

Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова

УДК 615.014:661.47

На правах рукописи

**ДЖУМАГАЗИЕВА АРДАК БИСЕНБАЕВНА**

**Фармацевтическая разработка комбинированного лекарственного  
средства с аддуктами иода**

6D074800 - Технология фармацевтического производства

Диссертация на соискание степени  
доктора философии (PhD)

Научные консультанты  
д.фарм.н., профессор Датхаев У.М.  
д.х.н., академик КазНАЕН  
Ильин А.И.  
Зарубежный научный консультант  
д.фарм.н., профессор Флисюк Е.В.

Республика Казахстан  
Алматы, 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

	<b>НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....</b>	5
	<b>ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....</b>	7
	<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....</b>	8
	<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	10
<b>1</b>	<b>КОМБИНИРОВАННЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ.....</b>	15
1.1	Координационные соединения (аддукты).....	15
1.2	Обоснование применения аддуктов (координационных соединений) иода.....	15
1.3	Комбинированные лекарственные средства.....	16
1.4	Особенности технологии комбинированных лекарственных форм..	18
1.5	Двухслойные или многослойные комбинированные таблетки с фиксированной дозой (FDC).....	20
1.6	Проблемы лечения гнойно-воспалительных ран .....	22
1.7	Лекарственная устойчивость бактерий и преимущества комбинированных лекарственных средств.....	23
1.8	Анализ номенклатуры антибактериальных средств для наружного применения в Республике Казахстан.....	26
1.9	Сочетанное действие веществ. Виды взаимодействия и методы их определения.....	27
1.9.1	Синергизм, антагонизм, аддитивность и потенцирование.....	29
<b>2</b>	<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	31
2.1	Объекты и материалы исследования.....	31
2.1.1	Объекты исследования.....	31
2.1.2	Реактивы и растворители .....	32
2.2	Методы исследования.....	32
2.2.1	Скрининг антимикробной активности аддуктов (координационных соединений) иода .....	32
2.2.2	Физико-химические и физические методы испытаний субстанции D1.....	33
2.2.3	Исследования технологических характеристик субстанции D1.....	36
2.2.4	Методики исследования биологической активности и фармакологических свойств субстанции D1 и комбинированного лекарственного средства .....	37
2.2.4.1	Тест-системы .....	37
2.2.4.1.1	Референс-штаммы .....	37
2.2.4.1.2	Экспериментальные животные .....	38

2.2.4.1.3	Культура клеток .....	38
2.2.4.2	Методики изучения биологических свойств.....	38
2.2.5	Методы изучения физико-химических свойств геля, содержащего субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол .....	40
2.2.6	Биофармацевтические методы исследований комбинированного лекарственного средства .....	42
2.2.7	Методы статистической обработки.....	42
<b>3</b>	<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ АДДУКТА ИОДА.....</b>	<b>43</b>
3.1	Скрининг аддуктов (координационных соединений) иода №1-9.....	43
3.2	Изучение совместного действия координационных соединений иода №5, №6 и №8 с антибиотиками.....	49
3.3	Изучение взаимодействия аддукта (координационного соединения) иода с антибиотиками.....	53
3.4	Синтез и описание субстанции D1.....	59
3.4.1	Синтез субстанции D1.....	59
3.4.2	Рентгенографический и рентгеноструктурный анализ субстанции D1.....	60
3.4.2.1	Рентгенографическое исследование субстанции D1.....	60
3.4.2.2	Рентгеноструктурный анализ образца субстанции D1.....	61
3.5	Изучение технологических характеристик субстанции D1.....	64
3.6	Разработка оптимальной технологии получения субстанции D1.....	67
3.7	Изучение физико-химических характеристик субстанции D1.....	70
3.8	Стандартизация и контроль качества субстанций D1.....	78
3.9	Установление сроков и условий хранения субстанции D1.....	80
<b>4</b>	<b>ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУБСТАНЦИИ D1.....</b>	<b>92</b>
4.1.	Оценка безопасности субстанции D1 « <i>in vitro</i> ».....	92
4.2	Исследование мутагенной активности (тест Эймса).....	92
<b>5</b>	<b>ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ СУБСТАНЦИИ D1.....</b>	<b>101</b>
5.1	Разработка составов гелевых основ.....	101
5.2	Изучение структурно-механических свойств гелевых основ.....	102
5.3	Изучение стабильности субстанции D1 при взаимодействии со связующим веществом ПЭО-400 и гелевыми основами.....	105
5.4	Изучение структурно-механических свойств образцов гелевых основ с ПВП.....	107
5.5	Разработка экспериментальных составов и технологии получения комбинированных гелей, содержащих аддукт иода.....	110

5.6	Изучение влияния активных фармацевтических ингредиентов на реологические свойства геля на основе карбопол 940 с 6 %-ным и 10 %-ным ПВП.....	111
5.7	Изучение высвобождения хлорамфеникола из образцов гелей методом равновесного диализа.....	113
5.8	Исследование взаимодействия вспомогательных веществ с субстанцией D1 и хлорамфениколом методом УФ-спектроскопии	114
5.9	Исследование взаимодействия вспомогательных веществ с субстанцией D1 и хлорамфениколом методами ДСК и ТГМ.....	116
5.10	Описание геля.....	119
5.11	Изучение однородности геля.....	119
5.12	Технологическая схема производства комбинированного геля.....	120
5.13	Стандартизация и контроль качества комбинированного антимикробного геля.....	124
5.13.1	Валидация методики количественного определения хлорамфеникола в комбинированном антимикробном геле.....	125
5.14	Установление сроков хранения комбинированного антимикробного геля.....	126
6	Фармакологические исследования субстанции D1 и комбинированного лекарственного средства, содержащего субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол.....	134
6.1	Изучение острой токсичности субстанции D1.....	134
6.2	Изучение местно-раздражающей действия комбинированного лекарственного средства.....	138
6.3	Изучение алергизирующего действия комбинированного лекарственного средства.....	139
6.4	Изучение проивомикробной активности комбинированного лекарственного средства <i>in vitro</i> .....	141
6.5	Изучение эффективности (ранозаживляющей активности) комбинированного лекарственного средства <i>in vivo</i> .....	142
	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	147
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>	149
	<b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	158

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:  
ICH Q8 (R2) «Pharmaceutical Development».

ICH Q2 (R1) (CPMP/ICH/381/95) «Validation of analytical procedures».

Государственная Фармакопея Республики Казахстан. Т.1. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2008. - 592 с.

Государственная Фармакопея Республики Казахстан. Т.2. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2008. - 720 с.

Фармакопея Евразийского экономического союза. Т.1 – Москва: Коллегия Евразийской экономической комиссии, 2020. – 568 с.

European Pharmacopoeia. 10-th edition. Strasburg (Germany): Council of Europe, 2019.

ENV/MC/CHEM(98)17 OECD: «Principles on Good Laboratory Practice», 1998.

Приказ И.о. министра здравоохранения Республики Казахстан от 4 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-15 «Об утверждении надлежащих фармацевтических практик» (приложение 1 – GLP, приложение 3 - GMP).

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020 «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств».

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 декабря 2017 г. № 31 "О Требованиях к воде для фармацевтического применения, используемой для производства лекарственных средств".

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 77 "Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза".

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 14 июля 2021 г. № 65 "О внесении изменений в Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза".

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10 мая 2018 г. № 69 "Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций".

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 30 июня 2020 г. № 86 «О внесении изменения в пункт 5 Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций».

Решение Коллегии Евразийской экономической Комиссии от 17 июля 2018 г. № 113 "Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств".

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. № 151 "Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата".

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26 ноября 2019 г. № 202 "Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов".

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 2 сентября 2019 г. № 25 "О Руководстве по доклинической и клинической разработке комбинированных лекарственных препаратов".

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 6 августа 2019 г. № 23 "О Руководстве по оценке и контролю ДНК-реактивных (мутагенных) примесей в лекарственных средствах и установлению границ потенциального канцерогенного риска".

ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

ГОСТ 17768-90 Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение;

ГОСТ 7.32-2001 Отчет о научно-исследовательской работе.

ГОСТ 7.1-2003 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины и определения:

**Аддукт** - координационное соединение, образующиеся в результате реакции присоединения, не сопровождающейся отделением побочных продуктов;

**Нормативный документ** по качеству лекарственного средства – это документ, устанавливающий требования к контролю качества лекарственного средства в пострегистрационный период на основании проведенной экспертизы при его регистрации, содержит спецификацию, описание аналитических методик и испытаний лекарственного средства или ссылки на такие испытания, а также соответствующие критерии приемлемости для показателей качества;

**Комбинированное лекарственное средство** - это лекарственное средство, которое включает два или более активных ингредиента, объединенных в одну лекарственную форму;

**Лекарственное средство** – средство, представляющие собой или содержащее фармакологические активные вещества, предназначенное для профилактики, диагностики и лечения заболеваний, а также изменения состояния и функций организма: лекарственная субстанция, лекарственное сырье природного происхождения, лекарственные ангро- и балк-продукты, лекарственные препараты, медицинские иммунобиологические препараты, парафармацевтики;

**Технологическая инструкция** – нормативный документ, содержащий характеристики продукта, требования к процессу производства, эксплуатации, контроля, а также материалам, настройкам оборудования и прочим компонентам производственного процесса;

**Фармацевтическая разработка** – это комплекс исследований, выполнение которых необходимо для подтверждения того, что выбранная лекарственная форма, включая ее состав, технологию производства, методы контроля качества и упаковку отвечает своему назначению;

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АО	– Акционерное общество
АФИ	– Активный фармацевтический ингредиент
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ВР	– Вспомогательная работа
ВЭЖХ	– Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФ РК	– Государственная Фармакопея Республики Казахстан
ГОСТ	– Государственный отраслевой стандарт
ГПМЦ	– Гидроксипропилметилцеллюлоза
ГСО	– Государственный стандартный образец
ЕФ	– Европейская Фармакопея
ИВ	– Исследуемое вещество
ДНК	– Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСК	– Дифференциальная сканирующая калориметрия
ИВК	– Индивидуально вентилируемые клетки
КОКСОН	– Комитет по обеспечению качества в сфере образования и науки
КОЕ	– Колониеобразующая единица
КЭ	– Капиллярный электрофорез
ЛЭК	– Локальный этический комитет
ЛС	– Лекарственное средство
ЛФ	– Лекарственная форма
МБК	– Минимальная бактерицидная концентрация
НЦПП	– Научный центр противомикробных препаратов
НД	– Нормативный документ
НТП	– Научно-техническая программа
ПМСП	– Первичная медико-санитарная помощь
ПЭО	– Полиэтиленоксид
СКО	– Среднеквадратичное отклонение
СПХФУ	– Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет
ТГ	– Термогравиметрия
ПК	– Положительный контроль
ТП	– Технологический процесс
УМО	– Упаковка, маркировка, отпуск
ФГБОУ ВО	– Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
ФИК	– Фракционная ингибирующая концентрация
ФСБ	– Фосфатно-солевой буфер
ЦТК <sub>50</sub>	– Цитотоксическая концентрация
2АА	– 2-Aminoanthracene
АТСС	– American Type Culture Collection
В(a)р	– Benzapyrene
CCDC	– The Cambridge Crystallographic Data Centre

DMEM	– Среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко
FDC	– Fixed dose combination
GMP	– Good manufacturing practice (надлежащая производственная практика)
GLP	– Good laboratory practice (надлежащая лабораторная практика)
GHS	Международная система классификации токсичности веществ
IND	– «Investigational new drug» разрешение на дальнейшее исследование, реализацию и применение новых лекарственных средств и субстанций
ICH	– Материалы международной конференции по гармонизации
IDSA	– Infectious Diseases Society of America
LD <sub>50</sub>	– «Полулетальная доза» средняя доза тестируемого вещества, вызывающая гибель половины испытываемой группы животных
MMS	– Метилметаносульфат
MDCK	– Клетки почек собаки породы Madin Darby Canine Kidney
MDR	– Multidrug resistant
NBRC	– Biological Resource Center
NC	– Negative control
OECD	– Организация экономического сотрудничества и развития «Organisation for Economic Co-operation and Development»
PIC	– Конвенция по фармацевтическим инспекциям «Pharmaceutical Inspection Convention»
PC	– Positive control
RD	– Клетки эмбриональной рабдомиосаркомы человека
RH	– Relative humidity
RSD	– Относительное стандартное отклонение
SA	– Sodium azide
SD	– Стандартные отклонения
k	– Волновое число, единица измерения в ИК спектроскопии (см <sup>-1</sup> )
λ	– Длина волны, единица измерения в УФ спектроскопии (нм)
Å	– Ангстрем - единица измерения длины химической связи, равная 10 <sup>-10</sup> м
°K	– Единица измерения температуры по абсолютной шкале температур
θ	угол скольжения (брегговский угол)
n <sub>D</sub> <sup>20</sup>	– показатель преломления воды при 20 градусах Цельсия, взятый на линии D натрия

## ВВЕДЕНИЕ

**Общая характеристика работы.** Настоящая диссертационная работа посвящена фармацевтической разработке оригинальной субстанции – координационного соединения (аддукта) иода D1, а также разработанного на её основе комбинированного лекарственного средства.

### **Актуальность темы:**

Государственная программа развития здравоохранения Республики Казахстан «Денсаулық» на 2020-2025 годы направлена на укрепление здоровья населения, обеспечение доступности медицинскими и фармацевтическими услугами, а также создание и внедрение конкурентоспособных импортозамещающих лекарственных средств.

Одной из задач фармацевтической науки является целенаправленный поиск новых высокоэффективных и безопасных лекарственных веществ. Открытие антибактериальных препаратов стало крупным научным достижением, значение которого сложно переоценить. Однако, формирование устойчивых к их действию штаммов возбудителей, возникновение мультирезистентных форм, появление новых видов опасных патогенов ставит под сомнение способность эффективного лечения инфекционных заболеваний. Резистентность является результатом ряда факторов, одним из которых является чрезмерное употребление антибиотиков и нецелесообразное их использование для лечения ряда заболеваний. Следует отметить, что большинство используемых сейчас препаратов лицензировано более десяти лет назад. Поиск и разработка новых антибактериальных препаратов продолжаются, однако количество вновь регистрируемых антибиотиков невелико, что связано с финансовыми и временными затратами.

Таким образом, необходимость в новых препаратах определяет актуальность поиска и создания новых противомикробных средств.

**Цель исследования:** Разработка и исследование субстанции аддукта иода D1 и фармацевтическая разработка комбинированного лекарственного средства на ее основе.

### **Задачи исследования**

1. Изучение антимикробной активности оригинальных аддуктов (координационных соединений) иода №1-9, определение образцов перспективных для разработки нового лекарственного средства;
2. Проведение контроля качества, определение условий и сроков хранения субстанции аддукта иода D1;
3. Изучение эффективности и безопасности *in vitro* субстанции аддукта иода D1;
4. Разработка рационального состава и технологии комбинированной лекарственной формы с аддуктом иода D1;
5. Изучение эффективности и безопасности *in vivo* разработанной лекарственной формы с аддуктом иода D1;

6. Проведение контроля качества и изучение стабильности комбинированного лекарственного средства с аддуктом иода D1.

#### **Научная новизна**

• Впервые по результатам исследования антимикробной активности оригинальных координационных соединений иода №1-9 в отношении 3 музейных чувствительных штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, 2 музейных мультирезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC-ВАА-39, *Escherichia coli* ATCC-ВАА-196 и 1 клинического мультирезистентного штамма *Pseudomonas aeruginosa* TA2, были выявлены 3 наиболее перспективных соединения: образец №5 - ди-трииодо-3,3'-ди-тио-бис-2-аминопропионовая кислота, образец №6 -  $\alpha,\alpha'$ -ди-амино- $\beta,\beta'$ -дифенилпропионовой кислоты моноиодид и образец №8 – ди-трииодидо-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат, проявившие наибольшую антимикробную активность по отношению, как к чувствительным, так мультирезистентным штаммам микроорганизмов;

• Впервые по результатам изучения совместного действия координационных аддуктов иода №5, №6 и №8 с антибиотиками, выявлены синергетические противомикробные эффекты соединения №8 с антибиотиками хлорамфениколом, гентамицином и тетрациклином, как в отношении грамотрицательных мультирезистентных штаммов – *E.coli* и *P. aeruginosa*, так и в отношении грамположительных штаммов – *S.aureus* и *S.pneumoniae*;

• Впервые по совокупности результатов спектральных методов исследования (УФ- и ИК-спектроскопии) установлено, что в бинарной системе - субстанция D1 и антибиотик хлорамфеникол, отсутствуют данные о возможном комплексообразовании.

• Впервые разработана технология получения координационного соединения иода №8 «Субстанции D1»;

• Изучены физико-химические и технологические характеристики субстанции D1; разработаны показатели качества и проведена стандартизация субстанции D1;

• По результатам исследования токсичности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, субстанция D1 относится к 4 классу токсичности в соответствии с международной системой классификации токсичности веществ GHS и не обладает мутагенным действием;

• Впервые разработан оптимальный состав и технология получения комбинированного лекарственного средства (геля), содержащего субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол; доказана стабильность субстанции D1 в комбинации с антибиотиком и вспомогательными веществами;

• Разработанное комбинированное лекарственное средство с аддуктом иода D1 и хлорамфениколом проявляет высокую антимикробную и ранозаживляющую активность *in vivo*, в условиях аллоксан-индуцированного экспериментального диабета превышает действие препаратов сравнения мазей

«Левомеколь» и «Бетадин», сокращая сроки заживления раны в 1,5 раза; не обладает местно-раздражающим и аллергизирующим действием;

- Исследованы физико-химические и технологические характеристики, разработаны показатели качества и проведена стандартизация комбинированного антимикробного геля.

#### **Практическая значимость исследования**

- Впервые координационное соединение иода №8 ди-трийодио-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат рекомендуются в качестве перспективной субстанции для разработки лекарственных средств антимикробного действия;

- Впервые разработана и внедрена в производство на базе АО «Научный Центр противомикробных препаратов» технология получения фармацевтической субстанции D1;

- Впервые разработана и внедрена в производство на базе АО «Научный Центр противомикробных препаратов» технология получения комбинированного антимикробного геля, содержащего субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол;

- Разработаны проекты НД по качеству лекарственного препарата на субстанцию D1 и на комбинированный антимикробный гель.

- Разработаны технологические инструкции на субстанцию D1 и комбинированный антимикробный гель.

#### **Внедрение результатов исследований в практику**

Результаты работы внедрены в опытно-промышленное производство АО «Научный Центр противомикробных препаратов» (Акт о внедрении от 2021 г.), а также в учебный процесс ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава РФ (Акт о внедрении от 2018 г.)

Работа легла в основу методических рекомендаций по использованию аддуктов в технологии и фармацевтической разработке.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

Возможность и перспективность использования аддуктов иода в фармации.

Структура субстанции D1, результаты изучения физических, физико-химических и технологических характеристик, а также синергетический эффект субстанции D1 и антибиотика хлорамфеникола в составе комбинированного антимикробного средства (геля).

Состав и технология комбинированного лекарственного средства, содержащего субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол.

Результаты изучения безопасности и специфической фармакологической активности субстанции D1 и комбинированного лекарственного средства, содержащего субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол.

#### **Апробация работы**

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 5-ти международных конференциях:

- Международная научная конференция «Topical Problems of modern science» (2017, Warsaw, Poland);

- VI международная научная конференция молодых ученых и студентов, инициированной Фондом Первого президента Казахстана – Елбасы и Южно-Казахстанской медицинской академией, «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (2018, Шымкент, Казахстан);

- Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти профессора Р. Дильбарханова «Формирование и перспективы развития научной школы фармации: преемственность поколений» (2018, Алматы, Казахстан);

- Международная научно-практическая конференция студентов, молодых ученых и преподавателей «Акановские чтения: роль ПМСП в достижении всеобщего охвата услугами здравоохранения» (2019, Алматы, Казахстан);

- LX-LXI Международная научно-практическая конференция «Научная дискуссия: вопросы медицины» (2017, Москва, Россия).

### **Публикации**

По результатам исследований опубликовано 11 печатных работ, в том числе:

- статья в международном журнале, входящем в базу данных Scopus – 1,

- статьи, рекомендованные КОКСОН МОН РК – 5,

- тезисы докладов на международных научно-практических конференциях (Казахстан, Польша, Россия) – 5.

Подана заявка на получение патента на изобретение «Фармацевтическая композиция с антимикробным действием». Номер государственной регистрации № 2020/0707.1 от 14.10.2020 г.

### **Связь задач исследований с планом научных программ**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова и в рамках программно-целевого финансирования на тему: «Разработка новых противомикробных препаратов» (шифр научно-технической программы № О.0671 на 2015-2017 гг., 2018-2020 гг., 2021-2023 гг). АО «Научный центр противомикробных препаратов» Министерства индустрии и инфраструктурного развития Республики Казахстан.

### **Личный вклад автора**

Автором лично разработаны и валидированы методы исследования (количественное определение хлорамфеникола в лекарственном средстве, оценка мутагенного потенциала фармацевтической субстанции, алгоритмы расчетов, методологические положения и т.п.), получены аналитические (эмпирические) зависимости, такие как область существования технологических параметров, установлены границы изменения существенных переменных. Автор непосредственно участвовал в сборе и анализе исходных данных, научных экспериментах, апробации результатов исследования, подготовке основных публикаций по выполненной работе. Автор диссертационной работы является основным разработчиком фармацевтических технологий получения нового АФИ и нового комбинированного лекарственного средства.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста в компьютерном наборе, содержит 53 таблицы, 63 рисунка, список использованных источников, включающий 118 наименований, и 10 приложений. Работа состоит из введения, обзора литературы, раздела посвященной материалам и методам исследования, 4-х разделов собственных исследований, выводов.

# **1 КОМБИНИРОВАННЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ**

## **1.1 Координационные соединения (аддукты)**

Аддуктами или координационными соединениями, называют класс химических соединений, полученными в результате реакции присоединения, протекающие без образования побочных продуктов, это, так называемые, продукты реакции Дильса-Альдера [1], реакций электрофильного или нуклеофильного присоединения и т.д. Помимо перечисленных, к ним относят молекулярные комплексы, например, комплексы с переносом заряда и клатраты.

В настоящее время аддукты относят к одному из перспективных классов химических соединений. Аддукты также называют конъюгатами, комплексами включения, координационными соединениями и дериватами. В IUPAC Gold Book под термином «аддукт» подразумевают вещества постоянного качественного и количественного состава, не зависящих от способа получения.

Одним из направлений фармацевтической химии и фармацевтической технологии является разработка биологически-активных координационных соединений иода и их лекарственных форм [2]. Иодсодержащие препараты, применяемые в современной медицине, представляют собой препараты, содержащие свободный или связанный иод – координационные соединения (аддукты) иода.

Аддукты, являющиеся комплексами с переносом заряда [3], характерны для галогенов (чаще для иода) или ионных комплексов. Особенностью данных комплексов является химическая лабильность, обуславливающая проблемы, связанные с сохранением состава и свойств аддуктов [4]. В этой связи, при разработке лекарственных средств, содержащих аддукты, необходимо серьезно подойти к выбору вспомогательных веществ и аналитических методик.

Отсутствие влияния на структуру аддукта, а также сохранение эффективности и безопасности при изучении взаимодействия аддукта с эксципиентами, дает предпосылки для успешной фармацевтической разработки лекарственных средств [5].

## **1.2 Обоснование применения аддуктов (координационных соединений) иода**

На сегодняшний день галогены и галогенсодержащие соединения широко распространены в медицине в силу своих антисептических, антигельминтных, противовоспалительных свойств [6]. Одним из ключевых свойств галогенов является способность к повышению липофильности лекарственных веществ, что облегчает их прохождение через биомембраны. Препараты этой группы оказывают быстрое и сильное бактерицидное действие на грамположительные и грамотрицательные бактерии [7]. Галогенсодержащие соединения проявляют также высокую активность против устойчивых к традиционным антибиотикам мультирезистентных штаммов микроорганизмов, борьба с которыми является одной из актуальных задач современной медицины. Кроме того, эти соединения

могут оказывать плеiotропный эффект: для ряда из них показано, помимо антимикробного, ранозаживляющего и иммуномодулирующего действие [8-10]. Поэтому галогенсодержащие соединения рассматриваются как прототипы для создания новых эффективных противоинфекционных лекарственных препаратов.

Используемые в данном исследовании оригинальные соединения являются иодными аддуктами, полученными путем реакции комплексообразования между ионами лития/калия, иода и органических лигандов, представленных аминокислотами. Известно, что иод нарушает структуры бактериальных трансмембранных белков и ферментов, не имеющих мембранную защиту. За счет окисления трансмембранных белков происходит нарушение их функций, а окисление фосфолипидов приводит к увеличению подвижности полярных  $-N^+$ -( $CH_3$ )-групп, вращению  $-C-C-$  связей, что приводит к ускорению латеральной диффузии молекул через мембрану, а значит, увеличивает ее проницаемость [11-12].

Создание комплексов органических соединений (производных углеводов, аминокислот) с галогенами приводит к появлению новых видов биоактивностей или заметному усилению уже имеющихся [13]. Сочетание биологической активности иодсодержащих соединений и токсичности свободного иода делает необходимым точное управление содержанием форм иода в составе органических соединений. Подбор оптимальных условий синтеза с учетом влияния иодкоординирующего растворителя позволяет прогнозировать образование биологически активных форм с заданной способностью освобождать молекулярный иод, выполняющий ключевую функцию в изменении проницаемости мембраны.

### **1.3 Комбинированные лекарственные средства**

Лекарственные средства XX века включают большое количество готовых комбинированных лекарственных препаратов. Издавна лекарственные средства применяют не только отдельно, но также в различных сочетаниях. Основной целью при этом является повышение эффективности, а в ряде случаев улучшение переносимости. Ранее для сочетанного применения готовили *ex tempore* смеси порошков, пилюли, микстуры, растворы. С развитием фармацевтической технологии стали производить различные комбинированные препараты в виде готовых лекарственных форм (таблеток, капсул, суспензий, ампулированных растворов и др.). Особенно много готовых комбинированных лекарственных препаратов под разнообразными торговыми названиями выпускают в настоящее время разные зарубежные фармацевтические фирмы. В прошлом комбинирование лекарств производилось в основном эмпирическим путем. Широко применяли наборы лекарственных растений («чай»), комбинировали синтетические лекарства, не учитывая, однако, возможные особенности взаимодействия компонентов [14].

В настоящее время изготовление готовых комбинированных лекарственных средств является сложным процессом, включающим многогранные

фармакологические, токсикологические, фармакокинетические, технологические и другие исследования.

Фармакологические исследования должны, во-первых, доказать целесообразность введения в комбинированный препарат каждого из его компонентов; определить, меняется ли и в какую сторону действие основного компонента. При этом учитывается, что фармакологическое взаимодействие может иметь характер синергизма и антагонизма, причем синергизм (усиление конечного эффекта) может найти выражение в простом суммировании эффектов (аддитивное действие) или потенцировании, когда общий эффект превышает простое сложение эффектов каждого из компонентов. В отдельных случаях может наблюдаться синерго-антагонизм, при котором одни эффекты компонентов усиливаются, а другие ослабляются. Все это должно быть выявлено в ходе фармакологического исследования. Механизм фармакологического взаимодействия может быть связан с влиянием отдельных компонентов на соответствующие рецепторы. Однако в ряде случаев модификация фармакологического (химиотерапевтического) эффекта может быть связана с другими факторами: улучшением биодоступности, повышением устойчивости основного компонента к разрушающему действию ферментов, разным влиянием компонентов на метаболические процессы и др. [15-18].

В комбинированных химиотерапевтических препаратах ко-тримоксазол (бактрим, септрим) и сульфатоне антибактериальное действие сульфаниламидного компонента значительно усилено его сочетанием с триметопримом и двойным действием на метаболизм микроорганизма: сульфаниламидный компонент нарушает биосинтез дигидрофолиевой кислоты, а триметоприм блокирует следующую стадию биосинтеза - восстановление дигидрофолиевой кислоты в тетрагидрофолиевую, необходимую для роста микроорганизма [19-20].

В последнее время разработаны новые комбинированные препараты антибиотиков (уназин, амоксиклав и др.), активность которых значительно усилена за счет сочетания со специфическими ингибиторами (сульбактам, клавулановая кислота и др.), подавляющими активность вырабатываемых микроорганизмами  $\beta$ -лактамаз - ферментов, инактивирующих  $\beta$ -лактамы антибиотики [21-24].

Известен комбинированный антибактериальный препарат тиенам содержит антибиотик имипенем в сочетании с циластатином. Последний является ингибитором фермента дегидропептидазы почек, блокирующим метаболизм имипенема в почках и способствующим поддержанию концентрации антибиотика в крови [25-26].

Фармакокинетические исследования комбинированных лекарственных препаратов в основном совпадают по требованиям исследований «обычных» (монокомпонентных) готовых лекарственных форм. Они должны свидетельствовать о достаточной биодоступности действующих веществ, достижении необходимой концентрации в органах и тканях, определять время выведения действующих веществ [27].

Токсикологические исследования должны свидетельствовать, что комбинирование веществ, входящих в состав препарата, не повышает их токсичности. Более того, в ряде случаев сочетание лекарственных средств рассчитано на ее снижение, уменьшение общих и местных побочных явлений. Так, введение в состав диуретических препаратов (триампура и его аналогов) калийсберегающего компонента триамтерена рассчитано на уменьшение нежелательного гипокалиемического действия гидрохлортиазида [28].

В недавно созданный комбинированный препарат артротек введен в качестве дополнительного слоя простагландиновый препарат мизопростол для предотвращения ulcerогенного действия основного компонента — нестероидного противовоспалительного препарата диклофенака-натрия (ортофена). Технологические исследования должны доказать фармацевтическую совместимость компонентов, стабильность препарата в течение установленного срока его хранения, определить технологические параметры изготовления лекарственной формы [29].

Современные готовые комбинированные препараты являются важным вкладом в арсенал лекарственных средств. В ряде случаев комбинированные препараты облегчают проведение фармакотерапии, расширяют ее границы, исключают необходимость экстемпорального приготовления рецептурных прописей. Следует, однако, учитывать, что при назначении любого комбинированного лекарственного препарата необходимо знать полный его состав и учитывать фармакологические свойства каждого из его компонентов, даже если его свойства достаточно известны [30].

#### **1.4 Особенности технологии комбинированных лекарственных форм**

Комбинированные лекарственные средства могут использоваться либо для объединения различных активных веществ в одной лекарственной форме, либо для достижения точного профиля высвобождения конкретного активного вещества, например, путем комбинирования препарата с немедленным высвобождением и препаратами с пролонгированным высвобождением. На рисунке 1 показаны распространенные типы таблетированных комбинированных (FDC – fixed dose combination) лекарственных форм. Монолитная таблетка FDC состоит из 2 или более активных составов, смешанных и спрессованных в виде однослойной таблетки. Прессование можно проводить с помощью обычных однослойных таблеточных прессов. Двухслойная или многослойная таблетка FDC состоит из отдельных слоев активных веществ. Для прессования двухслойных или многослойных таблеток FDC требуются таблеточные прессы с двумя или более системами подачи и прессующими валами. Ядро «таблетка в таблетке» FDC является наиболее сложным и состоит из ядра таблетки, окруженного вторым внешним составом. Эта таблетка FDC идеальна для быстро разрушающегося внешнего слоя и медленно разрушающегося внутреннего слоя, а рекомендуемое массовое соотношение ядро: внутреннее покрытие составляет не менее 1:4 [31]

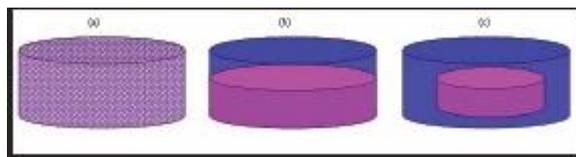


Рисунок 1 - Типы таблетированных комбинированных лекарственных форм

Преимущество монолитных таблеток FDC заключается в простоте изготовления и часто является первым выбором при разработке таблеток FDC. Наиболее важным критерием для монолитных таблеток FDC является химическая совместимость активных веществ и состава препарата. Монолитная таблетка FDC также должна состоять из составов, аналогичных по скорости высвобождения. Следовательно, невозможно составить монолитную таблетку, состоящую из составов с немедленным высвобождением и модифицированного высвобождения. Желательно смешивать активные ингредиенты в общей основе композиции, хотя также возможно смешивание основных композиций или гранулятов из 2 или более активных веществ. При первом подходе возможно получить таблетки FDC меньшего размера по сравнению с многослойными таблетками или таблетками с ядром.

Баланс между пластической деформацией и свойствами хрупкого разрушения частиц порошка в основе рецептуры необходим для обеспечения возможности прессования в таблетки. Для правильного связывания необходима пластичность, чтобы уменьшить расстояние между соседними частицами, а хрупкое разрушение необходимо для снижения чувствительности к смазочным материалам. Следовательно, в составах монолитных таблеток FDC может быть достаточная степень свободы для выбора пластичных и хрупких компонентов для достижения этого баланса. Недавнее исследование поведения при уплотнении бинарных смесей лактозы и силикатированной микрокристаллической целлюлозы иллюстрирует один подход к тому, как комбинации бинарных смесей могут быть протестированы и оптимизированы для составов таблеток [32]. Роль лактозы и микрокристаллической целлюлозы в процессе уплотнения была изучена путем анализа влияния композиции на передачу напряжения на порошковой подушке в осевом (передача напряжения) и радиальном (передача напряжения) направлениях. Было обнаружено, что высокое содержание лактозы в смеси способствует передаче в осевом направлении, тогда как высокое содержание микрокристаллической целлюлозы способствует уплотнению в радиальном направлении. В смесях с высоким содержанием лактозы, когда осевое давление достигло нуля и непосредственно перед началом выброса, таблетка непрерывно деформируется при сдвиге, и величина уменьшения радиального напряжения (Restituted Radial Stress - восстановленное радиальное напряжение, RRS) может использоваться для объяснения расслоения в планшетах. С другой стороны, в смесях с высоким содержанием микрокристаллической целлюлозы RRS был низким, тем самым ограничивая требования к сдвигу после сброса давления и перед

выталкиванием. Таким образом, состав комбинаций бинарных смесей также может быть изучен аналогичным образом, чтобы минимизировать напряжения, такие как RRS, для оптимизации поведения уплотнения.

### 1.5 Двухслойные или многослойные комбинированные таблетки с фиксированной дозой (FDC)

Двухслойная или многослойная таблетка FDC состоит из отдельных слоев рецептуры активных веществ. Учитывая, что эти двухслойные или многослойные таблетки FDC требуют более сложных производственных процессов, основными движущими силами развития являются химическая несовместимость между активными веществами и необходимость различных скоростей высвобождения. В идеале соотношение веса слоев должно быть одинаковым. Чем больше разница в весовых соотношениях, тем сложнее будет процесс таблетирования. Типичный цикл сжатия для операции двухслойного таблетирования показан на рисунке 2.

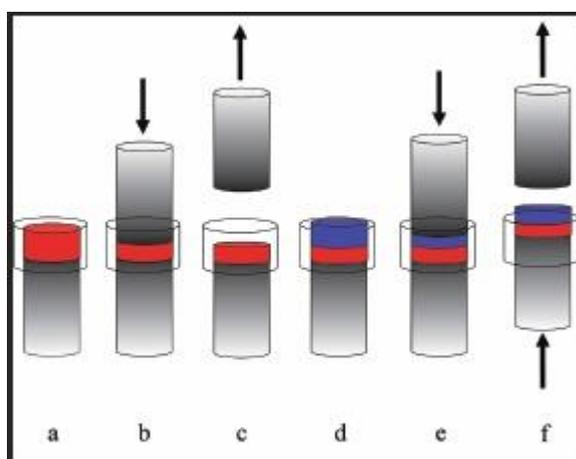


Рисунок 2 - Цикл сжатия для операции двухслойного таблетирования

Были проведены исследования для моделирования уплотнения двух слоев и границы раздела в процессе сжатия [33].

При производстве двух- или многослойных таблеток существует ряд принципов и соображений. В качестве первого слоя обычно выбирается более текучий состав. Это в значительной степени связано с тем, что заливка первого слоя будет определять вес и контроль заливки второго или последующих слоев. Усилие утрамбовки первого слоя обычно минимально, что приводит к некоторому уплотнению первого слоя. Выбранная сила может быть достаточной только для того, чтобы дать возможность прессовки для отбора проб первого слоя или освободить место для заполнения второго слоя. Было обнаружено, что прочность границы раздела уменьшается с увеличением силы уплотнения первого слоя [34]. Таким образом, память уплотненного материала первого слоя, то есть величина упругой и пластической деформации, оказывает значительное влияние на прочность границы раздела. Поскольку сила утрамбовки первого слоя обычно минимальна, может происходить прилипание материала первого

слоя к штамповке. Это станет проблемой после многократных сжатий или при повышенном перекрестном загрязнении слоев. Следовательно, оптимизация силы утрамбовки первого слоя, основной силы уплотнения и смазки может стать критической в этом случае. Поскольку состав первого слоя подвергается двойному сжатию при двухслойном таблетировании, обычно в качестве первого слоя выбирается более компактный материал. Чтобы проиллюстрировать это, было проведено исследование по разработке метода производства составленных двухслойных капсул, содержащих слой с замедленным высвобождением из гидроксипропилметилцеллюлозной матрицы 2208 (HPMC 2208) [35]. В этом исследовании растрескивание двухслойных каплет не было связано с разделением поверхности раздела, но ламинирование слоя с замедленным высвобождением, содержащего 60 % ГПМЦ 2208. Два фактора, давление роликового уплотнения при сухой грануляции слоя с замедленным высвобождением и порядок заполнения слоя с замедленным высвобождением при двухслойном сжатии, были связаны с ламинированием двухслойной каплеты. Уплотняемость слоя с замедленным высвобождением снижалась с увеличением давления валкового уплотнения при сухой грануляции. Уплотняемость слоя с замедленным высвобождением в форме второго слоя, выпукло-вогнутого, превосходит таковую в форме первого слоя, выпукло-выпуклого. Это объясняется более равномерным распределением плотности в форме выпукло-вогнутой, чем в форме выпукло-выпуклой. Поэтому, чтобы избежать расслоения, слой с замедленным высвобождением обрабатывали прямым прессованием для улучшения уплотняемости по сравнению с сухой грануляцией.

Еще одним из примеров данной инновации в этой области является Unigel™, первая на рынке технология, разработанная Procaps. Бренд Softigel от Procaps позволяет фармацевтическим и биологическим компаниям объединять различные продукты в одну таблетку, уменьшая количество таблеток, которые пациенты должны принимать в течение дня. Unigel разработан для объединения нескольких АФИ в одну мягкую желатиновую капсулу, предлагая различные режимы высвобождения, повышение биодоступности, более низкие производственные затраты и превосходную приверженность к различным методам лечения. Технология обеспечивает различные конфигурации для комбинаций фиксированных доз, таких как мягкий гель в мягком геле, одна или две таблетки в мягком геле, гранулы в мягком геле или любая их комбинация. Это помогает решить давние проблемы мультиактивных составов, предлагая новые возможности для рецептурных, безрецептурных и нутрицевтических продуктов.

Unigel - единственная комбинация с фиксированной дозой, которая предлагает преимущества мягкого геля, такие как доставка растворенного АФИ, уже доступного для абсорбции, или использование жидких или полутвердых вспомогательных веществ, которые увеличивают кишечную проницаемость, способствуя лимфатической абсорбции. Все это способы преодолеть проблемы биодоступности активных ингредиентов с низкой растворимостью или

проницаемостью. Поскольку Unigel включает две или более лекарственных форм в одной, мы можем сформулировать каждую фазу, чтобы обеспечить быстрое высвобождение или замедленное действие во внутренней лекарственной форме. Другими словами, у нас может быть продукт Unigel, который сочетает в себе часть с быстрым началом (жидкую фазу) и таблетку с немедленным высвобождением или модифицированным высвобождением для полного полного расширенного действия.

Первым продуктом, выпущенным в Латаме с использованием этой технологии, была комбинация, направленная на здоровье сердечно-сосудистой системы, включающая высококонцентрированное масло Омега-3 с аторвастатином.

Вторым выпущенным продуктом был розувастатин и фенофибриновая кислота в одной мягкой желатиновой капсуле, которая предлагала меньшую дозу, чем предыдущие версии продукта в другой комбинированной форме с фиксированной дозой, с преимуществами мягкой желатиновой капсулы.

Эти же инновации можно применить к координационным соединениям (аддуктам) иода.

### **1.6 Проблемы лечения гнойно-воспалительных ран**

Одной из актуальных проблем в медицине на протяжении многих лет остается лечение гнойных ран различного генеза. Несмотря на то, что к настоящему времени предложено много методов лечения и мер профилактики гнойных осложнений, число больных, как в хирургических стационарах, так и поликлиниках не снижается [36-37]. Лечение больных с гнойными ранами требует больших материальных затрат. Несмотря на успехи, достигнутые в комплексном лечении гнойных ран, эта проблема продолжает оставаться актуальной и до конца не решенной.

Значимость данной проблемы обусловлена широким распространением гнойно-воспалительных заболеваний и послеоперационных гнойных осложнений, учащением случаев генерализации инфекции, появлением антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [38-42].

Согласно многочисленным статистическим данным гнойно-воспалительные заболевания занимают одно из ведущих мест в общей структуре хирургических болезней: доля пациентов с гнойной инфекцией среди всех хирургических больных составляет 30-45 % [43].

По данным Bowler P.G. с соавт. возбудителями гнойно-воспалительных процессов могут быть представители различных родов, подавляющее большинство которых относят к «условно-патогенной» микрофлоре (аэробной, микроаэрофильной и анаэробной). Среди них чаще встречаются виды родов: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acetobacter*, *Haemophilus*, *Peptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Nocardia*, *Listeria*, *Fusobacterium*, *Neisseria*,

*Mycrococcus, Mycoplasma*. Реже – *Yersinia, Ervinia, Salmonella, Acinetobacter, Moraxella, Brucella, Candida, Actinomyces*.

Микроорганизмы могут вызывать и поддерживать гнойный процесс, как в монокультуре, так и в ассоциации [44].

### **1.7 Лекарственная устойчивость бактерий и преимущества комбинированных лекарственных средств**

Резистентность к противомикробным препаратам – внушительная проблема, которая препятствует дальнейшему прогрессу в борьбе с инфекционными заболеваниями, а также может привести к их быстрому распространению в будущем. Развитие устойчивости к лекарственным средствам является естественной ответной реакцией микроорганизмов, однако этот процесс реально предотвратить при условии рационального и обоснованного применения антибиотиков.

Резистентность микроорганизмов к антибиотикам может быть, как природной, так и приобретенной. Природная устойчивость характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени, на которую действует антибиотик или недоступности мишени вследствие низкой проницаемости или ферментативной инактивации. При наличии у бактерий природной устойчивости антибиотики клинически неэффективны.

Приобретенная резистентность к антибиотикам у бактерий проявляется чаще продукцией ферментов, инактивирующих или модифицирующих антибактериальные препараты - пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы (бета-лактамазы), аминогликозиды (ацетилтрансферазы, фосфорилазы), хлорамфеникол (ацетилтрансфераза) [45-46].

Высокие уровни антибиотикорезистентности у грамотрицательных бактерий обусловлены их способностью детоксицировать антибиотики в периплазматическом пространстве. В клеточной стенке грамположительных бактерий периплазматическое пространство отсутствует, поэтому механизмы их детоксикационной резистентности к антибиотикам менее эффективны, чем у грамотрицательных бактерий [47].

В основе механизма распространения генов антибиотикорезистентности между бактериями лежит обмен плазмидами и конъюгативными транспозонами. В эволюции антибиотикорезистентности плазмиды и конъюгативные транспозоны выполняют функцию генетических платформ, на которых посредством рекомбинационных систем бактерий происходит сборка и сортировка генов антибиотикорезистентности, включенных в транспозоны, интегроны, генные кассеты и инсерционные криптические последовательности [47].

Основными «проблемными» грамотрицательными возбудителями в настоящее время считают устойчивые к карбапенемам штаммы *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumonia* [48]. Кроме того, в последние годы отмечается увеличение этиологической роли таких

микроорганизмов как *Stenotrophomonas maltophilia* и *Burkholderia cepacia*, которые обладают природной устойчивостью к карбапенемам.

Специальной комиссией по изучению вопроса доступности антимикробных препаратов Американского Общества Инфекционных Болезней (IDSA) создан список приоритетных бактериальных и грибковых возбудителей, в который вошли *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *K. pneumoniae*, как микроорганизмы с растущим уровнем невосприимчивости практически ко всем группам антибиотиков, так называемые «проблемные» бактерии. Из-за отсутствия новых препаратов лечение пациентов в случае инфицирования полирезистентными бактериями затруднено, поэтому важным обоснованием включения микроорганизмов в список стала потребность в разработке против них новых антимикробных средств [49-53].

В феврале 2017 года ВОЗ опубликовала список бактерий, для борьбы с которыми срочно требуется создание новых антибиотиков. В этот список вошли 12 видов бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека. В частности, в этом списке подчеркивается угроза, которую представляют грамотрицательные бактерии, устойчивые к действию сразу нескольких антибиотиков. У этих бактерий есть способность искать все новые способы сопротивления действию лекарственных средств и на генетическом уровне передавать эту способность другим бактериям. Устойчивость к антибиотикам набирает масштаб, и арсенал методов лечения стремительно истощается [54]. Представленные в списке ВОЗ бактерии разделены на три группы по уровню потребности в создании новых антибиотиков:

1. Крайне приоритетные: *Acinetobacter baumannii*, устойчивы к карбапенемам; *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивы к карбапенемам; *Enterobacteriaceae*, устойчивы к карбапенемам, резистентны к цефалоспорином 3-го поколения.

2. Высокоприоритетные: *Enterococcus faecium*, устойчивы к ванкомицину; *Staphylococcus aureus*, устойчивы к метициллину, умеренно чувствительны или устойчивы к ванкомицину; *Helicobacter pylori*, устойчивы к кларитромицину; *Campylobacter spp.*, устойчивы к фторхинолонам; *Salmonellae*, устойчивы к фторхинолонам; *Neisseria gonorrhoeae*, устойчивы к цефалоспорином, фторхинолонам.

3. Среднеприоритетные: *Streptococcus pneumoniae*, не чувствительны к пенициллину; *Haemophilus influenzae*, устойчивы к ампициллину; *Shigella spp.*, устойчивы к фторхинолонам.

Для борьбы с «проблемными» микроорганизмами в конце 2009 г. IDSA анонсировало «инициативу 10x20», в рамках которой к 2020 г. предполагается разработать десять новых антибиотиков [55]. За период с 2010 г. по настоящее время только 7 новых препаратов, потенциально активных против MDR-патогенов, находятся на 2-3-й стадиях клинических испытаний. Причем все они принадлежат к уже длительно применяемым классам антибиотиков, к которым у бактерий выработались механизмы развития резистентности [49].

В настоящее время в лечении ран различной этиологии активно используются различные препараты. Например, при развитии гнойного процесса, с выраженным отеком, используют мази на полиэтиленгликолевой основе, такие как, левосин (хлорамфеникол, сульфадиметоксин, метилурацил, тримекаин), синтомициновая мазь (хлорамфеникол (D, L), касторовое масло, эмульгатор №1, сорбиновая кислота, этанол, кармелоза натрия, вода), «Левомеколь 5 %» (хлорамфеникол, метилурацил), диоксидиновая мазь (гидроксиметилхиноксалиндиоксид (диоксидин), ПЭО 400, ПЭО 1500, нипагин, нипазол). Также у больных местно применяются белковые и белковополисахаридные препараты, активизирующие репаративные процессы в ране, защищающие грануляционную ткань от вторичной инфекции и улучшающие обменные процессы в тканях. Такими препаратами являются дигиспон, содержащий коллаген, сшитый поливиниловым спиртом и 5 %-ным диоксидином, раневое покрытие коллахит, состоящее из коллаген-хитозановых композиций с содержанием 5 %-ного фурагина калия, гентоцикол (коллагеновая трубка с добавлением гентамицина) [56].

Наиболее распространенной в клинической практике является левомицетиновая (синтомициновая) мазь [56]. Используемые в клинической практике многокомпонентные мази "Левосин" и "Левомеколь", линимент "Левомецетин-Акри 5%" а также, линимент синтомицина 1%, 5%, 10%-ный, содержащие действующее вещество левомицетин (право- и левовращающие изомеры), обладающие антимикробными, осмотическими и некролитическими свойствами, сокращают сроки лечения или подготовки раны к оперативному закрытию швами или аутодермопластикой.

Однако, левомицетин по своим фармакотерапевтическим свойствам оптимален для лечения в I фазе раневого процесса, а мазевые основы, на которых разработаны его мягкие лекарственные формы плохо смешиваются с гнойным экссудатом и подходят для II (репаративно-восстановительной) фазы, что в целом снижает эффективность лекарственного препарата и не в полной мере удовлетворяют современную хирургию.

К недостаткам левомицетиновой мази относятся случаи появления резистентных к антибиотикам штаммов, в том числе, к левомицетину [57-58].

Таким образом, поиск новых соединений с антимикробной активностью может осуществляться в трех направлениях: выделение веществ природного происхождения; поиск соединений с антимикробной активностью среди новых химических структур, которые ранее не рассматривались в качестве источника получения антимикробных препаратов; создание комбинированных лекарственных средств, содержащих в своем составе два и более активных фармацевтических ингредиентов.

В этих условиях, одним из путей решения создания антибактериальных средств, активных в отношении полирезистентных штаммов, могут быть комбинированные лекарственные средства.

## 1.8 Анализ номенклатуры антибактериальных средств для наружного применения в Республике Казахстан

По рекомендациям Всемирной организации здравоохранения стратегическая безопасность каждого государства обеспечивается при 20 %-ной доле отечественных препаратов на фармацевтическом рынке [59]. Однако в структуре фармацевтического рынка Республики Казахстан, при населении в 19,2 млн. человек, отечественными производителями производится всего 11 % лекарственных средств.

В таблице 1 представлены данные по номенклатуре антибактериальных средств для наружного применения, зарегистрированных в Республике Казахстан.

Таблица 1 - Характеристика антибактериальных средств для наружного применения, включенных в Государственный реестр лекарственных средств Республики Казахстан (по состоянию на ноябрь 2020 г.)

