеристики микросфер, в том числе размер, полидисперсность и эффективность включения рилпивирин в микросферы.

3.2.1 Влияние типа и концентрации стабилизатора на характеристики PLGA микросфер, нагруженных рилпивирин

Важным параметром, влияющим на процесс формирования капель, является состав непрерывной ВФ [147]. Сама по себе O/W эмульсия является агрегационно-неустойчивой коллоидной системой и стремится к уменьшению поверхностной энергии. Поэтому для предотвращения агрегации и увеличения стабильности эмульсии в водную фазу добавляют специальные стабилизаторы, в роли которых могут выступать поверхностно-активные вещества или полимеры, основная задача которых заключается в снижении значения межфазного

натяжения на границе фаз и обеспечении электростатической или стерической стабильности эмульсий [148]. В тоже время сила межфазного натяжения между двумя фазами вносит основной вклад в формирование и отрыв капли в режиме фокусировки потока в условиях режима течения «выдавливание».

Формирование капель проводили при скорости потока органической фазы 8,9 мкл/мин, скорости потока водной фазы 83 мкл/мин. В качестве органической фазы использовали 1 масс.% раствор высокомолекулярного PLGA (76-115 кДа) 75:25 со сложноэфирной группой в этилацетате, в качестве водной фазы – 2 масс.% раствор стабилизатора. Для изучения влияния типа стабилизатора на формирование капель эмульсии в настоящей работе использовали четыре стабилизатора различной природы: ПВС (9-10 кДа), полоксамер 188, додецилсульфат натрия (SDS) и Твин 80. В отличие от ПВС и полоксамера 188, использование в качестве стабилизатора SDS или Твин 80 не приводило к отрыву капли в пределах выходного канала чипа. Это связано с тем, что на формирование капли влияет межфазное натяжение на границе раздела фаз: чем меньше его величина, тем быстрее происходит отрыв капли [149]. Поэтому было изучено значение межфазного натяжения на границе 1 масс.% раствора PLGA в этилацетате и 2 масс.% водного раствора используемых стабилизаторов (таблица 5).

Таблица 5 – Межфазное натяжение (σ , мН/м) в гетерофазной системе жидкость-жидкость, состоящей из 1% раствора PLGA в этилацетате и 2% раствора стабилизатора (n=3) [139]

Стабилизатор	σ , мН/м
Дистиллированная вода	6,13±0,28
Твин 80	2,71±0,21
SDS	2,46±0,19
Полоксамер 188	2,24±0,19
ПВС	1,26±0,35

Интересно отметить, что значения межфазного натяжения для ПВС и полоксамера 188 оказались ниже, чем для других ПАВ, что, по-видимому, приводит к формированию капли в пределах выходного канала чипа. Что касается исследования зависимости размера микросфер от концентрации ПВС и полоксамера 188, было отмечено, что при увеличении концентрации стабилизатора от 0,5 до 3 масс.% диаметр микросфер изменяется незначительно от 26 до 28 мкм для ПВС и от 27 до 30 мкм для полоксамера 188 (рисунок 12). Однако, в случае использования полоксамера 188 в качестве стабилизатора были получены PLGA микросферы немного большего размера. В момент отрыва капли устанавливается равновесие сил межфазного

натяжения и внешних вязких сил, создаваемых со стороны водной фазы, в самой узкой части капли [144,150]. Поскольку межфазное натяжение между 2 масс.% раствором ПАВ и 1 масс.% раствором PLGA в этилацетате выше для полоксамера 188 (2,24 мН/м против 1,26 мН/м для ПВС), то необходимое для отрыва капли равенство сил происходит с ростом капли. Поэтому при одинаковых условиях формирования эмульсии размер микросфер будет больше в случае использования полоксамера 188 как стабилизатора.

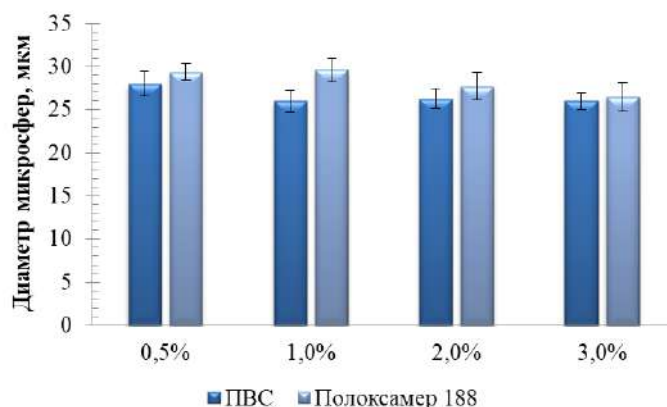


Рисунок 12 – Средний диаметр микросфер, полученных с разной концентрацией ПАВ в водной фазе; скорость потока органической фазы 8,9 мкл/мин, скорость потока водной фазы 83 мкл/мин (n=3) [139]

Таким образом, при дальнейшем получении PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринном, использовали в качестве стабилизатора ПВС (9-10 кДа) в концентрации 20 мг/мл.

3.2.2 Влияние соотношения скоростей потоков водной и органической фаз на характеристики PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринном

Для изучения влияния соотношения скоростей потоков водной и органической фаз (Q_v/Q_o) органическую фазу, состоящую из 1 масс.% раствора высокомолекулярного PLGA 75:25 с концевой сложноэфирной группой (76-115 кДа) в этилацетате, подавали во внутренний канал, тогда как водная фаза, состоящая из 2 масс.% водного раствора ПВС, поступала с двух сторон во внешние каналы, тем самым обеспечивая отрыв капли в результате неустойчивости струи органической фазы. Скорость потока органической фазы поддерживали постоянной 8,9 мкл/мин. Тогда как скорость потока водной фазы варьировали от 30 мкл/мин до

140 мкл/мин. В результате проведенных экспериментов установлено, что с увеличением отношения Q_v/Q_o , то есть с увеличением расхода водной фазы от 30 до 140 мкл/мин, размер микросфер уменьшался от 47 до 18 мкм (рисунок 13 а). Такое поведение связано с тем, что с увеличением скорости потока водной фазы происходит увеличение срывающих напряжений в месте отрыва капель [151]. Следует также отметить, что увеличение скорости потока водной фазы привело к уменьшению коэффициента вариации от 10% до 3-5%, что указывает на более монодисперсное распределение частиц меньшего размера. Кроме того, была установлена линейная зависимость диаметра микросфер от размера капель формирующейся эмульсии (рисунок 13 б). Полученную зависимость можно в дальнейшем использовать для получения микросфер заданного размера, что позволит сократить время технологического процесса при оптимизации и увеличении производительности.

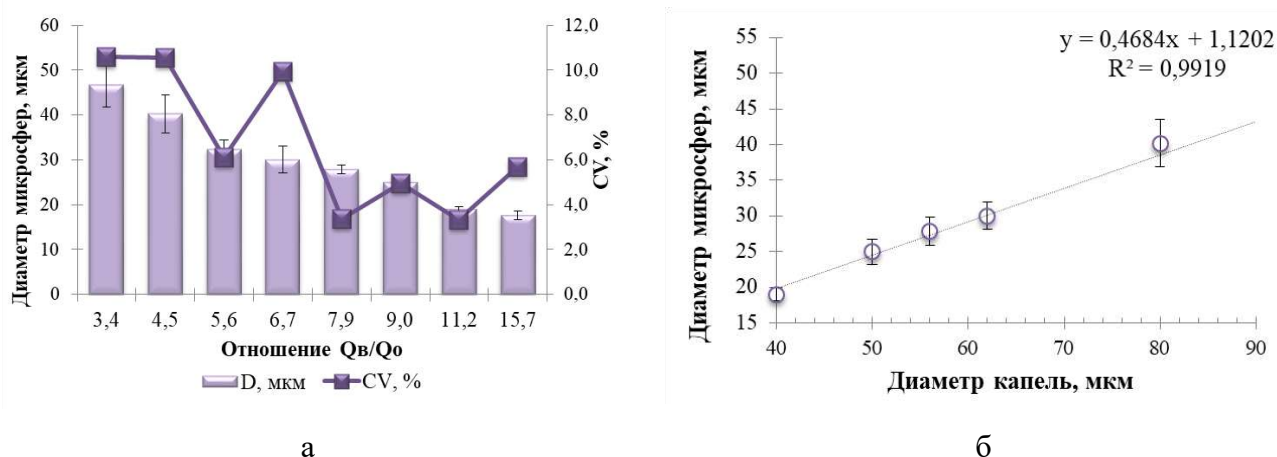
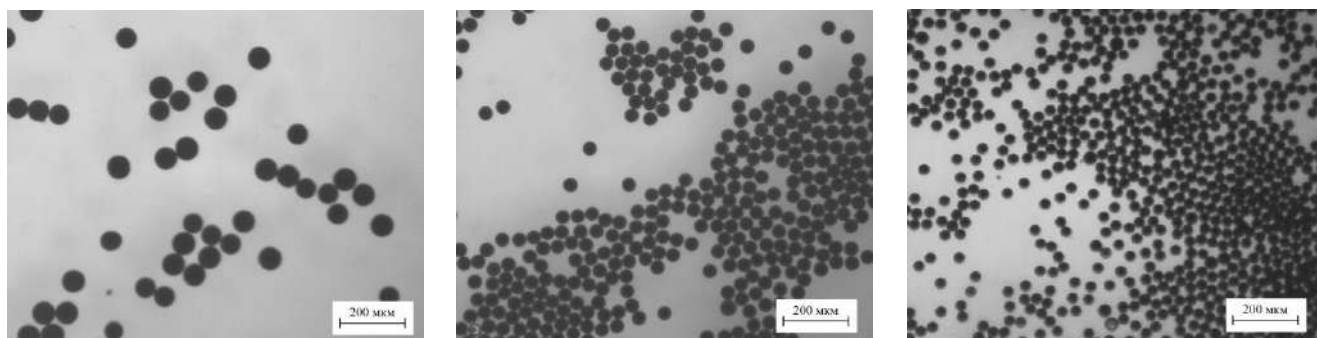


Рисунок 13 – а) Зависимость диаметра микросфер от соотношения расходов Q_v/Q_o ; расход органической фазы Q_o 8,9 мкл/мин, расход водной фазы варьировали от 30 до 100 мкл/мин; б) Зависимость диаметра микросфер от диаметра капель эмульсии ($n=3$)

Также было исследовано влияние соотношения скоростей потоков, и как следствие размера микросфер, на эффективность включения рилпивирин в микросферы. Показано, что с уменьшением размера PLGA микросфер с 67 мкм до 34 мкм (рисунок 14) эффективность включения рилпивирин увеличивалась с 94 до 99% (таблица 6), соответственно. Напротив, в работе [152] для полученных традиционным эмульгированием PLGA микросфер с включенным противоопухолевым агентом гефитинибом, относящимся также ко II классу по биофармацевтической классификации, показана противоположная зависимость: с увеличением размера микросфер от 5 до 130 мкм эффективность включения увеличилась от 33 до 84%. Такие различия могут быть связаны с разными механизмами формирования эмульсии и приложенными силами. В случае получения эмульсии в микрофлюидном чипе, уменьшение

площади поверхности контакта капли с внешней водной фазой приводит к более быстрому формированию полимерной оболочки вокруг капли и удерживанию внутри рилпивирин.



PLGA-RPV-1

PLGA-RPV-2

PLGA-RPV-3

Рисунок 14 – Оптические фотографии микросфер, полученных из высокомолекулярного PLGA (76-115 кДа) 75:25 со сложноэфирной группой: PLGA-RPV-1 – 69 мкм, PLGA-RPV-2 – 43 мкм, PLGA-RPV-3 – 34 мкм; цифровой микроскоп Meros High Speed Digital (Великобритания)

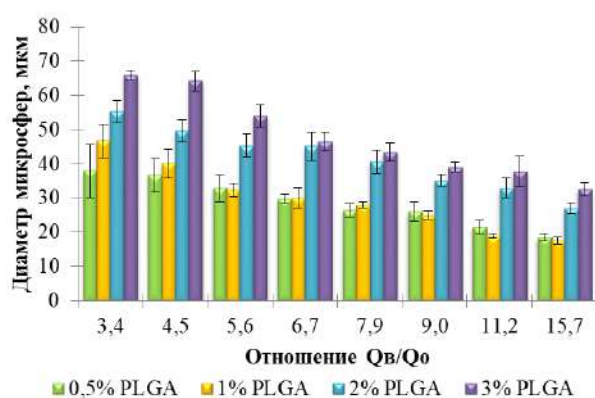
Таблица 6 – Характеристика PLGA микросфер с рилпивирин в зависимости от отношения Q_B/Q_0 ($n=3$)

№	Q_0 , мкл/мин	Q_B , мкл/мин	Q_B/Q_0	$DL_{теор}$, %	$DL_{практ}$, %	ЕЕ, %	$D_{ср}$, мкм	CV, %
PLGA-RPV-1	8,9	30	3,4	13,8	12,9±0,3	93,8±2,0	66,8±3,3	4,9
PLGA-RPV-2	8,9	60	6,7	13,8	13,4±0,2	97,5±1,8	42,7±0,6	1,4
PLGA-RPV-3	8,9	100	11,2	13,8	13,5±0,3	98,5±1,9	33,6±0,9	2,7

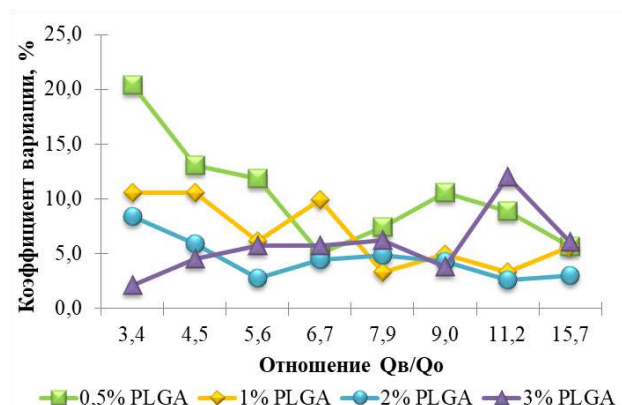
Таким образом, установлено, что увеличение соотношения скоростей потоков водной и органической фаз Q_B/Q_0 от 3,4 до 15,7 приводит к уменьшению среднего размера микросфер и коэффициента вариации. Также установлена линейная зависимость среднего размера микросфер от среднего размера капель эмульсии, что в дальнейшем позволит прецизионно настраивать заданный размер микросфер. Кроме того, установлена обратная зависимость эффективности включения рилпивирин от размера микросфер: с уменьшением размера от 67 до 34 мкм эффективность включения рилпивирин увеличилась с 94 до 99%.

3.2.3 Влияние концентрации PLGA на характеристики микросфер, нагруженных рилпивирин

Широко известно, что существенное влияние на размер микрочастиц оказывает концентрация полимера в органической фазе [153]. Нами было проведено исследование зависимости размера микросфер от концентрации PLGA в органической фазе. Из рисунка 15 а видно, что с увеличением концентрации PLGA средний диаметр микросфер увеличивался. Таким образом, например, при соотношении скоростей потоков Q_v/Q_o 5,6 при изменении содержания PLGA от 0,5 до 3 масс.% можно получить микросферы с диаметром от 32 ± 2 мкм до 54 ± 3 мкм. Аналогичные результаты были получены для других PLGA микросфер в работах [154,155].



а



б

Рисунок 15 – Зависимость среднего диаметра микросфер (а) и коэффициента вариации (б) от концентрации PLGA в органической фазе [139]

Также следует отметить, что с увеличением концентрации PLGA в органической фазе происходит уменьшение коэффициента вариации (то есть полидисперсности), что особенно хорошо показано при меньшем отношении расходов водной и органической фаз (Q_v/Q_o 3,4 и 4,5, рисунок 15 б). Следовательно, при более высоком содержании PLGA (2 и 3 масс.%) образуются более монодисперсные микросферы.

Таким образом, для дальнейшего получения PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринном, была выбрана концентрация PLGA в органической фазе 2 масс.% и соотношение скоростей потоков Q_v/Q_o 6,7, на основании самого низкого коэффициента вариации.

3.2.4 Влияние содержания рилпивиринна на характеристики PLGA микросфер

Влияние содержания рилпивирин в органической фазе (загрузки) на размер микросфер и эффективность включения рилпивирин в микросферы изучали для микросфер, полученных при соотношении скоростей Q_b/Q_o , равном 6,7. При этом органическая фаза состояла из 2 масс.% раствора PLGA в этилацетате, водная фаза из 2 масс.% раствора ПВС. Как видно из таблицы 7, изменение содержания рилпивирин от 1 до 3 мг/мл (соответствующее изменению массового соотношения рилпивирин-PLGA от 1/20 до 1/6) практически не повлияло на размер образующихся микросфер, средний диаметр которых составил 42-45 мкм. При этом следует отметить, что различия в коэффициентах вариации в данном случае связаны с флуктуациями потока, вызванными появлением пузырьков воздуха в микроканале, и как следствие, повышением давления.

Таблица 7 – Характеристика PLGA микросфер в зависимости от загрузки рилпивирин (n=3)

№	Концентрация РПВ в ОФ, мг/мл ЭА	РПВ/PLGA, м/м	DL _{теор} , %	DL _{практ} , %	ЕЕ, %	D _{ср} , мкм	CV, %
PLGA-RPV-4	1,0	1/20	4,0	0,4±0,1	9,5±1,1	45,1±2,1	4,7
PLGA-RPV-5	1,9	1/11	8,0	7,8±0,4	96,9±1,5	45,4±3,9	8,7
PLGA-RPV-2	3,2	1/6	13,8	13,4±0,2	97,5±1,2	42,7±0,6	1,4

РПВ – рилпивирин

В то же время, эффективность включения рилпивирин в PLGA микросферы значительно возросла при повышении концентрации рилпивирин в органической фазе с 1 до 3,2 мг/мл. Низкая эффективность включения рилпивирин (0,4%) при низком его содержании, вероятно, связана с диффузией рилпивирин в приемную среду одновременно с этилацетатом при формировании внешней полимерной оболочки микросфер. Этот факт может свидетельствовать о низком сродстве рилпивирин к PLGA и более высоком сродстве к растворителю. Увеличение концентрации рилпивирин в органической фазе до более чем 3,2 мг/мл привело к насыщению этилацетата и образованию S/O (solid in oil) дисперсии рилпивирин в растворителе. В фармацевтической технологии такой прием применяют для увеличения содержания лекарственного вещества в микросферах и эффективности его включения [156]. Однако, в случае использования микрофлюидной системы для получения PLGA микросфер повышение содержания рилпивирин в органической фазе выше его растворимости привело, во-первых, к закупориванию микроканалов чипа в результате агрегации частиц рилпивирин, а во-вторых, к седиментационной неустойчивости частиц рилпивирин в органической фазе.

Таким образом, увеличение содержания рилпивирин в органической фазе, соответствующее уменьшению массового соотношения рилпивирин-PLGA, привело к увеличению эффективности включения рилпивирин в PLGA микросферы. Тем не менее, загрузка и эффективность включения ограничены растворимостью лекарственного вещества в используемом органическом растворителе.

Судя по результатам оптимизации процесса получения микросфер, нагруженных рилпивирин, существенное влияние на такие характеристики PLGA микросфер, как средний размер и полидисперсность (коэффициент вариации), оказывает соотношение скоростей потоков водной и органической фаз (Q_v/Q_o), а также содержание PLGA в органической фазе. Варьирование параметров Q_v/Q_o от 3,4 до 15,7 и концентрации PLGA от 0,5 до 3 масс.% позволяет получить микросферы в диапазоне размеров от 18 до 66 мкм. Тогда как на эффективность включения рилпивирин в микросферы влияет размер микросфер и содержание рилпивирин в органической фазе. Для дальнейшего получения PLGA микросфер с максимальной эффективностью включения рилпивирин были выбраны следующие параметры: 2 масс.% раствор PLGA в этилацетате с концентрацией рилпивирин 3,2 мг/мл в качестве органической фазы, и 2 масс.% водный раствор ПВС (9-10 кДа).

3.2.5 Получение PLGA микросфер, нагруженных рилпивирин

Для дальнейшего изучения свойств полилактидной матрицы, оказывающих значимое влияние на высвобождение рилпивирин, получали микросферы из различных полимеров PLGA, отличающиеся по структуре концевой группы: $-\text{COOH}$ или $-\text{CH}_3$, молекулярной массе: 68 и 76-115 кДа, стехиометрическому соотношению лактид/гликолид: 50:50 и 75:25. PLGA микросферы с рилпивирин получали по разработанной ранее методике: 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 со средним размером 40 мкм, узким распределением по размерам ($\text{CV} < 5\%$) (таблица 8) и высокой эффективностью включения рилпивирин более 90%. Следует отметить, что в случае использования PLGA 50:50 с карбоксильной концевой группой включение рилпивирин в микросферы было выше на 5% (102% против 97%), что можно объяснить образованием дополнительных межмолекулярных водородных связей $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ между молекулой рилпивирин и PLGA. Микрофотографии PLGA микросфер, полученные с помощью СЭМ,

представлены на рисунке 16. Частицы имели узкое распределение по размерам, сферическую форму и плотную структуру.

Таблица 8 – Характеристика PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринном

№	Характеристика PLGA			DL _{теор} , %	DL _{практ} , %	EE, %	D _{ср} , мкм	CV, %
	Mw, кДа	L/G	концевая группа					
PLGA-RPV-1	117	75:25	сложноэфирная (-CH ₃)	13,8	12,9±0,3	93,8±2,0	66,8±3,3	4,9
PLGA-RPV-2				13,8	13,4±0,2	97,5±1,8	42,7±0,6	1,4
PLGA-RPV-3				13,8	13,5±0,3	98,5±1,9	33,6±0,9	2,7
PLGA-RPV-6	117	75:25	сложноэфирная (-CH ₃)	13,9	13,1±0,6	94,7±1,7	41,7±1,5	3,7
PLGA-RPV-7	64,7	75:25	сложноэфирная (-CH ₃)	13,9	12,6±0,2	90,9±1,5	45,8±1,1	2,4
PLGA-RPV-8	44,1	50:50	сложноэфирная (-CH₃)	7,4	7,2±0,1	96,5±1,5	39,3±1,8	4,7
PLGA-RPV-9	42,2	50:50	карбоксильная	7,3	7,4±0,1	101,8±0,9	41,4±1,2	3,0

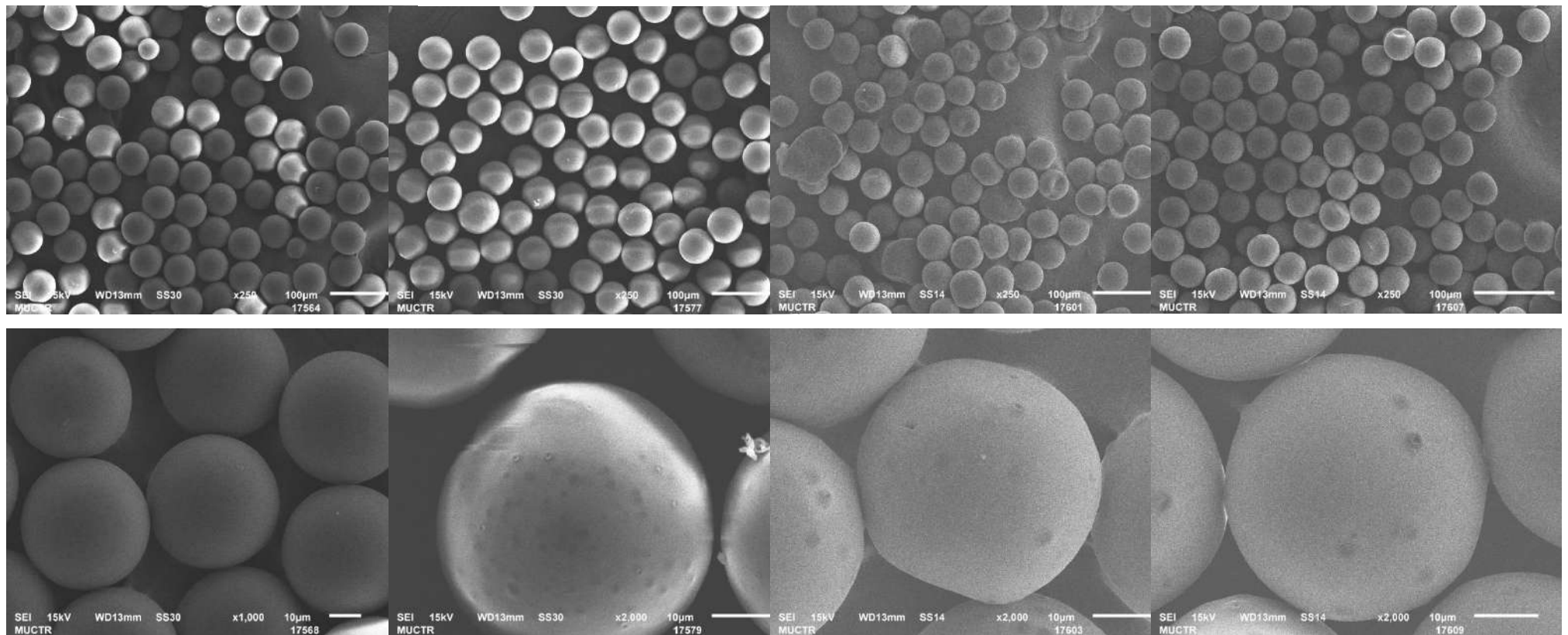
**PLGA-RPV-6****PLGA-RPV-7****PLGA-RPV-8****PLGA-RPV-9**

Рисунок 16 – Микрофотографии PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринном, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина): PLGA-RPV-6 – PLGA (117 кДа) 75:25 со сложноэфирной группой; PLGA-RPV-7 – PLGA (64,7 кДа) 75:25 со сложноэфирной группой; PLGA-RPV-8– PLGA (44,1 кДа) 50:50 со сложноэфирной группой; PLGA-RPV-9 – PLGA (42,2 кДа) 50:50 с карбоксильной группой

3.3 Получение составов для формирования *in situ* имплантатов, нагруженных рилпивиринном

Результаты, изложенные в настоящем разделе, описаны в статье [157]. В настоящем исследовании интерес представляли *in situ* формирующиеся имплантаты на основе PLGA. Такие 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 депо-форм этого типа являются относительно простая технология получения и менее инвазивная процедура введения [25,75]. Так, например, авторами [20,131] были получены *in situ* имплантаты на основе PLGA, нагруженные рилпивиринном и/или долутегравиром. Исследование фармакокинетики показало, что при однократном введении имплантаты обеспечивали концентрацию рилпивиринна в плазме в течение 180 дней превышающую в несколько раз PA-IC90.

Ключевым параметром *in situ* имплантатов так же, как и микросфер, является скорость высвобождения ЛВ из носителя. Однако если в случае микросфер на скорость высвобождения влияет не только химический состав PLGA, но и размер и полидисперсность, то в случае *in situ* имплантатов значительный вклад в профиль высвобождения вносит именно состав имплантата, поскольку от состава зависит скорость инверсии фаз [98]. Среди основных факторов, влияющих на скорость высвобождения следует отметить: содержание PLGA в имплантате, молекулярную массу PLGA, структуру концевой группы и соотношение мономеров лактид:гликолид в сополимере [98,158–160]. 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 1,89 сП, которая играет существенную роль при формировании имплантата, а растворимость рилпивиринна в NMP составляет 228 ± 5 мг/мл [131]. Для формирования имплантата раствор полимера в NMP вводили в приемную среду, состоящую из 0,15 М буферного раствора с pH 7,4 (рисунок 17 а). Для повышения растворимости рилпивиринна в модельную среду добавляли Твин 20 до концентрации 20 мг/мл. Использование модельной среды такого состава позволило поддерживать «условия бесконечного разбавления» при изучении скорости высвобождения рилпивиринна из полимерной матрицы. При этом максимально достижимая концентрация рилпивиринна была значительно меньше его растворимости равной $15,12 \pm 0,12$ мкг/мл. На рисунке 17 б показана

форма и размер сформированных имплантатов. Как можно заметить, имплантаты, полученные *in vitro*, не отличаются от имплантатов, полученных *in vivo* (рисунок 17 в).

