УДК 615.072: 615.28: 616-006.04 https://doi.org/10.24959/uekj.18.11

О. В. Стаднічeнко[1], Ю. М. Краснопольський[2], Т. Г. Ярних[1]

[1] Національний фармацевтичний університет
[2] Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»

Особливості трансферу технології і масштабування при промисловому освоєнні виробництва ліпосомальних цитостатиків

Невід'ємною частиною розробки оригінальних лікарських засобів у фармацевтичній галузі є докладна, узгоджена процедура відтворення фармацевтичних технологій на різних етапах розробки і виробництва – трансфер технологій.

Метою дослідження є аналіз варіантів трансферу, що часто зустрічаються у фармацевтичній промисловості, дослідити проблеми масштабування технологій, які спостерігаються під час трансферу при виробництві нанорозмірних лікарських форм і запропонувати шляхи їх вирішення.

Матеріали та методи. Для виготовлення лікарського засобу використовували яєчний фосфатидилхолін фірми Lipoid, ліофілізацію проводили в апараті Quarco виробництва КНР. Визначення ступеня інкапсуляції проводили методом ВЕРХ на приладі Shimadzu LC-20.

Результати. Ліпосомальні препарати відносяться до наноструктурованих лікарських засобів, і процес трансферу при їх освоєнні являє собою один з етапів розробки і вимагає проведення додаткового адаптаційного експерименту. Нами була поставлена задача систематизувати отриманий досвід по трансферу і масштабізації виробництва ліпосомальних препаратів цитостатиків. Були проведені додаткові експерименти, що дозволяють перенести на промислове обладнання без втрати якості препарату результати первинної фармацевтичної розробки.

Висновки. В результаті проведених досліджень проаналізовані основні варіанти трансферу технології протягом життєвого циклу готової лікарської форми. Розглянуті особливості трансферу і масштабізації технології виготовлення нанорозмірних ліпосомальних форм, зокрема отримання ліпідної плівки, екструзія при високому тиску, ультрафільтрація, стерилізаційна фільтрація і ліофільна сушка.

Ключові слова: ліпосоми; трансфер технологій; екструзія високого тиску; фармацевтична розробка; промислове виробництво

A. V. Stadnichenko, Y. M. Krasnopolsky, T. G. Yarnykh

Transfer technology features and settlement in industrial automotive of liposomal cytostatic production

An integral part of the original medicines development in pharmaceutical industry is a thorough, coordinated procedure for pharmaceutical technologies reproduction at various stages of development and production – technology transfer.

Aim. To study and to analyze the frequent transitions in the pharmaceutical industry, to investigate the problems of technology scaling observed during the transfer, in the manufacture of nanosized dosage forms, and to propose ways to solve them.

Materials and methods. For liposomes preparation it was purchased egg phosphatidylcholine from Lipoid, Germany. Lyophilization was carried out in the Quarco model, P.R.C. The encapsulation degree was determined by HPLC on a Shimadzu LC-20 instrument manufactured in Japan, according to a method developed earlier.

Results. Liposomal drugs related to complex structured drugs, and the transfer process during their development is one of the stages of development and requires an additional adaptation experiment. We were tasked with make an experience gained in the transfer and scaling of the production of liposomal cytostatics. Additional experiments were carried out, allowing the results of primary pharmaceutical development to be transferred to industrial equipment without loss of quality. Features of the scale of such technological processes as a lipid film obtaining, high pressure extrusion, ultrafiltration, sterilizing filtration and freeze drying was analyzed.

Conclusions. As a result of the conducted researches the basic variants of technology transfer during a life cycle of the finished medical form were analyzed. The peculiarities of the transfer and scaling of nanosized liposomal formulation technology, in particular the production of a lipid film, estrusion at high pressure, ultrafiltration, sterilizing filtration and lyophilic drying are considered.

Key words: liposomes; technology transfer; high pressure extrusion; pharmaceutical development; industrial production

ISSN 2311-1127 (Print)
ISSN 2519-8807 (Online)

А. В. Стадниченко, Ю. М. Краснопольский, Т. Г. Ярных

Особенности трансфера технологии и масштабирования при промышленном освоении производства липосомальных цитостатиков

Неотъемлемой частью разработки оригинальных лекарственных средств в фармацевтической отрасли является доскональная, согласованная процедура воспроизведения фармацевтических технологий на различных этапах разработки и производства – трансфер технологий.