№ п/п	Наименование	Действующий компонент	Изготовитель, страна-производитель	Фармакотерапевтическая группа
1	Зеркалин®, раствор	Клиндамицин	Ядран Галенский Лабораторий АО (Хорватия)	Антибактериальное средство для наружного применения
2	Розамет, крем	Метронидазол	Ядран Галенский Лабораторий АО (Хорватия)	Антибактериальное средство для наружного применения
3	Левомеколь, мазь	Хлорамфеникол	Нижфарм ОАО (Россия)	Антибактериальное средство для наружного применения
4	Метрогил, гель	Метронидазол	Юник Фармасьютикал Лабораториз (Индия)	Антибактериальное средство для наружного применения
5	Сульфаргин, мазь	Сульфадiazин	Гриндекс (Латвия)	Антибактериальное средство для наружного применения
6	Банеоцин, порошок	Бацитрацин, Неомицин	Pharmazeutisch Fabrik Montavit GmbH (Австрия)	Антибактериальное средство для наружного применения
7	Агросульфам, крем	Сульфатиазол серебра	Pharmazeutisch Fabrik Montavit GmbH (Австрия)	Антибактериальное средство для наружного применения
8	Тетрациклин, мазь	Тетрациклин	Биосинтез (Россия)	Антибактериальное средство для наружного применения
9	Диоксидин, раствор	Гидроксиметилхинокс илиндиоксид	Новосибхимфарм ОАО (Россия)	Антибактериальное средство для наружного применения

№ п/п	Наименование	Действующий компонент	Изготовитель, страна-производитель	Фармакотерапевтическая
10	Дермазин, крем	Сульфадiazин	Салютас Фарма ГмбХ (Германия)	Антибактериальное средство для наружного применения
11	Левомецетин, спиртовой раствор	Хлорамфеникол	Фармация 2010 ТОО (Казахстан)	Антибактериальное средство для наружного применения
12	Силкер, крем	Сульфадiazин	Оксфорд Лабораториз Пвт. Лтд (Индия)	Антибактериальное средство для наружного применения
13	Мупобел, мазь, крем	Мупироцин	Нобел Алматинская фармацевтическая фабрика АО (Казахстан)	Антибактериальное средство для наружного применения
14	Линимент синтомицина	Хлорамфеникол	Алтайвитамины (Россия)	Антибактериальное средство для наружного применения
15	Фурасол	Фурагин	Олайнфарм (Латвия)	Антибактериальное средство для наружного применения
16	Стрептоцидовая мазь	Сульфаниламид	Фармация 2010 ТОО (Казахстан)	Антибактериальное средство для наружного применения
17	Мистинин, раствор	Мирамистин	Досфарм ТОО (Казахстан)	Антибактериальное средство для наружного применения

Как следует из данных таблицы 1, номенклатура антибактериальных средств для наружного применения, зарегистрированных в Государственном реестре лекарственных средств Республики Казахстан, довольно немногочисленна, и это в основном импортные препараты. Доля отечественных антибактериальных препаратов для наружного применения составляет 23,5 %, из которых все препараты являются дженериками и производятся с использованием импортной составляющей активных фармацевтических компонентов.

### **1.9 Сочетанное действие веществ. Виды взаимодействия и методы их определения**

Изучение сочетанного действия различных биологически активных веществ, а также других факторов (например, радиации) является важной задачей медико-биологических исследований во многих областях: фармакологии, токсикологии, экологических исследованиях, нормальной и патологической физиологии [60-62]. Интерес к действию комбинаций агентов, обладающих биологической активностью, может быть вызван различными соображениями [60, 62].

1. Сочетанное использование терапевтических средств может быть более выгодно с клинической точки зрения. В этом случае подбор подходящих комбинаций является непосредственной целью исследования.

2. Изучение совместного действия терапевтических препаратов может быть вызвано необходимостью, вследствие их одновременного назначения по разным показаниям, когда получение сочетанного эффекта не является целью приёма. И даже если речь не идёт о нескольких препаратах, попадая в организм, лекарственное вещество потенциально способно вступить во взаимодействие со множеством присутствующих там химических соединений, помимо своей непосредственной мишени.

3. Учёт совместного действия важен при установлении допустимых уровней загрязнений. Как правило, государственное регулирование сосредоточено на утверждении экологических норм индивидуальных веществ, что может оказаться недостаточной мерой в случае их взаимодействия.

4. Высока вероятность, что многие физиологические и патологические процессы протекают в условиях взаимодействия (синергетического или антагонистического) биологических медиаторов (факторов роста, гормонов, медиаторов воспаления, интерферонов и других). И понимание этих взаимодействий требуется для расшифровки механизмов, лежащих в основе наблюдаемых явлений.

Взаимодействие различных факторов, влияющих на систему в один и тот же промежуток времени, может протекать по трём основным сценариям [60, 62]:

- оказываемые ими эффекты могут развиваться независимо друг от друга и попросту складываться; подобный тип взаимодействия называют *аддитивностью* или *независимостью* действия;
- сочетанный эффект может оказаться более выраженным, чем ожидалось в случае простого суммирования; подобное «положительное» взаимодействие, как правило, называют *синергизмом*;
- эффект при сочетанном применении может оказаться более слабым, чем ожидалось бы в случае аддитивности; такое «отрицательное» взаимодействие называют *антагонизмом*.

Термин «синергизм» происходит от древнегреческого synergos (συνεργός) – «действующие вместе» [62]. Зачастую именно поиск синергетических сочетаний оказывается наиболее привлекательным для исследователей. Применение синергетических пар может оказаться выгодным, поскольку позволяет [15, 63].

1) получить существенный прирост терапевтического эффекта. Патогенны и злокачественные новообразования, в отношении которых монотерапия оказывается неэффективна, могут поддаваться комбинированному лечению [64, 65];

2) снизить дозы при сохранении того же или даже большего уровня эффективности, что позволит избежать токсических эффектов [66];

3) минимизировать или существенно замедлить процесс развития резистентности к применяемым лекарственным средствам;

4) избирательно увеличить активность в отношении мишени (синергизм эффектов) в сравнении с организмом пациента (антагонизм токсичности).

Теоретические и экспериментальные исследования показали, что для сочетаний лекарственных средств, проявляющих синергизм основного действия, синергизм также и побочного действия наблюдается редко [67-68].

### 1.9.1 Синергизм, антагонизм, аддитивность и потенцирование

Следует отметить, что термины «синергизм» и «аддитивность» используются обычно в том случае, если применяемые совместно средства сами по себе обладают исследуемым эффектом. При этом их природа и механизм действия могут быть совершенно различны. Так, в области терапии онкологических заболеваний широко применяются сочетания химических и физических (тепло, pH, радиация) факторов. Однако феномен усиления эффекта может наблюдаться и в том случае, когда одно из действующих средств исследуемым видом активности не обладает. Крайним же случаем можно считать ситуацию, в которой оба компонента сами по себе не эффективны, однако при сочетанном их применении заданный эффект достигается [62]. Также известен эффект автосинергизма [69]. Например, парацетамол способен связываться с различными активными центрами мишени, тем самым усиливая собственное действие [70]. Применяемая в различных случаях терминология приведена в таблице 2.

Таблица 2 - Терминология, применяемая для описания сочетанного действия лекарственных веществ [62, 66, 71].

Эффект при сочетанном применении	Оба препарата обладают индивидуальной активностью	Только один из препаратов обладает индивидуальной активностью	Ни один из двух препаратов не обладает индивидуальной активностью
Больше, чем при нулевом взаимодействии	Синергизм	Потенцирование/ Усиление (Синергизм)	Коализм
Соответствует нулевому взаимодействию	Аддитивность/ Независимое действие	Инертизм (Инертность)	Инертизм (Инертность)
Меньше, чем при нулевом взаимодействии	Антагонизм	Антагонизм	-

Тем не менее, случаям потенцирования и коализма в литературе, посвящённой вопросам совместного действия, уделяется мало внимания. Такого рода взаимодействия, когда изучаемым эффектом обладает лишь одно из применяемых веществ, иногда называют гетероэргическими и их наличие легко можно установить по тому, имеется ли расхождение в активности действующего вещества в присутствии и в отсутствии дополнительного компонента [60].

В случае, когда исследуемым видом активности обладают оба вещества, определение типа сочетанного действия оказывается куда более сложной задачей. Синергизм определяют как эффект, больший, чем простое аддитивное действие; антагонизм – как эффект меньший, чем простое аддитивное действие. Таким образом, главной трудностью становится именно определение того, что понимать под аддитивным или независимым действием [60-61].

Несмотря на то, что активные работы в данном направлении ведутся уже более полувека, между исследователями: фармакологами, статистиками, клиницистами, токсикологами и представителями других областей научного знания – до сих пор нет полного согласия по данному вопросу [60, 62, 66, 72-76].

Так, в обзоре Греко и др. [66] в результате систематизации было выделено 13 различных подходов к определению антагонизма и синергизма. Тем не менее, в конечном итоге все подобные модели могут быть сведены к двум основным парадигмам, определяющим нулевое взаимодействие компонент, которые были рекомендованы так называемым Саарисельским соглашением [77]. Одна из них определяет аддитивность в терминах доз и называется *аддитивностью Лёве* (изоаддитивностью, аддитивностью доз); вторая – в терминах эффектов и называется *независимостью Блисса* (гетероаддитивностью, аддитивностью эффектов) [61, 78, 62].

До настоящего времени единого мнения о том, какая из моделей является более состоятельной, нет. Кроме того, открытым остаётся вопрос, могут ли они описывать принципиально разные биологические явления, или различаются лишь выбранным подходом к оценке аддитивности [79, 80, 62].

Тем не менее, поскольку в одной модели критерий нулевого взаимодействия определяется в терминах доз, а в другой – в терминах эффектов, сравнение между ними оказывается весьма затруднительным. Помимо персональных предпочтений использование того или иного подхода зависит от области биомедицинских исследований. Так, например, в исследованиях, связанных с радиационным излучением, широко используется критерий независимости Блисса [76]. В других областях так называемым «золотым стандартом» является аддитивность Лёве [74].

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты и материалы исследования

#### 2.1.1 Объекты исследования

##### Аддукты (координационные соединения) иода №1-9:

- № 1 -  $[C_4H_8O_2]_2[K+1][I_3-1]$  - калия трийодид ди-диэтилендиоксид,
- № 2 -  $[C_4H_8O_2]_5[K+1]_2[I_3-1]_2$  - ди-калия ди-трийодид пента-диэтиленоксид,
- № 3 -  $[C_6H_{15}N_2O_4]+[I_3]$  - ди-аминопропионат гидротрийодида,
- № 4 -  $2[C_6H_{13}NO_2], 2[C_6H_{14}NO_2]+1 2I -1 H_2O$  ди-иодо ди-2-амино-3-метилпентановой кислоты гидрат,
- № 5 -  $[C_6H_{14}N_2O_4S_2]^{+2}[I_3^{-1}]_2$  ди-трийодо-3,3'-ди-тио-бис-2-аминопропионовая кислота,
- № 6 -  $[C_{18}H_{23}N_2O_4+1][I-1]$   $\alpha,\alpha'$ -ди-амино- $\beta,\beta'$ -дифенилпропионовой кислоты монойодид,
- № 7 -  $6(C_3H_7NO_2), 2H_2O, Li^+, I_3^-$  гекса-аминопропионат лития трийодид дигидрат,
- № 8 -  $2C_6H_{15}N_2O_2^+ \cdot 2I_3^- \cdot H_2O$  ди-трийодидо-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат,
- № 9 -  $C_{11}H_{12}N_2O_2 \cdot (C_{11}H_{13}N_2O_2)^+ \cdot Na^+ \cdot 2H_2O \cdot (I_4)$  2- ди- ((2S) -2-амино-3-(1H-индол-3-ил) пропионат) дигидро тетрайодид.

Оригинальные комплексные соединения (аддукты) иода №1-9, синтезированы в лаборатории физической и биоорганической химии Научного Центра противоинфекционных препаратов в 2017 году. Пространственное строение соединений №1-9 установлено по результатам рентгеноструктурного анализа.

##### Субстанция D1: субстанция аддукта иода № 8.

Для исследования на базе лаборатории новых веществ и материалов АО «НЦПП» были синтезированы три серии аддукта (координационного соединения) иода № 8 -  $2C_6H_{15}N_2O_2^+ \cdot 2I_3^- \cdot H_2O$  ди-трийодидо-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрата.

**Комбинированное лекарственное средство:** гель, содержащий субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол.

##### Препараты сравнения:

- Левомеколь – мазь для наружного применения белого или белого с желтоватым оттенком цвета. Препарат для местного применения, оказывает противовоспалительное и антимикробное действие, активен в отношении, как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (золотистого стафилококка, синегнойной палочки, кишечной палочки и др.). Легко проникает вглубь тканей без повреждения биологических мембран, стимулирует процессы регенерации, сохраняет антибактериальное действие в присутствии гноя и некротических ран (Нижфарм, Россия).

- Мазь Бетадин – гомогенная мазь коричневого цвета со слабым запахом иода, антисептическое средство широкого спектра действия для местного

применения, а также профилактики инфекции мелких порезов и ссадин, небольших ожогов. Препарат рекомендуется для лечения грибковых и бактериальных инфекций кожи, а также инфекций пролежней и трофических язв (EGIS, Венгрия).

### 2.1.2 Реактивы и растворители:

*Вода очищенная* [ГФ РК, т. 1, с. 347].  $H_2O$ . М.м. 18. Бесцветная прозрачная жидкость без запаха и вкуса.  $T_{кип} = 100\text{ }^{\circ}C$ ,  $T_{пл} = 0\text{ }^{\circ}C$ ,  $d_4^{20} = 1,0\text{ г/см}^3$ .

*Гексан*.  $C_6H_{14}$ . ( $M_r$  86.2). [110-54-3]. (ГФ РК, т.1, с. 348).

Бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически не растворим в воде, смешивается с этанолом (ГФ РК с. 348). Гексан используется в качестве растворителя.

*96 % спирт этиловый*.  $C_2H_5OH$ . ( $M_r$  46.07). [64-17-5]. (ГФ РК, Т. 2, с. 581).

Прозрачная, бесцветная, подвижная, летучая жидкость с характерным запахом и жгучим вкусом.

*Хлорамфеникол*.  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ . ( $M_r$  323,132). [56-75-7]. (ГФ РК, Т. 2, с. 531).

Тонкий кристаллический порошок или тонкие кристаллы в виде игл или продолговатых пластин белого, серовато белого или желтовато-белого цвета.

*Иод*. I. ( $M_r$  126,90447(3)). [7553-56-2]. (ГФ РК, Т. 2, с. 248).

Кристаллы чёрно-серого цвета с фиолетовым металлическим блеском, проявляющие неметаллические свойства и издающие характерный запах.

*Калия иодид*. KI. ( $M_r$  166,0028). [7681-11-0]. (ГФ РК, Т. 2, с. 253).

Бесцветная кристаллическая соль, желтеющая на свету.

*Лизина гидрохлорид*.  $C_6H_{14}N_2O_2$  ( $M_r$  146,19). [657-27-2]. (ГФ РК, Т. 2, с. 304).

Белый или светло-коричневый порошок.

*Карбопол 940*.  $C_3H_4O_2$ . ( $M_r$  72.06). [9003-01-4].

Белый тонкий порошок.

*Поливинилпирролидон*.  $(C_6H_9NO)_n$ . ( $M_r$  12600±2700). [9003-39-8]. (ГФ РК, Т. 2, с. 422).

Белый или светлый кремово-белый гигроскопичный порошок или хлопья.

*Натрия гидроксид*. NaOH. ( $M_r$  39,997). [1310-73-2]. (ГФ РК, Т. 2, с. 358).

Белое твёрдое вещество. Сильно гигроскопичен, на воздухе «расплывается», активно поглощая пары воды и углекислый газ из воздуха. Хорошо растворяется в воде, при этом выделяется большое количество теплоты.

*Гидроксипропилметилцеллюлоза*.  $C_{56}H_{108}O_{30}$ . ( $M_r$  86000). [9004-65-3].

Гигроскопичный порошок белого цвета без вкуса и запаха.

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Скрининг антимикробной активности аддуктов (координационных соединений) иода

*Определение антимикробной активности*

Изучение антимикробной активности проводили методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде [81].

Для метода двукратных серийных разведений использовался инокулюм тест-штаммов микроорганизмов в концентрации  $1,5 \times 10^6$  КОЕ/мл. Первичная суспензия тест-штамма готовилась на физиологическом растворе (0,9 % NaCl). Стерильной петлей отобрали аликвоту суточно-культивированного тест-штамма, после чего внесли ее в стерильную пробирку с 5 мл 0,9 %-ного NaCl. Контроль мутности полученного инокулюма осуществлялся путем замера оптической плотности на денситометре DEN-1 (Biosan, Латвия). Плотность первичной суспензии составила 0,5 ед. по МакФарланду, что соответствует  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Далее первичную суспензию в количестве 0,1 мл вносили в пробирку с 9,9 мл изотонического раствора для достижения рабочей концентрации равной  $1,5 \times 10^6$  КОЕ/мл. Тестирование проводили на жидкой питательной среде – бульоне Мюллера-Хинтона (Himedia, Индия) [81].

В качестве тест-систем для изучения антимикробных свойств *in vitro* использовали референс штаммы микроорганизмов, полученные из Американской коллекции типовых культур (АТСС, США).

Антимикробное действие оригинальных аддуктов (координационных соединений) №1-9 определяли в отношении 3 музейных чувствительных штаммов *Staphylococcus aureus* АТСС 6538-Р, *Escherichia coli* АТСС 8739, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027, 2 музейных мультирезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* АТСС-ВАА-39, *Escherichia coli* АТСС-ВАА-196 и 1 клинического мультирезистентного штамма *Pseudomonas aeruginosa* ТА2.

Для изучения совместного действия координационного соединения (аддукта) иода №8 и антибиотиков (гентамицина, тетрациклина, хлорамфеникола) использовали мультирезистентные штаммы: музейные *Staphylococcus aureus* АТСС 33591, *Escherichia coli* АТСС ВАА-2523, *Streptococcus pneumoniae* АТСС ВАА-660 и клинический *Pseudomonas aeruginosa* ТА2.

Исследование антимикробного действия комбинированного лекарственного средства - геля, содержащего субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол, проводили в отношении 4 музейных чувствительных штаммов *Staphylococcus aureus* АТСС 6538-Р, *Escherichia coli* АТСС 8739, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027, *Streptococcus pneumoniae* АТСС 49619, 2 музейных мультирезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* АТСС 33591, *Escherichia coli* АТСС ВАА-2523 и 1 клинического мультирезистентного штамма *Pseudomonas aeruginosa* ТА2.

### **2.2.2 Физико-химические и физические методы испытаний субстанции D1**

Испытания показателей качества субстанции аддукта иода проводились согласно методикам, описанным в Государственной Фармакопее Республики Казахстан [82-84], Европейской фармакопее [85] и Фармакопее Евразийского экономического союза [86]. Испытания проводились на базе лабораторий, аккредитованных по стандарту ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»: лаборатории

микробиологии, лаборатории новых веществ и материалов и контрольно-аналитической лаборатории АО «НЦПП».

*Описание.* Цвет, запах, внешний вид и форму частиц субстанции определяли согласно монографии ГФ РК том 1, пп. 2.3.4 [82, с. 120].

*Определение растворимости.* Растворимость субстанции определяли согласно монографии ГФ РК том 1, с. 25 в воде очищенной. Помимо этого, растворимость также определяли в нескольких полярных и неполярных растворителях. Растворители для данного показателя субстанции иода выбирали в широком диапазоне индекса полярности от 0,04 до 10,20.

*Идентификация по ИК-спектру.* Определение проводили методом ИК-спектроскопии в диапазоне частот от 650 до 4000 см<sup>-1</sup> при помощи ИК-спектрофотометра Nicolet 6700, фирмы Thermo Scientific, согласно ГФ РК том 1, пп. 2.2.24. Сканирование осуществляли с помощью приставки Smart Performer методом внутреннего отражения на кристалле ZnSe [87, с. 27]

*Идентификация по УФ-спектру.* Определение проводили на приборе Lambda-35 фирмы Perkin Elmer. УФ спектр определяли для 0,05 %-ного водного раствора субстанции, диапазон сканирования – от 190 до 500 нм, согласно ГФ РК, том 1, пп. 2.2.25 [82, с. 66]

Валидацию данной аналитической методики проводили согласно руководству ICH Q2 (R1) (CPMP/ICH/381/95) [83], а также стандартной операционной процедуре «Валидирование аналитических методов» разработанной в АО «Научный центр противоинфекционных препаратов». В качестве критериев валидации аналитических методов использованы требования, изложенные в руководстве ICH Q2. Выбраны следующие параметры валидации и соответствующие критерии приемлемости: точность по длинам волн, повторяемость по длинам волн, точность по оптической плотности, повторяемость по оптической плотности.

*Определение показателя «температура плавления».* Определение температуры плавления/разложения проводили открытым капиллярным методом на приборе STA 449 F1 Jupiter (NETZSCH, Германия), согласно ГФ РК, том 1, пп. 2.2.15 [82, с. 54].

*Определение показателя «кинематическая вязкость».* Определение показателя кинематической вязкости проводили при температуре 20 °С с использованием стеклянного вискозиметра Оствальда, согласно ГФ РК, том 1, пп. 2.2.8 [82, с. 47].

Исследования проводили на 1 %-ном водном растворе субстанции. Расчет проводили согласно формуле 1:

$$v = k \times t, \quad (1)$$

где:  $k$  – постоянная вискозиметра;

$t$  – время истечения раствора субстанции, с [82, с. 47].

*Потенциометрическое определение рН.* Измерение рН проводили потенциометрически с использованием комбинированного электрода на

ионометре Basic pH Meter PB-11, фирмы Sartorius, согласно ГФ РК, том 1, пп. 2.2.3. Исследование проводили на 1 %-ном водном растворе субстанции [82, с. 41].

*Определение показателя «потеря в массе при высушивании».* Определение потери в массе при высушивании проводили методом «определения влажности», согласно ГФ РК, том 1, пп. 2.2.32 [82, с. 91].

*Определение показателя «общая зола».* Определение показателя «общая зола» проводили согласно методу, описанному в ГФ РК, том 1, пп. 2.4.16 [82, с. 55].

*Количественное определение.*

Количественное определение активного компонента – иода, проводили методом капиллярного электрофореза, согласно ГФ РК, том 1, 2.5.4 и 2.2.20 на приборе капиллярного электрофореза Agilent 1600 (Германия), согласно Фармакопее ЕвразЭС, пп.2.1.2.37 и ГФ РК, том 1, пп.2.5.4 [86, с.106; 82 с. 156]. Использовали программное обеспечение: 3D-CE ChemStation Rev. A.10.02 Agilent Technologies. Использовали следующие характеристики прибора: диапазон длин волн от 190 нм до 600 нм, среднеквадратичное отклонение (СКО) выходного сигнала по времени миграции – 1 % и по площади пика – 4 %. Использовали капилляр с внутренним диаметром – 50 мкм и длиной – 56 см. В качестве стандартного образца использовали государственный стандартный образец (ГСО) 9426-2009 (Санкт-Петербург) [86, с.106; 82 с.156].

*Метод исследования структуры субстанции D1.* Изучение структуры монокристаллов D1 проводили на автодифрактометре CAD4 «Enraf-Nonius» (Nederland) [88]. Дифракционные измерения проведены при низких температурах для того, чтобы избежать разрушения кристаллов под действием рентгеновских лучей. Низкие температуры поддерживались низкотемпературной приставкой фирмы «Enraf-Nonius» при помощи паров азота, с точностью  $\pm 1$  °С. Координаты недостающих атомов легких элементов определены из разностных синтезов Фурье [87, с.30].

*Совместимость субстанции со вспомогательными веществами.* Исследования проведено согласно методам: ИК - спектроскопии ГФ РК том 1, 2.2.24; рефрактометрии, УФ - спектроскопии ГФ РК том 1, 2.2.25 [86, с.56; с.36, с.59].

*Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) и термогравиметрия (ТГ)* были проведены согласно методике, описанной в ЕФ 6 изд. том 1, 2.2.34. Испытания проводили на приборе синхронного термоанализатора STA 449 F1 Jupiter (NETZSCH, Германия) сочетающего одновременное измерение изменений массы (термогравиметрия) и тепловых потоков (дифференциальная сканирующая калориметрия). Прибор синхронного термоанализатора STA 449 F1 предварительно калиброван по температуре и чувствительности с использованием методики и стандартных образцов Netzsch [87, с.30].

### 2.2.3 Исследования технологических характеристик субстанции D1

*Определение насыпной плотности до и после уплотнения.* Насыпную плотность ( $\rho_b$ , кг/м<sup>3</sup>) определяли путём взвешивания градуированного цилиндра, наполненного субстанцией после многократного уплотнения. Проводили расчет соотношения Хауснера (Н), характеризующего степень сыпучести субстанций [82, с.250].

*Определение истинной плотности.* Истинную плотность субстанции определяли отношением массы кристаллической субстанции к её объёму при нулевой пористости порошка на приборе Erweka SVM 121, Германия. Точные навески от 12 г до 15 г помещали в волюметр прибора, закрывали крышкой и запускали программу определения. Программное обеспечение прибора позволяет автоматически рассчитывать значения плотности исследуемых серий субстанций [87, с.31].

*Определение текучести (сыпучести).* Изучения проводили согласно методу, описанному в ГФ РК, том 1, пп. 2.9.16 [82, с. 251].

Степень сыпучести исследуемых серий субстанций D1 рассчитывали на основании расчетной величины индекса Хауснера по насыпной плотности, а именно плотности до уплотнения и после уплотнения. Расчеты проводили по формуле 2.

$$H = \frac{\rho_T}{\rho_B} \quad (2)$$

где:  $\rho_T$  – насыпная плотность после уплотнения, г/см<sup>3</sup>;  
 $\rho_B$  – насыпная плотность до уплотнения, г/см<sup>3</sup> [82, с. 251].

*Форма и размер частиц.* Форму и размер частиц определяли с помощью микроскопа Leica DM 2500 (ув.10x10, 10x20) и программного обеспечения Leica Application Suite. [82, с. 250].

*Определение гигроскопичности.* Испытание гигроскопичности проводили согласно методике, описанной ЕФ 6.0, 5.11. При условии, когда упругость паров в воздухе больше, чем их упругость на поверхности частиц субстанции, субстанция будет поглощать пары из внешней среды, расплываясь в поглощенной воде [87, с.31] Кинетику процесса влагопоглощения изучали в нормальных (рабочих) и экстремальных (в условиях максимальной влажности) условиях весовым методом. Рабочие условия создавали при комнатной температуре от 25 °С до 30 °С и относительной влажности 60-75 %. Для создания условий максимальной влажности устанавливали в герметичной камере температуру 25-30 °С и относительную влажность воздуха около 100 %.

Навески исследуемых серий субстанции массой 1,0 г помещали в камеру с максимальной влажностью и в рабочей комнате в предварительно взвешенных бюксах. Взвешивание бюксов проводили каждые сутки.

## 2.2.4 Методики исследования биологической активности и фармакологических свойств субстанции D1 и комбинированного лекарственного средства

### 2.2.4.1 Тест-системы

#### 2.2.4.1.1 Референс-штаммы

В качестве тест-систем для исследования антибактериальных свойств объектов исследования *in vitro* использовали референс штаммы для изучения антимикробных свойств, полученные из Американской коллекции типовых культур (АТСС, США). В эксперименте использовались музейные чувствительные, музейные мультирезистентные и один клинический тест-штаммы: *Staphylococcus aureus* АТСС 6538-Р (музейный чувствительный штамм), *Staphylococcus aureus* АТСС-ВАА-39 (музейный мультирезистентный штамм), *Escherichia coli* АТСС 8739 (музейный чувствительный штамм), *Escherichia coli* АТСС-ВАА-196 (музейный мультирезистентный штамм), *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027 (музейный чувствительный штамм), *Pseudomonas aeruginosa* ТА2 (клинический мультирезистентный штамм).

Для изучения совместного действия координационного соединения (аддукта) иода использовали мультирезистентные штаммы: *Pseudomonas aeruginosa* ТА2 (клинический мультирезистентный штамм), *Staphylococcus aureus* АТСС 33591 (музейный мультирезистентный штамм), *Escherichia coli* АТСС ВАА-2523 (музейный мультирезистентный штамм), *Streptococcus pneumoniae* АТСС ВАА-660 (музейный мультирезистентный штамм).

Для изучения антимикробного действия комбинированного лекарственного средства использовали тест-штаммы: *Staphylococcus aureus* АТСС 6538-Р (музейный чувствительный штамм), *Staphylococcus aureus* АТСС 33591 (музейный мультирезистентный штамм), *Streptococcus pneumoniae* АТСС 49619 (музейный чувствительный штамм), *Escherichia coli* АТСС 8739 (музейный чувствительный штамм), *Escherichia coli* АТСС ВАА-2523 (музейный мультирезистентный штамм), *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027 (музейный чувствительный штамм), *Pseudomonas aeruginosa* ТА2 (клинический мультирезистентный штамм). Исследование противомикробной активности геля проводили согласно [81].

Для изучения мутагенных свойств субстанции D1, согласно руководству ОЭСР № 471 «Тест обратных мутаций у бактерий» в качестве тест-систем использовали эталонные в генетической токсикологии штаммы грамотрицательных палочек: *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Штаммы микроорганизмов *Salmonella typhimurium* ТА1535, *Salmonella typhimurium* ТА1537, *Escherichia coli* WP2 получены из Американской коллекции типовых культур. Штаммы микроорганизмов *Salmonella typhimurium* ТА98, *Salmonella typhimurium* ТА100 получены из Центра Биологических Ресурсов (NBRC) Национального Института Технологии и Развития (NITE), Япония.

#### 2.2.4.1.2 Экспериментальные животные

При изучении острой токсичности исследуемой новой субстанции D1 использовали белых аутбредных самок мышей массой 20-24 г.

При изучении местно-раздражающего действия комбинированного лекарственного средства использовали кроликов обоего пола породы «Шиншилла» массой 2-3 кг.

При изучении алергизирующих свойств комбинированного лекарственного средства использовали морских свинок обоего пола массой 100-150 г.

В исследовании по изучению ранозаживляющей активности комбинированного лекарственного средства использовали самцов белых аутбредных крыс массой 250-300 г.

Все животные находились в условиях вивария АО «НЦПП» в ИВК-системах, подключенных к вентиляционному блоку. Животные находились в клетках с подстилкой из древесной стружки, предварительно обеззараженной УФ-облучением. Подстил менялся 2 раза в неделю. Условия содержания животных соответствовали общепринятым нормам – температура окружающей среды -  $21\pm 2$  °С, влажность воздуха  $50\pm 10$  %, искусственный световой режим 12:12.

#### 2.2.4.1.3 Культура клеток

Для изучения цитотоксического действия на эукариотические клетки использовали применяемые для этих целей референс культуры клеток почек собаки – MDCK и клетки рабдомиосаркомы – RD. Данные линии клеток были получены из АТСС. Культивирование культуры клеток проводили на среде Игла, подифицированной по методу Дульбекко (DMEM), содержащей 10 %-ную фетальную сыворотку, 2 %-ный раствор L- глутамина и 1 %-ный раствор антимикробных и агтигрибковых препаратов (10,000 ЕД пенициллина, 10,0 мг стрептомицина, 25,0 мкг/мл амфотерицина В). Клетки культивировали при  $37\pm 1$  °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Контроль жизнеспособности линий клеток после криоконсервации составил 98 %. Клетки эффективно размножались в концентрации  $2\times 10^5$  клетка/мл, достигая 100 % монослоя через 48 часов культивирования. Пересев культур клеток проводили два раза в неделю.

#### 2.2.4.2 Методики изучения биологических свойств

*Методы определения микробиологической чистоты.* Испытание микробиологической чистоты субстанции проводили методом прямого посева в соответствии с требованиями ГФ РК, том 1, 2.6.12 и, 2.6.13 (категория 3А) [82, с. 176].

*Изучение острой токсичности.* Эксперименты на животных одобрены локальной этической комиссией АО «НЦПП» (№ 04-03/037 от 03.04.2019 г.) и КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова (заседание №13 (77), заявка регистр. №672), в соответствии с законодательством Республики Казахстан (Приложения В, Г). Эксперименты проведены совместно с сотрудниками лаборатории

фармакологии и токсикологии, лаборатории микробиологии и лаборатории вирусологии АО «НЦПП».

При изучении острой токсичности исследуемой новой субстанции D1 использовали белых аутбредных самок мышей массой 20-24 г. Оценку острой токсичности осуществляли по руководству ОЭСР по испытанию химических веществ № 423 «Острая токсичность – классический метод». Класс токсичности субстанции D1 определяли в соответствии с международной системой классификации токсичности веществ GHS [89].

*Изучение местно-раздражающего и аллергизирующего действий.* При изучении местно-раздражающего действия комбинированного лекарственного средства использовали кроликов обоего пола породы «Шиншилла» массой 2-3 кг. При изучении аллергизирующих свойств комбинированного лекарственного средства использовали морских свинок обоего пола массой 100-150 г.

Исследование раздражающего действия комбинированного геля проведено на кроликах массой 2,5 - 3,0 кг при накожной аппликации. Площадь нанесения составляла 5,0 x 5,0 см<sup>2</sup>. За сутки до эксперимента шерсть животных тщательно выстригалась на симметричных участках боков, левая боковая сторона - контрольная (очищенная вода), правая - исследуемый гель. При нанесении изучаемого геля в течение 4-часовой экспозиции животные находились в фиксированном состоянии. Реакцию наблюдали через 1, 4, 24, 48, 72 часа.

Для изучения аллергизирующего действия использовались морские свинки по 6 особей в контрольной и опытной группах. Исследование проводилось с помощью конъюнктивальной пробы методом субконъюнктивального нанесения испытуемого геля в зоне перехода слизистых оболочек века и глазного яблока морской свинки правого глаза. После нанесения геля на 1 мин. прижимали слезно-носовой канал у внутреннего угла глаз. Контрольным служил - левый глаз (вводилась очищенная вода, в объеме 1 капли) [90].

Степень аллергизирующего действия геля (средние данные 6 повторов) оценивали по четырехбальной шкале через 3 и 24 часа после введения в конъюнктивальный мешок глаза.

*Изучение эффективности.* В исследовании по изучению ранозаживляющей активности комбинированного лекарственного средства использовали самцов белых аутбредных крыс массой 250-300 г.

Все животные находились в условиях вивария АО «НЦПП» в ИВК-системах, подключенных к вентиляционному блоку. Животные находились в клетках с подстилкой из древесной стружки, предварительно обеззараженной УФ-облучением. Подстил менялся 2 раза в неделю. Условия содержания животных соответствовали общепринятым нормам – температура окружающей среды - 21±2 °С, влажность воздуха 50±10 %, искусственный световой режим 12:12.

*Изучение цитотоксичности in vitro в отношении культур клеток при помощи МТТ-теста.* Оценку цитотоксичности субстанции D1 *in vitro* проводили методом МТТ [91].

Для изучения цитотоксического действия на эукариотические клетки использовали применяемые для этих целей референс культуры клеток почек

собаки – MDCK и клетки рабдомиосаркомы – RD. Данные линии клеток были получены из АТСС. Культивирование культуры клеток проводили на среде Игла, подифицированной по методу Дульбекко (DMEM), содержащей 10 %-ную фетальную сыворотку, 2 %-ный раствор L- глутамина и 1 %-ный раствор антимикробных и агтигрибковых препаратов (10,000 ЕД пенициллина, 10,0 мг стрептомицина, 25,0 мкг/мл амфотерицина В). Клетки культивировали при  $37 \pm 1$  °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Контроль жизнеспособности линий клеток после криоконсервации составил 98 %. Клетки эффективно размножались в концентрации  $2 \times 10^5$  клетка/мл, достигая 100 % монослоя через 48 часов культивирования. Пересев культур клеток проводили два раза в неделю.

Клетки рассевали в 96-луночные планшеты в концентрации  $2,5 \times 10^5$  клеток в 1,0 мл и т.д.

*Исследование мутагенных свойств (тест Эймса).* Исследование мутагенной активности (тест Эймса) осуществляли согласно ТР-МВ-007 «Тест обратных мутаций у бактерий». В чашки Петри с минимальной средой вносили агар верхнего слоя, содержащий 0,1 мл культуры тест-штамма, 0,1 мл раствора исследуемого вещества определенной концентрации (5; 1,581; 0,5; 0,158; 0,05 мг/чашку) и 0,5 мл микросомальной фракции печени крыс S9-mix. После застывания агара чашки Петри с посевами инкубировали при  $(37 \pm 1)$  °С в течение  $(48 \pm 12)$  ч [92-93]. Помимо опытных чашек в исследовании присутствовали и контрольные чашки, содержащие:

– отрицательный контроль:

а) только культуру бактерий и растворитель (ФСБ);

б) культуру бактерий, растворитель (ФСБ) и микросомальную активирующую систему.

– положительный контроль:

а) культуру бактерий с добавлением мутагенов;

б) культуру бактерий с добавлением промутагенов и микросомальной активирующей системы.

Учет результатов осуществляли через 48 ч. Степень мутагенного эффекта определяли по увеличению числа колоний ревертантов при данной дозе над таковым в негативном и позитивном контролях. Каждую концентрацию исследуемого соединения, позитивный и негативный контроли тестировали в трех повторностях. Оценку значимости увеличения числа ревертированных колоний в опытных вариантах по сравнению с отрицательным и положительным контролями проводили с использованием метода Стьюдента, подсчетом среднего арифметического и среднего стандартного отклонения. Достоверно значимым является значение  $p \leq 0,05$ .

### **2.2.5 Методы изучения физико-химических свойств геля, содержащего субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол**

*Описание.* Определение проводили, согласно ГФ РК, том 1, монография «Мягкие лекарственные средства для местного применения», категория «Гели».

*Идентификация по УФ-спектру.* Испытание проводили согласно ГФ РК, том 1, 2.2.25 на приборе Lambda-35 фирмы Perkin Elmer. УФ-спектр 0,05%-ного водного раствора комбинированного ЛС - геля, диапазон сканирования – от 190 до 500 нм [87, с.60]

*ДСК-анализ субстанции D1 и хлорамфеникола со вспомогательными веществами*

Дифференциальную сканирующую калориметрию проводили на приборе синхронного термического анализа модели STA 449 F3 Jupiter с держателем образца (ДСК/ТГ) типа S в алюминиевом тигле с проколотой крышкой (в качестве эталона использовался пустой алюминиевый тигель с проколотой крышкой). Проведение испытаний осуществляли в диапазоне температур от 25 до + 200 °С при естественном давлении воздуха, скорость нагревания составляла 5 °С/мин, экспериментальная масса 10 мг ± 1 %. Заполнение тиглей осуществляли с помощью стеклянной палочки.

*Реологические исследования*

Вязкость, напряжение сдвига, градиент скорости сдвига являются основными реологическими характеристиками мягких лекарственных форм. Изучение данных характеристик проводили при помощи прибора «Rheotest - II» (Германия). В ходе исследования определялись кривые гистерезиса, а именно: зависимость напряжения сдвига от градиента скорости сдвига при различных скоростях вращения цилиндра.

Расчет реологических параметров напряжения сдвига производился по формуле 3 и 4:

$$\tau = Z \times d, \quad (3)$$

где  $\tau$  – напряжение сдвига, Н/м<sup>2</sup>(Па);  $Z$  – константа цилиндра, Па/дел.шк. (деление шкалы);  $d$  – фиксируемое значение прибора.

$$\eta = \frac{\tau}{D\tau}, \quad (4)$$

где  $D\tau$  – градиент скорости сдвига, с-1,  $\eta$  – динамическая вязкость образца.

При разработке мягкой лекарственной формы необходимым условием является изучение структурно-механических характеристик, от показателей которых зависят потребительские свойства мази и его способность высвободить АФИ. Структурно-механические свойства (вязкость, предельное напряжение сдвига) являются факторами, влияющими на скорость диффузии лекарственного вещества, от которых зависит терапевтический эффект мази. Усилия, прилагаемые пациентом при нанесении геля на кожу, аналогичны тому напряжению, которое происходит в Rheotest-II во время сдвига вязкопластичного материала. Пропорция напряжения к величине сдвига характеризует сопротивление материала сдвиговым деформациям при определенной скорости

Реологические свойства основ изучали с помощью ротационного вискозиметра Rheotest-II (Германия).

*Оценку площади намазываемости* при нанесении геля проводили по методике, представленной в книге Г. Шрамма «Основы практической реологии и реометрии» [94].

#### *Определение рН комбинированного средства*

Определение водородного показателя ЛС проводили потенциометрически по ГФ ГФ РК, том 1, 2.2.3, при температуре 20° С, с использованием рН - метра РВ-10 «Sartorius» [82].

#### *Определение стабильности*

Стабильность разработанного комбинированного лекарственного средства проводили согласно Приказу Министра здравоохранения Республики Казахстан от 28 октября 2020 года № КР ДСМ-165/2020 «Об утверждении Правил производства и контроля качества, а также проведения испытаний стабильности и установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств и медицинских изделий». Сроки хранения ЛС в естественных условиях устанавливали посредством мониторинга показателей качества через 3 месяца в течение первого года хранения и каждые 6 месяцев в дальнейшем [95].

### **2.2.6 Биофармацевтические методы исследований комбинированного лекарственного средства**

*Изучение высвобождения* хлорамфеникола из испытуемого образца комбинированного лекарственного средства оценивали методом равновесного диализа по Крувчинскому. [96]. Определение хлорамфеникола в диализате проводили методом УФ-спектрофотометрии. В качестве модели полупроницаемой мембраны использовали стандартную целлофановую пленку, диализной средой служил раствор натрия гидроксида 5%. Экспериментальная температура + 37 ±2,0 °С. Отбор проб диализата проводили через определенные промежутки времени. Расчет степени высвобождения X (%) проводили по формуле 5:

$$X = B/A \times 100\%, \quad (5)$$

где В – количество действующего вещества, высвободившегося в диализную среду, г; А – количество вещества, содержащегося в навеске ЛС, г.

### **2.2.7 Методы статистической обработки**

Математическую статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили, согласно требованиям ГФ РК с помощью программы Statistica 6.0. Приведены средние арифметические значения и соответствующие им стандартные отклонения (SD). При проверке нуль-гипотезы используют t-критерий Стьюдента для уровня значимости  $p < 0,05$ .

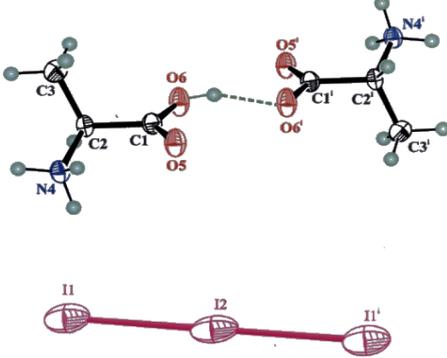
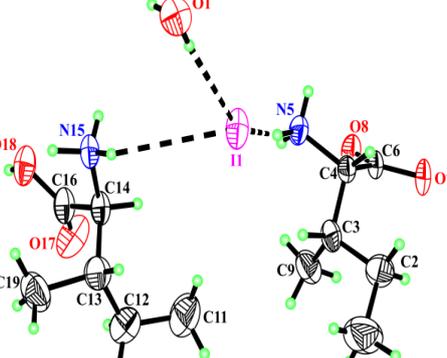
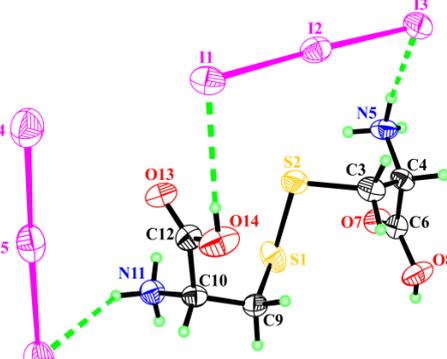
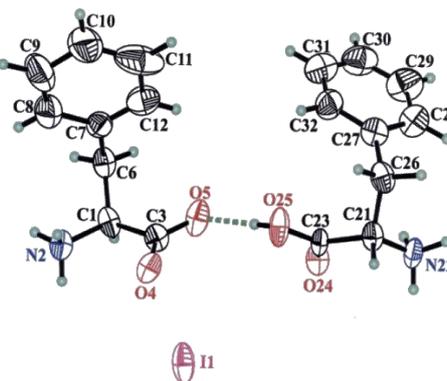
### 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ АДДУКТА ИОДА

#### 3.1 Скрининг аддуктов (координационных соединений) иода №1-9

В качестве объектов исследования выступали оригинальные комплексные соединения (аддукты) иода, синтезированные лабораторией физической и биоорганической химии Научного Центра противоинфекционных препаратов. В 2016-2017 гг. будучи признанными оригинальными соединениями на основе рентгеноструктурного анализа, полученные аддукты были зарегистрированы в Кембриджском банке кристаллографических данных (The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)), их пространственная структура и химический состав представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Структура и химический состав оригинальных координационных соединений

№ образца	Химическая формула / систематическое название (IUPAC)	Пространственная структура соединения
1	$[C_4H_8O_2]_2[K+1][I_3-1]$ калия трийодид-ди-диэтилендиоксид CCDC 975392*	
2	$[C_4H_8O_2]_5 [K+1]_2[I_3-1]_2$ ди-калия ди-трийодид-пента-диэтилендиоксид CCDC 975394*	

№ образца	Химическая формула / систематическое название (IUPAC)	Пространственная структура соединения
3	$[C_6H_{15}N_2O_4]^+[I_3]^-$ ди-аминопропионат гидротрииодида CCDC 1036607*	
4	$2[C_6H_{13}NO_2], 2[C_6H_{14}NO_2]+1 I - 1 H_2O$ ди-иодо-ди-2-амино-3-метилпентановой кислоты гидрат CCDC 1436137*	
5	$[C_6H_{14}N_2O_4S_2]^{+2}[I_3^{-1}]_2$ ди-трииодо-3,3'-ди-тио-бис-2-аминопропионовая кислота CCDC 1436136*	
6	$[C_{18}H_{23}N_2O_4+1][I-1]$ $\alpha, \alpha'$ -ди-амино- $\beta, \beta'$ -дифенилпропионовой кислоты моноиодид CCDC 1036670*	

№ образца	Химическая формула / систематическое название (IUPAC)	Пространственная структура соединения
7	$6(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2) \cdot 2\text{H}_2\text{O}, \text{Li}^+, \text{I}_3^-$ гекса-аминопропионат лития трийодид дигидрат  CCDC 1578038*	
8	$2\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{I}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ди-трийодидо-ди-2,6- диаминогексановой кислоты моногидрат  CCDC 1036668*	
9	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot (\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2)^+ \cdot \text{Na}^+ \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\cdot (\text{I}_4)^{2-}$  ди-((2S)-2-амино-3-(1H-индол-3-ил) пропионат) дигидротетрайодид  CCDC 1877292*	

Примечание: \* - Коды, присвоенные Кембриджским банком кристаллографических данных (The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC))

В исследовании использовались 1%-ные и 0,1%-ные растворы синтезированных соединений, содержание активного вещества в рабочих растворах образцов в пересчете на  $\text{I}_2$  представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Массовая доля содержания молекулярного иода в образцах координационных соединений

№ образца координационного соединения	Содержание молекулярного иода ( $\text{I}_2$ ) в образцах соединений	
	Массовая доля, %	Концентрация, мкг/мл
1	0,029	293,73
2	0,030	301,30
3	0,013	125,08
4	0,317	3166,50
5	0,027	115,72
6	0,012	272,46
7	7,450	74,51
8	43,340	433,44
9	0,031	311,15

Всего было протестировано 9 образцов координационных соединений, по результатам тестирования получены средние значения полученных МБК.

Для более удобного сравнения величин минимальной бактерицидной концентрации для разных соединений результаты представлены в виде сравнительных таблиц со значениями МБК чувствительных и резистентных штаммов (таблицы 5-7).

Результаты исследования антимикробной активности образца № 1 - калия трииодид ди-диэтилендиоксид свидетельствовали о высокой эффективности данного соединения в отношении штаммов *S. aureus* ATCC ВАА-39 и *S. aureus* ATCC 6538-Р. Минимальная бактерицидная концентрация данного образца в отношении как чувствительного, так и резистентного штаммов золотистого стафилококка составила 0,77 мкг/мл (таблица 5).

Таблица 5 – Минимальные бактерицидные концентрации координационных соединений иода для штаммов *S. aureus* ATCC ВАА-39 и *S. aureus* ATCC 6538-Р

№ образца координационного соединения иода	Среднее значение минимальной бактерицидной концентрации (в пересчете - I <sub>2</sub> ), мкг/мл	
	<i>S. aureus</i> ATCC ВАА-39	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-Р
1	0,77	0,77
2	3,14	3,14
3	2,60	2,60
4	2,06	1,03
5	0,60	0,30
6	0,70	0,70
7	3,88	3,88
8	0,71	0,71
9	125,0	125,0

Сравнительный анализ показал относительно меньшую бактерицидную активность образца № 1 по отношению к бактериям кишечной группы *E. coli* - ATCC ВАА-196 и *E. coli* ATCC 8739. Значение МБК соответствовали значению 1,54 мкг/мл (таблица 6).

Таблица 6 - Минимальные бактерицидные концентрации координационных соединений иода в отношении тест-штаммов *E. coli* ATCC ВАА-196 и *E. coli* ATCC 8739

№ образца координационного соединения иода	Среднее значение минимальной бактерицидной концентрации (в пересчете на активное вещ-во – I <sub>2</sub> ), мкг/мл	
	<i>E. coli</i> ATCC ВАА-196	<i>E. coli</i> ATCC 8739
1	1,54	1,54
2	0,79	1,52
3	2,60	2,60

№ образца координационного соединения иода	Среднее значение минимальной бактерицидной концентрации (в пересчете на активное вещ-во – I <sub>2</sub> ), мкг/мл	
	<i>E. coli</i> ATCC ВАА-196	<i>E. coli</i> ATCC 8739
4	2,06	2,06
5	0,60	0,60
6	0,70	1,39
7	3,88	3,88
8	0,56	0,71
9	125,0	250,0

В отношении клинического резистентного штамма *P. aeruginosa* ТА2 образец № 1 был эффективен в концентрации равной 3,07 мкг/мл, в то время как для чувствительного штамма - *P. aeruginosa* ATCC 9027 концентрация, полностью подавляющая его рост составила 1,54 мкг/мл (таблица 7).

Таблица 7 - Минимальные бактерицидные концентрации координационных соединений иода в отношении тест-штаммов *P. aeruginosa* ТА2 и *P. aeruginosa* ATCC 9027

№ образца координационного соединения иода	Среднее значение минимальной бактерицидной концентрации (в пересчете на активное вещество – I <sub>2</sub> ), мкг/мл	
	<i>P. aeruginosa</i> ТА2	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
1	3,07	1,54
2	3,14	3,14
3	3,26	1,30
4	2,06	1,03
5	0,60	0,30
6	2,79	2,79
7	1,55	3,88
8	1,41	1,41
9	250,0	250,0

Анализ активности образца № 2 - ди-калия трийодид-пента-диэтилендиоксид показал, что в концентрации 3,14 мкг/мл обладал бактерицидным действием в отношении как устойчивого *S. aureus* ATCC ВАА-39 так и чувствительного *S. aureus* ATCC 6538-Р. Минимальная бактерицидная концентрация, вызвавшая гибель тест-штаммов *P. aeruginosa* (ТА2 и ATCC 9027) также составила 3,14 мкг/мл. Однако, данный образец являлся более активным в отношении резистентного *E. coli* ATCC ВАА-196 и чувствительной культуры *E. coli* ATCC 8739, для которых значения минимальных бактерицидных концентраций составили 0,79 мкг/мл и 1,52 мкг/мл, соответственно (таблица 5, 6 и 7).

Наряду с высокой антистафилококковой активностью, соединение № 3 - ди-аминопропионат гидротрийодида также подавляло рост тест-штаммов *E. coli*

АТСС ВАА-196 и *E. coli* АТСС 8739, бактерицидная концентрация в отношении данных бактерий составила 2,60 мкг/мл. Для мультирезистентного штамма *P. aeruginosa* соединение проявило меньшую эффективность. Значение МБК для *P. aeruginosa* ТА2 составило 3,26 мкг/мл, что почти в три раза ниже по сравнению со значением МБК в отношении *P. aeruginosa* АТСС 9027 (1,30 мкг/мл) (таблица 5, 6 и 7).

В концентрации равной 2,06 мкг/мл соединение № 4 – ди-иодо-ди-2-амино-3-метилпентановой кислоты гидрат проявило бактерицидный эффект в отношении тест-штаммов *E. coli* АТСС ВАА-196, *E. coli* АТСС 8739, *S. aureus* АТСС ВАА-39 и *P. aeruginosa* ТА2. Тогда как значения минимальных бактерицидных концентраций для чувствительных штаммов *S. aureus* АТСС 6538-Р и *P. aeruginosa* АТСС 9027 не превышали значения, равного 1,03 мкг/мл (таблица 5, 6 и 7).

