

*На правах рукописи*



ОБЛУЧИНСКАЯ  
Екатерина Дмитриевна

**КАСКАДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ  
СРЕДСТВ ИЗ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ АРКТИКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ  
ИНСТРУМЕНТОВ QbD**

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора фармацевтических наук

Мурманск  
2024

Работа выполнена в федеральном бюджетном учреждении науки Мурманском морском биологическом институте Российской академии наук

Научный консультант:

**Шиков Александр Николаевич** доктор фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты:

**Молохова Елена Игоревна** доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии

**Джавахань Марина Аркадьевна** доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по разработке и внедрению Научно-образовательного института фармации имени К.М. Лакина

**Блынская Евгения Викторовна** доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», заведующий лабораторией технологии лекарственных препаратов

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита состоится «15» октября 2024 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г.Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул.Профессора Попова, д.14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте организации (<http://dissovet.spcpu.ru>).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 21.2.063.01,  
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** В последние годы возрастает интерес к лекарственным средствам природного морского происхождения. Основными направлениями Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года являются: разработка безопасных лекарственных препаратов, обеспечивающая качество на всех этапах жизненного цикла, импортозамещение. Особое направление Стратегии - разработка антикоагулянтов. В этой связи актуально создание лекарственных средств на основе биологически активных веществ (БАВ) водорослей, включая антикоагулянты. Новые экологически чистые и экономичные технологии их получения внесут вклад в достижение углеродной нейтральности российской экономики до 2050 г.

Инструменты концепции «Качество через разработку» или Quality-by-Design (QbD) позволяют обеспечить качество лекарственного препарата на протяжении всего жизненного цикла, начиная с ранней стадии исследований и разработок и заканчивая производством. В соответствии с основным положением QbD качество препарата должно быть встроено в разработку.

Изменчивость качества растительного сырья является важнейшим вопросом при получении фитопрепаратов из-за естественных колебаний содержания целевых БАВ. Применение инструментов QbD к фармацевтической разработке препаратов растительного происхождения позволит контролировать качество с помощью всех процессов и операций, начиная с этапов сбора и заготовки сырья.

Источниками фармакологически активных веществ служат бурые водоросли: ламинариевые и фукусовые. Потенциал бурых водорослей семейства Fucaceae в качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС) до конца не раскрыт. В Российской Федерации в Государственную Фармакопею включены только несколько видов ламинарии. Из них преимущественно получают один компонент, чаще всего альгинат натрия. Однако получение лекарственных средств из водорослей еще не является коммерчески устойчивым. В качестве альтернативы производству монопродукта, стали формироваться каскадные подходы к технологии переработки бурых водорослей. Каскадные технологии обеспечивают поэтапное извлечение БАВ в соответствии с принципом step-by-step, когда каждая технологическая стадия предназначена для извлечения одного компонента и для очистки следующего.

Сырьевая база арктических фукоидов не уступает ламинариевым на побережье Баренцева и Белого морей. Арктические моря смогут обеспечить получение высококачественного безопасного сырья, как для импортозамещения, так и для экспорта. Климатические условия российского побережья Баренцева моря позволяют круглогодично заготавливать сырье. Создание безотходных технологий получения лекарственных средств на основе БАВ бурых водорослей арктических морей будет способствовать выполнению Программы развития Арктики, утвержденной Указом Президента РФ 26.10.2020 г, которая предусматривает внедрение в Арктической зоне условий для перехода к экономике замкнутого цикла, созданию новых и модернизации действующих

промышленных предприятий, развитию наукоемких и высокотехнологичных производств.

В этой связи актуальна разработка научно-обоснованной методологии каскадных технологий получения БАВ бурых водорослей Арктики, включая фармацевтические субстанции и вспомогательные вещества, а также лекарственных препаратов на их основе с применением инструментов QbD.

**Степень разработанности темы исследования.** В научных публикациях, посвященных переработке водорослевого сырья внимание уделяется получению ограниченного набора БАВ. Работы разных лет в период с 1999 по 2024 гг. российских авторов, таких как Звягинцева Т.Н., Шевченко Н.М., Ермакова С.П., Имбс Т.И., Кусайкин М.И., Подкорытова А.В., Аминина Н.М., Усов А.И., Нифантьев Н.Э., Билан М.И. и других, сосредоточены на совершенствовании способов получения БАВ из слоевищ бурых водорослей, определении их физико-химических свойств, структурных характеристик, оценки различных видов биологической активности. Немногие работы в этой области затрагивают фармацевтическую сферу: это работы Кауховой И.Е. (1999-2007), Вайнштейна В.А. (1999), Компанцева В.А. и Компанцевой Е.В. (2002), Шикова А.Н. (2006), Саканян К.М. (2005). Эти исследования посвящены созданию технологий комплексного использования бурых водорослей, однако имеют свои ограничения по применению только к высушенному сырью, а также ограничены по числу получаемых БАВ. Каскадный подход к получению БАВ из бурых водорослей применяется преимущественно за рубежом в последние годы и отражен в публикациях Yuan и Macquarrie (2015), Abraham с соавт. (2019), Zhang и Thomsen (2021), Sasaki с соавт. (2022), Dobrinčić с соавт. (2022) и других.

При создании зеленых технологий переработки ЛРС привлекают внимание природные глубокие эвтектические растворители как экстрагенты нового поколения, способные заменить органические. Впервые предложенный Abbot с соавторами в 2003 г. термин «глубокие эвтектические растворители (ГЭР или DES)» стал использоваться для наименования целой группы дизайнерских экстрагентов, расширяя спектр входящих в это понятие эвтектических смесей. В 2011 г. группой ученых под руководством Verpoorte предложен новый класс природных глубоких эвтектических растворителей (ПГЭР или NADES), для приготовления которых используют метаболиты живых клеток. Исследования, посвященные извлечению флавоноидов, антоцианов и других БАВ из наземного растительного сырья с помощью ПГЭР отражены в работах Dai и Verpoorte с соавт. (2011, 2013- 2016, 2019), Chemat с соавт. (2012), Radosevic с соавт. (2016), Cannavacciuolo с соавт. (2022), а также отечественными учеными Шиковым А.Н., Флисюк Е.В., Пожарицкой О.Н. (2020, 2023), Джавахян М.А. (2022, 2023). Применение ПГЭР в фармацевтической области мало изучено, однако, очевидные преимущества этих растворителей делают целесообразным продолжение поиска подходов к изучению и внедрению этого класса растворителей в технологию получения БАВ из растительного сырья.

*Fucus* sp., наряду с ламинаревыми водорослями, широко распространены на каменистых приливно-отливных зонах Арктики и Субарктики. По оценкам сотрудников ПИНРО и ММБИ РАН (Пельтихиной Т.С., Шошиной Е.В.,

Воскобойникова Г.М., Малавенда С.В. и др.) современные запасы дикорастущих фукусовых водорослей достаточны для коммерческого сбора (не менее 180 тыс. тонн). По уровню содержания БАВ, фукусовые морей России не уступают, а по некоторым (фукоидану, полифенолам, фукоксантину) и превосходят фармакопейные виды водорослей (Клочкова Н.Г., Клочкова Т.А., Скрипцова А.В., Подкорытова А.В., Боголицын К.Г. и др.). Для освоения ресурсов арктических морей России в аспекте рационального природопользования изученность БАВ фукусовых водорослей Баренцева и Белого морей недостаточна. За счет уникального фитохимического состава БАВ с широким спектром фармакологической активности, фукусовые водоросли Арктики обладают высоким потенциалом для получения ЛС.

Создание методологии безотходных технологий эффективного использования дикорастущего сырья морского происхождения, получения и стандартизации оригинальных ЛС на основе БАВ бурых водорослей Арктики составило основу настоящего диссертационного исследования.

**Цель и задачи исследования.** Целью исследования является создание методологии каскадных технологий получения лекарственных средств из бурых водорослей Арктики с применением инструментов концепции «Качество через разработку» или «Quality-by-Design» (QbD).

**Задачи** исследования:

- провести оценку рисков потери качества водорослевого сырья с применением инструментов QbD, а также анализ влияния факторов на целевой профиль качества бурых водорослей;
- изучить закономерности влияния основных технологических факторов (температура, время экстракции, методов экстракции) на выход БАВ бурых водорослей, а также способов интенсификации экстракции БАВ бурых водорослей;
- разработать технологию переработки бурых водорослей с использованием нового класса экстрагентов – природных глубоких эвтектических растворителей (ПГЭР);
- разработать состав и технологию получения антикоагулянтных лекарственных препаратов на основе фукоидана с применением инструментов QbD;
- провести оптимизацию, валидацию и масштабирование разработанных технологий;
- сформулировать основные положения методологии каскадных технологий получения из бурых водорослей Арктики лекарственных средств с применением инструментов концепции QbD;
- разработать и валидировать методики сквозной стандартизации лекарственных средств на основе фукоидана;
- провести комплекс биофармацевтических исследований по безопасности и эффективности разработанных фармацевтических субстанций и лекарственных форм;
- разработать нормативную документацию на слоевища фукусовых водорослей, фармацевтические субстанции и лекарственные формы на их основе, а также технологии их получения.

**Научная новизна** состоит в том, что

- Теоретически обоснована методология каскадных технологий получения лекарственных средств из бурых водорослей Арктики с применением инструментов QbD, обеспечивающая достижение надлежащего качества препаратов за счет контроля на всех этапах фармацевтической разработки;
- Обобщенный анализ рисков потери качества сырья с применением инструментов QbD впервые выявил факторы с высоким рангом, влияющие на целевой профиль качества, привел к созданию стратегии контроля, позволяющей адаптируемо компенсировать изменчивость сырья для получения лекарственных средств с постоянным качеством;
- Каскадное извлечение БАВ, при котором каждая технологическая стадия предназначена для извлечения одного компонента и одновременной очистки следующего, способствует получению высокоочищенных фармацевтических субстанций и комплексных препаратов, а также валоризации производства лекарственных средств из бурых водорослей. Приоритетность способов получения лекарственных средств защищена патентами РФ;
- Впервые показано что, замена стадии сушки на замораживание бурых водорослей после сбора приводит к повышению качества и расширению спектра получаемых фармацевтических субстанций;
- Впервые изучены кинетические закономерности УЗ-экстракции фукоидана и оптимизирована технология его получения с применением инструментов QbD, приводящая к высокой антикоагулянтной активности субстанции. Технология защищена патентами РФ;
- Впервые заменены органические экстрагенты на новый класс природных глубоких эвтектических растворителей в процессе каскадной переработки бурых водорослей, что привело к созданию зеленой безотходной технологии;
- Впервые установлено, что природные глубокие эвтектические растворители можно настраивать для селективного или одновременного извлечения гидрофильных и липофильных веществ из водорослей. Доказано, что природные глубокие эвтектические растворители стабилизируют действующие вещества и их биологическую активность при хранении извлечений в естественных условиях;
- С применением инструментов QbD оптимизирована технология экстракции флоротанинов с помощью природных глубоких эвтектических растворителей из водорослей. Впервые экспериментально подтверждена эквивалентность химических профилей флоротанинов, извлекаемых этанолом и природными глубокими эвтектическими растворителями;
- Разработана и оптимизирована технология получения таблеток фукоидана для перорального приема с применением инструментов QbD. Новизна технологии подтверждена патентом РФ;
- Впервые для фармацевтической отрасли представлен алгоритм получения трансдермальной системы доставки фукоидана с применением инструментов QbD;
- В результате биофармацевтических исследований впервые доказано, что высокомолекулярный фукоидан обладает биодоступностью как после

перорального, так и после трансдермального введения. Методами *in vitro* и *in vivo* установлены антикоагулянтная, противовоспалительная, антиоксидантная, противодиабетическая активности фукоидана и его лекарственных форм.

**Теоретическая и практическая значимость.** Теоретическая значимость исследования заключается в научном обосновании методологии каскадных технологий получения лекарственных средств из бурых водорослей Арктики, охватывающей все этапы фармацевтической разработки препаратов, а также включающую ранее неизвестные закономерности в технологии экстракции БАВ бурых водорослей, в том числе с использованием нового класса природных глубоких эвтектических растворителей, получения таблеток и трансдермальных систем доставки на основе фукоидана, исследования по созданию систем обеспечения их качества с применением инструментов QbD. В диссертационной работе изложены новые научно обоснованные технологические решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие фармацевтической отрасли и соответствуют Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года (утв. Распоряжением Правительства РФ от 07.06.2023 г.) в части разработки инновационных лекарственных препаратов и необходимых сырьевых ингредиентов по полному технологическому циклу с целью импортозамещения антикоагулянтов и вспомогательных веществ для фармацевтической, пищевой и косметической промышленности. Разработанные новые экологически чистые и экономичные технологии их получения, включая применение зеленых природных глубоких эвтектических растворителей, вносят вклад в достижение углеродной нейтральности российской экономики до 2050 г. согласно Стратегии социально-экономического развития России (утв. Распоряжением Правительства РФ от 29.10.2021 г.). Создание каскадных технологий получения лекарственных средств на основе БАВ бурых водорослей способствует выполнению Программы развития Арктики, утвержденной Указом Президента РФ от 26.10.2020 г, которая предусматривает внедрение в Арктической зоне условий для перехода к экономике замкнутого цикла, созданию новых и модернизации действующих промышленных производств, развитию наукоемких и высокотехнологичных производств.

Практическая значимость исследования заключается в том, что каскадные технологии переработки бурых водорослей обеспечивают полную безотходность производства, в результате которого из бурых водорослей получают активные субстанции фармакопейного качества, в том числе липидный концентрат, маннит, альгинат натрия и фукоидан, а также субстанции для фармацевтической, пищевой и косметической промышленности, включая полифенольный комплекс, фукоксантин.

Разработаны и валидированы технологии антикоагулянтных лекарственных средств: таблеток и трансдермальной системы доставки фукоидана. Разработаны и валидированы методики сквозной стандартизации фармацевтической субстанции фукоидан и лекарственных препаратов на его основе.

Проведен полный комплекс доклинических исследований безопасности и эффективности фармацевтической субстанции фукоидан и готовых

лекарственных форм на ее основе. Проведено изучение стабильности субстанции и лекарственных препаратов. Установлено, что фукоидан и препараты на его основе стабильны в течение 2 лет и 6 мес. при хранении в естественных условиях.

Разработана и утверждена оригинальная методика сбора и заготовки слоевищ бурых водорослей Арктики. Разработан проект НД на сырье – слоевища фукусовых водорослей.

Результаты разработки технологии получения липидного концентрата, маннита, фукоидана и альгината натрия оформлены в виде лабораторных, опытно-промышленных регламентов. Составлены проекты НД на слоевища фукуса пузырчатого, фармацевтическую субстанцию фукоидан, таблеток и трансдермальной системы доставки фукоидана, а также комплекс флоротанинов.

Результаты диссертационного исследования внедрены на предприятии ООО «Биомарин» (г. Мурманск), специализирующемся на производстве биологически активных субстанций из гидробионтов, включая водоросли (акт внедрения от 13.04.2023 г.), на опытном производстве ООО «Архангельский водорослевый комбинат» (г. Архангельск) (акт внедрения от 20.01.2023). Результаты диссертационного исследования составили основу Государственного Контракта № 14.N08.11.1036 на выполнение прикладных научных исследований и экспериментальных разработок для государственных нужд в рамках реализации мероприятия 2.5 «Доклинические исследования инновационных лекарственных средств» федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». Результаты диссертационного исследования по разработке каскадной технологии из бурых арктических водорослей внедрены в учебный процесс Научно-образовательного и инновационного центра химико-фармацевтических технологий Химико-технологического института Уральского федерального университета им. Первого президента Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург) (акт внедрения от 12.09.2023).

Разработанные технологии защищены патентами Российской Федерации «Способ комплексной переработки фукусовых водорослей (варианты)» (Патент № 2337571), «Сухой экстракт фукуса, способ его получения и антикоагулянтная мазь на его основе» (Патент № 2506089), «Сухой экстракт из фукусовых водорослей, обладающий антиоксидантным действием, и способ его получения» (Патент № 2650808), «Фармацевтическая композиция на основе фукоидана для перорального применения и способ её получения» (Патент № 2657615), «Способ получения полисахаридов из шрота (отходов переработки) бурых водорослей» (Патент № 2793805).

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Целевой профиль качества бурых водорослей для получения стандартизированных лекарственных средств, учитывающий влияние факторов высокого ранга с использованием диаграммы Ишикавы и метода анализа видов и последствий отказов - инструментов QbD.
2. Каскадная технология переработки бурых водорослей, при которой каждая технологическая стадия предназначена для извлечения одного компонента и одновременной очистки следующего, обеспечивает полную безотходность

производства и получение липидного концентрата, фукоксантина, маннита, полифенольного комплекса, фукоидана, альгината натрия для фармацевтической, пищевой и косметической промышленности.

3. Закономерности влияния основных технологических факторов, растворителей, включая новый класс ПГЭР, методов экстракции и их интенсификации на выход БАВ и целевой профиль качества лекарственных средств из бурых водорослей. Результаты масштабирования и валидации каскадной технологии переработки бурых водорослей.
4. Обоснование и реализация технологии получения антикоагулянтного лекарственного препарата таблетки на основе фукоидана в соответствии с принципами QbD, обеспечивающими надлежащие качество и технологические характеристики.
5. Алгоритм получения трансдермальной системы доставки фукоидана с применением инструментов QbD, заключающийся в обосновании выбора состава вспомогательных веществ.
6. Стратегия обеспечения качества полученных лекарственных средств, в том числе валидированные методики сквозной стандартизации фукоидана и готовых лекарственных форм на его основе.
7. Безопасность, эффективность и механизмы действия разработанных фармацевтических субстанций и лекарственных форм установлены по результатам биофармацевтических и доклинических исследований.
8. Методология каскадных технологий получения лекарственных средств из бурых водорослей Арктики с применением инструментов QbD, обеспечивающая достижение надлежащего качества препаратов за счет контроля на всех этапах фармацевтической разработки.

**Методология и методы исследования.** Методология исследования базируется на поиске информации опубликованной в научной литературе, реестре патентов на изобретения, российских и международных баз данных, а также проведении экспериментальных изысканий с получением результатов в соответствии с принятыми и разработанными методиками.

Исследования проводились в период с 2004 по 2024 гг. с применением методов физико-химического анализа, включая методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии (ГЖХ), эксклюзионной хроматографии (ЭХ), высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии высокого разрешения ВЭЖХ-МСВР и высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием ВЭЖХ/МС-МС, ЯМР- и ИК-спектрометрии. При реализации подхода к определению критериев качества лекарственных средств (ЛС) и готовых лекарственных форм (ГЛФ) руководствовались статьями ГФ РФ XIV-XV изд. В диссертационном исследовании применяли инструменты концепции QbD: для оценки рисков использовали метод анализа рисков FMEA (Failure Mode and Effects Analysis) – анализ видов и последствий отказов и диаграмму Исикавы (Ишикавы), для создания пространства проектных параметров применяли математические методы планирования эксперимента. Для изучения

биологической и фармакологической активности лекарственных средств применяли биофармацевтические методы экспериментальных исследований *in vivo* и *in vitro*. Все результаты экспериментов подвергались статистической обработке.

**Степень достоверности и апробация полученных результатов.** Достоверность результатов обеспечивается использованием воспроизводимых и валидированных методик исследований, апробированных многократно на более чем 600 образцах бурых водорослей, собранных в 19 акваториях Арктики в разные сезоны. Для получения результатов применялись аттестованные и поверенные приборы и оборудование. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых журналах, представлены и обсуждены на международных и российских конференциях, симпозиумах, конгрессах, а также научно-инвестиционных выставках.