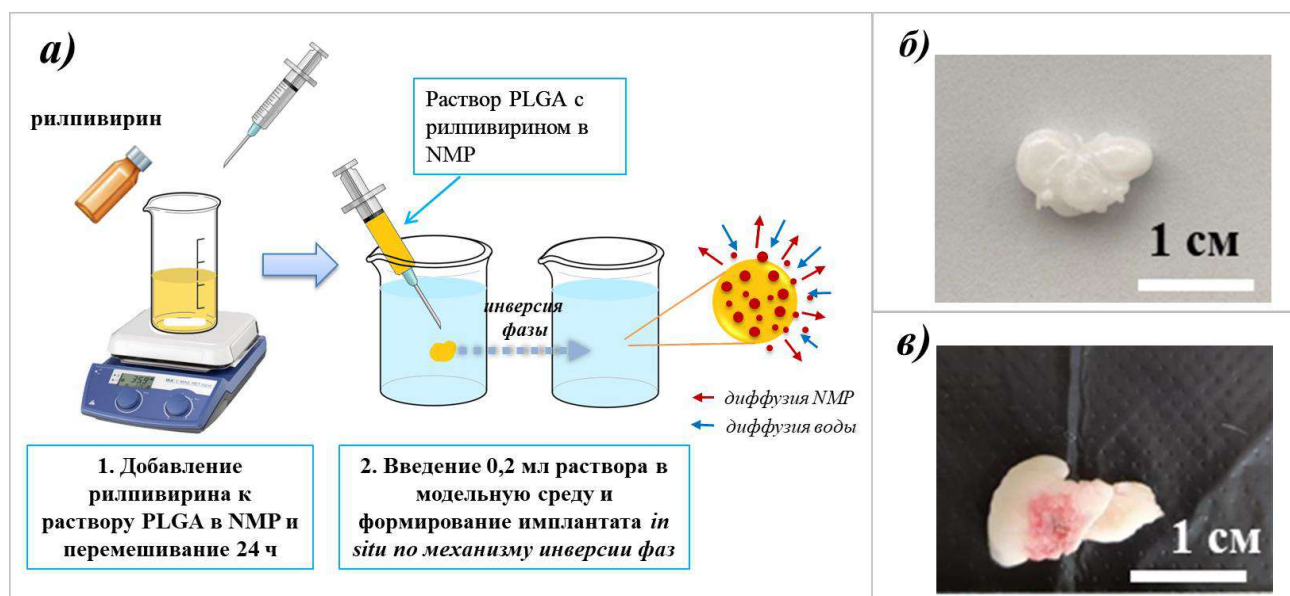


Рисунок 17 – а) Схема формирования *in situ* имплантатов; б) Форма PLGA имплантата, сформированного в буферном растворе *in vitro*; в) Форма PLGA имплантата, сформированного при п/к введении крысе

Выбор концентрации полимера в водимом растворе является одним из основных этапов при разработке инъекционного состава длительного действия, поскольку содержание полимера влияет как на профиль высвобождения лекарства из матрицы носителя, так и на вязкость растворов [78]. Высоковязкие растворы трудно вводить внутримышечно или подкожно через рекомендуемые иглы для инъекций (от 23G до 18G), это может создать дополнительный дискомфорт для пациента и боли в месте инъекции [161]. Для комфортного введения вязких растворов динамическая вязкость должна лежать в пределах от 100 до 1500 сП [162]. Известно, что динамическая вязкость растворов полимера возрастает с увеличением их концентрации. Так, при концентрациях PLGA (L/G 50:50, $\eta = 0.41$ дл/г, сложноэфирная концевая группа) 20 масс.%, 30 масс.% и 40 масс.% динамическая вязкость составила 794,42 сП, 1422,84 сП и 5677,54 сП, соответственно. Для оценки влияния вязкости растворов на структуру имплантатов их морфология была изучена методом СЭМ. Анализ срезов имплантатов (СЭМ изображение на рисунке 18) показывает, что увеличение содержания PLGA в растворе влияет на плотность оболочки имплантата и объем внутренней полости. Использование 20 масс.% раствора PLGA с наименьшей вязкостью привело к получению имплантатов с тонкой пористой оболочкой шириной около 1 мм и большой пустой внутренней полостью. Такая структура имплантата впоследствии может способствовать проникновению воды внутрь и ускорению деградации имплантата. Имплантаты, полученные из 30 масс.% и 40 масс.% растворов PLGA,

характеризуются более плотной и широкой оболочкой с «пальцеобразными» порами и меньшей внутренней полостью. Наличие «пальцеобразных» пор указывает на формирование имплантата по механизму быстрой инверсии фаз.



Рисунок 18 - Микрофотографии PLGA имплантатов, нагруженных рилпивиринном, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина)

Таким образом, для дальнейшего изучения влияния содержания PLGA на скорость высвобождения рилпивиринна исследовали 20, 30 и 40 масс.% растворы PLGA. Окончательный выбор концентрации PLGA, необходимой для легкого введения и формирования имплантата, будет сделан на этапе изучения скорости высвобождения рилпивиринна.

Для изучения свойств полилактидной матрицы, оказывающих значимое влияние на высвобождение рилпивиринна, имплантаты получали из тех же PLGA, что и микросферы. Условия формирования имплантатов показаны в таблице 9.

Таблица 9 – Условия формирования *in situ* имплантатов, нагруженных рилпивиринном

№	Характеристика сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA)			PLGA (масс.%)	NMP (масс.%)	РПВ (мг)
	L:G	концевая группа	Mw (кДа)			
ISFI_1	50:50	сложноэфирная (-CH ₃)	44,1	20	80	1,6
ISFI_2	50:50	сложноэфирная (-CH ₃)	44,1	30	70	1,6
ISFI_3	50:50	сложноэфирная (-CH ₃)	44,1	40	60	1,6
ISFI_4	50:50	сложноэфирная (-CH ₃)	44,1	30	70	1,6
ISFI_5	50:50	карбоксильная	42,2	30	70	1,6
ISFI_6	75:25	сложноэфирная (-CH ₃)	64,7	30	70	1,6
ISFI_7	75:25	сложноэфирная (-CH ₃)	12,5	30	70	1,6
ISFI_8	50:50	сложноэфирная (-CH ₃)	10,3	30	70	1,6

Глава 4 ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЕЙ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ РИЛПИВИРИНА ИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДЕПО-ФОРМ

Был проведен комплексный анализ профилей высвобождения рилпивиринa *in vitro*. Установлены временные промежутки, на которых скорость гидролитической деградации начинает активно участвовать в высвобождении рилпивиринa из полученных полилактидных микросфер и *in situ* имплантатов путем сравнения профилей высвобождения и гидролиза PLGA, а также проведена оценка профилей высвобождения рилпивиринa из тех образцов микросфер и имплантатов, скорость высвобождения которых сопоставима со скоростью растворения референтной формы – аналог препарата Cabenuva®, с использованием математических моделей.

4.1 Разработка метода изучения скорости высвобождения рилпивиринa из депо-форм

Профиль высвобождения ЛВ из парентеральных форм длительного действия (микросферы, *in situ* имплантаты) является ключевым параметром, который влияет на биодоступность лекарственной формы, а также открывает возможность разработки модели IVIVC (*in vitro* / *in vivo* корреляции) с целью дальнейшего прогнозирования фармакокинетики [25,97]. Чтобы предсказать поведение депо-форм *in vivo*, при разработке методов анализа *in vitro* необходимо учитывать различные аспекты, в том числе состав лекарственной формы и условия высвобождения ЛВ. Для парентеральных лекарственных форм с модифицированным высвобождением регламентированы следующие требования к исследованиям: pH среды, осмолярность, температура должны соответствовать физиологическим (pH 7,4, 285 мОм/кг, t 37 °С, соответственно); ЛВ должно оставаться стабильным на протяжении длительного периода; выбранный метод должен сохранять герметичность [163–165]. Для исследования высвобождения ЛВ из парентеральных депо-форм рекомендованы методы в основе которых лежит разделение среды и частиц (например, центрифугирование), а также диализная мембрана и использование проточной ячейки [163]. Однако для каждой конкретной формы требуется подбор экспериментальных условий ввиду существенных различий физико-химических характеристик депо-форм и механизмов высвобождения [166,167]. Поэтому на ранних стадиях разработки подходов к созданию депо-форм необходимо выбрать и оптимизировать метод, наиболее репрезентативный и чувствительный к изменениям свойств исследуемых депо-форм.

В рамках настоящей работы предстояло оптимизировать метод ВЭЖХ-анализа рилпивирин; изучить влияние состава модельной среды, имитирующей физиологические условия (рН 7,4 и 37 °С), и влияние солюбилизующей добавки на кажущуюся растворимость рилпивирин. Поскольку в задачи исследования входило изучение профилей высвобождения рилпивирин в течение длительного времени (более 1 недели), необходимо было также изучить стабильность рилпивирин в выбранной модельной среде в условиях инкубирования (37 °С), а также при хранении (4 °С).

4.1.1 Оптимизация метода ВЭЖХ-анализа рилпивирин

Согласно литературным данным, у рилпивирин существует два стереоизомера, соответствующих двум стереохимическим конфигурациям по двойной связи циановинильной группы E-изомер и Z-изомер [168]. По данным [169] основной активной формой рилпивирин считается E-изомер, поэтому допустимое содержание Z-изомера в субстанции и лекарственной форме не должно превышать 1%. При воздействии света может происходить фотоизомеризация рилпивирин с переходом из E-изомера в Z-изомер (рисунок 19 а). Также, при длительном изучении высвобождения рилпивирин в растворе могут присутствовать как примеси, содержащиеся в исходной субстанции, так и образовываться продукты разложения (рисунок 19 б). Поэтому очень важно иметь методику, позволяющую контролировать стабильность рилпивирин в процессе фармацевтической разработки его лекарственных форм, поскольку фармакопейная методика определения рилпивирин методом ВЭЖХ отсутствует.

Анализ литературных данных показал, что для разделения рилпивирин и его основных примесей широко используют обращенно-фазовую хроматографию, где в качестве неподвижной фазы используют сорбенты с привитыми C18 группами, а в качестве подвижных фаз ацетонитрил или метанол с различными буферными растворами, в том числе фосфатные, ацетатные, сульфатные, с диапазоном рН от 2 до 5 [169–172]. В настоящей работе была использована методика, описанная в работе [169], с модификациями. В качестве подвижных фаз использовали ацетонитрил и воду с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты в качестве ион-парного реагента для улучшения селективности разделения изомеров рилпивирин. Как следует из приведенной на рисунке 20 хроматограммы, выбранные условия хроматографирования позволили добиться селективного разделения пика основного компонента и одной из главных примесей. Сравнение полученных нами хроматографических данных с данными, приведенными в статье [169], позволяет предположить, что пик 1

соответствует примеси рилпивирина – Z-изомеру (время удерживания 15,7 мин), тогда как основному пику рилпивирина (E-изомер) соответствует время удерживания 16,1 мин. Нескорректированное относительное время удерживания (RRT) примеси по рилпивирину составило 1,0, что согласуется с данными, указанными в [169]. Эффективность разделения пика рилпивирина и примеси (разрешение, R_s) составила 1,87.

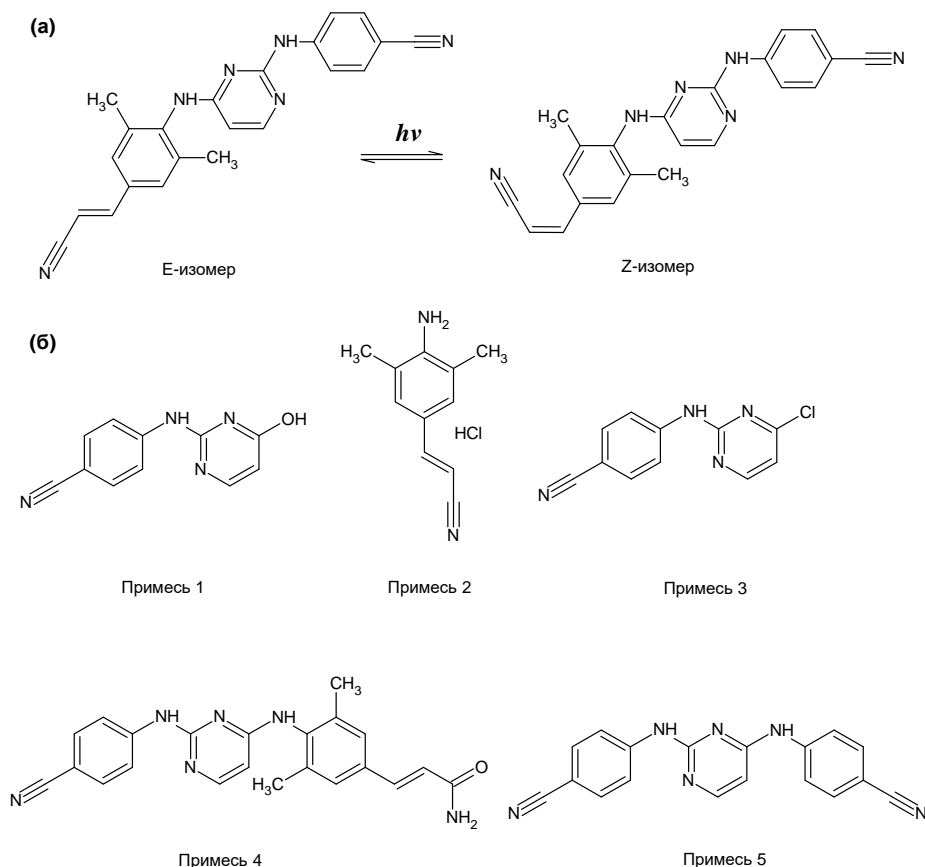


Рисунок 19 – а) Схема транс-цис-изомеризации рилпивирина; б) Структурные формулы основных примесей рилпивирина

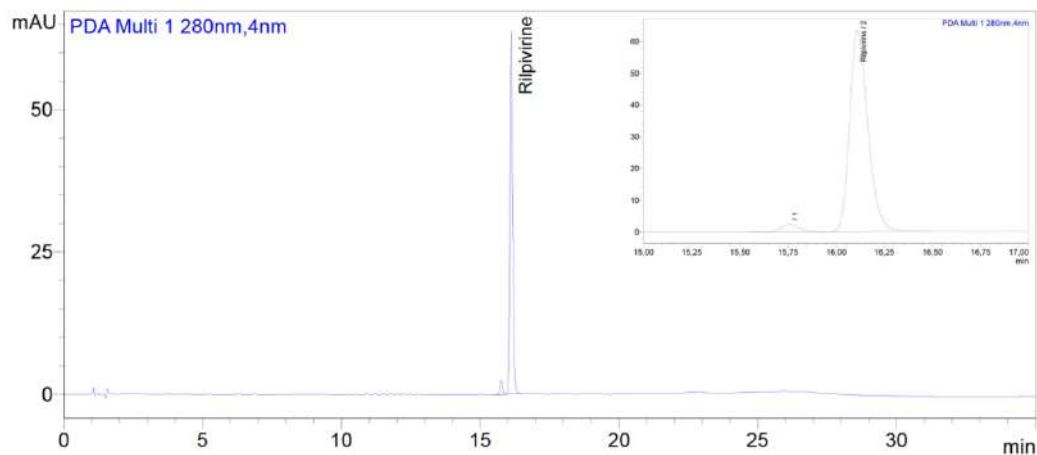


Рисунок 20 – Хроматограмма рилпивирина в 0,15 М фосфатно-солевом буферном растворе pH 7,4 с добавлением Твин 20

Для количественного определения рилпивирин строили калибровочную зависимость площади пика от концентрации рилпивирин ($S = 155894 \cdot C_{\text{рпв}}$, $R^2 = 0,9961$). Линейность градуировочного графика выполнялась в диапазоне концентраций 2 – 50 мкг/мл. Чувствительность методики ВЭЖХ-определения рилпивирин позволяет регистрировать минимально определяемую концентрации - 0,08 мкг/мл.

Таким образом, разработанная методика анализа рилпивирин методом ВЭЖХ может быть пригодна для количественного определения рилпивирин в анализируемых объектах, а также позволяет контролировать стабильность рилпивирин в процессе изучения скорости высвобождения рилпивирин из депо-форм *in vitro*.

4.1.2 Выбор состава модельной среды, имитирующей физиологические условия

Рилпивирин отличается низкой растворимостью в воде и высокой проницаемостью через стенку желудочно-кишечного тракта (II класс в соответствии с биофармацевтической классификацией [133]). В связи с этим низкая растворимость рилпивирин в водных средах накладывает особые требования к составу приемных сред при изучении скорости высвобождения рилпивирин. Из различных параметров, которые могут повлиять на высвобождение ЛВ из депо-формы, выбор модельной среды, имитирующей физиологические условия (рН 7,4 и 37 °С) имеет решающее значение [164]. Для того, чтобы обеспечить непрерывное высвобождение ЛВ, важно поддерживать «условия бесконечного разбавления» (sink conditions). Согласно определению Brown et al., «условия бесконечного разбавления» существуют тогда, когда указанное количество лекарственного вещества полностью (100%) растворяется в приемной среде в концентрации, не превышающей 1/3 концентрации насыщения (то есть растворимости) [173]. Другие авторы рекомендуют поддерживать концентрацию вещества в приемной среде на уровне менее 10% от концентрации насыщения в любой момент времени в процессе изучения высвобождения *in vitro* [174]. Следовательно, важным критерием для выбора модельной среды является достаточная растворимость в ней ЛВ, отсутствие каких-либо взаимодействий ЛВ и буферного раствора, а также отсутствие осадка. Кроме того, чем выше растворимость вещества в выбранном буферном растворе, тем меньше потребуется его объем для поддержания «условия бесконечного разбавления».

Наиболее часто для изучения скорости высвобождения ЛВ *in vitro* используют фосфатный буферный раствор с рН 7,4 [175]. Однако согласно литературным данным и по

результатам собственного эксперимента, растворимость рилпивирин в фосфатном буфере с рН 7,4 была ниже предела обнаружения (таблица 10). Поэтому также была исследована растворимость рилпивирин в 0,1 М HEPES буфере (рН 7,4), 0,1 М MES буфере (рН 7,4) и 0,1 М ацетатном буфере (рН 4,5). Эти буферы также применяются в качестве биологических сред, имитирующих свойства физиологической среды [176]. Результаты определения растворимости показаны в таблице 10. Несмотря на то, что растворимость рилпивирин в 0,1М MES буфере (рН 7,4) и 0,1М ацетатном буфере (4,5) выше, чем растворимость в 0,1М HEPES буфере, эти значения находятся близко к нижнему пределу обнаружения (0,08 мкг/мл) и являются неудовлетворительными, поскольку анализ на грани предела обнаружения будет иметь большую погрешность в определении.

Таблица 10 – Кажущаяся растворимость рилпивирин в модельных средах (n=3)

Буферный раствор	Без ПАВ, мкг/мл	5 мг/мл Твин 20, мкг/мл	20 мг/мл Твин 20, мкг/мл
0,15М фосфатный буфер (PBS), рН 7,4	н.п.о.	3,71±0,16	16,12±0,12
0,1М HEPES буфер, рН 7,4	н.п.о.	3,67±0,08	15,61±0,10
0,1М MES буфер, рН 7,4	1,03±0,28	4,16±0,14	16,16±0,16
0,1М ацетатный буфер, рН 4,5	2,08±0,21	5,05±0,09	19,96±0,21

н.п.о. – ниже предела обнаружения

В случае недостаточной растворимости исследуемых веществ в воде используют среды, содержащие поверхностно-активные вещества [173,177]. В качестве солюбилизаторов могут быть использованы додецилсульфат натрия, цетилтриметиламмония бромид, Твин®, Кремофор®, Тритон®. В данном исследовании для повышения растворимости рилпивирин использовали Твин 20. Как показано в таблице 10, увеличение содержания Твин 20 в растворе от 5 до 20 мг/мл привело к увеличению растворимости рилпивирин в 4 раза (около 4 мкг/мл для 5 мг/мл Твин 20 и около 16 мкг/мл для 20 мг/мл Твин 20), тогда как разницы между составом буферного раствора отмечено не было. Добавление Твин 20 облегчает диффузию и перенос свободного растворенного вещества в водную среду. Тем самым в концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ Твин 20 0,06 мМ) рилпивирин солюбилизируется в мицеллах, что увеличивает его растворимость в среде. Поскольку разница в растворимости между буферными растворами небольшая, то для изучения профилей высвобождения рилпивирин *in vitro* выбрали наиболее широко используемый буферный раствор: фосфатно-солевой буферный раствор рН 7,4 с содержанием 20 мг/мл Твин 20, ввиду соответствия составу биологических жидкостей, простоты его изготовления и дешевизны.

4.1.3 Оценка стабильности рилпивирин в модельной среде

Основная роль модельных сред заключается в моделировании физиологических условий *in vivo*. Однако нестабильность некоторых молекул в условиях инкубирования (37 °С, буферный раствор, рН) может представлять серьезную проблему, особенно при длительном инкубировании [164]. Химическая деградация вещества может начаться в любой момент времени, что в свою очередь может привести к неточным экспериментальным данным. Поэтому важно контролировать и знать стабильность ЛВ в модельной среде.

Стабильность рилпивирин в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) с добавлением 20 мг/мл Твин 20 оценивали методом ВЭЖХ при различных условиях, в том числе: хранение в темноте при 37 °С (в условиях инкубирования) и при 4 °С (в условиях холодильника), а также на свету при комнатной температуре. Известно, что при воздействии света может происходить транс-цис-изомеризация рилпивирин [169]. Так, авторы установили, что при воздействии УФ лампой на раствор рилпивирин в плазме в течение 24 ч 65% Е-изомера превратилось в Z-изомер. Однако исследований превращения одной формы рилпивирин в другую в литературе найдено всего одно. В настоящей работе при изучении стабильности рилпивирин на свету при комнатной температуре наблюдали превращение Е-изомера в Z-изомер через 1 ч – 27,5%), 2 ч – 32,2%, 4 ч – 36,8% и 8 ч – 45,2%, что коррелирует с литературными данными [169]. Напротив, в темноте рилпивирин оставался более стабильным при температуре 4 °С. В течение 4 месяцев содержание рилпивирин снизилось всего на 0,8%. Тогда как в условиях инкубирования при 37 °С концентрация рилпивирин в растворе снизилась на 5,2% в течение 1 недели, что указывает на то, что со временем в растворе при нагревании начинается процесс деградации молекулы.

Таким образом, молекула рилпивирин сохраняла свою стабильность только в темноте при пониженной температуре (4 °С) в течение 4 месяцев. Степень превращения рилпивирин на свету составляла 45,2% в течение 8 ч, тогда как в темноте при 37 °С – 5,2% в течение 7 дней. Поэтому при дальнейшем исследовании профилей высвобождения рилпивирин из его депозитов *in vitro* для снижения накопления продуктов разложения рилпивирин в модельной среде необходима полная смена среды каждые 7 дней, а также проведение исследований в темноте.

4.2 Изучение факторов, влияющих на профиль высвобождения рилпивирин, из полилактидных депо-форм *in vitro*

Результаты, изложенные в настоящем разделе, описаны в статье [157]. Согласно проведенному анализу литературы, изучение скорости высвобождения ЛВ из инъекционных депо-форм является главной и неотъемлемой задачей фармацевтической разработки. Известно, что основной вклад в кинетику высвобождения вносит процесс гидролитической деградации полимерного носителя, протекающий параллельно с высвобождением. Среди основных факторов, влияющих на эти процессы следует отметить: размер (для микросфер) и химическую структуру PLGA, в том числе молекулярную массу PLGA, природу концевой группы и соотношение мономеров лактид:гликолид в сополимере [84]. Характеристика микросфер и имплантатов представлена в таблице 8 (стр. 67) и 9 (стр. 71). При изучении механизма высвобождения рилпивирин из полимерных форм сравнивали профили высвобождения ЛВ с профилями гидролитической деградации носителей в буферном растворе при 37 °С. Растворимость рилпивирин составляла $16,12 \pm 0,12$ мкг/мл, что позволило поддерживать «условия бесконечного разведения». Доза рилпивирин для всех депо-форм составляла 1,6 мг. Выбирая полимерный состав депо-форм рилпивирин стремились к получению монофазного профиля высвобождения.

4.2.1 Высвобождение рилпивирин из PLGA микросфер

4.2.1.1 Влияние размера микросфер на профиль высвобождения их рилпивирин

Как следует из обзора литературы [84], влияние размера микросфер на профиль высвобождения лекарственного вещества, а также профиль гидролитической деградации, не так однозначен, как можно было бы ожидать. При оценке влияния размера микрочастиц на скорость его гидролиза следует учитывать два фактора: 1) при уменьшении размера микросфер увеличивается соотношение площади поверхности к объему, что приводит к увеличению скорости гидролитической деградации микросфер; 2) при увеличении размера ускоряется закисление ядра микрочастиц, что связано с замедлением скорости диффузии продуктов гидролиза из частиц. Закисление ядра частицы также приводит к ускорению ее гидролитической деградации. И как следствие, эти факторы ускоряют скорость высвобождения лекарственного вещества. Для подтверждения гипотезы были получены PLGA микросферы различного размера: PLGA-RPV-1 со средним размером $66,8 \pm 3,3$ мкм, PLGA-RPV-2 –

42,7±0,6 мкм, PLGA-RPV-3 – 33,6±0,9 мкм. PLGA микросферы получали при одинаковых условиях из высокомолекулярного PLGA (75-115 кДа) 75:25 с концевой сложноэфирной группой. Характеристика микросфер, нагруженных рилпивиринном, показана в таблице 8 (стр.67).

Результаты исследования показали, что увеличение размера микросфер от 34 до 67 мкм привело к замедлению скорости высвобождения рилпивиринна, начиная с 8 дня по 47 день. В течение 47 дней из PLGA микросфер с размером 34 мкм высвободилось 28% рилпивиринна, что на 6% больше, чем из микросфер с размером 43 и 67 мкм (рисунок 21). Незначительное ускорение высвобождения рилпивиринна из микросфер меньшего размера может быть связано с уменьшением диффузионного пути ЛВ в микросферах меньшего размера из-за увеличенного соотношения площади поверхности к объему [84]. Как следствие, увеличивается коэффициент диффузии ЛВ через полимерную матрицу. К аналогичным выводам пришли авторы в работе [152]. Так, уменьшение размера PLGA микросфер от 100 до 20 мкм привело к ускоренному высвобождению гефитиниба, включенного в матрицу микросфер: через 10 дней из микросфер с размером <20 и 20-50 мкм высвободилось 100% гефитиниба, тогда как из микросфер с размером 50-100 мкм и > 100 мкм – меньше 20% и меньше 10%, соответственно. Авторы так же отмечают, что профиль высвобождения гефитиниба из микросфер больше 50 мкм характеризовался начальной лаг-фазой, тогда как профиль высвобождения ЛВ из микросфер размером меньше 50 мкм соответствовал двухфазному высвобождению. Похожие результаты были получены и для других PLGA микросфер [92]. Действительно, в настоящем исследовании микросферы большего размера (43 и 67 мкм) также обладали более продолжительной лаг-фазой (18, 25 и 27 дней для PLGA-RPV-3, PLGA-RPV-2 и PLGA-RPV-1, соответственно). Во время лаг-фазы не отмечено резкого высвобождения рилпивиринна, что указывает на равномерное распределение рилпивиринна внутри микросфер и отсутствие его на поверхности. Аналогичные наблюдения были сделаны для PLGA микросфер с включенным бупивакаинном (II класс согласно биофармацевтической классификации), полученных с использованием микрофлюидной системы [178]. Так, на профиле высвобождения бупивакаина, включенного в монодисперсные микросферы размером 41 мкм, также отсутствовала фаза быстрой диффузии и микросферы высвобождали ЛВ равномерно: в течение 33 дней высвободилось всего 12 % бупивакаина.

