

Рекомендована д. фармац. наук, проф. Д. І. Дмитрієвським
УДК 615.071: 615.465.1
DOI 10.11603/2312-0967.2018.1.8612

ТЕХНОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ ВИРОБНИЦТВА ЛІПОСОМ З ОКСАЛІПЛАТИНОМ

© О. В. Стадніченко¹, Ю. М. Краснопольський², Т. Г. Ярних¹

Національний фармацевтичний університет¹, Харків

Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»², Харків
alstn31124@gmail.com

Мета роботи. На основі експерименту запропонувати науково обґрунтовану технологію виробництва ліпосомальної форми оксаліплатину. Провести аналіз проміжних продуктів, визначити контрольні точки.

Матеріали і методи. Для виготовлення ліпосом використовували яєчний фосфатидилхолін виробництва Lipoid (Німеччина). Дипальмітоїлфосфатидилгліцерин, холестерин, розчинники використовували виробництва фірми Sigma-Aldrich (США). Ліпідну плівку отримували на роторному випарнику Buchi 210. Для гомогенізації використовували метод екструзії при високому тиску. Процес ліофілізації здійснювали на обладнанні Quarco (КНР).

Результати й обговорення. Розроблено дослідно-промислово технологію отримання ліпосомальної форми оксаліплатину. Створення повноцінної технології вимагало вивчення колоїдних властивостей гетерогенної лікарської наносистеми, особливо на етапі регідратації, параметрів ліофілізації, валідації методик контролю ступеня інкапсуляції оксаліплатину в ліпосоми, валідації кількісного визначення і визначення сторонніх домішок.

Висновки. Запропоновано нову, оригінальну технологію отримання ліпосомальної форми оксаліплатину. Технологію апробовано на серіях препарату для проведення доклінічних досліджень.

Ключові слова: оксаліплатин; ліпосоми; фармацевтична розробка; технологія; хроматографія; ліофілізація.

Вступ. У сучасній фармацевтичній промисловості спостерігається зростання попиту на високотехнологічні ефективні лікарські засоби. Можна говорити про створення нової галузі фармації, яка вивчає препарати, розміри яких знаходяться в нанодіапазоні [1]. Зростання інтересу до наноструктурованих препаратів, зокрема ліпосом, зумовлений виходом на новий рівень терапії й потенційною можливістю корекції недоліків вже існуючих препаратів [2, 3].

За минулі 10 років з'явилися десятки нових, ефективних терапевтичних засобів [4, 5]. Прикладом таких препаратів можуть слугувати «Visudyne» – ліпосомальна форма вертепорфірину, «Doxil» – ліпосомальна форма доксорубіцину, «Marqibo» – ліпосомальна форма вінкристину, «Onivyde» – ліпосомальна форма іринотекану, «AmBisome» – ліпосомальна форма амфотерецину В.

Особливо можна виділити ліпосоми як носій протипухлинних препаратів. Перспектива цих лікарських засобів зумовлюється можливістю зниження токсичності цитостатичних препаратів – основної перешкоди для повного розкриття їх терапевтичних можливостей. Це здійснюється не тільки за рахунок пасивного накопичення ліпосом в онкологічно змінених тканинах за рахунок EPR (Enhanced permeability and retention effect), але й за рахунок можливості застосування активних таргетних технологій і використання онкогенних маркерів на зовнішній поверхні ліпосом [6].

Оксаліплатин є аналогом цисплатину, він схвалений до медичного застосування з 1996 р. Молекула оксаліплатину складається з центрального атома платини, оточеного двома лігандами – оксалатом і діаміноциклогексаном у транс-положенні відносно один одного. Терапевтична активність зумовлена взаємодією з ДНК і утворенням внутрішньоспиральних та міжспиральних зшивок. Ще одним фактором, що зумовлює застосування оксаліплатину, є його активність щодо пухлин, резистентних до цисплатину і карбоплатину. Оксаліплатин ефективний як в одиначному застосуванні, так й у комбінації з іншими цитостатиками. Відзначається синергізм дії при одночасному застосуванні з іринотеканом [7].