Основные положения и результаты диссертационной работы представлены на различных научных мероприятиях, в том числе:

на международном круглом столе в рамках 1-го международного симпозиума «Агрохимия, пищевая химия и биотехнология», г. Екатеринбург 10-16 сентября 2023 г.; VI Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология», Мурманск, 11-15 сентября 2023; III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII Съезде физиологов СНГ. VII Съезде биохимиков России. X Российском симпозиуме «Белки и пептиды». (Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2022); XI международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 11–15 апреля 2022 г.); V Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология», Гатчина, 21–24 сентября 2021; VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 07-08 ноября 2019; международной научно-практической конференции «Современные эколого-биологические и химические исследования, техника и технология производств», Мурманск, 07 апреля 2017 года; на VII Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья», Барнаул, 2017; на международной научной конференции, посвящённой памяти члена-корреспондента РАН Д.Г. Матишова «Окружающая среда и человек. Современные проблемы генетики, селекции и биотехнологии», Ростов-на-Дону, 2016 г; на международной конференции «Фитофарм» 2012, 2013, 2014, 2016, 2017, 2019 гг.

Результаты диссертационной работы были отмечены дипломами и золотой медалью Международной выставки-конгресса «Высокие технологии, инновации, инвестиции», а также Дипломом VI Московского международного салона инноваций и инвестиций. Автор исследования награждена медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени за большой вклад в развитие науки и многолетнюю добросовестную работу (Указ Президента РФ № 919 от 04.12.2023 г.).

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-

исследовательских работ федерального государственного бюджетного научного учреждения «Мурманский морской биологический институт» в рамках тем: «Научные основы инновационных технологий биологически активных веществ водорослей Баренцева моря» (№ темы 0228-2019-0013), «Биологически активные вещества гидробионтов Арктики: особенности химического состава и строения, технологии глубокой переработки, применение» (№ темы в ГЗ FMEE-2021-0027); поддержана грантами РФФИ: «Биологически активные комплексы водорослей Баренцева моря аминокислотной, полисахаридной и полифенольной природы» (Проект 14-04-98807), «Природные глубокие эвтектические растворители как основа «зеленых» технологий биологически активных веществ водорослей Баренцева моря» (Проект № 17-44-510487); а также выполнена по Федеральной целевой программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (ГК 14.N08.11.1036 «Доклинические исследования антикоагулянтного лекарственного средства на основе фукоидана» 2015–2017 гг.).

**Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов.** Автор лично участвовала в планировании и реализации экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций по результатам выполненной работы. Личный вклад автора составляет не менее 85 %.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки), а именно пункту 1 – «Решение задач в области разработки и промышленного производства лекарственных средств, обеспечивающих соблюдение надлежащих практик. Разработка инструментов, методов и подходов к оценке безопасности, эффективности и качества лекарственных средств», пункту 2 – «Проектирование и разработка технологий получения фармацевтических субстанций и лекарственных форм, утилизация производственных отходов с учетом экологической направленности. Стандартизация и валидация процессов и методик, продуктов и материалов. Оптимизация организационных и технологических процессов при разработке и получении лекарственных средств», пункту 3 - «Исследование биофармацевтических аспектов в технологии получения лекарственных средств, их дизайн и изучение фармацевтических факторов, влияющих на биодоступность. Разработка и валидация бионалитических методик. Исследование стабильности лекарственных средств», пункту 4 - «Организация фармацевтической разработки. Трансфер (перенос) фармацевтических технологий и аналитических методик из научных лабораторий в промышленное производство», пункту 7 - «Разработка и совершенствование научных, методологических и практических принципов систем качества. Управление рисками лекарственных средств, аудиты систем качества».

**Публикации материалов исследования.** По теме диссертации опубликовано 66 научных работ, среди которых 28 статей в изданиях, включенных в наукометрическую базу данных Scopus, в том числе 18 статей в

журналах перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации, рекомендованные ВАК Минобрнауки России, а также монография. Получено 5 патентов на изобретения.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 475 печатных страницах, состоит из введения, обзора литературы, характеристики объектов и методов исследования, пяти глав исследовательской работы, заключения, списка использованной литературы, включающего 374 источника, в том числе 270 – зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 97 рисунками, 44 таблицами.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во Введении** изложены актуальность, цель и задачи исследования, показана теоретическая и практическая значимость работы.

**В главе 1 Обзор литературы** приведены краткие сведения о бурых водорослях как растительном сырье для фармацевтической промышленности, включая информацию о распространении и местообитании, химическом составе. Рассмотрены основные БАВ макрофитов, их фармакологическое действие, ЛС на их основе, а также представлен анализ современного состояния и тенденций развития технологий получения ЛС на основе БАВ бурых водорослей. Особое внимание уделено вопросам сбора и заготовки водорослевого сырья, сведениям о влиянии факторов на изменчивость содержания БАВ, а также каскадного подхода к технологиям получения БАВ бурых водорослей и применению концепции «QbD» к созданию фитопрепаратов. Рассмотрено применение ПГЭР в технологии получения извлечений из лекарственного растительного сырья.

**В главе 2 Материалы и методы** представлена информация об объектах исследования, о реактивах и материалах, а также о методах исследования.

Объекты исследования - представители бурых водорослей Арктики (*Fucus vesiculosus* Linnaeus 1753; *Fucus serratus* Linnaeus 1753; *Fucus distichus* Linnaeus 1753; *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis 1863; *Fucus spiralis* Linnaeus 1753; *Pelvetia canaliculata* (Linnaeus) Decaisne & Thuret, 1845; *Saccharina latissima* (L.) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders, 2006; *Laminaria digitata* (Huds.) Lamouroux, 1813) были собраны в различные сезоны 2004-2023 гг. Образцы бурых водорослей собраны ежегодно в разные сезоны года в зависимости от задач исследования в губах и заливах Баренцева моря (губы Зеленецкая, Ярнышная, Териберская, Печенга, Ура, Кольский залив), Белого моря (Кандалакшский залив), моря Баффина (залив Диско), Норвежского моря, моря Ирмингера, залив Факсафлоу Атлантического океана.

Методы исследования: методы макро- и микроскопического анализа; метод хроматографии (ВЭЖХ, ГХ, ВЭЖХ-МСВР, ВЭЖХ/МС-МС); ЯМР- и ИК-спектроскопии; биофармацевтические методы *in vivo* и *in vitro*. Для экстракции водорослевого сырья использовали как классические методы (мацерация, перколяция, экстракция в аппарате Сокслета), так и экстракцию с ультразвуком.

В работе применяли инструменты концепции QbD: для оценки рисков использовали метод анализа рисков FMEA – анализ видов и последствий отказов; для определения факторов, влияющих на целевой профиль качества сырья,

диаграмма Ишикавы; определение целевого профиля качественных характеристик ЛС; оценка возможных критичных качественных признаков лекарственного препарата - критичные показатели качества (КПК) и критичные показатели качества материалов (КПКМ); выявление критичных параметров процесса (КПП); разработка проектного поля и его оптимизация; определение стратегии контроля (СК); для создания пространства проектных параметров применяли математические методы планирования эксперимента. Все результаты экспериментов подвергались статистической обработке.

**В главе 3 Методология каскадных технологий получения лекарственных средств из бурых водорослей Арктики** проведено теоретическое и экспериментальное обоснование Методологии с применением инструментов QbD для обеспечения качества ЛС на протяжении всего жизненного цикла, начиная с ранней стадии исследований и разработки, включая стадии сбора и заготовки сырья.

Водорослевое сырье обладает большой пластичностью фитохимического состава под влиянием факторов, как эндогенных (вид водорослей, фазы их роста и развития), так и экзогенных (условия местообитания, сезон сбора и др.). Концепция QbD для определения целевого профиля качества каждого из ЛС из бурых водорослей была применена для выявления критичных характеристик сырья, а также разработки стратегии контроля качества сырья.

Для процессов сбора и заготовки бурых водорослей разработана диаграмма Ишикавы, которая определяет факторы, влияющие на желаемые показатели качества сырья (рис. 1). Проведено ранжирование факторов по частоте появления, влиянию и обнаруживаемости с помощью метода FMEA (табл. 1). На основании данных литературы и собственных многолетних исследований установлено влияние факторов (соленость, температура, вид водорослей, фаза размножения и др.) на содержание полисахаридов, липидов, полифенолов и других БАВ бурых водорослей Арктики. Показано, что риски, связанные с организацией сбора водорослей, являются факторами высокого ранга для дальнейшего получения ЛС: места произрастания водорослей с индивидуальными характеристиками среды являются определяющими экзогенными факторами в накоплении БАВ, а видоспецифичность сырья – определяющий эндогенный фактор.

При проведении сравнительного исследования химического состава наиболее распространенных видов бурых водорослей акваторий Баренцева и Белого морей в различные сезоны выявлен высокий потенциал для представителей семейства Fucales как ЛРС. Фукусовые арктические водоросли содержат маннит 8.9–16%, липиды 0.9-4.8%, в том числе жирные кислоты 11.2-31.9%, йод 0.09-0.17%, полифенолы 2.1-7.2% пигментов до 1372 мкг/г, в том числе фукоксантина до 448 мкг/г. При изучении сезонных изменений содержания альгиновой кислоты у фукусовых водорослей Баренцева моря 4-х видов: *F. vesiculosus*, *F. distichus*, *F. serratus* и *A. nodosum* было показано, что у всех образцов в августе содержание альгиновой кислоты максимально и составляло 20-24%. Для сравнения содержание альгинатов у ламинариевых водорослей *S. latissima* составляло в августе 30-36% альгиновой кислоты, у *L. digitata* – 18-24%. Содержание фукоидана баренцевоморских фукусовых водорослей изменялось от 10-11% в

декабре до 14-15% в августе, что превышает уровень как представителей ламинариевых водорослей (*S. latissima*), так и представителей дальневосточных видов фукусовых, содержащих не более 7-8%.



Рисунок 1. Оценка риска потери качества водорослевого сырья: диаграмма Ишикавы.

Таблица 1. Первоначальная оценка риска QbD с помощью FMEA

Риск	Влияние	Возникновение	Оценка риска
Экзогенные природные факторы	9	9	81
Эндогенные факторы	8	9	72
Способ переработки и хранения водорослей	8	4	32
Стандартизация	9	3	27
Экзогенные антропогенные факторы	5	5	25
Организация производства	7	1	7

Фукус пузырчатый (*F. vesiculosus*) — один из наиболее перспективных видов бурых водорослей благодаря наличию в его составе фукоидана с высокой антикоагулянтной активностью. Для *F. vesiculosus* исследовано влияние репродуктивной фазы и условий местообитания на содержание БАВ. Сбор образцов *F. vesiculosus* из арктических регионов произведен в прибрежных зонах моря Ирмингера (IS), Норвежского моря (NS), Баренцева моря (BS) и Белого моря (WS). Показано, что моносакхаридный состав фукоиданов меняется в зависимости от репродуктивной фазы, но величина этих изменений зависит от района сбора. Содержание фукозы (основного компонента фукоидана) в фазе размножения увеличилось с 51.2 до 86.2 мг/г а.с.м. для образцов из IS, с 52.0 до 58.4 мг/г для образцов из NS и с 102.1 до 116.6 мг/г для образцов из BS. Уровень содержания ксилозы (другого наиболее часто встречающегося моносакhariда фукоидана), содержащейся в разных образцах, был примерно одинаковым, а ее количество составляло около 12 мг/г а.с.м. Содержание фукозы было ниже в стерильной фазе по сравнению с фертильной фазой, тогда как содержание ксилозы не зависело от фазы размножения водорослей. Наибольшее количество фукозы и ксилозы обнаружено в образцах *F. vesiculosus* из Баренцева моря (BS) (рис. 2).

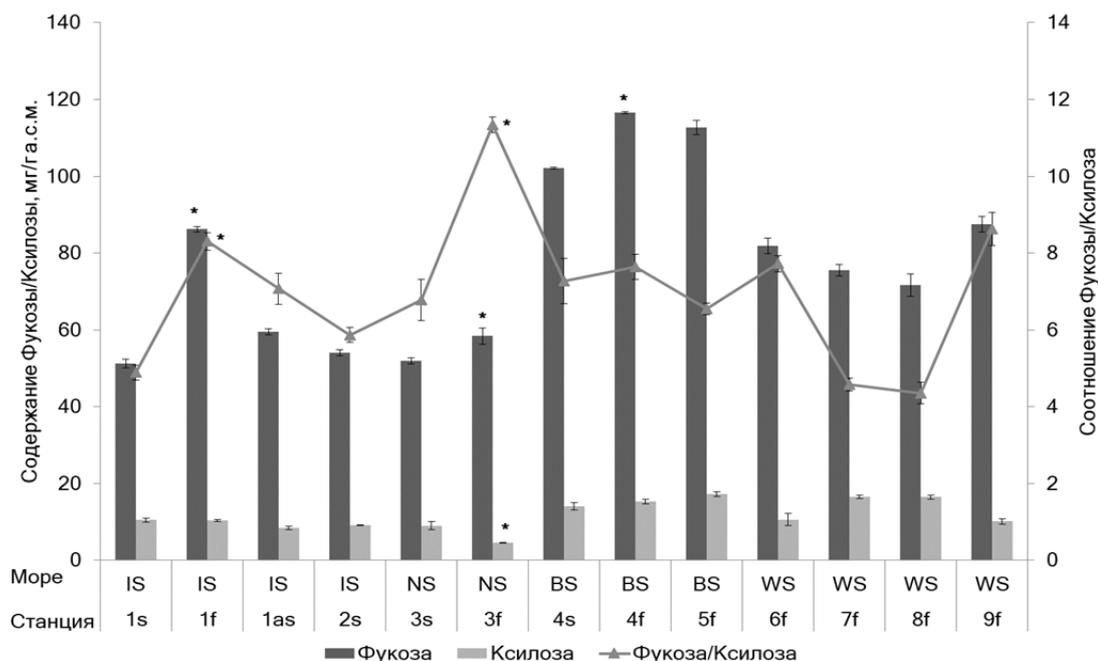


Рисунок 2. Уровни содержания фукозы и ксилозы в образцах *F. vesiculosus*. f – фертильная фаза, s – стерильная фаза. Примечание: Значения выражены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. \*  $p < 0,05$  по сравнению с фертильной фазой.

Установлена отрицательная корреляция между соленостью и накоплением фукозы (коэфф. корр. Пирсона  $r = -0.58$ ,  $p < 0.05$ ) и ксилозы ( $r = -0.60$ ,  $p < 0.05$ ). При этом соленость морской воды не влияла на их соотношение ( $r = 0.09$ ,  $p < 0.05$ ).

Образцы бурых водорослей также были собраны в разных географических локациях в России, Норвегии, Гренландии и Исландии для исследования содержания фукозы. Содержание фукозы бурых водорослей Арктики увеличивалось в ряду: *A. nodosum* > *F. distichus* > *F. spiralis* > *P. canaliculata* > *F. serratus* > *F. vesiculosus*. Аналогичные исследования проведены в отношении содержания других БАВ (альгината, ламинарана, маннита, полифенолов, пигментов и др.), выявлены изменения под влиянием солености, температуры и других факторов.

Исследовано влияние первичной переработки водорослевого сырья замораживанием и теневой воздушной сушкой, а также длительного хранения на уровень содержания фукоидана, альгината, полифенолов. Установлено, что содержание исследованных БАВ в замороженных образцах водорослей через 365 сут хранения были выше, чем в воздушно-сухих образцах, более чем на 5–15%, что позволило сделать вывод о преимуществе этого способа заготовки сырья.

В результате проведенных исследований разработана Методика сбора и заготовки бурых морских водорослей, заключающейся в следующих этапах: 1. Паспортизация локаций сбора сырья, включающая оценку видового состава, запасов, биомассы водорослей, характеристику факторов среды, приливно-отливных циклов, грунта, рельефа дна, оценку возможных источников загрязнения; 2. Определение периода сбора водорослей с учетом изменений факторов среды и стадий (фаз) жизненного цикла; 3. Определение орудий сбора водорослей, применимых в данной локации; 4. Изучение скорости восстановления зарослей и установление цикличности сбора водорослей. 5. Заготовка (первичная переработка) сырья.

Для оценки влияния фаз жизненного цикла фукусовых водорослей проведено исследование изменения содержания БАВ в *F. vesiculosus*, собранном в бухте Завалишина губы Териберская Баренцева моря. Образцы водорослей собирали в течение 4-х гидрологических сезонов (зима, весна, лето, осень) с выделением фаз генеративного состояния растений. В качестве критериев изменчивости уровня БАВ были изучены содержание альгинатов и фукоидана, маннита, фукоксантина, полифенолов и флавоноидов (рис. 3).

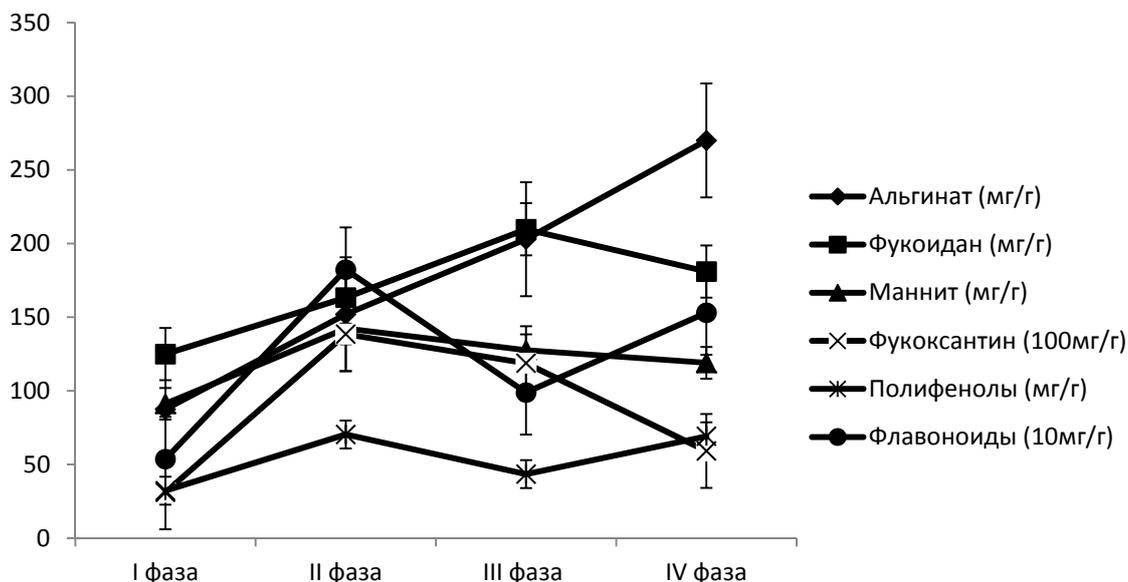


Рисунок 3. Зависимость содержания БАВ от фаз развития *F. vesiculosus*.

Уровень содержания альгината изменялся с 87.5 до 270 мг/г абсолютно сухой массы сырья, фукоидана с 125.0 до 209.7 мг/г, маннита с 91.2 до 142.4 мг/г, полифенолов с 32.2 до 70.3 мг/г, флавоноидов с 0.5 до 1.8 мг/г, и фукоксантина с 0.3 до 1.3 мг/г. В данной акватории высокий уровень содержания БАВ выявлен во 2-ю фазу (весенний сезон), в период роста и высокой фотосинтетической активности водорослей. В 3-ей фазе, фазе размножения, максимально содержание фукоидана с высоким уровнем содержания альгинатов, при этом содержание фукоксантина, полифенолов и флавоноидов снижено, что может быть благоприятным фактором для получения полисахаридов с меньшим содержанием сопутствующих компонентов. 4-я фаза благодаря высокому содержанию альгината может способствовать его высокому выходу и степени чистоты.

