

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 612.015.014

ОСОБЕННОСТИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ НАНОЛИПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА

В.Г. Пушкар[@], старший научный сотрудник, К.А. Ротов, заведующий лабораторией, И.В. Новицкая, заведующая отделом, Е.А. Снатенков, ведущий научный сотрудник

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
Волгоград, 400131 Россия

[@] Автор для переписки, e-mail: gunner50@mail.ru

Изучены условия лиофилизации нанолипосом с инкапсулированным гентамицином (липосомальный гентамицин). Предложен мягкий технологический режим лиофилизации по разработанной программе автоматического управления параметрами. Предлагаемая программа состоит из 10 шагов для достижения медленного и равномерного повышения температуры замороженного продукта. Для устранения неблагоприятных факторов в программе, предусмотрено плавное увеличение температуры от -70°C (температура замораживания) до комнатной температуры (22±2)°C и постепенное снижение вакуума от 30 до 10 Па без скачков и перепадов. Точный контроль давления в камере обеспечивается системой автоматического регулирования вакуума, входящего в комплект поставки оборудования. После регидратации лиофилизированные препараты полностью восстановили свою первоначальную форму и свойства.

Ключевые слова: лиофилизация, нанолипосомальные препараты, лекарственные средства, криопротекторы, температура, регулирование вакуума.

FEATURES OF LYOPHILIZATION OF A NANOLIPOSOMAL DRUG

V.G. Pushkar[@], K.A. Rotov, I.V. Novitskaya, E.A. Snatenkov

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Supervision Service for Consumer Rights
Protection and People's Welfare of the Russian Federation, Volgograd, 400131 Russia

[@]Corresponding author e-mail: gunner50@mail.ru

The conditions of lyophilization of nanoliposomes with encapsulated gentamicin (liposomal gentamicin) were studied. A mode of its safe lyophilization was suggested. A program for eliminating adverse factors was developed. It includes smooth increase of temperature from -70°C (freezing temperature) to room temperature (22±2)°C and gradual reduction of vacuum from 30 to 10 Pa without jumps and drops. The characteristics of the labile nanoliposomal drugs were not lost. The suggested program consisted of 10 steps allowing computer control to attain a slow and uniform increase in the temperature of the frozen product. The precise control of pressure in the chamber was provided by a system of automatic regulation of vacuum supplied with the equipment. After the rehydration the lyophilized preparations completely restored their original shape and properties.

Keywords: lyophilization, nanoliposomes, drugs, cryoprotectants, temperature, vacuum regulation.

Введение

С появлением лекарственных форм на основе липосом открылись новые возможности в использовании фармакологических средств, способных в силу их физико-химических свойств накапливаться в эффекторных тканях. Липосомальные препараты отмечены в XIII издании Государственной фармакопеи, вступающем в силу согласно Приказа Министерства

здравоохранения Российской Федерации № 771^[1] с 1 января 2016 г.

Терапевтическое использование липосом способствует избирательной доставке лекарственных средств в очаги инфекций, а также защите инкапсулированного препарата от действия ферментов

^[1]Приказ Министерства здравоохранения РФ № 771 от 29.10.2015 г. <http://zdravalt.ru/jdownloads/Fedlaws/771.pdf>

детоксикации, что позволяет увеличить период его полураспада, снизить суточную дозу введения и повысить переносимость антибиотика. Таким образом, становится возможным значительно увеличить эффективность лекарственного средства и адаптировать сроки госпитализации больного [1]. При этом среди широко используемых до настоящего времени и одним из наиболее востребованных методов лечения больных остается антибиотикотерапия, и усовершенствование лекарственных форм антибиотиков является актуальной проблемой отечественного здравоохранения [2, 3].

Настоящая работа посвящена изучению условий лиофилизации нанолипосомального препарата, содержащего инкапсулированный гентамицина сульфат (липосомальный гентамицин). Как известно, гентамицина сульфат относят к антибиотикам аминогликозидного ряда широкого спектра действия, который востребован до настоящего времени при многих инфекциях, включая нозокомиальные. Именно использование гентамицина в липосомальной форме, как нам кажется, представляет особый интерес. При этом получение нанолипосомальной формы гентамицина сульфата в сухом виде, позволяющем как стабилизировать свойства препарата, так и многократно увеличить сроки его хранения вне холодильной цепи, приобретает особую актуальность [4].