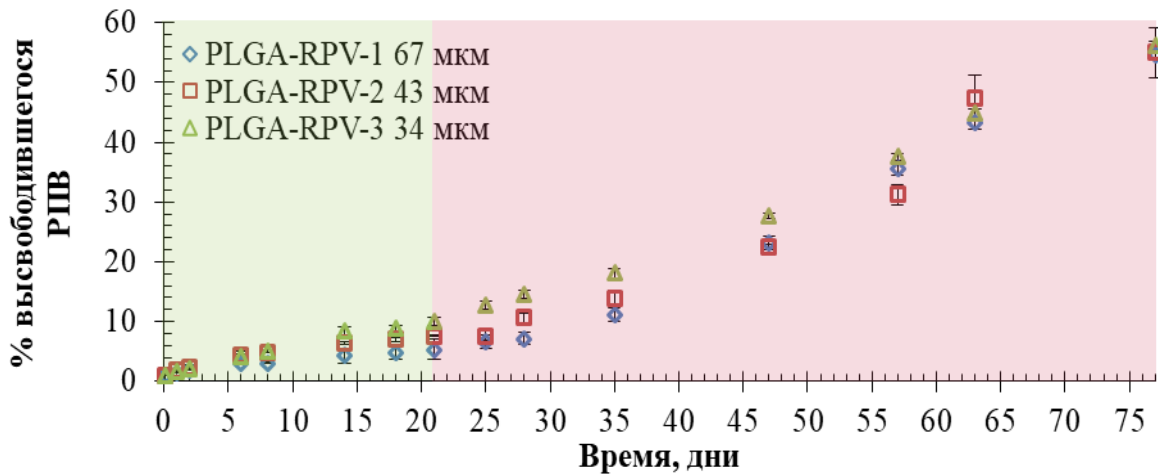


Рисунок 21 – Профили высвобождения рилпивирина из PLGA микросфер различного размера; n=3

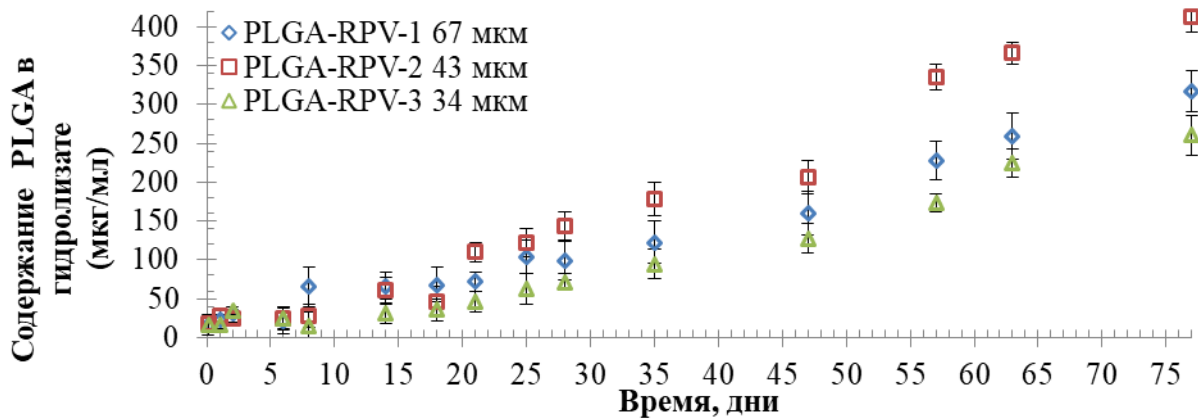


Рисунок 22 – Профили гидролитической деградации PLGA микросфер разного размера; n=3

Напротив, отмечены значимые различия профилей гидролитической деградации (рисунок 22): гидролиз PLGA происходил быстрее в случае микросфер размером 43 мкм, по сравнению с микросферами размером 67 мкм. Однако с увеличением размера частиц должно происходить закисление ядра микросфер вследствие накопления продуктов гидролиза внутри микросфер, что наоборот должно способствовать разложению [92]. Это противоречие может быть связано с тем, что молекула рилпивирин проявляет амфотерные свойства в зависимости от значения pH среды (рисунок 23). Согласно расчетным данным, полученным с использованием программного обеспечения Chemicalize (Chemaxon, <https://chemicalize.com>), изоэлектрическая точка рилпивирин находится в диапазоне pH от 8 до 8,4. При снижении pH от нейтрального значения 7,4 за счет образования продуктов гидролиза PLGA, содержащих -COOH группы, может происходить протонирование азота в пиримидиновом кольце рилпивирин и увеличение доли катионов внутри ядра частиц. Вероятно, чем интенсивнее

происходит закисление ядра микросфер, тем быстрее протонируется рилпивирин и pH внутри микросфер смещается в сторону нейтральных значений. Поэтому микросферы размером 67 мкм разрушаются медленнее, чем микросферы размером 43 мкм. По-видимому, молекула рилпивирин может связывать образующиеся протоны, тем самым препятствуя или замедляя действие автокаталитического эффекта в процессе гидролиза PLGA из микросфер с размером 67 мкм. Анализ СЭМ изображений (рисунок 24) также показал, что к 77 дню инкубации микросферы PLGA-RPV-2 с размером 43 мкм подверглись объемной эрозии быстрее.

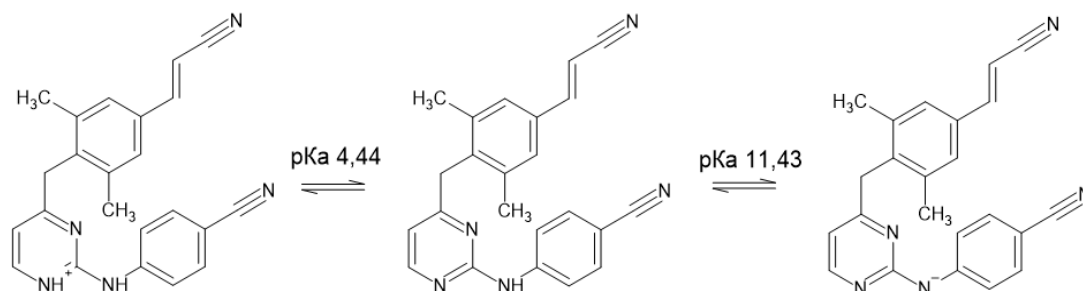


Рисунок 23 – Ионизация молекулы рилпивирин в водных растворах при изменении pH (Chemicalize, <https://chemicalize.com>)

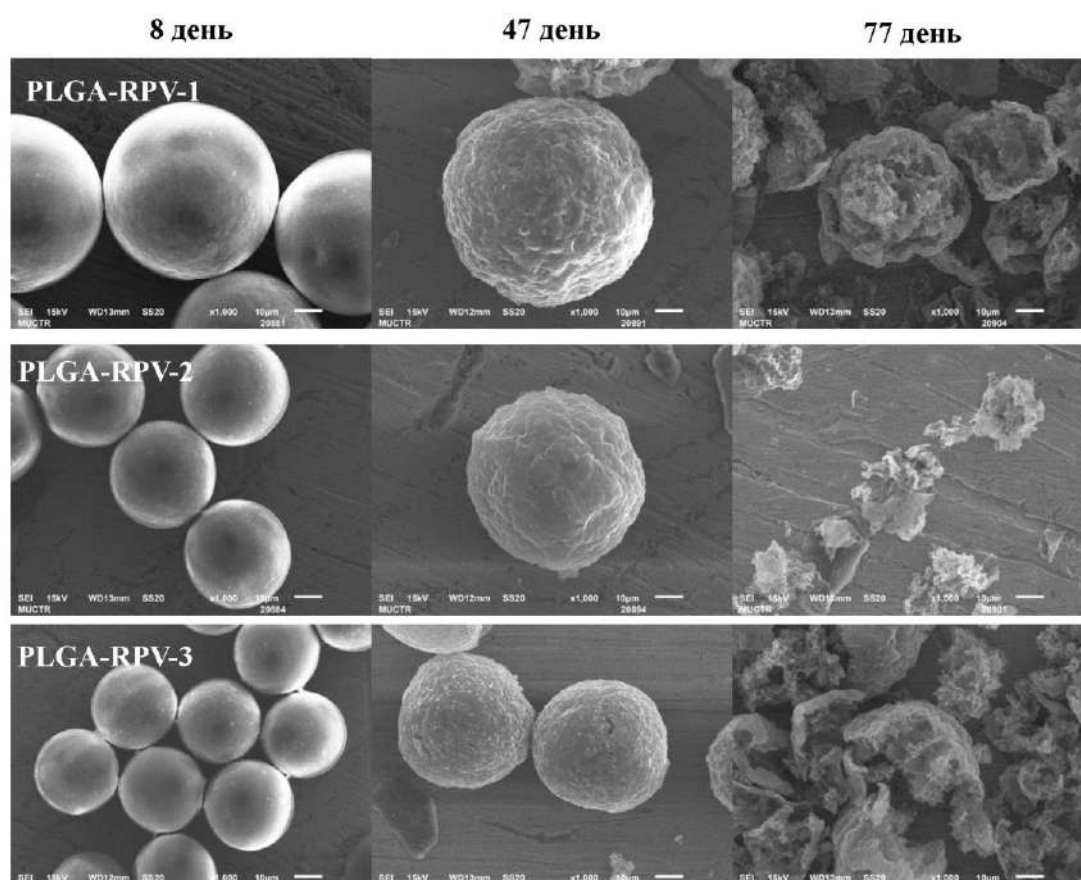


Рисунок 24 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), PLGA микросфер при инкубации в течение 77 дней

Таким образом, профиль высвобождения рилпивирин из узкодисперсных микросфер ($CV < 5\%$) разного размера (34-67 мкм) соответствует профилю отсроченного двухфазного высвобождения: с 1 по 25 день высвободилось до 13% рилпивирин (лаг-фаза), с 25 по 77 день – 56% рилпивирин (степенная фаза) – рисунок 21. В изученном диапазоне размеров существенных различий в профилях высвобождения рилпивирин не установлено. Однако, установлено, что размер микросфер влияет на скорость гидролитической деградации микросфер: увеличение скорости гидролиза PLGA происходит в ряду $43 \text{ мкм} > 67 \text{ мкм} > 34 \text{ мкм}$.

4.2.1.2 Влияние молекулярной массы PLGA на профиль высвобождения рилпивирин из микросфер

Согласно проведенному анализу литературы, полимеры с бóльшей молекулярной массой демонстрируют более низкую скорость гидролитической деградации, и как следствие, высвобождают ЛВ медленнее [179]. Для изучения зависимости профилей высвобождения рилпивирин и профилей гидролитической деградации от молекулярной массы полимера в настоящем исследовании были выбраны PLGA с соотношением L:G 75:25, с концевой сложноэфирной группой, но отличающиеся, согласно сертификатам производителя, по характеристической вязкости, а, следовательно, молекулярной массе: 0,71-1,0 дл/г (75-115 кДа) и 0,50-0,70 дл/г (54-74 кДа), PLGA-RPV-6 и PLGA-RPV-7, соответственно. Микросферы получали в одинаковых условиях для исключения действия других факторов. Точная характеристика PLGA микросфер представлена в таблице 8 (стр. 67).

Как показали результаты исследования, при сравнении профилей высвобождения рилпивирин из микросфер, полученных из PLGA разной молекулярной массы (рисунок 25), высвобождение соответствует профилю отсроченного двухфазного высвобождения. Длительность лаг-фазы составляет 21 день, что коррелирует с полученными ранее данными о высвобождении рилпивирин из микросфер разного размера.

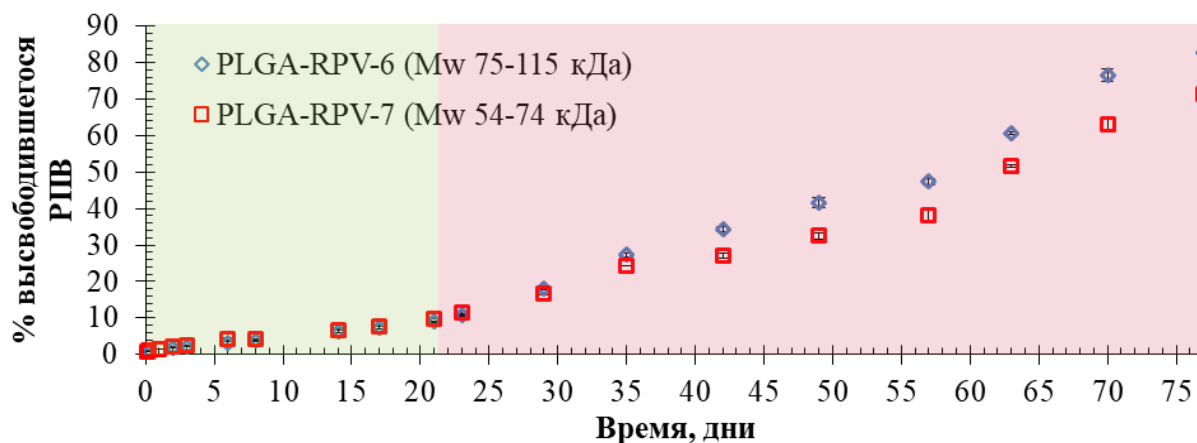


Рисунок 25 – Профили высвобождения рилпивирин из PLGA микросфер, полученных из полимеров с разной молекулярной массой; n=3

Следует также отметить, что высвобождение рилпивирин в течение первых 30 дней не показало значимых отличий для обоих образцов микросфер. Можно предположить, что высвобождение происходило вследствие его медленной контролируемой диффузии через слой полимера и равномерной объемной деградации полимерной матрицы микросфер (рисунок 26). За 30 дней для обоих участвующих в эксперименте микросфер высвобождение рилпивирин составило около 17%. Однако, если сравнивать количество высвободившегося рилпивирин за весь период наблюдения (77 дней), то скорость высвобождения, начиная с 35 дня, выше на ~10% для PLGA-RPV-6, полученных из высокомолекулярного полимера (82,9% для PLGA-RPV-6 по сравнению с 71,3% для PLGA-RPV-7).

Что касается влияния молекулярной массы на скорость гидролитической деградации PLGA микросфер, существенных различий не наблюдали (рисунок 26), вероятно, вследствие близости действительной характеристической вязкости полимеров. Как показано в предыдущем исследовании [180], при сравнении PLGA с одинаковой вязкостью 0,2 дЛ/г (согласно сертификатам производителей) были установлены значительные различия характеристической вязкости, и как следствие, молекулярной массы PLGA. Поэтому несмотря на то, что были выбраны полимеры PLGA близких диапазонов: 54-74 кДа и 75-115 кДа, действительное значение молекулярной массы может находиться близко к правой и левой границе, соответствующих полимеров.

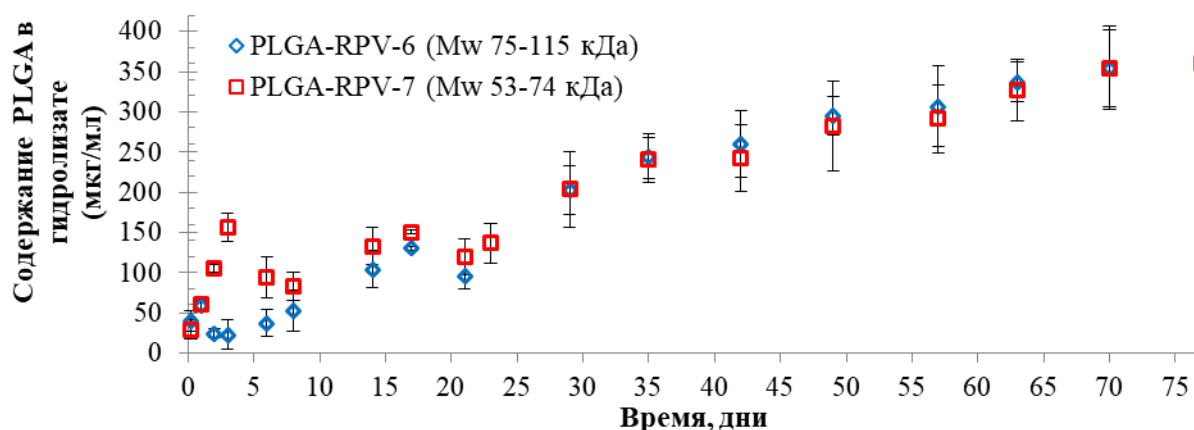


Рисунок 26 – Профили гидролитической деградации микросфер, полученных из PLGA с различной молекулярной массой; n=3

Процесс эрозии PLGA микросфер также наблюдали методом СЭМ, как показано на рисунке 27. Морфологические изменения поверхности микросфер уже были отмечены через 2 недели инкубации при температуре 37 °С и рН 7,4 и увеличивались с течением времени. Через 29 дней (4 недели) инкубации микросферы изменили свою форму, и поверхность стала более ребристой с ярко выраженным рельефом. Существенные различия в размере микросфер были отмечены после 42 дня инкубации. Из рисунка 27 видно, что эрозия была выше для микросфер PLGA-RPV-6, полученных из PLGA (Mw 75-115 кДа).

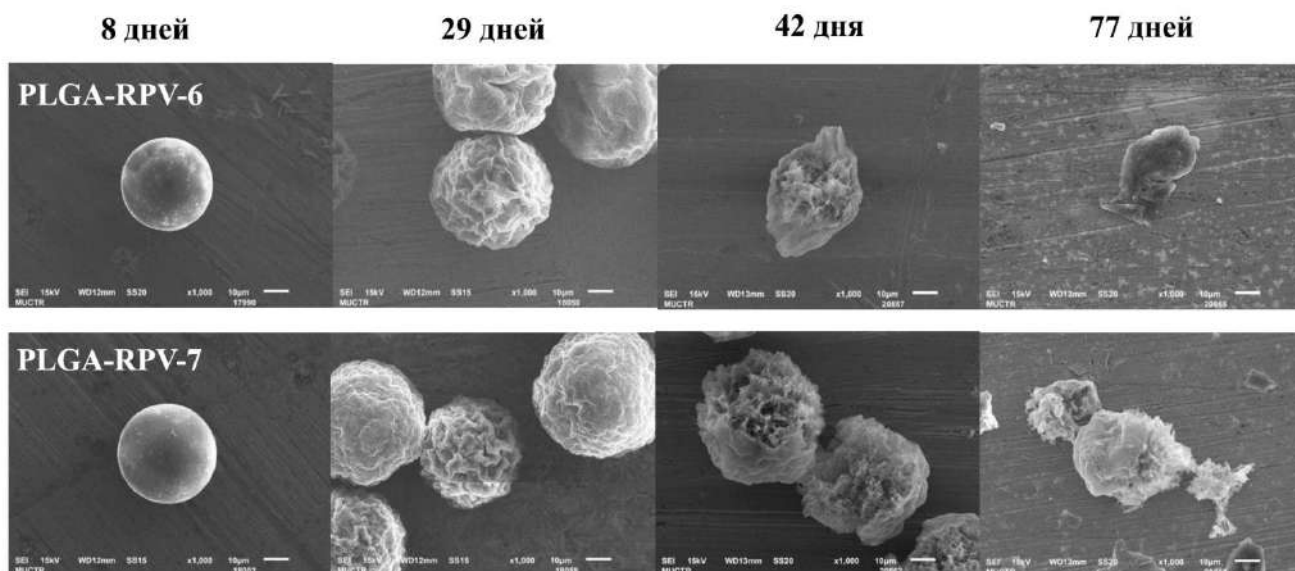


Рисунок 27 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), PLGA микросфер, полученных из полимеров разной Mw при инкубации в течение 77 дней

Таким образом, для микросфер, полученных из PLGA (Mw 75-115 кДа) и (Mw 54-74 кДа) не установлено существенного влияния молекулярной массы полимера на скорость высвобождения из них рилпивирин. Небольшое ускорение высвобождения ($\Delta 10\%$) наблюдали с 42 дня для микросфер, полученных из PLGA (Mw 75-115 кДа), что связано с морфологическими изменениями полимерной матрицы.

4.2.1.3 Влияние соотношения L:G PLGA на профиль высвобождения рилпивирин из микросфер

Поскольку предыдущие исследования показали, что молекулярная масса PLGA вносит несущественный вклад в профиль высвобождения рилпивирин из PLGA микросфер, то для изучения влияния соотношения мономерных звеньев в макромолекуле PLGA этим влиянием можно пренебречь. В качестве полимеров для получения микросфер были выбраны PLGA с концевой сложноэфирной группой, но различным соотношением лактид-гликолид (далее L:G): 38-54 кДа, 50:50 (PLGA-RPV-8) и 54-74 кДа, 75:25 (PLGA-RPV-7). По величине молекулярной массы выбранные образцы можно отнести к группе среднемолекулярных. Характеристика полученных PLGA микросфер представлена в таблице 8 (стр.67).

Как следует из рисунка 28 различия в скорости высвобождения рилпивирин из PLGA микросфер становятся значимыми только после 21 дня инкубации. За 21 день высвободилось от 10% до 14% рилпивирин из микросфер, полученных из PLGA с соотношением L:G 75:25 и 50:50, соответственно. К 49 дню инкубации разница увеличилась и составила 24% (56,5% для PLGA-RPV-8 и 32,5% для PLGA-RPV-7). Так, уменьшение доли молочной кислоты в полимере способствовало увеличению скорости высвобождения рилпивирин на стадии деградации PLGA микросфер. Аналогичные наблюдения были сделаны для PLGA микросфер, нагруженных противоопухолевым агентом финастеридом (II класс согласно биофармацевтической классификации): высвобождение финастерида из микросфер на основе PLGA с долей лактида в макромолекуле 50% (L:G 50:50) и 75% (L:G 75:25) составило 125 мкг/мл через 12 дней и 100 мкг/мл через 28 дней, соответственно [62]. С учетом того, что уменьшение доли молочной кислоты в полимере делает его менее гидрофобным, а следовательно, способным к большему поглощению воды, это явление способствует не только диффузии ЛВ, но и увеличивает его растворение на гидратированной поверхности микросфер. Ближе к 70 дню доля высвободившегося рилпивирин из обоих образцов микросфер достигла 65%. Вероятно, после 57 дней инкубации в микросферах PLGA-RPV-7, полученных из PLGA с

Сравнение полученных данных (рисунок 28) с профилем гидролитической деградации микросфер (рисунок 30) показывает, что высвобождение рилпивирин в первые три недели контролируется диффузией вещества через полимерный слой и гидролитическая деградация не оказывает существенного влияния. Однако, спустя 21 день инкубации была установлена корреляция между профилями высвобождения рилпивирин и профилями гидролитической деградации: гидролиз PLGA происходил с большей скоростью в случае микросфер, полученных из полимера с меньшим содержанием лактида в полимерной цепи (L:G 50:50). Полученные данные согласуется с результатами других авторов, которые также отметили замедление разложения полимера по мере увеличения соотношения L:G из-за присутствия гидрофобной метильной группы в мономере молочной кислоты, что привело к замедлению скорости диффузии воды внутрь микросфер [52].

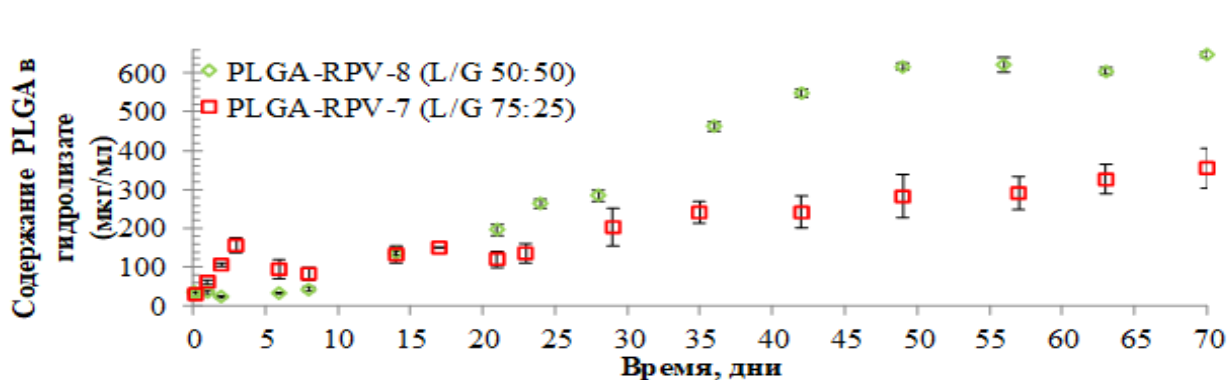


Рисунок 30 – Профили гидролитической деградации микросфер, полученных из PLGA с разным соотношением L:G; n=3

Таким образом, следует сделать вывод, что увеличение гидрофобности PLGA при увеличении доли молочной кислоты в сополимере (75:25 по сравнению с 50:50) замедляет скорость высвобождения рилпивирин из микросфер, начиная с 21 дня, а также замедляет скорость гидролитической деградации и эрозию микросфер.

4.2.1.4 Влияние структуры концевой группы PLGA на профиль высвобождения рилпивирин из микросфер

Наличие в молекулярной структуре PLGA карбоксильных концевых групп, также как и низкая молекулярная масса, делают полимер более гидрофильным, что способствует большему

проникновению воды в ядро микросфер, набуханию частиц, и как следствие, приводит к ускорению скорости гидролитической деградации и скорости высвобождения ЛВ. Кроме того, известно, что наличие карбоксильных групп может способствовать взаимодействию полимера с ЛВ за счет ионных или водородных связей, что также может вносить определенный вклад в профиль высвобождения [181]. В настоящем исследовании было проведено сравнение профилей высвобождения рилпивирин и гидролитической деградации микросфер в зависимости от структуры концевой группы PLGA. В качестве полимеров были выбраны PLGA с соотношением L:G 50:50 с близкой молекулярной массой, но разными концевыми группами: карбоксильной (PLGA-RPV-9) и сложноэфирной (PLGA-RPV-8). Характеристика PLGA микросфер представлена в таблице 8 (стр.67).

Результаты, полученные в течение 77 дней, представлены на рисунке 31. Как следует из данных, высвобождение рилпивирин в течение первых 6 дней не показало значимых отличий для обоих образцов микросфер. Вероятно, высвобождение рилпивирин в течение первой недели контролируется диффузией рилпивирин через полимерную оболочку, как и в случае высвобождения рилпивирин из микросфер, полученных из PLGA с разной молекулярной массой и разного размера. Данное предположение также подтверждается отсутствием существенных различий на 6 день в скорости гидролитической деградации микросфер (рисунок 32). В то же время, увеличение доли карбоксильных концевых групп в полимере, привело к уменьшению длительности начальной лаг-фазы: доля высвободившегося рилпивирин составила 10% через 7 дней для PLGA-RPV-9 (-COOH) и 13% через 21 день для PLGA-RPV-8 (-CH₃).