Технології отримання ліпосомальної форми оксаліплатину були досліджені, в основному, на лабораторному рівні в обсягах до 10 мл без застосування обладнання промислового масштабу [8]. Ефективним способом отримання повноцінної та якісної технології отримання нанобіотехнологічного лікарського засобу є плавна, ступінчаста масштабізація технологічного процесу [9]. Можна стверджувати, що між лабораторною технологією і дослідно-промисловою апробацією необхідна стадія відпрацювання технології в лабораторії, але із застосуванням обладнання, що працює на загальних принципах із промисловим. У ході таких робіт збирається статистична та практична інформація щодо перебігу різних режимів технологічного процесу. Така робота була проведена

і були отримані дані, необхідні для переходу на дослідно-промисловий рівень [10–13].

Мета роботи – на основі проведеного експерименту запропонувати науково обґрунтовану технологію виробництва ліпосомальної форми оксаліплатину. Провести аналіз одержуваних проміжних продуктів, визначити контрольні точки.

Матеріали і методи. Для виготовлення ліпосом використовували яєчний фосфатидилхолін виробництва Lipoid (Німеччина). Дипальмітоїлфосфатидилгліцерин, холестерин, розчинники використовували 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, яку проводили на установці Microfluidiser M-110P (Microfluidics, США). Розмір ліпосом визначали при 20 °С на приладі Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобританія). Рівень інкапсуляції оксаліплатину в ліпосомі, концентрацію оксаліплатину і вміст сторонніх домішок контролювали методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на хроматографі Shimadzu LC-20 (Японія). Процес ліофілізації здійснювали на обладнанні Quarco (КНР).

Результати й обговорення. Структура молекули оксаліплатину зумовлює особливості вибору допоміжних речовин у препараті. Так, наявність комплексоактивного атома платини виключає використання солей і буферних розчинів. При роботі з препаратом як розчинник використовується вода для ін'єкцій.

При дослідно-промисловому освоєнні технології виникає перелік невизначеностей, які потребують практичної апробації та вивчення. До таких питань можна віднести:

- перенесення моделі інкапсуляції з лабораторних досліджень, що реалізується за фармацевтичної розробки, до пілотних або дослідно-промислових;
- підтвердження стабільності екструзійного етапу технології, оптимізація його параметрів під великі обсяги;
- вивчення колоїдних властивостей гетерогенної лікарської нано-системи, особливо на етапі регідратації;
- вивчення параметрів ліофілізації готового препарату при переході до більшого масштабу;
- валідація методик контролю ступеня інкапсуляції оксаліплатину в ліпосомі, валідація кількісного визначення і визначення сторонніх домішок.

Застосування ліпосомальної платформи має незаперечну перевагу перед застосуванням інших, більш жорстких наночастинок. Це можливість проведення стерильної фільтрації й виключення необхідності реалізації технології в асептичних умовах, що позитивно позначається на освоєнні випуску і майбутньої вартості готового продукту.

На рисунку 1 представлено схематичне зображення технологічного процесу отримання ліпосомальної форми оксаліплатину.

Дослідження ліпідної мембрани показало, що оптимальним, з точки зору інкапсуляції оксаліплатину в ліпосомі, є наступний ліпідний склад: фосфатидилхолін / холестерин / дипальмітоїлфосфатидилгліцерин. У ході фармацевтичної розробки і оптимізації складу мембрани співвідношення фосфатидилхолін / холестерин / дипальмітоїлфосфатидилгліцерин зі значення 70/20/10 було змінено до співвідношення 50:20:30. Було зменшено вміст нейтрального ліпиду фосфатидилхоліну і збільшено вміст зарядженого ліпиду дипальмітоїлфосфатидилгліцерину, що поліпшило інкапсуляцію активної речовини. Такий склад забезпечує захоплення оксаліплатину за двома механізмами – ємнісне захоплення при гідратації ліпідної плівки розчином оксаліплатину і сорбційний механізм, зумовлений наявністю в мембрані зарядженого модифікатора – дипальмітоїлфосфатидилгліцерину. Корекція складу мембрани не вплинула на розмір ліпосом.