Образец № 5 - ди-трииодо-3,3'-ди-тио-бис-2-аминопропионовая кислота несомненно представляет особый интерес ввиду своей выраженной антимикробной активности. Так, данное соединение оказалось эффективным в отношении *S. aureus* АТСС 6538-Р и *P. aeruginosa* АТСС 9027 в концентрации 0,30 мкг/мл. Соединение № 5 в концентрации 0,60 мкг/мл обладало бактерицидным действием в отношении *E. coli* АТСС ВАА-196, *E. coli* АТСС 8739, *S. aureus* АТСС ВАА-39 и *P. aeruginosa* ТА2 (таблица 5, 6 и 7).

Наибольшую активность среди исследуемых соединений, помимо образца № 5, также показал образец № 6 -  $\alpha, \alpha'$ -ди-амино- $\beta, \beta'$ -дифенилпропионовой кислоты моноиодид. Данный образец обладал выраженным антимикробным действием по отношению к штаммам *E. coli* АТСС ВАА-196, *S. aureus* АТСС 6538-Р и *S. aureus* АТСС ВАА-39, значение МБК составило 0,70 мкг/мл. Средние значения МБК для данного соединения соответствовали 1,39 мкг/мл в отношении чувствительного штамма *E. coli* АТСС 8739 и 2,79 мкг/мл как в отношении чувствительного, так и мультирезистентного штаммов *P. aeruginosa*. (таблица 5, 6 и 7).

Соединение № 7 – гекса-аминопропионат лития трииодид дигидрат, продемонстрировало выраженный бактерицидный эффект в отношении клинического резистентного штамма *P. aeruginosa* ТА2, МБК для данной тест-культуры составила 1,55 мкг/мл. Активность данной субстанции наблюдалась также в отношении штаммов *E. coli* АТСС ВАА-196, *E. coli* АТСС 8739, *P. aeruginosa* АТСС 9027, *S. aureus* АТСС ВАА-39 и *S. aureus* АТСС 6538-Р. МБК для них составила 3,88 мкг/мл (таблица 5, 6 и 7).

Образец № 8 – ди-трииодидо-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат также проявил наибольшую активность среди изученных соединений. Значение МБК данного комплекса не превысило значения 0,56 мкг/мл для тест-штамма *E. coli* АТСС ВАА-196, что указывает на высокий уровень бактерицидной активности. Соединение № 8 в концентрации 0,71 мкг/мл подавляло рост штаммов *E. coli* АТСС 8739, *S. aureus* АТСС ВАА-39 и *S. aureus* АТСС 6538-Р. Минимальная бактерицидная концентрация данного соединения в отношении *P.*

*aeruginosa* TA2 и *P. aeruginosa* ATCC 9027 составила 1,41 мкг/мл (таблица 5, 6 и 7).

Соединение № 9 - ди- ((2S) -2-амино-3- (1H-индол-3-ил) пропионат) дигидротетраиодид) не проявило выраженного бактерицидного эффекта в отношении тест-штаммов. Значения МБК для тест-культур находились в диапазоне от 125 мкг/мл до 250 мкг/мл (таблица 5, 6 и 7).

Суммируя полученные результаты можно выделить несколько координационных соединений иода оказавшихся наиболее эффективными в отношении как мультирезистентных, так и чувствительных микроорганизмов.

Так, в отношении резистентного штамма *E. coli* ATCC ВАА-196 наибольшей активностью обладали образцы соединений № 5, 6 и 8, минимальные бактерицидные концентрации которых составили 0,60 мкг/мл, 0,70 мкг/мл и 0,56 мкг/мл, соответственно. Для штамма *E. coli* ATCC 8739 (чувствительный штамм) этими соединениями являлись только образцы № 5 и № 8 в концентрациях 0,60 мкг/мл и 0,71 мкг/мл.

В отношении метициллин-резистентного штамма *S. aureus* ATCC ВАА-39 и *S. aureus* ATCC 6538-Р (чувствительный штамм) наибольшую активность также проявили соединения № 5, 6 и 8. Для обоих штаммов *S. aureus* образцы № 6 и № 8 были эффективны в концентрациях 0,70 мкг/мл и 0,71 мкг/мл, соответственно. В свою очередь, образец № 5 для *S. aureus* ATCC ВАА-39 проявил бактерицидный эффект в концентрации 0,60 мкг/мл, в то время как для *S. aureus* ATCC 6538-Р эта величина составила 0,30 мкг/мл.

Наибольшим бактерицидным эффектом в отношении клинического мультирезистентного штамма *P. aeruginosa* TA2 обладало соединение № 5 с минимальной бактерицидной концентрацией равной 0,60 мкг/мл, и № 8, для которого МБК составила 1,41 мкг/мл. Для музейного чувствительного штамма *P. aeruginosa* ATCC 9027 этим эффектом обладало соединение № 5 в концентрации 0,30 мкг/мл, соответственно.

В настоящем исследовании была изучена антимикробная активность оригинальных координационных соединений иода. Среди 9 синтезированных комплексов, были выявлены 3 наиболее перспективных соединения: образец № 5 - ди-трийодо-3,3' ди-тио-бис-2-аминопропионовая кислота, образец № 6 -  $\alpha,\alpha'$ -ди-амино- $\beta,\beta'$ -дифенилпропионовой кислоты моноиодид и образец № 8 –ди-трийодидо-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат, проявившие наибольшую антимикробную активность по отношению, как к чувствительным, так мультирезистентным штаммам микроорганизмов. Ввиду высокой антимикробной эффективности данные комплексы были выбраны для дальнейших исследований по изучению эффектов комбинации данных соединений с антибиотиками для создания комбинированного лекарственного средства [97-99].

### **3.2 Изучение совместного действия координационных соединений иода №5, №6 и №8 с антибиотиками**

Координационные соединения иода: №5 - ди-трииодо-3,3'-ди-тио-бис-2-аминопропионовая кислота, №6 -  $\alpha,\alpha'$ -ди-амино- $\beta,\beta'$ -дифенилпропионовой кислоты моноиодид и №8 – ди-трииодидо-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат тестировали в комбинации с антибиотиками амоксициллин, ампициллин, хлорамфеникол, тетрациклин, гентамицин и оксациллин в отношении тест-штаммов с множественной лекарственной устойчивостью.

Таблица 8 – Комбинированное тестирование образца №5 с антибиотиками классическим методом Checkerboard

Тест-культуры	МБК при раздельном тестировании		МБК при совместном тестировании		Снижение МБК, АБ/КС, разы	ФИК	Эффект комбинации
	АБ, мкг/мл	КС, мкг/мл	АБ, мкг/мл	КС, мкг/мл			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC TA2	AMP – 1000	0,60	500	0,30	2/2	1	И
	AMX – 500		250	0,60	2/0	1,5	И
	CHL - 125		125	0,30	0/2	1,5	И
	GEN - 500		250	0,60	2/0	1,5	И
	OXA - 250		250	0,60	0/0	2	А
	TET - 1000		500	0,30	2/2	1	И
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2523	AMP - 1000	0,60	500	0,30	2/2	1	И
	AMX - 1000		500	0,30	2/2	1	И
	CHL – 500		500	0,30	0/2	1,5	И
	GEN – 250		250	0,30	0/2	1,5	И
	OXA – 1000		1000	0,60	0/0	2	А
	TET - 2000		1000	0,30	2/2	1	И
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	AMP – 2000	0,60	1000	0,15	2/4	0,75	АД
	AMX – 1000		250	0,30	4/2	0,75	АД
	CHL – 500		250	0,30	2/2	1	И
	GEN – 1000		500	0,30	2/2	1	И
	OXA – 250		250	0,30	0/2	1,5	И
	TET - 1000		500	0,30	2/2	1	И
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC ВАА-660	AMP – 2000	1,20	1000	0,60	2/2	1	И
	AMX – 2000		500	0,60	4/2	0,75	АД
	CHL – 1000		500	0,60	2/2	1	И
	GEN – 2000		1000	0,60	2/2	1	И
	OXA – 1000		1000	0,60	0/2	1,5	И
	TET -2000		1000	0,60	2/2	1	И

Примечание: «И» – индифферентность, «А» – антагонизм, «АД» - аддитивное действие, «АБ» - антибиотик, «КС» - координационное соединение иода.

Из данных, представленных в таблице 8 видно, что результатом комбинации координационного соединения иода (образец №5) с антибиотиком амоксициллином является аддитивное действие в отношении мультирезистентных грамположительных штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 и *Streptococcus pneumoniae* ATCC ВАА-660, в комбинации с

ампициллином аналогичных эффект достигается в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

Таблица 9 – Комбинированное тестирование образца №6 с антибиотиками классическим методом Checkerboard

Тест-культуры	МБК при раздельном тестировании		МБК при совместном тестировании		Снижение МБК, АБ/КС, разы	ФИК	Эффект комбинации
	АБ	КС, мкг/мл	АБ, мкг/мл	КС, мкг/мл			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC TA2	AMP – 1000	2,79	500	1,40	2/2	1	И
	AMX – 500		250	2,79	2/0	1,5	И
	CHL - 125		125	1,40	0/2	1,5	И
	GEN - 500		250	1,40	2/2	1	И
	OXA - 250		250	1,40	0/2	1,5	И
	TET - 1000		500	1,40	2/2	1	И
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2523	AMP - 1000	0,70	250	0,35	4/2	0,75	АД
	AMX - 1000		250	0,35	4/2	0,75	АД
	CHL – 500		500	0,35	0/2	1,5	И
	GEN – 250		125	0,35	2/2	1	И
	OXA – 1000		500	0,35	2/2	1	И
	TET - 2000		1000	0,35	2/2	1	И
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	AMP – 2000	0,70	1000	0,35	2/2	1	И
	AMX – 1000		250	0,35	4/2	0,75	АД
	CHL – 500		500	0,35	0/2	1,5	И
	GEN – 1000		500	0,35	2/2	1	И
	OXA – 250		250	0,70	0/0	2	А
	TET - 1000		500	0,35	2/2	1	И
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC ВАА-660	AMP – 2000	1,40	1000	0,70	2/2	1	И
	AMX – 2000		1000	0,70	2/2	1	И
	CHL – 1000		500	0,70	4/2	0,75	АД
	GEN – 2000		250	0,70	8/2	0,625	АД
	OXA – 1000		500	0,70	2/2	1	И
	TET -2000		1000	0,70	2/2	1	И

Примечание: «И» – индифферентность, «А» – антагонизм, «АД» - аддитивное действие, «АБ» - антибиотик, «КС» - координационное соединение иода.

Из данных, представленных в таблице 9 видно, что эффектом сочетанного действия координационного соединения иода (образец №6) с антибиотиком амоксициллином, в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 и *Escherichia coli* ATCC 2523, является аддитивное действие, то есть действие, при котором антимикробный эффект препаратов аддитивно складывается [100]. Этот же эффект наблюдается в комбинации с хлорамфениколом и гентамицином в отношении *Streptococcus pneumoniae* ATCC ВАА-660, а также с ампициллином в отношении *Escherichia coli* ATCC 2523. При всех остальных комбинациях наблюдается индифферентное (независимое) действие: эффект одного вещества никак не зависит от присутствия другого [101].

Таблица 10 – Комбинированное тестирование образца №8 с антибиотиками классическим методом Checkerboard

Тест-культуры	МБК при раздельном тестировании		МБК при совместном тестировании		Снижение МБК, АБ/КС, разы	ФИК	Эффект комбинации
	АБ	КС, МКГ/МЛ	АБ, МКГ/МЛ	КС, МКГ/МЛ			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC TA2	AMP – 1000	1,41	500	0,71	2/2	1	И
	AMX – 500		250	0,71	2/2	1	И
	CHL - 125		31	0,35	4/4	0,5	С
	GEN - 500		125	0,35	4/4	0,5	С
	OXA - 250		125	0,71	2/2	1	И
	TET - 1000		250	0,35	4/4	0,5	С
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2523	AMP - 1000	0,56	500	0,28	2/2	1	И
	AMX - 1000		250	0,28	4/2	0,75	АД
	CHL – 500		63	0,14	8/4	0,375	С
	GEN – 250		63	0,14	4/4	0,5	С
	OXA – 1000		500	0,28	2/2	1	И
	TET - 2000		250	0,14	4/4	0,375	С
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	AMP – 2000	0,71	500	0,35	4/2	0,75	АД
	AMX – 1000		250	0,35	4/2	0,75	АД
	CHL – 500		31	0,18	16/4	0,315	С
	GEN – 1000		125	0,18	4/4	0,5	С
	OXA – 256		125	0,35	2/2	1	И
	TET - 1000		250	0,18	4/4	0,5	С
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC BAA-660	AMP – 2000	0,71	500	0,35	4/2	0,75	АД
	AMX – 2000		1000	0,35	2/2	1	И
	CHL – 1000		63	0,18	16/4	0,315	С
	GEN – 2000		250	0,18	8/4	0,379	С
	OXA – 1000		500	0,35	2/2	1	И
	TET -2000		250	0,18	4/4	0,5	С

Примечание: «И» – индифферентность, «А» – антагонизм, «С» - синергизм, «АД» - аддитивное действие, «АБ» - антибиотик, «КС» - координационное соединение иода.

В результате экспериментов по установлению характера совместного антибактериального действия координационного соединения иода (образец №8) с антибиотиками – амоксициллин, ампициллин, хлорамфеникол, гентамицин, оксациллин и тетрациклин, синергетические противомикробные эффекты были выявлены с антибиотиками хлорамфеникол, гентамицин и тетрациклин, как в отношении грамотрицательных мультирезистентных штаммов – *E.coli* и *P. aeruginosa*, так и в отношении грамположительных штаммов – *S.aureus* и *S.pneumoniae*.

Одного факта наличия синергизма при сочетанном действии определённых комбинаций КС с конвенциональными антибиотиками на штаммы микроорганизмов очевидно недостаточно для создания комбинированного препарата. В связи с чем, следующие эксперименты были посвящены изучению

взаимодействия этих антибиотиков с КС методами рефрактометрии, УФ-спектроскопии и ИК-спектроскопии.

### 3.3 Изучение взаимодействия аддукта (координационного соединения) иода с антибиотиками

На начальной стадии разработки лекарственных средств следует выявлять возможные взаимодействия компонентов, чтобы прогнозировать совместимость, подбирать оптимальные составы и технологические параметры.

На рисунке 3 представлен график зависимости показателя преломления  $n_D^{20}$  от соотношения гентамицин:субстанция D1 (образец №8):

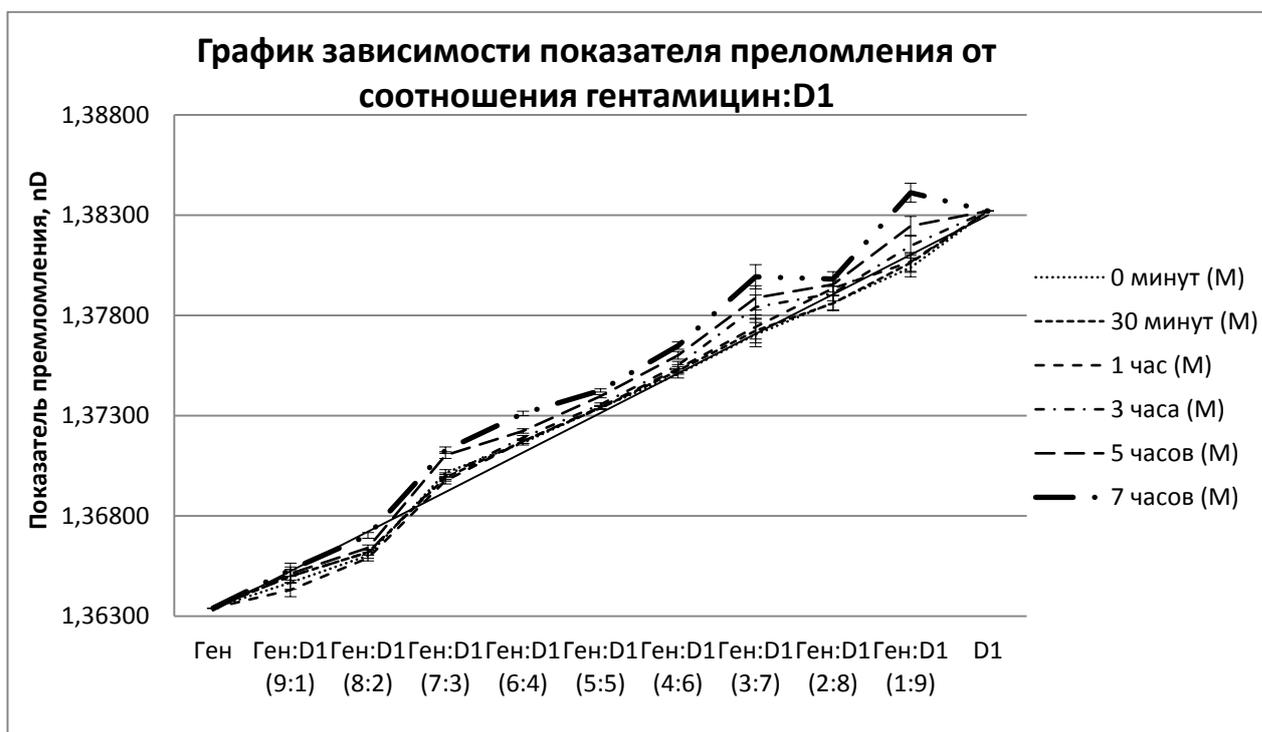
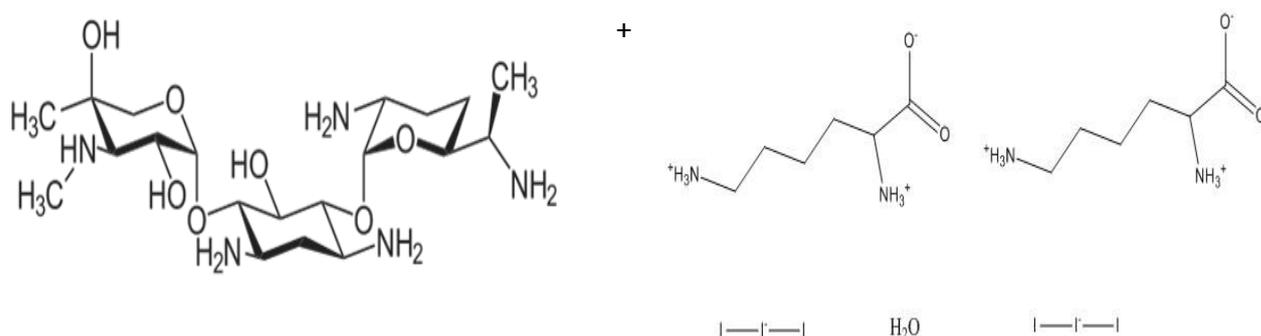


Рисунок 3 – Показатель преломления  $n_D^{20}$  для бинарных растворов гентамицин-субстанция D1 при 20 °С

На рисунке 3 видно, что кривая зависимости показателя преломления  $n_D^{20}$  от состава бинарного раствора гентамицин: субстанция D1 существенно изменяется с изменением соотношения компонентов. Изотермы данных смесей имеют заметную кривизну, характеризующуюся появлением экстремальных

точек на диаграмме рефракционных свойств, что говорит об отклонении этих свойств от аддитивности.

На изотермах показателя преломления экстремальные точки появляются при соотношении бинарной смеси гентамицин: субстанция D1 8:2, 7:3, 3:7 и 1:9, что может свидетельствовать об диссоциации одного или обоих компонентов в образовавшейся смеси.

На рисунке 4 представлен график зависимости показателя преломления  $n_D^{20}$  от соотношения тетрациклин: субстанция D1 в соотношениях 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9

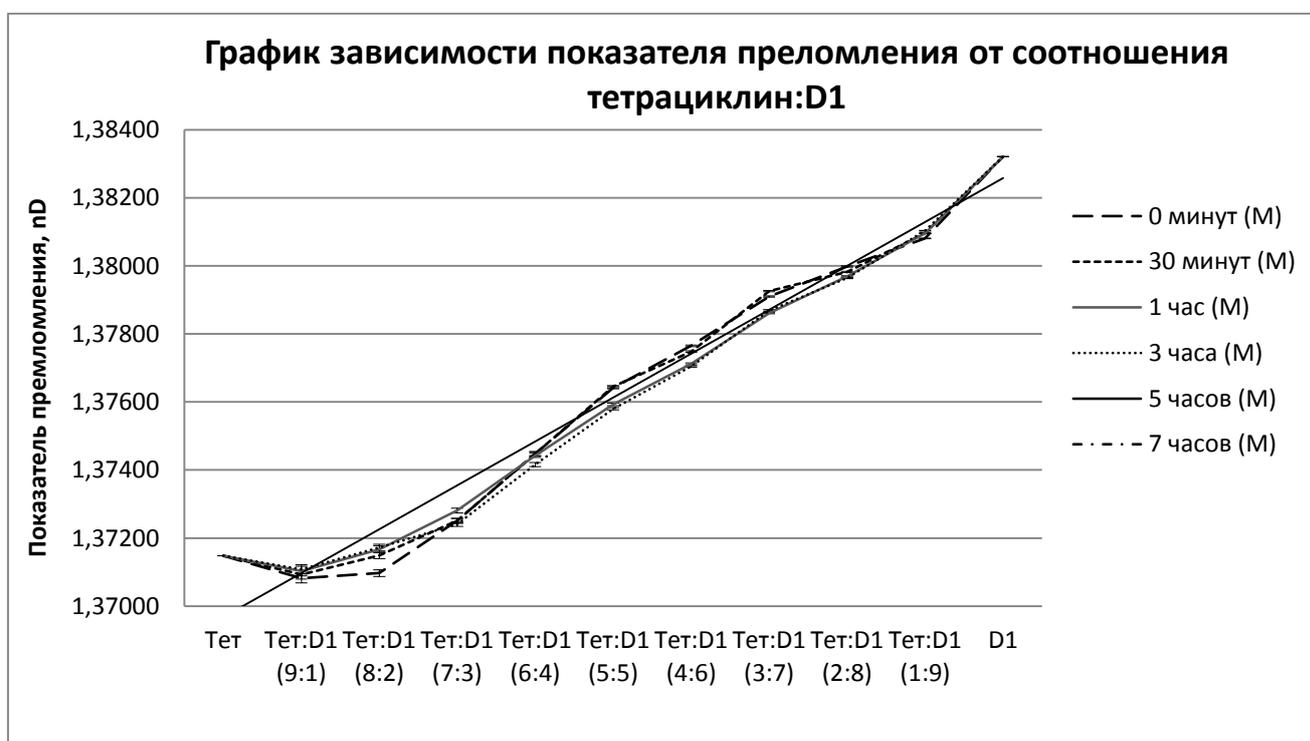
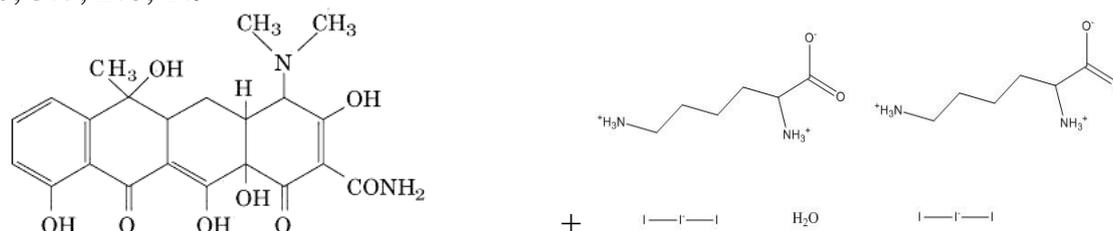


Рисунок 4 - Показатель преломления  $n_D^{20}$  для бинарных растворов тетрациклин-субстанция D1 при 20 °С

На рисунке 4 видно, что изотермы соотношения данных компонентов имеют отклонения рефракционных свойств от аддитивности. Так, при смешении бинарной смеси тетрациклин: субстанция D1 в соотношениях от 9:1 до 6:4, наблюдалось выпадение хлопьевидного осадка, что также характеризуется кривизной изотерм показателя преломления данных соотношений. В целом, форма изотермы близка к S-образной, что также может говорить о протекающих процессах в системе и образующихся в данной системе новых соединений или ассоциаций.

На рисунке 5 представлен график зависимости показателя преломления  $n_D^{20}$  от соотношения хлорамфеникол:субстанция D1:

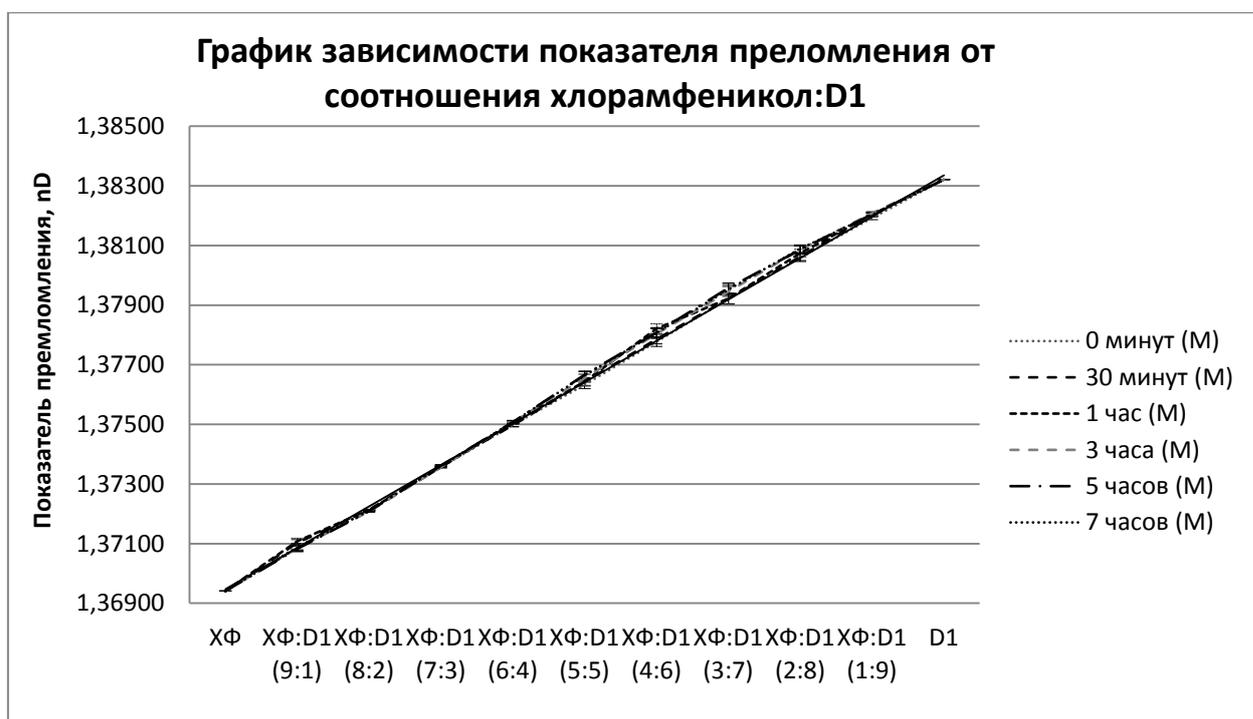
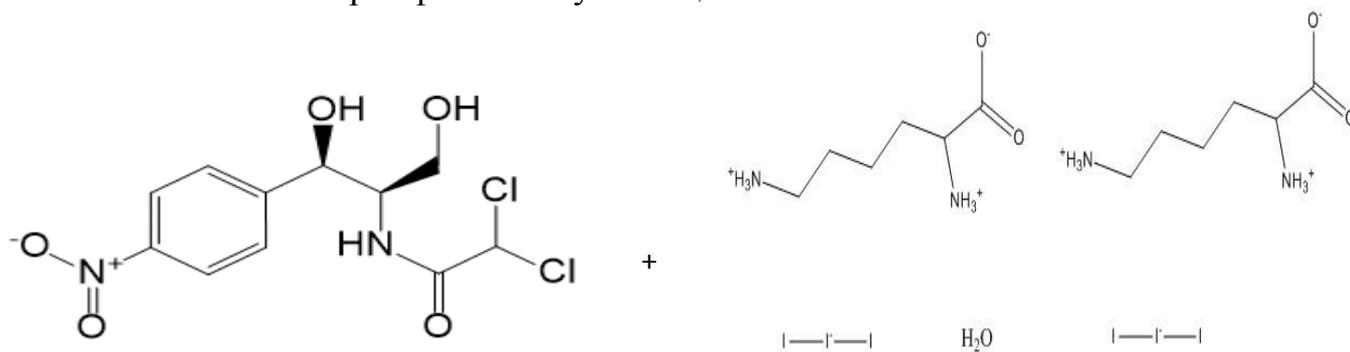


Рисунок 5 – Показатель преломления  $n_D^{20}$  для бинарных растворов хлорамфеникол:субстанция D1 при 20 °С

На рисунке 5 видно, что кривая зависимости показателя преломления  $n_D$  от состава бинарного раствора хлорамфеникол-аддукт иода имеет незначительную кривизну, где изменение  $n_D^{20}$  от состава достоверно ( $p < 0,005$ ) не отличается от линейного хода. Изотермы данных смесей относятся к аддитивному типу (прямолинейны), что говорит об отсутствии химического взаимодействия данной системы [102].

Дальнейшие исследования методами УФ-спектроскопии и ИК-спектроскопии проводили только с субстанцией хлорамфеникола.

Отсутствие взаимодействия между антибиотиком хлорамфениколом и аддуктом иода также изучалось методом УФ-спектроскопии, так как оба компонента поглощают свет в видимой и ультрафиолетовой областях спектра.

На рисунке 6 представлены спектры поглощения водного раствора субстанции аддукта йода.

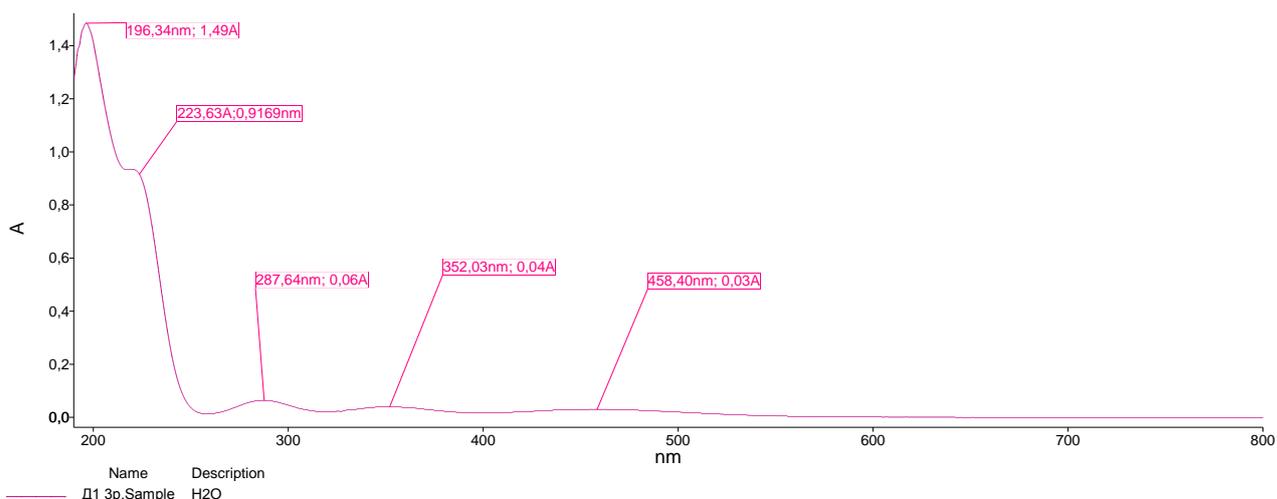


Рисунок 6 - УФ спектр субстанции D1

В электронном спектре 0,1 %-ного водного раствора субстанции D1 имеются полосы поглощения с  $\lambda_{\text{max}} \sim 194 \div 197$ ;  $225 \div 230$ ;  $283 \div 286$ ;  $345 \div 353$ ;  $453 \div 459$  нм, соответствующие формам йода.

На рисунке 7 представлены спектры поглощения 0,1 %-ного водного раствора хлорамфеникола.

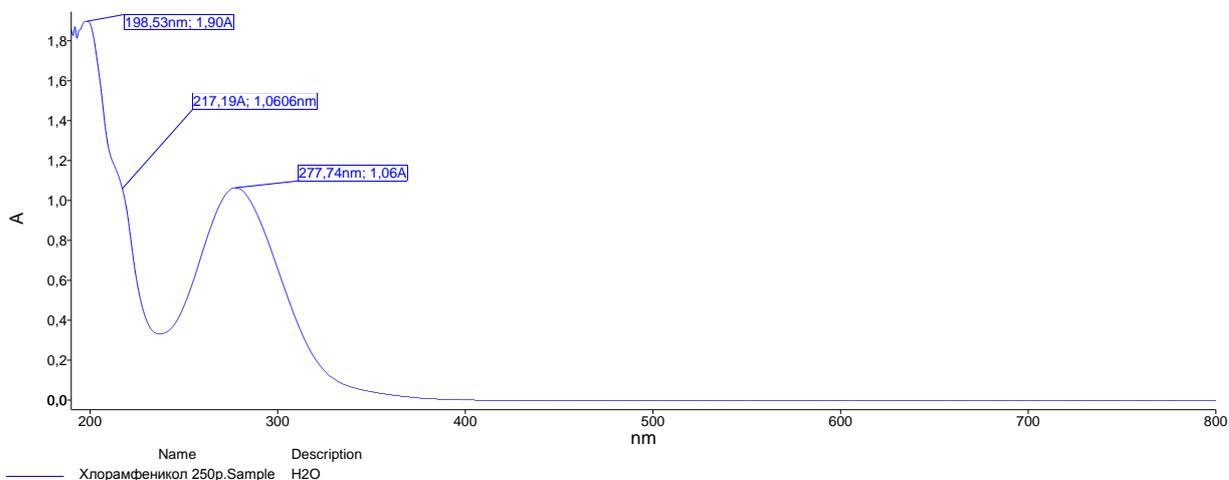


Рисунок 7 – УФ-спектр хлорамфеникола

Ультрафиолетовый спектр поглощения раствора в области длин волн от 230 до 350 нм имеет максимум при 278 нм.

На рисунке 8 представлен УФ-спектры поглощения смеси субстанции хлорамфеникола и субстанции D1 в диапазоне от 190 нм до 500 нм.

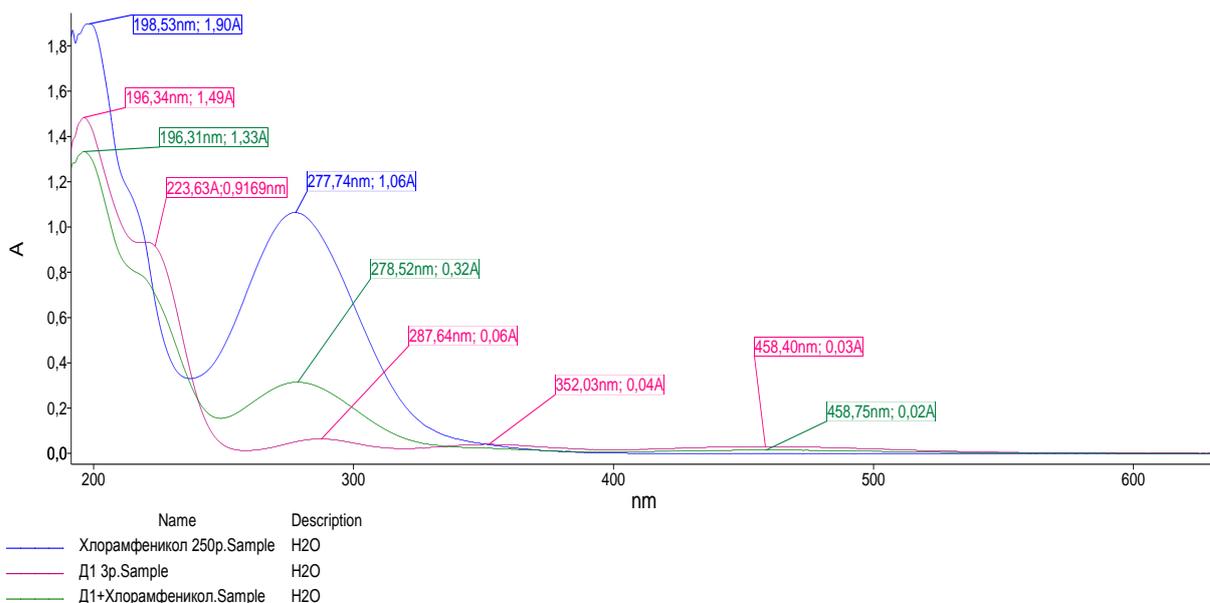


Рисунок 8 – УФ-спектр смеси хлорамфеникол:субстанция Д1 в соотношении 1:1 (область 190-500 нм)

В композиции хлорамфеникол + субстанция Д1 в соотношении 1:1 сохраняется пик, характерный для хлорамфеникола 278 нм, что свидетельствует об отсутствии комплексообразования между данными веществами. В бинарной смеси также видны УФ-пики, характерные для субстанции Д1: пики 196,34 нм и 223,63 нм для (Г), пик 352,03 нм для оксианиона (Ю<sup>-</sup>), пик 458,40 нм для  $n \cdot H_2O[I^+ \dots I^-]$ .

Изучены колебательные ИК-спектры исследуемых веществ. На рисунках 9-10, а также в таблице 10 приведены спектральные характеристики субстанции хлорамфеникола и смеси хлорамфеникол+субстанция Д1: волновое число полосы ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ), отнесение полосы. Для отнесения спектральных полос использована литература [16].

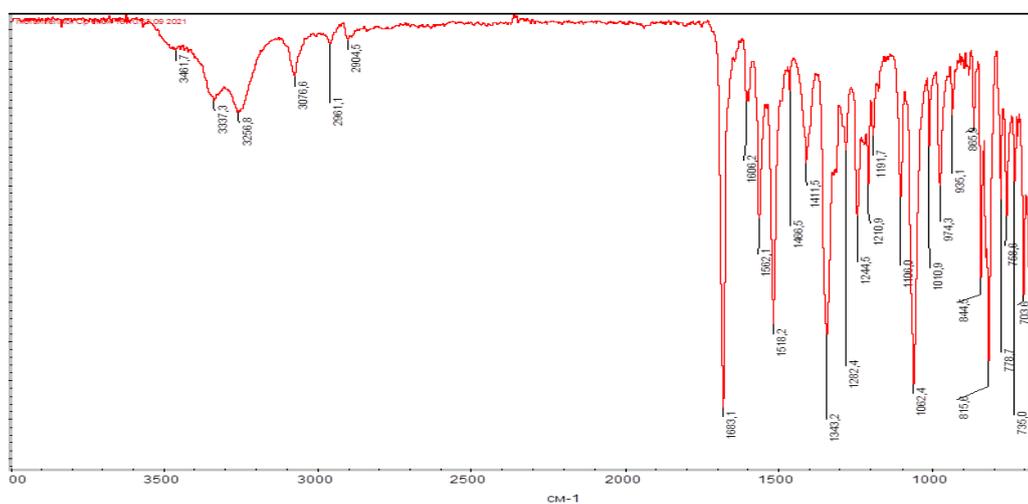


Рисунок 9 – ИК-спектр хлорамфеникола

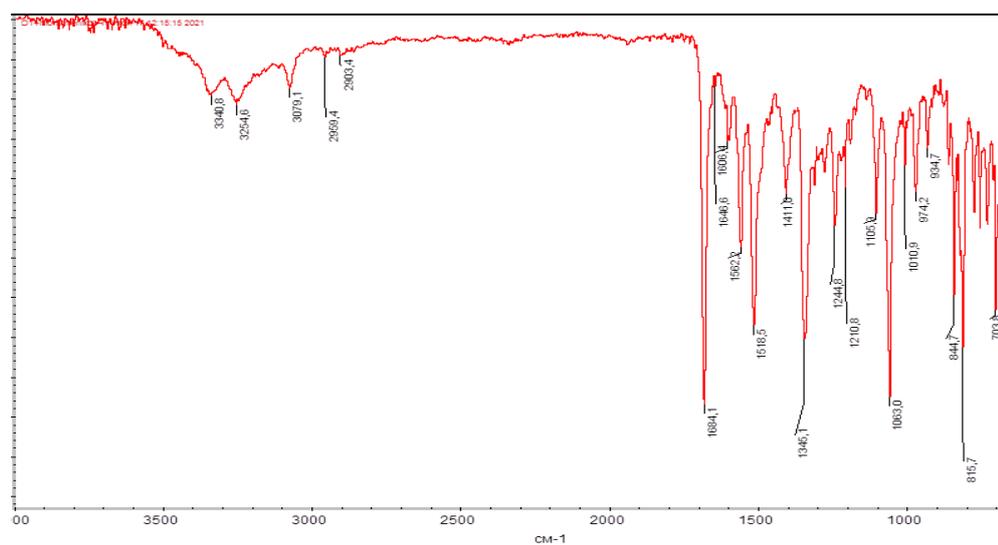


Рисунок 10 – ИК-спектр смеси хлорамфеникол:субстанция D1 в соотношении 1:1

Таблица 11 - Спектральные характеристики субстанции хлорамфеникола и смеси хлорамфеникол+субстанция D1

Номер полосы	Полоса, см <sup>-1</sup> , хлорамфеникол	Полоса, см <sup>-1</sup> , хлорамфеникол + субстанция D1	Отнесение
1	3337,3	3340,8	3460-3300, $\nu$ -NH
2	3256,8	3254,6	$\nu_s$ -OH
3	3076,6	3079,1	Аромат. $\delta$ – CH
4	2961,1	2959,4	$\delta_{as}$ CH <sub>2</sub>
5	2904,5	2903,4	$\delta_s$ CH <sub>2</sub>
6	1683,1	1684,1	C=O
7	1562,1	1562,2	C=C
8	1518,2	1518,5	1550-1485, $\delta$ -NH
9	687,4	688,3	C-Cl

ИК-спектры субстанции хлорамфеникола и бинарной смеси хлорамфеникол+субстанция D1 содержат группы, характерные для хлорамфеникола. Так, имеются пики поглощения 3337,3 см<sup>-1</sup> и 3256,8 см<sup>-1</sup> для хлорамфеникола и 3340,8 см<sup>-1</sup> и 3254,6 см<sup>-1</sup> для смеси хлорамфеникола+субстанция D1, отнесенные к валентным колебаниям O-H и N-H связей, соответственно. Пик поглощения 3076,6 см<sup>-1</sup> (хлорамфеникол) и 3079,1 см<sup>-1</sup> (хлорамфеникол+субстанция D1) отнесен к колебаниям химической связи – CH. Частота валентного колебания связей C=O и C=C соответствует 1683,1 и 1562,1 см<sup>-1</sup> для хлорамфеникола и 1684,1 и 1562,2 см<sup>-1</sup> для бинарной смеси, соответственно. Далее, валентные колебания  $\delta$  -NH и C-Cl наблюдали при 1518,0 см<sup>-1</sup> и 687,4 см<sup>-1</sup> отдельно для хлорамфеникола 1518,5 см<sup>-1</sup> и 688,3 см<sup>-1</sup> для изучаемой бинарной смеси, соответственно. Схожесть полученных спектров

хлорамфеникола со спектрами смеси D1+хлорамфеникол свидетельствует о том, что композиция не является новой структурой с химическим типом взаимодействия.

Таким образом, совокупность результатов спектральных методов исследования позволяет предположить, что в исследуемой бинарной системе - субстанция D1 и антибиотик хлорамфеникол, отсутствуют данные о возможном комплексообразовании. Основные функциональные группы сохраняются при исследовании, как методом УФ-, так и ИК-спектроскопии. Методом рефрактометрии доказано, что изотермы данных смесей относятся к аддитивному типу (прямолинейны), что также говорит об отсутствии химического взаимодействия данной системы.

### 3.4 Синтез и описание субстанции D1

#### 3.4.1 Синтез субстанции D1

Синтез субстанции D1 проводили по схеме указанной на рисунке 11.

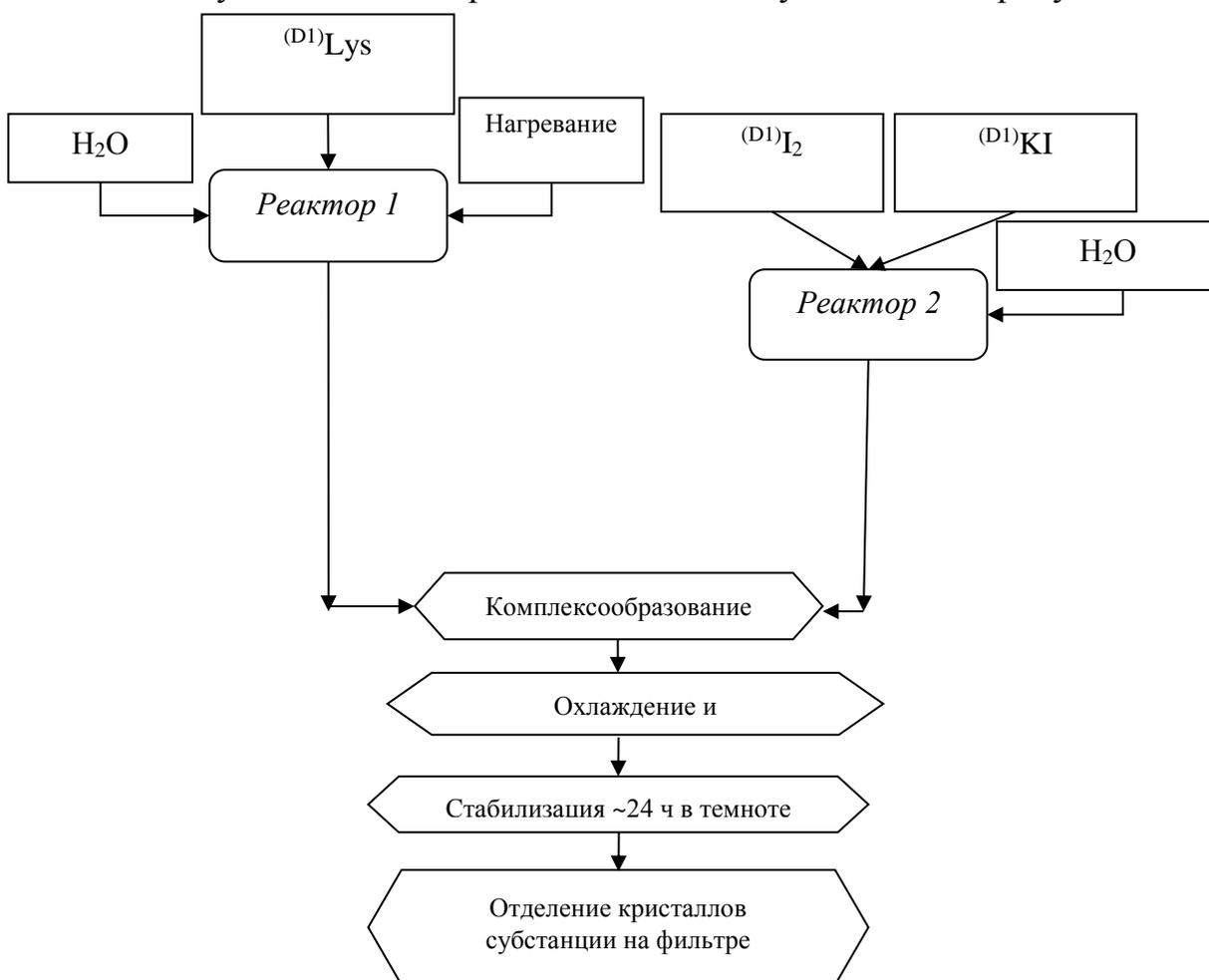


Рисунок 11 – Схема синтеза субстанции «D1»

Навеску (24,0 г) лизина гидрохлорида растворяли в 300 мл воде очищенной, при нагревании до 60 °С. Навеску (30,0 г) иодида калия и навеску (30,0 г) иода

растворяли в 400 мл воды очищенной, при интенсивном перемешивании. К полученному раствору добавляли горячий водный раствор лизина гидрохлорида ( $t \sim 50 \pm 10^\circ\text{C}$ ). Полученную реакционную смесь закрывали крышкой и перемешивали при скорости  $600 \pm 100$  об/мин, медленно остужая до комнатной температуры  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ . Через  $200 \pm 20$  минут полученный полупродукт помещали в тёмное место и выпаривали при комнатной температуре до полного улетучивания растворителя (воды). Все операции синтеза проводили при определенных и контролируемых условиях. Таким образом, были получены 3 серии субстанции D1 (01110517, 02180517, 03250517), которые в дальнейшем исследовали различными методами. Выход субстанции D1 составил – 97 %.

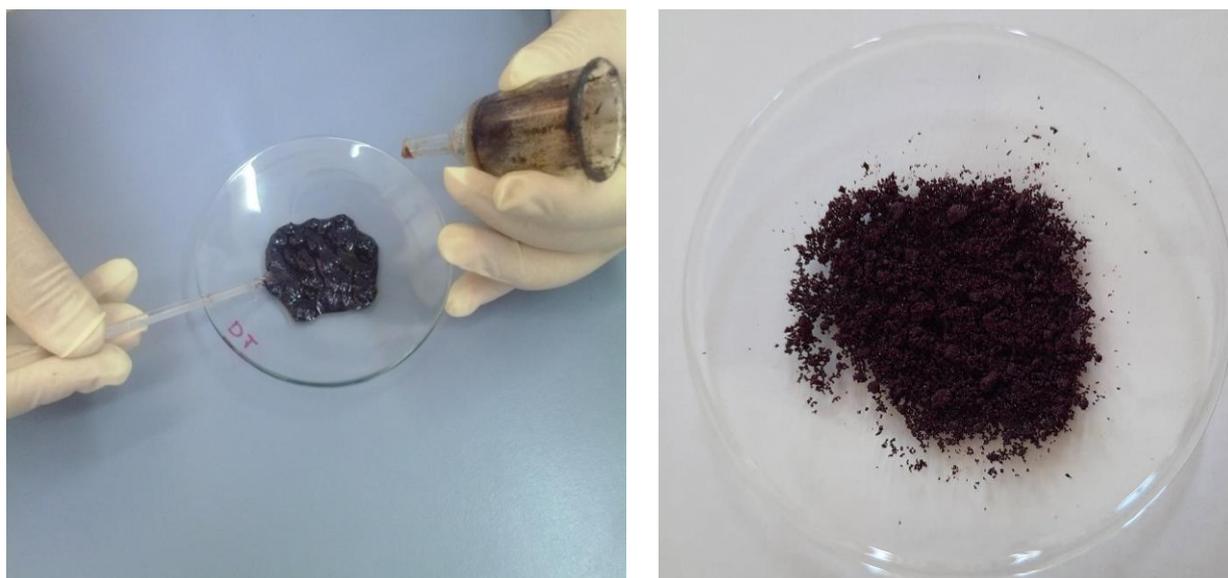


Рисунок 12 – Стадии синтеза субстанции D1

Субстанция D1 представлены монокристаллами. На следующем этапе изучены физико-химические, фармако-технологические параметры, также методом рентгеновской дифракции (РСА) изучена структура полученных монокристаллов.