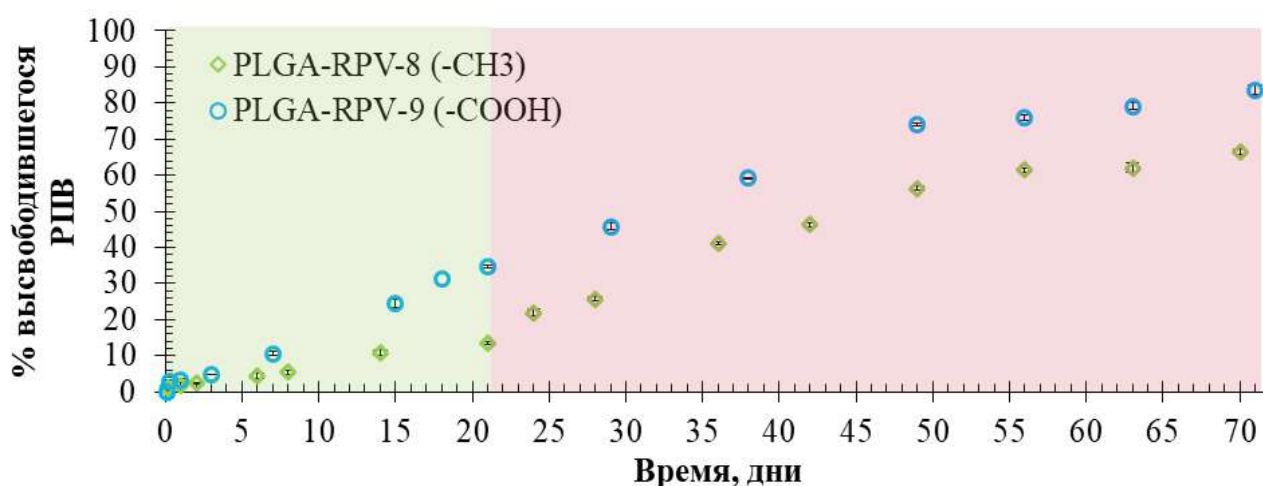


Рисунок 31 – Профили высвобождения рилпивирин из PLGA микросфер, полученных из полимеров с разной концевой группой; n=3

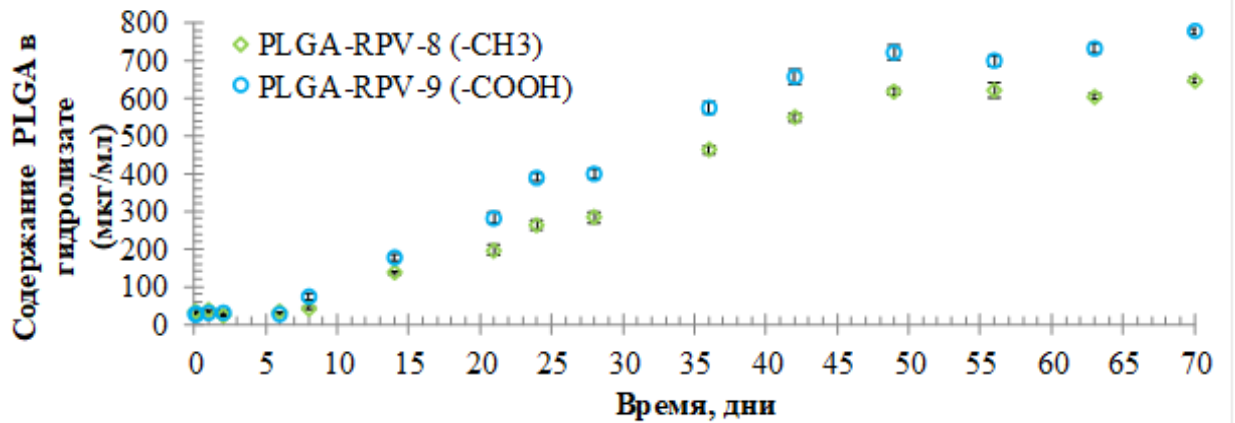


Рисунок 32 – Профили гидролитической деградации микросфер, полученных из полимеров с разной концевой группой; n=3

Значимые различия в профилях высвобождения рилпивирин из PLGA-RPV-8 и PLGA-RPV-9 наблюдали после 8 дня, тогда, когда процесс деструкции полимерной матрицы усилился, что подтверждается профилями гидролитической деградации микросфер (рисунок 32) и СЭМ изображениями (рисунок 33).

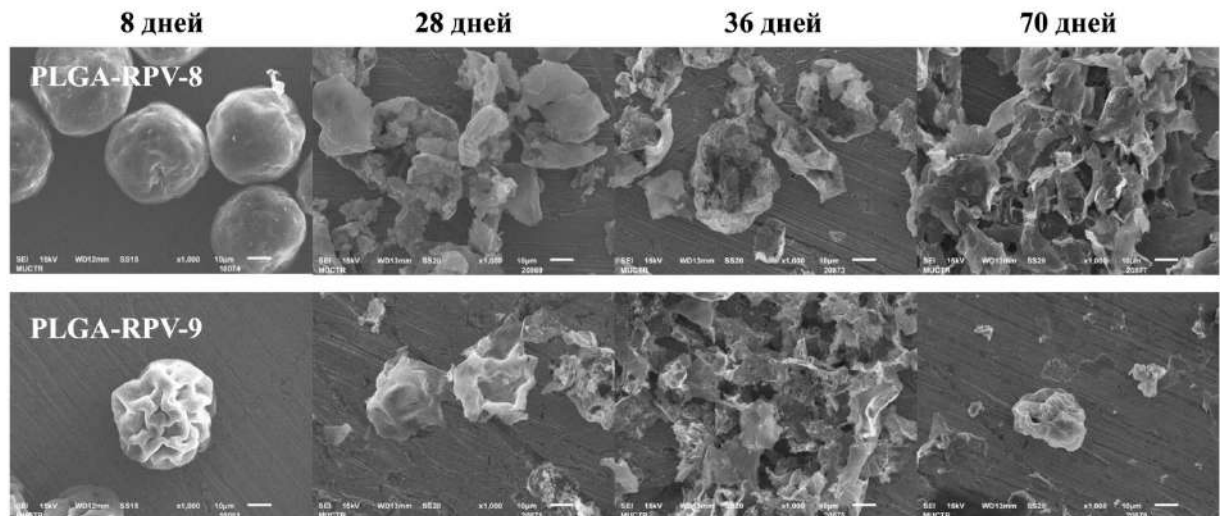


Рисунок 33 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), PLGA микросфер при инкубации в течение 70 дней

Из представленных на рисунке 31 и 32 данных следует, что микросферы PLGA-RPV-8 полученные из PLGA с модифицированными концевыми группами, не имеющего в составе макромолекул карбоксильных групп, высвобождали рилпивирин на стадии деструкции полимера медленнее, чем микросферы, полученные из немодифицированного PLGA (67% рилпивирин высвободилось из PLGA-RPV-8 в течение 70 дней, тогда как из PLGA-RPV-9 84% рилпивирин). Следовательно, возможное в данном случае влияние ионных взаимодействий

кислотно-основного характера между карбоксильными группами PLGA и основными группами молекулы рилпивиринана существенно только в случае увеличения эффективности включения рилпивиринана в микросферы (таблица 8), но не существенно по сравнению с влиянием гидрофобной природы сложноэфирной концевой группы полимера, которая позволяет замедлить проникновение воды в ядро микросфер, тем самым замедляя процесс деградации полимера. Следует отметить, что временные участки наиболее значимых различий в профилях деградации PLGA различной концевой группой и профилей высвобождения рилпивиринана совпадали.

Так, можно утверждать, что влияние гидрофобной природы сложноэфирной концевой группы полимера, которая позволяет замедлить проникновение воды в матрицу микросфер, приводит к замедлению процесса деградации полимера и замедлению скорости высвобождения рилпивиринана из PLGA микросфер на всем временном участке.

Таким образом, наиболее значимыми факторами, оказывающими влияние на скорость деградации полимера, и следовательно, высвобождение рилпивиринана являются доля молочной кислоты в сополимере и гидрофобность концевой группы. Установлено, что доля молочной кислоты 75% и наличие концевой сложноэфирной группы в сополимере позволили замедлить процесс деградации матрицы и снизить скорость высвобождения рилпивиринана в течение 70 дней.

4.2.2 Высвобождение рилпивиринана из PLGA *in situ* имплантатов

4.2.2.1 Влияние содержания PLGA в имплантате на профиль высвобождения рилпивиринана *in vitro*

Высвобождение ЛВ из имплантатов, сформированных методом инверсии фаз, в основном соответствует трехфазному профилю. При этом, в течение первых 24 часов после введения полимерного раствора высвобождение ЛВ 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 разработкой таких имплантатов, заключается в поиске способов снижения бёрст-эффекта. Один из подходов – это увеличение содержания полимера в исходном растворе. Однако, как показали данные вискозиметрии (п.3.2, стр.65), увеличение концентрации PLGA от 20 до 40 масс.% привело к получению очень вязкого раствора, который было довольно

сложно вводить в модельную среду, а следовательно, и внутримышечно. Тем не менее, это способствовало формированию более плотного имплантата (рисунок 18). Поэтому влияние содержания полимера PLGA (50:50, Mw 38-54 кДа, сложноэфирная концевая группа) в имплантате на профиль высвобождения из него рилпивирин и на скорость гидролитической деградации имплантата было изучено для всех концентраций полимера (таблица 9, стр.71).

Как следует из данных, представленных на рисунке 34, высвобождение рилпивирин во всех случаях соответствует трехфазному профилю: в первые 24 ч происходит быстрое высвобождение вещества. Можно полагать, что этот эффект обусловлен быстрой диффузией NMP вместе с ЛВ в окружающую среду с момента введения и до затвердевания имплантата [102]. Затем с 2 по 17 день следует медленное высвобождение рилпивирин, по-видимому, связанное с диффузией рилпивирин из объема матрицы через поры и началом процесса гидролитической деградации полимера. На 20 день начинается более интенсивное высвобождение рилпивирин. Этой стадии соответствуют этапы резкого возрастания содержания продуктов гидролиза полимера в приемной среде (с 20 по 28 день) (рисунок 35), что говорит о начавшемся процессе объемной эрозии имплантатов [182].

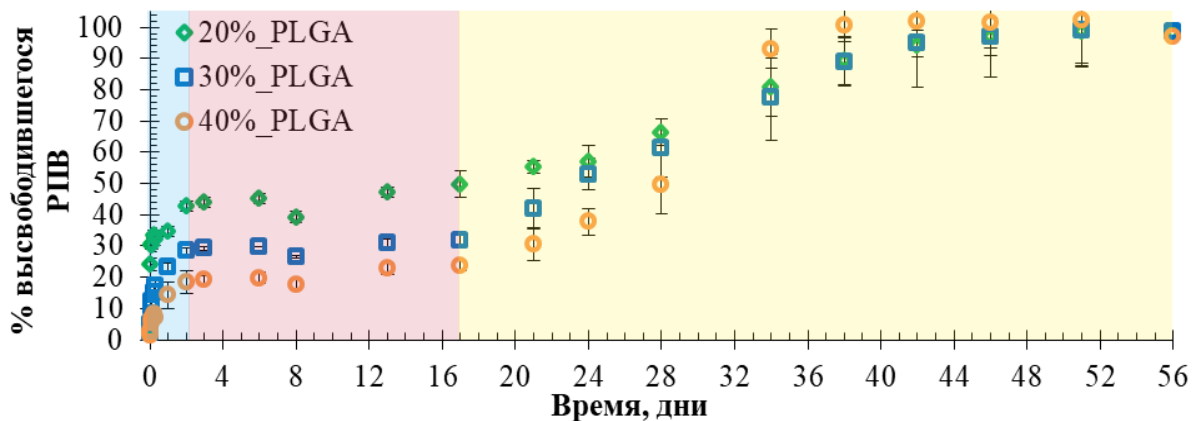


Рисунок 34 – Профили высвобождения рилпивирин из имплантатов с различным содержанием PLGA; n=3 [157]

Как показано на рисунке 34, увеличение содержания PLGA в формирующемся имплантате приводит к снижению фазы неконтролируемого высвобождения рилпивирин в первые 48 ч, вероятно, вследствие снижения скорости инверсии фаз. Действительно, через 48 ч инкубации при 37 °C доля высвободившегося рилпивирин уменьшается с 43% до 18%, соответственно, в ряду от 20 масс.% до 40 масс.% PLGA. Следует отметить, что существенная разница в скорости высвобождения рилпивирин сохраняется в течение 3 недель. По истечении этого времени из имплантатов высвобождается 55%, 42% и 31% рилпивирин в ряду с

20 масс.%, 30 масс.% и 40 масс.% содержанием PLGA, соответственно; в последующий период различия в высвобождении становятся менее существенными. Аналогичная обратная зависимость высвобождения ЛВ от содержания PLGA в имплантате показана Ch. Wischke и соавт. для гидрофобного фенретинида [183]. Исследование высвобождения показало, что увеличение содержания PLGA от 15 до 35 масс.% способствовало снижению фазы неконтролируемого высвобождения с 45% до 10%, соответственно.

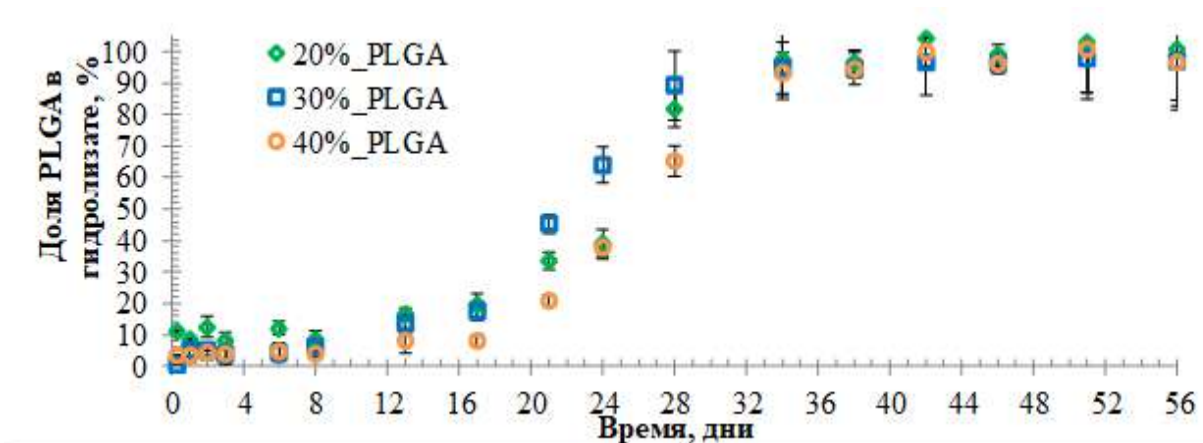


Рисунок 35 – Профили гидролитической деградации имплантатов с различным содержанием PLGA; n=3 [157]

Полное высвобождение рилпивирин из всех имплантатов наблюдалось через 46 дней. Интересно, что, несмотря на скачок на профилях гидролиза имплантатов в период с 21 и по 34 день (рисунок 34), который вероятно свидетельствует об их эрозии и разрушении, увеличение разницы в скоростях высвобождения рилпивирин в этот период не наблюдается. Следует отметить, что увеличение концентрации PLGA в имплантатах не оказывает значительного влияния на скорость их гидролитической деградации; небольшая разница наблюдается лишь на этапе объемной эрозии. Анализ срезов имплантатов методом СЭМ (рисунок 36) также показал, что через 24 дня имплантаты обладали такой же плотной структурой и развитой пористостью, как и через 3 дня инкубации, однако размер пор увеличился, что указывает на начальный процесс гидролитической деградации.

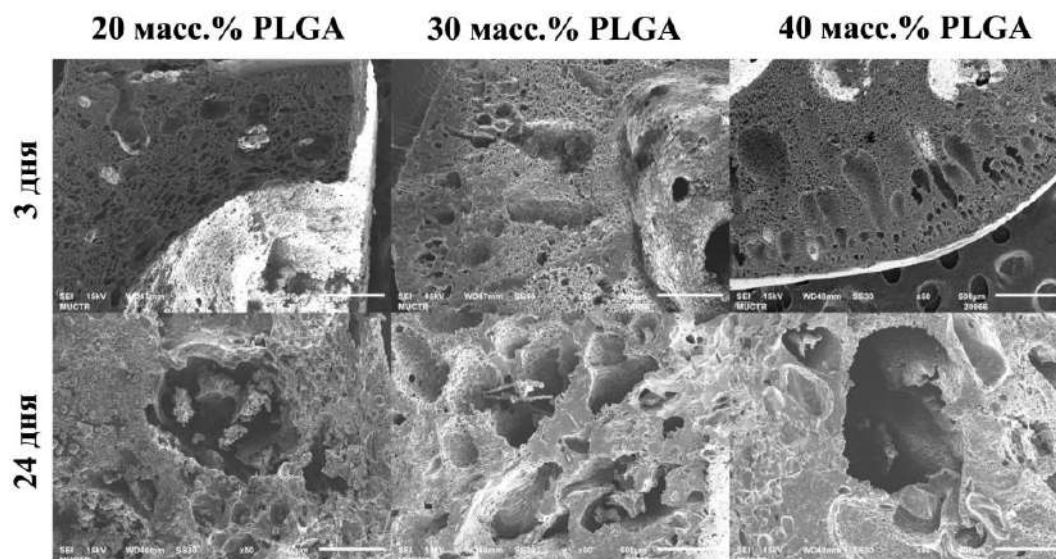


Рисунок 36 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), PLGA имплантатов при инкубации в течение 24 дней [157]

Из представленных выше результатов следует, что увеличение содержания PLGA в имплантате приводит к значимому замедлению скорости высвобождения из него рилпивирин в начальный период. К 21 дню наблюдений из *in situ* имплантатов с 20 масс.% содержанием PLGA высвобождается на 24% больше рилпивирин, чем из имплантатов с его 40 масс.% содержанием. Поскольку 40 масс.% раствор PLGA в NMP обладает высокой вязкостью и требует дополнительных усилий для его введения в приемный раствор, а имплантат, полученный из 20 масс.% раствора PLGA, обладает тонкой оболочкой и в течение первых 48 ч высвобождает более 40% рилпивирин, то для дальнейших экспериментов выбрали раствор с содержанием PLGA 30 масс.%.

4.2.2.2 Влияние молекулярной массы PLGA на профиль высвобождения рилпивирин из имплантата

Изменяя молекулярную массу полимера, можно значительно управлять профилями высвобождения ЛВ. Однако, имеющиеся данные о влиянии молекулярной массы на профиль высвобождения ЛВ из *in situ* имплантатов в экспериментах *in vitro* и *in vivo* весьма противоречивы. Широко известно, что с увеличением молекулярной массы полимера в имплантате высвобождение ЛВ существенно замедляется [79,107,184]. Тем не менее, в ряде

исследований *in vitro* отмечена противоположная тенденция: чем меньше молекулярная масса полимера, тем медленнее происходит высвобождение [185,186]. К.А. Норкин и соавт. связывают этот факт с медленной скоростью инверсии фаз в случае низкомолекулярного полимера [185].

Для установления влияния молекулярной массы PLGA на скорость высвобождения рилпивирин из имплантатов в данном исследовании использовали образцы PLGA (75:25) с концевой сложноэфирной группой и различными вязкостями (0,58 и 0,17 дл/г), которые соответствуют M_w ~68 кДа и 7-17 кДа, согласно сертификатам производителя (таблица 9, стр.71). Полученные профили высвобождения рилпивирин из имплантатов ISFI_6 и ISFI_7 и профили гидролитической деградации приведены на рисунке 37.

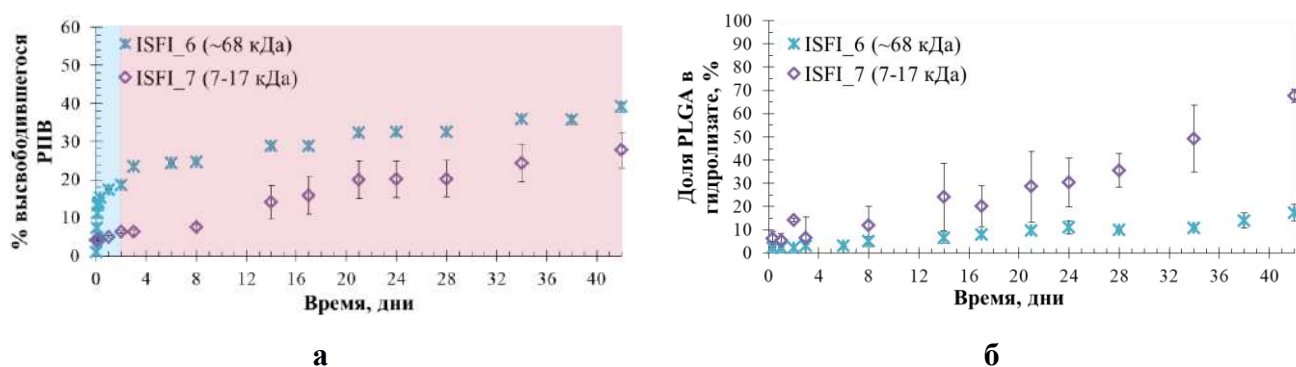


Рисунок 37 – Профили высвобождения рилпивирин (а) и профили гидролитической деградации PLGA (б) из имплантатов, полученных из полимеров с разной молекулярной массой, n=3 [157]

Уже в первые сутки скорость высвобождения ЛВ из имплантатов ISFI_6 с более высокой молекулярной массой оказалась выше (17,5% vs 4,7% для ISFI_7). Это различие, главным образом, объясняется динамикой инверсии фаз, связанной с уменьшением сродства растворителя (N-метил-2-пирролидона) к воде за счет увеличения сродства между растворителем и полимером, что приводит к медленной фазовой инверсии, а значит, медленному осаждению полимера [78,83]. Вероятно, снижение молекулярной массы полимера способствует увеличению сродства PLGA к растворителю и увеличению его растворимости, что приводит к замедлению инверсии фаз. С другой стороны, имплантаты, полученные из низкомолекулярных полимеров, способны к более интенсивному поглощению воды (набуханию). Соответственно, в этом случае приток воды во внутрь имплантата будет выше, чем отток растворителя. Таким образом, имплантаты, полученные из низкомолекулярного PLGA, могут удерживать бóльшую долю растворителя и ЛВ, что также приводит к замедлению скорости инверсии фаз, по сравнению с имплантатами из высокомолекулярного полимера,

демонстрирующими высокую скорость формирования и высвобождения ЛВ [137]. Действительно, мы визуальнo наблюдали интенсивное набухание образца ISFI_7, полученного из низкомолекулярного PLGA, в приемной среде и увеличение его в объеме (данные не представлены). Интересно, что после 3 дня скорость высвобождения рилпивиринa из ISFI_7 была выше и составила 0,46% в сутки, по сравнению с ISFI_6 (0,38% в сутки). Это согласуется с данными [185,186], где во время второй и третьей фаз из низкомолекулярного имплантата высвобождается большее количество ЛВ, чем из высокомолекулярного.

Такая закономерность скорости высвобождения рилпивиринa (%/день) в период с 3 по 42 день коррелирует со скоростью гидролитической деградации имплантатов (рисунок 37 б). Из представленных на рисунке 37 данных видно, что разрушение имплантата происходит быстрее в случае низкомолекулярного ISFI_7, вероятно, за счет большей способности к набуханию, что, в свою очередь, приводит к ускорению гидролитической деградации полимера и высвобождению рилпивиринa. Кроме того, в обоих случаях на профилях отсутствует третья фаза, связанная с периодом объемной эрозии имплантата, что, вероятно, можно объяснить изменением стехиометрического соотношения лактид:гликолид с 50:50 до 75:25, что продлевает период лаг-фазы.

Таким образом, в случае использования PLGA 75:25 с концевыми сложноэфирными группами молекулярная масса PLGA существенно влияет на скорость высвобождения рилпивиринa из имплантата. В проведенном эксперименте за 42 дня % высвободившегося рилпивиринa уменьшился с 39,1 до 27,7% при уменьшении молекулярной массы PLGA. Одновременно удалось уменьшить фазу неконтролируемого высвобождения и добиться равномерной скорости высвобождения, что важно для депо-форм.

4.2.2.2 Влияние структуры концевой группы PLGA на профиль высвобождения рилпивиринa из имплантата

Для формирования имплантатов использовали два типа полилактидов с близкими молекулярными массами (38-54 кДа), но разными концевыми группами: сложноэфирной -CH₃ (ISFI_4) и карбоксильной (ISFI_5) (таблица 9, стр.71). Результаты, полученные в течение 42 дней, представлены на рисунке 38. Профиль высвобождения рилпивиринa, как и в предыдущем эксперименте, соответствует трехфазному. На первом и втором этапах процесса отсутствуют существенные различия в скорости высвобождения рилпивиринa из обоих имплантатов (в первые 24 ч фаза неконтролируемого высвобождения в обоих случаях

составляет около 21%, после чего следует лаг-фаза: высвобождение рилпивирин – около 30% в течение 19 дней), что свидетельствует об отсутствии влияния структуры концевой группы на процесс инверсии фаз, который играет основную роль в высвобождении ЛВ из имплантата в начальный период. Различия в профилях высвобождения рилпивирин из ISFI_4 и ISFI_5 наблюдали лишь после 19 дня на третьей фазе, когда начинается процесс объемной эрозии и деструкции полимерной матрицы. Сравнение профилей гидролитической деградации имплантатов (рисунок 38 б), показывает, что концевая карбоксильная группа в молекуле PLGA усиливает эрозию имплантата, тоже начиная с 19 дня (скачок на профиле гидролитической деградации). Этим, очевидно, и вызвано ускорение высвобождения рилпивирин в этот период времени. Таким образом, временные участки наиболее значимых различий в профилях гидролитической деградации ISFI_4 и ISFI_5 и в профилях высвобождения рилпивирин совпадают.

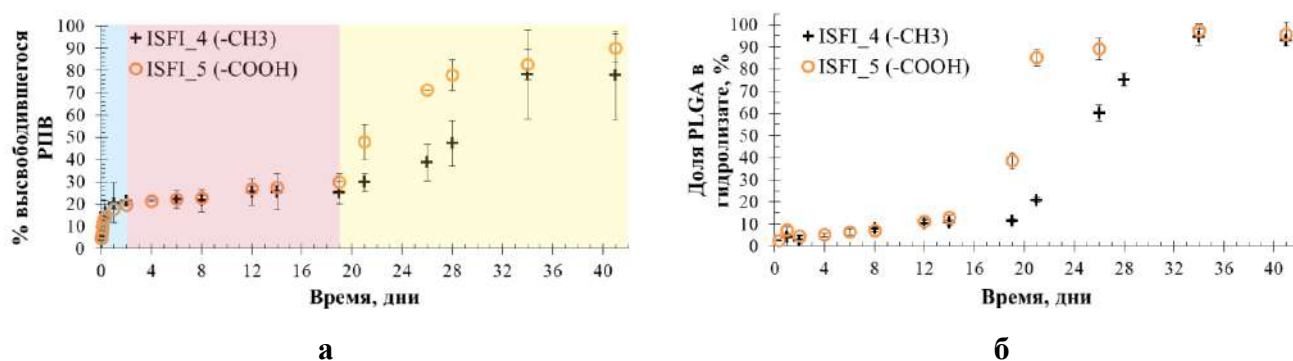


Рисунок 38 – Профили высвобождения рилпивирин (а) и профиль гидролитической деградации PLGA (б) имплантатов, полученных из полимеров, отличающихся по структуре концевой группы; n=3 [157]

Высвобождение рилпивирин из имплантата на этапе объемной эрозии замедляется в случае концевой сложноэфирной группы PLGA на 6 дней (78% рилпивирин высвободилось из ISFI_4 в течение 34 дней, тогда как из ISFI_5 в течение 28 дней). Следовательно, возможное в данном случае влияние ионных взаимодействий кислотно-основного характера между карбоксильными группами PLGA и основными группами молекулами рилпивирин не существенно по сравнению с влиянием гидрофобной природы сложноэфирной концевой группы полимера, которая позволяет замедлить проникновение воды в матрицу имплантата, тем самым замедляя процесс деградации полимера [96,97].

Приведенные экспериментальные данные показывают, что замена кислотной концевой группы на сложноэфирную -CH₃ в PLGA (50:50, Mw 38-54 кДа) позволяет замедлить скорость высвобождения рилпивирин из имплантата и сгладить скачок высвобождения ЛВ,

происходящий на стадии деструкции имплантата, что приводит к удлинению срока высвобождения рилпивирин из имплантата на 6 дней.

4.2.2.3 Влияние соотношения лактид:гликолид PLGA на профиль высвобождения рилпивирин из имплантата

Влияние данного фактора изучали при сравнении имплантатов, полученных из PLGA с Mw 7-17 кДа с эфирной концевой группой ISFI_7 (L/G 75/25) и ISFI_8 (L/G 50/50) (таблица 9, стр.71). Результаты, полученные в первые 42 дня, представлены на рисунке 39.