На стадії 1 технології відбувається отримання ліпідної плівки шляхом розчинення ліпідів у суміші хлороформ – етанол, фільтрація через фільтр із розмірами пор 0,22 мкм і видалення розчинників на роторному випарнику під вакуумом. На стадії здійснюється контроль повноти розчинення ліпідів і перевірка їх концентрації в розчині.

На стадії 2 здійснюється гідратація отриманої ліпідної плівки розчином оксаліплатину в воді для ін'єкцій і отримання грубої емульсії. Концентрація оксаліплатину на цьому етапі становить 4 мг/мл, а ліпідів – 40 мг/мл. Підхід із використанням концентрованого в два рази, порівняно з готовим препаратом, розчину оксаліплатину і збільшений в два рази вміст ліпідів, покращує показники інкапсуляції. На цьому етапі здійснюється контроль концентрації оксаліплатину в розчині.

На стадії 3 здійснюється гомогенізація і стандартизація за розміром грубої емульсії ліпідів. При цьому формуються ліпосомі з розміром (100±20) нм. Екструзія проходить при режимі 1500 атм і обов'язковому охолодженні емульсії до 20 °С. Було показано, що тиск 1500 атм не призводить до утворення великих агрегатів, не впливає на хімічну структуру оксаліплатину і не сприяє утворенню сторонніх домішок. На стадії здійснюється контроль розміру часток при кожному циклі екструзії, концентрації і сторонніх домішок в оксаліплатині, параметрів режиму екструзії.

На стадії 4 технологічного процесу до емульсії ліпосом додається розчин криопротектора трегалози дигідрату. При цьому контролюється розмір часток, ступінь інкапсуляції оксаліплатину, а також кількість і концентрація розчину криопротектора.

Стадія 5 перебігає в асептичних умовах. При цьому здійснюється стерилізуюча фільтрація через поліетилсульфоновий мембранний фільтр із розміром

СИРОВИНА І НАПІВПРОДУКТИ	НАЗВА ОПЕРАЦІЇ	АНАЛІТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ
Ліпіди, етанол, хлороформ	СТАДІЯ 1 Отримання ліпідної плівки	Концентрація ліпідів, повнота розчинення ліпідів
Плівка ліпідів, розчин оксалиплатину	СТАДІЯ 2 Гідратація плівки розчином оксалиплатину. Отримання грубої емульсії	Концентрація оксалиплатину в розчині
Груба емульсія ліпідів з оксалиплатином	СТАДІЯ 3 Гомогенізація грубої емульсії методом екструзії	Розмір часток, параметри екструзії, концентрація і сторонні домішки оксалиплатину
Емульсія ліпосом з оксалиплатином, розчин кріопротектора (трегалози дигідрат)	СТАДІЯ 4 Додавання розчину кріопротектора	Розмір часток, ступінь інкапсуляції, кількість і концентрація розчину кріопротектора
Емульсія ліпосом з оксалиплатином і кріопротектором, флакони, пробки	СТАДІЯ 5 Стерилізуюча фільтрація в асептичних умовах. Розлив. Передзакупорення пробками	Розмір часток, ступінь інкапсуляції, концентрація і сторонні домішки оксалиплатину
Емульсія ліпосом з оксалиплатином, розлита у флакони та передзакупорена	СТАДІЯ 6 Ліофільна сушка. Дозакупорювання пробками	Режим ліофільної сушки, вміст залишкової води у ліофілізаті
Ліофільно висушені ліпосоми у дозакупорених флаконах	СТАДІЯ 7 Завальцювання флаконів алюмінієвими ковпачками	Якість завальцювання
Завальцьовані флакони	СТАДІЯ 8 Миття флаконів. Сушка флаконів стиснутим повітрям	Якість миття, якість сушки
Вимиті, сухі флакони з ліофілізатом	СТАДІЯ 9 Маркування флаконів	Якість маркування, відповідність назви препарату, дати випуску, серії
Марковані флакони з ліофілізатом, вторинна упаковка	СТАДІЯ 10 Вторинне пакування, вкладання інструкції	Якість вторинної упаковки, відповідність назви препарату, дати випуску, серії, інструкції
Марковані, упаковані флакони з ліофілізатом та інструкцією	СТАДІЯ 11 Транспортування готової продукції на склад карантину	Повний контроль якості готової продукції

Рис. 1. Технологічна схема виробництва ліпосомального оксалиплатину.