Целью исследования является анализ вариантов трансфера, часто встречающихся в фармацевтической промышленности, исследовать проблемы масштабирования технологий, наблюдаемых во время трансфера при производстве наноразмерных лекарственных форм, и предложить пути их решения.

Материалы и методы. Для изготовления липосом использовали яичный фосфатидилхолин фирмы Lipoid, Лиофилизацию проводили в аппарате Quarco производства КНР. Определение степени инкапсуляции проводили методом ВЭЖХ на приборе Shimadzu LC-20.

Результаты. Липосомальные препараты относятся к наноструктурированным лекарственным средствам, и процесс трансфера при их освоении представляет собой один из этапов разработки и требует проведения дополнительного адаптационного эксперимента. Нами была поставлена задача систематизировать полученный опыт по трансферу и масштабизации производства липосомальных препаратов цитостатиков. Были проведены дополнительные эксперименты, позволяющие перенести на промышленное оборудование без потери качества препарата результаты первичной фармацевтической разработки.

Выводы. В результате проведенных исследований проанализированы основные варианты трансфера технологии в течение жизненного цикла готовой лекарственной формы. Рассмотрены особенности трансфера и масштабизации технологии изготовления наноразмерных липосомальных форм, в частности получение липидной пленки, эструзия при высоком давлении, ультрафильтрация, стерилизирующая фильтрация и лиофильная сушка.

Ключевые слова: липосомы; трансфер технологий; экструзия высокого давления; фармацевтическая разработка; промышленное производство

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Основоположним документом для початку реалізації ідеї фармацевтичного препарату є керівництво «ICH Q8(R2) PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT», яке окрім всього іншого розкриває такі сучасні підходи, як «якість через дизайн», «простір проектних параметрів при розробці препарату», «критичні параметри процесів», «стратегія контролю якості» [1]. Одним з понять є «Життєвий цикл препарату», що є послідовністю дій з розробки препарату, його виводу на ринок, випуску і завершення виробництва.

Фармацевтична галузь є однією з найбільш технологічно досконалих галузей знань людства, і це обумовлено використанням складних, часто унікальних технологій. Невід'ємною частиною цієї галузі є досконала, погоджена процедура відтворення фармацевтичних технологій – трансфер технологій [2–4].

Трансфер технологій реалізується протягом всього життєвого циклу препарату. Найважливіші етапи використання трансферу показані на рисунку.

На рисунку показана послідовність дій життєвого циклу препарату від реалізації ідеї створення лікарського препарату за допомогою фармацевтичної розробки, через пілотну розробку до промислового виробництва, виробництва за контрактом і продаж під контролем фармаконадзору. Сірим виділені етапи розробки і промислової апробації, стрілками показані необхідні трансфери.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Трансфер технологій можна розділити на декілька характерних випадків. Найбільш складний процес трансферу виникає на етапі створення, до моменту освоєння препарату в промисловому виробництві. При перенесенні технології з рівня фармацевтичної розробки на рівень пілотного виробництва і далі на рівень промислової апробації доводиться стикатися з процесом масштабування технології, що вимагає залучення всього досвіду дослідників і представників фірм – виробників, які поставляють фармацевтичне устаткування.

ВИДІЛЕННЯ НЕ ВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Трансфер на рівні промислового виробництва (перенесення технології, контрактне виробництво), хоча і відповідальніший етап з точки зору подальшого використання отриманого продукту – лікарського засобу споживачами, але носить більш прогнозований характер. При проведенні цього процесу фахівці можуть використовувати великий об'єм даних, отриманих

ISSN 2311-1127 (Print)
ISSN 2519-8807 (Online)