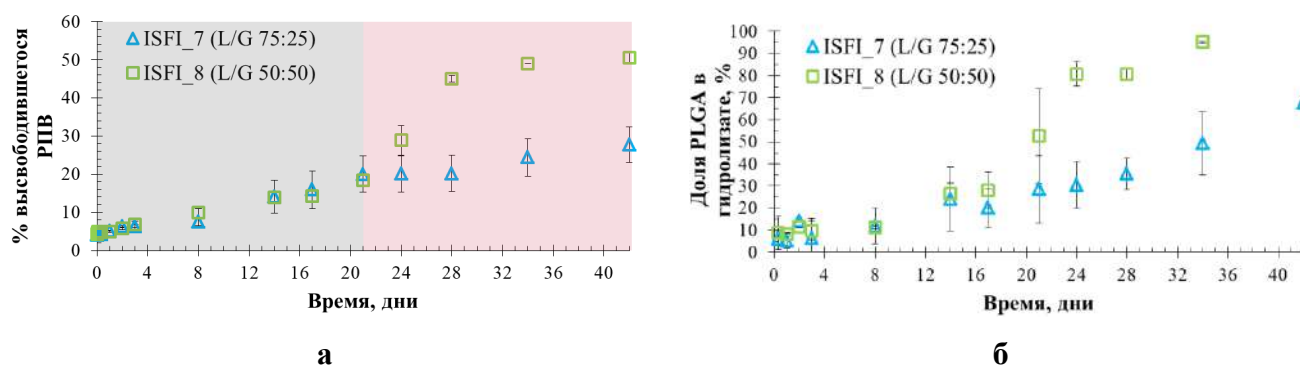


Рисунок 39 – Профили высвобождения рилпивирин (а) и профили гидролитической деградации PLGA (б) имплантатов, полученных из полимеров, отличающихся соотношением L:G; n=3 [157]

Значимых различий в высвобождении рилпивирин в течение первых 21 дней из обоих имплантатов не наблюдали. Как и в предыдущем случае, профили высвобождения рилпивирин из имплантатов, полученных из низкомолекулярных PLGA, не имеют фазы неконтролируемого высвобождения. За 21 день из обоих использованных в эксперименте имплантатов высвободилось 18% рилпивирин. Доля высвободившегося рилпивирин за весь период наблюдения (42 дня) на 23% меньше для имплантата с большим содержанием лактида в макромолекуле полимера (27,7% для ISFI_7 по сравнению с 50,6% для ISFI_8). Аналогичные данные были получены Neba A. Gad и соавторов [160], где авторы обнаружили, что скорость высвобождения доксициклина снижалась по мере увеличения доли молочной кислоты. Известно, что полимеры PLGA, содержащие молочную и гликолевую кислоты в соотношении 50:50, гидролизуются намного быстрее, чем полимеры, содержащие более высокую долю любого из двух мономеров. Большое количество молочной кислоты в PLGA замедляет

проникновение воды в матрицу, а, следовательно, и скорость гидролитической деградации имплантата [158]. Действительно, в настоящем исследовании скорость гидролитической деградации ниже для имплантата ISFI_7, в составе полимера которого содержится 75% молочной кислоты (рисунок 39 б). Можно предположить, что ускорение скорости высвобождения рилпивирин из ISFI_8, наблюдаемое после 24 дня, связано с началом процесса объемной эрозии PLGA, который для более гидрофильного полимера начинается раньше (рисунок 39).

Так, в случае использования низкомолекулярного PLGA с эфирной концевой группой увеличение доли молочной кислоты в PLGA с 50:50 на 75:25 позволяет замедлить скорость высвобождения рилпивирин из имплантата и избежать трехфазового профиля, тем самым добившись высвобождения лекарства с заданной скоростью.

Таким образом, наиболее значимыми факторами, оказывающими влияние на берст-эффект, являются содержание PLGA и молекулярная масса. Тогда как скорость деградации полимера, и следовательно, высвобождение рилпивирин зависят в значительной степени от доли молочной кислоты в сополимере и гидрофобности концевой группы. При этом, снижение молекулярной массы PLGA, замена концевой карбоксильной группы на сложноэфирную эфирную и увеличение доли молочной кислоты с 50 до 75% позволяет добиться необходимого монофазного профиля высвобождения рилпивирин из имплантата.

4.2.2.4 Влияние загрузки рилпивирин на профиль его высвобождения из имплантата

Увеличение содержания лекарственного вещества (загрузки) в депо-форме позволяет не только уменьшить объем вводимого раствора, но и увеличить продолжительность терапевтического действия вещества [80], что в свою очередь положительно сказывается на уменьшении болевого эффекта в месте введения и увеличении периода режима дозирования.

По результатам проведенных исследований для формирования имплантатов с различной загрузкой рилпивирин выбрали полимер: PLGA с Mw 7-17 кДа с концевой сложноэфирной группой и соотношением L:G 75:25, позволяющий высвобождать рилпивирин в соответствии с монофазным профилем. Содержание PLGA во всех вводимых растворах было постоянным – 30 масс.%. Тогда как загрузку рилпивирин по отношению к PLGA варьировали от 4,8 масс.% до 41,7 масс.%, что соответствует изменению массового соотношения рилпивирин-PLGA от 1:20 до 1:1,4. Результаты, полученные в первые 28 дней, представлены на рисунке 40.

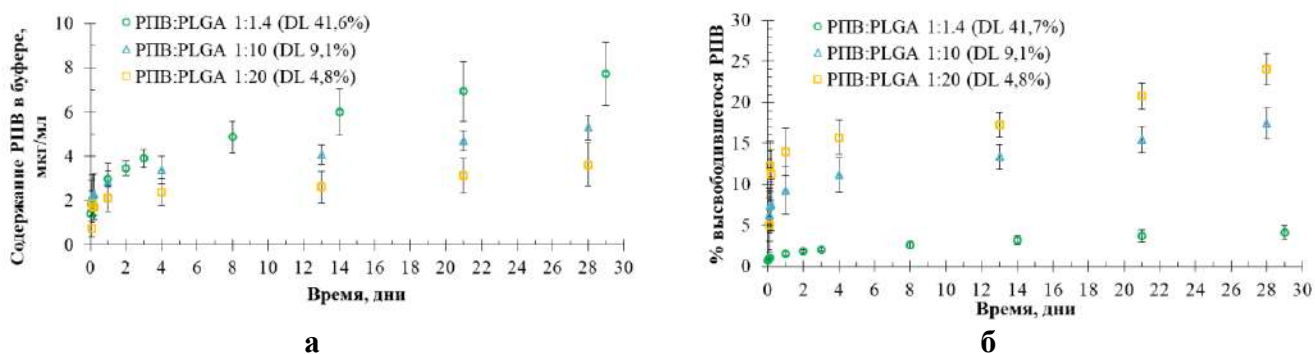


Рисунок 40 – Профили высвобождения рилпивирина из имплантатов, полученных с разной загрузкой рилпивирина: а) содержание свободного рилпивирина в приемной среде, б) доля высвободившегося рилпивирина; n=3

Из рисунка 40 а видно, что увеличение загрузки рилпивирина от 4,8 масс.% до 41,7 масс.% привело к ускоренному высвобождению рилпивирина из *in situ* имплантатов. В течение 4 недель содержание свободного рилпивирина в приемном растворе составило 3,6 мкг/мл, 5,3 мкг/мл и 7,7 мкг/мл для имплантатов с загрузкой рилпивирина 4,8%, 9,1% и 41,7%, соответственно. Однако если обратить внимание на долю высвободившегося рилпивирина по отношению к загруженному в имплантаты, то наблюдается обратная зависимость: чем выше содержание рилпивирина, тем дольше происходит его высвобождение (рисунок 40 б). Так, через 4 недели высвободилось 24%, 17% и 4% из имплантатов с загрузкой рилпивирина 4,8 масс.%, 9,1 масс.% и 41,7 масс.%, соответственно. Полученные результаты коррелируют с результатами других авторов. Так, в работе [62] показано, что увеличение загрузки противоопухолевого агента финастерида (II класс согласно биофармацевтической классификации) от 2,8 мг до 28 мг привело к более высокой скорости высвобождения *in vivo*: концентрация финастерида в плазме на 10 день после введения составляла меньше 1 мкг/мл для дозы 2,8 мг, тогда как около 9 мкг/мл для дозы 28 мг. Авторы это объясняют тем, что при большем содержании ЛВ в носителе, при его высвобождении остаются полости большего размера, что увеличивает проникновение воды в образующиеся поры, и следовательно, увеличивается скорость высвобождения. В то же время, в ряде исследований отмечается противоположная зависимость: доля высвободившегося вещества увеличивается с увеличением загрузки [94]. Вероятно, это связано с методом изучения кинетики высвобождения и начальными условиями эксперимента. Если в работе [94] высвобождение налтрексона (IV класс согласно биофармацевтической классификации) исследовали с помощью модифицированного фармакопейного метода «вращающаяся корзинка», то в нашем случае высвобождение рилпивирина исследовали при орбитальном перемешивании.

Таким образом, увеличение содержания рилпивирин в имплантатах *in situ* от 4,8 до 41,7 масс.% позволяет увеличить скорость высвобождения рилпивирин в приемную среду, а также продлить период высвобождения, что в дальнейшем положительно скажется при разработке режимов дозирования.

4.2.2.5 Исследование профилей высвобождения рилпивирин с использованием гелевых фантомов, имитирующих свойства мышечной ткани

Как уже было сказано ранее, одним из основных параметров парентеральных форм длительного действия является скорость высвобождения ЛВ. И важную роль в исследовании скорости высвобождения ЛВ из парентеральных депо-форм играет не только физико-химический состав среды (рН, буферная емкость, осмолярность), но и механические свойства окружающей ткани (жесткость, упругость) [97]. В ряде исследований сообщалось о значительных различиях в кинетике высвобождения ЛВ и морфологии имплантатов (форма, размер и микроструктура) для имплантатов, сформированных *in vitro* в различных средах [66,187,188], и *in vivo* [186,189]. При подкожном введении полимерного раствора в NMP, внутритканевое давление и силы упругости со стороны окружающей ткани препятствуют расширению имплантата и его набуханию, что приводит к механически индуцированной диффузии растворителя и вместе с ним ЛВ. Напротив, имплантаты, сформированные в буферном растворе *in vitro*, способны набухать и изменять свою форму без ограничения. Поэтому имплантаты, сформированные *in vivo*, обладают большей фазой немедленного высвобождения и высокой скоростью. Так, для более точного моделирования профиля высвобождения ЛВ *in vivo* при изучении кинетики высвобождения *in vitro* используют различные гидрогелевые фантомы, имитирующие упругие свойства мышечной ткани. В работе [187] была показана хорошая корреляция профилей высвобождения флуоресцеина из имплантатов, сформированных в полиакриламидных фантомах и при подкожном введении, поскольку фантомы способны препятствовать набуханию имплантатов и поддерживать их форму в течение времени. Выбор подходящего фантома зависит от свойств ЛВ и состава лекарственной формы и является сложной экспериментальной задачей. При этом выбор оптимального метода изучения профиля высвобождения рилпивирин в модельных средах, в том числе в гидрогелевом фантоме и буферном растворе, является необходимым условием для дальнейшего установления корреляций *in vitro/in vivo*. Основная задача состояла в выборе оптимального состава гидрогеля, подходящего для использования в качестве фантома

мышечной ткани и удовлетворяющего следующим параметрам: (1) модуль упругости геля должен соответствовать модулю упругости мышечной ткани (15 до 34 кПа [190]), (2) быстрое гелеобразование, (3) легкость введения вязкого раствора в фантом, (4) формирование имплантата внутри геля. А также в изучении влияния гидрогелевого фантома на профиль высвобождения рилпивирин из *in situ* имплантата. Для получения фантомов исследовали полиакриламидные и агарозный гели.

Внешний вид и форма полиакриламидных гелей показаны на рисунке 41 а. Все гели обладали цилиндрической формой с диаметром 15 мм (диаметр криогеля РАА_3б 30 мм). Полученные гели характеризовались модулем упругости (6,13 кПа для РАА_1, 8,6 кПа для РАА_2 и 9,59 кПа для РАА_3а, 10,69 кПа для РАА_3б). Также был получен 1 масс.% агарозный гель с модулем упругости 11,38 кПа (рисунок 41 а). На СЭМ изображениях (рисунок 41 б) показано, что микроструктура обычного (РАА_3а) и криогелей (РАА_3б) практически не отличалась: гели обладали высокоразвитой пористостью с размером пор ~ 3 мкм. Также следует отметить, что в образце криогеля РАА_3б присутствуют макропоры. По-видимому, отсутствие явных различий в структуре связано с высоким содержанием мономеров в реакционном растворе.

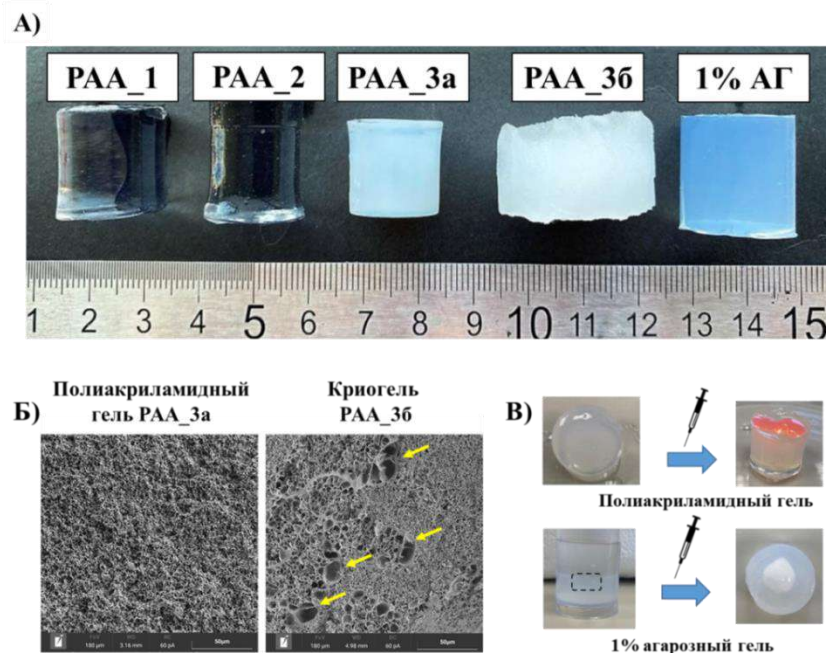


Рисунок 41 – а) Внешний вид и форма гелевых фантомов; б) СЭМ изображение внутренней структуры полиакриламидного геля РАА_3а и криогеля РАА_3б; в) Введение 30 масс.% раствора PLGA в N-метил-2-пирролидоне в гелевые фантомы. Для визуализации формирования имплантата использовали родамин 6G

Для визуальной оценки формирования имплантата в фантоме в полимерный раствор был добавлен гидрофобный краситель родамин 6G (рисунок 41 в). Согласно исследованию [191], профиль высвобождения родамина 6G коррелирует с профилем высвобождения рилпивирин из PLGA наночастиц, что позволяет его использовать в качестве модельного вещества вместо рилпивирин. Несмотря на пористость полиакриламидных гелей, ввести раствор полимера в гелевые фантомы не удалось. Однако быстрое гелеобразование агарозного геля (15 мин) по сравнению с полиакриламидным гелем (24 ч) позволило сформировать полость в фантоме для введения раствора полимера. Еще один существенный недостаток полиакриламидных гелей – это необходимость тщательной промывки гелей большим количеством воды для удаления токсичного мономера акриламида. Поэтому в качестве модельного фантома был выбран 1 масс.% гель агарозы для оценки его влияния на скорость высвобождения рилпивирин из *in situ* имплантата.

Использование гидрогелей в качестве модели тканей для исследования высвобождения лекарственных веществ из инъекционных депо-форм, в том числе из имплантатов, формирующихся в месте введения, использовалось ранее в ряде работ [188,192–194], где гидрогель полностью заменял биорелевантную среду. В настоящем исследовании в качестве основной среды высвобождения использовали 0,15 М фосфатно-солевой буферный раствор с pH 7,4 с добавлением 20 мг/мл Твин 20, в который помещали цилиндрический фантом со сформированным имплантатом. Благодаря такому подходу можно было избежать разрушения гелевой структуры во время отбора проб, при необходимости заменить среду высвобождения и избежать дополнительного этапа подготовки проб для анализа высвободившегося рилпивирин.

Исследование проводили для имплантатов, полученных при массовом соотношении рилпивирин-PLGA 1:43 (что соответствует теоретическому содержанию рилпивирин в имплантате 2,3 масс.%) из 30 масс.% раствора PLGA (L:G = 50:50, $\eta = 0.41$ дл/г, с концевой сложноэфирной группой) в NMP. Как показано на рисунке 42, имплантат, сформированный без фантома (то есть путем введения раствора PLGA и рилпивирин в NMP в буферный раствор) и имплантат, сформированный в 1 масс.% агарозном геле, показали различные профили высвобождения рилпивирин. Так, после 28 дней инкубирования имплантат, образованный в 1 масс.% агарозном геле, высвободил ~ 11% рилпивирин по сравнению с 80% рилпивирин, высвободившимся из имплантата, полученного без фантома. Как отмечалось ранее [66], в отсутствие фантома массоперенос в окружающую среду осуществляется в основном за счет конвекции, тогда как в гелевом фантоме массоперенос контролируется диффузией, как и *in vivo*. Следовательно, скорость высвобождения рилпивирин в гелевом фантоме значительно ниже. Однако, в ряде работ при сравнении кинетики высвобождения лекарственного вещества *in vitro* и *in vivo* наблюдается ускоренное высвобождение в условиях *in vivo* [187]. Авторы объясняют

это тем, что при внутримышечном или подкожном введении полимерного раствора окружающие ткани оказывают дополнительное давление на формирующийся имплантат, что приводит к ускоренной диффузии растворителя в окружающие ткани, а вместе с ним ЛВ.

Также важно отметить, что на профиле высвобождения рилпивирин в случае имплантата, полученного в фантоме, отсутствует фаза немедленного высвобождения. В первые 24 ч из имплантата, полученного в фантоме, высвободилось около 0,2% рилпивирин. Вероятно, задержка в высвобождении возникает из-за медленной диффузии растворителя, а также рилпивирин через гелевую фазу в приемную среду.

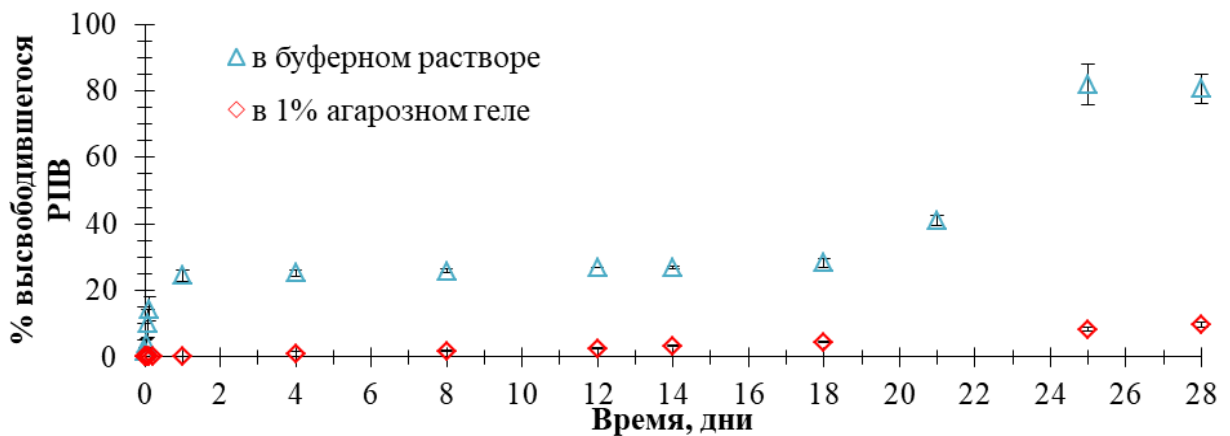
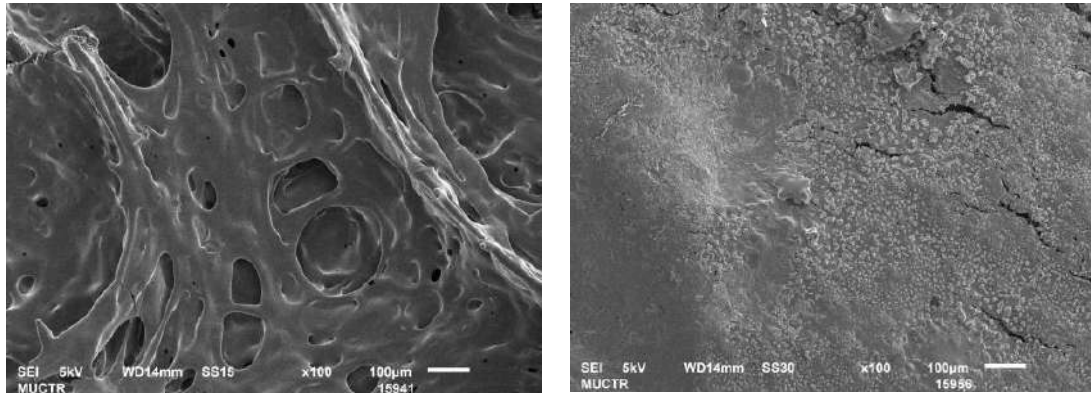


Рисунок 42 – Профиль высвобождения рилпивирин из *in situ* имплантата, сформированного в буферном растворе и в гелевом фантоме; n=3

Следует отметить, что для двух изучаемых имплантатов зафиксированы морфологические различия в структуре. Имплантаты, сформированные в агарозном геле, имели изначально менее пористую и более плотную микроструктуру (рисунок 43), что могло препятствовать проникновению воды внутрь матрицы, тем самым замедляя скорость гидролиза полимерных цепей и высвобождение рилпивирин из имплантата. Это может быть дополнительным объяснением отсутствия фазы немедленного высвобождения из имплантата, полученного в фантоме. Следует добавить, что сформированные в отсутствие фантома имплантаты, будучи более пористыми, быстро набухали, теряли форму и начинали разрушаться. Это обстоятельство затрудняет длительный эксперимент, необходимый при изучении таких депо-форм.



в буферном растворе

в 1 масс.% агарозном геле

Рисунок 43 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), PLGA имплантатов, сформированных в буферном растворе (слева) и в агарозном геле (справа)

Таким образом, результаты исследования показали, что для имитации мышечной ткани оптимальным является фантом на основе 1 масс.% агарозного геля с модулем упругости 11,38 кПа. Использование гидрогелевого фантома способствует сохранению формы имплантата в ходе эксперимента. Также установлено, что профиль высвобождения рилпивирин из имплантатов, сформированных в фантоме, характеризуется отсутствием фазы немедленного высвобождения, наблюдаемой в стандартных условиях высвобождения с использованием физиологической среды, что указывает на формирование имплантата в фантоме по механизму медленной инверсии фаз. Кроме того, высвобождение рилпивирин в условиях «фантома» протекает существенно медленнее (11% за 28 дней против 80%), что указывает на то, что процесс контролируется диффузией, как и в условиях *in vivo*.

4.3 Оценка сопоставимости *in vitro* профилей высвобождения рилпивирин из полимерных депо-форм и растворения его референтной формы

4.3.1 Получение нанокристаллической формы рилпивирин

Известно, что инъекционная депо-форма рилпивирин, для внутримышечного введения, представляющая собой суспензию нанокристаллов (НК) размером около 200 нм (входит в препарат Cabenuva® Janssen-Cilag International NV), была одобрена FDA в 2021 году и применяется в клинической практике [195]. В данном исследовании нанокристаллическую форму рилпивирин использовали в качестве референтной депо-формы для сравнительной оценки скорости высвобождения рилпивирин из полимерных микросфер и *in situ* имплантатов.

Для этого получили суспензию нанокристаллов рилпивирин с такими же физико-химическими характеристиками, как в оригинальном препарате: размер нанокристаллов около 200 нм, соотношение рилпивирин-полоксамер 338 4:1, концентрация полоксамера 338 10 мг/мл [24].

Согласно анализу литературы, одним из широко используемых в промышленности подходов для получения нанокристаллов является подход «top-down», основанный на уменьшении размера более крупных частиц, например, механическое диспергирование на бисерной мельнице (Alkermes, prev. Elan/Nanosystems) или гомогенизация под действием высокого давления (SkyePharma PLC) [196]. По сравнению с другим подходом «bottom-up», который представляет собой осаждение или самосборку молекул в наночастицы, «top-down» позволяет избежать использование органических растворителей и легко масштабируется. Также существуют комбинированные подходы, например, распылительное (Н69, [197]) или лиофильное (Н96, [198]) высушивание с последующей гомогенизацией под высоким давлением. Перечисленные технологии, как правило, требуют от 50 до 200 мл суспензии с содержанием активного вещества от 5% для эффективного измельчения до нано-размеров. С экономической точки зрения такой большой расход сырья в лабораторных условиях не целесообразен. Поэтому в рамках настоящей работы было проведено исследование влияния метода получения нанокристаллов на их физико-химические характеристики. В качестве подходов выбрали гомогенизацию под давлением, ультразвуковую гомогенизацию и механическое истирание со стеклянными шариками [33,196], позволяющие сократить расход рилпивирин и вспомогательных веществ. За основу были выбраны условия получения нанокристаллической формы рилпивирин (препарат Cabenuva®) по методике [24], в которой в качестве стабилизатора использовали полоксамер 338 с соотношением рилпивирин-полоксамер 338 (4:1 м/м).

Результаты проведенного нами исследования (таблица 11) показали преимущество использования метода истирания со стеклянными шариками (по сравнению с методами гомогенизации) для получения суспензии нанокристаллов рилпивирин наименьшего размера (около 200 нм) с узким распределением по размерам: размер нанокристаллов составил 226 нм по сравнению с 367 нм для метода гомогенизации под давлением и 701 нм для УЗ гомогенизации; индекс полидисперсности (PDI) 0,145 против 0,228 и 0,390, соответственно (таблица 11). Аналогичные размеры нанокристаллов рилпивирин (320 нм) были получены для метода гомогенизации авторами [199]. Напротив, в другом исследовании [123] были получены нанокристаллы рилпивирин с размером 277 ± 9 нм и PDI $0,24 \pm 0,02$ методом гомогенизации под давлением. Такие различия внутри метода гомогенизации могут быть связаны с различиями физико-химических свойств субстанции рилпивирин, в том числе полиморфной формы, а также различиями в принципе измельчения.

Таблица 11 – Характеристика образцов суспензии нанокристаллов рилпивирин, полученных различными методами (n=3)

Метод получения	Размер, нм	PDI	Выход по рилпивирину, % от теоретического значения
Гомогенизация под давлением	366,8±5,3	0,228±0,020	50,6
УЗ гомогенизация	700,7±54,8	0,390±0,082	93,4
Механическое истирание с шариками	225,9±1,3	0,145±0,006	89,5

Что касается влияния длительности диспергирования на средний размер нанокристаллов, то наблюдалось уменьшение среднего размера и индекса полидисперсности в случае механического истирания с шариками (рисунок 44 в). Более высокая скорость измельчения создавала большее усилие на отдельные частицы ЛВ, чем более низкая скорость вращения, и, таким образом, внутри камеры измельчения было доступно больше энергии для уменьшения размера частиц за счет удара, истирания и расщепления [200]. Напротив длительная гомогенизация, как УЗ, так и под давлением, привела сначала к снижению среднего размера нанокристаллов до ~500 нм и 300 нм, соответственно, а затем к его увеличению до 700 нм и 360 нм, соответственно (рисунок 44 а и б), вероятно вследствие недостаточного охлаждения, которое в дальнейшем привело к агрегации и слипанию частиц. В процессе измельчения кристаллы ЛВ распадаются на более мелкие частицы и, таким образом, постоянно создают новые поверхности. В результате из-за увеличения площади поверхности и увеличении теплового воздействия происходит агрегация частиц за счет термодинамического эффекта, что в конечном итоге снижает эффективность процесса [201].