### **3.4.2 Рентгенографический и рентгеноструктурный анализ субстанции D1**

#### **3.4.2.1 Рентгенографическое исследование субстанции D1**

Из визуального анализа рентгенограммы следует, что порошок комплекса представляет собой смесь рентгеноаморфной и хорошо кристаллизованной составляющих. Из количественного анализа следует, что исследуемый образец включает в состав 61% аморфной и 39% кристаллической составляющих. Природа аморфной составляющей исследуемых комплексных соединений пока остается открытой.

Обработанные по методу Ритвельда рентгенограммы с отмеченными на них порядковыми номерами дифракционных максимумов образца приведены на рисунке 13.

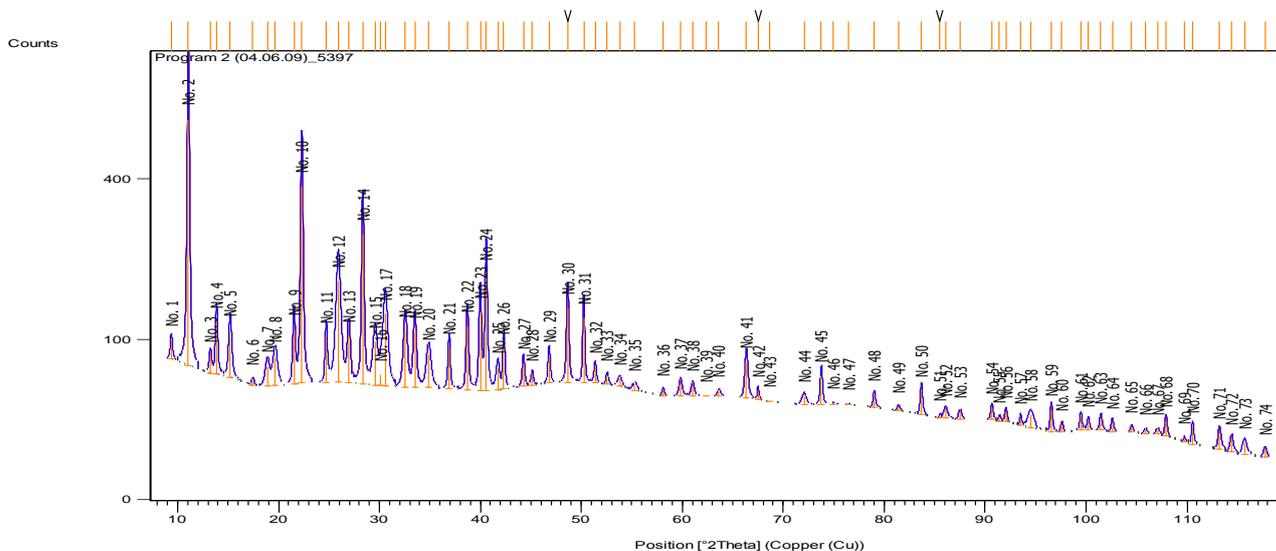


Рисунок 13 – Рентгенограмма субстанции D1, обработанная по Ритвельду

### 3.4.2.2 Рентгеноструктурный анализ субстанции D1

Структура кристаллической составляющей была определена методом РСА. Структура субстанции D1 была зарегистрирована в Кембриджском банке кристаллографических данных (CCDC) (Приложение А). Монокристаллы для РСА выращивали концентрированием раствора в кристаллизаторе над осушителем  $\text{CaCl}_2$ . Из водных растворов системы Лизин гидрохлорид – иодид калия – иод выделялись только кристаллы комплекса  $2[\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2]^+\cdot 2\text{I}_3^-\cdot \text{H}_2\text{O}$  вне зависимости от мольного соотношения исходных компонентов, которые меняли от 1:1:1 до 2:1:1 ( $\text{Lys}\cdot\text{HCl}:\text{KI}:\text{I}_2$ ).

Структура содержит две молекулы лизина, две молекулы  $\text{HI}_3$  и одну молекулу воды  $\text{H}_2\text{O}$  (рисунок 15). Помимо того, что молекулы лизина находятся в цвитер ионной форме, они еще захватывают протон у  $\text{HI}_3$ , превращаясь в положительно заряженный катион  $[\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2]^+$  и отрицательно заряженный полианион  $\text{I}_3^-$ . Таким образом, в молекуле лизина оба атома азота становятся четверичными, а положительный заряд на них компенсируется отрицательным зарядом карбоксигруппы лизина и полианионом трийодида (рисунок 15). Межатомные расстояния в кристаллической структуре комплекса приведены в таблице 12.

Таблица 12 - Основные межатомные расстояния в структуре субстанции D1

Атомы	Расстояние	Атомы	Расстояние
I1-I2	2.9831(9)	C8-H8B	0.9700
I2-I3	2.8471(9)	C9-H9B	0.9700
I4-I5	2.9737(8)	C9-H9A	0.9700

I5-I6	2.8649(9)	N15-C11	1.496(7)
O3-C2	1.239(7)	N20-C19	1.475(8)
O4-C2	1.259(6)	C11-C12	1.542(7)
N5-C1	1.496(7)	C11-C16	1.518(7)
N10-C9	1.489(8)	N15-H15C	0.8900
C1-C6	1.521(7)	N15-H15A	0.8900
C1-C2	1.533(7)	N15-H15B	0.8900
N5-H5B	0.8900	C16-C17	1.523(8)
N5-H5A	0.8900	C17-C18	1.526(8)
N5-H5C	0.8900	C18-C19	1.523(8)
C6-C7	1.528(7)	N20-H20B	0.8900
C7-C8	1.516(8)	N20-H20C	0.8900
C8-C9	1.499(8)	N20-H20A	0.8900
N10-H10A	0.8900	C11-H11	0.9800
N10-H10C	0.8900	C16-H16A	0.9700
N10-H10B	0.8900	C16-H16B	0.9700
O13-C12	1.240(7)	C17-H17A	0.9700
O14-C12	1.257(6)	C17-H17B	0.9700
C1-H1	0.9800	C18-H18B	0.9700
C6-H6A	0.9700	C18-H18A	0.9700
C6-H6B	0.9700	C19-H19A	0.9700
C7-H7B	0.9700	C19-H19B	0.9700
C7-H7A	0.9700	O1W-H1W	0.801(19)
C8-H8A	0.9700	O1W-H2W	0.80(2)

В трехмерной упаковке кристаллическую структуры молекулы лизина связываясь N-H...O водородными связями образуют гофрированные слои параллельно плоскости (001) (рисунок 14).

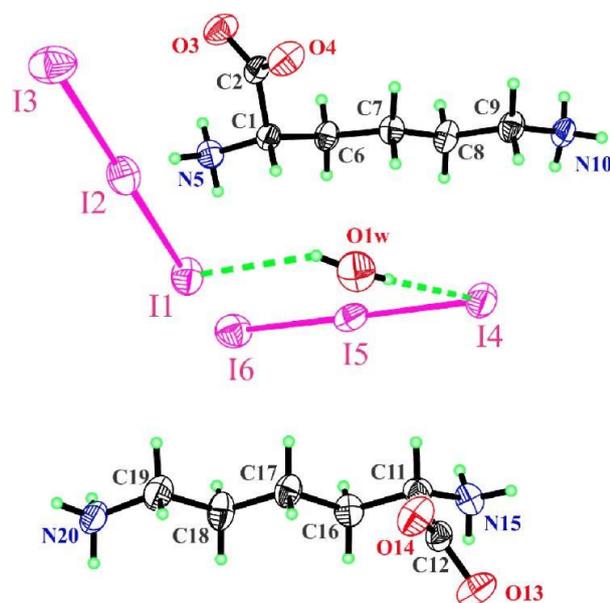


Рисунок 14 - Атомная модель структуры  $2C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2H_3 \cdot H_2O$ . Эллипсоиды анизотропных тепловых колебаний проведены на уровне 50 %-ой вероятности.

Молекулы воды и водородными связями связывают пару полианионов трийодида и вместе с ними заполняют пространство между гофрированными слоями из молекул лизина (рисунок 15).

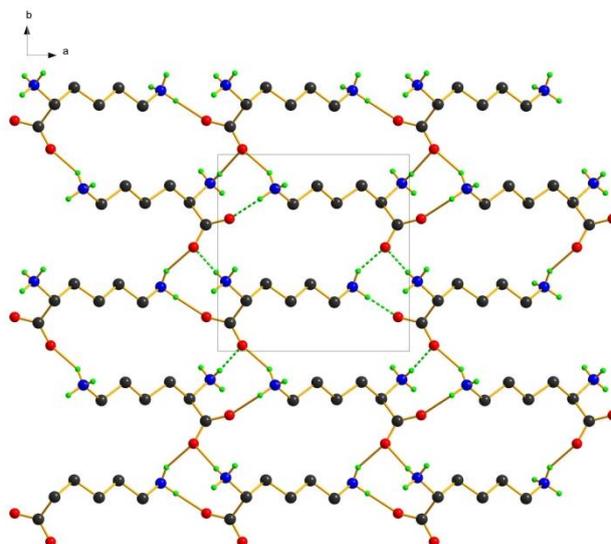


Рисунок 15 - Слой структуры, образованный молекулами лизина, связанных водородными связями.

На рисунке 16 показано чередование гофрированных плоскостей из молекул лизина и полианионов трийодида. Так как в структуре молекулы лизина являются положительно заряженными, а полианионы трийодида отрицательно заряженными, образуется сэндвичеобразная структура с чередующимся в направлении  $[001]$  положительно и отрицательно заряженными слоями.

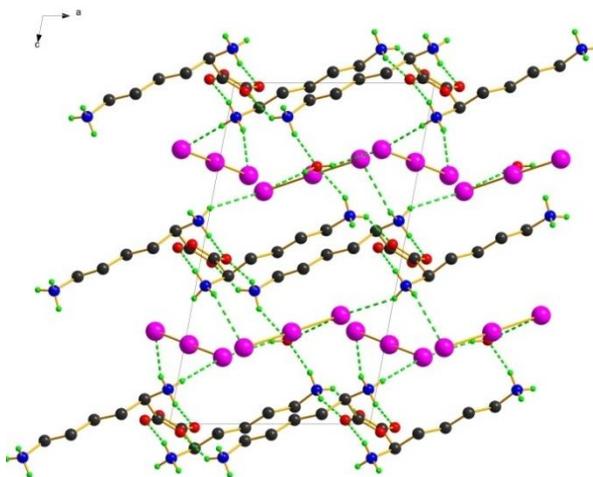


Рисунок 16 - Проекция структуры на плоскость (индекс Миллера (001))

### 3.5 Изучение технологических характеристик субстанции D1

Технологические свойства фармацевтической субстанции определяют рациональный состав и технологию получения лекарственных форм. Технологические свойства определяют технологические схемы и условия рациональной разработки лекарственных форм, обеспечивающие наименьшие затраты и потери для производителей изготавливаемой лекарственной формы [87, с.50]

Одной из основных характеристик сухих субстанций является их сыпучесть. Сыпучесть субстанций можно оценить по величине коэффициента Хауснера, относящейся к определению насыпной и истинной плотности.

В таблицах 13 представлены результаты основных технологических характеристик субстанций D1.

Таблица 13 – Технологические параметры субстанции D1

Показатель	Номер серии		
	01110517	02180517	03250517
Насыпная плотность, г/см <sup>3</sup>	0,8547	0,8732	0,8612
Истинная плотность, г/см <sup>3</sup>	0,9401	0,9805	0,9854
Коэффициент Хауснера	1,18	1,26	1,23
Сыпучесть, г/сек	1,35	1,33	1,26
Размер частиц, мкм	54,72	56,45	55,36
Форма частиц	удлиненная линейная трапецевидная форма		

Субстанция D1 обладает оптимальными фармако-технологическими характеристиками, в том числе сыпучестью, о чем свидетельствуют данные таблицы 13. Так, показатель, характеризующий насыпную плотность для всех трех серий субстанции D1 находится в диапазоне от 0,85 г/см<sup>3</sup> до 0,87 г/см<sup>3</sup>, показатель истинной плотности не превышает 0,99 г/см<sup>3</sup>. Коэффициент Хауснера соответствует значениям 1,18, 1,26 и 1,23 для трех серий субстанции, соответственно. Показатель сыпучести субстанции находится в прелелах от 1,26 до 1,35 г/сек, а размер частиц не превышает 57 мкм.

Форма и размер частиц изучены с помощью микроскопа Leica DM 2500 и программного обеспечения Leica Application Suite.

На рисунке 17 представлены снимки частиц субстанции D1.

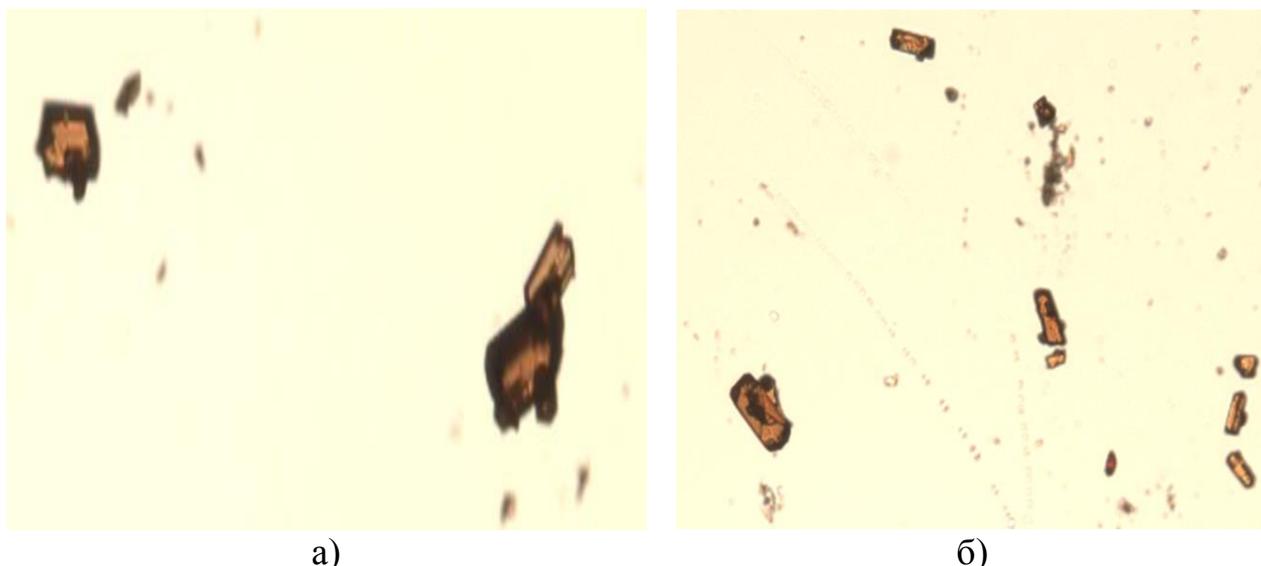


Рисунок 17 - Частицы субстанции D1: а) - ув.х20, б) ув.х10

Как видно из рисунка субстанция D1 имеет удлиненную форму прямоугольников или трапеций

Результаты изучения гигроскопичности субстанции D1 представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты исследования гигроскопичности исследуемых серий субстанции D1

Серия/ Период	Количество поглощенной влаги, %		
	01110517	02180517	03250517
Определение влагопоглощения в условиях максимальной влажности			
0	0,000	0,000	0,000
5	0,287	0,293	0,291
24	1,456	1,935	1,483
48	2,562	2,942	2,735
72	3,877	3,569	4,213
96	4,866	4,826	5,021
168	5,752	5,923	5,862
Определение влагопоглощения в условиях комнатной влажности			
0	0,000	0,000	0,000
48	0,009	0,013	0,019
72	0,024	0,022	0,033
96	0,032	0,039	0,048
120	0,037	0,054	0,053
144	0,0427	0,057	0,067
168	0,0480	0,061	0,069

Как видно из результатов, представленных в таблице 14, значения водопоглощения при рабочей влажности составляют 60-75 %, тогда как при максимальной влажности величина водопоглощения достигает 98-100 %. В результате проведенного исследования гигроскопичности, установлено, что в условиях рабочей влажности скорость поглощения влаги составляет 0,05 % в

сутки, а в условиях максимальной влажности исследуемая субстанция поглощает влагу со средней скоростью 1 % в сутки.

### 3.6 Разработка оптимальной технологии получения субстанции D1

Технологическая схема получения субстанции аддукта иода (D1) представлена на рисунке 18.

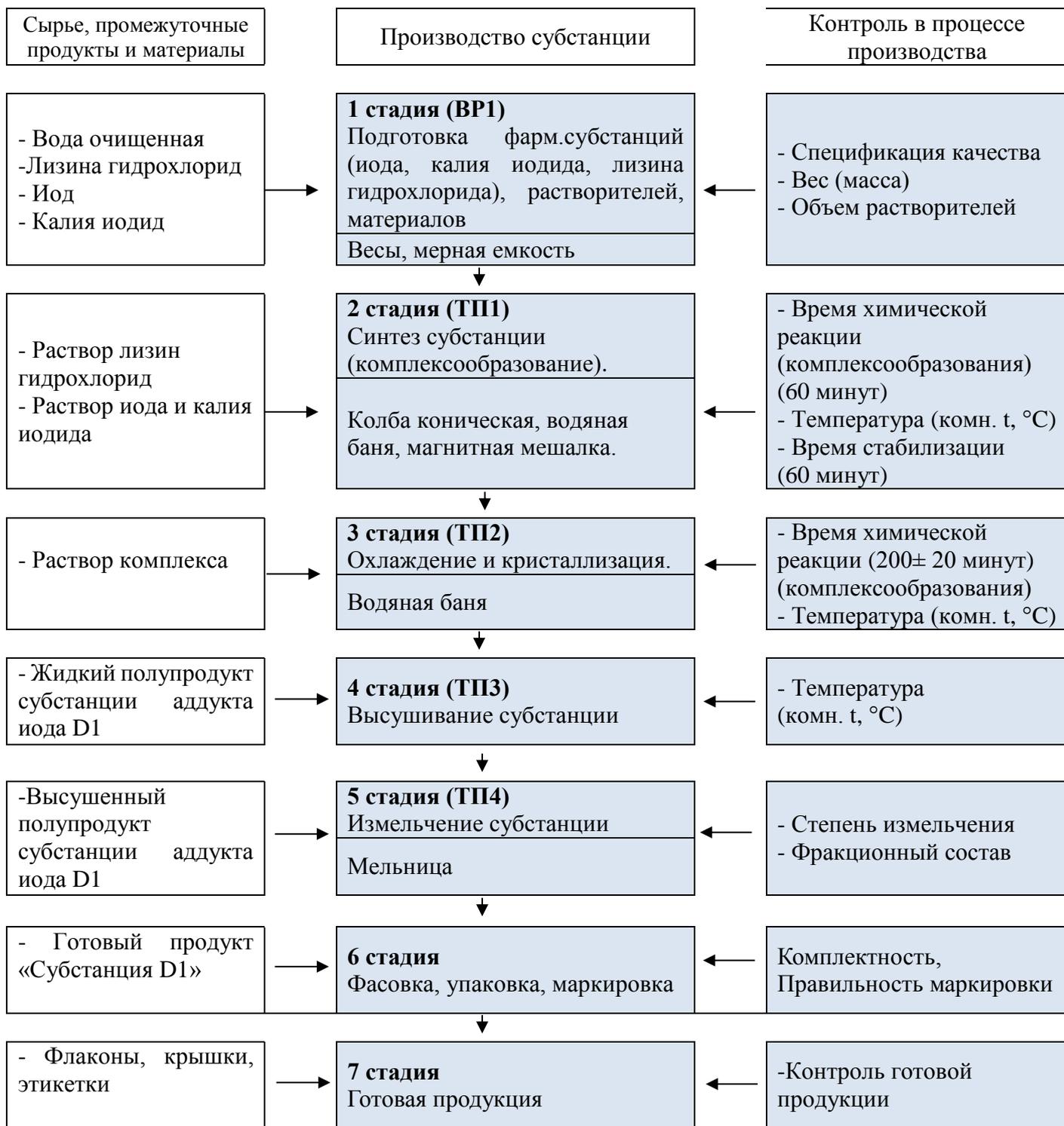


Рисунок 18 - Технологическая схема синтеза субстанции D1

## ***Стадии подготовительных работ***

### *Стадия 1*

*Подготовка очищенной воды:* воду очищенную получали с помощью системы водоподготовки, основанной на обратном осмосе и фильтрационной очистке. Спецификация качества воды очищенной: проводимость не более 1,1 мкСм/см при 20 °С, ТОС не более 0,5 мг/л, бактерии не более 50 КОЕ/мл. Для получения используется вода водопроводная. Система очистки воды, состоящая из последовательно расположенных: фильтра очистки от механических примесей А 5310, угольного фильтра АКФ 300, ионообменной колонки Rondomat E 50 DWZ, блока обратного осмоса UO 150 и блока УФ дезинфекции Bwades 58С, все производства компании BWT (Германия) [87, с.54].

### *Стадия 2*

*Подготовка рабочих растворов.*

*Подготовка раствора лизина гидрохлорида.* Плоскодонную стеклянную колбу объемом 1000 мл заполняли 300 мл воды очищенной, в которой растворяли 24,0 г лизина гидрохлорида. Раствор перемешивали в течение 60 мин в условиях комнатной температуры.

*Подготовка раствора калия иодида и иода.* Навеску иодида калия (30,0 г) и иода (30,0 г), поместили в колбу, добавили воду очищенную в объеме 400 мл и тщательно перемешивали до полного растворения иода при комнатной температуре.

## ***Стадии технологического процесса***

### *Стадия 3*

К раствору лизина гидрохлорида добавляли раствор калия иодида и иода. Перемешивали в течение 60 минут при комнатной температуре.

### *Стадия 4*

Образовавшийся раствор темно-фиолетового цвета (жидкий полупродукт) переносили из колбы во фторопластовые поддоны и высушивали при температуре не выше 35 °С.

### *Стадия 5*

Продукт, полученный на стадии 4, подвергали измельчению в мельнице.

## ***Стадии упаковки, маркировки, отгрузки***

### *Стадия 6*

Продукт, полученный в ходе измельчения на стадии 5 фасовали во флаконы из темного стекла объемом 50 мл с капроновой пробкой и завинчивающейся полипропиленовой крышкой. Хранили при комнатной температуре в защищенном от света месте.

### *Стадия 7*

Отпуск готовой продукции субстанции аддукта иода под кодовым названием (субстанция D1).

Стабильность лекарственных средств во многом зависит от химического состава и свойств упаковочного материала. Выбор стеклянных флаконов обусловлен тем, что как упаковочный материал они индифферентны по отношению ко многим лекарственным веществам. В герметичной упаковке

стекло предохраняет лекарственное средство от воздействия содержащейся в окружающей атмосфере влаги, кислорода и т.д. [87, с. 54]

Для защиты от влияния ультрафиолетового излучения при хранении светочувствительных субстанций используют темное стекло. Так как субстанция D1 содержит иод, использовали первичную упаковку из темного стекла, предохраняющего лекарственное средство от фотохимического разложения.

Результаты испытаний стабильности субстанция D1 демонстрируют совместимость препарата с материалом упаковки, поскольку после их контакта качество препарата изменяется в пределах установленных норм по показателям: рН, относительная плотность, относительная вязкость, количественное содержание действующих веществ (иод) [103].

Результаты данных исследований легли в основу разработки спецификации качества и НД по контролю качества лекарственного средства. Контроль качества полученных серий субстанции D1 изучали каждые 3 месяца до 1 год и каждые 6 месяцев после 1 года хранения (таблица 15).

Таблица 15 – Характеристики лабораторных серий субстанции D1 для исследования стабильности

№ серии	Дата производства	Периодичность исследования, мес
01110517	11.05.2017 г.	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24.
02180517	18.05.2017 г.	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24.
03250517	25.05.2017 г.	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24.

Рассчитан материальный баланс этапов получения фармацевтической субстанции D1 (таблица 16).

Таблица 16 – Материальный баланс процесса синтеза субстанции D1 в расчете на получение 1 кг продукта

Израсходовано			Получено		
Наименование сырья и полупродуктов	Значение		Наименование конечного продукта	Значение	
	г	мл		г	мл
1	2	3	4	5	6
Стадия ВР 2.1					
Вода очищенная	100,0		Раствор лизин гидрохлорида	122,5	
			Механические неучтенные потери	2,0	
Лизина гидрохлорид	24,0		-	-	
Сумма	124,5			124,5	
Выход: 98 %					
Стадия ВР 2.2					

Израсходовано			Получено		
Наименование сырья и полупродуктов	Значение		Наименование конечного продукта	Значение	
	г	мл		г	мл
1	2	3	4	5	6
Вода очищенная	600,0		Раствор иод+калий иод	657,2	
Иодид калия	30,0		Механические неучтенные потери	2,8	
Иод	30,0		-	-	
Сумма	660,0			660,0	
Выход: 98%					
<i>Стадия ТП 1</i>					
Раствор лизин гидрохлорида	124,5		Субстанция D1	752,2	
Раствор иод+калий иод	657,2		Механические неучтенные потери	23,5	
Сумма	781,7			775,7	
Выход: 98,0%					
Всего: расход реагентов – 781,7 г, получено продукта – 775,7 г. Выход: 775,7 г. *100/ 781,7 = 99,2 %					

### 3.7 Изучение физико-химических свойств субстанции D1

Определение подлинности субстанции D1 проводили визуально и при помощи спектральных методов.

#### *Изучение органолептических свойств*

В органолептический анализ входит описание внешнего вида (физического состояния), цвета и запаха субстанции. Описание субстанции проводили, согласно ГФ РК, статья «Субстанции». [82, с.542]. Запах субстанций определяют, согласно ГФ РК 2.3.4 [82, с. 120].

Субстанция D1 представляет собой порошок темно-фиолетового цвета с запахом иода (рисунок 19).



Рисунок 19 - Внешний вид субстанции D1

Результаты изучения органолептических свойств субстанции D1 представлены в таблице 17.

Таблица 17 - Органолептический анализ разных серий субстанции D1

Параметр	Описание	01110517	02180517	03250517
Вид	Кристаллический порошок	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Цвет	Темно - фиолетового цвета с металлическим блеском	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Запах	Иода	Соотв.	Соотв.	соотв.

Проведённые исследования органолептических свойств показали, что все серии субстанции обладают идентичными свойствами.

Растворимость субстанции D1 определяли в воде очищенной, полярных и неполярных растворителях согласно ГФ РК, т. 1 [82, с. 25]. Результаты изучения показателя растворимости субстанции D1 представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Растворимость субстанции D1 в растворителях различной полярности

Наименование растворителей	Индекс полярности P'	Серия субстанция D1		
		01110517	02180517	03250517
Вода	10,2	P	P	P
ДМСО	7,2	P	P	P
Ацетон	5,1	P	P	P
Этанол	4,3	P	P	P
Циклогексан	0,04	P	P	P
Примечание: «P» - растворим				

Из данных таблицы 17 видно, что субстанция D1 хорошо растворяется в различных растворителях (шкала полярности от 0,04 до 10,2). Процесс растворения сопровождается образованием интенсивной темно-синей окраской.

*Идентификация субстанции D1 методом ИК-спектроскопии*

ИК-спектроскопия один из основных методов исследования веществ различной химической природы, в том числе и лекарственных соединений. ИК-спектр химического соединения является одной из его наиболее важных характеристик [104-108].

В исследовании ИК-спектр каждой серии субстанции аддукта иода записаны данные классическим методом сканирования.

Изучения механизма взаимодействия реагирующих компонентов в ходе образования аддуктов иода проведено методом молекулярной ИК-спектроскопии в диапазоне частот от 650 до 4000 см<sup>-1</sup>.

По ИК-спектру субстанцию аддукта иода можно идентифицировать, определив наличие ряда полос поглощения в диапазонах от 550 до 4000 см<sup>-1</sup>.

Измерения ИК-спектров исследуемых лекарственных субстанций проводили при помощи ИК-спектрометра с Фурье-преобразованием «NICOLET

6700» фирмы «Thermo scientific», с приставкой SMART PERFORMER с использованием кристалла ZnSe. ИК-спектры субстанции D1 представлены на рисунке 20.

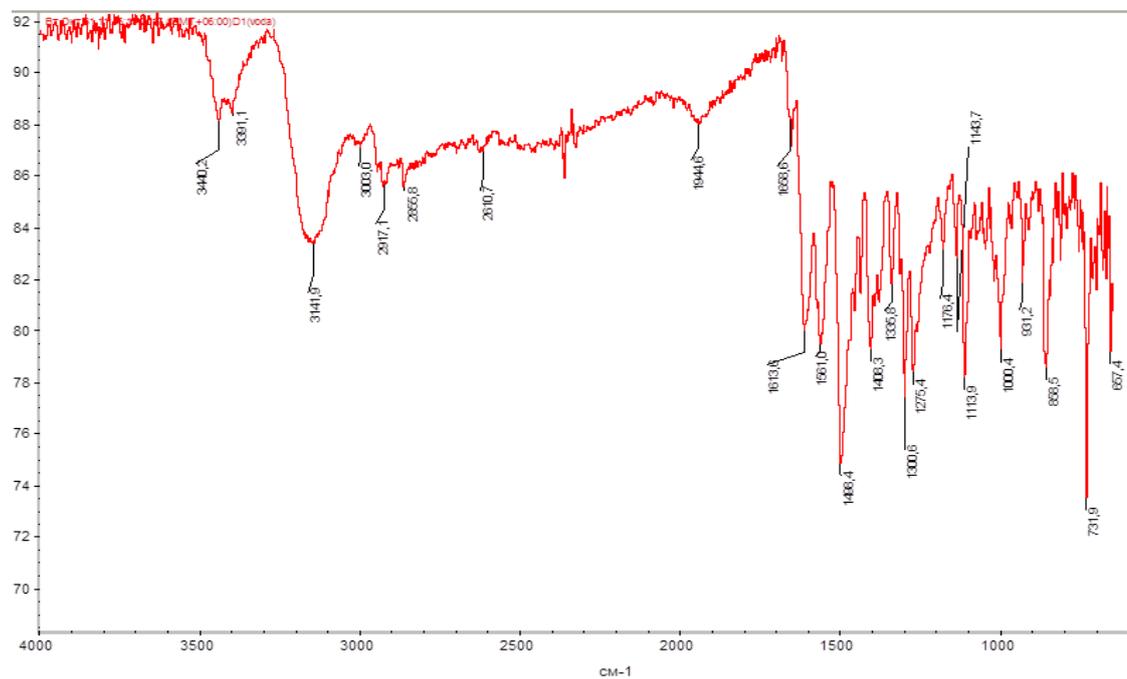


Рисунок 20 – ИК спектр субстанции D1

Из данных, представленных на рисунке 20 можно предположить, что появление узкой слабой полосы при  $1486\text{ см}^{-1}$  отнесется к ассиметричным деформационным колебаниям четвертичной аминогруппы, связанной с молекулой иода донорно-акцепторными связями.

В таблице 19 приведены спектральные характеристики субстанции D1 и отнесение полос поглощения.

Таблица 19 – Спектральные характеристики субстанции D1

Субстанция D1		
Полоса, $\text{см}^{-1}$	Интенсивность	Отнесение
3440,2 3391,1	слабая, широкая	$\nu$ asOH, NH, $\text{NH}_3^+$ , $\text{CH}_2$ ,
3141,9	широкая	$\nu_s$ –O–H, внутрикомплексные соединения
3003,0	средняя	$\delta_{as}$ $\text{NH}_3^+$ , $\nu_s$ $\text{CH}_3$
2917,1	средняя	$\nu_{as}$ $\text{CH}_2$ , $\delta_{as}$ $\text{CH}_3$
2855,8	средняя	$\nu_s$ $\text{CH}_2$
2610,7	слабая	–O–H
2555,8	слабая	$\delta_s$ $\text{NH}_2$
1613,6	сильная	$\nu$ (C=O), C=C
1561,0	сильная	$\text{NH}_2$ , C=O

Субстанция D1		
Полоса, см <sup>-1</sup>	Интенсивность	Отнесение
1488,4	сильная	$\nu$ NH <sub>3</sub> :I
1335,8	сильная	$\delta_s$ CH <sub>3</sub>
1300,6	слабая	$\nu$ NH <sub>3</sub> , $\delta$ OH; $\nu_s$ CN
1176,4	слабая	$\nu$ as CCN; $\omega$ CH <sub>2</sub>
1143,7	средняя	$\nu_{as}$ C-O в CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> $\nu_{as}$ C-O-C
1113,9	средняя	$\delta_s$ CH <sub>3</sub>
1000,4	средняя	$\delta_s$ CH
931,2	средняя	$\delta$ CH <sub>2</sub>
858,5	сильная	$\nu$ C-O-C
731,9	слабая	Ион иодата IO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
657,4	сильная	Ион иодата IO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

По результатам, полученным в результате исследований методом ИК-спектроскопии обозначены характеристические частоты поглощения. По наличию и интенсивности данных частот предложена идентификация субстанции D1. Субстанция считается подлинной, если ИК-спектр содержит полосы поглощения в диапазонах, указанных в таблице 20.

Таблица 20 - Диапазон характеристических частот субстанции D1, см<sup>-1</sup>

Диапазон характеристических частот субстанции D1, см <sup>-1</sup>
1479 ÷ 1489
1300 ÷ 1310
1110 ÷ 1120
725 ÷ 735
650 ÷ 660

В результате проведенного исследования комплексного соединения D1 методом ИК-спектроскопии установлено, что образование субстанции осуществляется путём координирования атомов кислорода молекул аминокислот вокруг положительно заряженного иона калия и образованием донорно-акцепторных связей атомов азота и молекулярного иода, также образуя четвертичную структуру аминогрупп.

В результате проведенных исследований показано, что метод ИК-спектроскопии может быть использован для подтверждения подлинности субстанции аддукта иода D1 и контроля технологического процесса изготовления лекарственных форм на ее основе [109].

*Идентификация субстанции D1 методом электронной спектроскопии*

УФ-спектр 0,05 % водного раствора субстанции D1 записывали в диапазоне 190-500 нм.

Данная аналитическая процедура была валидирована. Следующие результаты были получены (таблица 21)

Таблица 21 – Результаты валидации метода УФ-спектроскопии

Параметр валидации	Результат
Точность по длинам волн	$\pm 0,45$ нм
Повторяемость по длинам волн	$\pm 0,30$ нм (P=0,68); $\pm 1,01$ (P=0,99)
Точность по оптической плотности	$\pm 0,02$ единицы ОП
Повторяемость по оптической плотности	$\pm 0,001$ (P=0,68); $\pm 0,003$ (P=0,99)

На рисунке 21 представлен УФ-спектр субстанции D1, а в таблице 22 приведены отнесения полос поглощения различных форм иода субстанции D1 в воде.

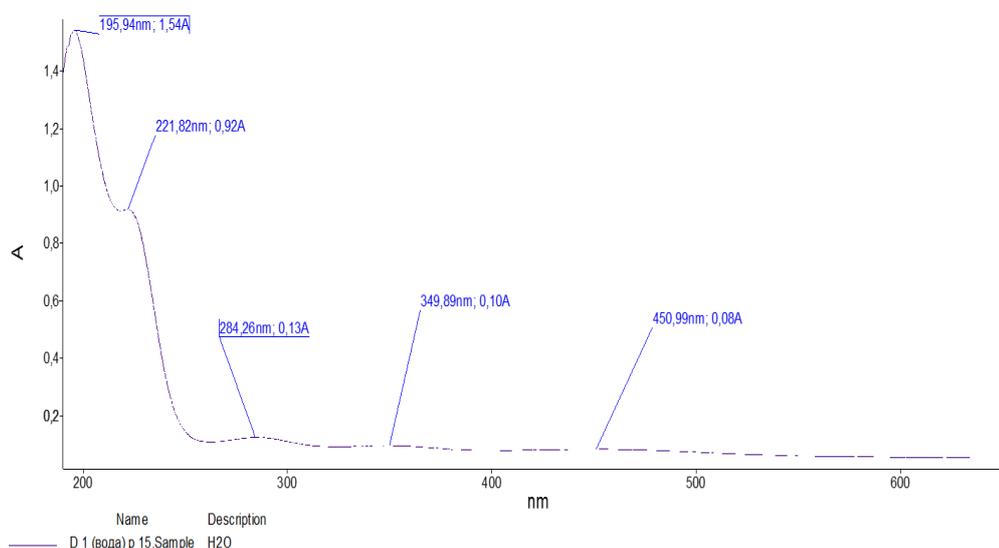


Рисунок 21 – УФ-спектр субстанции D1

Таблица 22 – Отнесение полос поглощения различных форм иода в воде

$\lambda$ , нм	195-196	221-224	283-286	347-352	450-455
Компоненты растворов	I <sup>-</sup>	I <sup>-</sup>	I <sup>3-</sup>	Оксианион, IO <sup>-</sup>	n·H <sub>2</sub> O[I <sup>+</sup> ...I <sup>-</sup> ]

По результатам проверки пригодности методики (валидации) данный метод был признан приемлемым для качественной идентификации субстанции D1.

В таблице 23 представлены УФ-спектры трех валидационных серий субстанции D1.

Таблица 23 – Электронные спектры серий субстанции D1

Серия субстанции D1	Длина волны, нм				
	01110517	195,94±0,04	221,82±0,04	284,26±0,03	349,89±0,01
02180517	195,89±0,04	221,81±0,02	284,23±0,03	349,91±0,01	450,94±0,03
03250517	195,96±0,03	221,84±0,02	284,28±0,02	349,90±0,02	450,97±0,02

Анализ сравнения спектров трех валидационных серий показал, что в УФ-спектрах субстанции присутствуют все формы иода субстанции D1 в воде. Это свидетельствует о том, что технологический процесс воспроизводим, а состав стабилен от серии к серии.

#### *Определение температуры плавления*

На рисунке 22 представлены экспериментальные данные образца субстанции D1, полученные методами термогравиметрии и дифференциального термического анализа.

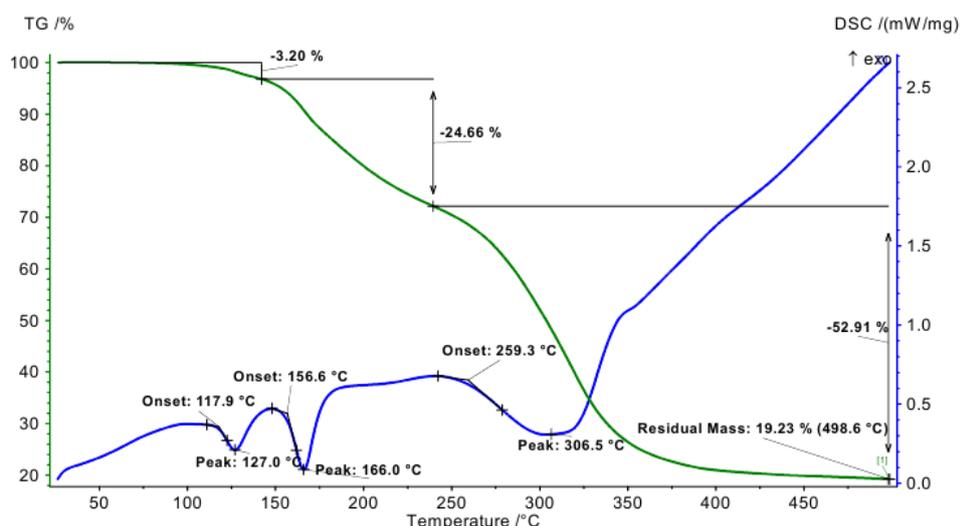


Рисунок 22 – Кривые ДСК и ТГ D1 (вода)

Термограмма D1, представлена на рисунке 22. На температурном участке до 150 °C потеря массы незначительна (3,2 %) и обусловлена, по-видимому, испарением воды и окклюдированного иода. Максимальная скорость данного процесса соответствует температуре 127 °C при которой на кривой ДСК наблюдается хорошо выраженный эндотермический эффект, связанный, по-видимому, с испарением воды и окклюдированного иода. Следующий эндотермический эффект на кривой ДСК наблюдается при 166 °C и связан с температурой плавления субстанции D1. Субстанция D1 плавится с разложением, при этом выделяется молекулярный иод. Дальнейшая потеря веса, сопровождающаяся эндотермическим эффектом на кривой ДСК при 306,5 °C обуславливается плавлением органического вещества комплекса, в котором уже нет иода и последующим разложением.

Таблица 24 – Температура плавления субстанции D1, °С

Показатель	Серия субстанции D1		
	01110517	02180517	03250517
Температура плавления, °С	166,0±0,03 с разложением	166,0±0,02 с разложением	166,0±0,03 с разложением

Температура плавления, определенная капиллярным методом, также составляет 166,0 °С. При достижении точки плавления наблюдалось появление выделений молекулярного иода на стенках капилляра. Через несколько секунд, при дальнейшем повышении температуры происходил процесс разложения субстанции с активным выделением молекулярного иода.

*Определение показателя «кинематическая вязкость»*

Изучение кинематической вязкости проводили согласно ГФ РК том 1, пп. 2.2.8 [82, с.47]

Испытания проводили на 1 %-ных водных растворах субстанции.

Значения показателя кинематической вязкости водных растворов исследуемых серий субстанции D1 приведены в таблице 25.

Таблица 25 – Величины кинематической вязкости 1%-ного раствора субстанции D1, мм<sup>2</sup>/с

Показатель	Серия субстанции D1		
	01110517	02180517	03250517
$\nu$ , мм <sup>2</sup> /с	1,124±0,001	1,123±0,001	1,125±0,001

В результате проведенных исследований, установлено, что субстанция D1 характеризуется величиной «кинематическая вязкость», соответствующей 1,124±0,001 мм<sup>2</sup>/с.

*Определение показателя рН*

Измерение показателя рН проводили потенциометрически, методом, описанным в ГФ РК [82, с. 41]. Значения показателя рН водных растворов субстанции D1 указаны в таблице 26.

Таблица 26 – Значение рН водных растворов субстанции D1

Показатель	Серия субстанции D1		
	01110517	02180517	03250517
рН	3,85±0,02	3,85±0,01	3,86±0,01

Из данных, представленных в таблице видно, что значения рН водных растворов разных серий субстанции D1 находится в диапазоне от 3,80 до 3,90.

В результате проведенных испытаний установлено, что для водных растворов субстанции D1 значения величины рН находятся в диапазоне от 3,5 до 4,0.

### *Определение влажности субстанции D1*

Определение влажности проводили методом измерения потери в массе при высушивании. Навеску субстанции, равную 1,0 г помещали во взвешенный стеклянный бюкс. Взвешивали бюкс с навеской субстанции. Далее бюкс помещали в сушильный шкаф и выдерживали при температуре 40 °С в течение пяти часов. Взвешивание бюксов проводили каждый час [82, с.91]. Результаты определения показателя влажности субстанции D1 представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Показатель влажности исследуемых серий субстанции D1, %

Показатель	Серия субстанции D1		
	01110517	02180517	03250517
φ, %	3,06±0,01	3,06±0,04	3,10±0,01

Из данных, представленных в таблице 25 видно, что содержание влаги в субстанции не превышает 3,2 %. При полученном экспериментальным путем, значении показателя влажности, субстанция D1 не меняет агрегатного состояния и сохраняет свойство сыпучести.

### *Определение общей золы*

Навеску субстанции D1, равную 1,0 г помещали в предварительно взвешенные, прокаленные фарфоровые тигли. Субстанцию выдерживали в течении 60 минут при температуре 100 ± 5 °С. Затем сжигали при температуре 600 ± 25 °С до постоянной массы (примерно 3 часа), согласно ГФ РК т.1, пп.2.4.16 [82, с.129]

Содержание общей золы в испытуемых сериях субстанции D1 представлено в таблице 28.

Таблица 28 – Значение показателя общей золы в испытуемых сериях субстанции D1, %

Показатель	Серия субстанции D1		
	01110517	02180517	03250517
ω <sub>зола</sub> , %	0,31±0,01	0,29±0,01	0,29±0,02

По результатам проведенного испытания, определен предел содержания общей золы после сжигания, который составляет не более 0,5 %.

### *Количественное определение субстанции D1*

Определение количества активного фармацевтического ингредиента – иода провели методом титрования согласно ГФ РК том 1, пп. 2.2.20 (таблица 29).

Таблица 29 – Количественное содержание иода (С<sub>1</sub>) в исследуемых сериях субстанции D1

Показатель	Серия субстанции D1		
	01110517	02180517	03250517
Количественное определение, %	43,35±0,07	43,44±0,06	43,15±0,15

В результате проведенных исследований по определению количества активного фармацевтического ингредиента – иода, в субстанции D1, установлено, что данный показатель находится в диапазоне от 40 % до 45 %.

### 3.8 Стандартизация и контроль качества субстанции D1

В целях стандартизации субстанции D1 была разработана и утверждена спецификация качества, содержащая перечень показателей качества, внесенные в нормативную документацию на субстанцию D1, в соответствии с требованиями ГФ РК (Приложение Д).

Физико-химические, микробиологические и органолептические показатели субстанции D1 должны соответствовать требованиям, указанным в таблице 30.

Таблица 30 - Спецификация качества субстанции D1

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
1	2	3
Описание	Темный порошок фиолетового цвета с металлическим блеском и запахом иода	- Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.6.0, ГФ РК, т.1, с.547
Идентификация - иод	При нагревании нескольких кристаллов субстанции в пробирке, выделяются фиолетовые пары иода;  ИК-спектр должен содержать полосы поглощения в диапазонах: 1479 ÷ 1489; 1300 ÷ 1310; 1110 ÷ 1120; 725 ÷ 735; 650 ÷ 660,  УФ-спектр должен содержать максимумы в диапазонах: 195÷196; 221÷224; 283÷286; 347÷352; 450÷455.	ГФ РК, т. 2, с.248  Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.2.23, ГФ РК, т. 1, 2.2.24  Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.2.24, ГФ РК, т. 1, 2.2.25
Растворимость: в воде	1,0 г/20 мл	- Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.6.0, пп.2.3.9.1, ГФ РК, т 1, с.25
pH	3,5-4,0	Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.2.3, ГФ РК, т. 1, 2.2.3
Кинематическая вязкость, мм <sup>2</sup> /с	От 1,120 до 1,130 мм <sup>2</sup> /с	Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.2.8, ГФ РК т.1, 2.2.8 и 2.2.9

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Потеря в массе при высушивание, %	не более 3,0 %	ЕвразЭС пп.2.1.2.31, ГФ РК т. 1, 2.2.32
Общая зола	Не более 1,0 %	ГФ РК, т. 1, 2.4.16
Определение температуры плавления	166,0 ±0,03 °С, с разложением	Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.2.16, ГФ РК т. 1, 2.2.14
Родственные примеси	На хроматограмме испытуемого раствора (а) любое пятно, кроме основного, не должно быть интенсивнее основного пятна на хроматограмме раствора сравнения (b) (0.5 %)	Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.4, ГФ РК, т. 1, 2.2.27
Микробиологическая чистота	Субстанция должна соответствовать требованиям ГФ РК, т. 1, категория 3А. В 1 г субстанции допускается наличие не более 1000 аэробных бактерий и 100 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). В 1 г субстанции не допускается наличие <i>Escherichia coli</i>	Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.6.6, ГФ РК, т.1, 2.6.12 2.6.13
Количественное содержание - иод	От 40,0 до 45,0 %	Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.2.37,
Маркировка	Маркировка должна содержать следующую информацию: страна-производитель, предприятие-изготовитель и его товарный знак (при наличии), адрес, название субстанции, количество субстанции, условия хранения, номер серии, дату изготовления и срок годности	В соответствии с проектом НД
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90	ГОСТ 17768-90
Хранение	Хранить в сухом, тёмном месте, при температуре от 15 °С до 25 °С.	В соответствии с проектом НД
Срок хранения	2 года	В соответствии с проектом НД
Основное фармакологическое действие	Противомикробное действие	

Для установления подлинности были записаны ИК-спектры исследуемых серий субстанции D1, а также проведена их интерпретация (таблица 31). ИК- и УФ-спектры исследуемых серий и компонентов субстанции D1, получены методами, описанными в Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.2.23, ГФ РК, т. 1, 2.2.24.

Подлинность ИК- и УФ-спектров синтезированных серий субстанций D1 должна соответствовать установленным критериям: ИК-спектры должны содержать соответствующие характеристические частоты, спектры поглощения в УФ-области должны совпадать. Результаты идентификации испытуемых серий

субстанции D1 методом ИК-спектроскопии представлены в таблице 31, а методом УФ-спектроскопии в таблице 32.

Таблица 31 – Результаты идентификации субстанции D1 методом ИК-спектроскопии

Критерий качества (к, см <sup>-1</sup> )	Испытуемые серии субстанции D1		
	01110517	02180517	03250517
1479 ÷ 1489	Соотв.	Соотв.	Соотв.
1300 ÷ 1310	Соотв.	Соотв.	Соотв.
1110 ÷ 1120	Соотв.	Соотв.	Соотв.
725 ÷ 735	Соотв.	Соотв.	Соотв.
650 ÷ 660	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Таблица 32 – Результаты идентификации субстанции D1 методом УФ-спектроскопии

Критерий качества (λ, нм)	Испытуемые серии субстанции D1		
	01110517	02180517	03250517
195÷196	Соотв.	Соотв.	Соотв.
221÷224	Соотв.	Соотв.	Соотв.
283÷286	Соотв.	Соотв.	Соотв.
347÷352	Соотв.	Соотв.	Соотв.
450÷455	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Как видно из представленных данных все испытуемые серии субстанции D1 соответствуют установленным критериям качества. Таким образом, очевидно, что принятые критерии качества по установлению подлинности являются приемлемыми.

### 3.9 Установление сроков и условий хранения субстанции D1

Установление условий и срока хранения субстанции D1 проводили посредством долгосрочных испытаний основных параметров качества в режиме реального времени. Исследования стабильности субстанции D1 проведены на трех лабораторных сериях, полученных на базе АО «НЦПП» (г. Алматы). Испытания субстанции проводились с помощью валидированных методик, в первичной упаковке идентичной применяемой для хранения и реализации (флакон из темного стекла ФВ-50 по ОСТ 64-282-85, закупоренный пробкой из полиэтилена и крышкой навинчивающейся по ОСТ 64-2-87-81), при температуре хранения (25 ± 2) °С и относительной влажности (RH) (60 ± 5) % [110].

Субстанция исследована по следующим показателям качества: описание, идентификация, количественное содержание активного фармацевтического ингредиента, растворимость, температура плавления-разложения, рН, потеря в массе при высушивании, общая зола, микробиологическая чистота и количественное определение.

За исследуемый период хранения (0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 мес.) субстанции в первичной упаковке при заданных условиях наблюдалось постоянство состава и отсутствие значительных изменений показателей качества. Параметры качества, а также количественные показатели находились в допустимых пределах,

обозначенных в спецификации качества и НД по контролю качества лекарственного средства.

Упаковка обеспечивает надежную защиту субстанции от внешних воздействий. Результаты изучения стабильности доказывают рациональность состава субстанции, оптимальную технологию получения и правильный подбор условий хранения.

Исследования стабильности фармацевтической субстанции D1 проведены в соответствии с требованиями нормативных документов МЗ РК, ГФ РК и ICH [111] (таблицы 33-35).