Лиофилизация – это технологический процесс, который направлен на высушивание веществ особым образом – из замороженного состояния без перехода в жидкую фазу, что позволяет практически полностью сохранить все основные свойства и активность препаратов даже после их длительного хранения [5].

Для получения лиофилизированных липосомальных форм высокого качества важно уделять внимание способу приготовления липосом, их составу, типу и концентрации криопротектора, а также непосредственно режиму высушивания [6].

Подбор параметров лиофилизации в каждом конкретном случае является сложной задачей, так как процесс связан с изменением агрегатного состояния вещества и напрямую влияет на активность лекарственного средства и возможность его использования после регидратации. Как известно, липосомы представляют собой ограниченные от внешней среды одной или несколькими бислойнными фосфолипидными мембранами сферические везикулы с внутренней водной фазой, которая может содержать биологически активные субстанции. Их реорганизация при лиофильном высушивании, обусловленная кристаллизацией и испарением воды из сферул, тесно связана с необходимостью обеспечения сохранности входящих в состав бислоя мембраны фосфолипидов в жидкокристаллическом состоянии [7].

Целью настоящей работы является усовершенствование технологии получения нанолипосомаль-

ного гентамицина сульфата на заключительном этапе производства, связанном с подбором криопротектора и параметров процесса лиофилизации, для максимально возможного сохранения свойств препарата после сушки и регидратации.

Экспериментальная часть

Для приготовления липосомального гентамицина использовали хроматографически чистые фосфатидилхолин (Харьковский завод бактерийных препаратов (ХТ № 18.3.1097-0500)) и холестерин («Serva», Германия) в мольном соотношении 7:3. Липосомы получали методом выпаривания и обращения фаз. Для этого 56.7 мг смеси липидов (39.7 мг фосфатидилхолина и 17 мг холестерина) растворяли в 3.8 мл хлороформа. Гентамицина сульфат (ОАО «Синтез», Курган, Россия), растворенный в 0.01 М фосфатном буфере (pH 7.2), в объеме 1.5 мл (конечная концентрация антибиотика 150 ед.) добавляли к раствору липидов в органической фазе, и обработкой ультразвуком мощностью 200 Вт с частотой 20 кГц в течение 5 мин достигали образования эмульсии типа «вода в масле». Полученную суспензию переносили в колбу роторного испарителя и при пониженном давлении, поддерживая температуру смеси выше температуры фазового перехода фосфолипидов, полностью удаляли органический растворитель до образования геля. Затем к нему добавляли 5 мл 0.01 М фосфатного буфера (pH 7.2) и встряхивали до образования гомогенной структуры суспензии.

Отделение невключившегося антибиотика проводили центрифугированием при 40000 g в течение 1 ч на центрифуге «Ja-21» фирмы «Beckman» (США).

Количество липосом в 1 мл препарата и их размеры определяли на приборе «Nanotrac Wave» (США) и на электронном микроскопе JEM-100-SX (JEOL, Япония).

Переокисный индекс Клейна (степень окисления липидов липосомальной мембраны) определяли спектрофотометрически [9]. Для этого к препарату липосом (эквивалентно 2 мМ лецитина), эмульгированных в 0.1 М растворе хлористого калия, добавляли 3 мл абс. этилового спирта. Пробы спектрофотометрировали при λ 215 и 233 нм и рассчитывали соотношение A233/A215.

Препарат замораживали и закачивали в морозильной камере при температуре -70°C в течение 18 ч. В качестве криопротекторов использовали 40% раствор сахарозы, а также консервант, содержащий 40% сахарозы и 10% желатина.