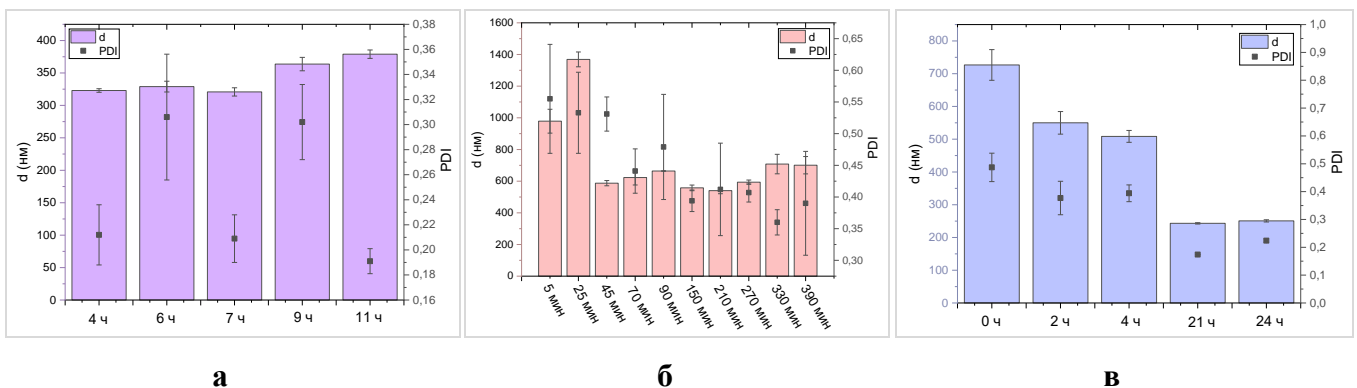


Рисунок 44 - Зависимость размера нанокристаллов от длительности измельчения: а) гомогенизация под давлением; б) ультразвуковая гомогенизация; в) механическое истирание со стеклянными шариками; соотношение рилпивирин-полоксамер 338 составляло 4:1; n=4

Размеры исходного порошка рилпивирин и его нанокристаллов также были определены методом СЭМ. На рисунке 45 видно, что нанокристаллы отличаются от исходного порошка рилпивирин более округлой формой и гладкой поверхностью. Средний размер нанокристаллов составляет около 200 нм, что согласуется данными, полученными методом динамического светорассеивания.

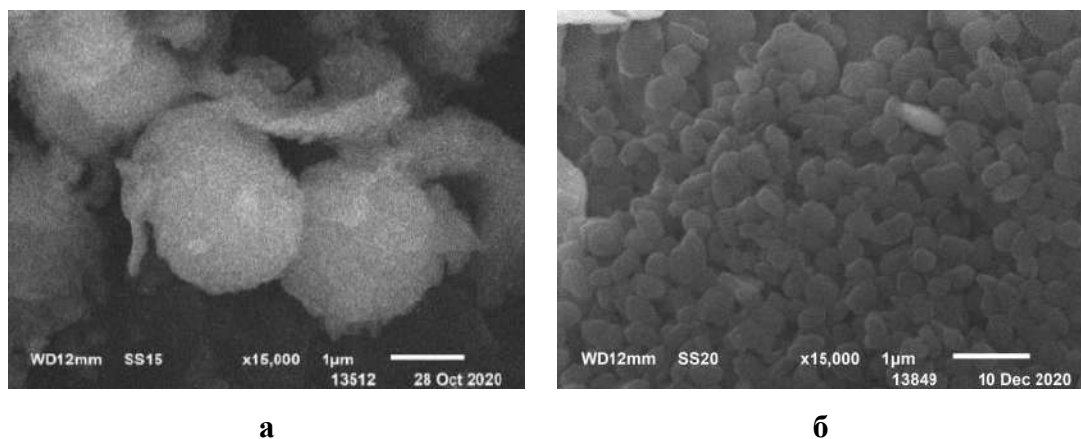


Рисунок 45 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), частиц порошка рилпивирин до (а) и после (б) измельчения стеклянными шариками в течение 24 ч [157]

Биораспределение и биодоступность ЛВ во многом зависит от их физико-химических свойств. Вместе с тем некоторые процессы, применяемые при получении наноформ ЛВ, в основе которых лежит принцип «bottom-up», такие как, например, электрораспыление, могут привести к аморфизации [202] или полиморфному переходу кристаллической решетки [203], что впоследствии скажется на их поведении *in vivo*. Таким образом, оценка кристаллического состояния ЛВ в составе лекарственной формы является важной задачей [204,205]. В настоящей работе кристалличность исходной субстанции и нанокристаллов рилпивирин определяли методом рентгенофазного анализа (РФА).

Анализ рентгенодифракционных спектров исходной субстанции рилпивирин показал, что субстанция имеет преимущественно кристаллическую форму (рисунок 46). Известно, что у рилпивирин есть несколько кристаллических модификаций, в том числе полиморфная форма I и форма II, которые отличаются по физико-химическим свойствам [206]. Поэтому при идентификации конкретной кристаллической фазы важным является набор положений характеристических пиков при углах 2θ . Дифрактограмма рилпивирин (рисунок 46) содержит пики при углах 12.2, 17.4, 20.8, 24.6, 25.5, 27.6, что соответствует полиморфной форме II [206]. Также была получена дифрактограмма поллоксамера 338 содержащая характеристические пики при углах 19.2 и 23.4 °. При сравнении положений основных пиков на дифрактограмме образца

нанокристаллов рилпивирин с положениями пиков порошка рилпивирин и полоксамера 338, установлено, что в образце нанокристаллов присутствуют две кристаллические фазы, соответствующие полиморфной форме II рилпивирин и кристаллической форме полоксамера 338. Таким образом, мы можем предположить, что частицы в полученной наносuspензии имеют кристаллическую структуру, о чем говорит отсутствие сдвигов в положении пиков по сравнению с исходными веществами.

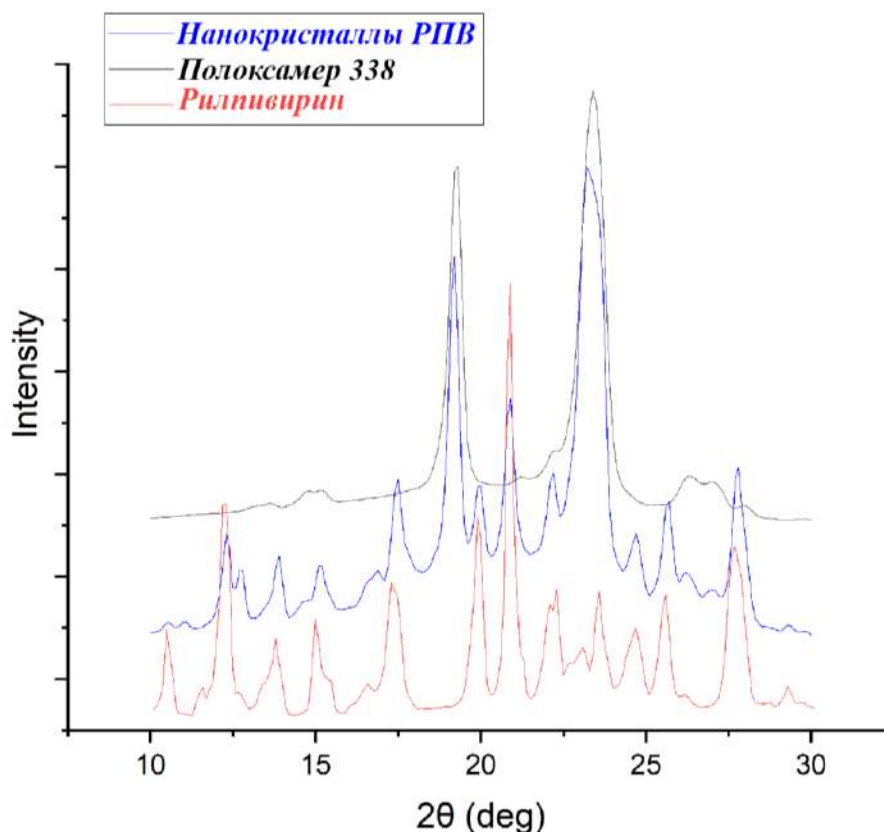


Рисунок 46 – Дифрактограмма исходного порошка рилпивирин, полоксамера 338 и нанокристаллов рилпивирин, стабилизированных полоксамером 338. Нанокристаллическая форма рилпивирин получена методом истирания со стеклянными шариками [157]

Также в процессе оптимизации условий получения наноразмерных форм лекарственных веществ важно, чтобы наночастицы сохраняли свои физико-химические характеристики после лиофилизации при ресуспендировании [201,205,207]. В связи с этим было проведено исследование влияния типа криопротектора (маннит, поливинилпирролидон, трегалоза) на размер и индекс полидисперсности нанокристаллов. При выборе криопротектора использовали следующие параметры: 1) легкость ресуспендирования лиофилизата; 2) близость размеров частиц suspension до и после лиофилизации (в последнем случае – размер частиц в suspension, восстановленной после лиофилизации). По результатам исследования было отмечено, на

примере маннита, что увеличение концентрации криопротектора положительно влияет на агрегационную стабильность нанокристаллов рилпивирин (рисунок 47). По-видимому, концентрации 1 масс.% недостаточно для предотвращения агрегации и роста нанокристаллов. Похожие данные были получены в работе [208]. Кроме того, в патенте [209] для стабилизации нанокристаллов рилпивирин указано использование трегалозы, поливинилпирролидона и их смеси 1:1 (м/м). В настоящем исследовании применение поливинилпирролидона и его смеси с трегалозой не показало удовлетворительных результатов. Размер нанокристаллов и индекс полидисперсности были более 800 нм и 0,3, соответственно, что указывает на агрегацию частиц в процессе лиофилизации. Напротив, образец нанокристаллов с добавлением 5 масс.% трегалозы сохранял агрегационную устойчивость после лиофилизации и повторного ресуспендирования в течение двух дней ($227,1 \pm 2,0$, PDI $0,163 \pm 0,009$). Кроме того, в лиофилизате не наблюдалось трещин.

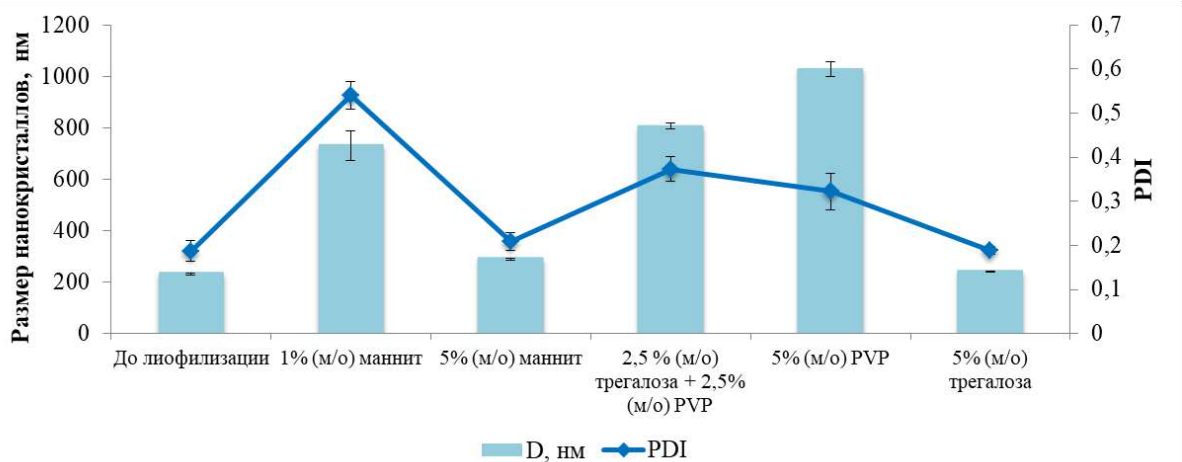


Рисунок 47 – Распределение по размерам нанокристаллов рилпивирин в образцах восстановленных суспензий после лиофилизации с использованием различных криопротекторов; образцы получены методом механического истирания со стеклянными шариками

Таким образом, для проведения дальнейших исследований был выбран метод механического истирания со стеклянными шариками, позволяющий получить наносуспензию рилпивирин со средними размерами нанокристаллов 226 нм и PDI 0,145 (содержание рилпивирин в суспензии – 89%), что соответствует характеристикам нанокристаллической формы рилпивирин в препарате Cabenuva®. А также был выбран криопротектор, необходимый для повышения устойчивости наносуспензии в процессе лиофилизации: 5 масс.% трегалоза.

4.3.2 Профиль растворения нанокристаллической формы рилпивирин

При изучении скорости растворения нанокристаллической формы рилпивирин для отделения нерастворившихся нанокристаллов от растворенного в приемной среде рилпивирин использовали два метода: центрифугирование и диализ. Однако после центрифугирования нанокристаллы агрегировали и повторно не ресуспендировались. Соответственно, дальнейшее изучение скорости растворения нанокристаллов рилпивирин методом центрифугирования было невозможно, вследствие неконтролируемого изменения соотношения площади поверхности к объему частиц, которое в свою очередь очень сильно исказило бы данные о растворении. В связи с этим, в дальнейшем при изучении кинетики растворения нанокристаллов рилпивирин использовали метод диализа.

Важным аспектом при выборе диализной мембраны является молекулярная масса отсечки (MWCO), а также сорбция ЛВ на мембране. Для диализа низкомолекулярных веществ часто используют диализные мембраны со значением MWCO от 10 до 15 кДа для уменьшения влияния диффузии вещества через мембрану [165]. В настоящей работе использовали мембрану из целлюлозы с MWCO 12-14 кДа. Предварительно определенная сорбция рилпивирин на мембране составила 4%.

Как показали результаты исследования, профиль растворения нанокристаллов рилпивирин характеризуется отсутствием бёрст-эффекта из-за равномерного растворения вещества с поверхности нанокристаллов. В то же время, растворение нанокристаллов начинается с небольшой фазы задержки, которая длится около 8 дней: через 8 дней доля растворенного рилпивирин составила всего 8%. Тогда как, за весь период инкубации (85 дней) растворилось около 33% нанокристаллов рилпивирин (рисунок 48).

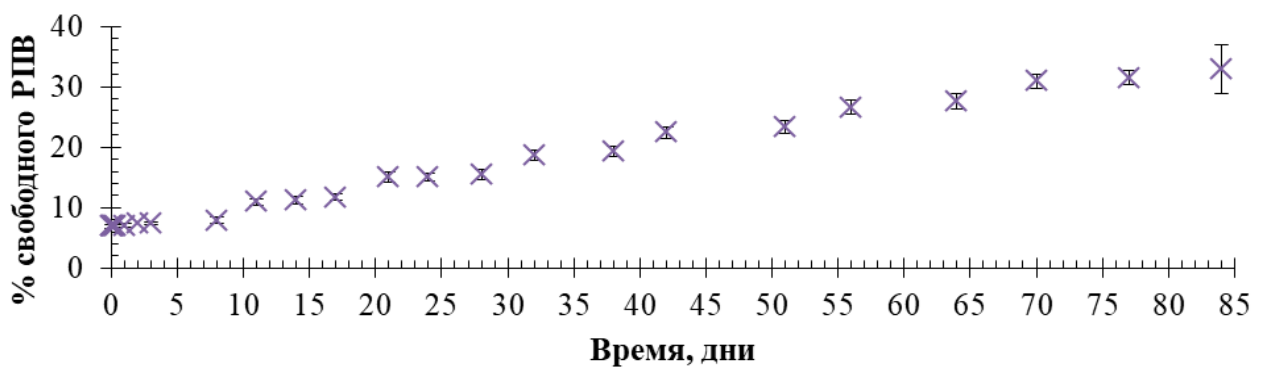


Рисунок 48 – Профиль растворения нанокристаллической формы рилпивирин, полученной истиранием со стеклянными шариками. Размер частиц 226 нм; n=3

Следует отметить, что профиль растворения нанокристаллической формы рилпивирин соответствует монофазному типу, скорость растворения 0,33% в день ($R^2 = 0,9918$).

4.3.3 Сравнение профилей высвобождения / растворения рилпивирин из депо-форм

По результатам проведенных выше исследований для оценки сопоставимости скорости высвобождения рилпивирин из полимерных микросфер и *in situ* имплантатов выбрали следующие образцы, исходя из условий: (1) отсутствие фазы немедленного высвобождения и (2) монофазный профиль высвобождения:

- PLGA микросферы (PLGA-RPV-7), полученные из PLGA (54-74 кДа, 75:25, с концевой сложноэфирной группой). Средний размер микросфер $45,8 \pm 1,1$ мкм, CV 2,4, содержание рилпивирин (DL) 12,6%, эффективность включения 90,9%.
- PLGA имплантаты (ISFI_7), полученные из PLGA (7-17 кДа, 75:25, с концевой сложноэфирной группой), содержание рилпивирин (DL) 2,4%.

Сравнительное исследование скорости высвобождения проводили для дозы рилпивирин 1,6 мг. Кинетика высвобождения ЛВ считается эквивалентной в случае, если фактор сходимости f_2 находится в интервале от 50 до 100 [210]. Как показано на рисунке 49, профиль высвобождения рилпивирин из микросфер в начальный период (8 дней) характеризуется фазой отсроченного высвобождения: за 8 дней высвободилось 4% рилпивирин. После чего с 8 по 23 день из микросфер высвободилось меньшее количество рилпивирин, чем из нанокристаллов (11% vs 15% в течение 23 дней). И только к 30 дню доля высвободившегося рилпивирин из микросфер достигла доли растворенных нанокристаллов рилпивирин (17% vs 16%). При этом фактор сходимости f_2 равен 65, а коэффициент корреляции R^2 0,9525. Напротив, по результатам сравнительных тестов кинетики высвобождения/растворения рилпивирин в случае имплантата была достигнута лучшая сходимость ($f_2 = 74$; R^2 0,9831): к 42 дню доля свободного рилпивирин в растворе составила 27% и 23% для имплантатов и нанокристаллов, соответственно. Тем не менее, несмотря на удовлетворительное значение фактора сходимости, после 30 дня, скорость высвобождения рилпивирин из обоих полимерных депо-форм становится значительно выше и к 77 дню доля рилпивирин в растворе составила более 60% по сравнению с долей растворенных нанокристаллов 32%.

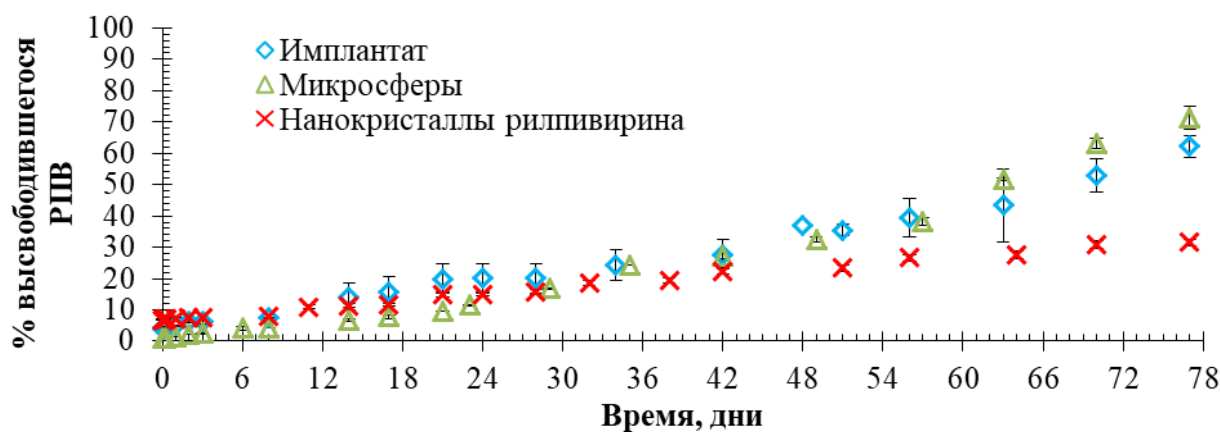


Рисунок 49 – Профиль высвобождения / растворения рилпивирин из депо-форм; n=3

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

4.4 Математическое описание скорости высвобождения рилпивирин из PLGA микросфер и имплантатов

Полилактидные *in situ* имплантаты и микросферы представляют собой матричные системы, основным механизмом высвобождения ЛВ из которых могут быть как диффузия ЛВ с поверхности или через образующиеся поры, так и гидролитическая деградация полимерной матрицы / эрозия [85]. Однако из-за сложного механизма их гидролитической деградации и взаимосвязи свойств полимеров, полимер-ЛВ, ЛВ-ЛВ от которых также может зависеть гидролиз, не так просто выделить факторы, однозначно влияющие на процесс высвобождения ЛВ. В связи с этим, для описания высвобождения ЛВ из сложных депо-форм существует большое количество кинетических моделей. Математическое описание позволяет выяснить основные механизмы транспорта ЛВ и дает возможность спрогнозировать влияние параметров состава депо-формы на скорость высвобождения ЛВ [211,212]. Кроме того, выбор наиболее адекватной математической модели профиля высвобождения *in vitro* может получить особую актуальность при разработке моделей *IVIVC*, необходимых для дальнейшего прогнозирования фармакокинетики [25,97].

Выбор типа математической модели, используемой для описания высвобождения ЛВ *in vitro*, зависит в первую очередь от типа ЛФ и от факторов, контролирующих этот процесс. Для

полимерных носителей процесс высвобождения ЛВ в большей или меньшей степени может контролироваться диффузией, набуханием и эрозией, поэтому для описания высвобождения рилпивирин из полимерных носителей и сравнения параметров высвобождения применяли следующие математические модели: модель нулевого и первого порядка, Хигучи, Хиксона-Кроуэлла, Корсмейера-Пеппаса, Пеппаса-Сахлина и Хопфенберга [212,213]. В таблице 12 и 13 приведены результаты математической обработки профилей высвобождения рилпивирин из тех форм, которые в наибольшей степени коррелируют с профилем растворения нанокристаллов (см. раздел 4.3). Выбор подходящей модели, описывающей скорость высвобождения, проводили при сравнении коэффициентов корреляции R^2 .

Таблица 12 – Математическое описание профиля высвобождения рилпивирин из микросфер и имплантата с использованием моделей нулевого и первого порядка, модели Хигуччи

Образец	Модель нулевого порядка		Модель 1-го порядка		Модель Хигуччи	
	$M_t/M_\infty = K_0 t$		$\ln(1-M_t/M_\infty) = -K_1 t$		$M_t/M_\infty = K_H$	
	k_0	R^2	k_1	R^2	k_H	R^2
Микросферы PLGA-RPV-7	0,0079	0,9642	0,0130	0,9693	0,0602	0,9312
Имплантаты ISFI_7	0,0076	0,9916	0,0107	0,9644	0,0551	0,9421

В результате математической обработки экспериментальных данных согласно эмпирическим моделям (таблица 12) при сравнении R^2 установили, что только модель нулевого порядка адекватно описывает процесс высвобождения рилпивирин из имплантата с высоким коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9916$. В остальных случаях коэффициенты корреляции были значительно ниже. Применение модели нулевого порядка для описания процесса высвобождения рилпивирин подтверждает, что высвобождение рилпивирин происходит с постоянной скоростью и не зависит от его концентрации. Однако, эмпирические модели, такие как нулевого или первого порядка, Хигучи и др, описывают только результирующие скорости высвобождения ЛВ, не давая понимания об основных механизмах транспорта ЛВ [214]. Наложение различных явлений массопереноса, например, диффузия воды и ЛВ, набухание и деградация полимера, также могут привести к общей кинетике высвобождения нулевого порядка. Поэтому если матрица подвергается биодеструкции, гидролитической или ферментативной, как в настоящем исследовании, необходимо учесть тот факт, что выход ЛВ будет происходить не только по диффузионному механизму, но и за счет разложения полимерной матрицы. В этом случае могут быть использованы уравнение Хиксона-Кроуэлла, которое описывает кинетику высвобождения ЛВ в условиях изменения площади поверхности, а

также модель Корсмейера-Пеппаса или Пеппаса-Сахлина, учитывающие взаимосвязанные эффекты диффузии по Фику и деградации полимерной матрицы [104].

Сравнение коэффициентов корреляции R^2 , определенных для моделей Хиксона-Кроуэлла, Корсмейера-Пеппаса и Пеппаса-Сахлина, показало, что наилучшая аппроксимация, как для микросфер, так и *in situ* имплантатов, получается при использовании модели Пеппаса-Сахлина (таблица 13). Возможность применения модели Пеппаса-Сахлина для описания механизма высвобождения рилпивирин позволяет оценить вклад диффузии по Фику (K_1) и вклад эффекта Case-II, связанного с разложением полимерной матрицы (K_2). Исходя из значений констант скорости, полученных для наших профилей, можно предположить, что при высвобождении рилпивирин процесс диффузии преобладает над процессом разложения ($K_1 \gg K_2$).

Таблица 13 – Математическое описание профиля высвобождения рилпивирин из микросфер и имплантата с использованием моделей, учитывающих форму и разрушение полимерной матрицы

	Модель Хиксона-Кроуэлла		Модель Корсмейера-Пеппаса			Модель Пеппаса-Сахлина				Модель Хопфенберга*		
	$(1-M_t/M_\infty)^{1/3} = 1-k_\beta t$		$M_t/M_\infty = k_{KP} t^n$			$M_t/M_\infty = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$				$M_t/M_\infty = 1 - [1 - k_1 t (t-1)]^n$		
	k_β	R^2	k_{KP}	n	R^2	k_1	k_2	m	R^2	k_1	n^{**}	R^2
Микросферы PLGA-RPV-7	0,0036	0,9719	0,0011	1,4736	0,9933	0,0031	0,0000	1,0639	0,9944	0,0001	3	0,9917
Имплантаты ISFI_7	0,0032	0,9764	0,0158	0,8024	0,9890	0,0203	0,0027	0,5445	0,9902	-	-	-

K – константа скорости, n и m – коэффициенты диффузии, R^2 – коэффициент корреляции

* Модель Хопфенберга применима для ЛФс фазой задержки

** для ЛФ сферической формы $n=3$ [213]

Для определения степени, в которой макромолекулярная релаксация полимера (R) способствует высвобождению ЛВ, была построена зависимость соотношения R/F ($R/F = K_2 t^m / K_1$, F характеризует диффузию ЛВ) от доли высвободившегося рилпивирин (рисунок 50). При соотнесении полученного графика с данными о профиле высвобождения рилпивирин из имплантатов (рисунок 50) с 1 по 34 день соотношение $R/F < 1$, что свидетельствует о высвобождении рилпивирин путем диффузии, тогда как после 34 дня преобладающим механизмом высвобождения является разрушение полимерной матрицы ($R/F > 1$). В случае микросфер практически на всем периоде (с 1 по 63 день) высвобождение происходит за счет диффузии $R/F < 1$. Полученные кинетические параметры также хорошо согласуются с экспериментальными профилями гидролитической деградации носителей.

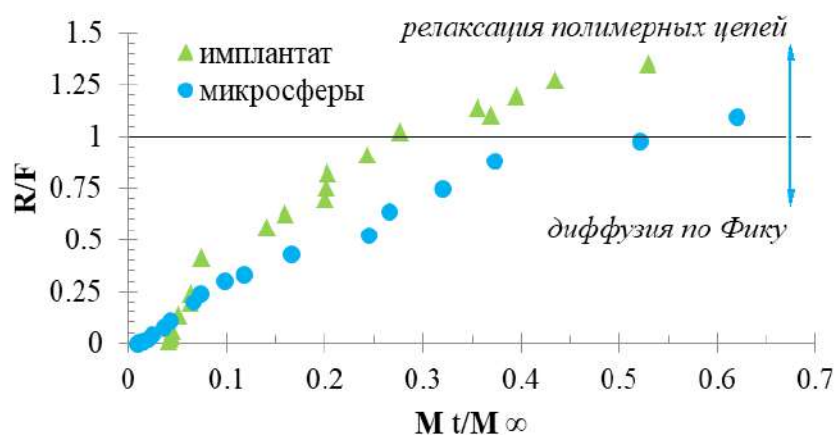


Рисунок 50 – Влияние эффекта Case II и диффузии по Фику на скорость высвобождения рилпивирин из полимерных микросфер и имплантатов

Таким образом, с использованием математического моделирования установлено, что профиль высвобождения рилпивирин из разработанных полимерных депо-форм подчиняется модели Пеппаса-Сахлина, которая учитывает вклад диффузии и деградации полимера. Также установлено, что совокупность диффузионных и релаксационных процессов позволяет высвобождать рилпивирин из имплантата в соответствии с кинетикой нулевого порядка ($R^2 = 0,9916$). Примененный подход открывает возможность разработки модели IVIVC (*in vitro* / *in vivo* корреляции) с целью дальнейшего прогнозирования фармакокинетики.