Результаты исследования легли в основу целевого профиля качества фукусовых водорослей. Для разработки надлежащей СК качества слоевищ фукусовых водорослей в соответствии с рекомендациями руководства ICH Q8 определены критичные показатели качества сырья и выбраны критерии приемлемости этих показателей. Важным аспектом этого блока исследований стало выявление показателей, критичных для качества получаемых ЛС из бурых водорослей, принимая во внимание их планируемое применение. В зависимости от входных факторов, способных влиять на показатели качества сырья, сформирована Стратегия контроля и Проектное поле фармацевтической разработки ЛС из бурых водорослей.

Для стандартизации слоевищ фукусовых водорослей выбраны критичные показатели качества сырья и критерии приемлемости, в частности количественного определения: йода не менее 0.1%, маннита не менее 7.0%, альгиновой кислоты не менее 10.0%, фукоидана не менее 10.0 %, полифенолов не менее 3.0%. Критерием подлинности сырья выбран моносакхаридный состав, который наиболее полно характеризует полисахариды бурых водорослей. Методика определения содержания фукоидана в слоевищах фукуса пузырчатого валидирована в соответствии с современными требованиями по показателям специфичность, линейность, правильность и прецизионность. Разработан целевой профиль качества слоевищ фукуса пузырчатого (рис. 4). Результаты проведенных исследований использованы при разработке проекта НД на новый вид лекарственного растительного сырья – слоевища фукуса пузырчатого.

### Целевой профиль качества бурых водорослей

Описание	Микроскопия	Подлинность	Количественное определение	Хранение	Другие показатели
Цельное сырье. Слоевища фукуса пузырчатого состоят из лентообразных заостренных на концах ветвей, разветвляющихся дихотомически с видимыми центральными ребрами (срединная жилка). <i>F. vesiculosus</i> обладает ветвями с гладкими краями с яйцевидными, одиночными или парными воздушными пузырьками. Концы некоторых ветвей имеют яйцевидную форму и немного расширены. Образуют многочисленные репродуктивные органы (рецептакулы). Цвет цельных слоевищ темно-зеленый, зеленовато-черный; бурый, коричневатозеленый. Запах характерный. Вкус солоноватый.	Исследование микропрепаратов галлома фукоидов позволяет выявить на поперечном срезе два слоя клеток: внешний состоит из нескольких рядов окрашенных прямоугольных и округлых клеток, плотно расположенных друг к другу. С поверхности клетки внешнего слоя округлые, овальные. Внутренний слой состоит из длинных, гифообразных прозрачных клеток, расположенных рыхло. На давленных препаратах этот слой представлен одиночными длинными прозрачными клетками (т.н. гифообразными).	Определение основных групп биологически активных веществ. Качественные реакции на полисахариды, йод. Моносакхаридный состав.	Определение содержания йода, маннита, альгината натрия, полифенолов: йода не менее 0.1%, маннита не менее 7.0%, альгиновой кислоты не менее 10.0%, фукоидана не менее 10.0 %, полифенолов не менее 3.0%	Определение срока годности и условий хранения растительного сырья.	Испытания на влажность, общую золу, измельченность сырья, посторонние примеси, тяжелые металлы, мышьяк, радионуклиды, микробиологическую чистоту и др.

Рисунок 4. Целевой профиль качества на примере слоевищ фукуса пузырчатого.

В настоящее время из бурых водорослей (в РФ преимущественно из ламинариевых) получают небольшой ассортимент ЛС, включая фармацевтические субстанции маннит, альгинат натрия, липидный концентрат (КЛАМ®). При их производстве используют различные методы очистки, в результате чего ценные фармакологически активные вещества (фукоидан, полифенолы, пигменты и др.) попадают в отходы. В этой связи перспективно применение каскадного подхода в технологии переработки водорослей, позволяющего поэтапно получать БАВ, используя каждый предыдущий этап как этап очистки для последующего целевого компонента.

Разработанная каскадная технология получения ЛС из бурых водорослей Арктики может быть реализована в двух вариантах:

1 вариант, включающий последовательное получение фармацевтических субстанций липидного концентрата (ЛК), маннита, фукоидана и альгината натрия с дополнительной возможностью получения пищевых или косметических ингредиентов полифенольного комплекса и фукоксантина (рис. 5);

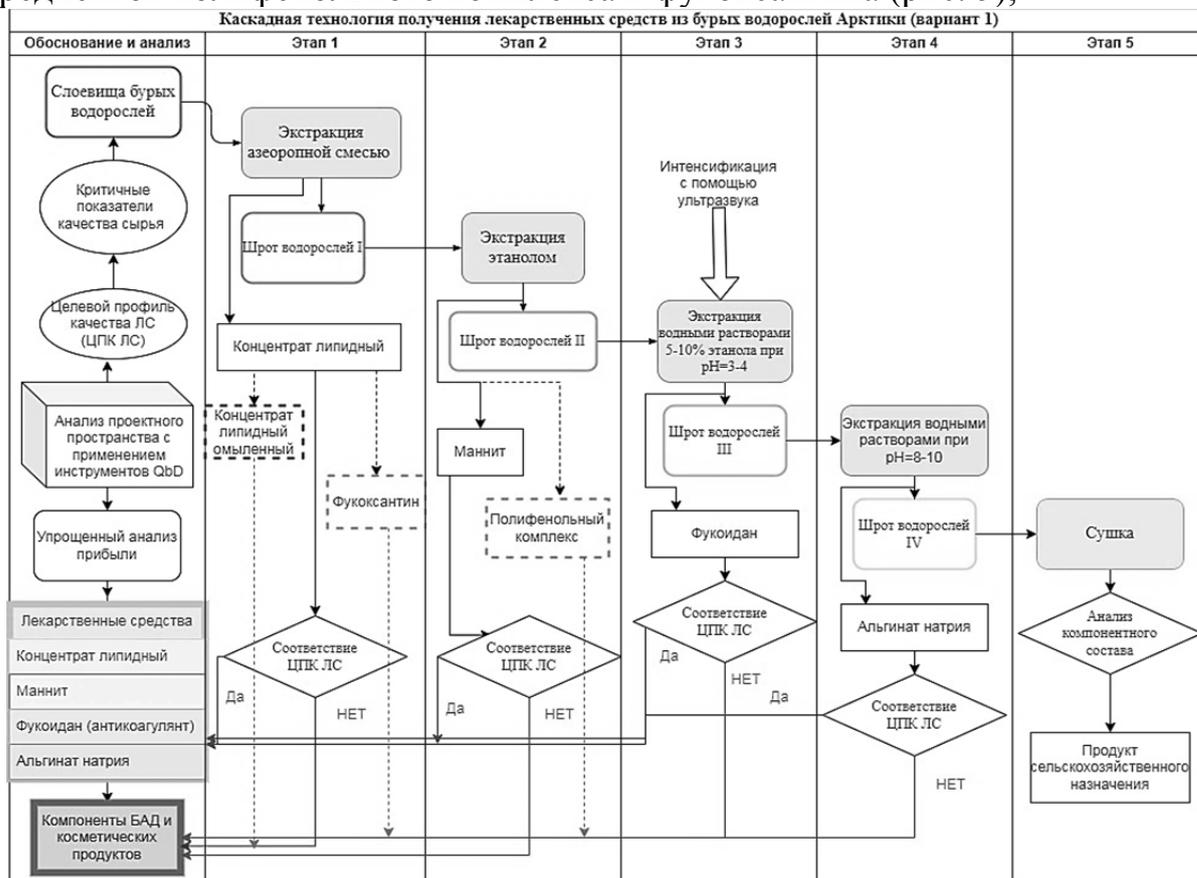


Рисунок 5. Каскадная технология получения ЛС из бурых водорослей Арктики (вариант 1).

2 вариант, включающий последовательное получение ПГЭР-извлечения, фукоидана и альгината натрия (рис. 6). Безотходность технологий переработки бурых водорослей обеспечивается получением на последнем этапе продукции сельскохозяйственного назначения (корм для животных, удобрения).

Для обоснования каскадной технологии проведен анализ проектного пространства с применением инструментов QbD. Анализ включал предварительную оценку экономической целесообразности получения ЛС из водорослей, основанную на упрощенном расчете прибыли или доходности.

Упрощенный расчет прибыли проведен в соответствии с методом валоризации на примере углеводов бурых водорослей (рис. 7). При расчете учитывались сезонные изменения содержания БАВ (рис. 3), доходы от которых были количественно определены в соответствии с фитохимическим составом бурых водорослей Баренцева моря в разные фазы сбора. Установлено, что потенциальный доход с 1 кг бурых водорослей в большей степени зависит от получения фукоидана, который имеет самую высокую потенциальную стоимость. На втором месте по доходности находится альгинат натрия. Прибыль повышается с получением маннита в периоды его максимального содержания.

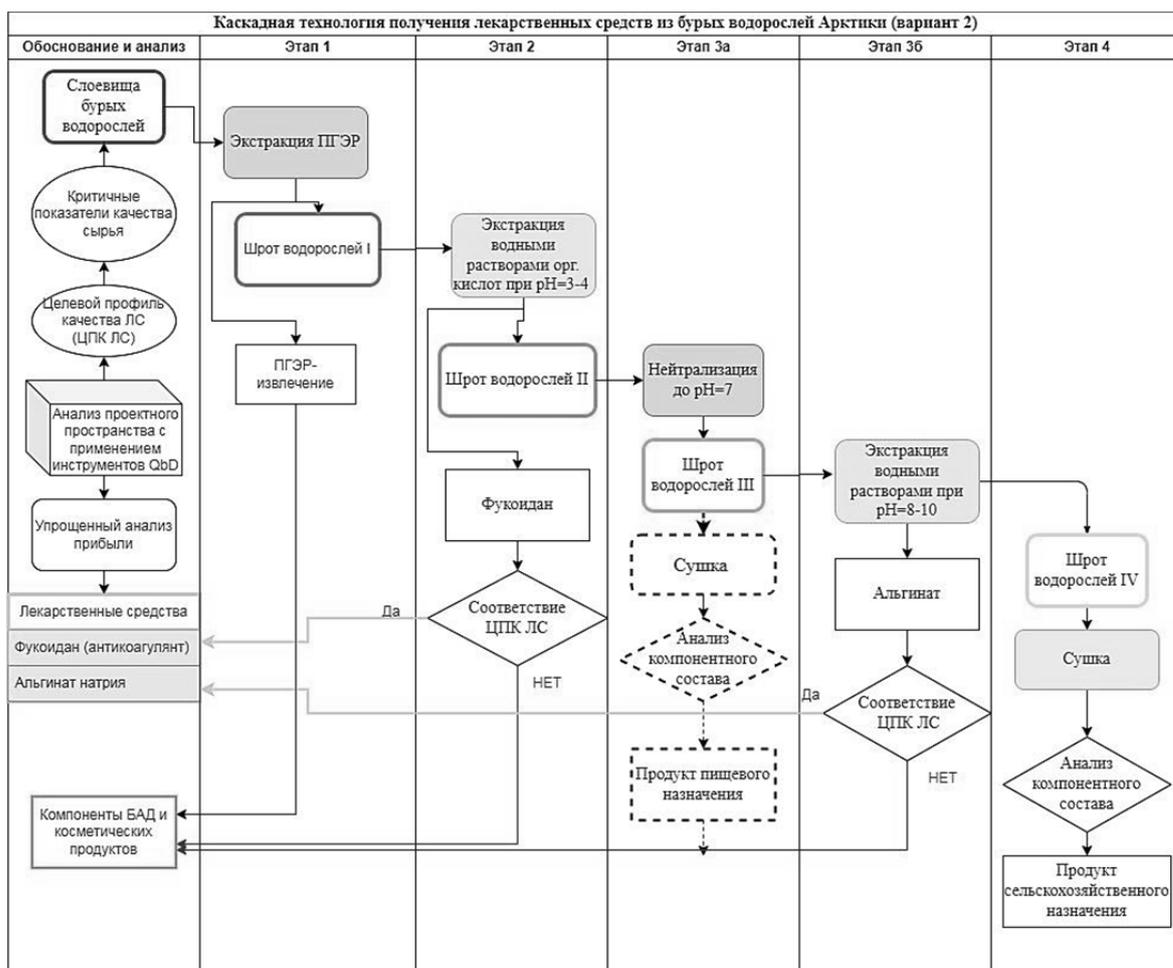


Рисунок 6. Каскадная технология получения ЛС из бурых водорослей Арктики (вариант 2).

Для реализации каскадного подхода необходимо определить целевой профиль качества ЛС, которые возможно получить из данного вида сырья. В соответствии с руководством ICH Q8 были составлены Целевые профили качества для ЛС из арктических бурых водорослей: ЛК, маннита, фукоидана и альгината натрия. Целевой профиль качества фукоидана представлен на рис. 8.

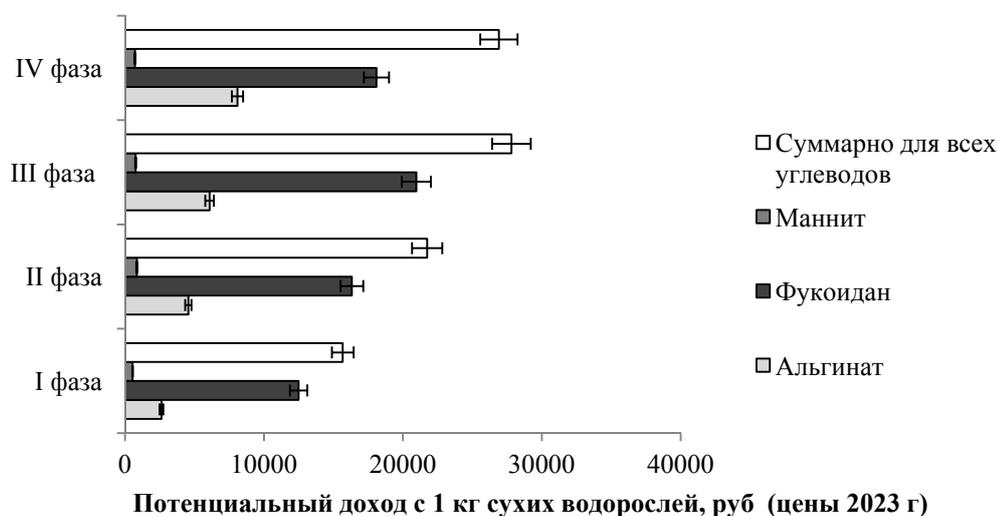


Рисунок 7. Результаты упрощенного анализа потенциальной прибыли при переработке бурых водорослей (на примере углеводов *F. vesiculosus* Баренцева моря).

Целевой профиль качества фукоидана					
Описание	Подлинность	Растворимость	Количественное определение	Хранение	Другие показатели
Мелкодисперсный порошок от светло-коричневого или кремового цвета	Антикоагулянтная активность (Клоттинговый метод). Анти-Ха активность (Хромогенный метод). На ВЭЖХ наличие пика фукозы, допускается наличие дополнительных пиков идентифицированных (ксилозы, арабинозы, маннозы, глюкозы и галактозы) и неидентифицированных моносахаридов.	Растворим в воде, практически нерастворим в этаноле, хлороформе	Анти-Ха активность (Хромогенный метод): Расчетная активность должна составлять не менее 90 % и не более 111 % от заявленной. Доверительный интервал установленной активности (P=0.95) должен составлять от 80 % до 125 % от заявленной активности. Содержание фукоидана не менее 70.0%, включая фукозу не менее 35.0%; сульфатных групп не менее 20.0%	Определение срока годности и условий хранения.	Испытания на влажность, тяжелые металлы, мышьяк, микробиологическую чистоту и др.

Рисунок 8. Целевой профиль качества фукоидана из бурых водорослей Арктики.

Анализ критичных показателей качества ЛС на основе БАВ бурых водорослей позволил установить, что для ЛК важнейшими критериями являются подлинность и уровень содержания жирных кислот и йода; для маннита – степень чистоты, температура плавления и показатель удельного вращения; для фукоидана - подлинность моносахаридного состава и уровень содержания фукозы и сульфатов; для альгината натрия – подлинность, относительная вязкость и количественное содержание альгиновой кислоты.

Для обеспечения свойств, заданных в целевом профиле качества ЛС, были разработаны и запатентованы каскадные технологии их получения в двух вариантах. Для получения ЛК (этап 1, вариант 1) экстрагирование осуществляли азеотропной смесью метилхлорида со спиртом этиловым или азеотропной смесью хлороформа с этанолом в аппарате Сокслета. Затем водорослевый шрот экстрагировали в аппарате Сокслета или методом перколяции 85-95% этанолом, фильтровали, концентрировали в вакууме на роторном испарителе, кристаллизовали маннит, фильтровали на нутч-фильтре, сушили. Для получения маннита фармакопейного качества его очищали методом колоночной хроматографии (этап 2). Оставшийся шрот экстрагировали методом перколяции 5-10% раствором этанола при pH 3-4, для получения фукоидана (этап 3), который очищали и концентрировали на ультрафильтрационном аппарате, сушили лиофильно или в вакуум-сушильном шкафу. Затем шрот экстрагировали методом перколяции 1.5-4% раствором карбоната натрия, вытяжку обрабатывали серной кислотой, полученный осадок альгиновой кислоты растворяли в растворе карбоната натрия при pH=8-10, очищали и концентрировали на ультрафильтрационном аппарате, сушили в вакуум-сушильном шкафу или

лиофильно и получали альгинат натрия (этап 4). Шрот подвергали сушке, анализу компонентного состава для применения в сельском хозяйстве (этап 5).

1-й этап каскадной технологии (вариант 1) - получение ЛК (рис. 5). Известно, что бурые водоросли содержат значительное количество липофильных БАВ, обладающих фармакологической активностью. Так, ЛК из ламинарии является фармацевтической субстанцией КЛАМ<sup>®</sup>, входящей в состав препарата Мамоклам для лечения мастопатии. Вместе с тем получение водорастворимых БАВ из бурых водорослей предусматривает обязательные этапы очистки от примесей, в том числе липидов. Применение каскадного подхода при экстракции бурых водорослей на 1-м этапе неполярными экстрагентами (азеотропными смесями) позволило получить ЛК и одновременно удалить липофильные компоненты из сырья для следующего этапа технологии - получения водорастворимых БАВ. Полученные образцы ЛК по содержанию йода и жирных кислот соответствовали целевому профилю качества.

Экстрагирование водорослевого сырья с помощью азеотропной смеси осуществлено в аппарате Сокслета, что позволило достичь высокого выхода ЛК до 30.6 мг/г, уменьшить общее время проведения процесса экстракции более чем на 1 ч по сравнению с классическим методом мацерации.

Сравнительное исследование образцов, полученных на 1 этапе каскадной технологии (рис. 9) из бурых водорослей Баренцева моря показало, что содержание жирных кислот в ЛК из замороженных слоевищ выше на 7.9-9.3% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с высушенными.