Таблица 33 – Результаты исследования стабильности субстанции D1 серия 01110517. Дата начала и окончания испытаний: 18.05.17 г. - 18.05.19 г., T=25±2 °C, RH=60±5 %

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.							
			0	3	6	9	12	18	24	
Описание	Органолептически	Темный кристаллический порошок фиолетового цвета с металлическим блеском и запахом иода	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация - иод	ГФ РК, т. 2, с. 248	- при нагревании нескольких кристаллов субстанции в пробирке, выделяются фиолетовые пары иода; - ИК-спектр должен содержать полосы поглощения в диапазонах: 1479 ÷ 1489; 1300 ÷ 1310; 1110 ÷ 1120; 725 ÷ 735; 650 ÷ 660,	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.							
			0	3	6	9	12	18	24	
		- УФ-спектр должен содержать максимумы в диапазонах: 195÷196; 221÷224; 283÷286; 347÷352; 450÷455.								
Растворимость: в воде	ГФ РК, т. 1, с.25	1,0 г/20 мл	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Температура плавления	ГФ РК т. 1, 2.2.14	166,03±0,3, °С	166,0±0,3	166,0±0,2	166,0±0,2	166,0±0,3	166,0±0,3	166,0±0,2	166,0±0,1	
Потеря в массе при высушивании	ГФ РК т. 1, 2.2.32	не более 4,0 %	3,03	3,09	3,08	3,03	3,12	3,12	3,09	
Родственные примеси	Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.4, ГФ РК, т. 1, 2.2.27	не более 0,5 %	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	
рН	ГФ РК, т. 1, 2.2.3	От 3,5 до 4,5	3,82	3,85	3,75	3,85	3,84	3,84	3,81	
Кинематическая вязкость	ГФ РК т. 1, 2.2.8 и 2.2.9	От 1,110 до 1,230 мм <sup>2</sup> /с	1,118	1,111	1,125	1,118	1,135	1,138	1,142	
Количественное содержание суммарного иода	ЕФ 6 изд, 2.2.47	От 40,0 до 45,0 %	43,01	42,87	42,83	43,43	43,29	43,03	42,91	

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.							
			0	3	6	9	12	18	24	
Микробиологическая чистота	ГФ РК, т. 1, 2.6.12	Субстанция должна соответствовать требованиям								
	ГФ РК, т. 1, 2.6.12	ГФ РК, т. 1, категория 3А.								
	ГФ РК, т. 1, 2.6.13	В 1 г субстанции допускается наличие: - не более 1000 аэробных бактерий, - не более 100 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно).	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10
		В 1 г субстанции не допускается наличие <i>Escherichia coli</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Таблица 34 – Результаты исследования стабильности субстанции D1 серия 02180517. Дата начала и окончания испытаний: 25.05.17 г. - 25.05.19 г., T=25±2 °C, RH=60±5 %

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.						
			0	3	6	9	12	18	24
Описание	Органолептически	Темный кристаллический порошок фиолетового цвета с металлическим блеском и запахом иода	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация - иод	ГФ РК, т. 2, с. 248 ГФ РК, т.1, 2.3.1	- при нагревании нескольких кристаллов субстанции в пробирке, выделяются фиолетовые пары иода; - ИК-спектр должен содержать полосы поглощения в диапазонах: 1479 ÷ 1489; 1300 ÷ 1310; 1110 ÷ 1120; 725 ÷ 735; 650 ÷ 660,	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.						
			0	3	6	9	12	18	24
		- УФ-спектр должен содержать максимумы в диапазонах: 195÷196; 221÷224; 283÷286; 347÷352; 450÷455.							
Растворимость: в воде	ГФ РК, т. 1, с.25	1,0 г/20 мл	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Температура плавления	ГФ РК т. 1, 2.2.14	166,0 ±0,3°C	166,0±0,2	166,0±0,1	166,0±0,3	166,0±0,3	166,0±0,1	166,0±0,3	166,0±0,2
Потеря в массе при высушивании	ГФ РК т. 1, 2.2.32	не более 4,0 %	3,14	3,15	3,12	3,14	3,13	3,16	3,17
Родственные примеси	Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.4, ГФ РК, т. 1, 2.2.27	не более 0,5 %	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1
рН	ГФ РК, т. 1, 2.2.3	От 3,5 до 4,5	3,74	3,85	3,74	3,83	3,74	3,84	3,81
Кинематическая вязкость	ГФ РК т.1, 2.2.8 и 2.2.9	От 1,110 до 1,230 мм <sup>2</sup> /с	1,122	1,120	1,125	1,122	1,135	1,139	1,141
Количественное содержание суммарного иода	ЕФ 6 изд, 2.2.47	От 40,0 до 45,0 %	42,89	42,76	42,71	43,43	43,04	42,88	43,16
Микробиологическая чистота	ГФ РК, т. 1, 2.6.12 ГФ РК, т. 1, 2.6.12	Субстанция должна соответствовать требованиям							

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.							
			0	3	6	9	12	18	24	
	ГФ РК, т. 1, 2.6.13	ГФ РК, т. 1, категория ЗА. В 1 г субстанции допускается наличие: - не более 1000 аэробных бактерий, - не более 100 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). В 1 г субстанции не допускается наличие <i>Escherichia coli</i>	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10
			-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10
			Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Таблица 35 – Результаты исследования стабильности субстанции D1 серия 03250517. Дата начала и окончания испытаний: 31.05.17 г. - 30.05.19 г., T=25±2 °C, RH=60±5 %

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.						
			0	3	6	9	12	18	24
Описание	Органолептически	Темный кристаллический порошок фиолетового цвета с металлическим блеском и запахом иода	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация - иод	ГФ РК, т. 2, с. 248 ГФ РК, т.1, 2.3.1	- при нагревании нескольких кристаллов субстанции в пробирке, выделяются фиолетовые пары иода; - ИК-спектр должен содержать полосы поглощения в диапазонах: 1479 ÷ 1489; 1300 ÷ 1310;	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.							
			0	3	6	9	12	18	24	
		1110 ÷ 1120; 725 ÷ 735; 650 ÷ 660, - УФ-спектр должен содержать максимумы в диапазонах: 195÷196; 221÷224; 283÷286; 347÷352; 450÷455.								
Растворимость: в воде	ГФ РК, т. 1, с.25	1,0 г/20 мл	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Температура плавления	ГФ РК т. 1, 2.2.14	166,0±0,03, °С	166,0±0,1	166,0±0,2	166,0±0,2	166,0±0,1	166,0±0,2	166,0±0,2	166,0±0,3	
Потеря в массе при высушивании	ГФ РК т. 1, 2.2.32	не более 4,0 %	3,12	3,13	3,13	3,12	3,14	3,16	3,16	
Родственные примеси	Фармакопея ЕвразЭС пп.2.1.4, ГФ РК, т. 1, 2.2.27	не более 0,5 %	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	
pH	ГФ РК, т. 1, 2.2.3	От 3,5 до 4,5	3,88	3,85	3,75	3,85	3,84	3,84	3,81	
Кинематическая вязкость	ГФ РК т. 1, 2.2.8 и 2.2.9	От 1,110 до 1,230 мм <sup>2</sup> /с	1,128	1,121	1,125	1,127	1,135	1,141	1,144	
Количественное содержание суммарного иода	ЕФ 6 изд, 2.2.47	От 40,0 до 45,0 %	43,12	43,04	42,51	42,92	43,63	43,22	43,14	

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.							
			0	3	6	9	12	18	24	
Микробиологическая чистота	ГФ РК, т. 1, 2.6.12	Субстанция должна соответствовать								
	ГФ РК, т. 1, 2.6.12	требованиям								
	ГФ РК, т. 1, 2.6.13	ГФ РК, т. 1, категория 3А. В 1 г субстанции допускается наличие:								
		- не более 1000 аэробных бактерий,	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10
		- не более 100 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно).	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10	-менее 10
		В 1 г субстанции не допускается наличие <i>Escherichia coli</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует.	Отсутствует.	Отсутствует.	Отсутствует.	Отсутствует.

По результатам долгосрочных испытаний стабильности субстанции D1, значительных отклонений контролируемых показателей качества не наблюдалось. Таким образом, на основании соответствия показателей качества субстанции аддукта иода (субстанция D1) требованиям проекта нормативного документа по качеству, установлен срок хранения субстанции, соответствующий 24 месяцам (Приложение Д).

## 4 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУБСТАНЦИИ D1

### 4.1 Оценка безопасности субстанции D1 «*in vitro*»

*Изучение цитотоксичности субстанции D1 на линиях клеток RD и MDCK методом MTT in vitro.*

Исследование цитотоксичности субстанции D1 *in vitro* проводили методом МТТ.

На основании проведенных исследований, были получены значения ЦТК<sub>50</sub> для субстанции D1 в отношении каждой клеточной линии. Результаты полученных *in vitro* значений ЦТК<sub>50</sub> субстанции D1 представлены в таблице 36.

Таблица 36 – Значения ЦТК<sub>50</sub> субстанции D1 в отношении культур клеток MDCK и RD, мг/мл

Исследуемое вещество	Культура клеток	ЦТК <sub>50</sub> , мг/мл
Субстанция D1	MDCK	1,55
	RD	2,17

В результате проведенных исследований, было показано, что исследуемое вещество - субстанция D1 (ди(трийодидо)-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат) является нетоксичным в отношении культур клеток MDCK и RD. Однако, при сравнении результатов токсичности исследуемого вещества в отношении культур клеток RD и MDCK, было показано, что субстанция D1 обладает большей токсичностью в 1,4 раза в отношении культур клеток MDCK (ЦТК<sub>50</sub> = 1,55 мг/мл). ЦТК<sub>50</sub> субстанции D1 в отношении культур клеток RD составило 2,17 мг/мл [112].

### 4.2 Исследование мутагенной активности (тест Эймса)

Субстанция D1 изучалась на наличие потенциальной мутагенной и промутагенной активностей на референс-штаммах *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 и *Escherichia coli* WP2.

*Критерии оценки результатов испытания.* Критерием позитивного результата являются статистически достоверное дозозависимое увеличение числа ревертантов или воспроизводимый и статистически достоверный ответ, по крайней мере, в одной из выбранных доз.

Тестируемое вещество, которое не вызывает статистически значимого достоверного дозозависимого увеличения числа колоний-ревертантов или воспроизводимого и статистически достоверного ответа для какой-либо выбранной дозы, расценивается как вещество, не обладающее мутагенной активностью в данном тесте [93].

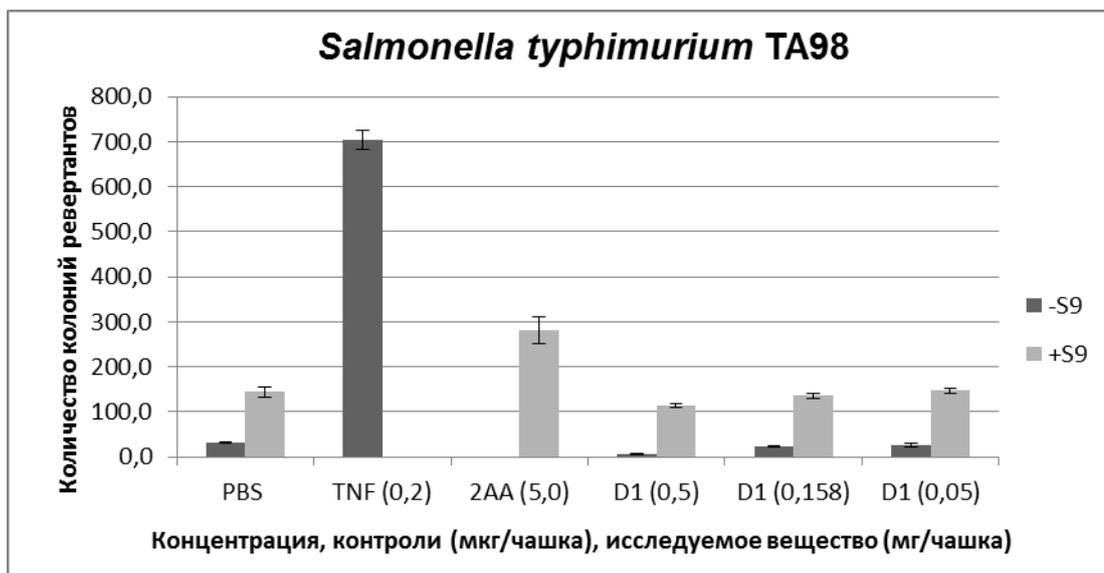


Рисунок 23 – Результаты изучения мутагенных и промутагенных свойств субстанции D1 с/без метаболической активацией на *S.typhimurium* TA 98

Как видно на рисунке 23, воздействие субстанцией D1 на индикаторный тест-штамм *S.typhimurium* TA 98 в концентрациях от 0,05 мг/чашку до 0,5 мг/чашку не индуцирует частоту реверсий по сравнению с положительным контролем. Субстанция D1 в концентрациях, равных 5,0 мг/чашка 1,581 мг/чашка в экспериментах, как с метаболической активации, так и без нее, а также концентрация 1,581 в эксперименте без метаболической системы активации продемонстрировали цитотоксическое действие, что подтверждалось полным отсутствием колоний-ревертантов и истощением фонового газона [113].

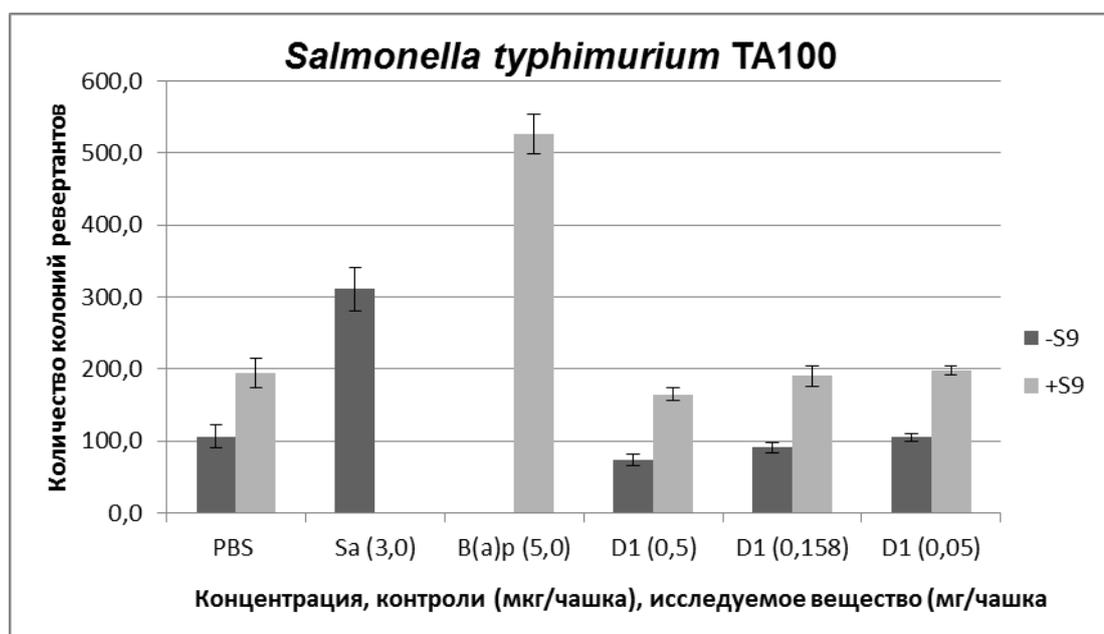


Рисунок 24 – Результаты изучения мутагенных и промутагенных свойств субстанции D1 с/без метаболической активацией на *S.typhimurium* TA 100

Число ревертантов тест-штамма *S.typhimurium* TA100, индуцированных субстанцией D1 в концентрациях от 0,05 мг/чашку до 0,5 мг/чашку, статистически не превышало фон спонтанных мутаций.

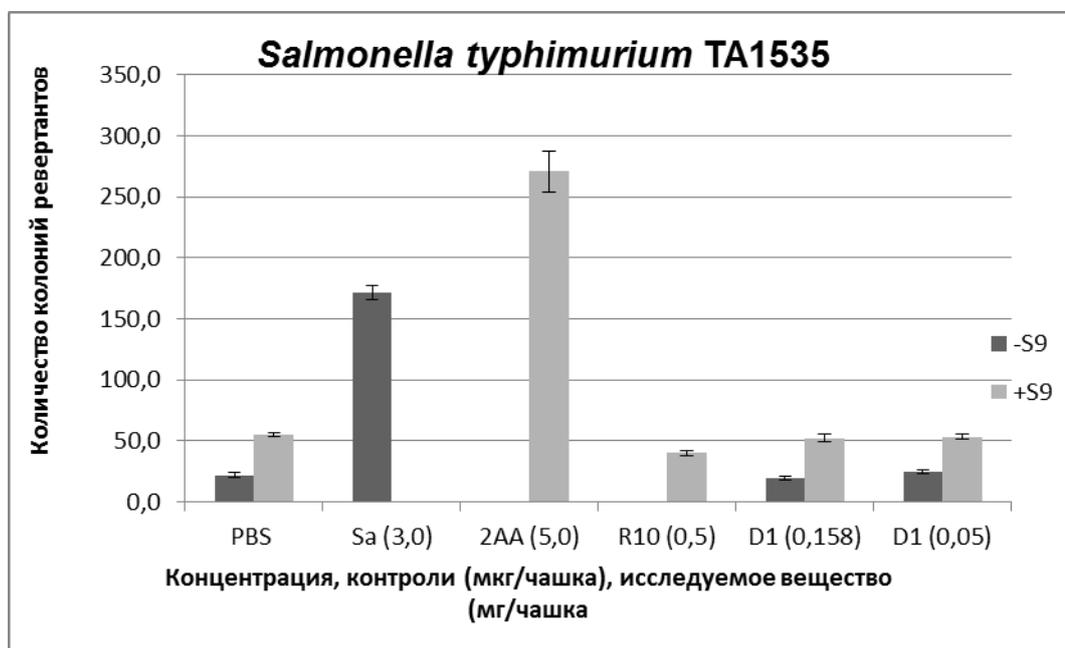


Рисунок 25 – Результаты изучения мутагенных и промутагенных свойств субстанции D1 с/без метаболической активацией на *S.typhimurium* TA 1535

Из данных, представленных на рисунке 25 видно, что при воздействии субстанцией D1 на индикаторный тест-штамм *S. typhimurium* TA1535, достоверного увеличения уровня индуцированных мутаций по сравнению с положительным контролем не наблюдается. Уровень индуцированных субстанцией мутаций не превышает фон спонтанных мутаций (негативный контроль).

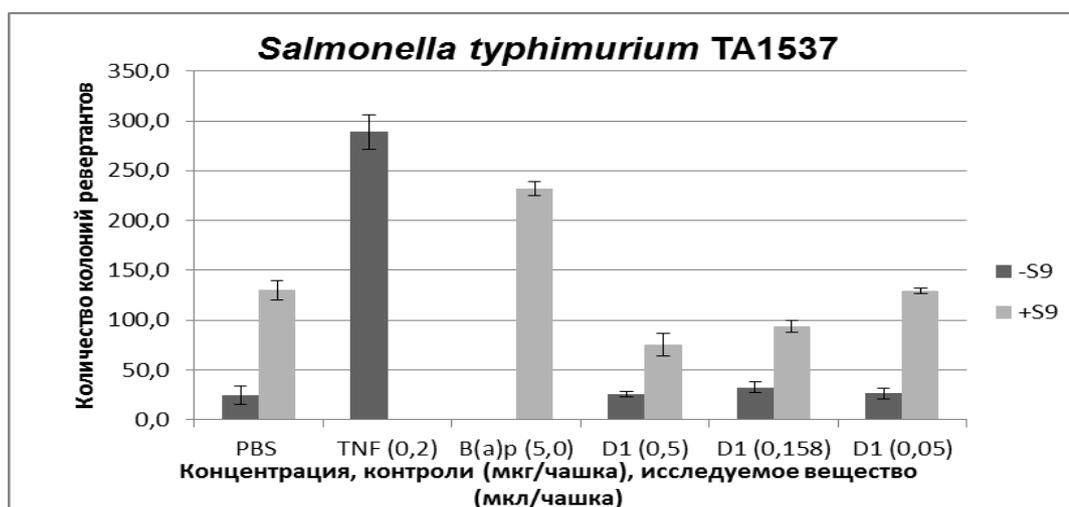


Рисунок 26 – Результаты изучения мутагенных и промутагенных свойств субстанции D1 с/без метаболической активацией на *S.typhimurium* TA 1537

Из данных представленных на рисунке 26 видно, что при воздействии субстанции D1 на индикаторный тест-штамм *S.typhimurium* TA1537 в концентрациях от 0,05 мг/чашку до 0,5 мг/чашку, частота индуцированных реверсий, не превышает спонтанный фон мутаций, что говорит об отсутствии мутагенного и промутагенного действия исследуемой субстанции.

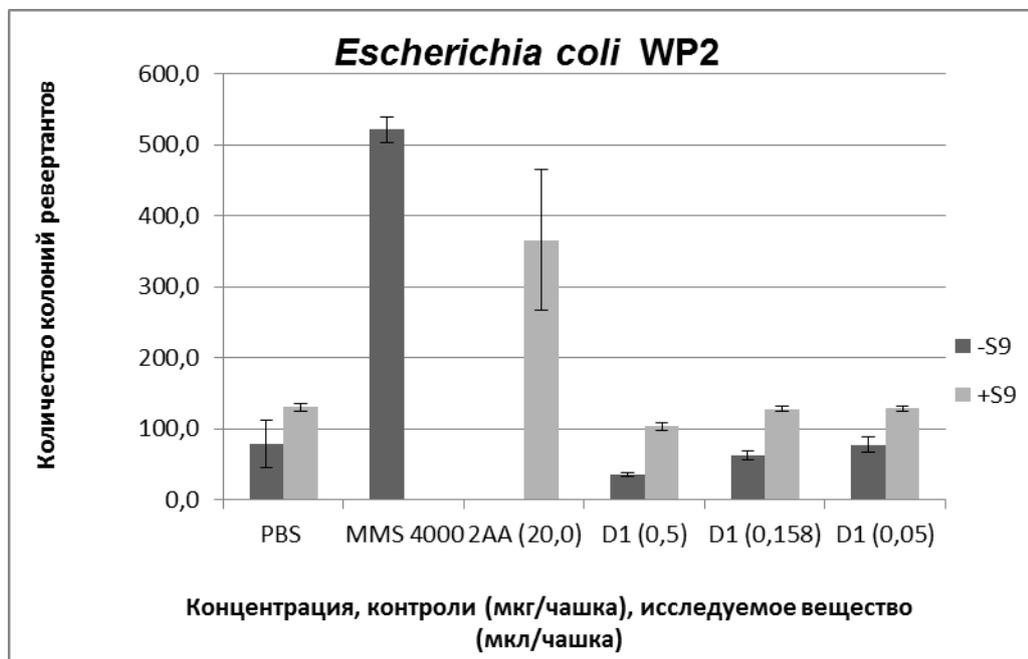


Рисунок 27 – Результаты изучения мутагенных и промутагенных свойств субстанции D1 с/без метаболической активацией на *E.coli* WP2

Число ревертантов тест-штамма *E.coli* WP2, индуцированных исследуемым веществом в концентрациях от 0,05 до 0,5 мг/чашку, статистически не превышало фон спонтанных мутаций.

Для того, чтобы вещество рассматривалось как мутаген в данном тесте, необходимо, чтобы оно вызывало дозозависимое и статистически достоверное увеличение частоты мутаций по сравнению с уровнем фоновых мутаций (отрицательным контролем). На рисунках 6-10 представлены кривые дозозависимого эффекта для всех тест-штаммов.

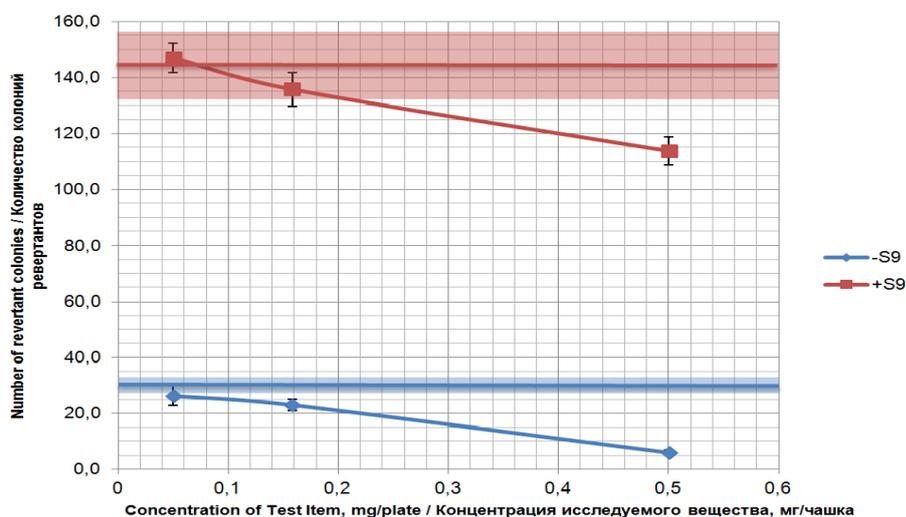


Рисунок 28 – Кривая доза-эффект для *S.typhimurium* TA98

Здесь и далее: Синей горизонтальной линией обозначен уровень спонтанных мутаций без метаболической активации – значение отрицательного контроля (PBS), синей полупрозрачной областью выделены границы среднеекватрического отклонения. Красной горизонтальной линией обозначен уровень спонтанных мутаций с метаболической активацией – значение отрицательного контроля (PBS), красной полупрозрачной областью выделены границы среднеекватрического отклонения.

На рисунке 28 видно, что уровень индуцированных мутаций в концентрациях 0,05 мг/чашка и 0,158 мг/чашка в варианте с метаболической активацией находится в пределах среднеекватрического отклонения спонтанных мутаций. При воздействии тестируемым веществом в концентрации 0,5 мг/чашка среднее количество колоний-ревертантов оказалось достоверно ниже уровня спонтанных мутаций. Следует отметить, что полученная кривая имеет «обратный» дозозависимый наклон (т.е. с уменьшением доз исследуемого вещества наблюдается увеличение количества колоний ревертантов), что может говорить об остаточном токсическом эффекте исследуемого вещества на тестовую систему в исследованных концентрациях [92].

Уровень индуцированных мутаций в концентрациях от 0,05 мг/чашка до 0,5 мг/чашка в варианте без метаболической активацией оказался ниже уровня соответствующего отрицательного контроля даже с учётом среднеекватрического отклонения, что также говорит о частичном бактерицидном эффекте исследуемого вещества в исследованных концентрациях.

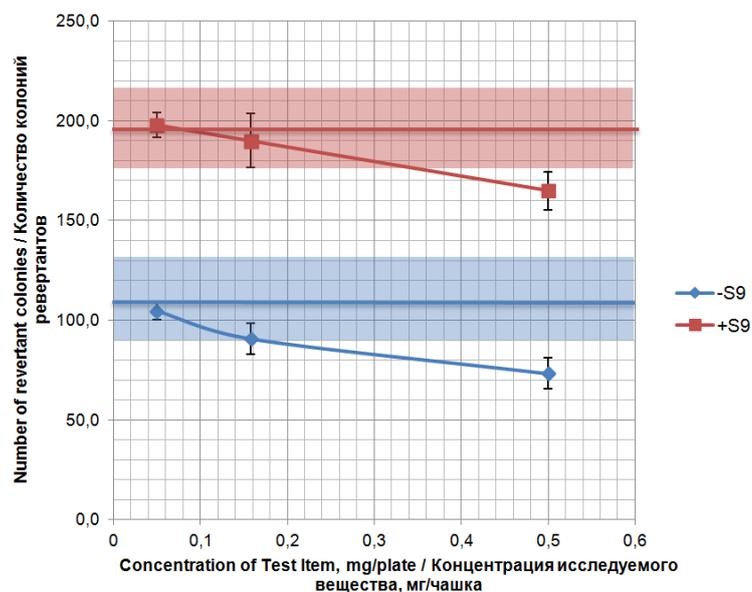


Рисунок 29 – Кривая доза-эффект для *S.typhimurium* TA100

Обозначения, как на рис.28.

Для концентраций исследуемого вещества 0,05 мг/чашка и 0,158 мг/чашка, средние значения числа колоний-ревертантов тест-штамма *S.typhimurium* TA100 достоверно не отличаются от значений отрицательного контроля как для варианта с метаболической активацией, так и без нее. При концентрации исследуемого вещества 0,5 мг/чашка наблюдается снижение количества ревертантов в обоих вариантах, что также свидетельствует о токсичном эффекте тестируемого вещества на культуру (рисунок 29).

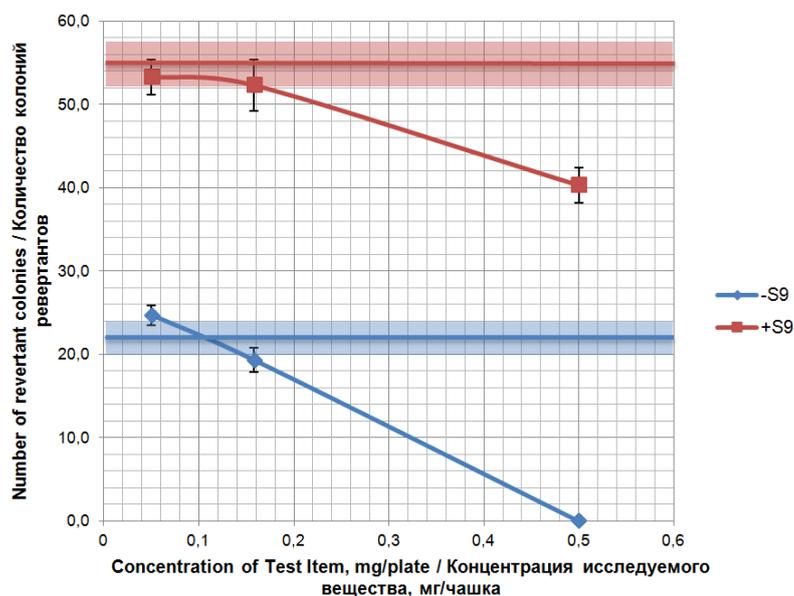


Рисунок 30 – Кривая доза-эффект для *S.typhimurium* TA1535

Обозначения, как на рис.28.

На рисунке 30 видно, что средние значения индуцированных мутаций в концентрациях 0,05 мг/чашка и 0,158 мг/чашка в варианте с метаболической активацией совпадают с уровнем фоновых мутаций в пределах статистической погрешности. При воздействии тестируемым веществом в концентрации 0,5 мг/чашка среднее количество колоний-ревертантов значительно ниже уровня спонтанных мутаций. Следует отметить, что кривая имеет «обратный» дозозависимый наклон, возможно обусловленный токсичностью исследуемого вещества на *S.typhimurium* TA1535 в исследованных концентрациях.

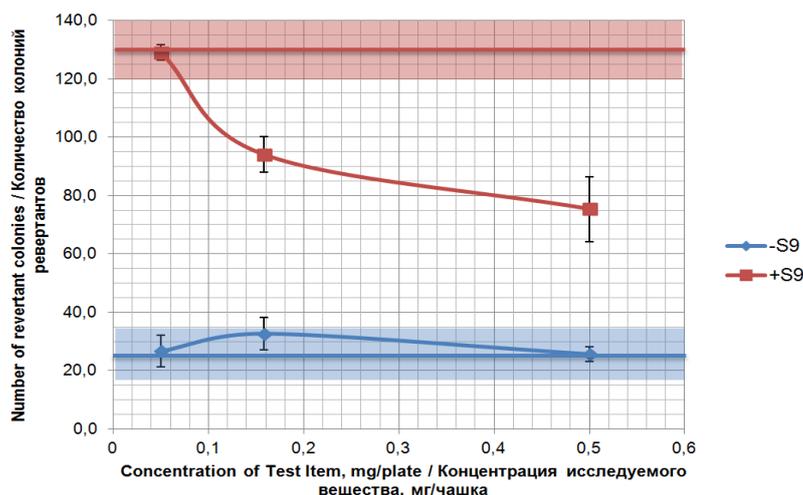


Рисунок 31 – Кривая доза-эффект для *S.typhimurium* TA1537  
Обозначения, как на рис.28.

Для концентраций 0,05 мг/чашка, 0,158 мг/чашка и 0,5 мг/чашка в варианте без метаболической активацией, средние значения числа колоний-ревертантов тест-штамма *S.typhimurium* TA1537 статистически не отличаются от значения отрицательного контроля. Для варианта с метаболической активацией только при воздействии самой низкой концентрацией 0,05 мг/чашка среднее количество колоний-ревертантов достигает отрицательного контроля. Воздействие более высокими концентрациями ИВ 0,158 мг/чашка и 0,5 мг/чашка приводит к снижению числа колоний ревертантов. Данная кривая также имеет обратную зависимость и указывает на цитотоксичность ИВ (рисунок 31).

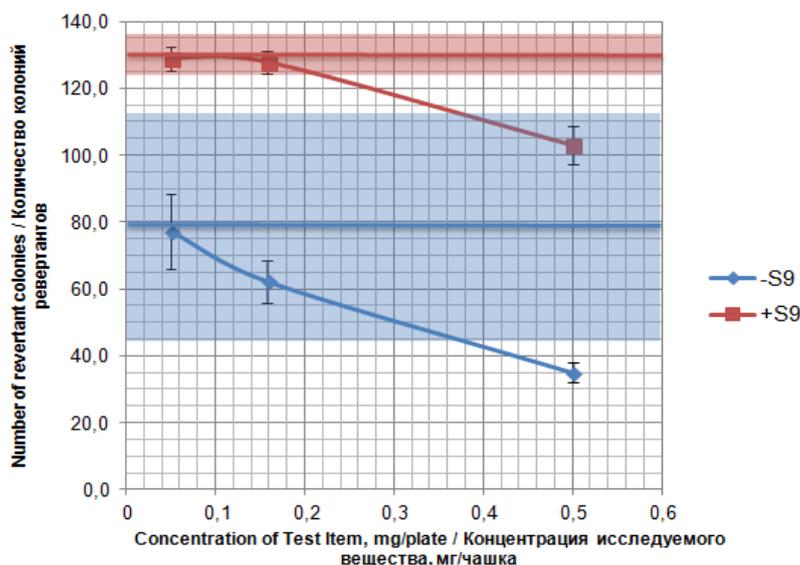


Рисунок 32 – Кривая доза-эффект для *E.coli* WP2  
Обозначения, как на рис.28.

Для концентраций 0,05 мг/чашка и 0,158 мг/чашка, как для варианта с метаболической активацией, так и без нее, средние значения числа колоний-ревертантов тест-штамма *E.coli* WP2 находятся в пределах статистической погрешности определения отрицательного контроля. При концентрации 0,5 мг/чашка наблюдается снижение количества ревертантов в обоих вариантах, что также свидетельствует о токсичном эффекте тестируемого вещества на культуру (рисунок 32).

Необходимо также отметить, что полученные значения коэффициента Стьюдента указывают на достоверно значимое увеличение уровня мутаций под воздействием ИВ (т.е. подтверждают нулевую гипотезу). Однако картина доза-эффект, представленная на рисунке 32, однозначно указывает на отсутствие мутагенного эффекта исследуемого вещества.

В данном случае появление коэффициентов Стьюдента  $p \geq 0.05$ , связано с минимально возможным размером выборки и, что важнее, получением необычного значения положительного контроля в одном из повторов и как следствие, большого среднеквадратичного отклонения.

Так как, согласно руководства ОЭСР № 471, результаты статистической обработки не должны являться единственными критериями при оценке мутагенного эффекта в данном случае мы оценивали биологически значимые результаты, а именно наличие дозозависимого эффекта, не принимая во внимание противоречивые значения коэффициента Стьюдента.

В ходе исследования некоторые культуры продемонстрировали необычные уровни и высокую вариабельность положительных и отрицательных контролей. Тем не менее, полученные значения контролей не оказали на результаты исследования никакого влияния. И так как, нет никаких свидетельств того, что необычные значения контролей были вызваны какими-либо отклонениями в

процедуре, они были приняты и внесены в лабораторную историческую базу данных.

Таким образом, в тесте обратных мутаций при воздействии субстанцией D1 в концентрациях от 0,05 до 0,5 мг/чашку на тест-штаммы: *S.thyphimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 и *E.coli* WP2 в экспериментах с и без метаболической активации мутагенной активности не выявлено.

## 5 ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ СУБСТАНЦИИ D1

### 5.1 Разработка составов гелевых основ

Гели – это мази, в которых для получения основы используются гелеобразователи природного и синтетического происхождения, обладают упруго-пластичной консистенцией и способны сохранять свою форму [114].

Для исследования были выбраны основы, представляющие собой растворы 1,5 % и 2 % ГПМЦ, а также 1 %, 1,5 % и 2 % растворы карбопола 940.

В качестве нейтрализующего агента использован 10% раствор натрия гидроксида, в качестве консерванта 0,1% бинарная смесь метилпарабен-пропилпарабен (7:3) в 5 мл 95% этилового спирта, в качестве пластификаторов – ПЭО-400 и 6% и 10% растворы поливинилпирролидона н.м..

Образцы основ № 1, 2 и 3 представляют собой водный гель карбопола-940 в концентрациях 1%, 1,5% и 2%, нейтрализованный раствором натрия гидроксида.

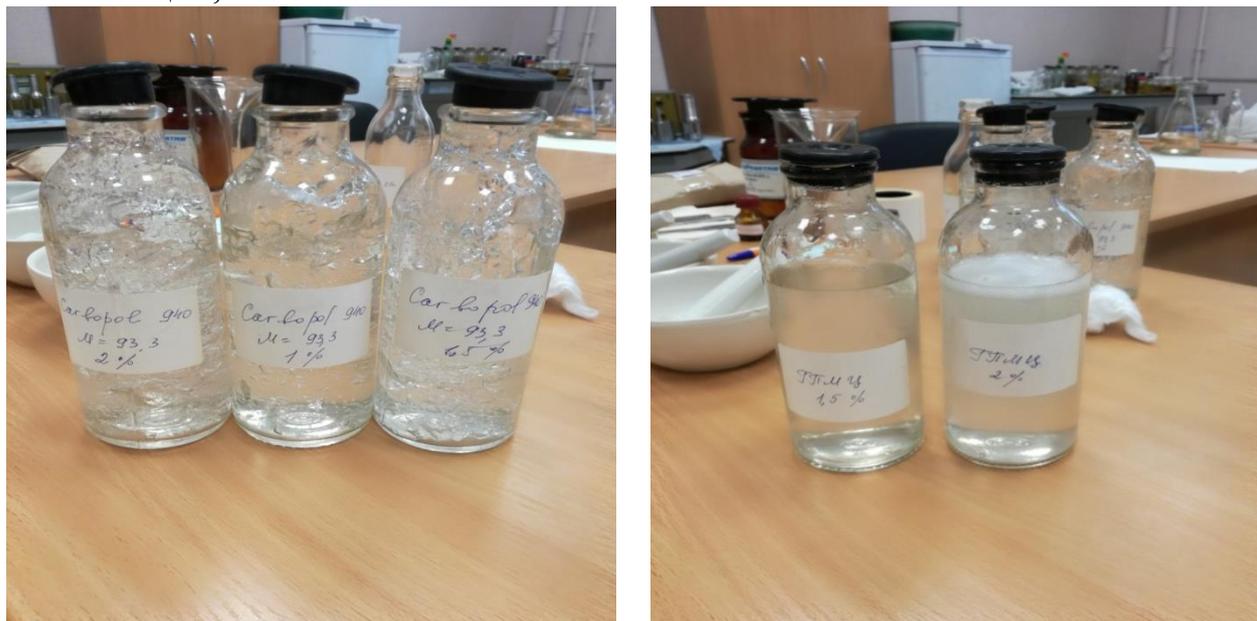
Карбопол является редкосшитым сополимером акриловой кислоты, который образует вязкие гидрогели в водном растворе. В дерматологической практике гели карбопола зарекомендовали себя как эффективные основы, не раздражающие кожу, включая лиц с гиперчувствительностью. Гели карбопола равномерно распределяются по слизистым и кожной поверхности, образуя тонкую пленку и обеспечивая равномерное пролонгированное высвобождение лекарственных веществ. Данные составы получают путем растворения активного компонента в соотношении 1:20 в воде очищенной (40 °С) и тщательном перемешивании до получения однородной консистенции. Далее добавляли 5 мл 95 %-ного этилового спирта с содержанием 0,1 г смеси метилпарабен-пропилпарабен 7:3. Затем вводили 10% раствор натрия гидроксида, выступающим в качестве нейтрализующего агента, в количестве 1,8 г 10 %-ного NaOH на 1 г карбопола в полупродукт основы с последующим перемешиванием смеси до получения однородной гелевой композиции.

Образцы основ № 4 и 5 содержат гидроксипропил метилцеллюлозу в концентрациях 1,5 % и 2 %.

ГПМЦ представляет собой белый или слегка желтоватый порошок, без запаха, безвкусно, нетоксический. Этот продукт может быть растворен в холодной воде, формирует прозрачный вязкий раствор. Водный раствор этого продукта представляет собой поверхностно-активное вещество, которое способствует эмульгированию и защите относительной стабильности. Данные составы получают путем растворения активного компонента в соотношении 1:20 в воде (40 °С), диспергированием, введением 5 мл 95 %-ного этилового спирта с содержанием 0,1 % метилпарабен-пропилпарабен при постоянном перемешивании при 250 об/мин в полупродукт основы с последующим перемешиванием смеси до получения гелевой композиции.

Таким образом были получены основы: 1%-ный Карбопол 940, 1,5 %-ный Карбопол 940, 2%-ный Карбопол 940, 1,5 %-ный ГПМЦ и 2%-ный ГПМЦ

(рисунок 33). Основы представляют собой прозрачные гели, однородной консистенции, без запаха.



а) 1%, 1,5% и 2%-ные растворы б) 1,5 % и 2 %-ные растворы ГПМЦ карбопола 940

Рисунок 33 - Основы гелей

## 5.2 Изучение структурно-механических свойств гелевых основ

Вязкость, напряжение сдвига, градиент скорости сдвига являются основными реологическими характеристиками мягких лекарственных форм.

Изучение данных характеристик проводили при помощи прибора «RheotestII» (Германия), система Н. В ходе исследования анализировали кривые гистерезиса, а именно: зависимость напряжения сдвига от градиента скорости сдвига при различных скоростях вращения цилиндра.

Расчет реологических параметров напряжения сдвига производился по формуле 6 и 7:

$$\tau = Z \times d, \quad (6)$$

где  $\tau$  – напряжение сдвига, Н/м<sup>2</sup>(Па);  $Z$  – константа цилиндра, Па/дел.шк. (деление шкалы);  $d$  – фиксируемое значение прибора.

$$\eta = \frac{\tau}{D\tau}, \quad (7)$$

где  $D\tau$  - градиент скорости сдвига, с<sup>-1</sup>,  $\eta$  - динамическая вязкость образца.

При разработке мягкой лекарственной формы необходимым условием является изучение структурно-механических характеристик, от показателей которых зависят потребительские свойства геля и его способность высвобождать АФИ. Структурно-механические свойства (вязкость, предельное напряжение сдвига) являются факторами, влияющими на скорость диффузии лекарственного

вещества, от которых зависит терапевтический эффект геля. Усилия, прилагаемые пациентом при нанесении геля на кожу, аналогичны тому напряжению, которое происходит в Rheotest-II во время сдвига вязко-пластичного материала. Пропорция напряжения к величине сдвига характеризует сопротивление материала сдвиговым деформациям при определенной скорости

Реологические свойства гелевых основ представлены на рисунках 34-38.

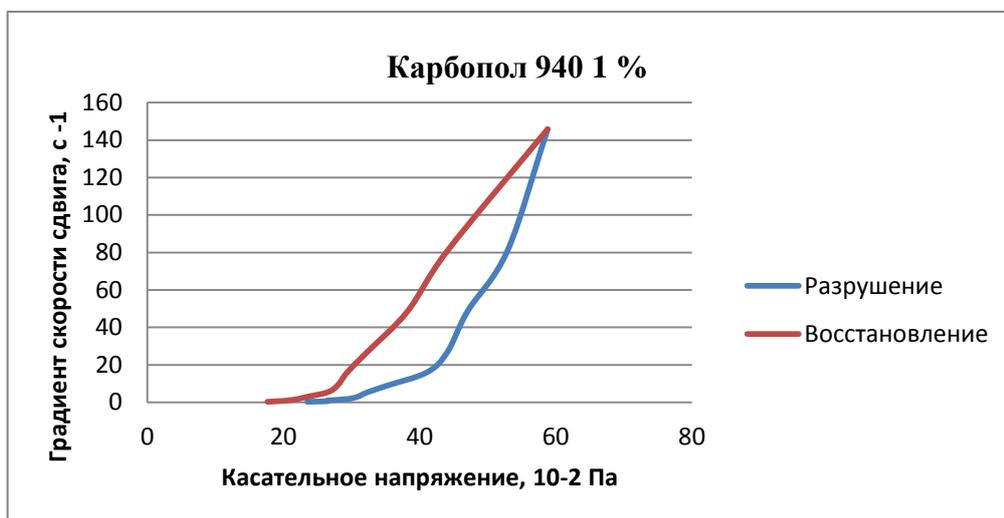


Рисунок 34 - Реограмма течения образца № 1

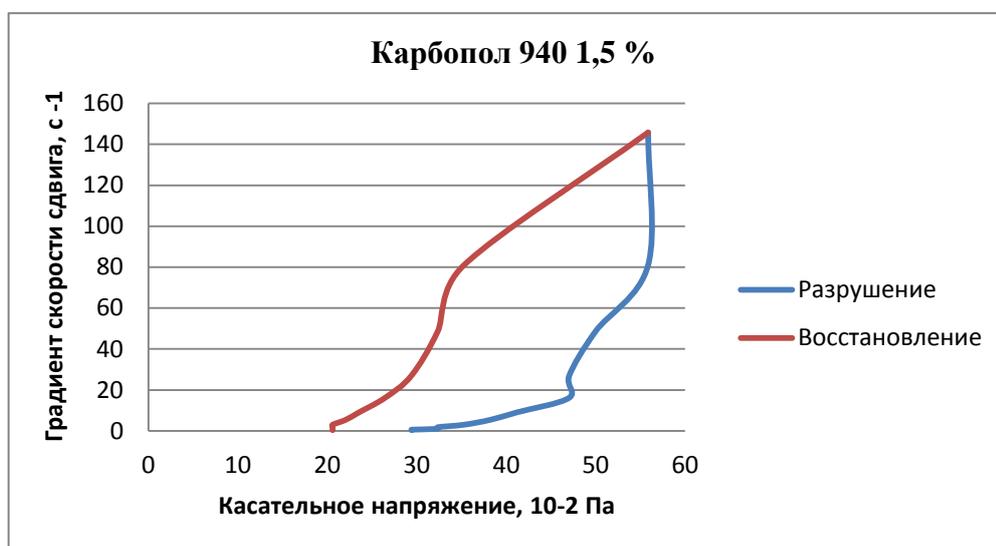


Рисунок 35 - Реограмма течения образца № 2

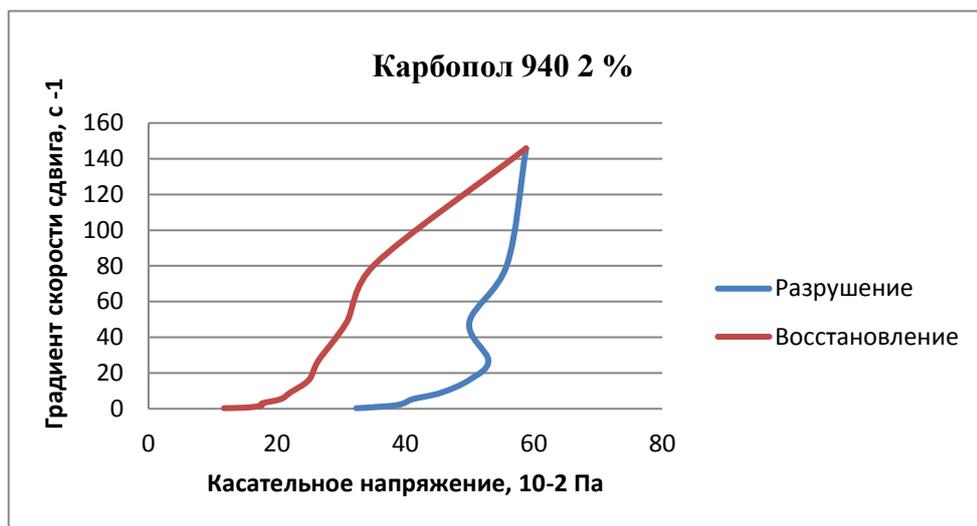


Рисунок 36 - Реограмма течения образца № 3

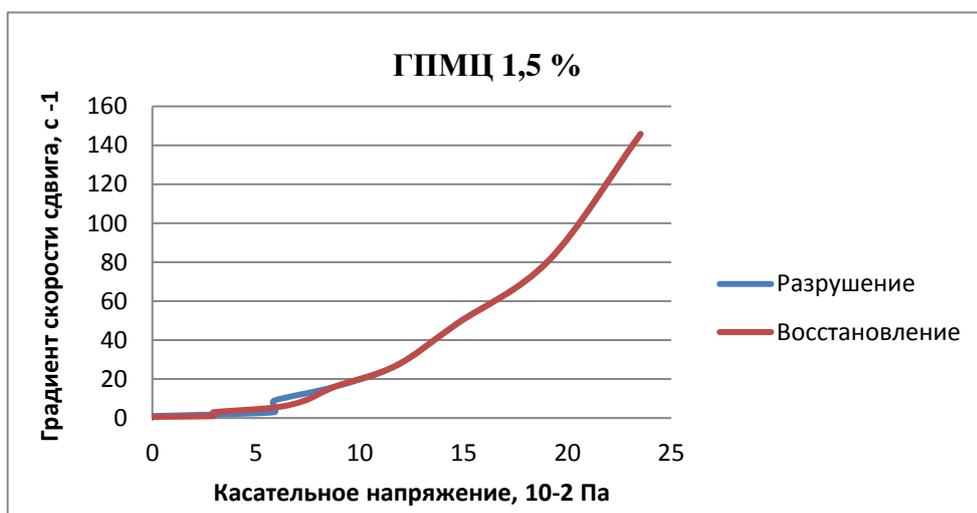


Рисунок 37 - Реограмма течения образца № 4

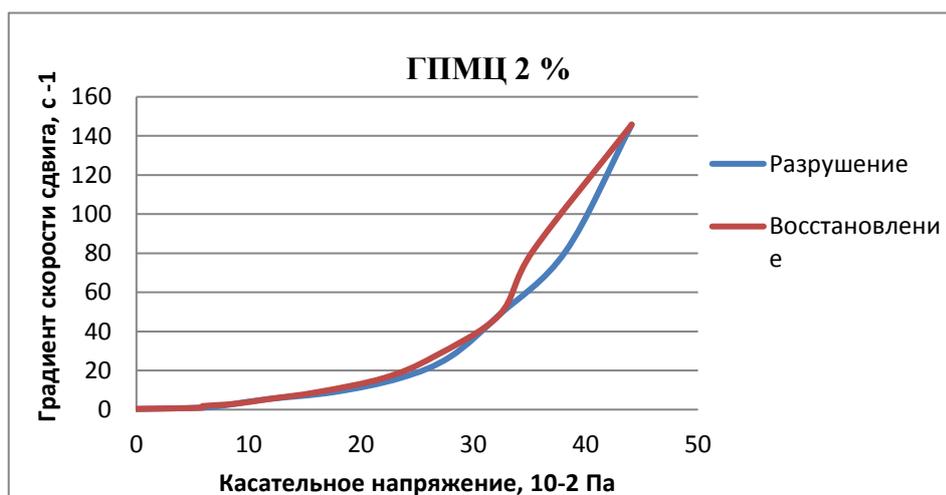


Рисунок 38 - Реограмма течения образца № 5

По результатам исследования выяснили, что все образцы являются тиксотропными структурами и образуют петли гистерезиса (рисунок 35-39). Однако их ширина заметно отличается, что служит относительной оценкой

глубины процессов структурообразования в образцах основ. Образец № 1, № 4 и № 5 образует оптимальную петлю гистерезиса и является более структурированной системой с преимущественно коагуляционным типом связей, характеризуется оптимальной намазываемостью и распределением по поверхности (рисунок 34, 37-38)

### 5.3 Изучение стабильности субстанции D1 при взаимодействии со связующим веществом ПЭО-400 и гелевыми основами

Для изучения взаимодействия субстанции D1 с ПЭО-400 и гелевыми основами готовили гели следующего состава: 1 % субстанция D1 (0.05 г), 1 капля ПЭО-400 (0,05 мл), 5 г гелевой основы (1 % ГПМЦ и 1,5 % Карбопол).