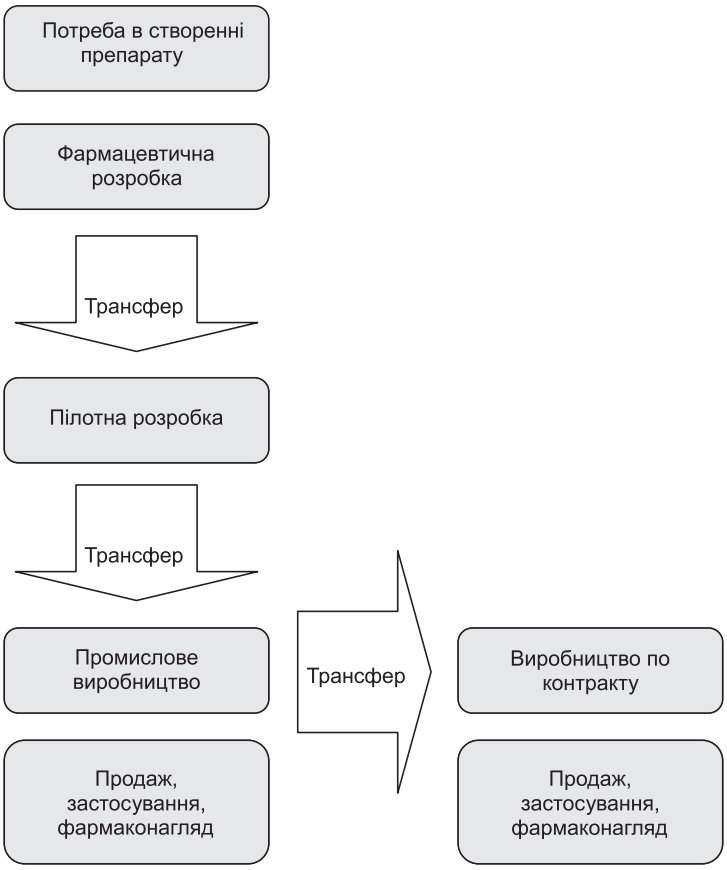

Рис. Трансфер технології в життєвому циклі препарату

на валідаційних серіях і при попередньому промисловому освоєнні.

Використання ліпосомальної платформи в створенні нанобіотехнологічних препаратів – один із способів зменшити головний недолік медичних цитостатиків – високу токсичність при терапевтичному вживанні [5]. При цьому поряд з EPR (enhanced permeability and retention effect) ефектом [6] діє ефект регенерації пошкоджених мембран клітин органів людини ліпідами бішару ліпосом [7]. Це робить ліпосоми об'єктами постійного вивчення у фармацевтичній технології. Так, вже зараз світовий ринок ліпосомальних препаратів налічує більше 20 найменувань, серед яких такі комерційно успішні препарати як «Maeqibo» – ліпосомальна форма вінкристину сульфату, «Doxil» – ліпосомальна форма доксорубіцину гідрохлориду, «Onivyde» – ліпосомальна форма іринотекану гідрохлориду, «Ambisome» – ліпосомальна форма амфотерицину В [8]. Ринок лише одного препарату «Doxil» і його дженериків вимірюється в сотнях мільйонів доларів, і ці показники зростають [9]. Окрім зменшення токсичності, ліпосомальна платформа підвищує біодоступність нерозчинних у водних середовищах лікарських речовин [10].

Вельми перспективними для хіміотерапії є препарати групи камптотецинів – зокрема іринотекан, і препарат групи платиновмісних сполук – оксаліплатин [11]. Ліпосомальні форми цих препаратів дозволять знизити токсичність і збільшити ефективність терапії.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Мета дослідження – проаналізувати варіанти трансферу, що часто зустрічаються у фармацевтичній промисловості, дослідити проблеми масштабування технології, які спостерігаються під час трансферу, при виробництві нанорозмірних лікарських форм і запропонувати шляхи їх вирішення.

ВИКЛАДЕННЯ ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для виготовлення ліпосом використовували яєчний фосфатидилхолін фірми Lipoid, Німеччина; холестерин, лимонну кислоту моногідрат, фосфатидилгліцерин, трегалози дигідрат, розчинники – виробництва фірми Sigma-aldrich, США. Ліпідну плівку отримували на роторному випарнику Buchi 210 з вакуумним контролером при залишковому тиску 0,02 атм. Для гомогенізації використовували метод екструзії при високому тиску.

Екструзію проводили за допомогою установок: шприцевий міні-екструдер фірми Avantipo-

ISSN 2311-1127 (Print)
ISSN 2519-8807 (Online)

larlipids з полістереновими мембранами з діаметром пор 400 і 100 нм, США і Microfluidiser M-110P виробництва фірми Microfluidics, США. Розмір ліпосом визначали при температурі 20 °С на приладі Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS виробництва Великобританії.