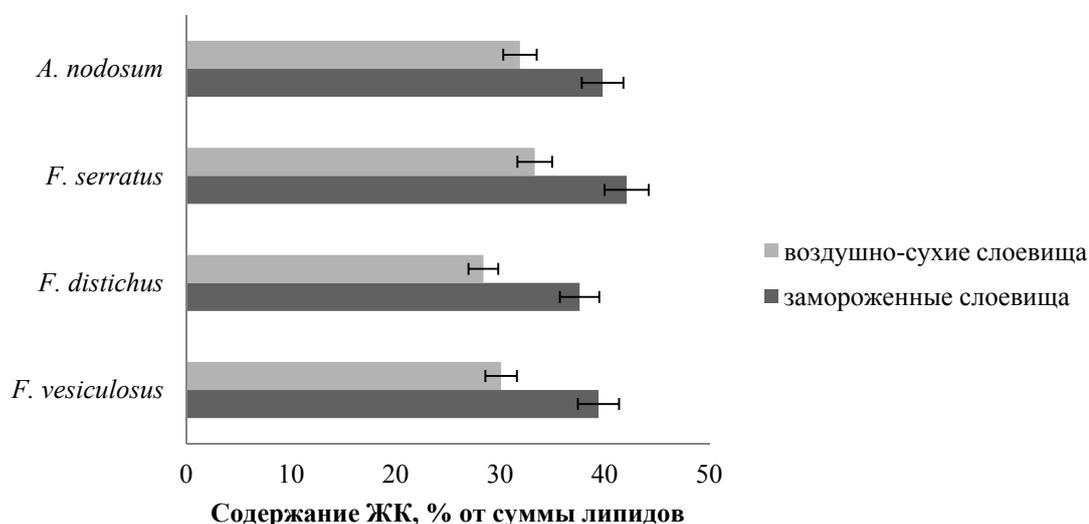


Рисунок 9. Содержание суммы жирных кислот, в % от содержания липидов.

Каскадная технология 1 этапа была реализована на замороженных образцах - представителей 4-х наиболее распространённых видов водорослей Арктического региона: *F. vesiculosus*, *F. serratus*, *F. distichus* и *A. nodosum* (табл. 2). Установлено, что ЛК по критически важным показателям качества подлинность и количественное содержание йода и высших жирных кислот, а также другим критериям, полностью соответствовали целевому профилю качества как для ЛК, так и для аналогичного лекарственного средства КЛАМ<sup>®</sup> (Р N001918/01-310810). Исключение составлял образец ЛК из *A. nodosum* по показателю количественное

содержание йода. Кроме того, ЛК можно рекомендовать в качестве источника фукоксантина как кандидата в лекарственные средства или БАД.

Таблица 2. Результаты определения показателей качества липидных концентратов

Показатель качества	Критерий приемлемости	ЛК из <i>F. vesiculosus</i>	ЛК из <i>F. distichus</i>	ЛК из <i>F. serratus</i>	ЛК из <i>A. nodosum</i>
Описание	Пастообразная масса зеленого или бурого цвета (в тонком слое) с характерным запахом водорослей	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Подлинность	На газо-жидкостной хроматограмме не менее 7 пиков, в том числе пик метилового эфира олеиновой кислоты, совпадающий по времени удерживания с СО.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Количественное определение: Высшие жирные кислоты, % Йод, %	Не менее 30% Не менее 0.1%	39.4±0.2 0.16±0.08	37.6±0.3 0.11±0.02	42.1±0.5 0.15±0.06	39.8±0.4 0.08±0.03

2-м этапом каскадной технологии (вариант 1) является получение маннита из шрота I бурых водорослей (рис. 5). Шрот водорослей I подвергают обработке для удаления паров растворителя с дальнейшей регенерацией азеотропной смеси. Маннит – действующее вещество ЛС диуретического и бронхолитического действия. Разработано два варианта технологии получения маннита при экстрагировании этанолом 95% (об.): 1) в аппарате Сокслета; 2) методом перколяции. Для сравнения получен маннит классическим методом однократной мацерации с нагреванием (рис. 10).

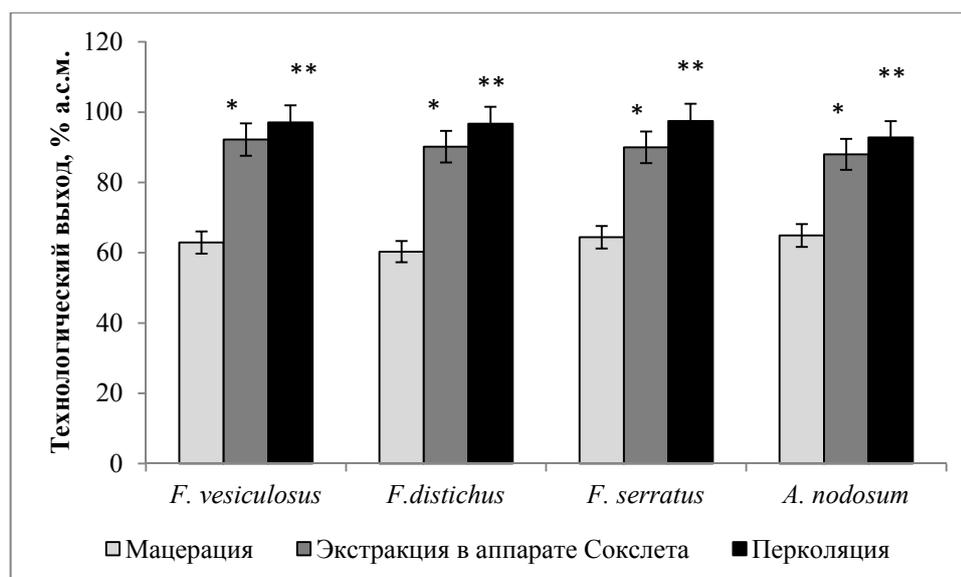


Рисунок 10. Влияние экстрагента и метода экстрагирования на выход маннита (в пересчете на содержание в сырье) (\*, \*\* $p < 0.05$ ).

Результаты исследований подтверждают высокую эффективность метода перколяции по сравнению с классическим способом мацерации, а также экстракции в аппарате Сокслета: выход маннита увеличился на 7-10% (в сравнении с методом (1), и на 22-25% (в сравнении с мацерацией).

Для получения маннита фармакопейного качества использовали метод колоночной хроматографии. Показано, что все образцы маннита, полученные при реализации 2 этапа из 4-х видов бурых водорослей (табл. 3) полностью удовлетворяют целевому профилю качества маннита в соответствии с НД Р N003249/01-250118.

Таблица 3. Результаты определения показателей качества маннита

Показатель качества	Критерий приемлемости	Маннит, полученный по каскадной технологии (вариант 1)			
		<i>F. vesiculosus</i>	<i>F. distichus</i>	<i>F. serratus</i>	<i>A. nodosum</i>
Описание	Белый кристаллический порошок без запаха	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Подлинность:	Качественная реакция с раствором железа (III) хлорида	(+)	(+)	(+)	(+)
Температура плавления, °С	166-169	166.6	167.5	168.4	166.9
Удельное вращение $[\alpha]_D^{20}$	От +23° до +24°	+23.5	+23.7	+23.9	+23.3
Количественное определение	Не менее 99.0%	99.2	99.1	99.3	99.0

В процессе кристаллизации маннита образуются отходы в виде спиртового маточного раствора. По результатам исследования установлено, что маточный раствор содержал в зависимости от вида бурых водорослей, использованных в качестве сырья, от 48.5 до 64.9% полифенолов от суммы экстрактивных веществ. Определение антирадикальной активности маточных растворов *in vitro* показало их высокую антиоксидантную активность ( $EC_{50}$  23.3-83 мкг/мл) и, следовательно, они могут быть направлены на получение полифенольных комплексов пищевого и косметического применения. Предложен способ валоризации отходов получения маннита.

3-й этап каскадной технологии (вариант 1) – получение фукоидана (рис. 5). Фукоидан – сульфатированный полисахарид, обладающий высокой антикоагулянтной активностью, а также проявляющий другие виды фармакологической активности. Фукоидан является кандидатом в ЛС гепариноподобного действия. Показано, что шрот бурых арктических водорослей после извлечения ЛК и маннита содержал не менее 14% фукоидана. Изучение кинетических закономерностей экстракции фукоидана различными экстрагентами с применением методов мацерации и перколяции, а также определение температурных и временных параметров процесса экстрагирования позволили определить оптимальный экстрагент для получения фукоидана – 5-10% этанол. Для разработки проектного поля экстракции фукоидана использовали дробный

факторный план ( $2^{k-p}$ ) как инструмент QbD, в качестве факторов на основании серии однофакторных экспериментов выбраны:  $X_1$  - продолжительность настаивания, ч;  $X_2$  - температура, °C;  $X_3$  - pH;  $X_4$  - измельченность сырья  $D_{ср.}$ , мм,  $X_5$  - модуль экстракции (сырье : экстрагент). В качестве отклика выбран выход фукоидана, % (Y).

Проектное поле процесса экстракции фукоидана из шрота бурых водорослей описывается уравнением регрессии (1), степень адекватности модели ( $R^2=0.98$ ):

$$Y = 57.83 + 9.97 \cdot X_1 + 10.88 \cdot X_2 - 6.46 \cdot X_3 + 3.3 \cdot X_4 - 0.34 \cdot X_5 \quad (1)$$

Методом крутого восхождения были определены оптимальные параметры извлечения фукоидана. В оптимальных условиях был выделен фукоидан с высоким содержанием фукозы в составе моносахаридов (59.9 мол%) и высоким содержанием нейтральных углеводов  $708 \pm 13$  мг/г.

Экспериментально установлено, что выход фукоидана из замороженных слоевищ был достоверно ( $p < 0.05$ ) выше по сравнению с воздушно-сухими для образцов 4-х видов бурых водорослей в 1.2-1.5 раз, что составило от 14 до 25% в зависимости от вида сырья.

Для интенсификации процесса экстрагирования фукоидана применили два метода: ультразвуковую экстракцию (УЗЭ) и мацерацию с нагреванием и перемешиванием. Исследована кинетика экстракции фукоидана из замороженных слоевищ бурых арктических водорослей. Установлено, что выход фукоидана линейно возрастал с увеличением времени УЗЭ до 40 мин и высокой температуре при настаивании с нагреванием (рис. 11). Согласно данным дисперсионного анализа, и процесс УЗЭ, и процесс мацерации наиболее адекватно описываются уравнениями степенного закона или моделью Пелега. Сравнивая процессы УЗЭ и мацерации с нагреванием, было установлено, что диффузия с применением ультразвука протекает быстрее.

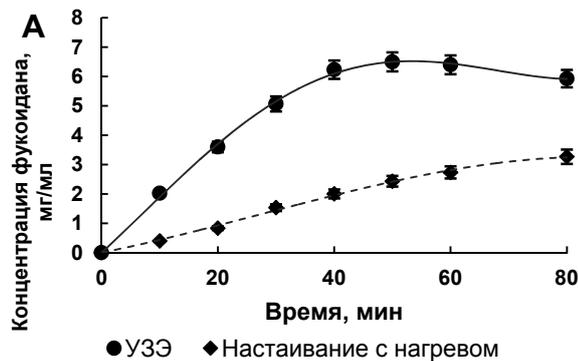


Рисунок 11. Влияние времени экстракции на выход фукоидана.

Установлено влияние способа экстрагирования фукоидана на химический профиль фукоидана (табл. 4) и моносахаридный состав (табл. 5) при УЗЭ и мацерации с нагреванием. При УЗЭ наблюдалось увеличение выхода фукоидана, уровня фукозы, а при мацерации с нагреванием – уровня сульфатов у арктических водорослей. Содержание фукозы варьировало от 31.9% для *F. serratus* при мацерации до 43.2% для *F. vesiculosus* при УЗЭ. Известно, что уровень содержания сульфатов в составе фукоиданов играет важную роль в биологической активности, в частности антикоагулянтной. Среднее содержание сульфатов в фукоиданах составило 23.3% для мацерации и 21.2% для УЗЭ, и

превышало 20% для большинства образцов, что важно, поскольку содержание сульфата менее 20% приводит к потере антикоагулянтной активности. Установлено, что метод экстракции в меньшей степени влияет на моносахаридный состав фукоиданов, который преимущественно зависит от вида сырья. Фукоидан, выделенный из *F. vesiculosus*, независимо от метода экстракции относится к фуканам.

Таблица 4. Химический состав фукоиданов арктических бурых водорослей

Сырье	Метод экстракции	Выход фукоидана, %	Содержание L-фукозы, % а.с.м.	Содержание сульфатов, % а.с.м.
<i>F. vesiculosus</i>	Мацерация	11.9±1.2 <sup>a</sup>	41.6±0.4 <sup>a</sup>	25.9±0.3
	УЗЭ, 40 мин	21.6±0.9	43.2±0.3	24.7±0.3
<i>F. distichus</i>	Мацерация	13.6±0.8 <sup>a</sup>	38.9±0.5 <sup>a</sup>	23.8±0.3 <sup>a</sup>
	УЗЭ, 40 мин	17.9±1.1	40.5±0.3	22.4±0.4
<i>F. serratus</i>	Мацерация	10.4±0.9 <sup>a</sup>	31.9±0.2 <sup>a</sup>	18.0±0.3
	УЗЭ, 40 мин	15.5±0.6	36.7±0.3	18.9±0.4
<i>A. nodosum</i>	Мацерация	15.8±0.4	37.5±0.1 <sup>a</sup>	26.4±0.1 <sup>a</sup>
	УЗЭ, 40 мин	16.1±1.0	38.1±0.2	18.8±0.3

Примечание. <sup>a</sup> Множественный сравнительный анализ показал статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ) между методами экстракции УЗЭ и мацерации с нагреванием.

Таблица 5. Моносахаридный состав фукоиданов (мол.%)

Сырье	Метод экстракции	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glu	Fuc:Gal+Xyl+Man:Glu
<i>F. vesiculosus</i>	Мацерация	76.7	6.3	3.9	6.9	6.2	1:0.22:0.08
	УЗЭ, 40 мин	74.4	7.9	3.6	8.3	5.8	1:0.27:0.08
<i>F. distichus</i>	Мацерация	60.0	5.5	5.7	24.0	4.8	1:0.59:0.08
	УЗЭ, 40 мин	65.4	5.8	5.8	18.2	4.8	1:0.46:0.07
<i>F. serratus</i>	Мацерация	58.0	5.6	3.6	24.3	8.5	1:0.58:0.15
	УЗЭ, 40 мин	61.0	5.4	2.5	21.8	9.3	1:0.49:0.15
<i>A. nodosum</i>	Мацерация	66.5	16.3	7.2	6.4	3.6	1:0.45:0.05
	УЗЭ, 40 мин	73.6	14.7	4.7	3.9	3.1	1:0.32:0.04
<i>F. vesiculosus</i> <sup>a</sup>	-	74.4	9.0	4.1	8.9	3.7	1:0.29:0.05

<sup>a</sup> Коммерческий фукоидан от Sigma-Aldrich использовался в качестве контроля.

Проведена оптимизация факторов УЗЭ фукоидана с использованием дробного факторного планирования ( $2^{5-2}$ ) как инструмента концепции QbD и определения диапазонов технологических факторов Проектного поля. Изучено влияние 5-ти факторов на извлечение фукоидана из замороженных бурых водорослей, обработанных в рамках каскадного цикла (вариант 1) и интенсификации с помощью УЗЭ:  $X_1$  - время экстракции (мин);  $X_2$  - мощность (%);  $X_3$  - pH;  $X_4$  - соотношение жидкости и сырья,  $X_5$  - размер частиц (мм). Зависимость переменной отклика (выход фукоидана) и 5-ю факторами описана в следующем уравнении (2):

$$Y = 54.30 + 23.54 \cdot X_1 + 2.56 \cdot X_2 - 2.80 \cdot X_3 + 2.54 \cdot X_4 + 1.03 \cdot X_5 \quad (2)$$

Согласно результатам дисперсионного анализа (ANOVA), регрессионная модель имела высокое значение  $R^2$  (0.9945) и скорректированного  $R^2$  (0.9918) при коэффициенте вариации (CV 0.04%),  $F = 363$  и  $p < 0.0000$ , что указывает на высокую степень корреляции между экспериментальными и прогнозируемыми значениями. Определены оптимальные значения для экстракции фукоидана:

время экстракции 57.4 мин, мощность ультразвука 76.1%, pH 3.4, соотношение экстрагента и сырья 23.4 мл/г, размер частиц 1.4 мм. Рассчитано количество выбрасываемого в атмосферу CO<sub>2</sub>: оно выше для мацерации с нагреванием (3848 г CO<sub>2</sub>/г фукоидана), чем для УЗЭ (168 г CO<sub>2</sub>/г фукоидана), что подтверждает экологичность применения ультразвуковой обработки. Образцы фукоидана из бурых водорослей по критичным показателям качества удовлетворяли профилю качества (рис. 8) в соответствии с проектом НД и спецификации качества. Установлено, что УЗЭ бурых водорослей соответствует принципам зеленой экстракции благодаря тому, что процесс проводят при низких температурах, снижается расход энергии, а снижение выбросов CO<sub>2</sub> вносит вклад в достижение углеродной нейтральности экономики. Разработана и запатентована оригинальная технология УЗЭ фукоидана из шрота бурых водорослей. Результатом являются ускорение процесса экстрагирования и получение фукоидана с определенными физико-химическими характеристиками, усиливающими его антикоагулянтное действие.

4-ый этап каскадной технологии (вариант 1) – получение альгината натрия (рис. 5). Альгинат натрия является как действующим веществом ряда отечественных лекарственных препаратов, так и вспомогательным веществом в производстве лекарств. Для получения альгината натрия шрот III экстрагировали методом перколяции водным раствором Ca<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> при температуре 40-80°C. При изучении кинетики экстрагирования альгината из шрота бурых водорослей было показано, что оптимальной является температура 60-65 °С. Изучено влияние высушенного и замороженного сырья на выход альгината из бурых водорослей. Установлено, что выход альгината натрия из шрота замороженных слоевищ на 13.2-17.2% выше, чем из воздушно-сухих ( $p < 0.05$ ).

Разработанная технология получения альгината натрия позволяет получать субстанцию фармакопейного качества, соответствующую требованиям НД (ФСП 42-0372-3392-06) с высоким выходом (82.4-85.6%) и степенью чистоты (95.3-99.0). Все образцы альгината натрия (табл. 6), полученные при реализации 4 этапа каскадной переработки бурых арктических водорослей, по критичным показателям качества полностью удовлетворяют профилю качества в соответствии с НД.

Таблица 6. Результаты определения показателей качества альгината натрия

Показатель качества	Критерий приемлемости	Альгинат натрия, полученный по каскадной технологии (вариант 1)			
		<i>F. vesiculosus</i>	<i>F. distichus</i>	<i>F. serratus</i>	<i>A. nodosum</i>
1	2	3	4	5	6
Описание	Белый, аморфный кремоватый или светлосерый с кремоватым оттенком порошок без запаха	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

1	2	3	4	5	6
Подлинность	Кач. реакция водного раствора альгината натрия с раствором CaCl <sub>2</sub> .	(+)	(+)	(+)	(+)
	Кач. реакция водного раствора альгината натрия с разб. HCl.	(+)	(+)	(+)	(+)
	Кач. реакция водного раствора альгината натрия с насыщ. р-ром (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(+)	(+)	(+)	(+)
Относительная вязкость	От 9.0 до 26.0 - марка 1	25.9	18.1	14.9	36.2
	От 26.0 до 45.0 - марка 2				
	От 45.0 до 120.0 - марка 3				
Количественное определение	90.8-106.0 %	95.3	96.1	98.7	99.0

В зависимости от факторов, влияющих на критичные показатели качества бурых водорослей Арктики, упрощенный анализ прибыли (рис. 6) может указать на нецелесообразность извлечения ЛК и маннита, и, напротив, экономическую эффективность извлечения других БАВ, в частности флоротанинов – уникальных полифенольных соединений бурых водорослей. Флоротанины проявляют антиоксидантные, противовоспалительные, антибактериальные, противоопухолевые и другие свойства.