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 рилпивирин, профиль высвобождения которых сопоставим с профилем растворения референтной формы (аналог препарата Cabenuva®). Результаты, касающиеся математической обработки профилей высвобождения рилпивирин, могут быть полезны при поиске *in vitro/in vivo* корреляций (IVIVC), а выявленные при этом закономерности помогут прогнозировать фармакокинетику депо-форм рилпивирин на основе PLGA с определенным известным профилем высвобождения *in vitro*.

В перспективе разработанные в диссертационной работе подходы и выявленные закономерности могут быть полезны при создании и изучении депо-форм других труднорастворимых лекарственных веществ, что открывает широкие возможности практического использования полученных результатов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CV	- коэффициент вариации
DL	- загрузка ЛВ
EE	- эффективность включения
EMA	- Европейское агентство лекарственных средств (European Medicines Agency)
FDA	- Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (U.S. Food and Drug Administration)
HEPES	- (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота)
ISFI	- имплантат, формирующийся в месте введения (in situ forming implants)
MES	- 2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота
Mw	- молекулярная масса полимера
NMP	- N-метил-2-перридон
PAA	- полиакриламид
PA-IC90	- откорректированная по связыванию с белком концентрация, ингибирующая репликацию 90% вирусов
PBS	- фосфатно-солевой буферный раствор
PDI	- индекс полидисперсности
polyEVA	- сополимер этилена и винилацетата (polyethylene vinyl acetate)
SDS	- додецилсульфат натрия
в/м	- внутримышечный путь введения
ВААРТ	- высокоактивная антиретровирусная терапия
ВИЧ	- вирус иммунодефицита человека
ВЭЖХ	- высокоэффективная жидкостная хроматография
DMCO	- диметилсульфоксид
ККМ	- критическая концентрация мицеллообразования
ЛВ	- лекарственное вещество
ЛФ	- лекарственная форма
МС	- микросфера
НИОТ	- нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы
НК	- нанокристаллы
ННИОТ	- ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы
ОТ	- обратная транскриптаза

п/к	- подкожный путь введения
ПАВ	- поверхностно-активное вещество
ПВП	- поливинилпирролидон
ПВС	- поливиниловый спирт
ПЭГ	- полиэтиленгликоль
РПВ	- рилпивирин
РФА	- рентгенофазовый анализ
СПИД	- синдром приобретенного иммунодефицита
СЭМ	- сканирующая электронная микроскопия
$T_{1/2}$	- период полувыведения
ЮНЭЙДС	- Объединенная программа Организации Объединенных Наций по ВИЧ/СПИДу

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bares S.H., Scarsi K.K. A new paradigm for antiretroviral delivery: long-acting cabotegravir and rilpivirine for the treatment and prevention of HIV // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2022. Vol. 17. № 1. P. 22–31.
2. Сысуев Б.Б., Плетнева И.В. Современное состояние исследований разработок в области инновационных лекарственных форм и их модификаций // *Вестник ВолгГМУ*. 2014. Т. 4. № 52. С. 7–12.
3. Jermain S. V, Brough C., Williams R.O. Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery – An update // *Int. J. Pharm.* 2018. Vol. 535. № 1. P. 379–392.
4. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices // *J. Pharm. Sci.* 1963. Vol. 52. № 12. P. 1145–1149.
5. Folkman J., Long D.M. The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy // *J. Surg. Res.* 1964. Vol. 4. № 3. P. 139–142.
6. Wright J.C., Hoffman A.S. Historical Overview of Long Acting Injections and Implants // *Long Acting Injections and Implants. Advances in Delivery Science and Technology*. Boston, MA: Springer US. 2012. P. 11–24.
7. Wu C. et al. Lipid and PLGA hybrid microparticles as carriers for protein delivery // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2018. Vol. 43. P. 65–72.
8. Niraj et al. Sustained and controlled drug delivery system - As a part of modified release dosage form // *Int. J. Pharma Sci.* 2015. Vol. 4. № 5. P. 347–364.
9. Alghamdi M., Gumbleton M., Newland B. Local delivery to malignant brain tumors: Potential biomaterial-based therapeutic/adjuvant strategies // *Biomater. Sci.* 2021. Vol. 9. № 18. P. 6037–6051.
10. Vellimana A.K. et al. Combination of paclitaxel thermal gel depot with temozolomide and radiotherapy significantly prolongs survival in an experimental rodent glioma model // *J. Neurooncol.* 2013. Vol. 111. № 3. P. 229–236.
11. Tibbitt M.W., Dahlman J.E., Langer R. Emerging Frontiers in Drug Delivery // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. Vol. 138. № 3. P. 704–717.
12. Karkada M. et al. A liposome-based platform, VacciMax, and its modified water-free platform DepoVax enhance efficacy of in vivo nucleic acid delivery. // *Vaccine*. 2010. Vol. 28. № 38. P. 6176–6182.
13. Weir G.M. et al. Single dose of DPX-rPA, an enhanced-delivery anthrax vaccine formulation,

- protects against a lethal *Bacillus anthracis* spore inhalation challenge // *NPJ vaccines*. 2019. Vol. 4. P. 6.
14. Hobson J.J. et al. Anhydrous nanoprecipitation for the preparation of nanodispersions of tenofovir disoproxil fumarate in oils as candidate long-acting injectable depot formulations // *Nanoscale Adv.* 2019. Vol. 1. № 11. P. 4301–4307.
 15. Karumanchi D.K. et al. Rational design of liposomes for sustained release drug delivery of bevacizumab to treat ocular angiogenesis // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2018. Vol. 47. P. 275–282.
 16. Mu H. et al. Multivesicular liposomes for sustained release of bevacizumab in treating laser-induced choroidal neovascularization // *Drug Deliv.* 2018. Vol. 25. № 1. P. 1372–1383.
 17. Blazaki S. et al. Novel Liposome Aggregate Platform (LAP) system for sustained retention of drugs in the posterior ocular segment following intravitreal injection. // *Int. J. Pharm.* 2020. Vol. 576. P. 118987.
 18. Qi F. et al. Recent research and development of PLGA/PLA microspheres/nanoparticles: A review in scientific and industrial aspects // *Front. Chem. Sci. Eng.* 2019. Vol. 13. № 1. P. 14–27.
 19. Lagreca E. et al. Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery // *Prog. Biomater.* 2020. Vol. 9. № 4. P. 153–174.
 20. Maturavongsadit P. et al. Biodegradable polymeric solid implants for ultra-long-acting delivery of single or multiple antiretroviral drugs // *Int. J. Pharm.* 2021. Vol. 605. P. 120844.
 21. Kamali H. et al. Optimization and in Vitro Evaluation of Injectable Sustained-Release of Levothyroxine Using PLGA-PEG-PLGA // *J. Pharm. Innov.* 2021. Vol. 16. № 4. P. 688–698.
 22. Lin X. et al. A novel risperidone-loaded SAIB-PLGA mixture matrix depot with a reduced burst release: effects of solvents and PLGA on drug release behaviors in vitro/in vivo. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2012. Vol. 23. № 2. P. 443–455.
 23. McMillan J. et al. Pharmacokinetics of a Long-Acting Nanoformulated Dolutegravir Prodrug in Rhesus Macaques. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018. Vol. 62. № 1. e01316-17.
 24. Baert L. et al. Development of a long-acting injectable formulation with nanoparticles of rilpivirine (TMC278) for HIV treatment // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009. Vol. 72. № 3. P. 502–508.
 25. Chaudhary K., Patel M.M., Mehta P.J. Long-acting injectables: Current perspectives and future promise // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2019. Vol. 36. № 2. P. 137–181.
 26. Wright J.C., Burgess D.J. Long Acting Injections and Implants. *Advances in Delivery Science and Technology*. Boston, MA: Springer US. 2012. P. 409–427.
 27. Park E.J. et al. Long-acting injectable formulations of antipsychotic drugs for the treatment of

- schizophrenia // *Arch. Pharm. Res.* 2013. Vol. 36. № 6. P. 651–659.
28. Nkanga C.I. et al. Clinically established biodegradable long acting injectables: An industry perspective // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2020. Vol. 167. P. 19–46.
 29. Liu K.-S. et al. Novel Depots of Buprenorphine Prodrugs Have a Long-Acting Antinociceptive Effect // *Anesth. Analg.* 2006. Vol. 102. № 5. P. 1445-1451.
 30. Kalicharan R.W. et al. Where does hydrolysis of nandrolone decanoate occur in the human body after release from an oil depot? // *Int. J. Pharm.* 2016. Vol. 515. № 1. P. 721–728.
 31. Rahnfeld L., Luciani P. Injectable Lipid-Based Depot Formulations: Where Do We Stand? // *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12. № 6. P. 567.
 32. Weng Larsen S., Larsen C. Critical Factors Influencing the In Vivo Performance of Long-acting Lipophilic Solutions—Impact on In Vitro Release Method Design // *AAPS J.* 2009. Vol. 11. № 4. P. 762–770.
 33. Couillaud B.M. et al. State of the Art of Pharmaceutical Solid Forms: from Crystal Property Issues to Nanocrystals Formulation // *ChemMedChem*. 2019. Vol. 14. № 1. P. 8–23.
 34. De Smet L. et al. Formulation of itraconazole nanocrystals and evaluation of their bioavailability in dogs // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014. Vol. 87. № 1. P. 107–113.
 35. Bisrat M., Nyström C. Physicochemical aspects of drug release. VIII. The relation between particle size and surface specific dissolution rate in agitated suspensions // *Int. J. Pharm.* 1988. Vol. 47. № 1. P. 223–231.
 36. Mitri K. et al. Lutein nanocrystals as antioxidant formulation for oral and dermal delivery // *Int. J. Pharm.* 2011. Vol. 420. № 1. P. 141–146.
 37. Machkovech S.M., Foster T.P. *Aqueous Suspensions // Long Acting Injections and Implants*. Boston, MA: Springer US. 2012. P. 137–151.
 38. Merisko-Liversidge E., Liversidge G.G. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. Vol. 63. № 6. P. 427–440.
 39. Liu P. et al. Nanosuspensions of poorly soluble drugs: Preparation and development by wet milling // *Int. J. Pharm.* 2011. Vol. 411. № 1. P. 215–222.
 40. Lindenmayer J.-P. Long-acting injectable antipsychotics: focus on olanzapine pamoate // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2010. P. 261–267.
 41. Meyers K.J. et al. Postinjection delirium/sedation syndrome in patients with schizophrenia receiving olanzapine long-acting injection: results from a large observational study. // *BJPsych open*. 2017. Vol. 3. № 4. P. 186–192.
 42. Emsley R., Kilian S. Efficacy and safety profile of paliperidone palmitate injections in the management of patients with schizophrenia: an evidence-based review. // *Neuropsychiatr. Dis.*

- Treat. 2018. Vol. 14. P. 205–223.
43. Weiden P.J. et al. Does Half-Life Matter After Antipsychotic Discontinuation? // *J. Clin. Psychiatry*. 2017. Vol. 78. № 7. P. e813–e820.
 44. Spreen W.R., Margolis D.A., Pottage J.C. Long-acting injectable antiretrovirals for HIV treatment and prevention // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2013. Vol. 8. № 6. P. 565–571.
 45. Rizzardini G. et al. Long-Acting Injectable Cabotegravir + Rilpivirine for HIV Maintenance Therapy: Week 48 Pooled Analysis of Phase 3 ATLAS and FLAIR Trials // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2020. Vol.85. №4. P. 498-506.
 46. Gigliobianco M.R. et al. Nanocrystals of poorly soluble drugs: Drug bioavailability and physicochemical stability // *Pharmaceutics*. 2018. Vol. 10. № 3. P. 134.
 47. Wang Y., Burgess D.J. *Microsphere Technologies // Long Acting Injections and Implants*. Boston, MA: Springer US. 2012. P. 167–194.
 48. Kapoor D.N. et al. PLGA: a unique polymer for drug delivery // *Ther. Deliv.* 2015. Vol. 6. № 1. P. 41–58.
 49. Yang S. et al. Fabrication of PLGA in situ forming implants and study on their correlation of in vitro release profiles with in vivo performances // *J. Biomater. Sci. Polym.* 2021. Vol. 32. № 8. P. 994–1008.
 50. Bode C. et al. In-situ forming PLGA implants for intraocular dexamethasone delivery // *Int. J. Pharm.* 2018. Vol. 548. № 1. P. 337–348.
 51. Molavi F., Barzegar-Jalali M., Hamishehkar H. Polyester based polymeric nano and microparticles for pharmaceutical purposes: A review on formulation approaches // *J. Control. Release*. 2020. Vol. 320. P. 265–282.
 52. Park K. et al. Injectable, long-acting PLGA formulations: Analyzing PLGA and understanding microparticle formation // *J. Control. Release*. 2019. Vol. 304. P. 125–134.
 53. Zhang C. et al. Formulation and in vitro characterization of long-acting PLGA injectable microspheres encapsulating a peptide analog of LHRH // *J. Mater. Sci. Technol.* 2021. Vol. 63. P. 133–144.
 54. Patel M., Jha A., Patel R. Potential application of PLGA microsphere for tissue engineering // *J. Polym. Res.* 2021. Vol. 28. № 6. P. 214.
 55. Jin S. et al. Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration // *Acta Biomater.* 2021. Vol. 127. P. 56–79.
 56. Shi Y. et al. A review of existing strategies for designing long-acting parenteral formulations: Focus on underlying mechanisms, and future perspectives // *Acta Pharm. Sin. B.* 2021. Vol. 11. № 8. P. 2396–2415.
 57. Dasaratha Dhanaraju M. et al. Characterization of polymeric poly(ϵ -caprolactone) injectable

- implant delivery system for the controlled delivery of contraceptive steroids // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2006. Vol. 76A. № 1. P. 63–72.
58. Boia R. et al. Porous poly(ϵ -caprolactone) implants: A novel strategy for efficient intraocular drug delivery // *J. Control. Release*. 2019. Vol. 316. P. 331–348.
59. Thakkar H. et al. Albumin microspheres as carriers for the antiarthritic drug celecoxib // *AAPS PharmSciTech*. 2005. Vol. 6. № 1. P. 65–73.
60. Cosco D. et al. Rutin-loaded chitosan microspheres: Characterization and evaluation of the anti-inflammatory activity // *Carbohydr. Polym.* 2016. Vol. 152. P. 583–591.
61. Wu L. et al. Long-Acting Injectable Hormonal Dosage Forms for Contraception // *Pharm. Res.* 2015. Vol. 32. № 7. P. 2180–2191.
62. Kim J.H. et al. Three months extended-release microspheres prepared by multi-microchannel microfluidics in beagle dog models // *Int. J. Pharm.* 2021. Vol. 608. P. 121039.
63. Bhujel R. et al. Practical quality attributes of polymeric microparticles with current understanding and future perspectives // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2021. Vol. 64. P. 102608.
64. Morteza S. et al. Modeling, design, and machine learning-based framework for optimal injectability of microparticle-based drug formulations // *Sci. Adv.* 2022. Vol. 6. № 28. P. eabb6594.
65. Parumasivam T. Rifapentine-loaded PLGA microparticles for tuberculosis inhaled therapy: Preparation and in vitro aerosol characterization // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 88. P. 1–11
66. Larsen C. et al. Role of in vitro release models in formulation development and quality control of parenteral depots // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009. Vol. 6. № 12. P. 1283–1295.
67. Hirota K. et al. Optimum conditions for efficient phagocytosis of rifampicin-loaded PLGA microspheres by alveolar macrophages // *J. Control. Release*. 2007. Vol. 119. № 1. P. 69–76.
68. Lei H. et al. A Novel Method for Preparing Uniform-Sized PLGA Microspheres and the Application in Anti-tubercular Drug Delivery // *J. Pharm. Innov.* 2021. Vol. 16. № 4. P. 620–629.
69. Sequeira J.A.D. et al. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) matrix implants // *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs: From Design to Applications*. 2018. P. 375–402.
70. Fialho S.L., Silva Cunha A. da. Manufacturing Techniques of Biodegradable Implants Intended for Intraocular Application // *Drug Deliv.* 2005. Vol. 12. № 2. P. 109–116.
71. Kefayat A., Vaezifar S. Biodegradable PLGA implants containing doxorubicin-loaded chitosan nanoparticles for treatment of breast tumor-bearing mice // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 136. P. 48–56.
72. Bode C. et al. Often neglected: PLGA/PLA swelling orchestrates drug release: HME implants //

- J. Control. Release. 2019. Vol. 306. P. 97–107.
73. Bassand C. et al. Hot melt extruded PLGA implants loaded with ibuprofen: How heat exposure alters the physical drug state // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2022. Vol. 73. P. 103432.
 74. Yang Y. et al. Safety and efficacy of PLGA(Ag-Fe(3)O(4))-coated dental implants in inhibiting bacteria adherence and osteogenic inducement under a magnetic field // *Int. J. Nanomedicine.* 2018. Vol. 13. P. 3751–3762.
 75. Kempe S., Mäder K. In situ forming implants — an attractive formulation principle for parenteral depot formulations // *J. Control. Release.* 2012. Vol. 161. № 2. P. 668–679.
 76. Southard G.L., Dunn R.L., Garrett S. The drug delivery and biomaterial attributes of the ATRIGEL® technology in the treatment of periodontal disease // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 1998. Vol. 7. № 9. P. 1483–1491.
 77. Young I.C., Benhabbour S.R. Multipurpose Prevention Technologies: Oral, Parenteral, and Vaginal Dosage Forms for Prevention of HIV/STIs and Unplanned Pregnancy // *Polymers.* 2021. Vol. 13. № 15. P. 2450
 78. Parent M. et al. PLGA in situ implants formed by phase inversion: Critical physicochemical parameters to modulate drug release // *J. Control. Release.* 2013. Vol. 172. № 1. P. 292–304.
 79. Thakur R.R.S., McMillan H.L., Jones D.S. Solvent induced phase inversion-based in situ forming controlled release drug delivery implants // *J. Control. Release.* 2014. Vol. 176. № 1. P. 8–23.
 80. Ibrahim T.M., El-Megrab N.A., El-Nahas H.M. An overview of PLGA in-situ forming implants based on solvent exchange technique: effect of formulation components and characterization // *Pharm. Dev. Technol.* 2021. Vol. 26. № 7. P. 709–728.
 81. Wright J.C. et al. *In Situ Forming Systems (Depots) // Long Acting Injections and Implants.* Boston, MA: Springer US. 2012. P. 153–166.
 82. McHugh A.J. The role of polymer membrane formation in sustained release drug delivery systems // *J. Control. Release.* 2005. Vol. 109. № 1. P. 211–221.
 83. Graham P.D., Brodbeck K.J., McHugh A.J. Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery // *J. Control. Release.* 1999. Vol. 58. № 2. P. 233–245.
 84. Ermolenko Y. V et al. Role of hydrolytic degradation of polylactide drug carriers in developing micro- and nanoscale polylactide-based drug dosage forms // *Russ. Chem. Bull.* 2020. Vol. 69, № 8. P. 1416–1427.
 85. A A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – a review // *Int J Pharm.* 2011. Vol. 415. P. 34.
 86. Chen W. et al. Effect of particle size on drug loading and release kinetics of gefitinib-loaded PLGA microspheres // *Mol. Pharm.* 2017. Vol. 14. № 2. P. 459–467.

87. Bertrand N., Leclair G., Hildgen P. Modeling drug release from bioerodible microspheres using a cellular automaton // *Int. J. Pharm.* 2007. Vol. 343. № 1–2. P. 196–207.
88. Edlund U., Albertsson A.C. Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery // *Advances in Polymer Science.* 2002. Vol. 157. P. 67–112.
89. Chen X., Ooi C.P. Hydrolytic degradation and drug release properties of ganciclovir-loaded biodegradable microspheres // *Acta Biomater.* 2008. Vol. 4. № 4. P. 1046–1056.
90. Ramazani F. et al. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: State-of-the-art and challenges // *Int. J. Pharm.* 2016. Vol. 499. P. 358–367.
91. Su Y. et al. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application // *Drug Deliv.* 2021. Vol. 28. № 1. P. 1397–1418.
92. Busatto C. et al. Effect of particle size, polydispersity and polymer degradation on progesterone release from PLGA microparticles: Experimental and mathematical modeling // *Int. J. Pharm.* 2018. Vol. 536. № 1. P. 360–369.
93. Chhabra S., Sachdeva V., Singh S. Influence of end groups on in vitro release and biological activity of lysozyme from a phase-sensitive smart polymer-based in situ gel forming controlled release drug delivery system // *Int. J. Pharm.* 2007. Vol. 342. № 1–2. P. 72–77.
94. Zhang Q., Fassihi R. Release rate determination from in situ gel forming PLGA implant: a novel ‘shape-controlled basket in tube’ method // *J. Pharm. Pharmacol.* 2020. Vol. 72. № 8. P. 1038–1048.
95. Kapoor D.N., Katare O.P., Dhawan S. In situ forming implant for controlled delivery of an anti-HIV fusion inhibitor // *Int. J. Pharm.* 2012. Vol. 426. № 1–2. P. 132–143.
96. Chhabra S., Sachdeva V., Singh S. Influence of end groups on in vitro release and biological activity of lysozyme from a phase-sensitive smart polymer-based in situ gel forming controlled release drug delivery system // *Int. J. Pharm.* 2007. Vol. 342. № 1. P. 72–77.
97. Wang X., Burgess D.J. Drug release from in situ forming implants and advances in release testing // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021. Vol. 178. P. 113912.
98. Kanwar N., Sinha V.R. In situ forming depot as sustained-release drug delivery systems // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2019. Vol. 36. № 2. P. 93–136.
99. Yoo J., Won Y.Y. Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020. Vol. 6. № 11. P. 6053–6062.
100. Tamani F. et al. Mechanistic explanation of the (up to) 3 release phases of PLGA microparticles: Diprophylline dispersions // *Int. J. Pharm.* 2019. Vol. 572. P. 118819.
101. Zare M. et al. Effect of additives on release profile of leuprolide acetate in an in Situ forming controlled-release system: In Vitro study // *J. Appl. Polym. Sci.* 2008. Vol. 107. № 6. P. 3781–

- 3787.
102. Ahmed T.A. et al. Development of biodegradable in situ implant and microparticle injectable formulations for sustained delivery of haloperidol // *J. Pharm. Sci.* 2012. Vol. 101. № 10. P. 3753–3762.
 103. Ibrahim T.M., El-Megrab N.A., El-Nahas H.M. Optimization of injectable PLGA in-situ forming implants of anti-psychotic risperidone via Box-Behnken Design // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2020. Vol. 58. P. 101803.
 104. Bruschi M.L. Mathematical models of drug release // *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. Sawston: Woodhead Publishing. 2015. P. 63–86.
 105. An T. et al. Sustained release of risperidone from biodegradable microspheres prepared by in-situ suspension-evaporation process // *Int. J. Pharm.* 2016. Vol. 503. № 1. P. 8–15.
 106. Zhao J. et al. Development of near zero-order release PLGA-based microspheres of a novel antipsychotic // *Int. J. Pharm.* 2017. Vol. 516. № 1. P. 32–38.
 107. Astaneh R. et al. Changes in morphology of in situ forming PLGA implant prepared by different polymer molecular weight and its effect on release behavior // *J. Pharm. Sci.* 2009. Vol. 98. № 1. P. 135–145.
 108. Camargo J.A. et al. Injectable PLA-based in situ forming implants for controlled release of Ivermectin a BCS Class II drug: Solvent selection based on physico-chemical characterization // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2013. Vol. 39. № 1. P. 146–155.
 109. Astaneh R. et al. Effects of ethyl benzoate on performance, morphology, and erosion of PLGA implants formed in situ // *Adv. Polym. Technol.* 2008. Vol. 27. № 1. P. 17–26.
 110. DesNoyer J.R., McHugh A.J. The effect of Pluronic on the protein release kinetics of an injectable drug delivery system // *J. Control. Release.* 2003. Vol. 86. № 1. P. 15–24.
 111. Saltzstein D. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of subcutaneous versus intramuscular leuprolide acetate formulations in male subjects // *Ther. Adv. Urol.* 2018. Vol. 10. № 2. P. 43–50.
 112. Vella S. et al. The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world // *AIDS.* 2012. Vol. 26. № 10. P. 1231–1241.
 113. Flexner C. Modern HIV Therapy: Progress and Prospects // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2019. Vol. 105. № 1. P. 61–70.
 114. Danel C. et al. Two-Months-off, Four-Months-on Antiretroviral Regimen Increases the Risk of Resistance, Compared with Continuous Therapy: A Randomized Trial Involving West African Adults // *J. Infect. Dis.* 2008. Vol. 199. № 1. P. 66–76.
 115. Gu S.X. et al. Advances in diarylpyrimidines and related analogues as HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. Vol. 158. P. 371–392.

116. Gu S.X. et al. Recent progress in HIV-1 inhibitors targeting the entrance channel of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. Vol. 174. P. 277–291.
117. Hodge D. et al. Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions of Long-Acting Intramuscular Cabotegravir and Rilpivirine // *Clin. Pharmacokinet.* 2021. Vol. 60. № 7. P. 835–853.
118. Landovitz R.J. et al. Tail-phase safety, tolerability, and pharmacokinetics of long-acting injectable cabotegravir in HIV-uninfected adults: a secondary analysis of the HPTN 077 trial // *Lancet. HIV.* 2020. Vol. 7. № 7. P. e472–e481.
119. McGowan I. et al. Long-acting rilpivirine as potential pre-exposure prophylaxis for HIV-1 prevention (the MWRI-01 study): an open-label, phase 1, compartmental, pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment // *Lancet. HIV.* 2016. Vol. 3. № 12. P. e569–e578.
120. Penrose K.J. et al. Selection of Rilpivirine-Resistant HIV-1 in a Seroconverter From the SSAT 040 Trial Who Received the 300-mg Dose of Long-Acting Rilpivirine (TMC278LA). // *J. Infect. Dis.* 2016. Vol. 213. № 6. P. 1013–1017.
121. Kulkarni T.A. et al. A year-long extended release nanoformulated cabotegravir prodrug. // *Nat. Mater.* 2020. Vol. 19. № 8. P. 910–920.
122. Zhou T. et al. Creation of a nanoformulated cabotegravir prodrug with improved antiretroviral profiles. // *Biomaterials.* 2018. Vol. 151. P. 53–65.
123. Hilaire J.R. et al. Creation of a long-acting rilpivirine prodrug nanoformulation // *J. Control. Release.* 2019. Vol. 311–312. P. 201–211.
124. Mc Crudden M.T.C. et al. Design, formulation and evaluation of novel dissolving microarray patches containing a long-acting rilpivirine nanosuspension // *J. Control. Release.* 2018. Vol. 292. P. 119–129.
125. Gunawardana M. et al. Multispecies Evaluation of a Long-Acting Tenofovir Alafenamide Subdermal Implant for HIV Prophylaxis. // *Front. Pharmacol.* 2020. Vol. 11. P. 569373.
126. Johnson L.M. et al. Characterization of a Reservoir-Style Implant for Sustained Release of Tenofovir Alafenamide (TAF) for HIV Pre-Exposure Prophylaxis (PrEP) // *Pharmaceutics* . 2019. Vol. 11. № 7. P. 315.
127. Simpson S.M. et al. Design of a Drug-Eluting Subcutaneous Implant of the Antiretroviral Tenofovir Alafenamide Fumarate. // *Pharm. Res.* 2020. Vol. 37. № 4. P. 83.
128. Manjula G. et al. Pharmacokinetics of Long-Acting Tenofovir Alafenamide (GS-7340) Subdermal Implant for HIV Prophylaxis // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2022. Vol. 59. № 7. P. 3913–3919.
129. Schachter D., Zhang Q. Implantable devices for treating HIV. US Pat. № 20110256206A1. 20 Oct. 2011.