В качестве субстанции сравнения использовали 5 % раствор Люголя. На модельных образцах гидрогелей ГПМЦ и карбопола изучена совместимость после введения исследуемых субстанций с равным количеством ПЭО-400. Для этого: 1 г калия йодида растворяли в 2 мл воды, добавляли 0,5 г йода и доводили ПЭО-400 до 10 г по массе. 0,5 мл полученного раствора Люголя на ПЭО смешивали с 5 г гелевых основ.

Таблица 37 - Предварительные исследования по изучению взаимодействия субстанции D1 со связующим веществом и основой в сравнении с раствором Люголя

Наименование составов	Описание геля	Стабильность после приготовления	Стабильность после 3-х суток приготовления	Равномерность нанесения
1 % D1 + ПЭО 400 + 1 % Карбопол	Однородный гель, мягкой консистенции, светло-коричневого цвета с характерным запахом.	+	Обесцвечивание геля до светло желтого цвета	Легкое равномерное распределение
1 % D1 + ПЭО 400 + 1,5 % ГПМЦ	Резиноподобный сгусток коричнево-черного цвета, коагуляция геля	-	-	Нанесение невозможно
Раствор Люголя + ПЭО 400 + 1 % Карбопол	Однородный гель, мягкой консистенции, светло-красного цвета с включениями с характерным запахом.	+	Обесцвечивание геля до светло желтого, почти белого цвета	Легкое равномерное распределение

Наименование составов	Описание геля	Стабильность после приготовления	Стабильность после 3-х суток приготовления	Равномерность нанесения
Раствор Люголя + ПЭО 400 +1,5 % ГПМЦ	Однородный гель, мягкой консистенции, светло-малинового цвета с характерным запахом.	+		Легкое равномерное распределение



Рисунок 39 - Взаимодействие субстанции D1 с ПЭО-400 и основами, в сравнении с раствором Люголя с ПЭО-400 и основами



а) субстанция D1 с ПЭО-400 + 1 % -ный карбопол 940



б) субстанция D1 с ПЭО-400 + 1,5 %-ный ГПМЦ



в) раствор Люголя с ПЭО-400 + 1 % -ный карбопол 940

г) раствор Люголя с ПЭО-400 + 1,5 %-ный ГПМЦ

Рисунок 40 - Взаимодействие субстанции D1 с ПЭО-400 и основами, в сравнении с раствором Люголя

По предварительным испытаниям взаимодействия субстанции D1 с ПЭО-400 и гелевыми основами, наиболее подходящей основой была выбрана основа карбопол 940, так как при взаимодействии субстанции D1 с ПЭО и ГПМЦ происходит коагуляция геля (рисунок 41б). Также в ходе данного эксперимента было предложено заменить ПЭО-400 на ПВП в качестве вещества введения в основу, в связи с обесцвечиванием полученного геля с субстанцией D1 в комбинации с ПЭО-400 и гелевыми основами уже через 24-36 часов, что свидетельствует о нестабильности данной композиции и высвобождении активного иода.

#### 5.4 Изучение структурно-механических свойств образцов гелевых основ с ПВП

Проведены дополнительные исследования влияния ПВП, как полимера для введения активных фармацевтических ингредиентов, на структурно-механические свойства геля. Поливинилпирролидон вводился в гелевую основу в виде 6 % и 10 %-ного раствора в конечной концентрации 5% от массы гелевой основы. В качестве основ использовали 1 %, 1,5 % и 2 %-ные гели карбопола 940. На рисунках 41-46 представлены реограммы течения данных образцов.

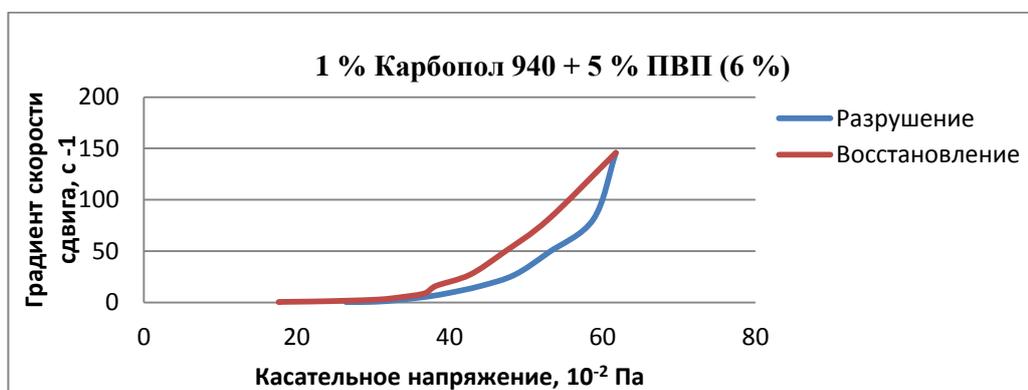


Рисунок 41 - Реограмма течения 1%-ного карбопола с 5% ПВП (6%)



Рисунок 42 - Реограмма течения 1,5 %-ного карбопола с 5% ПВП (6%)



Рисунок 43 - Реограмма течения 2 %-ного карбопола с 5 %-ным ПВП (6 %)

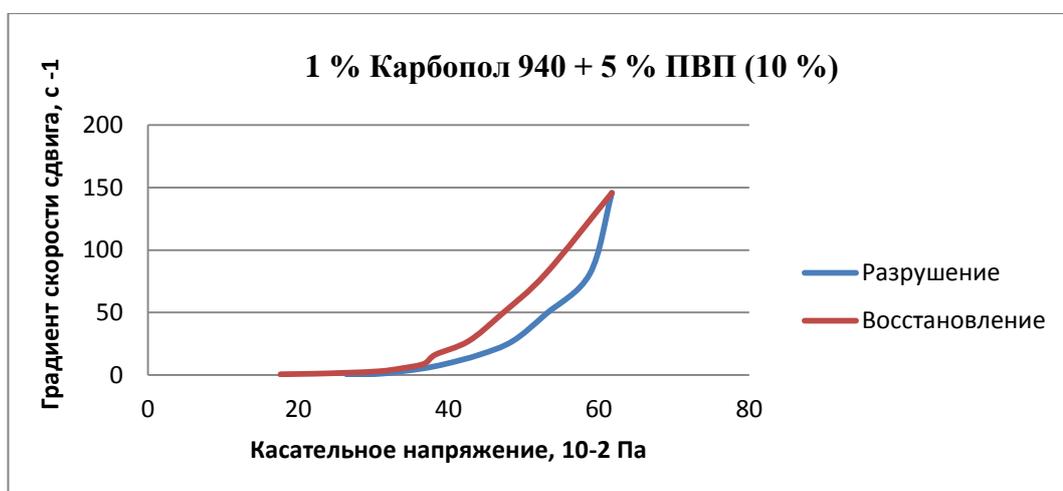


Рисунок 44 - Реограмма течения 1 %-ного карбопола с 5%-ным ПВП (10 %)

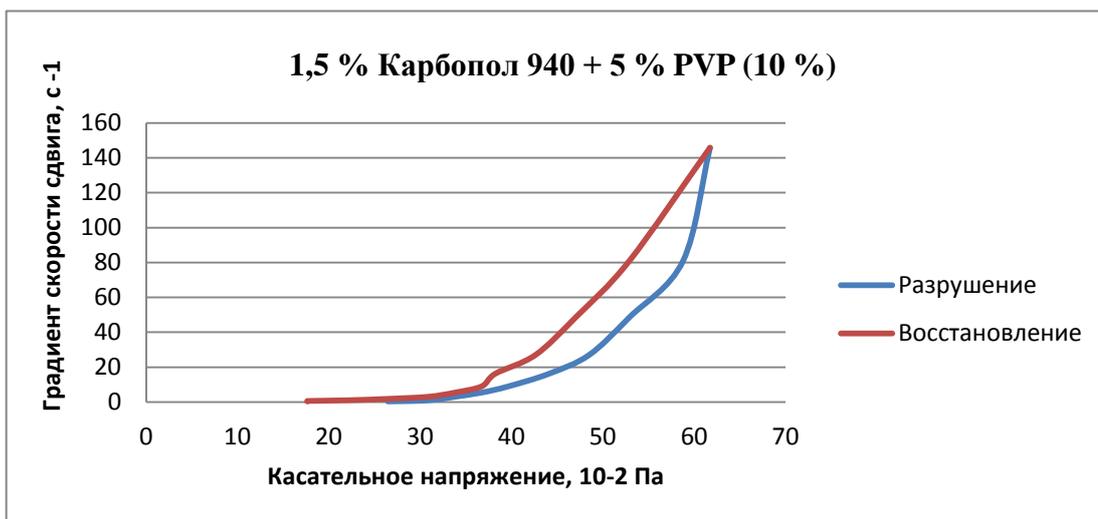


Рисунок 45 - Реограмма течения 1,5 %-ного карбопола с 5% ПВП (10%)

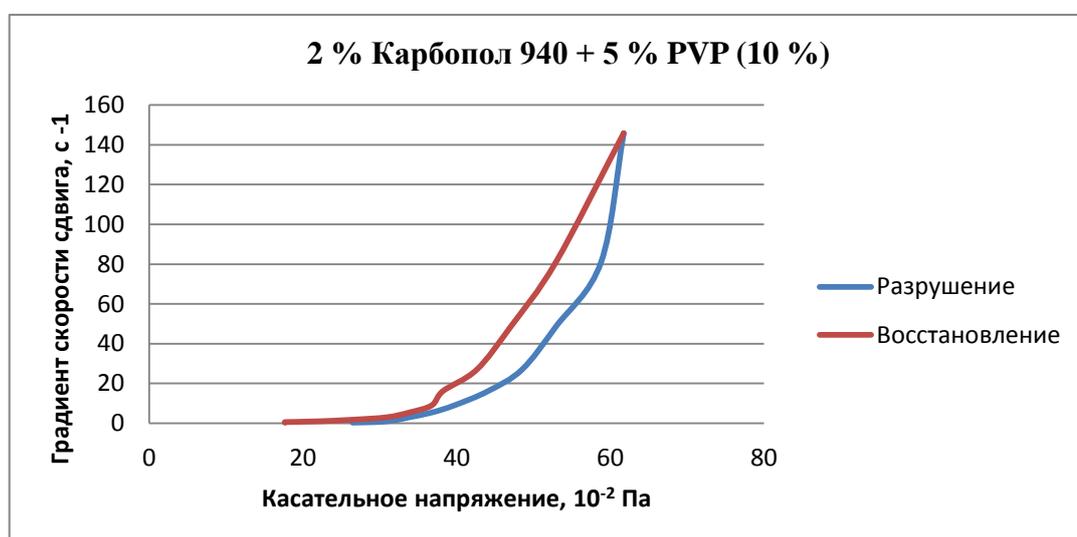


Рисунок 46 - Реограмма течения 2 %-ного карбопола с 5% ПВП (10%)

После приложенного напряжения система сохранила остаточную деформацию, что отражается на рисунках 41-46 различием восходящей и нисходящей кривых, характеризующими разрушение и восстановление структуры соответственно. Кривые вязкости образцов при введении в систему как 6 %-ного, так и 10%-ного ПВП свидетельствует о полном разрушении системы при увеличении скоростей сдвига и ее восстановлении после снятия напряжения.

Таким образом, 5 % содержание ПВП (как 6 %-ный, так и 10%-ный раствор) в гелевой основе с карбополом 940 оказывает положительное влияние на структуру мягкой лекарственной формы. Гель с поливинилпирролидоном представляет собой более структурированную, однородную и стабильную структуру по сравнению с исходной основой.

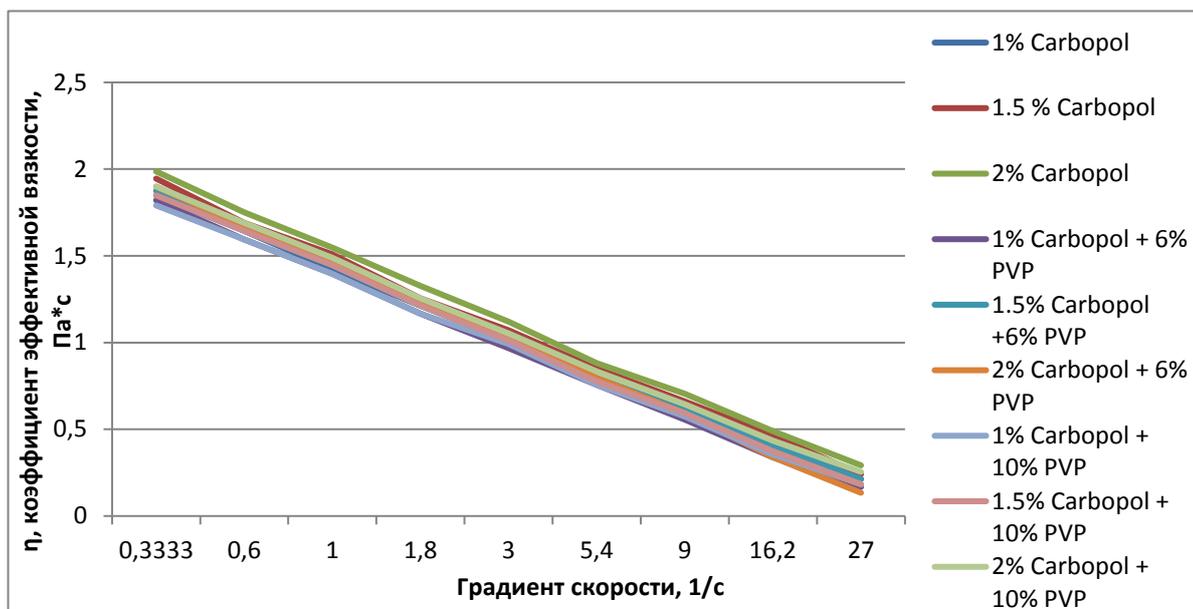


Рисунок 47 - Влияние пластификатора ПВП на структурно-механические свойства основ

Введение пластификатора ПВП как в концентрации 6 %, так и в концентрации 10 % не оказывает существенного влияния на структурно-механические свойства основы Карбопола 940. Так введение ПВП в 1 %, 1,5 % и 2 % растворы карбопола вязкость основы практически не изменяется при увеличении градиента сдвига от 0,3333 до 27 Па.

### 5.5 Разработка экспериментальных составов и технологии получения комбинированных гелей, содержащих аддукт иода D1

На основе полученных данных по взаимодействию субстанции D1 с гелевыми основами и вспомогательными веществами предложены следующие составы комбинированных гелей:

#### Состав 1:

Субстанции D1 – 1,0 г  
 Хлорамфеникола – 2,0 г  
 Карбопола 940 – 1,5 г  
 Поливинилпирролидона 6% – 5 г  
 Натрия гидроксида 10 % – 2,7 г  
 Метилпарабен-пропилпарабен 0,1 % спиртовой раствор - 0,1 г  
 Воды очищенной – до 100,0 г

#### Состав 2:

Субстанции D1 – 1,0 г  
 Хлорамфеникола – 0,75 г  
 Карбопола 940 – 1,5 г  
 Поливинилпирролидона 6% – 1,75 г  
 Натрия гидроксида 10 % – 2,7 г  
 Метилпарабен-пропилпарабен 0,1 % спиртовой раствор - 0,1 г  
 Воды очищенной – до 100,0 г

Данные комбинированные составы представляют собой гели, темно-коричневого цвета, однородные, мягкой консистенции, с запахом иода (рисунок 48)



а) комбинированный гель с аддуктом иода и хлорамениколом (0,75 %)

б) комбинированный гель с аддуктом иода и хлорамфениколом (2 %)

Рисунок 48 - Комбинированные гели с аддуктом иода

### 5.6 Изучение влияния активных фармацевтических ингредиентов на реологические свойства геля на основе карбопол 940 с 6 %-ным и 10 %-ным ПВП

На рисунках 49-52 представлены реограммы течения образцов геля на основе карбопол 940 с 6 %-ным и 10 %-ным ПВП.

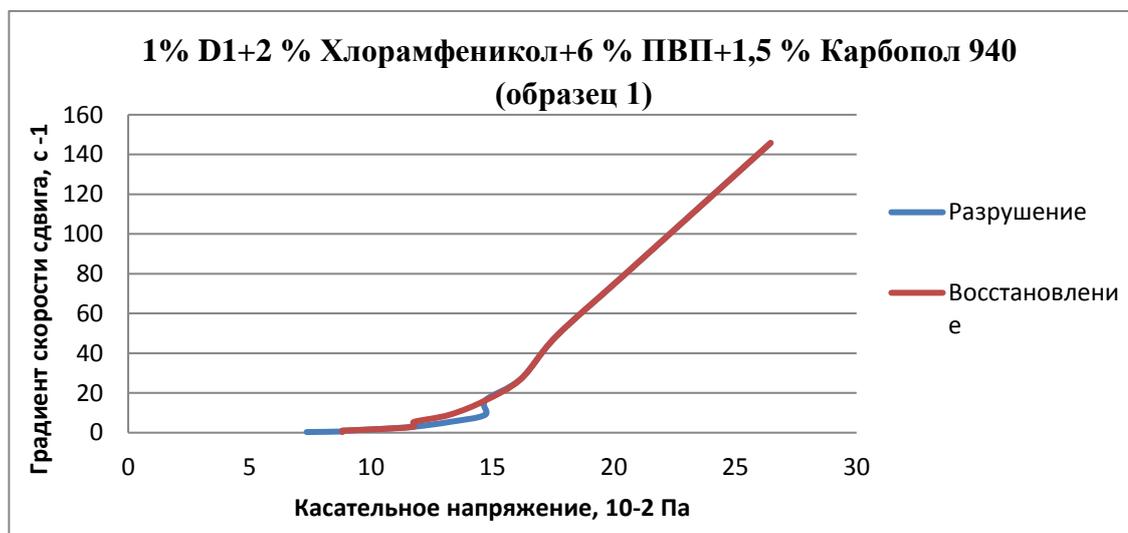


Рисунок 49 - Реограмма течения 1 %-ного карбопол 940 с АФИ (2 % хлорамфеникол, 1% субстанция D1, введенных с 6% ПВП)

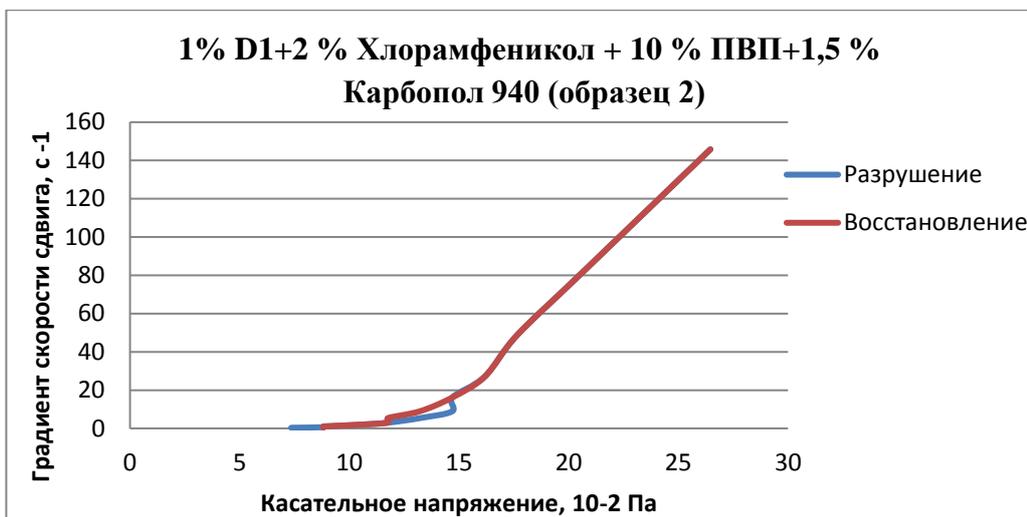


Рисунок 50 - Реограмма течения 1 %-ного карбопол 940 с АФИ (2 % хлорамфеникол, 1% субстанция D1, введенных с 10% ПВП)



Рисунок 51 - Реограмма течения 1 %-ного карбопол 940 с АФИ (0,75% хлорамфеникол, 1% субстанция D1, введенных с 6% ПВП)

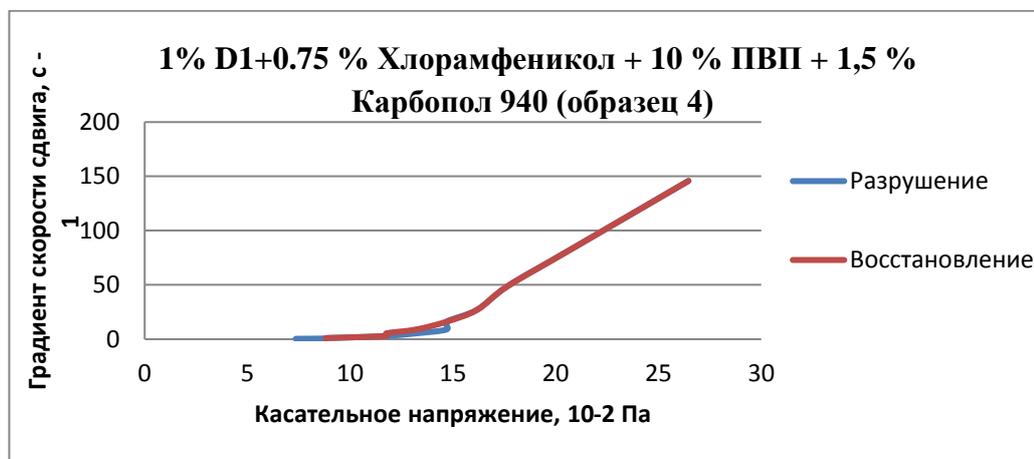


Рисунок 52 - Реограмма течения 1 %-ного карбопол 940 с АФИ (0,75% хлорамфеникол, 1% субстанция D1, введенных с 10% ПВП)

На основании реологических исследований мягких лекарственных форм субстанции D1 в комбинации как с 2 %-ным, так и 0,75 %-ным содержанием хлорамфеникола и их анализа выяснили, что образцы гелей на основе карбопола с 6 % или 10 %-ным ПВП обладают оптимальными структурно-механическими характеристиками и представляет собой тиксотропную высокопластичную систему, способную легко намазываться на кожу и обеспечивать необходимую стабильность системы при проведении технологических операций. Кроме того, субстанции АФИ оказывают положительное влияние на структурно-механические свойства мягкой лекарственной формы.

### 5.7 Изучение высвобождения хлорамфеникола из образцов гелей методом равновесного диализа

Сила и продолжительность терапевтического действия геля, способность заключать и высвобождать из себя действующее вещество, зависят от свойств вспомогательных веществ.

Сущность последней группы методов заключается в высвобождении действующего вещества из геля через полупроницаемую мембрану в диализную среду.

Хлорамфеникол в диализате количественно определяли на хроматографе Agilent 1200. Образец №1 и №2 – гелевые основы карбопола с 2 %-ным содержанием хлорамфеникола, образцы №3 и №4 - гелевые основы карбопола с 0,75 %-ным содержанием хлорамфеникола. В качестве раствора сравнения использовали диализат из геля – плацебо. Расчёты высвобождения лекарственного вещества из образцов проводились с использованием  $CO$  хлорамфеникола. На основании данных измерения концентрации хлорамфеникола, перешедшего в диализат строили кривые высвобождения, представленные на рисунке 53.

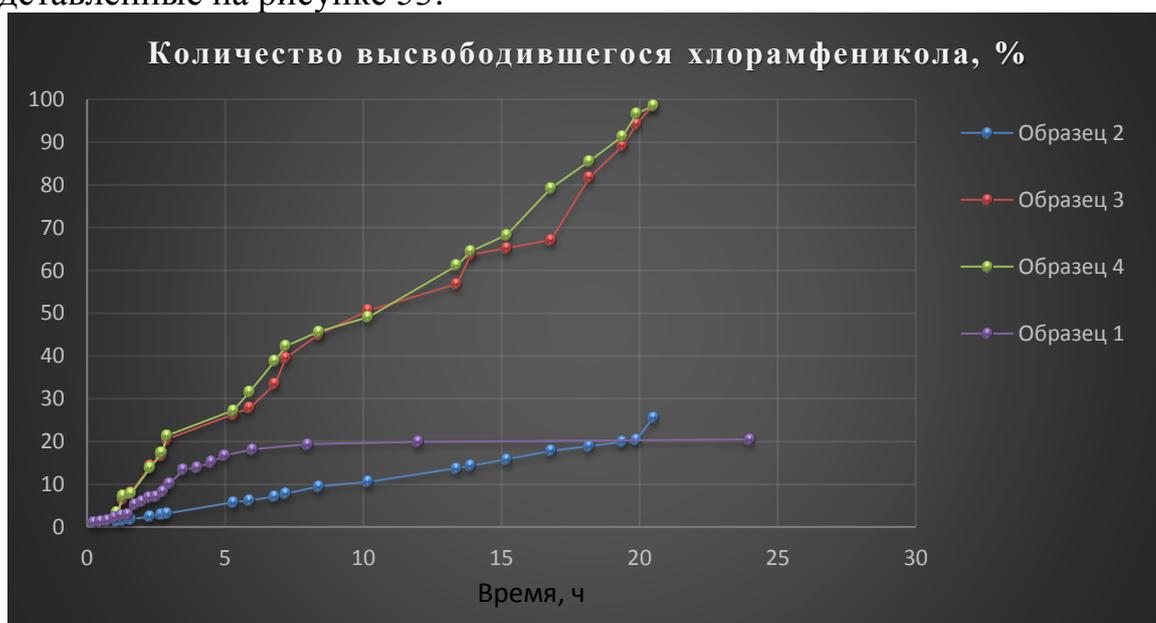


Рисунок 53 - Кинетический профиль высвобождения хлорамфеникола из гелей

Как следует из рисунка 53, гелевые основы карбопола с 0,75 %-ным хлорамфениколом (образец № 3 и образец №4) в течение 20 часов обеспечивают равномерное и полное высвобождение хлорамфеникола, по сравнению с образцами №1 и №2 с содержанием хлорамфеникола, равным 2%. На основании данного исследования было решено использовать 0,75 %-ное содержание хлорамфеникола в составе комбинированного средства, соответствующее такому в препарате сравнения – мази «Левомеколь». Таким образом состав комбинированного лекарственного средства выглядит следующим образом: субстанция D1 - 1,0 г, хлорамфеникол - 0,75 г, карбопол 940 – 1,5 г, поливинилпирролидон 6% – 1,75 г, натрия гидроксид 10 % – 2,7 г, метилпарабен-пропилпарабен 0,1 % спиртовой раствор - 0,1 г, вода очищенная – до 100,0 г. На комбинированное лекарственное средство подана заявка на изобретение (Приложение Б).

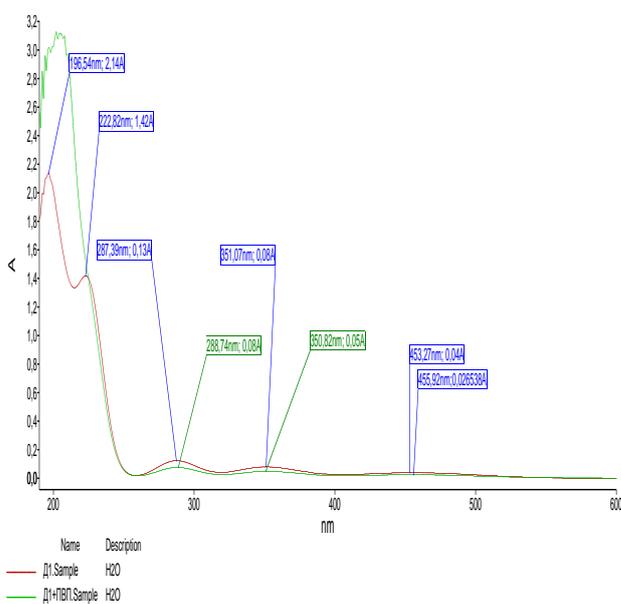
### 5.8 Исследование взаимодействия вспомогательных веществ с субстанцией D1 и хлорамфениколом методом УФ-спектроскопии

Прогнозирование совместимости, подбор оптимальных составов и технологических параметров являются основными критериями при оценке возможных взаимодействий компонентов лекарственных средств.

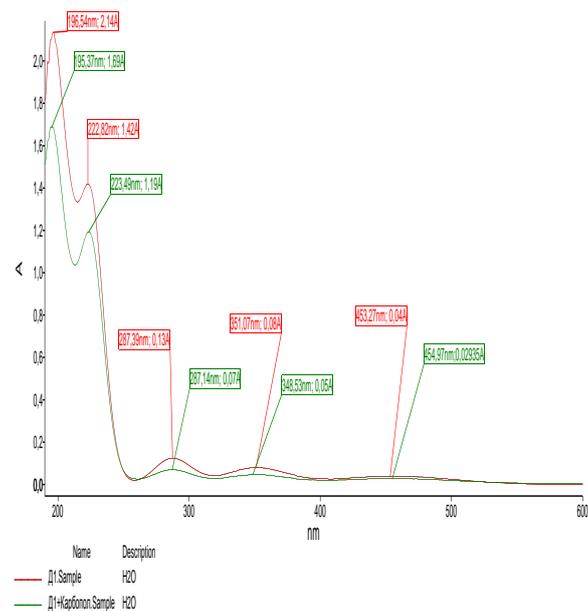
Следующим этапом исследования являлось изучение взаимодействия основных активных фармацевтических ингредиентов - субстанции D1 и хлорамфеникола со вспомогательными веществами.

Так как, иодсодержащие вещества и хлорамфеникол поглощают свет в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, то для изучения совместимости субстанций D1 и антибиотика хлорамфеникола с компонентами лекарственной формы применяли метод УФ-спектроскопии.

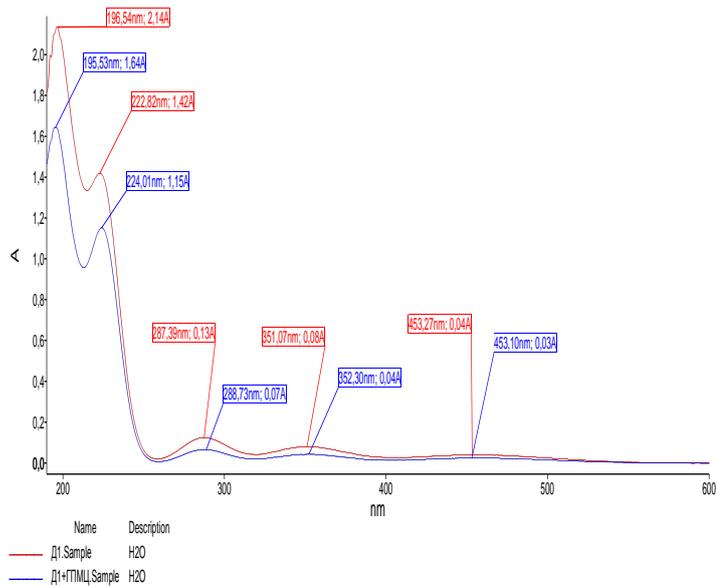
На рисунках 54-55 представлены спектры поглощения водных растворов субстанции D1 и хлорамфеникола со вспомогательными веществами.



а)

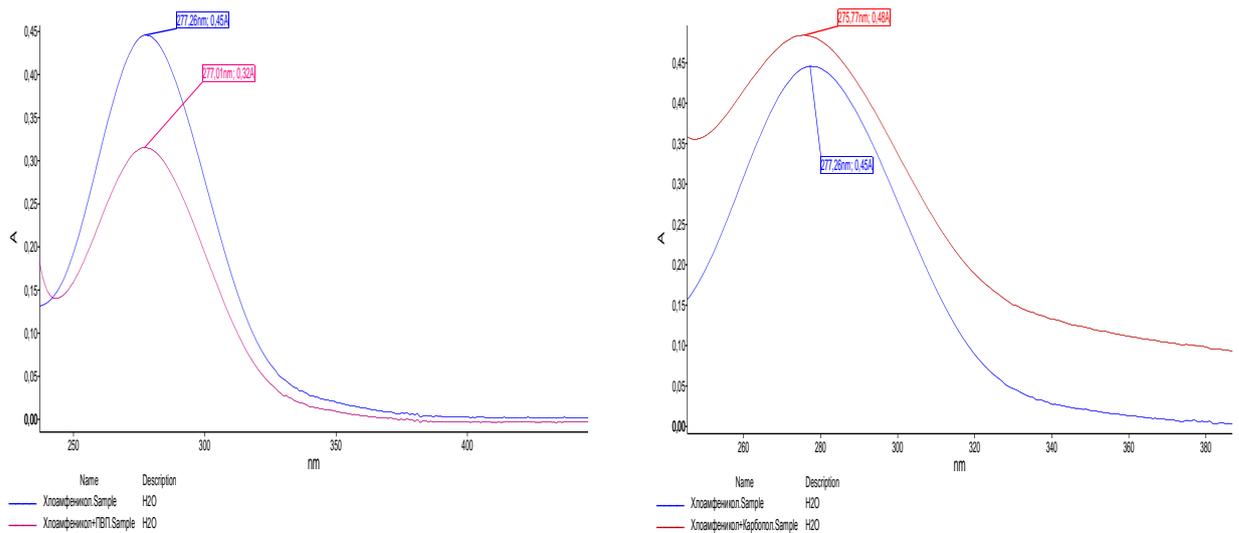


б)



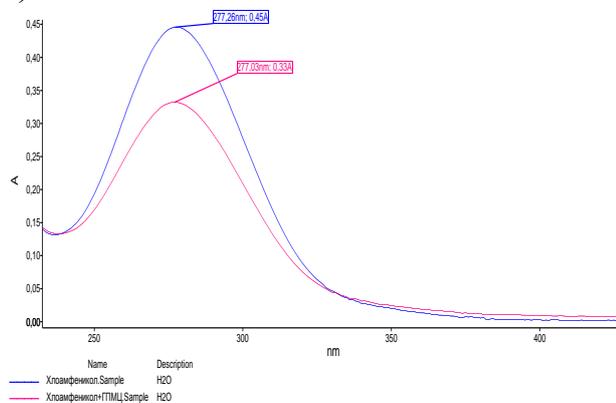
в)

Рисунок 54 – УФ-спектры поглощения водных растворов:  
 а) 0,01 % субстанция D1+ПВП; б) 0,01 % субстанция D1+Карбопол 940;  
 в) 0,01 % субстанция D1+ГПМЦ



а)

б)



в)

Рисунок 55 – УФ-спектры поглощения водных растворов:  
 а) Хлорамфеникол+ПВП; б) Хлорамфеникол+Карбопол 940; в) Хлорамфеникол+ГПМЦ

В электронных спектрах поглощения исследованных соединений, содержащих такие гетероатомы с неподелёнными парами электронов (НЭП) как кислород, азот и галогены, можно ожидать появления в спектре слабых или средних по интенсивности полос поглощения  $n \rightarrow \sigma^*$  переходов в интервале от 180 до 220 нм и выше, т.е. в средней УФ области.

Относительно пика поглощения, характерного для антибиотика хлорамфеникола – 278 нм (рисунок 55а, б, в), следует отметить, что его интенсивность сохраняется в смесях со вспомогательными веществами.

Кроме того, анализ полученных данных показал, что в спектрах (рисунок 54-55) не наблюдаются характерные изменения, отличающие их от спектров индивидуальных соединений, свидетельствующие о взаимодействии компонентов (возникновении внутри и межмолекулярных водородных связей, образовании новых связей с переносом заряда) во всех изученных системах.

Таким образом, при анализе полученных данных можно обнаружить характерные функциональные группы исследуемых веществ, а в смеси определяется основные компоненты – субстанция D1 и хлорамфеникол, что свидетельствует об отсутствии химического взаимодействия между выбранными компонентами смеси. Полученные результаты использовали для исключения нежелательных взаимодействий путем изменения компонентного состава и технологии.

## **5.9 Исследование взаимодействия вспомогательных веществ с субстанцией D1 и хлорамфениколом методами ДСК и ТГМ**

С помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) можно определить множество разнообразных величин, характеризующих свойства веществ и материалов и представляющих интерес, как для теории, так и для практики. ДСК позволяет, например, измерить характеристические температуры и выделяемое или поглощаемое тепло, физических процессов или химических реакций, происходящих в образцах твердых тел и жидкостей при их контролируемом нагреве или охлаждении. ДСК является наиболее часто используемым методом в термическом анализе.

Быстрота получения результатов анализа, большое значение для решения исследовательских задач и контроля качества сырья и продукции, удобство в обращении обуславливают его возрастающую роль в исследовании веществ и материалов [115]. Нагревание лекарственных веществ до температуры, не вызывающей термического разложения, приводит к ряду изменений в их физических свойствах. Происходят полиморфные превращения, растворение в кристаллизационной воде, удаление сорбционной и кристаллизационной воды, сублимация, плавление, кипение [115]. В зависимости от природы вещества, температуры и условий нагревания могут происходить химические превращения: структурирование, термическая, окислительная или гидролитическая деструкция.

Исследования взаимодействия субстанции D1 со вспомогательными веществами проводили методом ДСК и ТГ на приборе синхронного термоанализатора STA 449 F1 Jupiter (NETZSCH, Германия), образцы субстанции D1 и вспомогательных веществ весом 1-5 мг нагревались в интервале температур от 28 до 500 °С в закрытых корундовых тиглях объемом 85 мкл со скоростью 10 °С/мин в атмосфере сухого азота (скорость потока газа 40 мл/мин). На термограммах были зафиксированы изменения теплоемкости образца (ДСК).

Определение температуры плавления веществ осуществляли с помощью программы Netzsch-Proteus по точке пересечения касательных, проведенных к началу эндотермического пика на кривой ДСК. Проведён термический анализ исходных компонентов и смеси [87, с.102].

Кривые нагревания испытуемых образцов представлены на рисунках 56-59.

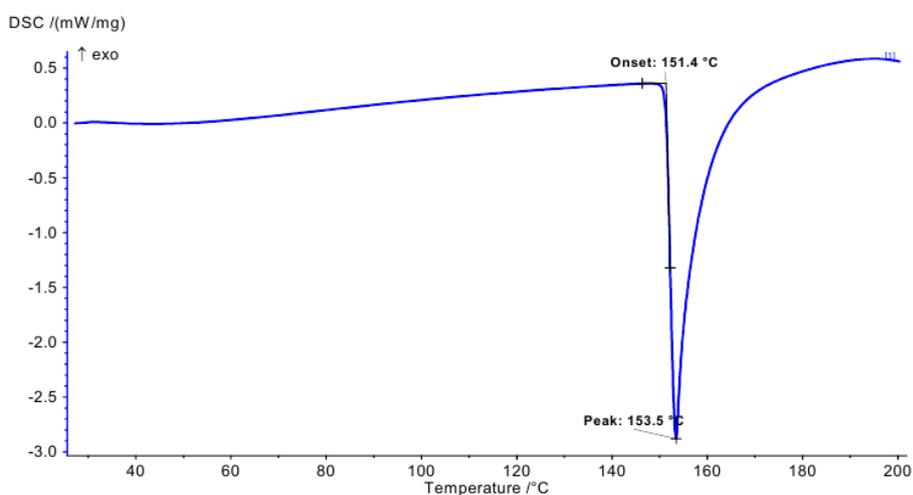


Рисунок 56– Кривые ДСК Хлорамфеникол

Температура плавления хлорамфеникола составляет 153,5 °С, что хорошо совпадает с данными литературы.

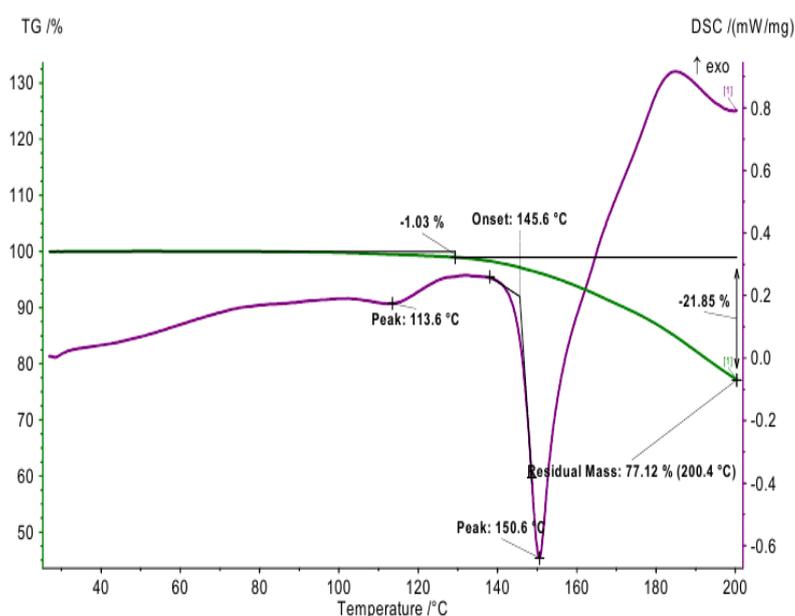
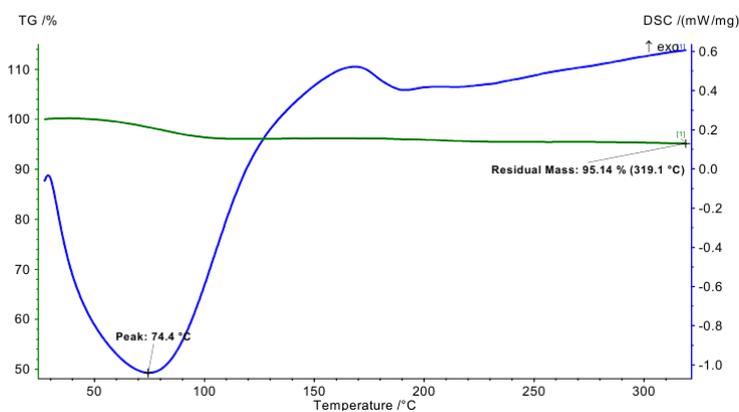
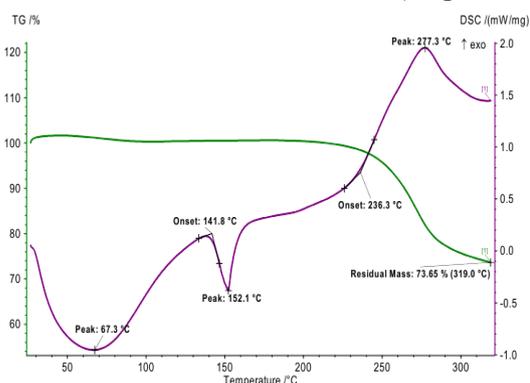


Рисунок 57 – Кривые ДСК и ТГ: смесь субстанции D1 + хлорамфеникол

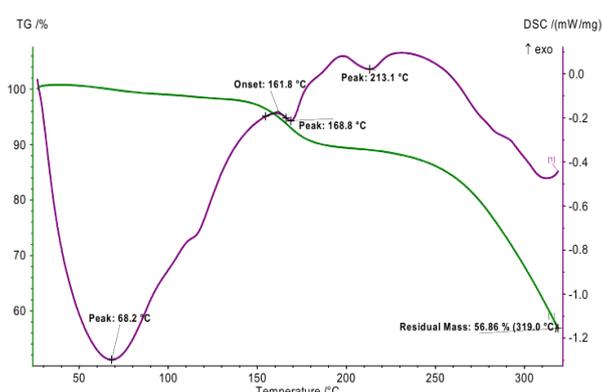
Для сухой смеси субстанции хлорамфеникола и субстанции D1 (рисунок 57) наблюдается эндотермический пик при 150,6 °С, что на 3 °С ниже температуры плавления чистого хлорафеникола (рисунок 38) и на 16 °С ниже температуры плавления субстанции D1. Это свидетельствует об образовании субстанцией D1 и хлорамфениколом эвтектической смеси, инконгруэнтно плавящейся при 150,6 °С.



а) Кривые ДСК и ТГ ПВП 40.000



б) Кривые ДСК и ТГ: смесь ПВП + Хлорамфеникол



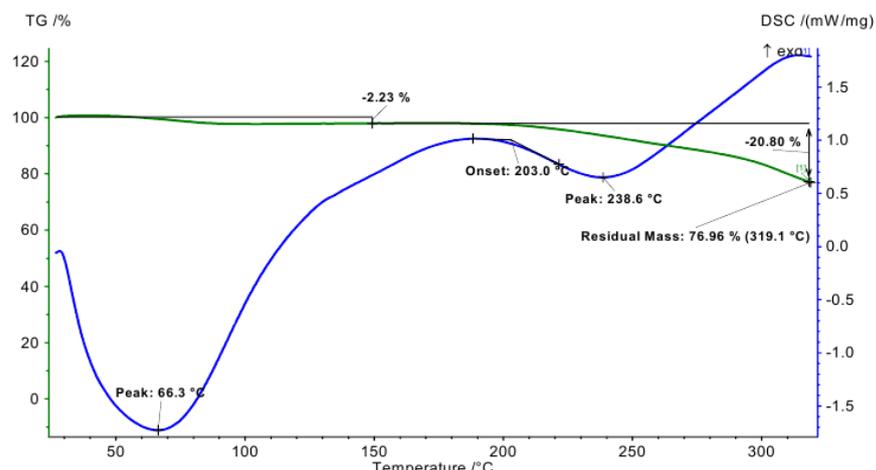
в) Кривые ДСК и ТГ: смесь субстанции D1 и ПВП

Рисунок 58 – Кривые ДСК и ТГ

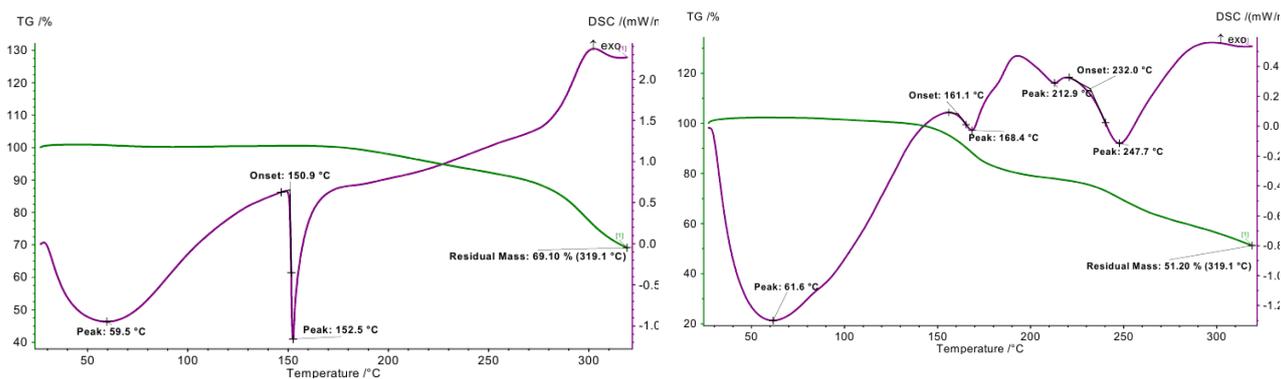
Данные ДСК и термогравиметрии ПВП и его смесей с АФИ представлены на рисунке 58

На ДСК кривой ПВП (рисунок 58а) наблюдается эндотермический эффект при 74,4 °С, связанный с межмолекулярным взаимодействием воды и ПВП (влажность субстанции ПВП составляет 3,5 %). Эндотермический эффект с максимумом при ~175 °С соответствует температуре размягчения ПВП.

На кривых ДСК и ТГ смеси ПВП и хлорамфеникола (рисунок 58б) сохраняется эндотермический эффект, характерный для ПВП, и эндотермический эффект плавления хлорамфеникола при 152,1 °С. Разложение смеси начинается выше температуры плавления ПВП и сопровождается потерей массы из-за образования летучих продуктов разложения.



а) Кривые ДСК и ТГ Карбопол 940



б) Кривые ДСК и ТГ смесь Карбопол 940+ Хлорамфеникол

в) Кривые ДСК и ТГ смесь субстанции D1 и Карбопол 940

Рисунок 59– Кривые ДСК и ТГ

На кривых плавления карбопола 940, как в смеси с субстанцией D1, так и в смеси с хлорамфениколом сохраняются характерный пик температуры плавления карбопола – около 238 °С. Пик температуры плавления 152,2 °С субстанции хлорамфеникола в смеси с карбопол 940 также сохраняется. Характерные пики плавления субстанции D1 – в диапазоне 168,4 °С в смеси с карбопол 940, также сохраняются.

На ДСК/ТГ кривых данных смесей не наблюдается заметных изменений тепловых эффектов, соответственно, можно заключить, что субстанции хлорамфеникола и D1 совместимы с полимером карбопол 940.

Верхней предел температуры технологического процесса составляет 150 °С. Полученные результаты важны для исключения нежелательных взаимодействий путем изменения компонентного состава и технологии.

## 5.10 Описание геля

Испытание по показателю «Описание» проводилось визуально. Полученный гель представлял собой гель темно-коричневого цвета, однородный, мягкой консистенции, с запахом иода.

## 5.11 Изучение однородности геля

Для подтверждения неизменности органолептических показателей геля была проведена микроскопическая оценка свежеприготовленного геля сразу после приготовления и после 24 месяцев хранения на фазово-контрастном микроскопе Leica DM 2500 (Германия) при увеличении  $\times 10$ , по результатам которой установили, что образцы геля сохраняют свою однородность и стабильность в течение 24 месяцев (рисунок 60).

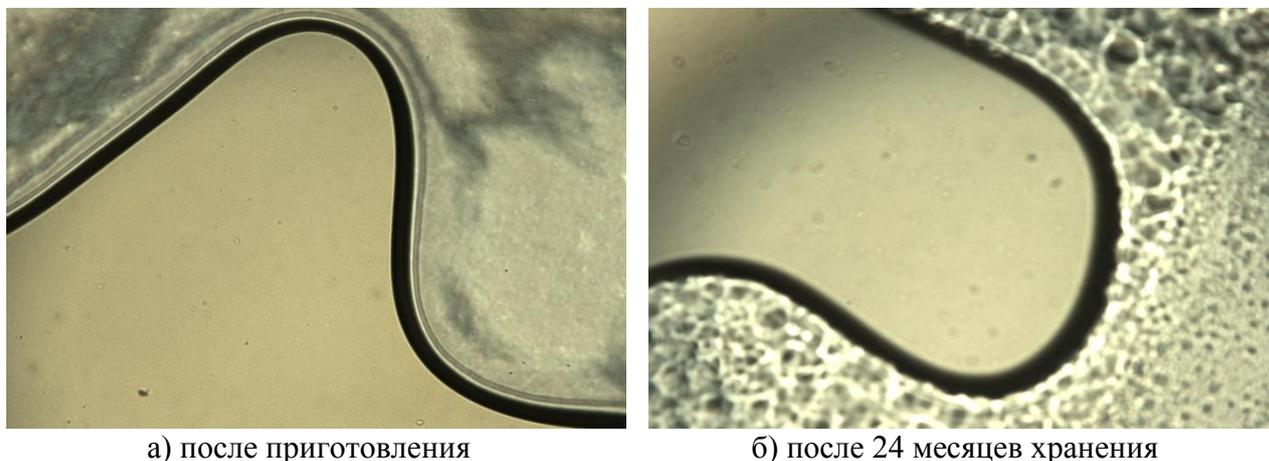


Рисунок 60 - Микроскопическое исследование гелей, ув.  $\times 10$

Из рисунков следует, то гель сохраняет свою однородность и физико-химические свойства в течение всего периода хранения.