Ультрафільтрацію для отримання «хімічного градієнта» проводили на установці Minim2 фірми PALL, США, а також методом діалізу. Ліофілізацію проводили в апараті Quarco виробництва КНР. Визначення ступеня інкапсуляції проводили методом ВЕЖХ на приладі Shimadzu LC-20 виробництва Японії згідно з розробленою раніше методикою [12].

На етапі апробації препарат був профільтрований крізь шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм і розлитий у віали ємністю 2 мл виробництва Agilent, США. У пілотному масштабі препарат був стерильно профільтрований і розлитий по 20 мл в асептичних умовах у стерильні флакони VAT050-2C ємністю 50 мл відповідно виробництва Schott, Німеччина.

Саме поняття фармацевтичного трансферу, який проводиться на життєвому циклі препарату, має на увазі одночасну масштабізацію процесу, що при використанні складних технологій, найчастіше, перетворюється на окрему розробку. Найбільш складним у трансфері і масштабізації є збереження балансу між компонентами препарату і знаходження в єдиному полі властивостей системи, що можна охарактеризувати «простором проектних параметрів» як на етапі підтвердження принципової можливості отримання препарату, так і на етапі впровадження технології на промисловому обладнанні.

Фармацевтична розробка на етапі підтвердження ідеї створення препарату проходить, як правило, у мікромасштабі для мінімізації витрат при фармацевтичному експерименті. Для ліпосомальних препаратів це обсяги 1-5 мл.

Первинну ліпідну емульсію отримували при фармрозробці, так і в разі пілотного та промислового масштабу методом гідратації ліпідної плівки. Ліпідна плівка була отримана методом відгону розчинника з розчину ліпідів у суміші етанол/хлороформ. Спосіб добре піддається масштабізації і легко піддається трансферу на різних етапах освоєння препарату. Однією з вимог до масштабізації є використання продуктивного вакуумного обладнання для досягнення необхідного ступеня видалення органічних розчинників, що застосовуються.

Для стадії екструзії в мікромасштабі використовують шприцеві дозатори, що дозволяють у малому обсязі без витрати дорогих реактивів провести велику кількість дослідів з дослідження шляху створення препарату. Нами були використані шприцеві дозатори фірми Avanti Polar Lipids об'ємом 2,5 мл. Були також використані екструзійні мембрани з діаметром пор двох видів – 400 і 100 нм. Був застосований метод послідовної екструзії. Це було пов'язано з наявністю великих частинок, які формуються при отриманні мультиламелярних ліпосом методом ліпідної плівки. Спочатку ці ліпосомальні агломерати піддавалися екструзії через мембрани з порами 400 нм і тільки після зменшення часток до розміру менше 500 нм була проведена екструзія через мембрани з діаметром пор 100 нм; як результат отримували ліпосоми розміром від 100 до 140 нм.

Перенесення технології екструзії на промислові масштаби має два аспекти. Один з них має на увазі застосування більш продуктивного обладнання, яке дає можливість подолати навантаження, необхідне для руйнування мультиламелярних агрегатів і формування ліпосом з заданими параметрами. Інший аспект пов'язаний з необхідністю охолодження і контролю тиску для запобігання руйнування і деградації таких лабільних об'єктів, як фосфоліпіди. На етапі трансферу цей етап піддається ретельному вивченню і проведенню додаткового експерименту.

Одним з ключових аспектів ліпосомальної технології, зокрема технології виробництва ліпосомального іринотекану, є ультрафільтрація на етапі заміни зовнішнього буфера і створення «хімічного градієнта» на поверхні ліпосомального бішару. На етапі створення «хімічного градієнта» в мікромасштабі застосовувався метод діалізу, при якому 2 мл ліпосомальної емульсії розводили водою для ін'єкцій до об'єму 20 мл, і обробляли розчин у діалізаторі. Таким чином, була доведена можливість реалізації методу активного завантаження іринотекану гідрохлориду в ліпосоми. На етапі ж напівпромислового освоєння з використанням обладнання, що працює на основі принципів промислових установок, нами був застосований метод ультрафільтрації.