130. Schachter D. et al. Degradable removable implant for continuous release of active compound. US Pat. №2011080141A2. 7 Jul. 2011.
131. Benhabbour S.R. et al. Ultra-long-acting tunable biodegradable and removable controlled release implants for drug delivery // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10. № 1. P. 4324.
132. Assessment report. Rekambys. 2020. 139 p.
133. Stegemann S. et al. When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2007. Vol. 31. № 5. P. 249–261.
134. Guillemont J. et al. Synthesis of novel diarylpyrimidine analogues and their antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1. // *J. Med. Chem.* 2005. Vol. 48. № 6. P. 2072–2079.
135. Romero G.B., Keck C.M., Müller R.H. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production // *Int. J. Pharm.* 2016. Vol. 501. № 1. P. 236–244.
136. Lozinsky I. V. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application // *Russ. Chem. Rev.* 2002. Vol. 71. № 6. P. 489–511.
137. Solorio L. et al. Noninvasive characterization of in situ forming implants using diagnostic ultrasound // *J. Control. Release.* 2010. Vol. 143. № 2. P. 183–190.
138. Ermolenko Y. et al. Potential of the capillary electrophoresis method for PLGA analysis in nano-sized drug formulations // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2022. Vol. 70. P. 103220.
139. Ульянова Ю.В., Ермоленко Ю.В., Карманова Р.А. Влияние параметров микрофлюидного процесса на характеристики микросфер на основе высокомолекулярного сополимера молочной и гликолевой кислот // *Успехи в химии и химической технологии.* 2019. Т. 33. № 3(213). С. 44–46.
140. Li X., Jiang X. Microfluidics for producing poly (lactic-co-glycolic acid)-based pharmaceutical nanoparticles // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018. Vol. 128. P. 101–114.
141. Watanabe T., Ono T., Kimura Y. Continuous fabrication of monodisperse polylactide microspheres by droplet-to-particle technology using microfluidic emulsification and emulsion-solvent diffusion // *Soft Matter.* 2011. Vol. 7. № 21. P. 9894–9897.
142. Fontana F. et al. Microfluidics as a cutting-edge technique for drug delivery applications // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2016. Vol. 34. P. 76–87.
143. Wang J. et al. Droplet microfluidics for the production of microparticles and nanoparticles // *Micromachines.* 2017. Vol. 8. № 1. P. 1–23.
144. Martins J.P., Torrieri G., Santos H.A. The importance of microfluidics for the preparation of nanoparticles as advanced drug delivery systems // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2018. Vol. 15. № 5. P. 469–479.
145. Liu Z. et al. Microfluidics for Production of Particles: Mechanism, Methodology, and

- Applications // *Small*. 2020. Vol. 16. № 9. P. 1904673.
146. Gu Z. Experimental and Theoretical Study of Droplet Formation at a T-junction with Xanthan Gum Solutions: dissertation ... Doctor of Philosophy – Sydney. 2013. – 273 p.
 147. Kovalchuk N.M. et al. Effect of surfactant on emulsification in microchannels // *Chem. Eng. Sci.* 2018. Vol. 176. P. 139–152.
 148. Гельперина С.Э. Введение в фармацевтическую нанотехнологию: учебное пособие. М.: РХТУ им. Д.И.Менделеева. 2021. 232 с.
 149. Jo Y.K., Lee D. Biopolymer Microparticles Prepared by Microfluidics for Biomedical Applications // *Small*. 2020. Vol. 16. № 9. P. 1–23.
 150. Liu D. Microfluidic-assisted fabrication of carriers for controlled drug delivery // *Lab Chip*. 2017. Vol. 17. № 11. P. 1856-1883.
 151. Zhu P., Wang L. Passive and active droplet generation with microfluidics: a review // *Lab Chip*. 2017. Vol. 17. № 1. P. 34–75.
 152. Chen W. et al. Effect of particle size on drug loading and release kinetics of gefitinib-loaded PLGA microspheres // *Mol. Pharm.* 2017. Vol. 14. № 2. P. 459–467.
 153. Hung L.H. et al. PLGA micro/nanosphere synthesis by droplet microfluidic solvent evaporation and extraction approaches // *Lab Chip*. 2010. Vol. 10. № 14. P. 1820–1825.
 154. Jafarifar E. et al. Preparation of a reproducible long-acting formulation of risperidone-loaded PLGA microspheres using microfluidic method // *Pharm. Dev. Technol.* 2017. Vol. 22. № 6. P. 836–843.
 155. Amoyav B., Benny O. Controlled and tunable polymer particles' production using a single microfluidic device // *Appl. Nanosci.* 2018. Vol. 8. № 4. P. 905–914.
 156. Sawant A. et al. Solid-in-Oil-in-Water Emulsion: An Innovative Paradigm to Improve Drug Stability and Biological Activity // *AAPS PharmSciTech*. 2021. Vol. 22. № 5. P. 199.
 157. Ulianova Y. et al. Tuning the release rate of rilpivirine from PLGA-based in situ forming implants // *Polym. Bull.* 2023. Vol. 80. № 10. P. 11401–11420.
 158. Patel V. et al. A Review on PLGA Based Solvent Induced In-situ Forming Implant // *Res. J. Pharm. Dos. Forms Technol.* 2015. Vol. 8. P. 127.
 159. Luan X., Bodmeier R. Influence of the poly(lactide-co-glycolide) type on the leuprolide release from in situ forming microparticle systems // *J. Control. Release*. 2006. Vol. 110. № 2. P. 266–272.
 160. Gad H.A., El-Nabarawi M.A., Abd El-Hady S.S. Formulation and Evaluation of PLA and PLGA In Situ Implants Containing Secnidazole and/or Doxycycline for Treatment of Periodontitis // *AAPS PharmSciTech*. 2008. Vol. 9. № 3. P. 878.
 161. Schwendeman S.P. et al. Injectable controlled release depots for large molecules // *J. Control.*

- Release. 2014. Vol. 190. P. 240–253.
162. Bradshaw J., White S. Combining Human Needs with High Viscosity Formulations // *ONdrugDelivery Mag.* 2018. № 91. P. 16–21.
163. <1001> In vitro release test methods for parenteral drug preparations [Electronic resource] // USP. URL: <https://online.uspnf.com> (date of the application: 21.02.2022).
164. D'Souza S. *Injectables // In Vitro Drug Release Testing of Special Dosage Forms*. NJ: John Wiley & Sons Ltd. 2019. P. 55–85.
165. Kim Y. et al. Recent progress in drug release testing methods of biopolymeric particulate system // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13. № 8. P. 1–23.
166. Brown C.K. et al. FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms // *Indian J. Pharm. Sci.* 2011. Vol. 73. № 3. P. 338–353.
167. Gray V. et al. *In Vitro Release Test Methods for Drug Formulations for Parenteral Applications // Dissolution Technol.* 2018. Vol. 25. P. 8–13.
168. Natarajan S. et al. Atropisomerism in Rilpivirine hydrochloride: Spectroscopic characterization of Rilpivirine and related impurities // *Chirality*. 2018. Vol. 30. № 8. P. 966–973.
169. Else L.J. et al. Quantification of rilpivirine in human plasma, cervicovaginal fluid, rectal fluid and genital/rectal mucosal tissues using liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Bioanalysis*. 2014. Vol. 6. № 14. P. 1907–1921.
170. Kumar K.R., Suneetha A., Srilakshmi N. A validated LC Method for the Estimation of Rilpivirine in API and Pharmaceutical Dosage form // *J. Pharm. Res.* 2012. Vol. 5. № 8. P. 4434–4436.
171. Date A.A. et al. Development and validation of a simple and isocratic reversed-phase HPLC method for the determination of rilpivirine from tablets, nanoparticles and HeLa cell lysates // *Biomed. Chromatogr.* 2015. Vol. 29. № 5. P. 709–715.
172. Shibata M. et al. Development and application of a simple LC-MS method for the determination of plasma rilpivirine (TMC-278) concentrations // *J. Med. Investig.* 2013. Vol. 60. № 1–2. P. 35–40.
173. Brown C.K. et al. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds // *Pharm. Technol.* 2004. Vol. 28. № 12. P. 56–65.
174. Klose D., Delplace C., Siepmann J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles // *Int. J. Pharm.* 2011. Vol. 404. № 1. P. 75–82.
175. Гребёнкин Д.Ю., Станишевский Я.М., Шохин И.Е. Современные подходы к проведению сравнительного теста кинетики растворения (обзор) // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016. Т. 1. С. 166–171.
176. Fecioru E. et al. In vitro performance testing of nanoparticulate drug products for parenteral

- administration // *Dissolution Technol.* 2019. Vol. 26. № 3. P. 28–37.
177. Fotaki N. et al. Rationale for selection of dissolution media: Three case studies // *Dissolution Technol.* 2013. Vol. 20. № 3. P. 6–13.
178. Xu Q. et al. Preparation of Monodisperse Biodegradable Polymer Microparticles Using a Microfluidic Flow-Focusing Device for Controlled Drug Delivery // *Small.* 2009. Vol. 5. № 13. P. 1575–1581.
179. Xu Y. et al. Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug–polymer applications: A review of experiments and theories // *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 2017. Vol. 105. № 6. P. 1692–1716.
180. Kumskova N. et al. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release // *J. Microencapsul.* 2020. Vol. 37. № 3. P. 283–295.
181. Hines D.J., Kaplan D.L. Poly(lactic-co-glycolic) Acid-Controlled-Release Systems: Experimental and Modeling Insights // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2013. Vol. 30. № 3. P. 257–276.
182. Burkersroda F. von, Schedl L., Göpferich A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion // *Biomaterials.* 2002. Vol. 23. № 21. P. 4221–4231.
183. Wischke C. et al. Development of PLGA-Based Injectable Delivery Systems For Hydrophobic Fenretinide // *Pharm. Res.* 2010. Vol. 27. № 10. P. 2063–2074.
184. Solorio L. et al. Noninvasive characterization of the effect of varying PLGA molecular weight blends on in situ forming implant behavior using ultrasound imaging // *Theranostics.* 2012. Vol. 2. № 11. P. 1064–1077.
185. Hopkins K.A. et al. Noninvasive characterization of in situ forming implant diffusivity using diffusion-weighted MRI // *J. Control. Release.* 2019. Vol. 309. P. 289–301.
186. Patel R.B. et al. Effect of injection site on in situ implant formation and drug release in vivo // *J. Control. Release.* 2010. Vol. 147. № 3. P. 350–358.
187. Hernandez C. et al. Macroporous acrylamide phantoms improve prediction of in vivo performance of in situ forming implants // *J. Control. Release.* 2016. Vol. 243. P. 225–231.
188. Sun Y. et al. Concomitant monitoring of implant formation and drug release of in situ forming poly (lactide-co-glycolide acid) implants in a hydrogel matrix mimicking the subcutis using UV–vis imaging // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018. Vol. 150. P. 95–106.
189. Solorio L., Exner A.A. Effect of the Subcutaneous Environment on Phase-Sensitive in Situ-Forming Implant Drug Release, Degradation, and Microstructure // *J. Pharm. Sci.* 2015. Vol. 104. № 12. P. 4322–4328.
190. Mathur A.B. et al. Endothelial , cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and

- elastic properties as determined by atomic force microscopy // *J. Biomech.* 2001. Vol. 34. P. 1545–1553.
191. Mandal S. et al. Confocal fluorescence microscopy: An ultra-sensitive tool used to evaluate intracellular antiretroviral nano-drug delivery in HeLa cells // *AIP Adv.* 2015. Vol. 5. № 8. P. 84803.
192. Ye F. et al. Drug release into hydrogel-based subcutaneous surrogates studied by UV imaging // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012. Vol. 71. P. 27–34.
193. Klose D. et al. Towards More Realistic In Vitro Release Measurement Techniques for Biodegradable Microparticles // *Pharm. Res.* 2008. Vol. 26. № 3. P. 691.
194. Hoang Thi T.H. et al. Bone implants modified with cyclodextrin: Study of drug release in bulk fluid and into agarose gel // *Int. J. Pharm.* 2010. Vol. 400. № 1. P. 74–85.
195. FDA Approves Cabenuva and Vocabria for the Treatment of HIV-1 Infection [Electronic resource] // Food & Drug Administration. 2021. URL: <https://www.fda.gov/> (date of the application: 15.04.2022).
196. Van Eerdenbrugh B., Van den Mooter G., Augustijns P. Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products // *Int. J. Pharm.* 2008. Vol. 364. № 1. P. 64–75.
197. Müller R.H., Möschwitzer J. Method and device for producing very fine particles and coating such particles. US Pat. №9168498B2. 27 Oct. 2015.
198. Lemke A., Moeschwitzer J. Method for carefully producing ultrafine particle suspensions and ultrafine particles and use thereof. WO Pat. №2006108637A3. 19 Oct. 2006.
199. Mukadam I.Z. et al. Rilpivirine-associated aggregation-induced emission enables cell-based nanoparticle tracking // *Biomaterials.* 2020. Vol. 231. P. 119669.
200. Ghosh I. et al. Optimization of formulation and process parameters for the production of nanosuspension by wet media milling technique: Effect of Vitamin E TPGS and nanocrystal particle size on oral absorption // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012. Vol. 47. № 4. P. 718–728.
201. Wang Y. et al. Stability of nanosuspensions in drug delivery // *J. Control. Release.* 2013. Vol. 172. № 3. P. 1126–1141.
202. Wang M. et al. Production and Characterization of Carbamazepine Nanocrystals by Electrospraying for Continuous Pharmaceutical Manufacturing // *J. Pharm. Sci. Elsevier.* 2012. Vol. 101. № 3. P. 1178–1188.
203. Surwase S.A. et al. Indomethacin: New Polymorphs of an Old Drug // *Mol. Pharm.* 2013. Vol. 10. № 12. P. 4472–4480.
204. Ding D., Zhu Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics // *Mater. Sci. Eng. C.* 2018. Vol. 92. P. 1041–1060.

205. Peltonen L., Strachan C.J. Degrees of order: A comparison of nanocrystal and amorphous solids for poorly soluble drugs // *Int. J. Pharm.* 2020. Vol. 586. P. 119492.
206. Stokbroekx S.C.M. Crystalline form of 4-4-4-(2-cyanoethenyl)-2,6-dimethylphenyl-amino-2-pyrimidinylaminobenzonitrile. US Pat. №20100189796A1. 29 Jul. 2010.
207. Peltonen L., Hirvonen J. Drug nanocrystals – Versatile option for formulation of poorly soluble materials // *Int. J. Pharm.* 2018. Vol. 537. № 1. P. 73–83.
208. Sharma M., Mehta I. Surface stabilized atorvastatin nanocrystals with improved bioavailability, safety and antihyperlipidemic potential // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. № 1. P. 16105.
209. Inghelbrecht S.K.K., Gieseler H., Beirowski J.A. Freeze dried drug nanosuspensions. WO Pat. №201240220A1. 18 Oct. 2012.
210. Зырянов С.К. Оценка эквивалентности *in vitro* воспроизведенных препаратов бетагистина как инструмента, потенциально определяющего эффективность фармакотерапии // *Журнал неврологии и психотерапии.* 2018. Т. 11. С. 43–48.
211. Dash S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems // *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 2010. Vol. 67. № 3. P. 217–223.
212. Lao L.L. et al. Modeling of drug release from bulk-degrading polymers // *Int. J. Pharm.* 2011. Vol. 418. № 1. P. 28–41.
213. Trucillo P. Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release // *Processes.* 2022. Vol. 10. № 6. P. 1094.
214. Siepmann J., Göpferich A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 48. № 2–3. P. 229–247.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА (ТАБЛИЦЫ)

Таблица 1 – Примеры инъекционных лекарственных препаратов длительного действия, одобренные для клинического применения [25,26] – С. 13.

Таблица 2 – Инъекционные лекарственные препараты длительного действия на основе PLGA, одобренные для клинического применения [56] – С. 19.

Таблица 3 – Математические модели для расчета кинетики высвобождения ЛВ – С. 54.

Таблица 4 – Характеристика PLGA – С. 56.

Таблица 5 – Межфазное натяжение (σ , мН/м) в гетерофазной системе жидкость-жидкость, состоящей из 1% раствора PLGA в этилацетате и 2% раствора стабилизатора (n=3) [139] – С. 60.

Таблица 6 – Характеристика PLGA микросфер с рилпивиринном в зависимости от отношения Q_v/Q_o (n=3) – С. 63.

Таблица 7 – Характеристика PLGA микросфер в зависимости от загрузки рилпивиринна (n=3) – С. 65.

Таблица 8 – Характеристика PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринном – С. 67.

Таблица 9 – Условия формирования *in situ* имплантатов, нагруженных рилпивиринном – С. 71.

Таблица 10 – Кажущаяся растворимость рилпивиринна в модельных средах (n=3) – С. 76.

Таблица 11 – Характеристика образцов суспензии нанокристаллов рилпивиринна, полученных различными методами (n=3) – С. 106.

Таблица 12 – Математическое описание профиля высвобождения рилпивиринна из микросфер и имплантата с использованием моделей нулевого и первого порядка, модели Хигуччи – С. 113.

Таблица 13 – Математическое описание профиля высвобождения рилпивиринна из микросфер и имплантата с использованием моделей, учитывающих форму и разрушение полимерной матрицы – С. 114.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА (РИСУНКИ)

Рисунок 1 – Типичное изображение фармакокинетических профилей лекарственного вещества в плазме после многократного введения обычной лекарственной формы (ЛФ) (сиреневая линия) и однократного в/м введения системы пролонгированного высвобождения (голубая линия) – С. 12.

Рисунок 2 – СЭМ изображение частиц позаконазола, плохо растворимого в воде противогрибкового средства, до (слева) и после (справа) измельчения порошка субстанции с использованием технологии влажного помола. Также показаны кривые распределения частиц по размерам, полученные методом лазерной дифракции света: средний размер частиц до измельчения составлял ~53 мкм с широким распределением по размерам, после измельчения – 0,185 мкм с узким распределением по размерам [38] – С. 16.

Рисунок 3 – Сополимер молочной и гликолевой кислот (x – число мономерных звеньев молочной кислоты, y – гликолевой кислоты) – С. 19.

Рисунок 4 – СЭМ изображение PLGA микросфер, нагруженных ЛВ, полученных с использованием микрофлюидной системы: полученных из низкомолекулярного PLGA (0,16 – 0,24 дл/г, 50:50) (сверху); полученных из низкомолекулярного PLGA (0,16 – 0,24 дл/г, 75:25) (снизу); и распределение частиц по размерам [62] – С. 22.

Рисунок 5 – Механизм формирования *in situ* имплантата [77] – С. 24.

Рисунок 6 – СЭМ изображение внутренней структуры *in situ* имплантатов, сформированных по механизму быстрой (а) и медленной (б) инверсии фаз. Слева показан пример «пальцеобразных» пор (а), справа – «губчатых» пор (б). Имплантаты получали из 40 масс.% раствора PLGA (50:50, Mw 10 кДа) в NMP (а) или триацетине (б) [83] – С. 26.

Рисунок 7 – Схема объемной деградации полилактидной матрицы [84] – С. 28.

Рисунок 8 – Профили высвобождения ЛВ *in vitro* и *in vivo* для четырех различных высвобождений: а) монофазное, б) импульсное двухфазное, в) отсроченное двухфазное, г) трехфазное [99] – С. 29.

Рисунок 9 – Структуры ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, одобренные FDA – С. 32.

Рисунок 10 – Типичные дифрактограмма (а) и ДСК термограмма (б) образца PLGA (76-115 кДа) с соотношением лактид:гликолид 75:25 – С.57.

Рисунок 11 – Схема получения PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринном, с использованием микрофлюидной системы – С. 59.

Рисунок 12 – Средний диаметр микросфер, полученных с разной концентрацией ПАВ в водной фазе; скорость потока органической фазы 8,9 мкл/мин, скорость потока водной фазы 83 мкл/мин (n=3) [139] – С. 61.

Рисунок 13 – а) Зависимость диаметра микросфер от соотношения расходов Q_w/Q_o ; расход органической фазы Q_o 8,9 мкл/мин, расход водной фазы варьировали от 30 до 100 мкл/мин; б) Зависимость диаметра микросфер от диаметра капель эмульсии (n=3) – С. 62.

Рисунок 14 – Оптические фотографии микросфер, полученных из высокомолекулярного PLGA (76-115 кДа) 75:25 со сложноэфирной группой: PLGA-RPV-1 – 69 мкм, PLGA-RPV-2 – 43 мкм, PLGA-RPV-3 – 34 мкм; цифровой микроскоп Meros High Speed Digital (Великобритания) – С. 63.

Рисунок 15 – Зависимость среднего диаметра микросфер (а) и коэффициента вариации (б) от концентрации PLGA в органической фазе [139] – С. 64.

Рисунок 16 – Микрофотографии PLGA микросфер, нагруженных рилпивиринном, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина): PLGA-RPV-6 – PLGA (76-115 кДа) 75:25 со сложноэфирной группой; PLGA-RPV-7 – PLGA (68 кДа) 75:25 со сложноэфирной группой; PLGA-RPV-8 – PLGA (44 кДа) 50:50 со сложноэфирной группой; PLGA-RPV-9 – PLGA (42 кДа) 50:50 с карбоксильной группой – С. 68.

Рисунок 17 – а) Схема формирования *in situ* имплантатов; б) Форма PLGA имплантата, сформированного в буферном растворе *in vitro*; в) Форма PLGA имплантата, сформированного при п/к введении крысе – С. 70.

Рисунок 18 – Микрофотографии PLGA имплантатов, нагруженных рилпивиринном, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина) – С. 71.

Рисунок 19 – а) Схема транс-цис-изомеризации рилпивиринина; б) Структурные формулы основных примесей рилпивиринина – С. 74.

Рисунок 20 – Хроматограмма рилпивиринина в 0,15 М фосфатно-солевом буферном растворе pH 7,4 с добавлением Твин 20 – С. 74.

Рисунок 21 – Профили высвобождения рилпивиринина из PLGA микросфер различного размера; n=3 – С. 80.

Рисунок 22 – Профили гидролитической деградации PLGA микросфер разного размера; $n=3$ – С. 80.

Рисунок 23 – Ионизация молекулы рилпивирин в водных растворах при изменении pH (Chemicalize, <https://chemicalize.com>) – С. 81.

Рисунок 24 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), PLGA микросфер при инкубации в течение 77 дней – С. 81.

Рисунок 25 – Профили высвобождения рилпивирин из PLGA микросфер, полученных из полимеров с разной молекулярной массой; $n=3$ – С. 83.

Рисунок 26 – Профили гидролитической деградации микросфер, полученных из PLGA с различной молекулярной массой; $n=3$ – С. 84.

Рисунок 27 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), PLGA микросфер, полученных из полимеров разной Mw, при инкубации в течение 77 дней – С. 84.

Рисунок 28 – Профили высвобождения рилпивирин из PLGA микросфер, полученных из полимеров с разным соотношением L:G; $n=3$ – С. 86.

Рисунок 29 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), PLGA микросфер, полученных из полимеров с разным соотношением L:G, при инкубации в течение 36 дней – С. 86.

Рисунок 30 – Профили гидролитической деградации микросфер, полученных из PLGA с разным соотношением L:G; $n=3$ – С. 87.

Рисунок 31 – Профили высвобождения рилпивирин из PLGA микросфер, полученных из полимеров с разной концевой группой; $n=3$ – С. 88.

Рисунок 32 – Профили гидролитической деградации микросфер, полученных из полимеров с разной концевой группой; $n=3$ – С. 89.

Рисунок 33 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), PLGA микросфер при инкубации в течение 70 дней – С. 89.

Рисунок 34 – Профили высвобождения рилпивирин из имплантатов с различным содержанием PLGA; $n=3$ [157] – С. 91.

Рисунок 35 – Профили гидролитической деградации имплантатов с различным содержанием PLGA; $n=3$ [157] – С. 92.

Рисунок 36 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), PLGA имплантатов при инкубации в течение 24 дней [157]– С. 93.

Рисунок 37 – Профили высвобождения рилпивирин (а) и профили гидролитической деградации PLGA (б) из имплантатов, полученных из полимеров с разной молекулярной массой, n=3 [157] – С. 94.

Рисунок 38 – Профили высвобождения рилпивирин (а) и профиль гидролитической деградации PLGA (б) имплантатов, полученных из полимеров, отличающихся по структуре концевой группы; n=3 [157] – С. 96.

Рисунок 39 – Профили высвобождения рилпивирин (а) и профили гидролитической деградации PLGA (б) имплантатов, полученных из полимеров, отличающихся соотношением L:G; n=3 [157] – С. 97.

Рисунок 40 – Профили высвобождения рилпивирин из имплантатов, полученных с разной загрузкой рилпивирин: а) содержание свободного рилпивирин в приемной среде, б) доля высвободившегося рилпивирин; n=3 – С. 99.

Рисунок 41 – а) Внешний вид и форма гелевых фантомов; б) СЭМ изображение внутренней структуры полиакриламидного геля PAA_3а и криогеля PAA_3б; в) Введение 30% раствора PLGA в N-метил-2-пирролидоне в гелевые фантомы. Для визуализации формирования имплантата использовали родамин 6G – С. 101.

Рисунок 42 – Профиль высвобождения рилпивирин из *in situ* имплантата, сформированного в буферном растворе и в гелевом фантоме; n=3 – С. 103.

Рисунок 43 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), PLGA имплантатов, сформированных в буферном растворе (слева) и в агарозном геле (справа) – С. 104.

Рисунок 44 – Зависимость размера нанокристаллов от длительности измельчения: а) гомогенизация под давлением; б) ультразвуковая гомогенизация; в) механическое истирание со стеклянными шариками; соотношение рилпивирин-полоксамер 338 составляло 4:1; n=4 – С. 106.

Рисунок 45 – Микрофотографии, полученные с помощью СЭМ (микроскоп JSM-6510LV (JEOL, Япония); напыление платина), частиц порошка рилпивирин до (а) и после (б) измельчения стеклянными шариками в течение 24 ч [157] – С. 107.

Рисунок 46 – Дифрактограмма исходного порошка рилпивирин, поллоксамера 338 и нанокристаллов рилпивирин, стабилизированных поллоксамером 338. Нанокристаллическая форма рилпивирин получена методом истирания со стеклянными шариками [157] – С. 108.

Рисунок 47 – Распределение по размерам нанокристаллов рилпивирин в образцах восстановленных суспензий после лиофилизации с использованием различных криопротекторов; образцы получены методом механического истирания со стеклянными шариками – С. 109.

Рисунок 48 - Профиль растворения нанокристаллической формы рилпивирин, полученной истиранием со стеклянными шариками. Размер частиц 226 нм; $n=3$ – С. 110.

Рисунок 49 – Профиль высвобождения / растворения рилпивирин из депо-форм; $n=3$ – С. 112.

Рисунок 50 – Влияние эффекта Case II и диффузии по Фику на механизм высвобождения рилпивирин из полимерных микросфер и имплантатов – С. 115.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

Результаты ВЭЖХ-МС анализа водорастворимой фракции PLGA

Таблица 1 – Результаты ВЭЖХ-МС

Время уд, мин	Молекулярная масса, г/моль на спектре (предпол. компонента)	Соотношение звеньев молочной и гликолевой кислот в олигомере
детектирование при отрицательной ионизации		
1,47	205 (206)	1:2
1,64	219 (220)	2:1
	263 (264)	1:3
1,68	277 (278)	2:2
	321 (322)	1:4
1,81	335 (336)	2:3
	349 (350)	3:2
	393 (394)	2:4
1,85	305 (306) (низкий уровень сигнала)	4:0
	349 (350)	3:2
1,89	363 (364)	4:1
	407 (408)	3:3
1,93	421 (422)	4:2
	465 (466)	3:4
1,98	421 (422)	4:2
	479 (480)	4:3
детектирование при положительной ионизации		
1,78	337 (336)	2:3
1,91	467 (466)	3:4
1,96	423 (422)	4:2
	467 (466)	3:4
2,00	423 (422)	4:2
	481 (480)	4:3
2,04	481 (480)	4:3
	539 (538)	4:4