## **5.12 Технологическая схема производства комбинированного геля**

### **Стадия 1**

**ВР1:** Подготовка очищенной воды: для изготовления данного сырья используется система обратного осмоса и мембранная очистка. Показатели качества воды по спецификации: проводимость не более 1,1 мкСм/см при 20° С, ТОС не более 0,5 мг/л, бактерии не более 50 КОЕ/мл. Для получения используется питьевая вода. Система очистки воды, состоящая из последовательно расположенных: фильтра очистки от механических примесей А 5310, угольного фильтра АКФ 300, ионообменной колонки Rondomat E 50 DWZ, блока обратного осмоса UO 150 и блока УФ дезинфекции Bwades 58С, все производства компании BWT (Германия) [87, с.54].

### **Стадия 2**

**ВР2:** Санитарная обработка производства

Осуществляется в соответствии с требованиями действующей нормативной документации и включает в себя комплекс мероприятий подготовки воздуха, с контролем микробной обсемененности не реже 1 раза в месяц, а также приготовление дезинфицирующих растворов для санитарной обработки. Для достижения и обеспечения соответствующего класса чистоты подготовка помещений производства к работе включала влажную уборку, дезинфекцию, ультрафиолетовое облучение производственных помещений. Подготовка

технологического оборудования заключается в мойке и стерилизации всей лабораторной посуды моющими и дезинфицирующими средствами.

### **Стадия 3**

**ВР3:** Подготовка сырья: До поступления в производственный отдел действующие и вспомогательные вещества проверить на соответствие требованиям нормативной документации. В предварительно подготовленные индивидуальные тары на технических весах отвешивают субстанцию D1, хлорамфеникол, карбопол, поливинилпирролидон, натрия гидроксид, нипагин-нипазол и воду.

**ВР3.1: Подготовка 10%-ного раствора натрия гидроксида.** В плоскодонную стеклянную колбу объемом 250 мл помещают навеску 10 г натрия гидроксида и добавляют 90 г воды очищенной. Раствор перемешивается в течение 10 мин при комнатной температуре.

**ВР3.2: Подготовка 6 %-ного раствора поливинилпирролидона.** В плоскодонную стеклянную колбу объемом 250 мл помещают навеску 6 г поливинилпирролидона и добавляют 94 г воды очищенной. Раствор перемешивается в течение 10 мин при комнатной температуре.

**ВР3.3: Подготовка 0,1%-ного раствора нипагин-нипазол.** В плоскодонную стеклянную колбу объемом 250 мл помещают навеску 0,1 г смеси нипагин-нипазол (7:3) и добавляют 99,9 г спирта этилового. Раствор перемешивается в течение 10 мин при комнатной температуре.

### **Стадия 4**

#### **ТП 4: Приготовление комбинированного антимикробного геля**

**ТП. 4.1. Приготовление основы (смачивание полимера).** В реактор подают предварительно взвешенный карбопол 940. Смачивают небольшим количеством воды и выдерживают от 30 мин до 1 часа. Затем интенсивно перемешивают с помощью роторной мешалки, постепенно добавляя воду до образования гомогенной гидрофильной основы.

**ТП.4.2. Введение раствора субстанции D1 в 6%-ный раствор ПВП.** Предварительно взвешенную в индивидуальной таре субстанцию D1 растворяют в 6 %-ном растворе поливинилпирролидона.

**ТП.4.3. Приготовление суспензии субстанции хлорамфеникола.** В предварительно взвешенную в индивидуальной таре субстанцию хлорамфеникола добавляют воду очищенную. Тщательно перемешивают до получения однородной суспензии.

**ТП 4.3. Нейтрализация полимера раствором 10 %-ного раствора натрия гидроксида.** В реактор с готовой гелевой основой, при медленном перемешивании, добавляют раствор гидроксида натрия до образования однородного прозрачного геля с рН 5,5-6,0. После этого добавляют раствор консерванта (нипагин-нипазол 0,1 %-ный), тщательно перемешивают

**ТП 4.4. Смешивание ингредиентов геля.** В реактор с готовой гелевой основой, при медленном перемешивании, добавляют введенную в ПВП субстанции D1 и суспензию субстанции хлорамфеникола.

**ТП 4.5. Гомогенизация геля.** Гомогенизацию геля осуществляют в роторном гомогенизаторе в течение 30 мин. Контроль равномерного распределения субстанции D1 и субстанции хлорамфеникола в основе осуществляют визуально по достижению однородной окраски основы.

#### **Стадия 5**

**УМО 5. Фасовка, упаковка и маркировка геля.** Готовый гель фасуют по 20 г во флаконы из темного стекла типа объемом 20 мл с пластмассовой и завинчивающейся крышками. На первичной упаковке фиксируют МНН и ТН лекарственного препарата, дату выпуска, срок годности, номер серии, концентрацию. На картонной пачке фиксируют МНН и ТН лекарственного препарата, наименование производителя лекарственного препарата, дату выпуска серию, срок годности, концентрацию, массу, номер РУ на лекарственную форму, способ применения, условия отпуска, условия хранения, предупредительные надписи. Технологическая схема производства комбинированного геля с аддуктом иода D1 и хлорамфениколом представлена на рисунке 61

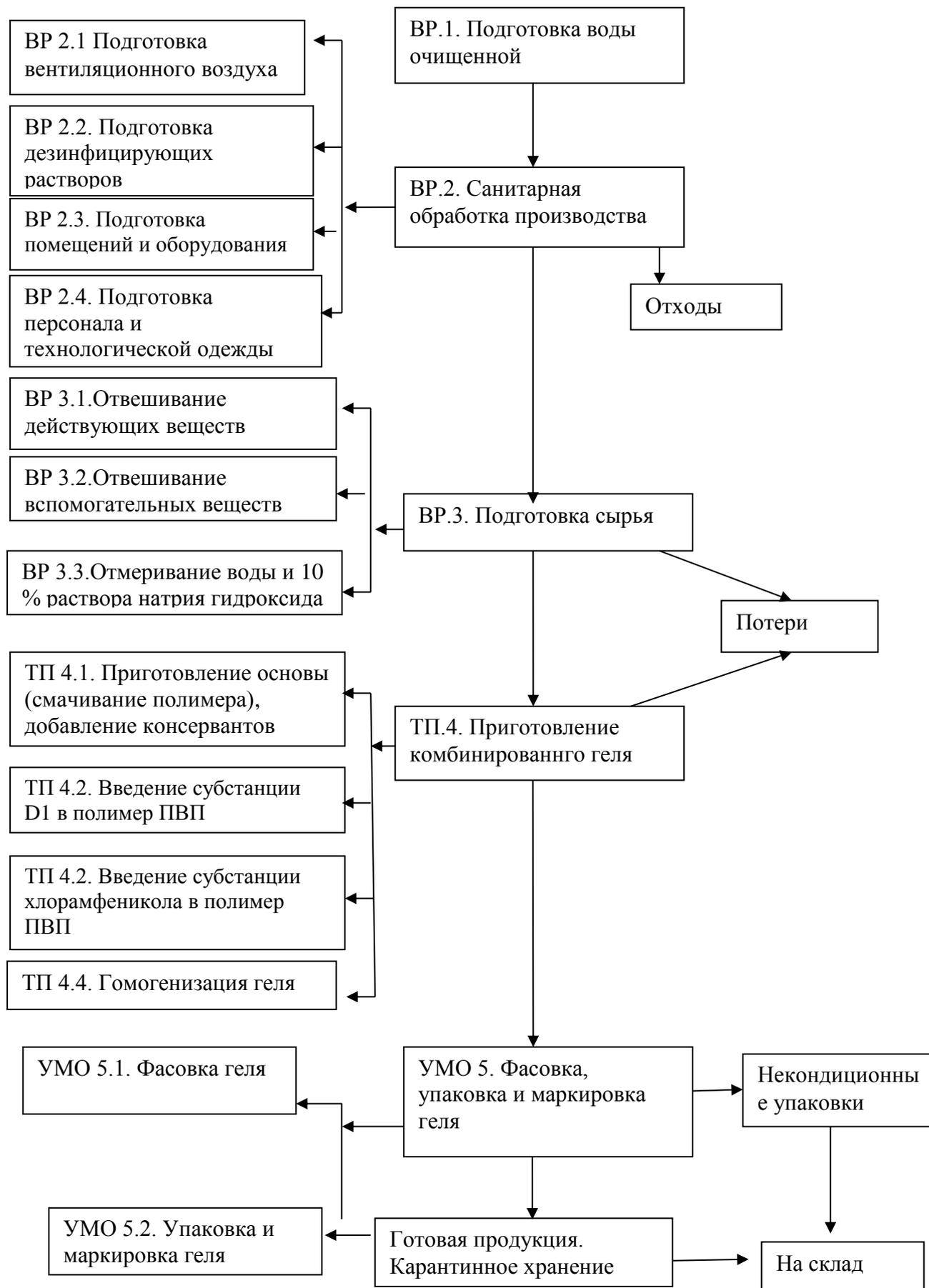


Рисунок 61 - Технологическая схема производства комбинированного геля с субстанцией D1 и хлорамфениколом

### 5.13 Стандартизация и контроль качества комбинированного антимикробного геля

С целью стандартизации комбинированного антимикробного геля разработан и утвержден нормативный документ, который согласно ГФ РК I, том 1, приложение 1 содержит показатели качества, включаемые в аналитическую нормативную документацию на мягкие лекарственные средства для наружного применения (Приложение Е).

По органолептическим, физико-химическим показателям микробиологической чистоте, комбинированный антимикробный гель должен соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице 38.

Таблица 38 - Спецификация качества комбинированного антимикробного геля

Показатель качества	Методика испытаний	Норма
Описание	ГФ РК, т. 1, с.547	Гомогенный гель темно-коричневого цвета с запахом иода
Идентификация - субстанция D1 и хлорамфеникол	ГФ РК, том 2, с.248 ГФ РК, том 1, 2.3.1	-при нагревании геля в пробирке, должны выделяться фиолетовые пары иода - в УФ-спектре геля должны быть максимумы поглощения характерные для субстанции D1 при (195÷196; 221÷224; 283÷286; 347÷352; 450÷455) нм и максимум поглощения характерный для хлорамфеникола при 278 нм.
Масса содержимого в упаковке	В соответствии с НД	Отклонение от средней массы содержимого в упаковке допускается не более $\pm 1,5$ %.
Однородность геля	ГФ РК I, том 1, «Мягкие лекарственные средства для наружного применения», приложение 1	Гель должен быть однородным
pH	ГФ РК т.1, 2.9.7	5,5-6,0
Примеси	ГФ РК, т. 1, 2.4.16	Менее 1 %
Количественное определение: - иода - хлорамфеникола	В соответствии с НД	- от 0,95 % до 1,05 % -от 0,71 % до 0,79 %
Микробиологическая чистота	ГФ РК, т.1, 2.6.12 2.6.13	Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I т.1, 5.1.4, категория 2. В 1 грамме препарата допускается наличие: - не более 100 аэробных бактерий и грибов (суммарно), - не более 10 энтеробактерий. В 1 г препарата не допускается наличие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> .

Для установления подлинности активных фармацевтических ингредиентов – субстанции D1 и антибиотика хлорамфеникола, применим метод УФ-спектрометрии, описанной в пп..2.2.5.

Количественное определение иода определяют согласно пп. 2.2.2

Количественное определение хлорамфеникола проводят в соответствии с методом, валидированном для комбинированного геля.

### **5.13.1 Валидация методики количественного определения хлорамфеникола в комбинированном антимикробном геле**

Количественное определение активного компонента – хлорамфеникола проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Agilent 1200 (Agilent Technologies, Германия).

В качестве стандартных образцов использовали хлорамфеникол (99.9%, Sigma-Aldrich, Германия), ацетонитрил и метанол для ВЭЖХ ( $\geq 99.9\%$ , Sigma-Aldrich, Германия); н-гексан и ацетон для ВЭЖХ ( $\geq 99.9\%$ , Panreac, Испания); этилацетат для ВЭЖХ ( $\geq 99.9\%$ , Fisher Chemical, Германия); хлороформ х. ч. (ЗАО “База № 1 Химреактивов”, Россия).

Условия хроматографирования оптимизировали на колонке длиной 150 мм, внутренним диаметром 2.1 мм и с зернением сорбента 3.5 мкм Zorbax SB C18 (Agilent Technologies, США). Пробы перед анализом методом ВЭЖХ фильтровали с помощью мембранных шприцевых фильтров из регенерированной целлюлозы (13 мм, 0.2 мкм, Millipore).

На основании результатов предварительных исследований по оптимизации методики количественного определения хлорамфеникола в лекарственных препаратах, нами выбрана следующая методика: 1,0 мл геля помещают во флакон из стеклотрота объемом 20 мл, прибавляют 200 мкл этанольного раствора сульфаметоксазола с концентрацией 25,0 мкг/мл (внутренний стандарт) 3,0 мл ацетонитрила и 1 г натрия сульфата. Флакон герметично закупоривают и интенсивно встряхивают в течение 50 секунд. Полученную смесь центрифугируют (3000 об/мин - 15 мин), затем 2,5 мл супернатанта переносят в центрифужные пробирки объемом 10 мл и упаривают досуха в токе воздуха при 45 °С.

К сухому остатку прибавляют 0,5 мл смеси вода-ацетонитрил (75:25) и аликвоту в 10 мкл вводят в хроматографическую систему. Хроматографирование проводят при температуре колонки 30 °С. Подвижная фаза: вода, подкисленная ортофосфорной кислотой до значения рН 2-3 - ацетонитрил (77:23 по объему), расход этонга 1,0 мл/мин.

Детектирование осуществляют при длине волны  $\lambda=278$  нм. Расчет содержания хлорамфеникола в геле проводят по градуировочному графику зависимости концентрации хлорамфеникола от отношения площадей хроматографических пиков хлорамфеникола и сульфаметоксазола (внутренний стандарт) Основные данные по валидации представлены ниже.

**Селективность (специфичность):** разрешение хроматографических пиков хлорамфеникола и сульфаметоксазола с соседними составляет более 1,5; на

хроматограммах нулевых образцов отсутствуют хроматографические пики со временем удерживания 7,9 мин и 6,1 мин, соответствующем временам удерживания хлорамфеникола и сульфаметоксазола

**Правильность и внутрилабораторная точность:** результаты количественного определения хлорамфеникола в геле по методу «введено-найденно» представлено в таблице 39 (в разные дни).

Таблица 39 - Результаты количественного определения хлорамфеникола в геле (P=0,95; n=9)

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл X+ΔX	S <sub>r</sub>	R, %	δ. %
0,39	0,36±0,02	0,076	95,7	-6,78
0,78	0,77±0,02	0,044	100,6	0,71
1,56	1,60±0,03	0,025	104,5	2,45
3,13	3,17±0,06	0,028	103,7	1,37
6,25	6,31±0,14	0,032	101,0	0,96
12,5	12,48±0,29	0,033	99,8	-0,17
25,0	24,95±0,57	0,033	99,8	-0,21

**Линейный диапазон определяемых содержаний.** Хлорамфеникол в геле определяли по градуировочному графику по формуле:

$$C = b \times K, \quad (8)$$

где b - угловой коэффициент градуировочного графика;

C - концентрация хлорамфеникола в геле, мкг/мл,

K - отношение площадей хроматографических пиков хлорамфеникола и сульфаметоксазола (внутренний стандарт).

Линейный диапазон определяемых концентраций хлорамфеникола по использованной методике составляет 0,39 - 25,00 мкг/мл. нижняя граница определяемых содержаний левомицетина - 0,39 мкг/мл, предел обнаружения (при соотношении сигнал/шум =3) - 0,09 мкг/мл.

Разработанная методика позволяет обеспечить надежное количественное определение лекарственного вещества - хлорамфеникола в геле в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (GLP).

#### **5.14 Установление сроков хранения комбинированного антимикробного геля**

Результаты проведения долгосрочных испытаний стабильности при температуре 25 ± 2 °С и относительной влажности 60 ± 5 % представлены в таблицах 40-42, которые охватывают основные параметры качества, подверженные изменениям при хранении: описание, идентификация, однородность, масса содержимого в упаковке, рН, микробиологическая чистота,

количественное определение. Периодичность контроля образцов составляет 0, 3, 6, 9, 12, мес.

Таблица 40 – Результаты испытания стабильности при хранении комбинированного антимикробного геля, серия 01090917. Дата начала и окончания испытаний: 09.09.2017 г. - 09.09.2018 г. гг, T=25±2 °С, RH=60±5 %

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.				
			0	3	6	9	12
Описание	ГФ РК, т. 1, с547	Гомогенный гель темно-коричневого цвета с запахом иода	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Идентификация - субстанция D1 и хлорамфеникол	ГФ РК, том 2, с.248 ГФ РК, том 1, 2.3.1	-при нагревании геля в пробирке, должны выделяться фиолетовые пары иода - в УФ-спектре геля должны быть максимумы поглощения характерные для субстанции D1 при (195÷196; 221÷224; 283÷286; 347÷352; 450÷455) нм и максимум поглощения характерный для хлорамфеникола при 278 нм.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Масса содержимого в упаковке	В соответствии с НД	Отклонение от средней массы содержимого в упаковке допускается не более ± 1,5 %.	20,03	20,04	20,02	20,03	20,02
Однородность геля	ГФ РК I, том 1, «Мягкие лекарственные средства для наружн	Гель должен быть однородным	Однородный	Однородный	Однородный	Однородный	Однородный

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.					
			0	3	6	9	12	
	ого применения», приложение 1							
pH	ГФ РК т.1, 2.9.7	5,5-6,0	5,7	5,6	5,7	5,6	5,7	
Примеси	ГФ РК, т. 1, 2.4.16	Менее 1%	0,5	0,4	0,6	0,5	0,6	
Количественное определение: - иода - хлорамфеникола	В соответствии с НД	- от 0,95 % до 1,05 % -от 0,71 % до 0,79 %	- 1,02 - 0,72	- 1,01 - 0,72	- 1,02 - 0,73	- 1,01 - 0,72	- 0,99 - 0,73	
Микробиологическая чистота	ГФ РК, т.1, 2.6.12 2.6.13	<p>Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I т.1, 5.1.4, категория 2. В 1 грамме препарата допускается наличие:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- не более 100 аэробных бактерий и грибов (суммарно),</li> <li>- не более 10 энтеробактерий.</li> </ul> <p>В 1 г препарата не допускается наличие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	- менее 10, - менее 10, Отсутствую т	- менее 10, - менее 10, Отсутствую т	Примеси (общая зола)	ГФ РК, т. 1, 2.4.16	Менее 1%	0

Таблица 41 – Результаты испытания стабильности при хранении комбинированного антимикробного геля, серия 02100917. Дата начала и окончания испытаний: 10.09.2017 г. - 10.09.2018 г. гг, T=25±2 °C, RH=60±5 %

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.				
			0	3	6	9	12
Описание	ГФ РК, т. 1, с547	Гомогенный гель темно-коричневого цвета с запахом иода	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Идентификация - субстанция D1 и хлорамфеникол	ГФ РК, том 2, с.248 ГФ РК, том 1, 2.3.1	-при нагревании геля в пробирке, должны выделяться фиолетовые пары иода - в УФ-спектре геля должны быть максимумы поглощения характерные для субстанции D1 при (195÷196; 221÷224; 283÷286; 347÷352; 450÷455) нм и максимум поглощения характерный для хлорамфеникола при 278 нм	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Масса содержимого в упаковке	В соответствии с НД	Отклонение от средней массы содержимого в упаковке допускается не более ± 1,5 %.	20,01	19,97	20,01	19,98	19,98
Однородность геля	ГФ РК I, том 1, «Мягкие лекарственные средства для наружного	Гель должен быть однородным	Однородный	Однородный	Однородный	Однородный	Однородный

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.					
			0	3	6	9	12	
	<i>применения», приложение 1</i>							
рН	ГФ РК т.1, 2.9.7	5,5-6,0	5,6	5,7	5,8	5,6	5,7	
Примеси	ГФ РК, т. 1, 2.4.16	Менее 1%	0,5	0,4	0,6	0,5	0,6	
Количественное определение: - иода - хлорамфеникола	В соответствии с НД	- от 0,95 % до 1,05 % -от 0,71 % до 0,79 %	- 0,99 - 0,73	- 0,98 - 0,72	- 0,99 - 0,74	- 1,01 - 0,73	- 0,98 - 0,73	
Микробиологическая чистота	ГФ РК, т.1, 2.6.12 2.6.13	Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I т.1, 5.1.4, категория 2. В 1 грамме препарата допускается наличие: - не более 100 аэробных бактерий и грибов (суммарно), - не более 10 энтеробактерий. В 1 г препарата не допускается наличие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> .	- менее 10, - менее 10, Отсутствую т					

Таблица 42 – Результаты испытания стабильности при хранении комбинированного антимикробного геля, серия 03110917. Дата начала и окончания испытаний: 11.09.2017 г. - 11.09.2018 г. гг, T=25±2 °C, RH=60±5 %

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.				
			0	3	6	9	12
Описание	ГФ РК, т. 1, с547	Гомогенный гель темно-коричневого цвета с запахом иода	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Идентификация - субстанция D1 и хлорамфеникол	ГФ РК, том 2, с.248 ГФ РК, том 1, 2.3.1	-при нагревании геля в пробирке, должны выделяться фиолетовые пары иода - в УФ-спектре геля должны быть максимумы поглощения характерные для субстанции D1 при (195÷196; 221÷224; 283÷286; 347÷352; 450÷455) нм и максимум поглощения характерный для хлорамфеникол а при 278 нм - максимум поглощения при 278 нм	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Масса содержимого в упаковке	В соответствии с НД	Отклонение от средней массы содержимого в упаковке допускается не более ± 1,5 %.	20,00	19,99	20,01	19,99	20,01

Показатель качества	Методика испытаний	Норма	Интервал хранения, мес.				
			0	3	6	9	12
Однородность геля	ГФ РК I, том 1, «Мягкие лекарственные средства для наружного применения», приложение 1	Гель должен быть однородным	Однородный	Однородный	Однородный	Однородный	Однородный
pH	ГФ РК т.1, 2.9.7	5,5-6,0	5,8	5,7	5,8	5,7	5,8
Примеси	ГФ РК, т. 1, 2.4.16	Менее 1%	0,5	0,6	0,6	0,4	0,5
Количественное определение: - иода - хлорамфеникола	В соответствии с АНД	- от 0,95 % до 1,05 %	- 1,00	- 0,99	- 1,01	- 1,01	- 0,98
		-от 0,71 % до 0,79 %	- 0,72	- 0,73	- 0,73	- 0,72	- 0,73
Микробиологическая чистота	ГФ РК, т.1, 2.6.12 2.6.13	<p>Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I т.1, 5.1.4, категория 2. В 1 грамме препарата допускается наличие:</p> <p>- не более 100 аэробных бактерий и грибов (суммарно),</p> <p>- не более 10 энтеробактерий.</p> <p>В 1 г препарата не допускается наличие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	- менее 10, - менее 10, Отсутствуют				

На протяжении 12-ти месяцев хранения при температуре  $25 \pm 2$  °С, относительной влажности  $60 \pm 5$  % физико-химические параметры разработанного комбинированного геля с субстанцией аддукта иода и антибиотиком хлорамфеникол находятся в пределах регламентируемых норм, тем самым обосновывая выбранную упаковку, которая обеспечивает надежную защиту препарата (Приложение Е).

## 6 Фармакологические исследования субстанции D1 и комбинированного лекарственного средства, содержащего субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол

### 6.1 Изучение острой токсичности субстанции D1

Ввиду имеющихся литературных данных по токсичности хлорамфеникола – 150 мг/кг при оральном введении мышам, было решено провести исследование острой токсичности только для субстанции D1.

Исследуемое вещество – субстанцию D1 вводили однократно. Введение тестируемого вещества однократно в больших дозах направлено на определение класса токсичности вещества, выявлению потенциальных органов и тканей-мишеней токсического действия, определению максимальной переносимой дозы и установлению доз введения в последующих исследованиях токсичности при многократных введениях.

Для исследования использованы белые аутбредные самки мышей в количестве 24 особи, возрастом 1,5-2,5 месяца и весом  $22 \text{ г} \pm 10 \%$ , полученные из Научно-практического центра санитарии и эпидемиологической экспертизы и мониторинга (Алматы, Казахстан). Животных содержали в индивидуально-вентилируемых клетках (ИВК) (Techniplast, Италия) при контролируемых условиях: цикл день/ночь составлял 12 часов, температура окружающей среды  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , относительная влажность  $55 \pm 10 \%$ . Кормили животных коммерческим полнорационным кормом (Ассортимент Агро, Россия). Корм и вода предоставлены животным *ad libitum*. Акклиматизация животных длилась 2 недели, после чего животных рандомизировали на группы.

Растворитель (вода очищенная) для исследуемого вещества использовалась в качестве негативного контроля, который вводился мышам перорально с помощью зонда в объеме 0,5 мл.

Дозы, группы представлены в таблице 43.

Таблица 43 – Распределение животных по группам

Группы	Объем введения, мл	Доза, мг/кг	Количество животных в группе
Контроль	0,5	-	3
Опытная 1	0,5	1000	3
Опытная 2	0,5	2000	3

Для определения острой токсичности были использованы следующие дозы субстанции D1: 1000 и 2000 мг/кг веса тела экспериментальных животных.

Основной целью изучения острой токсичности является определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества и причин наступления гибели животных. Параметрами острой токсичности является ДЛ50, т. е. дозы вещества, вызывающие гибель 50 % животных наблюдаемой группы.

Класс токсичности тестируемого препарата Acute toxicity estimate (ATE) будет определен в соответствии с международной системой классификации токсичности веществ GHS (Globally Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures: Acute toxicity hazard categories):

Таблица 44 – Классы токсичности при пероральном введении

Класс токсичности при введении Oral (mg/kg bodyweight)	Класс 1	Класс 2	Класс 3	Класс 4	Класс 5
LD <sub>50</sub> , мг/кг	ATE ≤ 5	5 < ATE ≤ 50	50 < ATE ≤ 300	300 < ATE ≤ 2000	2000 < ATE ≤ 5000

Наблюдения за животным осуществлялось в течение 15 суток. В первый день каждые 2 часа, в последующие дни – 2 раза в сутки.

На этапе исследования для определения максимально переносимой дозы трем животным введена доза субстанции D1 - 1000,0 мг/кг. В течение 24 часов после введения животным токсические симптомы не наблюдались, смертность не фиксировалась. После внутрижелудочного введения субстанции D1 в дозе 2000 мг/кг также не наблюдалось гибели мышей в течение 15 дней наблюдения.

Результаты исследований представлены в таблицах 45-46.

Таблица 45 – Клинические симптомы и смертность во время исследования у мышей

Группы животных	Код животного	Часы				Дни															
		1	2	4	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Контроль	♀	PHT-028-1-1	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
		PHT-028-1-2	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
		PHT-028-1-3	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Опытная 1 субстанция D1 1000 мг/кг	♀	PHT-028-2-1	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
		PHT-028-2-2	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
		PHT-028-2-3	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Опытная 2 субстанция D1 2000 мг/кг	♀	PHT-028-3-1	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
		PHT-028-3-2	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
		PHT-028-3-3	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
X – Мертвый √ – Норма A – нескоординированные движения B – слезотечение						J – тремор K – затрудненное дыхание L – сгорбленная осанка															

Группы животных	Код животного	Часы				Дни													
		1	2	4	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
С – слюноотделение D – жидкий стул E – рвота F – пилоэрекция G – сбивание в кучу I – находящийся в прострации					M – заторможенная реакция на внешние раздражители O – отказ от еды P – бледность слизистых оболочек Q – судороги V – жидкий стул W – снижение тонуса скелетных мышц														

Динамика изменения массы тела животных в ходе эксперимента представлена в таблице 46.

Таблица 46 – Изменение массы тела мышей после однократного внутрижелудочного введения субстанции D1

Группы	Доза субстанции D1, мг/кг	Средняя масса животных, г		
		1 сутки	7 сутки	15 сутки
Контроль	0	26,5 ± 0,46	26,6 ± 0,42	27,1 ± 0,49
Опытная 1	1000	24,6 ± 1,36	23,6 ± 2,52	23,5 ± 3,82
Опытная 2	2000	24,9 ± 4,29	25,8 ± 5,59	25,1 ± 7,64

Примечание: \* – отличие достоверно по отношению к контрольным значениям ( $p < 0,05$ )

Исследование динамики массы тела мышей, получавших субстанцию D1 перорально однократно, не выявило значимого изменения массы тела.

По истечении 15 суток животных умерщвляли цервикальной дислокацией и макроскопировали.

Степень расширения и спадания легких в норме, в сердечной сумке жидкости нет. Поверхность печени гладкая, почти однородной темно-бордовой окраски, консистенция мягкая, упругая. Глиссонова капсула тонкая, прозрачная, не напряжена. На разрезе гистоархитектоника печени не изменена, паренхима умеренно полнокровная. Во всех группах форма почек не изменена.

Поверхность почек коричневатого цвета, гладкая, капсула тонкая, прозрачная, легко снимаемая. На фронтальном разрезе почки различается наружное более темное корковое и внутреннее более светлое – мозговое вещество.

Селезенка во всех группах наблюдения уплощённая, продолговатой формы, темно-вишневого цвета, умеренно плотной консистенции. Поверхность органа бугристая, как «апельсиновая корка». Капсула органа тонкая. Сращения с желудком, диафрагмой и другими органами нет. Отложения фибрина нет. Консистенция органа средней плотности, на разрезе без соскоба, не изъязвленная и без признаков кровоизлияний, очагов уплотнения или размягчения нет.

Во всех исследуемых группах лимфатические узлы и слюнные железы, не спаяны между собой и подлежащими тканями.

В результате макроскопического осмотра установлено, что субстанция D1 не вызвал патологических изменений внутренних органов мышей. Расположение внутренних органов было правильным, не отмечалось ни их спаянности, ни патологического увеличения или уменьшения размеров (рисунок 61).



а) контроль – вода очищенная



б) субстанция D1 в дозе 1000 мг/кг



в) Субстанция D1 в дозе 2000 мг/кг

Рисунок 61 - Макроскопический осмотр внутренних органов экспериментальных животных

По результатам исследования острой токсичности на лабораторных мышах при однократном внутрижелудочном введении субстанции D1, значение ЛД<sub>50</sub> по пробит-анализу находится в пределах 1000-2000 мг/кг (4 класс токсичности в соответствии с международной системой классификации токсичности веществ GHS) [116].

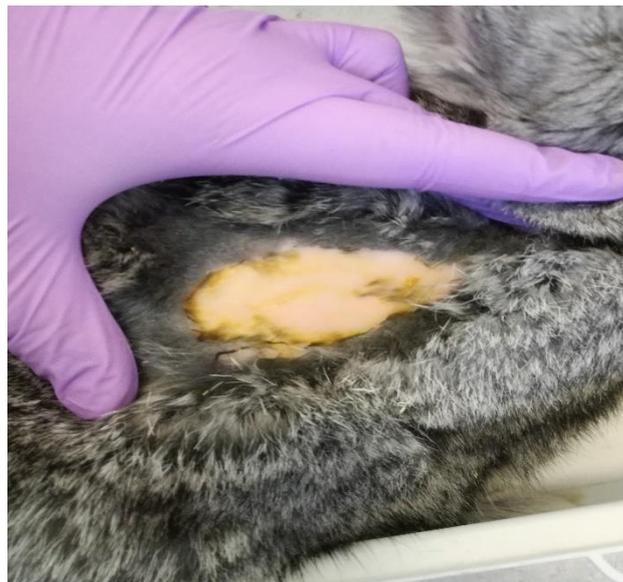
## 6.2 Изучение местно-раздражающего действия комбинированного лекарственного средства

Изучение местнораздражающего действия комбинированного лекарственного средства проводили на интактной коже на трех кроликах породы «Шиншилла».

Комбинированное лекарственное средство объемом 0,5 мл наносили на участок для аппликации размером 5,0x5,0 см. На контрольные участки наносили очищенную воду (0,5 мл), размер аппликации также составил 5,0x5,0 см (рисунок 62)



а) контрольный участок



б) опытный участок

Рисунок 62 – Участок спины кролика полсе аппликации исследуемым комбинированным лекарственным средством

Время экспозиции составило 4 часа. В конце периода экспозиции остатки комбинированного лекарственного средства удаляли очищенной водой.

Состояние опытного и контрольного аппликационного участка визуально оценивали через 60 минут после воздействия исследуемым ЛС и далее, через 24, 48 и 72 часа после экспозиции.

В ходе ежедневного клинического наблюдения за общим состоянием здоровья всех испытуемых животных не выявило в месте аппликации никаких патологических отклонений – отеков, изъязвлений, эритем.

Индивидуальные показатели реакций раздражений представлены в таблице 47

Таблица 47 - Индивидуальные показатели реакции первичного раздражения опытных участков после нанесения комбинированного ЛС

Реакция	Время экспозиции	Индивидуальные значения			Общее значение
		Кролик №1	Кролик №2	Кролик №3	
Эритема, формирование струпа	1 час	0	0	0	0
	24 часа	0	0	0	0
	48 часов	0	0	0	0
	72 часа	0	0	0	0
Появление отека	1 час	0	0	0	0
	24 часа	0	0	0	0
	48 часов	0	0	0	0
	72 часа	0	0	0	0
Сумма реакций за 24 часа и 72 часов (S)	0				
Индекс первичного раздражения (S/6)	0/6 = 0.0				
Категория реакции	Пренебрежимо мала				

В течение периода наблюдения каких-либо признаков раздражения (гиперемия и др.) со стороны кожных покровов, отечности, за весь период наблюдения не выявлялось, что указывало на отсутствие проявления местнораздражающего действия. В течение периода наблюдения каких-либо признаков местнораздражающего действия (гиперемия и др.) со стороны кожного и слизистого покрова, отечность не наблюдали, что указывало на отсутствие проявления сенсibilизации к данному комбинированному ЛС.

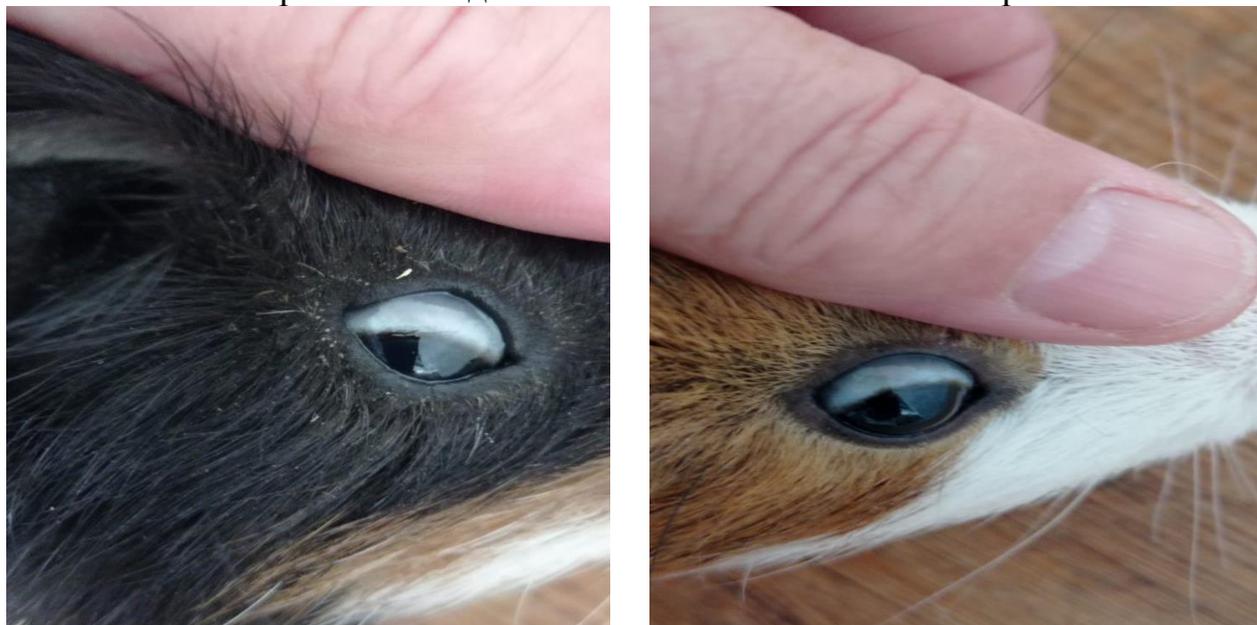
Общее состояние животных за все время наблюдения было без отклонений от нормы. По результатам проведенного исследования, можно заключить, что комбинированный гель не обладает раздражающим действием.

### 6.3 Изучение аллергизирующего действия комбинированного лекарственного средства

Степень аллергизирующего действия геля (средние данные 6 повторов) оценивали по четырехбальной шкале через 3 и 24 часа после введения в конъюнктивный мешок глаза (рисунок 6б).

Через 3 часа после нанесения фармацевтической композиции покраснение наблюдалось у 2-х морских свинок из 6, что свидетельствует о слабом раздражающем действии (таблица 45).

У остальных животных в течение периода наблюдения каких-либо признаков аллергизирующего действия (гиперемия и др.) со стороны слизистого покрова, отека глаз не наблюдали, что указывало на отсутствие проявления сенсибилизации к данной фармацевтической композиции. Общее состояние животных за все время наблюдения было без отклонений от нормы.



а) контроль

б) опыт

Рисунок 63 – Определение раздражающих свойств комбинированного ЛС (а) на слизистую оболочку глаза в сравнении с контролем (б) (конъюнктивальная проба)

Таблица 48 - Степень аллергизирующего действия комбинированного ЛС

Время регистрации эффекта	Вещество / препарат	Степень раздражения						M±StD Раздражающего эффекта
		1 повтор	2 повтор	3 повтор	4 повтор	5 повтор	6 повтор	
Через 3 часа	Вода	0	0	0	0	0	0	0
	КЛС	1	1	0	0	0	0	0,33±0,5
Через 24 часа	Вода	0	0	0	0	0	0	0
	КЛС	0	0	0	0	0	0	0

В результате проведенного исследования по изучению аллергизирующего действия комбинированного геля, установлено отсутствие признаков аллергических реакций (гиперемия, покраснение, отечность и др.) со стороны слизистого покрова, что указывает на отсутствие проявления сенсибилизации к данной фармацевтической композиции [117].

#### 6.4 Изучение проивомикробной активности комбинированного лекарственного средства *in vitro*

Нами была изучена антибактериальная активность комбинированного геля с аддуктом иода. В результатах представлены средние значения полученных МБК в виде сравнительных таблиц для чувствительных и резистентных штаммов (таблицы 49-50).

Таблица 49 - Минимальные бактерицидные концентрации комбинированного геля с субстанцией аддукта иода в отношении штаммов *S. aureus* и *S. pneumoniae*

Исследуемое вещество	Минимальная бактерицидная концентрация, мкг/мл			
	Тест-штаммы			
	<i>S.aureus</i> ATCC 6538-P	<i>S.aureus</i> ATCC ВАА- 33591	<i>S.pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>S.pneumoniae</i> ATCC ВАА-660
Комбинированный гель с субстанцией аддукта иода D1	1,00	1,00	0,50	0,50

Результаты исследования антимикробной активности образца комбинированного геля свидетельствовали о высокой эффективности данного препарата в отношении штаммов *S. aureus* и *S. pneumoniae*. Минимальная бактерицидная концентрация данного образца в отношении как чувствительного, так и резистентного штаммов золотистого стафилококка составила 1,00 мкг/мл. Наряду с высокой антистафилококковой активностью, исследуемый гель эффективно подавлял рост как чувствительного, так и резистентного штаммов *S. pneumoniae*, значения МБК в отношении их составило 0,5 мкг/мл.

Таблица 50 – Минимальные бактерицидные концентрации комбинированного геля с субстанцией аддукта иода для штаммов *E.coli* и *P.aeruginosa*

Исследуемое вещество	Минимальная бактерицидная концентрация, мкг/мл			
	Тест-штаммы			
	<i>E.coli</i> ATCC 8739	<i>E.coli</i> ATCC ВАА-2523	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>P.aeruginosa</i> ТА2
Комбинированный гель с субстанцией аддукта иода D1	1,00	1,00	1,50	1,50

Из данных, представленных в таблице 2 видно, что образец комбинированного геля также продемонстрировал выраженный бактерицидный эффект в отношении клинического резистентного штамма *P. aeruginosa* ТА2 и *P. aeruginosa* ATCC 9027, значения МБК для данных тест-культуры составила 1,50 мкг/мл. Активность данного геля наблюдалась также в отношении штаммов *E. coli* ATCC ВАА-2523 и *E. coli* ATCC 8739. Значение МБК для них не превысило 1,00 мкг/мл (таблица 2) [118].

## **6.5 Изучение эффективности (ранозаживляющей активности) комбинированного лекарственного средства *in vivo***

Для изучения терапевтической эффективности использовали белых аутбредных половозрелых лабораторных мышей - самки в количестве 25 штук (по 5 особей в контрольной и опытных группах), возрастом 1,5-2,5 месяца и весом  $22 \text{ г} \pm 10 \%$ .

**1 группа** – контрольные, с неинфицированной раной (5 животных);

**2 группа** – опытные, с моделью кожной раны, инфицированной однократно *S. aureus* (в концентрации  $1,5 \times 10^9$  КОЕ/мл), объем каждой суспензии по 1,0 мл (5 животных) – не получавших лечение.

**3 группа** – животные, с моделью инфицированной кожной раны (при тех же условиях и концентрациях возбудителей) и леченные ежедневно лекарственным препаратом «Бетадин» в течение 8 дней со 2-х суток, с момента заражения (5 животных) – группа сравнения.

**4 группа** – животные, с моделью инфицированной кожной раны (при тех же условиях и концентрациях возбудителей) и леченные ежедневно мазью «Левомеколь» в течение 8 дней со 2-х суток, с момента заражения (5 животных) – группа сравнения.

**5 группа** – животные, с моделью инфицированной кожной раны (при тех же условиях и концентрациях возбудителей) и леченные ежедневно комбинированным лекарственным средством в форме геля, содержащей аддукт иода и антибиотик хлорамфеникол в течение 8 дней со 2-х суток, с момента заражения (5 животных) – опытная группа.

**6 группа** – животные, с моделью инфицированной кожной раны (при тех же условиях и концентрациях возбудителей) и леченные ежедневно 1%-ным раствором субстанции D1 в течение 8 дней со 2-х суток, с момента заражения (5 животных) – группа сравнения.

С помощью аллоксана достигли выраженные нарушения углеводного обмена, что подтверждается развитием гипергликемии и потерей массы тела животными. Гипергликемия сохранялась на протяжении всего эксперимента. На 9 сутки модели аллоксан-индуцированного сахарного диабета при анестезии было произведено удаление волосяного покрова и обработка кожи 70 %-ным этиловым спиртом с последующим моделированием раны путем иссечения кожного лоскута  $1 \times 1$  см в области холки. На поверхность полученной раны наносили в раневой дефект суспензию мультирезистентного тест-штамма золотистого стафилококка *S. aureus* ATCC 33591, в концентрации  $1,5 \times 10^9$  КОЕ/мл. Развитие местного гнойного процесса оценивали на 4 сутки после нанесения раны.

Таким образом, была получена модель гнойной раны, инфицированной мультирезистентным штаммом золотистого стафилококка.

Исследуемое комбинированной ЛС, а также препараты сравнения наносили на раневую поверхность в течение 9 дней, в виде аппликаций в объеме 0,5 мл.

Таблица 51 – Плотность бактерий раневых поверхностей, обработанных комбинированным ЛС и препаратами сравнения

Экспериментальные группы	Микробная обсемененность раневых поверхностей, КОЕ/см <sup>2</sup>				
	День эксперимента				
	4 день	7 день	10 день	13 день	15 день
2 группа (не получавшие лечение)	9,50±0,48x10 <sup>5</sup>	9,18±1,02x10 <sup>5</sup>	8,71±0,26x10 <sup>5</sup>	8,53±0,3x10 <sup>5</sup>	6,1±0,2x10 <sup>5</sup>
3 группа (лечение препаратом «Бетадин»)	9,22±0,11x10 <sup>5</sup>	8,30±0,12x10 <sup>4</sup>	7,97±1,14x10 <sup>3</sup>	7,13±0,23x10 <sup>3</sup>	4,40±0,18x10 <sup>2</sup>
4 группа (лечение препаратом «Левомеколь»)	9,84±1,15x10 <sup>5</sup>	7,86±0,57x10 <sup>5</sup>	6,52±1,08x10 <sup>4</sup>	5,19±0,87x10 <sup>2</sup>	2,52±0,14x10 <sup>2</sup>
5 группа (лечение комбинированным ЛС)	9,46±0,46x10 <sup>5</sup>	6,49±0,95x10 <sup>3</sup>	4,95±0,96x10 <sup>2</sup>	2,2±0,6x10 <sup>1</sup>	0,7±0,3x10 <sup>1</sup>
6 группа (лечение 1%-ны раствором субстанции D1)	9,09±0,32x10 <sup>5</sup>	7,93±0,28x10 <sup>4</sup>	7,17±2,43x10 <sup>3</sup>	6,63±0,4x10 <sup>3</sup>	4,13±0,07x10 <sup>2</sup>

Микробную обсемененность раневых поверхностей оценивали на 4, 7, 10, 13 и 15 сутки после нанесения раны. Для этого брали смыв с поверхностей ран стерильным зондом-тампоном и высевали на дифференциально-диагностическую среду Байрд-Паркер для идентификации золотистого стафилококка. Плотность бактерий раневых поверхностей представлена в таблице

Из данных, представленных в таблице 46 видно, что плотность бактерий раневых поверхностей на 4 сутки эксперимента, достаточно высока и соответствует в среднем 9,5x10<sup>5</sup> КОЕ/см<sup>2</sup>. На 7, 10 и 13 сутки эксперимента, в контрольной группе, микробная обсемененность снижается незначительно, и составляет 9,18±1,02x10<sup>5</sup>, 8,71±0,26x10<sup>5</sup> и 8,53±0,3x10<sup>5</sup>, соответственно (таблица 51).

Плотность возбудителя раневых поверхностей животных, леченых препаратом «Бетадин», значительно снижается и достигает к 10-ым суткам эксперимента 7,13±0,23x10<sup>3</sup> КОЕ/см<sup>2</sup>.

Динамика снижения плотности возбудителя раневых поверхностей животных, леченых 1 %-ным раствором субстанции D1, схожа с препаратом

сравнения – мазью «Бетадин», значительное снижение достигается к 13-ым суткам эксперимента -  $6,63 \pm 0,4 \times 10^3$  КОЕ/см<sup>2</sup>.

Более эффективной, по сравнению с препаратом «Бетадин» оказалась мазь «Левомеколь». В группе животных, получавших лечение данным препаратом, плотность бактерий к концу эксперимента (13 день) соответствует значению  $5,19 \pm 0,87 \times 10^2$ .

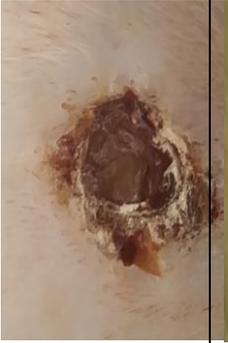
Для группы 6 – животные, леченные 1 %-ным раствором субстанции D1, характерно наличие возбудителя в высоких концентрациях вплоть до 15 суток лечения. Концентрация бактерий на раневой поверхности составляет  $4,13 \pm 0,07 \times 10^2$  КОЕ/мл к 15 суткам лечения.

Лечение инфицированных ран комбинированным лекарственным средством, содержащим субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол, является наиболее эффективным. Так, к 15 суткам эксперимента наблюдается практически полная элиминация возбудителя на раневых поверхностях экспериментальных животных –  $0,7 \pm 0,3 \times 10^1$  (таблица 52).

На протяжении всего периода лечения проводили ежедневный замер раны до окончания эксперимента (таблица 52).

Таблица 52 – Площадь раневых поверхностей, обработанных комбинированным ЛС и препаратами сравнения

Экспериментальные группы	День эксперимента				
	4 день	7 день	10 день	13 день	15 день
2 группа (не получавшие лечение)					
3 группа (лечение препаратом «Бетадин»)					

Экспериментальные группы	День эксперимента				
	4 день	7 день	10 день	13 день	15 день
4 группа (лечение препаратом «Левомеколь»)					
5 группа (лечение комбинированным ЛС)					

На четвертый день после заражения ран *S.aureus* размеры ран увеличились и составили более 100 % от первоначальных размеров. После санации размер ран стал уменьшаться во всех исследуемых группах. Однако полученные данные свидетельствует о том, что на 9 день происходило значительное уменьшение площади раны именно в группе, пролеченной фармацевтической композицией. Уже на 12 день в данных группах животных наблюдалось полное закрытие раневого дефекта.

Таблица 53 – Динамика изменения площади ран в исследуемых группах в период от начала нанесения и заражения раны

Группа животных	Размер раны (% от первоначального размера)					
	1 сутки	4 сутки	7 сутки	10 сутки	13 сутки	15 сутки
Контрольная группа	100	115±7,0	71±1,5	57±4,2	49±1,2	30,14±0,8
Препарат сравнения «Левомеколь»	100	125±2,9	58±4,2	53±2,4	31±2,5	19±1,2

Группа животных	Размер раны (% от первоначального размера)					
	1 сутки	4 сутки	7 сутки	10 сутки	13 сутки	15 сутки
Препарат сравнения «Бетадин»	100	121±3,5	85±3,1	54±1,8	39±1,4	16±0,3
1 %-ный раствор субстанции D1	100	123±1,5	79±3,1	59±1,8	34±1,4	18±0,4
Комбинированное лекарственное средство	100	123±2,7	74±2,1	21±2,5	8±1,1	0,2±0,02

Таким образом, разработанное комбинированное лекарственное средство с аддуктом иода D1 и хлорамфениколом проявляет высокую антимикробную и ранозаживляющую активность *in vivo* и в условиях аллоксан-индуцированного экспериментального диабета превышает действие препаратов сравнения мазей «Левомеколь» и «Бетадин», сокращая сроки заживления раны в 1,5 раза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые по результатам исследования антимикробной активности оригинальных координационных соединений иода №1-8 в отношении 3 музейных чувствительных штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, 2 музейных мультирезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC-ВАА-39, *Escherichia coli* ATCC-ВАА-196 и 1 клинического мультирезистентного штамма *Pseudomonas aeruginosa* ТА2, были выявлены 3 наиболее перспективных соединения: образец №5 - ди-трииодо-3,3'-ди-тио-бис-2-аминопропионовая кислота, образец №6 -  $\alpha,\alpha'$ -ди-амино- $\beta,\beta'$ -дифенилпропионовой кислоты моноиодид и образец №8 – ди-трииодидо-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат, проявившие наибольшую антимикробную активность по отношению, как к чувствительным, так мультирезистентным штаммам микроорганизмов.