Наиболее распространенными экстрагентами для извлечения полифенольных соединений являются органические растворители (метанол, этанол, ацетон и др.) или их водные растворы. Органические растворители оказывают негативное действие на окружающую среду и рабочую зону, предполагают использование специального оборудования, сложных систем очистки. В связи с этим актуальным является применение нового класса растворителей – природных глубоких эвтектических растворителей (ПГЭР) на основе таких веществ, как органические кислоты, аминокислоты, моносахариды и другие соединения, для извлечения из водорослей БАВ полифенольной природы. На первом этапе 2-го варианта каскадной технологии (рис. 6) может быть получено ПГЭР-извлечение, содержащее флоротанины.

Проведено изучение 10 ПГЭР, состоящих из природных метаболитов, являющихся донорами и акцепторами водородных связей эвтектических смесей, для извлечения флоротанинов из бурых водорослей *F. vesiculosus* и *A. nodosum* Баренцева моря (рис. 12). Показано, что даже при однократной мацерации сырья водным раствором ПГЭР на основе холина хлорида и молочной кислоты может быть извлечено 70-72% полифенолов, содержащихся в водорослях.

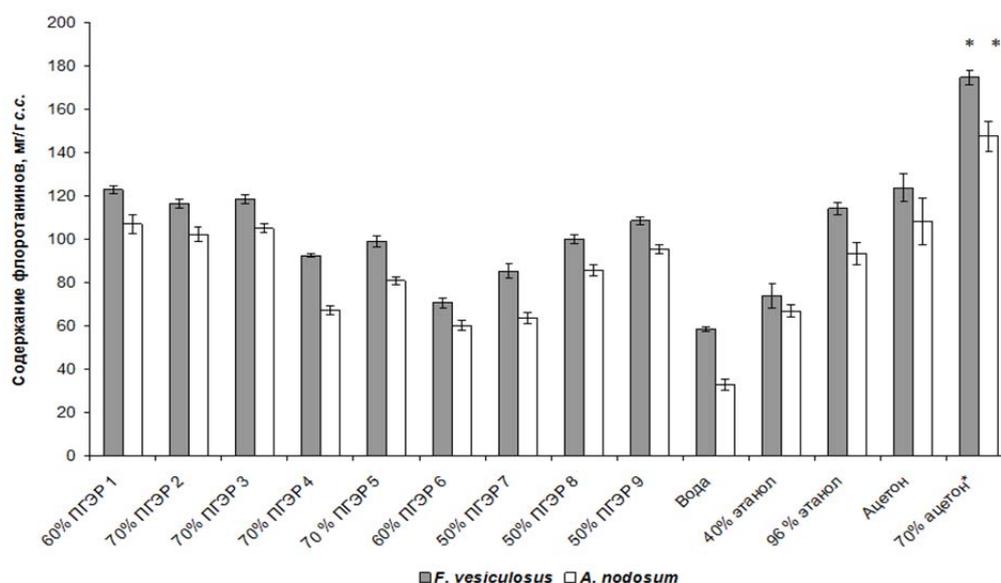


Рисунок 12. Содержание флоротанинов (мг/г сухого сырья) в извлечениях на основе водных растворов ПГЭР из *F. vesiculosus* и *A. nodosum*.

Примечание: \* - содержание определено методом исчерпывающей экстракции

Впервые разработан и валидирован метод одновременной экстракции липофильных (фукоксантина) и гидрофильных (аскорбиновая кислота и флоротанины) веществ из *F. vesiculosus* с использованием ПГЭР, обеспечивающий высокую извлекаемость БАВ. Антирадикальная активность модельной смеси аскорбиновой кислоты и флороглюцина показала, что эти вещества обладают сильным синергическим действием в реакции с радикалом DPPH (Эффект смеси (ЭС) = 2.99). Для ПГЭР-извлечений на основе молочной кислоты: глюкозы : H<sub>2</sub>O (5:1:3) ЭС был выше, чем для этанольного извлечения (ЭС = 2.27 и 2.03 соответственно). Синергический эффект ПГЭР-извлечений из бурых водорослей рассчитан впервые.

Установлено, что ПГЭР, помимо их нейтрального воздействия на окружающую среду, обеспечивают высокую стабильность компонентов ПГЭР-извлечений, сохраняя их биологическую активность в течение года хранения. Составлен целевой профиль качества готового продукта для ПГЭР-извлечения из слоевищ арктических бурых водорослей (рис. 13).

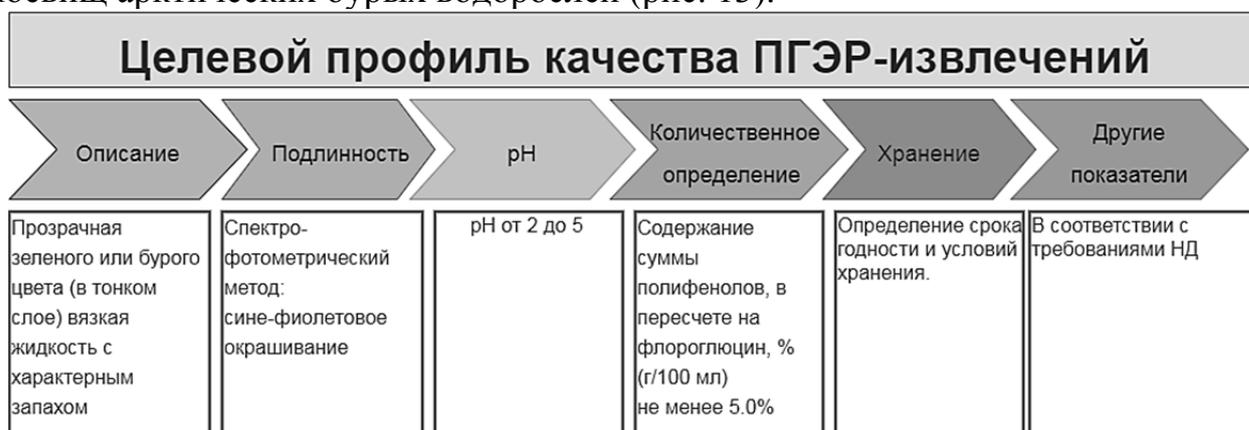


Рисунок 13. Целевой профиль качества ПГЭР-извлечений из бурых водорослей Арктики.

Изучено влияние параметров УЗЭ на содержание флоротанинов в ПГЭР-извлечении:  $X_1$  - время (мин),  $X_2$  - содержание воды в ПГЭР (%),  $X_3$  - соотношение экстрагента и сырья (г/г). Регрессионный анализ данных показал, что зависимость общего содержания флоротанинов в ПГЭР-извлечениях (TPhC, мг/г а.с.м.) от факторов процесса выражена уравнением (3) ( $R_2=0.989$ ,  $p = 0.007$ ). Сравнение расчетного значения критерия Фишера ( $F_p = 62.2$ ) с табличным значением ( $F_t = 4.1$ ) показало, что уравнение регрессии адекватно описывает экспериментальные данные.

$$TPhC = 60.3 + 13.3X_1 + 15.8X_2 + 8.5X_3 - 11.5X_1^2 + 2.9X_2^2 + 4.8X_3^2 - 1.6X_1X_2 + 6.2X_1X_3 + 3.5X_2X_3 \quad (3)$$

Трехмерные поверхности отклика (рис. 14) иллюстрируют взаимосвязь между содержанием флоротанинов, выраженного в мг эквив. флороглюцина/ г а.с.м. (TPhC, mg PhE/g DW) в ПГЭР-извлечении *F. vesiculosus* и факторами, такими как время экстракции, концентрация воды и соотношение сырья и растворителя.

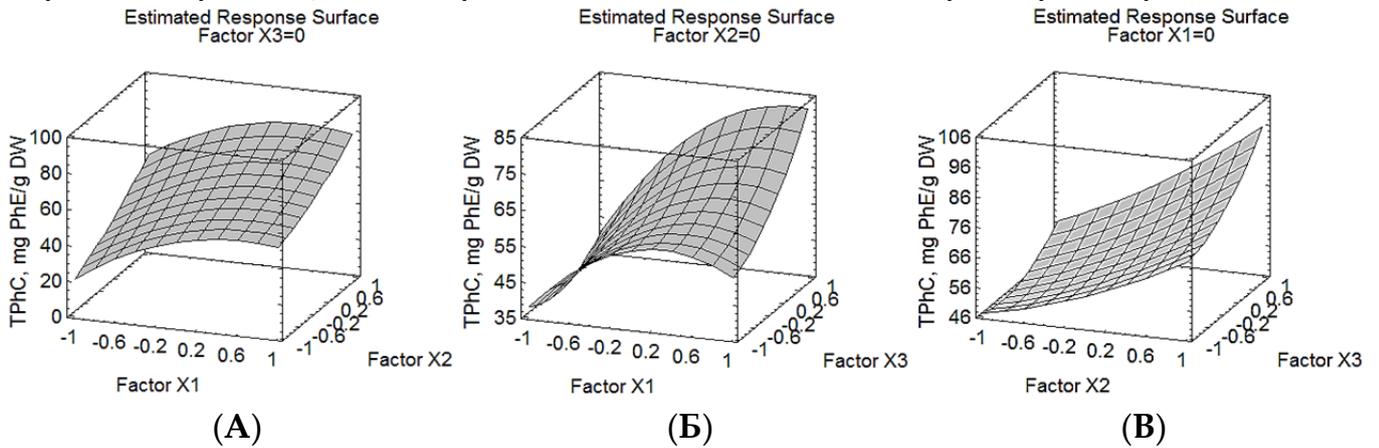


Рисунок 14. Поверхность отклика содержания флоротанинов в ПГЭР-извлечениях *F. vesiculosus* в зависимости от факторов:

- (А) концентрации воды (%),  $X_2$ ) и время экстракции (мин,  $X_1$ ), (Б) время экстракции (мин,  $X_1$ ) и соотношение сырья и экстрагента (м/м,  $X_3$ ), (В) концентрация воды (%),  $X_2$ ) и соотношение сырья и экстрагента (м/м),  $X_3$ ).

Для расчета оптимальных условий экстракции применялся метод крутого восхождения. Оптимизация извлечения флоротанинов из *F. vesiculosus* с помощью ПГЭР методом УЗЭ позволила увеличить их выход до  $137.3 \pm 2.9$  мг эквив. флороглюцина/ г а.с.м. водорослей.

Впервые выполнено химическое профилирование флоротанинов в ПГЭР извлечениях. Используя ВЭЖХ-МСВР и МС/МС анализ идентифицированы 32 флоротанина (один тример, два тетрамера, шесть пентамеров, четыре гексамера, шесть гептамеров, шесть октамеров и семь нонамеров) в ПГЭР-извлечении из *F. vesiculosus*. Химический состав флоротанинов был идентичен как в ПГЭР-извлечениях, так и в извлечениях, полученных с помощью этанола.

В серии предварительных экспериментов было установлено, что шрот после получения ПГЭР-извлечений из бурых водорослей содержит достаточное количество углеводов – полисахаридов фукоидана (до 18%), альгинатов (до 35%) и, для некоторых видов, ламинарана (до 15%), с учетом их различного содержания в исходном сырье.

Каскадная технология (вариант 2, Рис. 6) заключается в том, что на 1-м этапе слоевища водорослей измельчали, экстрагировали с помощью ПГЭР на основе молочной или яблочной кислоты. После отделения жидкого ПГЭР-извлечения фильтрацией или центрифугированием шрот водорослей I на 2-м этапе экстрагировали при рН 2.0-5.0 при температуре 20-60 °С в течение 1-24 ч. рН регулировали добавлением 10-80% раствора молочной или яблочной кислоты соответственно. Для интенсификации процесса экстракции и перемешивания среды применяли УЗ-аппарат типа «горн». На 3 этапе реакцию смесь нейтрализовали добавлением раствора 0.1 М NaOH или КОН, выдерживали при температуре экстракции 1-24 ч, отделяли от твердого остатка фильтрацией или центрифугированием. Супернатант фильтровали через мембрану с диаметром пор 5-30 кДа для удаления низкомолекулярных примесей. Концентрированные жидкие извлечения сушили лиофильно или под вакуумом или в распылительной сушилке и получали фукоидан (рис. 6). Для получения альгината натрия шрот водорослей III экстрагировали так же, как и на этапе 4 по 1 варианту. При разработке технологии решена проблема валоризации шрота после обработки ПГЭР. Оригинальность технологии подтверждена патентом.

На основании проведенных исследований и принципов концепции QbD разработана методология каскадного получения ЛС из бурых водорослей Арктики. Сформулированы основные положения Методологии каскадных технологий получения ЛС из слоевищ бурых водорослей (рис. 15):

1. Анализ проектного пространства каскадных технологий ЛС из водорослевого сырья должен базироваться на первоначальной оценке потенциальной прибыли в соответствии с фитохимическим составом БАВ бурых водорослей, составлении Целевого профиля ЛС на основании комплекса научных знаний о критичных показателях качества сырья и фармацевтических субстанций, выявлении общих закономерностей накопления БАВ в зависимости от экзогенных и эндогенных факторов.

2. На этапе выявления критичных показателей качества водорослевого сырья проводится обобщенный анализ рисков потери качества сырья с помощью инструментов QbD с определением факторов высокого ранга, влияющих на целевой профиль качества. Этап заканчивается созданием стратегии контроля, позволяющей адаптируемо компенсировать изменчивость сырья для получения фармацевтических субстанций с постоянным качеством.

3. На этапе выявления критичных показателей качества ЛС в виде фармацевтических субстанций из слоевищ бурых водорослей и ГЛФ на их основе проводится оценка влияния факторов, влияющих на надлежащее качество за счет разработки и валидации процесса производства и проведения биофармацевтических исследований. Комплексная оценка критичных параметров производства позволяет создать проектное поле, состоящее из многомерной комбинации взаимно влияющих факторов, обеспечивающих надлежащее качество активных фармацевтических субстанций и ГЛФ. На данном этапе применяются математические модели для поиска оптимальных параметров процесса производства как неотъемлемый инструмент концепции QbD.

4. Каскадные технологии получения ЛС из слоевищ бурых водорослей

позволяют поэтапно получать высокоочищенные субстанции фармакопейного качества, используя каждый предыдущий этап как этап очистки для последующего целевого компонента. Применение гибкого каскадного подхода способствует валоризации процесса безотходной переработки бурых водорослей за счет возможности получения дополнительных продуктов пищевого, косметического и сельскохозяйственного назначения, а также снижению выбросов CO<sub>2</sub>.

5. Гибкие каскадные технологии переработки слоевищ бурых водорослей обеспечивают возможность переноса контроля всех показателей качества на вышестоящие стадии и минимизации испытаний фармацевтических субстанций и ГЛФ на их основе.

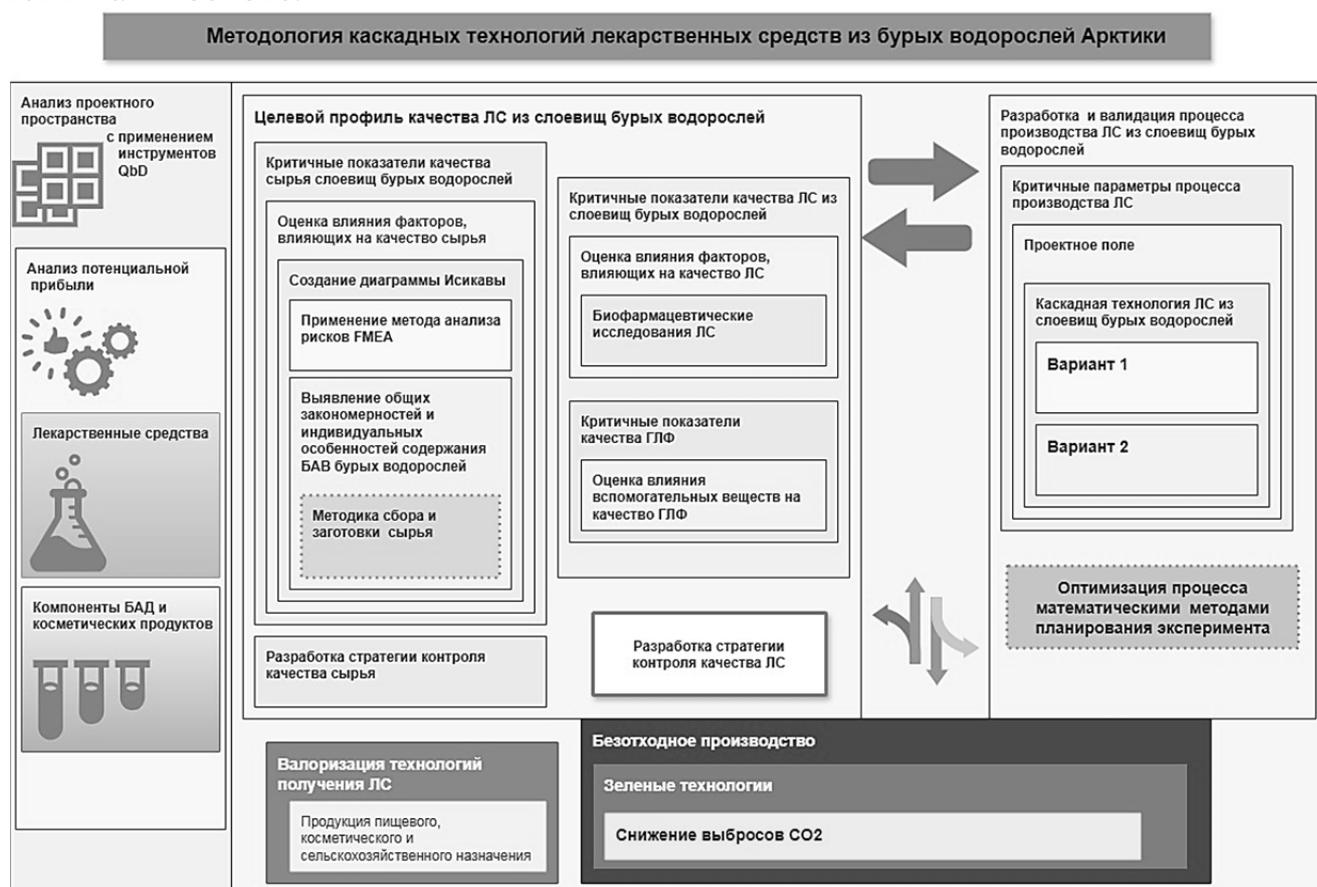


Рисунок 15. Схема Методологии каскадных технологий получения ЛС из слоевищ бурых водорослей.

В главе 4 Применение концепции качество через разработку для создания лекарственных препаратов фукоидана антикоагулянтного действия представлены результаты по разработке стратегии контроля фармацевтической субстанции фукоидан и ГЛФ на ее основе, включая методику определения содержания фукоидана, которая используется для сквозной стандартизации. Доказано, что разработанная методика, основанная на спектрофотометрическом определении продуктов реакции фукозы с L-цистеином, применима для анализа фукоидана не только в субстанции, но и в лекарственных формах в виде мази и таблеток. Методики определения содержания фукоидана в ГЛФ в форме мази и в форме таблеток валидированы по показателям специфичность, линейность, прецизионность (на уровне повторяемости или сходимости) и правильность.

Изучены фармако-технологические свойства фукоидана из фукуса пузырчатого, полученного в рамках 3 этапа каскадной технологии (вариант 1). Для разработки и оптимизации состава лекарственной формы использовали метод обобщённой функции желательности Харрингтона как инструмент QbD. Составы приготовленных модельных смесей фукоидана и вспомогательных веществ представлены в таблице 7. Для расчета значения желательности изучены следующие параметры: распадаемость модельных таблеток ( $Y_1$ , мин.), коэффициент прессуемости ( $Y_2$ ), индекс Карра ( $Y_3$ , %) и индекс Хауснера ( $Y_4$ ).