пор 0,22 мкм. Одночасно відбувається розлив у флакони, які пройшли стерилізацію і депірогенізацію. Розлитий препарат закупорюється підготовленими пробками. На стадії, після розливу, контролюється розмір часток емульсії, ступінь інкапсуляції, вміст і сторонні домішки оксалиплатину. Так само здійснюється відбір проб на контроль стерильності.

Стадія 6 – ліофільна сушка і дозакупорювання відбувається у камері ліофілізаційної машини. Флакони в асептичних умовах поміщаються у попередньо охолоджену камеру машини. Камера герметизується, цикл ліофілізації займає 2040 хв або 34 години. В кінці процесу флакони дозакупорюються під вакуумом за допомогою полиць машини, що опускаються. На

стадії контролюється режим сушіння і вміст залишкової вологи у готовому продукті.

Стадія 7 передбачає завальцювання флаконів алюмінієвими ковпачками з паралельним контролем якості завальцювання. На стадії 8 флакони миють і сушать стисненим повітрям, контролюють якість мийки і якість сушіння. Стадія 9 і стадія 10 представляють собою маркування флаконів та вторинну упаковку із вкладанням інструкції із застосування. На стадії здійснюється контроль маркування, відповідності назви препарату, дати випуску, номера серії, якості упаковки і відповідність інструкції оригінал-макету. На стадії 11 здійснюється транспортування готової продукції на склад карантинного зберігання і проводиться повний контроль якості готової продукції.

Варто зазначити, що технологія вимагає одночасного використання при контролі двох ВЕРХ-систем, одна із яких налаштована на контроль ступеня інкапсуляції, а інша – на контроль кількісного вмісту оксалиплатину та його сторонніх домішок.

Технологію було розроблено на етапі фармацевтичної розробки і апробовано в лабораторному і дослідно-промисловому масштабах. Проведено валідацію методик контролю якості. У ході подальших робіт, після проведення повної валідації технологічного процесу, планується оптимізація кількості контрольних точок для забезпечення стабільної якості продукції, що випускається. Запропоновану технологію використовували для отримання зразків препарату для доклінічних досліджень. За результатами доклінічних досліджень було отримано дозвіл на проведення першої фази клінічних випробувань препарату.

Висновки. 1. Запропоновано нову, оригінальну технологію отримання ліпосомальної форми оксалиплатину. Вивчено технологічні режими та підбрано контрольні точки.

2. Технологія апробована на серіях препарату, що використовуються для проведення доклінічних досліджень. Підтверджено стабільність і відтворюваність технології.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРОИЗВОДСТВА ЛИПОСОМ С ОКСАЛИПЛАТИНОМ

А. В. Стадниченко¹, Ю. М. Краснопольский², Т. Г. Ярных¹

Национальный фармацевтический университет¹, Харьков

*Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт»², Харьков
alstn31124@gmail.com*

Цель работы. На основе эксперимента предложить научно обоснованную технологию производства липосомальной формы оксалиплатина. Провести анализ промежуточных продуктов, определить контрольные точки.

Материалы и методы. Для изготовления липосом использовали яичный фосфатидилхолин производства Lipoid (Германия). Дипальмитоилфосфатидилглицерин, холестерин, растворители использовали производства фирмы Sigma-Aldrich (США). Липидную пленку получали на роторном испарителе Buchi 210. Для гомогенизации использовали метод экструзии при высоком давлении. Процесс лиофилизации осуществляли на оборудовании Quarco (КНР).

Результаты и обсуждение. Была разработана опытно-промышленная технология получения липосомальной формы оксалиплатина. Создание полноценной технологии требовало изучения коллоидных свойств гетерогенной лекарственной наносистемы, особенно на этапе регидратации, параметров лиофилизации, валидации методик контроля степени инкапсуляции оксалиплатина в липосомы, валидации количественного определения и определения посторонних примесей.