2. Впервые по результатам изучения совместного действия координационных аддуктов иода №5, №6 и №8 с антибиотиками, выявлены синергетические противомикробные эффекты соединения №8 с антибиотиками хлорамфениколом, гентамицином и тетрациклином, как в отношении грамотрицательных мультирезистентных штаммов – *E.coli* и *P. aeruginosa*, так и в отношении грамположительных штаммов – *S.aureus* и *St.pneumoniae*. По совокупности результатов спектральных методов исследования (УФ- и ИК-спектроскопии) установлено, что в бинарной системе - субстанция D1 и антибиотик хлорамфеникол, отсутствуют данные о возможном комплексообразовании.

3. Впервые координационное соединение иода №8 – ди-трииодидо-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат рекомендуются в качестве перспективной субстанции для разработки лекарственных средств антимикробного действия. По результатам исследования токсичности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, субстанция D1 относится к 4 классу токсичности в соответствии с международной системой классификации токсичности веществ GHS и не обладает мутагенным действием.

4. Впервые разработана и внедрена в производство на базе АО «Научный Центр противомикробных препаратов» технология получения фармацевтической субстанции D1. Изучены физико-химические и технологические характеристики субстанции D1, разработан проект НД и проведена стандартизация субстанции D1.

5. Впервые разработан оптимальный состав и технология получения комбинированного лекарственного средства (геля), содержащего субстанцию D1 и антибиотик хлорамфеникол; доказана стабильность субстанции D1 в комбинации с антибиотиком и вспомогательными веществами. Технология получения комбинированного антимикробного геля внедрена в производство на базе АО «Научный Центр противомикробных препаратов».

6. Разработанное комбинированное лекарственное средство с аддуктом иода D1 и хлорамфениколом проявляет высокую антимикробную и ранозаживляющую активность *in vivo*, в условиях аллоксан-индуцированного экспериментального диабета превышает действие препаратов сравнения мазей «Левомеколь» и «Бетадин», сокращая сроки заживления раны в 1,5 раза; не обладает местно-раздражающим и аллергизирующим действием.

7. Исследованы физико-химические и технологические характеристики комбинированного антимикробного геля, разработан проект НД и проведена его стандартизация. Разработаны лабораторные регламенты на субстанцию D1 и комбинированный антимикробный гель.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Смит В. А., Дильман А. Д.. Реакция Дильса - Альдера // Основы современного органического синтеза. - М.: Бинوم. Лаборатория знаний, 2009. – Ч. 1, глава 22. - С. 605-642.
- 2 Калыкова А.С., Баринов Д.В., Сакипова З.Б. Этапы разработки новых лекарственных средств на основе оригинальной субстанции ФС-1 // Вестник КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова. Материалы научно-практической конференции по итогам научно-технических программ. – 2012. - №4. - С. 78-81
- 3 Sulifor Oxygenates of Biomimetics of the Diiron Subsite of the [FeFe]-Hydrogenase Active Site: Properties and Oxygen Damage Repair Possibilities, Tianbiao Liu, Bin Li, Michel L. Singleton, Michael B. Hall and Marcetta Y. Darensbourg, J. Am. Chem. Soc., 2009, 131, 8296-8307 DOI: 10.1021/ja9016528
- 4 Бекешева К.Б., Курманалиева А.Р., Баринов Д.В., Устенова Г.О. Разработка лекарственных средств на основе аддуктов иода и их применение в медицине // Вестник КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова. - 2014. - №4. – С. 37-38.
- 5 Бекешева К.Б., Курманалиева А.Р., Баринов Д.В., Устенова Г.О. Технологические аспекты разработки таблеток на основе субстанции аддукта иода // Вестник КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова.– 2015. - №5. - С. 523-526.
- 6 Taylor G.R., Butler M.A. Comparison of the virucidal properties of chlorine, chlorine dioxide, bromine chloride and iodine // The Journal of Hygiene. – 1982. – Vol. 89, No 2. – P. 321–328. PMID: 6290566.
- 7 Bloomfield S.F. Chlorine and iodine formulations // Handbook of disinfectants and antiseptics. – P. 133–158.
- 8 Aceves C, Mendieta I, Anguiano B, Delgado-González E. Molecular Iodine Has Extrathyroidal Effects as an Antioxidant, Differentiator, and Immunomodulator. Int J Mol Sci. 2021 Jan 27;22(3):1228. doi: 10.3390/ijms22031228. PMID: 33513754; PMCID: PMC7865438.
- 9 Vermeulen H, Westerbos SJ, Ubbink DT. Benefit and harm of iodine in wound care: a systematic review. J Hosp Infect. 2010 Nov;76(3):191-9. doi: 10.1016/j.jhin.2010.04.026. Epub 2010 Aug 12. PMID: 20619933.
- 10 Kramer SA. Effect of povidone-iodine on wound healing: a review. J Vasc Nurs. 1999 Mar;17(1):17-23. doi: 10.1016/s1062-0303(99)90004-3. PMID: 10362983.
- 11 Gouriprasanna R., Munirathinam N., Mughesh G. Interaction of anti-thyroid drugs with iodine: the isolation of two unusual ionic compounds derived from Semethimazole // Org. Biomol. Chem. – 2006. – Vol. 4, No 15. – P. 2883–2887. doi: 10.1039/b604060h.
- 12 Бекешева К.Б., Курманалиева А.Р., Баринов Д.В., Устенова Г.О. Современное состояние и перспективы применения иодсодержащих препаратов // Медицина. – 2015. – №12 (162). – С. 123-125.
- 13 Калыкова А.С. Разработка новых лекарственных средств на основе субстанции ФС-1 и их стандартизация : дис. док. PhD : 6D074800 : защищена 30.11.15 / Калыкова Асем Сериковна. – А., 2015. – 164 с. – Библиогр.: с. 12–18. – 615.31.012.07.

- 14 Jaynes, J., Ding, X., Xu, H., et al. Application of Fractional Factorial Designs to Study Drug Combinations. *Stat. Med.* 2013, 32, 307–318.
- 15 Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006;68:621–681.
- 16 Chou TC. What is synergy? *Scientist* 2007;21:15
- 17 Wood, K., Nishida, S., Sontag, E. D., et al. Mechanism-Independent Method for Predicting Response to Multidrug Combinations in Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109, 12254–12259.
- 18 Chou TC. Drug combination against xenograft tumors in nude mice: experimental design, execution, and computerized simulation of synergism and antagonism (An abstract for the minisymposium). *Proc Am Assoc Cancer Res* 2008;49:p. 997.
- 19 Sköld O. Sulfonamides and trimethoprim. In: *Antimicrobial Drug Resistance*. Mayers DL (Ed.). Humana Press, NY, USA, 257–267 (2009).
- 20 Perreten V, Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1169–1172 (2003).
- 21 USP. 2012. UNASYN® (ampicillin sodium/sulbactam sodium), Jan
- 22 Rafailidis, P.I., Ioannidou, E.N. & Falagas, M.E. Ampicillin/Sulbactam. *Drugs* 67, 1829–1849 (2007).  
<https://doi.org/10.2165/00003495-200767130-00003>
- 23 Benninger MS. Amoxicillin/clavulanate potassium extended release tablets: a new antimicrobial for the treatment of acute bacterial sinusitis and community-acquired pneumonia. *Expert Opin Pharmacother.* 2003 Oct;4(10):1839-46
- 24 Jacobs MR. Extended release amoxicillin/clavulanate: optimizing a product for respiratory infections based on pharmacodynamic principles. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2005 Jun;3(3):353-60
- 25 Derevianko II, Nefedova LA, Lavrinova LN. Effektivnost' imipenem/tsilastatina (tienam, MSD) pri lechenii oslozhennykh infektsii v urologii [Effectiveness of imipenem/cilastatin (Tienam, MSD) in treating complicated infections in urology]. *Urologiia.* 2002 May-Jun;(3):21-5. Russian. PMID: 12180053.
- 26 Kabbara WK, Nawas GT, Ramadan WH. Evaluation of the appropriateness of imipenem/cilastatin prescription and dosing in a tertiary care hospital. *Infect Drug Resist.* 2015;8:31-38. Published 2015 Mar 24. doi:10.2147/IDR.S78633
- 27 WHO Annex 5. Guidelines for registration of fixed-dose combination medicinal products Technical Report Series, № 929, 2005.
- 28 Tu W, Decker BS, He Z, Erdel BL, Eckert GJ, Hellman RN, Murray MD, Oates JA, Pratt JH: Triamterene Enhances the Blood Pressure Lowering Effect of Hydrochlorothiazide in Patients with Hypertension. *J Gen Intern Med.* 2016 Jan;31(1):30-6. doi: 10.1007/s11606-015-3469-1.
- 29 Altman R, Bosch B, Brune K, Patrignani P, Young C. Advances in NSAID development: evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs.* 2015;75(8):859-877. doi:10.1007/s40265-015-0392-z

- 30 Rescigno A. Foundations of pharmacokinetics. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003.
- 31 Inman, S.J., Briscoe, B.J., Pitt, K.G. Topographic characterization of cellulose bilayered tablets interfaces, *Chemical Engineering Research and Design* 85 (7 A), pp. 1005- 1012 (2007)
- 32 Michrafy, A., Diarra, H., Dodds, J.A. Compaction behavior of binary mixtures, *Powder Technology* 190 (1-2), pp. 146-151 (2009)
- 33 Sinka, I.C., Cocks, A.C.F. Modeling die compaction in the pharmaceutical industry, in *Engineering Materials and Processes*, Chapter 14, pp. 223 to 239 (2008) Publisher: Springer-Verlag London Limited
- 34 Inman, S.J., Briscoe, B.J., Pitt, K.G. Topographic characterization of cellulose bilayered tablets interfaces, *Chemical Engineering Research and Design* 85 (7 A), pp. 1005- 1012 (2007)
- 35 Ohmori, S., Makino, T. Sustained-release phenylpropanolamine hydrochloride bilayer caplets containing the hydroxypropylmethylcellulose 2208 matrix. II. Effects of filling order in bilayer compression and manufacturing method of the prolonged-release layer on compactibility of bilayer caplets, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 48 (5), pp. 678-682 (2000)
- 36 Zhao G. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds // *Adv. Wound Care* (New Rochelle). - 2013; 2 (7): 389-99
- 37 Винник Ю.С. Современные методы лечения гнойных ран // *Сибирское медицинское обозрение*. – 2013. – № 1. – С. 18–24
- 38 Janssen H, Janssen I, Cooper P, Kainyah C, Pellio T, Quintel M, et al. Antimicrobial-Resistant Bacteria in Infected Wounds, Ghana, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2018; 24(5):916-919
- 39 Mulu W, Kibru G, Beyne G, Damtie M. Postoperative nosocomial infections and antimicrobial resistance pattern of bacteria isolates among patients admitted at Felege Hiwot Referral Hospital, Bahirdar, Ethiopia. *Ethiop J Health Sci*.2012;22:1-12
- 40 World Health Organization. Antimicrobial resistance: 2014 global report on surveillance. Geneva: World Health Organization; 2014; Akers KS, Mende K, Cheatle KA, Zera WC, Yu X, Beckius ML, et al. Biofilms and persistent wound infections in United States military trauma patients: a case-control analysis. *BMC Infect Dis*. 2014,14:190
- 41 Murphy RA, Okoli O, Essien I, Teicher C, Elder G, Pena J, Ronat JB, Bernabe KJ. Multidrug-resistant surgical site infections in a humanitarian surgery project. *Epidemiol Infect*. 2016:1–7
- 42 Keen EF, Mende K, Yun HC, Aldous WK, Wallum TE, Guymon CH, et al. Evaluation of potential environmental contamination sources for the presence of multidrug-resistant bacteria linked to wound infections in combat casualties. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012;33(9):905–911
- 43 Jarbrink K, Ni G, Sonnergren H, Schmidtchen A, Pang C, Bajpai R, Car J: Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst Rev* 2016, 5(1):152

- 44 Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):244–269
- 45 Сидоренко С.В. Исследования распространения антибиотикорезистентности: практическое значение для медицины // Инфекции и антимикробная терапия.-2002.-Т.4, №2.-С.38-41
- 46 Amyes S.B., Gemmel C.G. Antibiotic resistance // *J. Med. Microbiol.* – 1997. – Vol. 46, N 6. – P. 436-470
- 47 Супотницкий М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий // Биопрепараты. — 2011. — № 2. — С. 4–11.
- 48 Черненькая Т.В., Годков М.А. «Проблемные» полирезистентные бактерии — возбудители внутрибольничных инфекций у пациентов в критических состояниях (обзор литературы) // Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь.— 2015.— № 3.— С. 30–35.
- 49 Antimicrobial Resistance among Gram-Negative Bacilli Causing Infections in Intensive Care Unit Patients in the United States between 1993 and 2004 / Sh.R. Lockhart, M.A. Abramson, S.E. Beekmann at all. // *J. of Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45. – Is. 10. – Pp. 3352–3359.
- 50 Giamarellou H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long // *International J. of Antimicrobial Agents.* – 2010. – Vol. 36. – Suppl. 2. – Pp. 50–54.
- 51 Containment of a Country-wide Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli Hospitals via a Nationally Implemented Intervention / M.J. Schwaber, B. Lev, A. Israeli at all // *Clin. Infect. Diseases.* – 2010. – Vol. 52. – Iss. 7. – Pp. 848–855.
- 52 Brooke J.S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen // *Clin. Microbiol. Reviews.* – 2012. – Vol. 25. – No. 1. – Pp. 2–41.
- 53 Мартинович А.А. Динамика антибиотикорезистентности и эпидемиология инфекций, вызванных *Acinetobacter* spp. в России // *Клин. микробиол. и антимикробн. химиотерапия.* – 2010. – Т. 12. – № 2. – С. 96–116.
- 54 Устойчивость к противомикробным препаратам. Доклад секретариата ВОЗ. А70/12, 10 апреля 2017 г. <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>
- 55 Устойчивость к противомикробным препаратам. Доклад секретариата ВОЗ. А70/12, 10 апреля 2017 г. <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>
- 56 ФС 42-2010-97. Линимент синтомицина 1%, 5% и 10%
- 57 Misra, R. N., Chander, Y., Debata, N. K., & Ohri, V. C. (2000). Antibiotic resistance pattern of isolates from wound and soft tissue infections. *Medical journal, Armed Forces India*, 56(3), 205–208
- 58 Matilde Fernández, Susana Conde, Jesús de la Torre, Carlos Molina-Santiago, Juan-Luis Ramos, Estrella Duque // Mechanisms of Resistance to

Chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. Antimicrobial Agents and Chemotherapy Jan 2012, 56 (2) 1001-009

59 Электронный ресурс - <http://www.who.int/ru>

60 Berenbaum M.C. What is synergy? / M.C. Berenbaum // Pharmacol. Rev. – 1989. – V. 41, №2. – P.93–141

61 Dressler V. CombiTool – a new computer program for analyzing combination experiments with biologically active agents / V. Dressler, G. Müller, J. Sühnel // Comput. Biomed. Res. – 1999. – V. 32, №2. – P.145–60

62 Breitinger H.-G. Chapter 7. Drug Synergy – Mechanisms and Methods of Analysis / H.-G. Breitinger // Toxicity and Drug Testing / Prof. Bill Acree (Ed.). – InTech, 2012. – P.143–166

63 Systematic exploration of synergistic drug pairs / M. Cokol, H.N. Chua, M. Tasan, B. Mutlu, Z.B. Weinstein, Y. Suzuki, M.E. Nergiz, M. Costanzo, A. Baryshnikova, G. Giaever, C. Nislow, C.L. Myers, B.J. Andrews, C. Boone, F.P. Roth // Mol. Syst. Biol. – 2011. – V. 7. – E.544. – URL: <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2011.71>

64 Yeh P. Functional classification of drugs by properties of their pairwise interactions / P. Yeh, A.I. Tschumi, R. Kishony // Nat. Genet. – 2006. – V. 38. – P.489–494

65 Proof of concept: network and systems biology approaches aid in the discovery of potent anticancer drug combinations / A.S. Azmi, Z. Wang, P.A. Philip, R.M. Mohammad, F.H. Sarkar // Mol. Cancer Ther. – 2010. – V. 9. – P.3137–3144

66 Greco W.R. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective / W.R. Greco, G. Bravo, J.C. Parsons // Pharmacol. Rev. – 1995. – V. 47. – P.331–385

67 Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity / J. Lehar, A.S. Krueger, W. Avery, A.M. Heilbut, L.M. Johansen, E.R. Price, R.J. Rickles, G.F. Short, J.E. Staunton, X. Jin, M.S. Lee, G.R. Zimmermann, A.A. Borisy // Nat. Biotechnol. – 2009. – V. 27. – P.659–666

68 Chemical combinations elucidate pathway interactions and regulation relevant to Hepatitis C replication / C.M. Owens, C. Mawhinney, J.M. Grenier, R. Altmeyer, M.S. Lee, A.A. Borisy, J. Lehar, L.M. Johansen // Mol. Syst. Biol. – 2010. – V. 6. – E.375. – URL: <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2010.32>].

69 Response surface analysis of synergism between morphine and clonidine / R.J. Tallarida, D.J. Stone Jr., J.D. McCary, R.B. Raffa // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1999. – V. 289, №1. – P.8–13

70 Raffa R.B. Discovery of "self-synergistic" spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol) / R.B. Raffa, D.J. Stone Jr., R.J. Tallarida // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2000. – V. 295, №1. – P.291–294.

71 Drug Interactions in Infectious Diseases / edited by Stephen C. Piscitelli, Keith A. Rodvold. – 2nd ed. – Totowa, N.J.: Humana Press, 2005. – 533 p

72 Chou T.C. Theoretical Basis, Experimental Design and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies / T.C. Chou // Pharmacological Reviews. – 2006. – V. 58, №3. – P.621–681

- 73 Consensus on concepts and terminology for combined-action assessment: The Saariselkä Agreement / W. Greco, H.-D. Unkelbach, G. Pösch, J. Sühnel, M. Kundi, W. Bödeker // Arch. Complex Environmen. Studies. – 1992. – V. 4, №3. – P. 65–69.
- 74 Gebhart O.F. Comments on the isobole method for analysis of drug interactions / O.F. Gebhart // Pain. – 1992. – V.51. – P.381
- 75 Miaskowski C. Comments on the evaluation of drug interactions using isobolographic analysis and analysis of variance / C. Miaskowski, J.D. Levine // Pain. – 1992. – V.51. – P.383–387
- 76 Suzuki S. The synergistic action of mixed irradiation with high-LET and low-LET radiation / S. Suzuki // Radiat Res. – 1994. – V.138. – P. 297–301
- 77 Consensus on concepts and terminology for combined-action assessment: The Saariselkä Agreement / W. Greco, H.-D. Unkelbach, G. Pösch, J. Sühnel, M. Kundi, W. Bödeker // Arch. Complex Environmen. Studies. – 1992. – V. 4, №3. – P. 65–69.
- 78 К методологии оценки типа комбинированной токсичности на основе данных эколого-эпидемиологического исследования / Б.А. Кацнельсон, Ю.И. Казмер, А.Н. Вараксин, Л.И. Привалова, В.Г. Панов, Е.П. Киреева // Токсикологический вестник. – 2011. – №3 (108). – С.2–6.
- 79 Каган Ю.С. Проблема изучения и оценки комбинированного действия ксенобиотиков / Ю.С. Каган, Б.М. Штабский // Токсикологический вестник. – 1996. – № 5. – С. 2–9.
- 80 Кацнельсон Б.А. Комбинированное действие химических веществ / Б.А. Кацнельсон // Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. – М.: Медицина, 2002. – С. 497–520.
- 81 CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29<sup>th</sup> ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA , Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019
- 82 Государственная фармакопея Республики Казахстан. - Алматы: Издательский дом «Жибек молы», 2008. - Т.1. – 592 с.
- 83 Валидация аналитических методов: Содержание и Методология. CPMP/ICH/381/95 - ICH Q2. 128. (R1).
- 84 Государственная фармакопея Республики Казахстан. - Алматы: Издательский дом «Жибек
- 85 European Pharmacopoeia. - 6-th edition. - Strasbourg: Council of Europe, 2007. - Vol. 1. - 1129 p.
- 86 Фармакопея Евразийского экономического союза. 2020. - Т.1. – 568 с.
- 87 Бекешева К.Б. Диссертационная работа «Разработка и исследование новых лекарственных средств на основе аддукта иода». – Алматы, 2017. - 151 с.
- 88 Сильверстейн Р.Вебстер, Кимл Д. Спектрометрическая идентификация органических соединений. - М.: «БИНОМ. Лаборатория знаний», 2011
- 89 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test #423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method.
- 90 Джумагазиева А.Б., Ибрагимова Н.А., Датхаев У.М., Ильин А.И. Изучение местнораздражающего и алергизирующего действия комбинированной мази с аддуктом иода// Сборник материалов международной

научно-практической конференции студентов, молодых ученых и преподавателей // Акановские чтения. Роль ПМСП в достижении всеобщего охвата услугами здравоохранения. – г. Алматы, 2019. С.152

91 Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2):55-63. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

92 Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test / *Mutation Res.* – 1983. – Vol.3. – P. 173-215

93 OECD Guideline for the testing of chemicals No 471. Bacterial Reverse Mutation Test / OECD, 1997. – 11 p.

94 Шрамм, Г. Основы практической реологии и реометрии: пер. с англ. / Г. Шрамм. - М.: Колос, 2003. - 312 с.

95 Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020 «Об утверждении Правил производства и контроля качества, а также проведения испытаний стабильности и установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств и медицинских изделий».

96 Гладышев, В. В. Изучение влияния основ-носителей на интенсивность высвобождения каптоприла из назальных мягких лекарственных форм / В. В. Гладышев // Кубан. науч. мед. вестн. - 2013 - № 5 (140). - С. 69-73.

97 Джумагазиева А.Б., Кенешева С.Т., Бакытов Д.Б., Бердібай С.Б., Парецкая Н.А., Датхаев У.М., Карпенюк Т.А., Тамазян Р.А., Ильин А.И. Изучение антимикробной активности координационных соединений иода в отношении бактерий с множественной лекарственной устойчивостью // Вестник Казахского Национального Университета им. аль-Фараби // Серия биологическая. – 2018. - № 1 (74). – С. 140-151

98 Jumagazyeva A.B., Paretskaya N.A., Tamazyan R.A., Akhmatullina N.B., Amanzholkyzy A., Sabitov A.N., Berdibai S.B., Kerimzhanova B.F., Korotetskii I.S., Ilin A.I. New semiorganic iodine complex, its structure and biological activity. // *News of the Academy of science of the Republic of Kazakhstan // Series chemistry and technology*. Vol.1. № 433. – 2019. – P.70-77

99 Jumagazyeva A.B., Sabitov A.N., Turganbay S. Structure and properties of the di-((2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl) propionate)-dihydro-tetraiodide. // *Chemical Journal of Kazakhstan*. 2021. – Vol.2. №74(2021). P.86-102

100 Synergistic Interaction between Silver Nanoparticles and Membrane-Permeabilizing Antimicrobial Peptides. / S. Ruden, K. Hilpert, M. Berditsch, P. Wadhvani, A.S. Ulrich // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – V. 53, №8. – P.3538–3540

101 Fehri L.F. Activities of Antimicrobial Peptides and Synergy with Enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis* / L.F. Fehri, H. Wróblewski, A. Blanchard // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – V. 51, №2. – P.468–474.

102 Джумагазиева А.Б., Сахипов Е.Н., Турғанбай С., Атагельдиева Н.М., Датхаев У.М., Ильин А.И., Взаимодействие некоторых антибиотиков с

семиорганическими аддуктами иода // Фармация Казахстана. №4. – 2021. – С.45-49

103 ГОСТ 19808-86. Стекло медицинское. Марки. ИУС N 6, 2005.

104 Fehri L.F. Activities of Antimicrobial Peptides and Synergy with Enrofloxacin against Mycoplasma pulmonis / L.F. Fehri, H. Wróblewski, A. Blanchard // Antimicrob. Agents Chemother. – 2007. – V. 51, №2. – P.468–474.

105 Bekesheva K.B., Baczek T., Konieczna A. Roszkowska A., Kalykova G., Ustenova D., Barinov. Analysis of the substance on the basis of iodine adducts with by liquid chromatography combination with mass spectrometry Ls-ms // Ls-ms Астанинский медицинский журнал. - 2017. - №2. – С. 181-187.

106 Kalykova A.S. Stability and storage conditions of the new pharmaceutical substance with antibacterial action // Фармация Казахстана. – 2015. – №6. (169) – С. 45-48.

107 ICH Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products. – 2003, february – 20 p.

108 Бекешева К.Б., Устенова Г.О., Курманалиева А.Р., Баринов Д.В. Изучение стабильности субстанции на основе аддуктов иода // Фармация Казахстана. - 2016. - №10 - С. 19 -25.

109 Barinov A.S., Bekesheva K.B., Kalykova A.R. Kurmanalieva G.O. Ustenova A.I., Ilin I.R. spectroscopy study of substances containing iodine adduct // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2017. - №8(1). – P. 1599-1604.

110 Kalykova A.S. Stability and storage conditions of the new pharmaceutical substance with antibacterial action // Фармация Казахстана. – 2015. – №6. (169) – С. 45-48.

111 ICH Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products. – 2003, february – 20 p.

112 Джумагазиева А.Б., Зубенко Н.В., Бакытов Д.Б., Датхаев У.М. // Изучение цитотоксичности координационного соединения иода (аддукта иода) *in vitro* // Материалы VI международной научной конференции молодых ученых и студентов, инициированной Фондом Первого Президента Казахстана – Елбасы и Южно-Казахстанской медицинской академией // «Перспективы развития биологии, медицины и фармации». Вестник Южно-Казахстанской медицинской академии. – 7-8 декабря, г. Шымкент, 2018. №4 (84). – С. 12.

113 Jumagaziyeva A.B., Iskakbayeva Zh.A., Myrzabayeva A.N., Suldina N.A., Paretskaya N.A., Datkhayev U.M., Flisyuk E.V., Ilin A.I. // Evaluation of mutagenic properties of 2(C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)+2I<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O iodine coordination complex in bacterial reverse mutation test. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, Vol.77 No.3. Poland. – 2020. P. 465-473.

114 ОФС.1.4.1.0008.15 «Мази»

115 Roduit B., Borgeat C., Ticmanis U., Kaiser M., Guillaume P., Berger B., Folly P. Thermal stability and safety analysis of explosives under different temperature modes // 35th International Annual Conference of ICT. – Karlsruhe, 2004, july. – P. 37-41.

116 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test #423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method.

117 Джумагазиева А.Б., Датхаев У.М., Ильин А.И., Ибрагимова Н.А. Изучение местнораздражающего и аллергизирующего действия комбинированной мази с аддуктом иода. // Сборник материалов международной научно-практической конференции студентов, молодых ученых и преподавателей // Акановские чтения. Роль ПМСП в достижении всеобщего охвата услугами здравоохранения. – г. Алматы, 2019. С.152

118 Джумагазиева А.Б., Искакбаева Ж.А., Датхаев У.М., Ильин А.И. Изучение антимикробной активности комбинированной мази с аддуктом иода. // Вестник Казахского Национального Медицинского Университета. 2019. – №2. - С. 345-348.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

Данные этого соединения (2(C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 2(I<sub>3</sub>), H<sub>2</sub>O) зарегистрированы под номером CCDC 1036668, копия письма подтверждающего регистрацию прилагается.

From: CCDC Deposit

Dear Depositor,

Thank you for depositing your crystal structure(s) at the Cambridge Crystallographic Data Centre. The data have been assigned to the following deposition numbers.

CCDC 1036668

-----  
Summary of Data CCDC 1036668  
-----

Compound Name:

Formula: 2(C<sub>6</sub> H<sub>15</sub> N<sub>2</sub> O<sub>2</sub> 1+),H<sub>2</sub> O<sub>1</sub>,2(I<sub>3</sub> 1-)

Unit Cell Parameters: a 9.3026(19) b 9.4973(19) c 16.257(3) P21

If we have any queries relating to the data then we will contact you later.

Data submitted as a Private Communication will be processed and added to the Cambridge Structural Database (CSD).

Please note, if the data have not appeared in a journal publication 1 year after the date of deposition,

and the CCDC cannot contact you to discuss the matter, then the CCDC will automatically include the

data

in the CSD as a Private Communication.

Kind regards,

Data Acquisition Team

CCDC launched a new service in June 2014 to make depositing data at the CCDC even easier: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/deposit/>

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Дата поступления 14.10.2020	(85) Дата перевода международной заявки на национальную фазу	(21) Регистрационный №	(22) Дата подачи
<input type="checkbox"/> (86) регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные получающим ведомством <input type="checkbox"/> (87) номер и дата международной публикации международной заявки <input type="checkbox"/> (96) номер евразийской заявки и дата подачи заявки, установленные получающим ведомством <input type="checkbox"/> (97) номер и дата публикации евразийской заявки			
<h3 style="margin: 0;">ЗАЯВЛЕНИЕ</h3> <h4 style="margin: 0;">о выдаче патента</h4> <h4 style="margin: 0;">Республики Казахстан на изобретение</h4>			
Предоставляя указанные ниже документы, прошу (просим) выдать патент Республики Казахстан на изобретение на имя заявителя(ей) (71) Заявитель(и): 1. Акционерное общество "Научный центр противомикробных препаратов" (улица Ауэзова 84, город Алматы, район Бостандыкский, 050008) <small>(указывается полное имя или наименование и местожительство или местонахождение. Данные о местожительстве авторов-заявителей приводятся в графе, рядом с графой с кодом (72))</small>		Код страны по стандарту ВОИС ST.3 (если он установлен)  <div style="border: 1px solid black; width: 100px; margin: 0 auto; text-align: center; padding: 2px;">KZ</div>	
Заполняется только при испрашивании приоритета по дате, более ранней, чем дата подачи заявки в РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности» Прошу (просим) установить приоритет изобретения по дате: <input type="checkbox"/> подачи первой(ых) заявки(ок) в государстве-участнике Парижской конвенции (пунктом 2 статьи 20 Закона)  <input type="checkbox"/> подачи более ранней заявки в РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности» в соответствии с пунктом 4 статьи 20 Закона  <input type="checkbox"/> подачи первоначальной заявки в РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности» в соответствии с пунктом 5 статьи 20 Закона приоритета первоначальной заявки (пунктом 5 статьи 20 Закона) (номер заявки, дата подачи)  <input type="checkbox"/> поступления дополнительных материалов к более ранней заявке (пунктом 3 статьи 20 Закона)			
(31) № первой, более ранней, первоначальной заявки	(32) Дата испрашиваемого приоритета	(33) Код страны подачи по ST.3 (при испрашивании конвенционного приоритета)	
(54) Название изобретения Фармацевтическая композиция с антимикробным действием Микробка карсы фармацевтикалық композициясы			
Адрес для переписки (полный почтовый адрес и имя адресата) ИЛЬИН АЛЕКСАНДР ИВАНОВИЧ, МИКРОРАЙОН Аксай-3 33, 8, АЛМАТЫ АУЭЗОВСКИЙ Ауэзовский, Республика Казахстан, 050031 Телефон: +77775153988      Мобильный тел.      Факс:      Адрес электронной почты: ilin_ai@mail.ru			
(74) Патентный поверенный (полное имя, регистрационный номер) или представитель заявителя(ей) (полное имя или наименование)			

Перечень прилагаемых документов	Количество листов в 1 экземпляре	Количество экземпляров	(место для штампа РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»)
<input type="checkbox"/> приложение к заявлению			
<input checked="" type="checkbox"/> описание изобретения	17	1	
<input checked="" type="checkbox"/> формула изобретения	2	1	
<input type="checkbox"/> чертеж(и) и иные материалы			
<input checked="" type="checkbox"/> реферат	1	1	
<input checked="" type="checkbox"/> документ об оплате подачи заявки	1	1	
<input type="checkbox"/> документ, подтверждающий наличие оснований для уменьшения размера оплаты			
<input type="checkbox"/> копия(и) первой(ых) заявки(ок) (при испрашивании конвенционного приоритета)			
<input type="checkbox"/> документы заявки на иностранном языке			
<input type="checkbox"/> доверенность, удостоверяющая полномочия патентного поверенного или представителя			
<input type="checkbox"/> другой документ (указать)			
№ фигуры чертежей, предлагаемой для публикации с формулой(рефератом)			
(72) Автор(ы) (указывается полное имя)	Полный почтовый адрес местожительства, включая наименование страны и ее код по стандарту ВОИС ST.3, если он установлен		
1. ДЖУМАГАЗИЕВА АРДАК БИСЕНБАЕВНА	УЛИЦА Крылова 56, 2, АЛМАТЫ ЖЕТЫСУСКИЙ, KZ, 050034		
2. ДАТХАЕВ УБАЙДИЛЛА МАХАМБЕТОВИЧ	МИКРОРАЙОН Карагайлы, ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЙ КООПЕРАТИВ САДОВОДЧЕСКИХ ТОВАРИЩЕСТВ Мамыр-кар 9, АЛМАТЫ НАУРЫЗБАЙСКИЙ, KZ, 050000		
3. БАКЫТОВ ДАУЛЕТ БАКЫТОВИЧ	МКР ТАУГУЛЬ 9, 59, АЛМАТЫ АУЭЗОВСКИЙ -, KZ, 050052		
4. ИЛЬИН АЛЕКСАНДР ИВАНОВИЧ	МИКРОРАЙОН Аксай-3 33, 8, АЛМАТЫ АУЭЗОВСКИЙ Ауэзовский, KZ, 050031		
Я (мы) прошу (просим) не упоминать меня (нас) как автора(ов) при публикации сведений о выдаче патента на изобретение			
Подпись(и) автора(ов):			
Согласен на использование сведений, составляющих охраняемую законом тайну, содержащуюся в информационных системах			
Подпись 14.10.2020		Подписано с помощью ЭЦП. ИЛЬИН АЛЕКСАНДР Роль (Автор)	
Подпись(и) заявителя(ей), (при подписании от имени юридического лица подпись руководителя скрепляется печатью)			



## ПРИЛОЖЕНИЕ В

	<b>«ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>	
	Локальная этическая комиссия (ЛЭК)	Выписка из протокола заседания ЛЭК №13 (77)

### ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА

Заседания № 13 (77)

Локальная этическая комиссия (ЛЭК)

АО «Национальный медицинский университет»

Дата заседания: 26 декабря 2018 года.

Присутствовали:

**Председатель: Алтыибеков С.А.** – д.м.н., профессор, исполнительный директор УМО РУМС

**Заместитель председателя: Жусупов Б.С.** - проректор по исследовательской деятельности

**Секретарь: Тажиева А.Е.**

**Члены Локальной Этической Комиссии (ЛЭК):**

1. **Балмуханова А.В.** - д.м.н., профессор, руководитель департамента науки и инноваций
2. **Айтхожин Г.К.** – д.м.н., профессор кафедры хирургических болезней №3;
3. **Супиев Т. К.** - д.м.н., профессор кафедры «Стоматология детского возраста»;
4. **Устенова Г.О.** - д. фарм.н., зав. кафедры «Технология лекарств и инженерных дисциплин»;
5. **Салиев Т.М.** - директор Научно-исследовательского института фундаментальной медицины им. Б.А. Атчабарова;
6. **Аймаханова А.Ш.** - канд. физ.-мат. наук, н.о. заведующего кафедрой «Биостатистика и основы научного исследования»;
7. **Батырбаева Д. Ж.** - к.м.н., заведующая научной клинико-диагностической лабораторией НИИ ФМ им. Б. Атчабарова;
8. **Сатбаева Э.М.** - к.м.н., ассоциированный профессор, заведующая кафедрой «Фармакология», директор центра экспериментальной фармакологии НИИ ФМ им. Б. Атчабарова;
9. **Нысанова Б.Ж.** – к.м.н., доцент кафедры ортопедической стоматологии;
10. **Касенов Б.Ж.** - к.м.н., доцент кафедры «Патологическая физиология»;
11. **Сейталиева А.М.** – к.м.н., доцент кафедры фармакологии;
12. **Фахрадиев И.Р.** - заведующий лабораторией экспериментальной медицины Научно-исследовательского института фундаментальной медицины им. Б.А. Атчабарова, онколог, общий хирург, эндовидеохirurg, докторант кафедры "Клиническая анатомия и оперативная хирургия";
13. **Испаева Г.Б.** – д.ю.н., профессор кафедры медицинского права АО «Национальный медицинский университет»;
14. **Есжанова П.Р.** – к.х.н., ассоц. профессор кафедры «Технология и безопасность пищевых продуктов» НАО «КазНАУ» (неаффилированное лицо).

Число голосов, принадлежащим членам ЛЭК, принявшим участие в заседании по вопросам повестки дня - «13». Кворум для проведения заседания Комиссии имеется. Из 16 членов ЛЭК присутствуют 13. Заседание Комиссии признано правомочным принимать решения по всем вопросам повестки дня.

	<b>«ЎЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТИ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>		
	Локальная этическая комиссия (ЛЭК)	Выписка из протокола заседания ЛЭК №13 (77)	Редакция: 1 Страница 2 из 4

#### ПОВЕСТКА ДНЯ

Дата: 26.12.2018г.

Рассмотрение материалов исследования: Заявка, регистрац. №672. Диссертационное исследование на соискание степени PhD (экспериментальное исследование «*in vivo*») на тему: **«Фармацевтическая разработка комбинированного лекарственного средства с аддуктами пода»**. Главный исследователь: Джумагазиева А.Б. PhD докторант фармацевтического факультета по специальности «Технология фармацевтического производства». Научный руководитель: д. фарм.н., профессор Датхаев У.М.

#### Перечень документов, представленных на экспертизу:

1. Заявка с протоколом планируемых экспериментов;
2. Аннотация НИР;
3. Справка о состоянии производственных помещений для проведения доклинических исследований;
4. Сведения об оборудовании и аппаратуре, имеющиеся в организации для проведения доклинических исследований;
5. Сведения о лабораторных животных и условиях их содержания;
6. Перечень методов, используемых при проведении доклинических исследований;
7. Перечень стандартных операционных процедур;
8. Гарантийное обязательство;
9. Профессиональная автобиография главного исследователя и его научного руководителя.

#### Эксперт № 1:

**Критерии оценки:** Дизайн исследования: Дизайн представлен, описаны этапы исследования, количество животных и т.д. **Рекомендации эксперта:** Необходимо обосновать запрашиваемое количество экспериментальных животных -12 крыс, согласно нормативным документам по проведению доклинических испытаний в одной группе должно быть 5-6 голов; для 4-х групп соответственно 24 крысы должно быть для достоверности полученных результатов; Рекомендуется указать не только название докторской диссертации, но и название проводимого научного исследования; В протоколе исследования указана только методика по определению токсичности субстанции, но нет методики по изучению токсичности для мази с учетом наружного применения. В протоколе исследования указано, что будет изучаться токсичность и специфическая фармакологическая активность субстанции и мази, но не описаны данные методики, рекомендуется указать показания к применению для мази, какое фармакологическое действие будет изучаться и на каких животных; В пункте по применению метода статистической обработки полученных результатов конкретизировать, какие из перечисленных методов биохимических, иммунологических, гистологических, гистохимических, клеточно-молекулярных, физиологических, морфологических и других будут использованы в данном исследовании.

**Заключение эксперта:** Рекомендовать к одобрению с поправками.

	<b>«ЎЛТТИҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТИ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>	
	Локальная этическая комиссия (ЛЭК)	Выписка из протокола заседания ЛЭК №13 (77)
		Резюме: 1 Страница 3 из 4

### Эксперт № 2:

**Критерии оценки заявки-протокола:** Цель и обоснование необходимости проведения НИР на животных. Обоснование выбора данного вида и количества животных. (По возможности, количество животных в НИР должно подтверждаться статистически). Обоснование невозможности применения менее инвазивных процедур, других видов животных, препаратов изолированных органов, культур клеток или тканей или компьютерного моделирования. Соответствие подготовки и опыта персонала, выполняющего указанные процедуры. Наличие необычных требований по содержанию и разведению животных. Применение соответствующих седативных препаратов, анальгетиков и анестетиков. Неужное дублирование экспериментов. Выполнение многократных, обширных хирургических операций. Критерии и процесс своевременного вмешательства, изъятия животных из эксперимента или эвтаназии, если предполагаются болезненные или стрессовые ситуации. Уход за животными после выполнения эксперимента. Метод эвтаназии (ликвидации) животного. Безопасность рабочих помещений для персонала. Наличие в протоколе процедур не встречавшихся ранее и вызывающих боль и страдания у животных, которые невозможно надежно контролировать (физическая фиксация, многократные и обширные хирургические операции, ограничения в получаемой пище или жидкости, использование адьювантов, использование смерти как конечной точки эксперимента, применение крайне негативно сказывающихся на здоровье животных методов физической, химической или биологической стимуляции, тестирование чувствительности кожи или роговицы, неограниченный рост опухоли, использование необычных параметров среды обитания). Рекомендации эксперта по плану (протоколу) исследования. Рекомендации эксперта ЛЭК по другим представленным на экспертизу документам.

**Заключение эксперта:** Эксперт делает одно из следующих заключений: Рекомендовать к одобрению проведение исследования без замечаний.

**Принятое решение:** Одобрить проведение исследования после устранения замечаний, без повторного рассмотрения ЛЭК.

Решение ЛЭК с рекомендациями экспертов по устранению замечаний было своевременно передано заявителю. Замечания устранены, ответы на вопросы экспертов предоставлены в полном объеме.

**ПОСТАНОВИЛИ:** Локальная этическая комиссия АО Национального медицинского университета считает представленные документы согласно рекомендациям экспертов ЛЭК соответствующими установленным этическим требованиям.

**РЕШЕНИЕ ЛЭК: ОДОБРИТЬ проведение исследования: №672.** Диссертационное исследование на соискание степени PhD (Экспериментальное исследование *in vivo*) на тему: «**Фармацевтическая разработка комбинированного лекарственного средства с аддуктами нода**». Главный исследователь: Джумагазиева А.Б. PhD докторант фармацевтического факультета по специальности «Технология фармацевтического производства». Научный руководитель: д. фарм.н., профессор Датхаев У.М.

**Заключение об одобрении ЛЭК действует один год, с 26 декабря 2018 года по 26 декабря 2019 года. По истечении указанного срока необходимо представить в ЛЭК отчет о выполненной работе за год, не позднее 26 декабря 2019 года. Ответственность за**

	<b>«ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>	
	Лекциялық-тәжірибелік комиссия (ЛЭК)	Выписка из протокола заседания ЛЭК №13 (77)
		Ред. серия: I Страница 4 из 4

представление в ЛЭК отчета по исследованию возлагается на главного исследователя А.Б. Джумагазиеву PhD докторанта фармацевтического факультета по специальности «Технология фармацевтического производства» и ее научного руководителя д. фарм.н., профессора У.М. Датхаева.

Председатель ЛЭК



С. Алтынбеков

Секретарь ЛЭК



А. Тажиева

ҚОҒАМ РАСТАЙЫМЫН  
«Ұлттық медицина университеті»  
акционерлік қоғамының құжатталған сөзінше,  
еңу бөлімінің басшысы  
ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ  
Руководитель отдела документационного обеспечения  
АО «Национальный медицинский университет»

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

	«С.Ж. АСФЕНДИЯРОВ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» ҚБАҚ НАО «КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ С.Д.АСФЕНДИЯРОВА»	
	Локальная этическая комиссия (ЛЭК)	Заключение

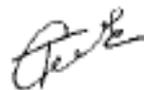
### Заключение

Локальная этическая комиссия (ЛЭК)  
 НАО «Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова»

1. ФИО докторанта	Джумагазиева Ардак Бисенбаевна
2. Специальность (образовательная программа) докторантуры	«6D074800- Технология фармацевтического производства»
3. Период обучения в докторантуре	2016-2019 г.
4. Тема диссертации, дата утверждения	«Фармацевтическая разработка комбинированного лекарственного средства с аддуктами иода»  Дата утверждения: Выписка из протокола №1 заседания Научного Комитета от 17.10.2016 г
5. Данные о научных консультантах – Ф.И.О. (при его наличии), должности и места работы, ученые степени, гражданство	Научные руководители: - Датхаев У.М. - д.фарм.н., профессор. - Ильин А.И.- д.х.н., академик НАЕН.
6. Объекты исследования	Субстанция координационного соединения и комбинированное лекарственное средство
7. Нарушения в процессе планирования, оценки, отбора и проведения научных исследований	Нарушения не выявлены.
8. Нарушения в процессе распространения результатов научных исследований	Нарушения не выявлены.

9. Каким образом проводилась защита прав, безопасности и благополучия объектов исследования (в случае наличия объектов живой природы и среды обитания)?
- Защита прав, безопасности и благополучия объектов исследования проводилась по соблюдению руководств по проведению доклинических исследований лекарственных средств по Мионову А.Н.

Заместитель председателя ЛЭК



Т.Салиев

Секретарь ЛЭК



Р.Онгалова



## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

**УТВЕРЖДЕН**

Председатель Правления  
АО «Научный центр  
противоинфекционных препаратов»

  
А. И. Ильин  
« 04 » \_\_\_\_\_ 2021 г.

### ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА

РГП на ПХВ «Национальный центр  
экспертизы лекарственных средств,  
изделий медицинского назначения и  
медицинской техники» МЗ РК

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

### ПРИКАЗ

Комитета контроля медицинской и  
фармацевтической деятельности  
МЗ РК

от « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

№ \_\_\_\_\_

## ПРОЕКТ

### НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Торговое наименование лекарственного препарата: Субстанция D1

МНН : -

Лекарственная форма: Порошок

Дозировка: -

Держатель регистрационного удостоверения: АО «Научный центр  
противоинфекционных препаратов», Республика Казахстан

Номер и дата нормативного документа: -

ПРОЕКТ НД РК 42-

Срок введения установлен с

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

Вводится впервые

Срок действия до

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

**УТВЕРЖДЕН**

Председатель Правления  
АО «Научный центр  
противоинфекционных препаратов»  
*А. И. Ильин*  
« 04 » \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

### ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА

РГП на ПХВ «Национальный центр  
экспертизы лекарственных средств,  
изделий медицинского назначения и  
медицинской техники» МЗ РК

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

### ПРИКАЗ

Комитета контроля медицинской и  
фармацевтической деятельности  
МЗ РК

от « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

№ \_\_\_\_\_

## ПРОЕКТ

### НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

**Торговое наименование лекарственного препарата:** Комбинированный  
антимикробный гель

**МНН :** -

**Лекарственная форма:** Гель

**Дозировка:** 1 %/0,75%

**Держатель регистрационного удостоверения:** АО «Научный центр  
противоинфекционных препаратов», Республика Казахстан

**Номер и дата нормативного документа:** -

**ПРОЕКТ АНД РК 42-**

**Вводится впервые**

Срок введения установлен с

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

Срок действия до

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

**ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ**

**ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА**

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Утверждаю

Проректор по научной работе ФГБОУ  
ВО СПХФУ Минздрава РФ,  
заведующий кафедрой технологии  
лекарственных форм, докт.фарм.н.,  
профессор  Е. В. Флисюк

«            » июня 2018 года

Акт

### о внедрении результатов научно-исследовательской работы в учебный процесс ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава РФ

1. **Наименование предложения для внедрения:** изучение физико-химических свойств гидрофильных мазевых основ. Изучение вязкости дисперсных систем. Обоснование способов введения и выбора вспомогательных веществ для введения действующих активных субстанций в мази на гидрофильных основах.

2. **Авторы разработки:** доцент кафедры ТЛФ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава РФ, канд.фарм.н. Русак А.В., PhD-докторант Казахского Национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова специальности 6D074800 «Технология фармацевтического производства» Джумагазиева А.Б.

3. **Где и куда внедрено:** в практический курс для магистрантов. Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология. Уровень высшего образования – магистратура, направленность (профиль) магистерской программы «Фармацевтическая разработка лекарственных препаратов» Б.1.ПМ.00 Разработка состава и технологии лекарственного препарата. МДК 01.01 Свойства фармацевтических субстанций. Вспомогательные вещества.

4. **Результаты внедрения:** получение магистрантами новых знаний, формирование компетенций в области разработки лекарственных средств, изучения их физико-химических, реологических свойств, вязкости гомогенных и гетерогенных систем а также выбора вспомогательных веществ для обеспечения введения действующих активных субстанций в мази на гидрофильной основе.

доцент кафедры ТЛФ  
канд.фарм.н.

 А.В. Русак  
подпись, дата

PhD-докторант КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова,  
специальность 6D074800 «Технология фармацевтического  
производства»

 А.Б. Джумагазиева  
подпись, дата

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

УТВЕРЖДАЮ  
Председатель Правления АО «Научный  
центр противинфекционных  
препаратов», д-р хим. наук,  
академик КазНАЕН



А.И. Ильин  
2021 г.

АКТ

о внедрении основных результатов диссертационной работы PhD докторанта  
Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова –  
Джумагазиевой Ардак Бисенбаевны  
Тема: «Разработка комбинированного лекарственного средства с аддуктами нода»

**Наименование предложения для внедрения:** Разработка комбинированных лекарственных средств, содержащих координационное соединение (аддукт) нода и антибиотик клорамфеникол.

**Учреждение, автор:** Казахский Национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, кафедра фармацевтической технологии, PhD-докторант специальности «61074800 – Технология фармацевтического производства» Джумагазиева Ардак Бисенбаевна.

**Где внедрено:** Опытное производство АО «Научный центр противинфекционных препаратов».

**Форма внедрения:** Основные результаты диссертационного исследования внедрены в практическую деятельность Научного центра. Приняты к внедрению научно-исследовательские разработки в соответствии с международным стандартом GLP и руководством по фармацевтической разработке ICH Q8.

**Эффективность внедрения:** Способ получения комбинированной штимакробной мази.

**Охраноспособность объекта научно-инновационного внедрения:** Подана заявка на получение патента на изобретение.

**Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение:** Нет.

**Ответственный за внедрение:**

  
Председателя Правления  
АО «НЦПП»  
к.х.н., академик КазНАЕН  
Ильин А.И.  
«11» август 2021 г.

**Исполнитель:**

  
Джумагазиева А.Б.

**Главный технолог опытного  
производства**

  
Ахметова М.С.

**Зав. опытным производством,  
к.х.н.**

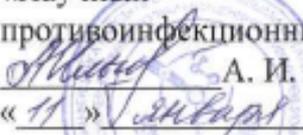
  
Щукина О.В.

## ПРИЛОЖЕНИЕ И

Для служебного пользования. Экз. № 1

**УТВЕРЖДАЮ**

Председатель Правления АО  
«Научный центр  
противоинфекционных препаратов»

  
А. И. Ильин  
«11» января 2021 г.



### ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

на производство субстанции D1

Разработчик: PhD докторант КазНМУ  
им. С.Д. Асфендиярова специальности  
«Технология фармацевтического  
производства» Джумагазиева А.Б.

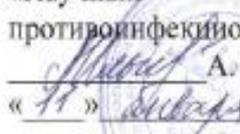
Срок действия технологической инструкции до «11» января 2023 г.

## ПРИЛОЖЕНИЕ К

Для служебного пользования. Экз. № \_\_\_\_

**УТВЕРЖДАЮ**

Председателя Правления АО  
«Научный центр  
противоинфекционных препаратов»

  
А. И. Ильин  
« 11 » сентября 2021 г.

### ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

на производство комбинированного антимикробного геля, содержащего  
субстанцию аддукта (координационного соединения) иода D1 и антибиотик  
хлорамфеникол

Разработчик: PhD докторант КазНМУ  
им. С.Д. Асфендиярова специальности  
«Технология фармацевтического  
производства» Джумагазиева А.Б.

Срок действия технологической инструкции до « 11 » сентября 2023 г.

Алматы 2021 г.