В результате обработки экспериментальных данных получены уравнения (4-7) регрессии в натуральных единицах, описывающие влияние контролируемых факторов на функции отклика ( $Y_1$ ):

$$Y_1 = 16.25 - 0.3X_1 - 1.8X_2 + 0.25X_3 \quad (4)$$

$$Y_2 = 0.9180 - 0.0013X_1 - 0.0039X_2 + 0.0005X_3 \quad (5)$$

$$Y_3 = 11.495 - 0.374X_1 + 0.624X_2 + 0.244X_3 \quad (6)$$

$$Y_4 = 1.13 - 0.0045X_1 + 0.0075X_2 + 0.0031X_3 \quad (7)$$

Модели (4-7) информационно способны, коэффициенты детерминации параметров  $Y_1 - R^2 = 0.9872$ ,  $Y_2 - R^2 = 0.9157$ ,  $Y_3 - R^2 = 0.8887$ ,  $Y_4 - R^2 = 0.9684$ .

Таблица 7. Модельные составы таблеточных масс фукоидана (мг)

Компонент	Состав				
	1	2	3	4	5
Фукоидан	250.0	250.0	250.0	250.0	250.0
Натрия кроскармеллоза ( $X_1$ )	35.0	0	0	35.0	35.0
Кросповидон ( $X_2$ )	35.0	0	35.0	0	35.0
Лактоза ( $X_3$ )	140.0	140.0	0	0	0
Микрокристаллическая целлюлоза	229.5	299.5	404.5	404.5	369.5
Кремния диоксид коллоидный	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Натрия стеарилфумарат	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5

Методом дисперсионного анализа установлено, что все контролируемые факторы (содержание натрия кроскармеллозы  $X_1$ , кросповидона  $X_2$  и лактозы  $X_3$ ) оказывают статистически значимое влияние на технологические характеристики ( $p < 0.001$ ). Наибольшее влияние на распадаемость таблетки и коэффициент прессуемости оказало содержание кросповидона (69.53% и 56.69% соответственно). Определяющим фактором, влияющим на индексы Карра ( $Y_3$ ) и Хауснера ( $Y_4$ ) являлся формообразующий компонент лактоза (60.88% и 68.95% соответственно). Проведя оптимизацию состава методом крутого восхождения в соответствии с полученными уравнениями, было найдено оптимальное соотношение вспомогательных веществ для таблеток фукоидана (в мг): фукоидана субстанции 250.0, лактозы 17.5, микрокристаллической целлюлозы 359.0, кросповидона 35.0, натрия кроскармеллозы 28.0, кремния диоксида коллоидного 7.0, натрия стеарилфумарата 3.5. Для гранулята оптимального состава были определены основные технологические характеристики: насыпная плотность до уплотнения –  $0.379 \pm 0.005$  г/см<sup>3</sup>, насыпная плотность после уплотнения –  $0.395 \pm 0.004$  г/см<sup>3</sup>, индекс Карра –  $3.99 \pm 0.02$  %, индекс Хауснера –  $1.04 \pm 0.01$ , угол естественного откоса –  $35 \pm 1^\circ$ . Разработана и запатентована

технология получения ГЛФ таблетки на основе фукоидана, и подготовлен проект НД, спецификация представлена в Приложении.

Проведена оценка характера и скорости высвобождения таблетки в тесте "Растворение" в 3-х средах. Высвобождение фукоидана протекало интенсивнее в кислых средах, моделирующих условия желудка и двенадцатиперстной кишки, чем в щелочных средах, моделирующих условия нижних отделов тонкого кишечника. К 45 минуте эксперимента при рН 1.2 и рН 5.7 высвобождалось около 73% и 80% действующего вещества в пересчете на фукозу или 86% и 94% в пересчете на субстанцию, соответственно. При рН 6.8 к 45 минуте эксперимента высвобождалось около 45% фукоидана в пересчете на фукозу или 53% в пересчете на субстанцию.

Для сравнения профилей высвобождения рассчитали константы скорости растворения и факторы различия  $f_1$  и сходимости  $f_2$ . Константы скорости растворения фукоидана ( $\text{мин}^{-1}$ ) при рН 1.2; 5.7 и 6.8 были 1.32; 1.38 и 1.00 соответственно. Учитывая полученные данные о стабильности фукоидана в кислой среде желудка и о том, что всасывание его протекает главным образом в тонком кишечнике, покрытие таблеток кишечнорастворимой оболочкой не целесообразно. Высвобождение фукоидана из разработанных таблеток описывается уравнением кинетики первого порядка.

С целью создания ГЛФ в виде мази на основе фукоидана было проведено экспериментально-теоретическое обоснование алгоритма разработки трансдермальной системы доставки (ТСД) фукоидана в рамках подхода QbD для местной терапии. ТСД в виде мази могут эффективно применяться для действующих веществ с большой молекулярной массой, в частности полисахаридов. Составы ТСД, содержащие фукоидан, готовили с использованием оливкового масла и дополнительных модифицирующих наполнителей различной природы (табл. 8).

Таблица 8. Составы исследуемых образцов ТСД фукоидана (масс.%)

№	Полоксамер 407	Масло оливковое	Полиоксил 40 ГKM	ПЭГ 400	ДЭМЭ	Нипагин	Нипазол	Вода	Стабильность при хранении*
1	4.5	5	4	2.5	1	0.15	0.05	67.8	1
2	4.5	10	8	5	1	0.15	0.05	56.3	1
3	4.5	15	12	7.5	1	0.15	0.05	44.8	3
4	4.5	20	16	10	1	0.15	0.05	33.3	3
5	9	5	8	7.5	1	0.15	0.05	54.3	3
6	9	10	4	10	1	0.15	0.05	50.8	2
7	9	15	16	2.5	1	0.15	0.05	41.3	3
8	9	20	12	5	1	0.15	0.05	37.8	2
9	13.5	5	12	10	1	0.15	0.05	43.3	3
10	13.5	10	16	7.5	1	0.15	0.05	36.8	3
11	13.5	15	4	5	1	0.15	0.05	46.3	2
12	13.5	20	8	2.5	1	0.15	0.05	39.8	2
13	18	5	16	5	1	0.15	0.05	39.8	1
14	18	10	12	2.5	1	0.15	0.05	41.3	1
15	18	15	8	10	1	0.15	0.05	32.8	1
16	18	20	4	7.5	1	0.15	0.05	34.3	1

Примечание: \* 1 – образец расслоился в течение 24 часов; 2 – образец расслоился в течение 1–50 суток; 3 – образец стабилен при хранении в течение 90 суток.

Исследование влияния свойств вспомогательных веществ на технологические свойства ТСД проводили с применением плана греко-латинского квадрата  $4 \times 4$  с повторными наблюдениями. В качестве физико-химических показателей оценивали коллоидную и термическую стабильность и pH мази.

Проведена оптимизация качественного и количественного состава композиции, разработка рациональной технологии, определение показателей качества. Определение структурной вязкости, тиксотропности, механической стабильности на данном этапе позволяет объективно оценивать качество разрабатываемого препарата.

Проведен анализ полученных образцов на коллоидную и термическую стабильность при хранении в течение 3 месяцев. По данным дисперсионного анализа установили, что значимое ( $p < 0.05$ ) наибольшее влияние на стабильность образцов ТСД фукоидана имеет количество полоксамера 407 (50%), в то время как влияние содержания полиоксил 40 ГКМ и ПЭГ 400 менее выражено (25%). Для изучения влияния вспомогательных веществ на стабильность ТСД разработали алгоритм, учитывающий соотношение компонентов водной и липофильной фаз (рис. 16). Полученные данные были ранжированы с учетом стабильности максимального относительного содержания каждого компонента к минимальному.

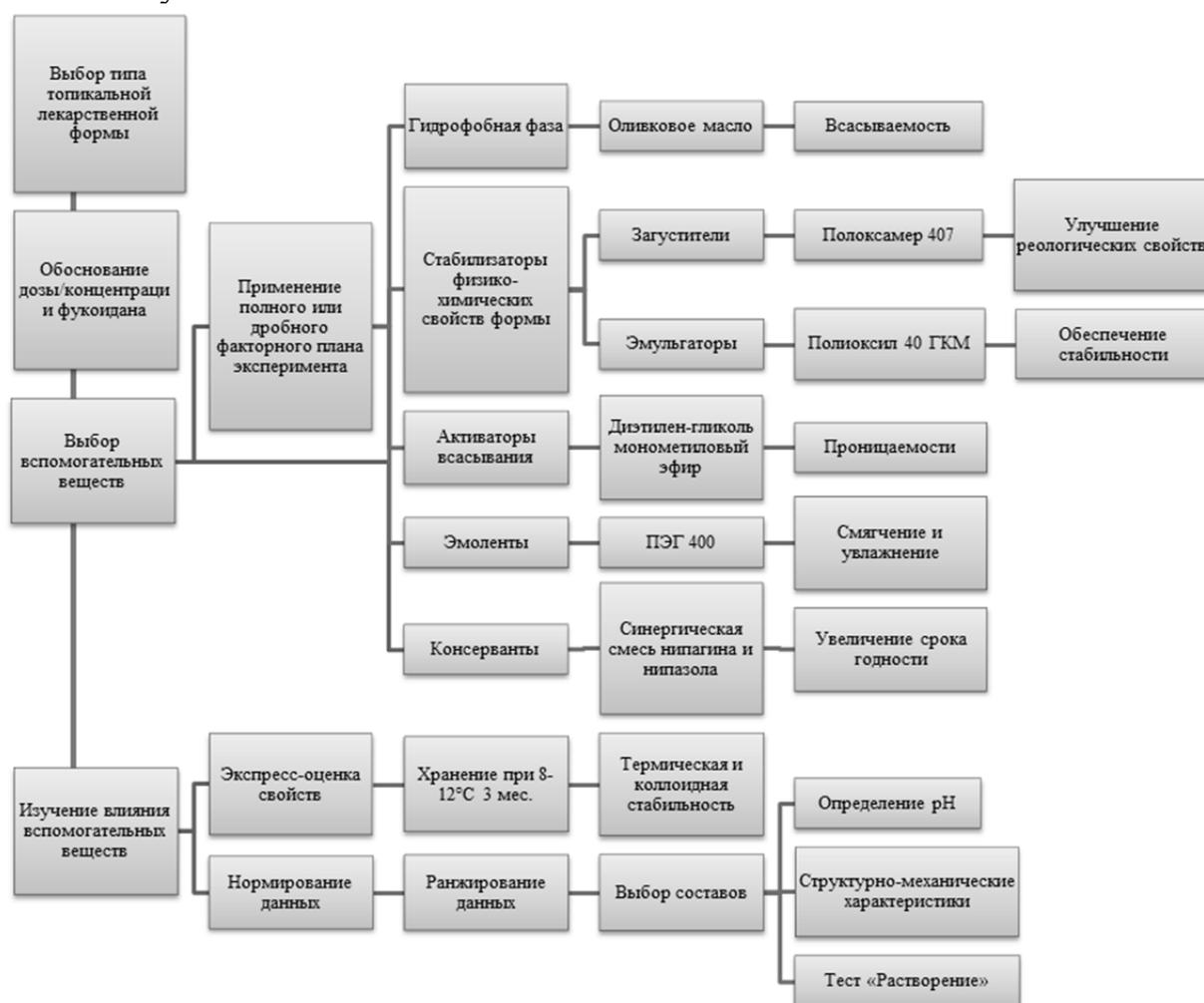


Рисунок 16. Алгоритм разработки топической трансдермальной системы доставки фукоидана.

На основании полученных данных установили, что для обеспечения стабильности ТСД фукоидана требуется соблюдение следующих условий Проектного поля: 1) отношение полоксамера 407 к водной фазе должно быть не менее 0.1 и не более 0.37 (объясняет расслоение образцов 1, 2, 13-16); 2) отношение воды к водной фазе должно быть не менее 0.56 и не более 0.69 (объясняет расслоение образцов 1, 2, 13-16); 3) отношение полиоксил 40 ГКМ к масляной фазе должно быть не менее 0.34 (объясняет расслоение образцов 6, 8, 11, 12). Установленные значения параметров определяют диапазон для проектного поля ТСД фукоидана.

Данный алгоритм учитывает физико-химические и технологические особенности фукоидана и позволяет создать высококачественную ТСД, обеспечивающую стабильность и полное высвобождение действующего вещества. Разработана технология получения ГЛФ мазь на основе фукоидана, и подготовлен проект НД, спецификация представлена в Приложении.

Результаты исследований легли в основу разработки лабораторных регламентов, проектов опытно-промышленных регламентов и масштабирование технологий получения ЛС из бурых водорослей Арктики, разработки проектного поля экстрагирования фукоидана и масштабирование технологии его получения. Разработаны лабораторные регламенты на получение концентрата липидного, маннита, фукоидана и альгината натрия из слоевищ фукусовых водорослей. Разработаны лабораторные и проекты опытно-промышленных регламентов на производство фармацевтической субстанции фукоидан из слоевищ фукуса пузырчатого, на производство ГЛФ в виде 15% мази с фукоиданом, на производство ГЛФ Фукоидан таблетки, 250 мг. Нарботаны и проанализированы лабораторные и опытные образцы ЛС. Для оценки эффективности масштабирования технологии была определена программа мониторинга лабораторных и опытно-промышленных партий. Вычисленный индекс воспроизводимости процесса, масштабированного в условиях ООО «Биомарин» составил  $Sr\ 1.56 > 1$ , следовательно, процесс экстракции фукоидана по отклику выход воспроизводим в опытно-промышленных условиях.

На основании исследования стабильности в условиях естественного хранения и в условиях холодильника установлен срок годности фукоидана и ГЛФ Фукоидан таблетки – 2 года в естественных условиях и ГЛФ Фукоидан мазь - 2 года при температуре  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

**В главе 5 Биофармацевтические исследования лекарственных средств из бурых водорослей Арктики** для подтверждения фармакологической безопасности и эффективности разработанных в ходе диссертационного исследования субстанций и ГЛФ представлены результаты биофармацевтических исследований ЛС из бурых водорослей Арктики.

Установлено, что при внутрижелудочном введении крысам субстанции фукоидан и ГЛФ Фукоидан таблетки 250 мг  $LD_{50} > 2000$  мг/кг, что позволяет их отнести к к IV классу малотоксичных веществ по классификации Hodge и Sterner и к классу 5 по классификации GHS. Изучение хронической токсичности ГЛФ таблетки в дозах 60-600 мг/кг при внутрижелудочном введении в течение 90 дней не выявило токсических эффектов. При однократном накожном нанесении ГЛФ

Фукоидан мазь 15% крысам в дозе 3000 мг/кг не отмечали токсических явлений. После нанесения на кожу мази с фукоиданом кроликам в течение 28 дней (60-600 мг/кг) не регистрировали раздражающего действия.

Оценка алергизирующих свойств ГЛФ Фукоидан таблетки в дозах 208 и 2000 мг/кг у морских свинок и 553 и 2000 мг/кг у мышей, а также ГЛФ Фукоидан мазь в дозах 100 и 1000 мг/морскую свинку и 10 и 100 мг/мышь в тестах «реакция общей анафилаксии», «реакция активной кожной анафилаксии», на самцах и самках морских свинок, «реакция гиперчувствительности «замедленного» типа», на самцах и самках аутбредных мышей выявила отсутствие сенсibiliзирующих свойств. Иммунотоксическое действие препаратов фукоидана в тестах по оценке гуморального и неспецифического иммунного ответа на половозрелых самцах мышей и клеточного иммунного ответа в дозах 553 мг/кг и 2000 мг/кг для ГЛФ таблетки и в дозах 10 и 100 мг/мышь для ГЛФ мазь выявлено не было. Оценка мутагенных свойств фукоидана и ГЛФ на его основе методом по учету микроядер в полихроматофильных (ПХЭ) и нормохроматофильных эритроцитах (НХЭ) периферической крови мышей позволила установить, что субстанция и таблетки не обладали мутагенным эффектом в дозах 550 мг/кг и 2000 мг/кг при внутрижелудочном пути введения, а мазь в дозах 10 мг/мышь и 100 мг/мышь при накожном нанесении. Репродуктивная токсичность при оценке в дозах 60 и 600 мг/кг при внутрижелудочном введении фукоидана субстанции и ГЛФ таблетки и в дозах 60 и 600 мг/кг при накожном нанесении ГЛФ мазь самцам и самкам крыс не оказали эмбрио-, фетотоксического и тератогенного действия, не повлияли на развитие потомства в пре- и постнатальном периодах.

Результаты оценки профиля безопасности фукоидана, ГЛФ на его основе мазь 15% и таблетки 250 мг позволяют сделать заключение об их низкой токсичности.

Для оценки безопасности ПГЭР-извлечений, полученных из образцов бурых водорослей, было проведено исследование содержания ряда элементов, включая Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Sr, Co, Zn и As, в сравнении с их содержанием в водных и ацетоновых извлечениях. Коэффициенты опасности, индексы опасности и канцерогенный риск, рассчитанные для всех элементов и их сочетаний, оказались значительно меньше 1, что свидетельствует об отсутствии риска для здоровья при местном применении всех изученных ПГЭР извлечений.

Механизмы противовоспалительного действия фукоидана из *F. vesiculosus* установлен в биофармацевтических условиях *in vitro* и *in vivo* в отношении ферментов провоспалительной циклооксигеназы (ЦОГ-1 и 2), митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) p38 и гиалуронидазы. Фукоидан ингибировал активность обеих изоформ фермента ЦОГ в диапазоне концентраций 0.1-10 мкг/мл. Фукоидан проявлял существенную ингибирующую активность ЦОГ-2 (IC<sub>50</sub> 4.3 мкг/мл). На основании полученного результата фукоидан можно отнести к умеренным селективным ингибиторам ЦОГ-2. Ингибирование фукоидана активности МАРК p38 в мононуклеарных клетках U937 человека, стимулированных липополисахаридами (ЛПС) происходило в зависимости от концентрации: активность наблюдали в области от 0.0125 до 0.5 мкг/мл. Прямая

зависимость наблюдалась в области концентраций от 0.00625 до 0.025 мкг/мл. Антигиалуронидазную активность фукоидана сравнивали с препаратом Алфлутоп®. Значение  $IC_{50}$  для фукоидана составляло 2.9 мкг/мл, в то время как для Алфлутопа составляло 3.3 мкг/мл.

Исследована противовоспалительная и антирадикальная/антиоксидантная активность фукоиданов из 5 видов бурых водорослей с использованием тест-систем *in vitro*. Установлено, что фукоидан из *F. vesiculosus* оказался значительно более мощным ингибитором денатурации белков ( $IC_{50}=0.20$  мг/мл), чем остальные фукоиданы и превосходил препарат сравнения диклофенак натрия ( $IC_{50}=0.37$  мг/мл). Отмечено, что ингибирование денатурации белков фукоиданом усиливалось с увеличением относительного содержания фукозы в его составе. Синергический эффект смеси (ЭС) для фукоиданов был рассчитан с использованием углеводов и полифенолов в качестве модельных смесей. Синергизм в тесте DPPH был обнаружен только для фукоиданов из *F. vesiculosus* (эффект смеси ЭС составлял 2.68 и 2.04 соответственно). ЭС сильно положительно коррелировал с полифенолами. Связь ЭС с содержанием фукозы была положительной. Фукоиданы из *F. vesiculosus* имели более высокий уровень общей антиоксидантной активности, чем фукоиданы из других видов водорослей: максимальная активность  $0.51\pm 0.03$  мг эквив. аскорбиновой кислоты наблюдалась при концентрации 50 мг/мл, и наибольшая антирадикальная активность по удалению DPPH-радикалов  $IC_{50}=0.05$  мг/мл. Проведенные исследования антиоксидантной и противовоспалительной активности фукоиданов *in vitro* выявили взаимосвязь между характеристиками их структуры и действием.