Выводы. Предложена новая, оригинальная технология получения липосомальной формы оксалиплатина. Технология апробирована на сериях препарата, используемых для проведения доклинических исследований.

Ключевые слова: оксалиплатин; липосомы; фармацевтическая разработка; технология; хроматография; лиофилизация.

TECHNOLOGICAL PARAMETERS OF PRODUCTION OF LIPOSOMES WITH OXALIPLATIN

A. V. Stadnichenko¹, Y. M. Krasnopolsky², T. G. Yarnykh¹

National University of Pharmacy¹, Kharkiv

*National Technical University "Kharkiv Polytechnic Institute"², Kharkiv
alstn31124@gmail.com*

The development of medicines of a nanoscale diapason opens a new trend in the modern pharmaceutical industry. Reducing the toxicity of known cytotoxic agents is one of the advantages of the liposomal biotechnology platform. **The**

aim of the work is to offer scientifically grounded technology of production of liposomal form of oxaliplatin based on the experiment. To analyze intermediate products, define control points.

Materials and Methods. Egg phosphatidylcholine produced by Lipoid, Germany was used to make liposomes. Dipalmitoylphosphatidylglycerin, cholesterol, solvents used by the company Sigma-Aldrich, USA. The lipid film was obtained on a rotary evaporator Buchi 210. For homogenization, an extrusion method at high pressure was used. The lyophilization process was carried out on Quarco equipment (PRC).

Results and Discussion. The experimental industrial technology of obtaining the liposomal form of oxaliplatin was developed. The development of a full-fledged technology requires the study of colloidal properties of a heterogeneous nano-system, especially at the rehydration stage, lyophilization parameters, validation of control methods for the encapsulation of oxaliplatin into liposomes, validation of quantitative determination and determination of impurities.

Conclusions. A new, original technology and control points for obtaining liposomal form of oxaliplatin are proposed. The technology has been tested on batches of preparations, used for preclinical studies.

Key words: oxaliplatin; liposomes; pharmaceutical development; technology; chromatography; lyophilization.

Список літератури

1. Фостер Л. Нанотехнологии. Наука, инновации и возможности / Л. Фостер // Техносфера. – 2006. – № 1. – С. 2461.
2. Medical University of Vienna. Drug delivery using liposomes. ScienceDaily. – 2017. <https://www.sciencedaily.com/releases/2017/10/171023180627.htm>.
3. Liposomes and Nanotechnology in Drug Development: Focus On Pancreatic Cancer / A. Malik, J. Wei, A. Raheem [et al.] // Journal of Gastroenterology, Pancreatology & Liver Disorders. – 2017. – Vol. 5. – P. 1–10.
4. Recent progress of liposomes in nanomedicine / L. Hosta-Rigau, P. Schattling, B. Teo [et. al.] // Journal of Materials Chemistry B. – 2014. – Vol. 39. – P. 6686–6691.
5. Prospective clinical applications of nanosized drugs / Y. M. Krasnopolskii, V. Y. Balabanyan, D. L. Shobolov [et al.] // Russian J. of General Chemistry. – 2013. – Vol. 83, № 12. – P. 2524–2540.
6. Dai Z. Liposomal nanotechnology for cancer theranostics / Z. Dai, X. Yue // Curr. Med. Chem. – 2017. – Vol. 24. – P 527–536.
7. Bartolomeo M. D. Capecitabine, oxaliplatin and irinotecan in combination, with bevacizumab (COI-B regimen) as first-line treatment of patients with advanced colorectal cancer. An Italian Trials of Medical Oncology phase II study / M. D. Bartolomeo, A. Ciarlo // European Journal of Cancer. – 2015. – Vol. 51. – P. 473–481.
8. Стадниченко А. В. Некоторые аспекты получения липосомальной формы оксалиплатина / А. В. Стадниченко, Ю. М. Краснополяский, В. И. Швец // Тонкие химические технологии. – 2015. – Т. 10, № 1. – С. 60–65.
9. Краснополяский Ю. М. Исследование факторов риска при производстве липосомальных лекарственных препаратов / Ю. М. Краснополяский, А. С. Григорьева, Н. Ф. Конахович // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – № 5 (24). – С. 174–175.
10. Stadnichenko A. V. The study of the lipid membrane charge effect when creating liposomes with oxaliplatin / A. V. Stadnichenko, Y. M. Krasnopolsky, T. G. Yarnykh // News of pharmacy. – 2016. – Vol. 4 (88). – P. 34–37.
11. Stadnichenko A. V. Standardization of Extrusion Parameters during Liposomal Oxaliplatin Creation / A. V. Stadnichenko, Y. M. Krasnopolsky, T. G. Yarnykh // Research J. Pharm. and Tech. – 2017. – Vol. 10 (3). – P.785–788.
12. Стадниченко А. В. Изучение факторов, влияющих на стабильность липосом при регидратации / А. В. Стадниченко, Ю. М. Краснополяский, Т. Г. Ярных // Рецепт. – 2017. – № 2 (20). – С. 146–153.
13. Стадниченко А. В. Исследование окисленности липидов при изготовлении липосом с цитостатиками / А. В. Стадниченко, Ю. М. Краснополяский, Т. Г. Ярных // Вестник фармации. – 2017. – № 3. – С. 29–34.