Однак було з'ясовано, що при застосуванні ультрафільтраційних касет з верхньою межею відсікання від 100 кДа виникає ризик проскакування і втрати ліпосом, розмірність яких лежить в області малих діаметрів. У зв'язку з цим нами були застосовані ультрафільтраційні касети з верхньою межею відсікання 30 кДа, при використанні яких явище проскакування не спостерігається.

При застосуванні ультрафільтрації виникла проблема повної втрати інкапсуляції в ході обробки розчинів об'ємом понад 500 мл. У результаті проведених експериментів було визначено, що втрата виникає внаслідок збільшення часу процесу і як наслідок – нагрівання емульсії вище критичної точки. Було знайдено рішення у вигляді застосування охолодження на технологічній

ISSN 2311-1127 (Print)
ISSN 2519-8807 (Online)

стадії, а саме не допускання підвищення температури емульсії понад 10 ^{0}C.

Кінцевим етапом технології є стерильний розлив у флакони в асептичних умовах і подальша ліофільна сушка. На етапі мікроапробації стерильність препарату не була потрібна, і етап стерилізації моделювався шляхом фільтрації отриманої емульсії через насадочний фільтр з замком LuerLock з мембраною з поліефірсульфону і з розміром пор 0,22 мкм.

Можливість фільтраційної стерилізації без руйнування ліпосом була доведена, і в подальшому технологія стерилізаційної фільтрації була передана і масштабована без ускладнень. Як наслідок, необхідною умовою було лише збільшення площі фільтру. Стерилізаційна фільтрація була охарактеризована як надійний і відтворюваний метод і була апробована як у варіанті фільтрації під вакуумом для пілотного масштабу, так і у вигляді фільтрації під тиском при промисловому виробництві.

При апробації технології ліофілізації розлив проводився у віали ємністю 2 мл з темного скла. Перевагою даних віал було широке горло, яке становило не менше 70 % просвіту в порівнянні з шириною віал і плоске дно, що забезпечує щільний контакт з полицями ліофільної сушки.

Була показана можливість ліофільного висушування ліпосом без колапсу. У ході фармрозробки був проведений експеримент з оптимізації кріопротекторів і технологічних параметрів процесу ліофілізації. При трансфері технології як на пілотний масштаб, так і на промислове виробництво була необхідна корекція технологічних параметрів процесу, таких як загальний час сушіння і час вторинного сушіння, що пов'язано з адаптацією технології під різні завантаження ліофілізаційного обладнання.

На всіх етапах технології найбільш важливим є контроль якості продукту, що отримується, і розуміння керованості технологічного процесу. Це досягається шляхом першочергового трансферу і апробації методик контролю якості вихідних компонентів, проміжних продуктів і готової лікарської форми. Так, на кожному етапі, починаючи від змішування компонентів, нами проводився контроль кількісного вмісту активної субстанції, відстежувалася динаміка зростання домішок, в тому числі і домішок ліпідів, при цьому технологічний процес корегувався з таким розрахунком, щоб кількість домішок знаходилося в допустимих межах. На кожному етапі після формування ліпосом відстежувалися розміри наночастинок і ступінь інкапсуляції в них активної речовини. На етапі готового лікарського засобу проводився контроль у відповідності з усіма пунктами специфікації, в тому числі і контроль залишкових органічних розчинників.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Проаналізовані основні варіанти трансферу технології протягом життєвого циклу готової лікарської форми.
2. Розглянуті особливості трансферу і масштабізації технології виготовлення нанорозмірних ліпосомальних форм, зокрема отримання ліпідної плівки, екструзія при високому тиску, ультрафільтрація, стерилізуюча фільтрація і ліофільна сушка.

Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Pharmaceutical development Q8(R2). – 2009. – Available at : https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf
2. Береговых, В. В. Перенос технологий при создании производства лекарственного средства / В. В. Береговых, О. Р. Спицкий // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – № 12. – С. 49–57.
3. Резцов, Е. Трансфер технологий в фармацевтической отрасли / Е. Резцов, В. Могилюк, Д. Рябко // Фармац. отрасль. – 2010. – №. 2. – С. 49–52.
4. ISPE Good practice guide. Technology transfer. – Tampa, FL, International Society for Pharmaceutical Engineering, 2003.
5. Барышников, А. Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов / А. Ю. Барышников // Актуальные вопросы онкологии. Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–31.
6. Nichols, J. W. EPR : Evidence and fallacy / J. W. Nichols, Y. H. Bae // J. of Controlled Release. – 2014. – Vol. 190. – P.451–464. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.03.057
7. Monteiro, N. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine / N. Monteiro, A. Martins, R. L. Reis // J. R. Soc. Interface. – 2014. – Vol. 11. – P. 101–108.
8. Fan, Y. Development of liposomal formulations : From concept to clinical investigations / Y. Fan, Q. Zhang // Asian J. of Pharmac. Sci. – 2013. – Vol. 8, Issue 2. – P. 81–87. doi: 10.1016/j.ajps.2013.07.010
9. Liposomal Doxorubicin Market Size, Share / Industry Report. – 2016. – Available at: https://www.grandviewresearch.com/industry–analysis/liposomal–doxorubicin–market

ISSN 2311-1127 (Print)
ISSN 2519-8807 (Online)

10. Kalepu, S. Insoluble drug delivery strategies : review of recent advances and business prospects / S. Kalepu, V. Nekkanti // Acta Pharmac. Sinica B. – 2015. – Vol. 5, Issue 5. – P.442–453. doi: 10.1016/j.apsb.2015.07.003
11. Efficacy of treatment with irinotecan and oxaliplatin combination in FU–resistant metastatic colorectal cancer patients / E. Bajetta et al. // Oncol. – 2004. – Vol. 66, Issue 2. – P. 132–137. doi: 10.1159/000077439
12. Стадниченко, А. В. Разработка и валидация методики определения степени инкапсуляции иринотекана гидрохлорида в липосомы / А. В. Стадниченко, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец // Биофармац. журн. – 2015. – Т. 7, № 1. – С. 53–55.

REFERENCES

1. *Pharmaceutical development Q8(R2).* (2009). Available at: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf
2. Beregovykh, V. V., Spitckii, O. P. (2013). *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditcinskikh Nauk, 12,* 49–57.
3. Reztcov, E., Mogiliuk, V., Riabko, D. (2010). *Farmatcevticheskaia otrasl, 2,* 49–52.
4. *ISPE Good practice guide. Technology transfer.* (2003). Tampa, FL, International Society for Pharmaceutical Engineering.
5. Baryshnikov, A. Yu. (2012). *Aktualnye voprosy onkologii. Vestnik RAMN, 3,* 23–31.
6. Nichols, J. W., Bae, Y. H. (2014). EPR: Evidence and fallacy. *Journal of Controlled Release, 190,* 451–464. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.03.057
7. Monteiro, N., Martins, A., Reis, R. L. (2014). Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J. R. Soc. Interface, 11,* 101–108.
8. Fan, Y., Zhang, Q. (2013). Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 8 (2),* 81–87. doi: 10.1016/j.ajps.2013.07.010
9. Liposomal Doxorubicin Market Size, Share (2016). *Industry Report.* Available at: https://www.grandviewresearch.com/industry–analysis/liposomal–doxorubicin–market
10. Kalepu, S., Nekkanti, V. (2015). Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B, 5 (5),* 442–453. doi: 10.1016/j.apsb.2015.07.003
11. Bajetta, E., Beretta, E., Di Bartolomeo, M., Cortinovis, D., Ferrario, E., Dognini, G., Buzzoni, R. (2004). Efficacy of Treatment with Irinotecan and Oxaliplatin Combination in FU–Resistant Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Oncology, 66 (2),* 132–137. doi: 10.1159/000077439
12. Stadnichenko, A. V., Krasnopolskii, Yu. M., Shvetc, V. I. (2015). *Biofarmatcevticheskii zhurnal, 7 (1),* 53–55.

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
Тел. +38 (098) 254–96–06. E-mail: alstn31124@gmail.com.
Національний фармацевтичний університет
Стадніченко О. В. (ORCID – http://orcid.org/0000-0003-3450-3899)
Краснопольский Ю. М. (ORCID – http://orcid.org/0000-0003-3469-5827)
Ярних Т. Г. (ORCID – http://orcid.org/0000-0001-8496-1578)

Надійшла до редакції 22.02.2018 р.

ISSN 2311-1127 (Print)
ISSN 2519-8807 (Online)