Установлено зависимое от концентрации ингибирование фермента ДПП-IV фукоиданом в диапазоне концентраций 0.02–200.0 мкг/мл.  $IC_{50}$  составляла 11.1 мкг/мл, тогда как для препарата ситаглиптина  $IC_{50}$  составляла 3.8 мкг/мл.

Противовоспалительная активность ГЛФ на основе фукоидана (в форме мази) в сравнении с препаратом Диклофенак (в форме мази) исследована на модели каррагенинового отека у крыс. Фукоидан мазь наносили в дозах 400 мг, 200 мг, 100 мг. Диклофенак наносили в количествах 400 мг и 200 мг. Доказан выраженный терапевтический эффект фукоидана, сопоставимый с воздействием препарата сравнения Диклофенак мазь.

Антикоагулянтное действие фукоидана и ГЛФ на его основе подтверждено исследованиями *in vitro* и *in vivo*. Для оценки фармакологической активности препаратов анализировали показатели: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), антиIIa и антиXa активность, агрегацию тромбоцитов. Исследование антикоагулянтного действия фукоидана в условиях *in vitro* было выполнено на контрольной плазме. В качестве биологической тест-системы исследований *in vivo* использовали самцов кроликов. Референтные препараты – Гепарин, Гепарин мазь и таблетки Вессел Дуе Ф (сулодексид). Субстанции фукоидан и Гепарин вводили однократно, внутривенно, в 3-х дозах: 0.1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг для фукоидана, и 50 МЕ/кг, 100 МЕ/кг, 200 МЕ/кг для гепарина. Препараты в форме мази наносили методом накожных аппликаций, в трех дозах, многократно (0.3 г,

0.6 г и 1.5 г.), препараты в форме таблеток были протестированы в дозах 20 мг/кг, 50 мг/кг и 100 мг/кг для фукоидана и в дозе 80 ЛЕ/кг для Вессел Дуе.

Показано, что фукоидан *in vitro* дозозависимо удлинял показатели ТВ, АЧТВ и ПВ. Для показателей гемостаза получены линейные зависимости с высокими коэффициентами аппроксимации ( $R^2 > 0.99$ ). Статистически достоверное удлинение АЧТВ и ТВ наблюдалось при внесении в плазму 0.0016 мг субстанции фукоидан/мл реакционной смеси, а ПВ – 0.08 мг субстанции фукоидан/мл.

Показано, что субстанция фукоидан и ГЛФ мазь и таблетки на ее основе *in vivo* оказали существенное влияние на показатели АЧТВ и ТВ. Выявлено ингибирующее влияние фукоидана на «внутренний» путь гемостаза. Выявлено дозозависимое увеличение антиХа активности у фукоидана и наличие ингибирующего действия на агрегацию тромбоцитов.

При проведении экспериментов в условиях *in vitro* и *in vivo* были получены результаты, подтверждающие высокую антикоагулянтную активность у субстанции и ГЛФ фукоидана из фукуса пузырчатого.

Учитывая антикоагулянтное действие, для изучения фармакокинетики и распределения фукоидана в тканях и органах лабораторных животных использовали оригинальный подход с применением в качестве биомаркера антиХа активности.

На рис. 17 показаны фармакокинетические профили фукоидана в плазме и тканях после внутрижелудочного введения крысам. Фукоидан в дозе 100 мг/кг с молекулярной массой 735 кДа обнаруживался в плазме крыс через 30 мин после внутрижелудочного введения.  $C_{max} = 0.125$  мкг/мл наблюдалась через 4 часа. Установлено, что фукоидан преимущественно накапливается в почках и селезенке: длительность МРТ в почках составляла 13.39 ч, самая продолжительная МРТ — 14.57 ч — наблюдалась для фукоидана в селезенке. Фукоидан в мышцах определялся впервые: AUC фукоидана была относительно низкой; его MRT равна 5.43 ч.

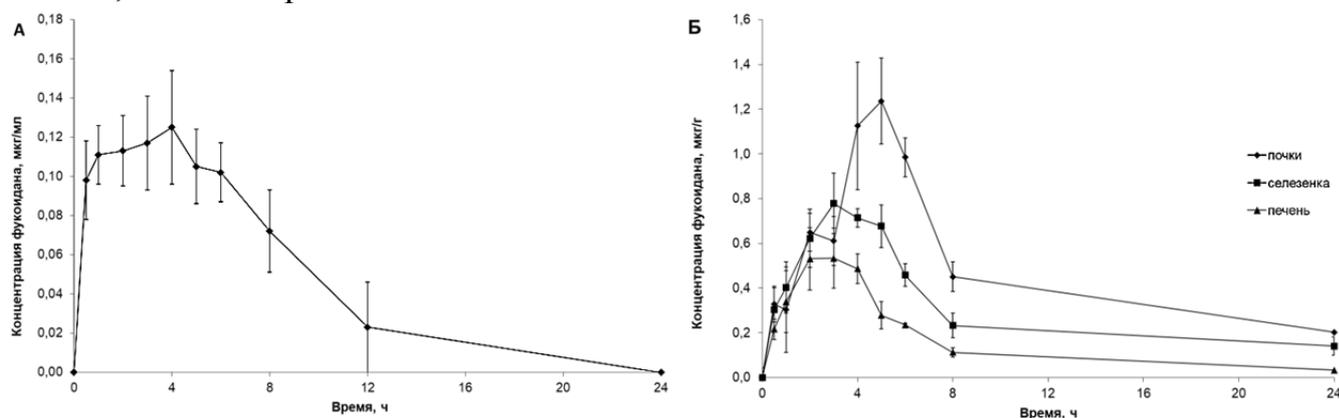


Рисунок 17. Фармакокинетические профили фукоидана *in vivo* после внутрижелудочного введения крысам: Концентрации фукоидана в плазме (А), а также в почках, селезенке и печени (Б).

Изучены профили зависимости концентрации фукоидана от времени после местного применения мази в плазме после однократной дозы (100 мг/кг) и после повторного ежедневного нанесения 100 мг/кг фукоидана в течение 5 дней.

Показано, что фукоидан в составе мази проникал в кожу и распределялся в коже, поперечно-полосатых мышцах и плазме с  $AUC_{0-48} = 0.94$  мкг·ч/г, 2.22 мкг·ч/г и 1.92 мкг·ч/мл, соответственно. Установлено, что фармакокинетика фукоидана при наружном применении носит линейный характер в диапазоне доз 50–150 мг/кг. После многократного наружного применения в течение 5 дней в дозе 100 мг/кг накопления фукоидана в плазме не наблюдалось. Результаты подтверждают рациональность наружного применения препаратов с фукоиданом в качестве антикоагулянтов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании выполненных исследований разработаны теоретические положения методологии каскадных технологий получения лекарственных средств из бурых водорослей Арктики, охватывающие все этапы фармацевтической разработки препаратов. Экспериментально подтверждены ранее неизвестные закономерности в технологии экстракции бурых водорослей, в том числе с использованием нового класса природных глубоких эвтектических растворителей. Разработаны технологии получения таблеток и трансдермальных систем доставки на основе фукоидана бурых водорослей. Проведены исследования по созданию систем обеспечения их качества с применением инструментов «Качество через разработку».

1. Разработана методология каскадных технологий лекарственных средств из бурых водорослей Арктики с применением инструментов QbD: обобщенный анализ рисков потери качества сырья впервые выявил факторы с высоким рангом, влияющие на целевой профиль качества, привел к созданию надлежащей стратегии контроля, позволяющей адаптируемо компенсировать изменчивость сырья для получения лекарственных средств с постоянным качеством, а каскадное извлечение БАВ, при котором каждая технологическая стадия предназначена для извлечения одного компонента и одновременной очистки следующего, способствует валоризации производства лекарственных средств.

2. Теоретические и экспериментальные исследования в области оценки рисков потери качества и влияния на целевой профиль качества слоевищ бурых водорослей Арктики с применением инструментов QbD позволили сформулировать положения, которые качественно объясняют и количественно описывают экспериментально полученные зависимости: а) Установлена взаимосвязь эндогенных ритмов и внешних факторов сбора и заготовки с целевым профилем качества сырья и субстанций из слоевищ бурых водорослей Арктики, показано что по степени влияния на содержание БАВ наибольшее значение имеет географическое положение мест сбора сырья, соленость воды, фаза размножения. Бурые водоросли Баренцева моря по содержанию фукоидана и полифенолов превосходят образцы из других акваторий Арктики; б) Для стандартизации слоевищ фукусовых водорослей выбраны критичные показатели качества и установлены критерии приемлемости; в) замена стадии сушки на замораживание сырья после сбора приводит к повышению качества и расширению спектра получаемых фармацевтических субстанций.

3. Установлено, что каскадные технологии переработки бурых водорослей наиболее перспективны, так как позволяют поэтапно получать БАВ, используя каждый предыдущий этап как этап очистки для последующего целевого компонента. Технологии каскадного получения ЛС из арктических бурых водорослей включают последовательное получение липидного концентрата, маннита, фукоидана и альгината натрия в виде высокоочищенных или концентрированных фармацевтических субстанций с дополнительной возможностью получения полифенольного комплекса и фукоксантина.

Доказано, что при каскадной технологии переработки бурых водорослей на выход и профиль качества ЛС наибольшее влияние оказывают экстрагент, метод экстракции и способ первичной заготовки сырья. Исследовано влияние основных факторов (температура, время экстракции, способов экстракции), а также способов интенсификации (ультразвуковая экстракция) на содержание и выход БАВ из сухих и замороженных слоевищ бурых водорослей Арктики, оптимизированы технологии получения лекарственных средств на их основе.

Проведены систематические исследования экстракции фукоидана из бурых водорослей Арктики с помощью ультразвука, установлено, что данный метод позволяет значительно интенсифицировать процесс выделения БАВ из сырья и добиться высокой степени истощения сырья по фукоидану. Выявлены закономерности процесса экстракции фукоидана и установлена взаимосвязь основных параметров экстракционной системы, теоретически предсказана равновесная концентрация фукоидана в извлечении, рассчитаны оптимальные значения объема, времени, рН растворителя и измельченности сырья для достижения заданной степени истощения сырья.

Впервые показано, что обработка ультразвуком приводит к высокой антикоагулянтной активности фукоидана. Приоритетность способа получения фукоидана защищена патентами РФ.

4. Установлено, что гибкий подход к каскадному получению ЛС из бурых водорослей позволяет получать комплекс полифенолов с помощью нового класса природных глубоких эвтектических растворителей, а также фукоидана и альгината натрия. Разработанная новая каскадная технология селективного извлечения гидрофильных и липофильных БАВ из бурых водорослей может быть использована для разработки технологии выделения других видов гидрофильных и липофильных БАВ из новых видов ЛРС. Результаты легли в основу развития нового направления каскадных технологий селективного извлечения гидрофильных и липофильных БАВ из бурых водорослей, которое отвечает основным принципам «зеленой химии».

5. Теоретически и экспериментально обоснован алгоритм разработки трансдермальной системы доставки (ТСД) фукоидана из фукуса пузырчатого в рамках подхода QbD. Осуществлен выбор вспомогательных веществ для топической трансдермальной системы доставки фукоидана. В соответствии с принципом QbD установлена значимость влияния концентраций вспомогательных веществ на стабильность ТСД при хранении. По результатам исследований термической, коллоидной стабильности, изучения реологических свойств и высвобождения выбран оптимальный состав ТСД фукоидана, обеспечивающую

стабильность и биодоступность. Разработана технология и оптимизирован состав мази фукоидана антикоагулянтного действия.

Для оптимизации состава и технологии лекарственной формы для перорального применения использован метод обобщенной функции желательности Харрингтона, биофармацевтическая оценка которых показала, что процесс растворения фукоидана подчиняется уравнению кинетики первого порядка. Разработана технология и оптимизирован состав таблеток фукоидана антикоагулянтного действия.

6. Впервые разработан и валидирован метод одновременной экстракции липофильных (фукоксантина) и гидрофильных (аскорбиновая кислота и флоротанины) веществ из бурых водорослей с использованием природных глубоких эвтектических растворителей (ПГЭР), обеспечивающий высокую извлекаемость БАВ. Установлено, что ПГЭР, помимо их нейтрального воздействия на окружающую среду, обеспечивают синергический эффект и высокую стабильность компонентов извлечений, сохраняя их биологическую активность. Впервые рассчитанный синергический эффект полученных ПГЭР извлечений из бурых водорослей позволит стандартизировать процесс получения биологически активных полиэкстрактов для применения в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности.

Процесс экстракции флоротанинов из бурых водорослей оптимизирован с использованием плана Бокса-Бенкена и методологии поверхности отклика, с помощью регрессионного анализа установлена высокая адекватность разработанной модели реальному процессу, что позволило значительно увеличить выход флоротанинов. Впервые выполнено химическое профилирование флоротанинов в ПГЭР извлечениях с использованием ВЭЖХ-МСВР и МС/МС анализа и установлено, что химический состав флоротанинов в ПГЭР-извлечениях идентичен этанольным.

7. На основе концепции сквозной стандартизации разработаны универсальные методики контроля качества фукоидана в сырье, субстанции и лекарственных формах и проведена их валидация, что составило основу стратегии обеспечения качества антикоагулянтных лекарственных препаратов.

8. На основании проведения комплекса доклинических исследований *in vitro* и *in vivo* субстанции фукоидана и готовых лекарственных форм на ее основе, установлены низкая токсичность и высокие показатели антикоагулянтной, противовоспалительной и антиоксидантной активности. Результаты оценки токсикологического профиля фукоидана и ГЛФ мазь и таблетки на его основе позволяют сделать вывод об их высоком уровне безопасности. Впервые показано, что ПГЭР-извлечения *F. vesiculosus* содержат меньшее количество элементов и более безопасны, чем извлечения, полученные с использованием воды и 70% ацетона. Это указывает на значительное преимущество ПГЭР по сравнению с другими растворителями.

Результаты данного исследования расширяют и дополняют существующие сведения о фукоиданах водорослей и подтверждают рациональность использования фукоидана из *F. vesiculosus* Баренцева моря в качестве средства

для лечения воспалительных заболеваний за счет механизмов удаления радикалов, антиоксидантной активности, ингибирования денатурации белка.

Показано, что каскадная технология получения фукоидана из бурых водорослей Арктического региона, обеспечивала синергический эффект антирадикального действия и сильное противовоспалительное действие, с установлением взаимосвязи между составом и биологической активностью. Подтвержден высокий практический потенциал коммерциализации фукоидана из бурых водорослей Баренцева моря как средства для лечения воспалительных заболеваний.

9. Разработана нормативная документация на слоевища фукусовых водорослей, фармацевтические субстанции и лекарственные формы в виде проектов НД, лабораторных и опытно-промышленных регламентов. Технологии валидированы и масштабированы. Разработано проектное поле экстрагирования фукоидана из бурых водорослей и масштабирована технология получения фармацевтической субстанции фукоидан.

В диссертационном исследовании приведены полные убедительные данные в необходимости и перспективности применения каскадного подхода к получению ЛС из слоевищ бурых водорослей Арктики.

Рекомендации. Результаты диссертационного исследования могут быть применены для создания лекарственных средств на основе БАВ бурых водорослей Арктики в промышленных условиях и масштабах. В диссертационной работе изложены новые научно обоснованные технологические решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие страны и соответствуют Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года (утв. Распоряжением Правительства РФ от 07.06.2023 г.) в части разработки инновационных лекарственных препаратов и необходимых сырьевых ингредиентов по полному технологическому циклу с целью импортозамещения антикоагулянтов и вспомогательных веществ для фармацевтической, пищевой и косметической промышленности. Разработанные новые экологически чистые и экономичные технологии их получения вносят вклад в достижение углеродной нейтральности российской экономики до 2050 г согласно Стратегии социально-экономического развития России (утв. Распоряжением Правительства РФ от 29.10.2021 г.). Создание каскадных технологий получения лекарственных средств на основе БАВ бурых водорослей способствует выполнению Программы развития Арктики, утвержденной Указом Президента РФ от 26.10.2020 г, которая предусматривает внедрение в Арктической зоне условий для перехода к экономике замкнутого цикла, созданию новых и модернизации действующих промышленных производств, развитию наукоемких и высокотехнологичных производств.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

### Статьи в журналах Перечня ВАК : 18 ВАК, 28 Scopus

1. **Облучинская, Е.Д.** Методология разработки топической трансдермальной системы доставки фукоидана / **Е.Д. Облучинская**, А.Н. Шиков, О.Н. Пожарицкая // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 1. – С. 59-68.
2. **Облучинская, Е.Д.** Оптимизация состава и технологии получения таблеток с фукоиданом и их биофармацевтическая оценка / **Е.Д. Облучинская**, О.Н. Пожарицкая, Е.В. Флисюк, А.Н. Шиков // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т. 54, № 5. – С. 38-42.
3. **Облучинская, Е.Д.** Сравнительное исследование полифенолов бурых водорослей морей Арктики и Северной Атлантики / **Е.Д. Облучинская**, Л.В. Захарова // Химия растительного сырья. – 2020. – № 4. – С. 129-137.
4. **Облучинская, Е.Д.** Природные глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты для извлечения флоротанинов бурых водорослей / **Е.Д. Облучинская**, А.В. Даурцева, О.Н. Пожарицкая, Е.В. Флисюк, А.Н. Шиков // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, № 3. – С. 45-49.
5. Шараф, А.Х. Мутагенные свойства субстанции фукоидана / А.Х. Шараф, Е.Д. Бондарева, К.Л. Крышень, О.Н. Пожарицкая, **Е.Д. Облучинская**, М.Н. Макарова // Фармация. – 2018. – Т. 67, № 3. – С. 46-51.
6. Клиндух, М.П. Сравнительное изучение свободных аминокислот бурой водоросли *Fucus vesiculosus* Linnaeus, 1753 литорали Мурманского берега Баренцева моря / М.П. Клиндух, **Е.Д. Облучинская** // Биология моря. – 2018. – Т. 44, № 3. – С. 200–206.
7. Косман, В.М. Сквозная стандартизация субстанции фукоидана из фукуса пузырчатого *Fucus vesiculosus* L. и препаратов на ее основе / В.М. Косман, **Е.Д. Облучинская**, О.Н. Пожарицкая, М.Н. Макарова, Е.В. А.Н. Шиков // Фармация. – 2017. – Т. 66, № 6. – С. 20-24.
8. **Облучинская, Е.Д.** Сравнительное исследование липидных экстрактов водорослей / **Е.Д. Облучинская**, С.А. Иванова, О.Н. Пожарицкая, А.Н. Шиков // Фармация. – 2016. – Т. 65, № 2. – С. 29-32.
9. **Облучинская, Е.Д.** Валидация методики количественного определения фукоидана из фукуса пузырчатого / **Е.Д. Облучинская**, В.М. Косман, О.Н. Пожарицкая, А.Н. Шиков // Фармация. – 2016. – Т. 65, № 4. – С. 26-30.
10. **Облучинская, Е.Д.** Влияние ультразвуковой обработки на химический состав и антикоагулянтные свойства сухого экстракта фукуса / **Е.Д. Облучинская**, М.Н. Макарова, О.Н. Пожарицкая, А.Н. Шиков // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, № 3. – С. 35-38.
11. Клиндух, М.П. Химический состав и антиоксидантная активность настоек фукусовых водорослей / М.П. Клиндух, **Е.Д. Облучинская** // Фармация. – 2015. – № 3. – С. 8-11.
12. **Облучинская, Е.Д.** Биологически активные вещества бурых водорослей: состав и фармакологические свойства / **Е.Д. Облучинская** // Фармация. – 2014. – № 4. – С. 49-51.
13. **Облучинская, Е.Д.** Изучение слоевищ фукусовых водорослей / **Е.Д. Облучинская**, И.В. Рыжик // Фармация. – 2014. – № 2. – С. 19-21.
14. Клиндух, М.П. Сравнительное исследование химического состава бурых водорослей *Fucus vesiculosus* и *Ascophyllum nodosum* / М.П. Клиндух, **Е.Д. Облучинская** // Вестник МГТУ. Труды Мурманского государственного технического университета. – 2013. – Т. 16, № 3. – С. 466-471.