References

1. Foster L. [Nanotechnology. Science, innovation and opportunities]. Tehnosfera 2006; 1: 2461. Russian.
2. Medical University of Vienna. Drug delivery using liposomes. ScienceDaily. – 2017. <https://www.sciencedaily.com/releases/2017/10/171023180627.htm>.
3. Malik A, Wei J, Raheem A. [Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on pancreatic cancer]. Journal of Gastroenterology, Pancreatology & Liver Disorders. 2017;5: 1-10.
4. Hosta-Rigau L, Schattling P, Teo B. [Recent progress of liposomes in nanomedicine]. Journal of Materials Chemistry 2014;39: 6686-91.
5. Krasnopolskii YM, Balabanyan VY, Shobolov DL. [Prospective clinical applications of nanosized drugs]. Russian J. of General Chemistry 2013;83(12): 2524-40. Russian.
6. Dai Z, Yue X. [Liposomal nanotechnology for cancer theranostics]. Curr. Med. Chem. 2017;24: 527-36.
7. Bartolomeo MD, Ciarlo A. [Capecitabine, oxaliplatin and irinotecan in combination, with bevacizumab (COI-B regimen) as first-line treatment of patients with advanced colorectal cancer. An Italian Trials of Medical Oncology phase II study]. European Journal of Cancer 2015;51: 473-81.
8. Stadnichenko AV, Krasnopolskiy YuM, Shvets VI. [Some aspects of the preparation of liposomal form of oxaliplatin]. Tonkie khimicheskie tekhnologii 2015;10(1): 60-5. Russian.

9. Krasnopolskiy YuM, Grigoreva AS, Konahovich NF. [Investigation of risk factors in the manufacture of liposomal drugs]. Farmakolohiia ta likarska toksykolohiia. 2011;5(24): 174-5. Russian.
10. Stadnichenko AV, Krasnopolsky YM, Yarnykh TG. [The study of the lipid membrane charge effect when creating liposomes with oxaliplatin]. News of Pharmacy 2016;4(88): 34-7.
11. Stadnichenko AV, Krasnopolsky YM, Yarnykh TG. [Standardization of extrusion parameters during liposomal oxaliplatin creation]. Research J. Pharm. and Tech. 2017;10(3): 785-8.
12. Stadnichenko AV, Krasnopolskiy YuM, Yarnykh TG. [Investigation of factors affecting the stability of liposomes during rehydration]. Retsept. 2017;2(20): 146-53. Russian.
13. Stadnichenko AV, Krasnopolskiy YuM, Yarnykh TG. [The study of lipid oxidation in the manufacture of liposomes with cytostatics]. Vestnik farmatsii 2017;3: 29-34. Russian.

Отримано 14.12.2017