15. **Облучинская, Е.Д.** Влияние факторов внешней среды на содержание полисахаридов фукуса пузырчатого *Fucus vesiculosus* L / Е.Д. Облучинская // Химия растительного сырья. – 2011. – № 3. – С. 47-51.
16. **Облучинская, Е.Д.** Оптимизация состава и технологии капсул, содержащих сухой экстракт фукуса / Е.Д. Облучинская // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – Т. 43, № 6. – С. 22-25.
17. **Облучинская, Е.Д.** Сравнительное исследование бурых водорослей Баренцева моря / **Е.Д. Облучинская** // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44, № 3. – С. 337-342.
18. **Облучинская, Е.Д.** Использование фукусовых водорослей Баренцева моря / Е.Д. Облучинская, Е.В. Шошина // Рыбное хозяйство. – 2008. – № 2. – С. 105-107.

**Статьи в журналах, входящих в международную базу Scopus:**

19. **Obluchinskaya, E.D.** The efficacy of two methods for extracting fucoidan from frozen Arctic algae thalli: chemical composition, kinetic study and process optimization / **E.D. Obluchinskaya**, O.N. Pozharitskaya // Journal of Applied Phycology. – 2024. – Vol. 36. – No. 1. – P. 1-20.
20. **Obluchinskaya, E.D.** *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis from Arctic: Its Biochemical Composition, Antiradical Potential, and Human Health Risk / **E.D. Obluchinskaya**, O.N. Pozharitskaya, E.V. Gorshenina, A.V. Daurtseva, E.V. Flisyuk, Y.E. Generalova, I.I. Terninko, A.N. Shikov // Marine Drugs. – 2024. – Vol. 22. – Iss. 1. – P. 48.
21. **Obluchinskaya, E.D.** Arctic Edible Brown Alga *Fucus distichus* L.: Biochemical Composition, Antiradical Potential and Human Health Risk / **E.D. Obluchinskaya**, O.N. Pozharitskaya, E.V. Gorshenina, E.V. Flisyuk, I.I. Terninko, Y.E. Generalova, A.N. Shikov // Plants. – 2023. – Vol. 12 – No. 12. – P. 2380.
22. **Obluchinskaya, E.D.** Biochemical composition, antiradical potential and human health risk of the Arctic edible brown seaweed *Fucus spiralis* L. / **E.D. Obluchinskaya**, O.N. Pozharitskaya, D.V. Zakharov E.V. Flisyuk, Y.E. Generalova, I.I. Terninko, A.N. Shikov // Journal of Applied Phycology. – 2023. – Vol. 35 – No. 1. – P. 365-380.
23. **Obluchinskaya, E.D.** Optimization of Extraction of Phlorotannins from the Arctic *Fucus vesiculosus* Using Natural Deep Eutectic Solvents and Their HPLC Profiling with Tandem High-Resolution Mass Spectrometry / **E.D. Obluchinskaya**, O.N. Pozharitskaya, V.A. Shevyrin, E.G. Kovaleva, E.V. Flisyuk, A.N. Shikov // Marine Drugs. – 2023. – Vol. 21. – Iss. 5. – P. 263.
24. **Obluchinskaya, E.D.** In Vitro Anti-Inflammatory Activities of Fucoidans from Five Species of Brown Seaweeds / **E.D. Obluchinskaya**, O.N. Pozharitskaya, A.N. Shikov // Marine Drugs. – 2022. – Vol. 20 – No. 10. – P. 606.
25. Shikov, A.N. The Impact of Natural Deep Eutectic Solvents and Extraction Method on the Co-Extraction of Trace Metals from *Fucus vesiculosus* / A.N. Shikov, **E.D. Obluchinskaya**, E.V. Flisyuk, I.I. Terninko, Y.E. Generalova, O.N. Pozharitskaya // Marine Drugs. – 2022. – Vol. 20, No. 5. – P. 324.
26. **Obluchinskaya, E.D.** The Biochemical Composition and Antioxidant Properties of *Fucus vesiculosus* from the Arctic Region / **E.D. Obluchinskaya**, O.N. Pozharitskaya, D.V. Zakharov, E.V. Flisyuk, I.I. Terninko, Y.E. Generalova, I.E. Smekhova, A.N. Shikov // Marine Drugs. – 2022. – Vol. 20, No. 3. – P.193.
27. Arokiarajan, M.S. Advance research in biomedical applications on marine sulfated polysaccharide/ M.S. Arokiarajan, R. Thirunavukkarasu, J. Joseph, **E.D. Obluchinskaya**, A. Wilson// International Journal of Biological Macromolecules.– 2022. – Vol. 194. – P. 870-881.

28. **Obluchinskaya, E.D.** Formulation, Optimization and In Vivo Evaluation of Fucoidan-Based Cream with Anti-Inflammatory Properties / **E.D. Obluchinskaya**, O.N. Pozharitskaya, E.V. Flisyuk, A.N. Shikov // *Marine Drugs*. – 2021. – Vol. 19. – No 11. – P. 643.
29. **Obluchinskaya, E.D.** Efficacy of natural deep eutectic solvents for extraction of hydrophilic and lipophilic compounds from fucus vesiculosus / **E.D. Obluchinskaya**, O.N. Pozharitskaya, L.V. Zakharova A.V. Daurtseva, E.V. Flisyuk, A.N. Shikov // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, No. 14. – P. 4198.
30. Ayrapetyan, O.N. Antibacterial Properties of Fucoidans from the Brown Algae *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea / O.N. Ayrapetyan, **E.D. Obluchinskaya**, E.V. Zhurishkina, Y.A. Skorik, D.V. Lebedev, A.A. Kulminskaya, I.M. Lapina // *Biology*. – 2021. – Vol. 10 – No 1. – P. 67.
31. **Obluchinskaya, E.** Metal concentrations in three species of Fucus L. on the Murmansk coast of the Barents Sea / **E.Obluchinskaya**, L. Zakharova // *Polar Science*. – 2021. – Vol. 28. – P. 100646.
32. Derkach, S.R. Rheological properties of fish gelatin modified with sodium alginate / S.R. Derkach, D.S. Kolotova, N.G. Voron'ko, **E.D. Obluchinskaya**, A.Y. Malkin // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13, No. 5. – P. 1-18.
33. **Obluchinskaya, E.** Effects of air drying and freezing and long-term storage on phytochemical composition of brown seaweeds / **E. Obluchinskaya**, A. Daurtseva // *Journal of Applied Phycology*. – 2020. – Vol. 32, No. 6. – P. 4235-4249.
34. Pozharitskaya, O.N. Mechanisms of Bioactivities of Fucoidan from the Brown Seaweed *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea / O.N. Pozharitskaya, **E.D. Obluchinskaya**, A.N. Shikov // *Marine Drugs*. – 2020. – Vol. 18. – No 5. – P. 275.
35. Shikov, A.N. Pharmacokinetics of marine-derived drugs / A.N. Shikov, E.V. Flisyuk, **E.D. Obluchinskaya**, O.N. Pozharitskaya // *Marine drugs*. – 2020. – Vol. 18. – No 11. – P. 557.
36. Pozharitskaya, O.N. The Pharmacokinetics of Fucoidan after Topical Application to Rats / O.N. Pozharitskaya, A.N. Shikov., **E.D. Obluchinskaya E.D.**, H. Vuorela // *Marine Drugs*. – 2019. – Vol. 17 – No 12. – P. 687.
37. Pozharitskaya, O.N. Pharmacokinetic and tissue distribution of fucoidan from Fucus vesiculosus after oral administration to rats / O.N. Pozharitskaya, A.N. Shikov, N.M. Faustova, **E.D. Obluchinskaya**, V.M. Kosman, H. Vuorela, V.G. Makarov // *Marine Drugs*. – 2018. – Vol. 16. – No. 4. – P. 132.

#### Монография

38. **Облучинская, Е.Д.** Технологии лекарственных и лечебно-профилактических средств из бурых водорослей / **Е.Д. Облучинская**. – Апатиты: Изд-во КНЦ РАН. 2005. 164 с. (монография).

#### Другие публикации

39. Захарова, Л.В. Полифенолы и антиоксидантная активность экстрактов фукусовых водорослей залива Факсафлоуи (море Ирмингера) и бухты Завалишина (Баренцево море) / Л.В.Захарова, **Е.Д. Облучинская** // Труды Кольского научного центра РАН. – 2021. – Т. 12. – № 3(9). – С. 68-75.
40. **Облучинская, Е.Д.** Фитохимические и технологические исследования водорослей Баренцева моря / **Е.Д. Облучинская** // Труды КНЦ. – 2020. – Т. 7. – № 4. – С. 178-197.
41. Daurtseva, A.V. The stability of pigments in the thalli and extracts of the Barents Sea fucus algae / Daurtseva A.V., **Obluchinskaya E.D.** // Вестник МГТУ. – 2019. – Т. 22. – № 3. – С. 314-321.
42. **Облучинская, Е.Д.** Антиоксидантные комплексные экстракты из фукусовых водорослей Баренцева моря / Е.Д. Облучинская // Вестник МГТУ. Труды Мурманского государственного технического университета. – 2018. – Т. 21, № 3. – С. 395-401.

43. Ткач, А.В. Стерины и полифенолы фукоидов мурманского побережья Баренцева моря / А.В. Ткач, **Е.Д. Облучинская** // Вестник МГТУ. Труды Мурманского государственного технического университета. – 2017. – Т. 20 – № 2. – С. 326-335.
44. Pozharitskaya, O.N. Investigation of an anti-activated factor x (anti-Xa) assay for the quantification of fucoidan in rodents plasma / O.N. Pozharitskaya, V.M. Kosman, N.M. Faustova, **Е.Д. Obluchinskaya** // Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2017. – Vol. 15, No. S1. – P. 55.
45. Terekhina, Y.A. Preparation and biopharmaceutical evaluation of topical pharmaceutical composition of fucoidan / .Y.A. Terekhina, M.V. Karlina, **Е.Д. Obluchinskaya** O.N. Pozharitskaya O.N. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2016. – Том 14, приложение. – С. 59.
46. **Облучинская, Е.Д.** Методологические подходы к разработке биопрепаратов на основе фукусовых водорослей / **Е.Д. Облучинская** // Вестник КНЦ. – 2015. – Т. 21. – № 2. – С. 78-82.
47. **Облучинская, Е.Д.** Теоретические и экспериментальные аспекты создания биопрепаратов на основе фукусовых водорослей / **Е.Д. Облучинская**// Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2015. – № 1 (59). – С. 41-42.
48. Клиндух, М.П. Исследование влияния концентрации спирта на содержание биологически активных веществ в настойках фукусовых водорослей / М.П. Клиндух, **Е.Д. Облучинская** // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – № 3 (57). – С. 31-33.
49. **Obluchinskaya, Е.Д.** Comparative study of antioxidant activity of fucus ethanol extracts / **Е.Д. Obluchinskaya** // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Том 12, приложение. – С 47-48.
50. **Obluchinskaya, Е.Д.** New method obtain the fucoidan containing extracy with the ultrasonic treatment / **Е.Д. Obluchinskaya** // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, – 2013. – Том 11, приложение. – С. 67-68.
51. **Obluchinskaya, Е.Д.** Lipid composition of brown algae species by HPTLC / **Е.Д. Obluchinskaya, S.A. Ivanova, O.N. Pozharitskaya, A.N. Shikov** // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, – 2013. – Том 11, приложение. – С. 68.
52. **Obluchinskaya, Е.Д.** Physical and chemical properties, anticoagulant and antioxidant activity of fucus dry extract / **Е.Д. Obluchinskaya** // Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2012. – Vol. 10 – No. 2. – P. 85.

#### **Материалы и тезисы конференций:**

53. **Облучинская, Е.Д.** Влияние географического положения мест сбора арктического *Fucus distichus* L. На накопление металлов и полисахаридов / **Е.Д. Облучинская, Е.В. Горшенина, О.Н. Пожарицкая** // Сборник материалов VI Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология-2023», Мурманск, 11.09.2023-15.09.2023 / Мурманский арктический университет. – Мурманск: Мурманский арктический университет, 2023. – С. 92.
54. Журишкина, Е.В. Исследование сочетанного действия паклитаксела и фукоидана из бурых водорослей *Fucus vesiculosus* в отношении клеток HELA G63 / Е.В. Журишкина, И.М. Лапина, С.И. Степанов, А.А. Кульминская, О.Н. Пожарицкая, **Е.Д. Облучинская** // Сборник материалов III Международной научно-практической конференции «Фундаментальная наука для практической медицины. Аддитивные технологии, современные материалы и физические методы в медицине: инновации», Нальчик, 06.09.2023-09.09.2023 / Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова. – Нальчик: КБГУ, 2023. – С. 28.

55. Лапина, И.М. Исследование противоопухолевой и антиоксидантной активности фукоиданов из бурых водорослей Баренцева моря / И.М. Лапина, **Е.Д. Облучинская**, Е.В. Журишкина, А.А. Кульминская // Сборник материалов III объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, Сочи – Дагомыс, 03.10.2021-08.10.2021. – Москва: Издательство «Перо», 2022. – Том 3. – С. 50.
56. **Облучинская Е.Д.** Полифенольные экстракты из фукуса пузырчатого на основе природных глубоких эвтектических растворителей / **Е.Д. Облучинская** // Сборник материалов XI международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», Москва, 11.04.2022-15.04.2022. – Москва: Издательство «Перо», 2022. – С. 204.
57. Лапина, И.М. Антибактериальные свойства фукоиданов из бурых водорослей *Fucus vesiculosus* Баренцева моря / И.М. Лапина, О.Н. Айрапетян, **Е.Д. Облучинская** // Сборник тезисов V Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология», Гатчина, 21.09.2021-24.09.2021. – Гатчина: Издательство Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 2021. – С. 27-28.
58. Айрапетян, О.Н. Исследование влияния фукополисахаридов на бактериальные клетки методом АСМ / О.Н. Айрапетян, И.М. Лапина, **Е.Д. Облучинская** // Сборник тезисов V Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология», Гатчина, 21.09.2021-24.09.2021. – Гатчина: Издательство Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 2021. – С. 76-77.
59. **Облучинская, Е.Д.** Технология, химический состав и антиоксидантные свойства экстрактов водорослей на основе природных глубоких эвтектических растворителей / **Е.Д. Облучинская**, А.В. Даурцева, Л.В. Захарова // Сборник материалов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 07.11.2019-08.11.2019. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2019. – С. 314-318.
60. Захарова, Л.В. Определение растворимости биологически активных веществ гидробионтов Баренцева моря в экологически чистых растворителях / Л.В. Захарова, **Е.Д. Облучинская** // Сборник материалов XXXVI конференции молодых ученых «Исследования арктических экосистем», Мурманск, 17.05.2018. – Мурманск: ММБИ КНЦ РАН, 2018. – С. 54-58.
61. **Облучинская, Е.Д.** Молекулярно-массовое распределение полисахаридов бурых водорослей при ультразвуковой обработке экстрактов / **Е.Д. Облучинская** // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Современные эколого-биологические и химические исследования, техника и технология производств», Мурманск, 25.04.2018. – Мурманск: МГТУ, 2018. – С. 306-311.
62. **Облучинская, Е.Д.** Изучение иммунотоксичности и иммуномодулирующих свойств сухих экстрактов из фукоидов Баренцева моря / **Е.Д. Облучинская** // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Современные эколого-биологические и химические исследования, техника и технология производств», Мурманск, 07.04.2017. – Мурманск: МГТУ, 2017. – С. 44-50.
63. Ткач, А.В. Исследование содержания полифенолов и фитостерина фукоидов Кольского залива / А.В. Ткач, **Е.Д. Облучинская** // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Современные эколого-биологические и химические исследования, техника и технология производств», Мурманск, 07.04.2017. – Мурманск: МГТУ, 2017. – С. 61-65.

64. Косман, В.М. Стандартизация субстанции фукоидана из фукуса пузырчатого *Fucus vesiculosus* L. / В.М. Косман, О.Н. Пожарицкая, Е.Д. Облучинская, А.Н. Шиков, Т.Н. Фомичева // Сборник материалов VII Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья», Барнаул, 24.04.2017-28.04.2017. – Барнаул: АГУ, 2017. – С. 199-201.

65. **Облучинская, Е.Д.** Разработка и валидация методик анализа (контроля качества) слоевищ фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus* L.) / **Е.Д. Облучинская**, Е.В. Горшенина // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Современные эколого-биологические и химические исследования, техника и технология производств», Мурманск, 08.04.2016. – Мурманск: МГТУ, 2016. – С. 163-169.

66. Ткач, А.В. Сравнительное исследование содержания полифенолов и фитостероидов в бурых водорослях *Fucus vesiculosus* мурманского побережья Баренцева моря / А.В. Ткач, **Е.Д. Облучинская** // Сборник материалов Международной научной конференции, посвящённой памяти члена-корреспондента РАН Д.Г. Матишова «Окружающая среда и человек. Современные проблемы генетики, селекции и биотехнологии», Ростов-на-Дону, 05.09.2016-08.09.2016. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2016. – С. 240-243.

#### Патенты

Патент № 2337571 С2 Российская Федерация, МПК А23L 1/30, А23L 1/337, А61К 36/02. Способ комплексной переработки фукусовых водорослей (варианты) : № 2006129254/13 : заявл. 11.08.2006 : опубл. 10.11.2008 / **Е.Д. Облучинская** ; заявитель Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра Российской академии наук (ММБИ КНЦ РАН).

Патент № 2506089 С1 Российская Федерация, МПК А61К 36/03, В01D 11/02, А61К 9/06. Сухой экстракт фукуса, способ его получения и антикоагулянтная мазь на его основе : № 2012130594/15 : заявл. 17.07.2012 : опубл. 10.02.2014 / **Е.Д. Облучинская** ; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра Российской академии наук (ММБИ КНЦ РАН).

Патент № 2650808 С1 Российская Федерация, МПК А61К 36/03. Сухой экстракт из фукусовых водорослей, обладающий антиоксидантным действием, и способ его получения : № 2016148563 : заявл. 09.12.2016 : опубл. 17.04.2018 / **Е.Д. Облучинская** ; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра Российской академии наук (ММБИ КНЦ РАН).

Патент № 2657615 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/737, А61К 47/00, А61К 9/20. Фармацевтическая композиция на основе фукоидана для перорального применения и способ её получения : № 2017115540 : заявл. 02.05.2017 : опубл. 14.06.2018 / **Е.Д. Облучинская**, М.В. Карлина, О.Н. Пожарицкая, Д.В. Демченко, А.Н. Шиков, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, Ю.С. Фомичев; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра Российской академии наук (ММБИ КНЦ РАН)

Патент № 2793805 С1 Российская Федерация, МПК А61К 36/02, А61К 9/06, В01D 11/02. Способ получения полисахаридов из шрота (отходов переработки) бурых водорослей: № 2022120381 : заявл. 25.07.2022 : опубл. 06.04.2023 / **Е.Д. Облучинская**; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский морской биологический институт Российской академии наук.