Лиофилизацию препарата проводили на установке «COOLSAFE-100-9» (изготовитель «SCANLAF», Дания), в комплектацию которого входят вакуумный насос RZ-1 фирмы «VACUUBRAND», а также ком-

пьютер и цветной принтер для программирования и графической визуализации параметров высушивания. По дополнительному заказу лиофильное оборудование было снабжено блоком автоматического регулирования вакуума фирмы-изготовителя установки («SCANLAF», Дания).

Фотографирование препарата выполняли в ходе микроскопии с помощью электронно-лучевого микроскопа «JEM-100SX» фирмы «JEOL» (Япония) при увеличении $\times 10\,000$.

Результаты и их обсуждение

Известно, что эффективность лиофилизации тесно связана как с особенностями подвергаемых сублимации продуктов, так и с выбором криопротектора и технологическими особенностями лиофилизации – температурным режимом высушивания, его скоростью, глубиной вакуума, а также временем прохождения различных этапов процесса сублимации [10].

В качестве объекта лиофилизации использовали липосомальный гентамицин, который достаточно лабилен из-за наличия наноструктуры – тонкой липидной оболочки. При этом размер везикул не превышал 100 нм, что позволяет рассматривать их как наночастицы [11]. Перекисный индекс Клейна составлял (0.9 ± 0.5) – при том, что для неокисленных липидов его величина не должна превышать 1.0 [12]. Исходное количество липосом, содержащих гентамицина сульфат в 1 мл препарата, составляло $1.0 \cdot 10^5$, рН суспензии соответствовал 7,3.

Однако, как известно, непосредственно предваряющее процесс лиофилизации замораживание продукта неизбежно сопровождается ростом кристаллов образующегося льда и, как следствие, механическим повреждением наночастиц препарата. По данным литературы, температура замораживания вещества перед лиофилизацией не должна превышать его температуру эвтектики, т.е. в среднем быть не выше $-40 \div -60^\circ\text{C}$ [13]. В наших исследованиях был использован низкотемпературный замораживатель с диапазоном температуры $-50 \div -86^\circ\text{C}$ (Ultra-Low Temperature Freezer, MDF-U3286S, «SANYO», Япония), с помощью которого препарат нанолипосом охлаждали до -70°C .

Структурировать биообъекты и, таким образом, предупредить их повреждения в процессе криоконсервирования позволяет добавление в среду высушивания криопротекторов. Обычно используют как взаимодействующие с молекулами воды за счет водородных связей так называемые проникающие (глицерин, диметилсульфоксид и др.), так и непроникающие вещества (олигосахариды сахароза, трегалоза и др., а также высокомолекулярные соединения – поливинилпирролидон, желатин и др.). Считают, что защитный эффект олигосахаридов, как и высокомо-

лекулярных непроникающих соединений, обусловлен их способностью действовать в качестве промежуточной матрицы между отдельными везикулами. Таким образом предотвращается сближение последних, что для липосом, близкий контакт бислоев которых является предпосылкой к мембранному слиянию, несомненно, становится особенно значимым [14].

В наших исследованиях лиофилизации подвергали нанолипосомы с добавлением криопротектора, в качестве которого использовали:

- 1) 40% сахарозу в соотношении с липосомами 3:7;
- 2) 40% сахарозу и 10% желатин в соотношении с липосомами 3:7.

В качестве контроля использовали нативные нанолипосомы без добавления криопротектора.

Оказалось, что в контроле после регидратации большая часть липосом, подвергавшихся сублимации без криопротектора, была разрушена.

Добавление в консервант желатина в наших наблюдениях сопровождалось резким снижением растворимости препарата после высушивания. По-видимому, это может быть связано с полимеризацией желатина, отдельные молекулы которого несоизмеримо крупнее липосомальных наночастиц, и потому у желатина не теряется способность образовывать межмолекулярные перекрестные связи (cross-linking polymerization).

Лиофилизация в среде высушивания, содержащей сахарозу без желатина, позволяла практически полностью сохранить нативные свойства препарата (табл. 1).

Таким образом, использование в качестве криопротектора дисахарида сахарозы обеспечивало эффективную защиту липосомального гентамицина в ходе его лиофилизации.

В процессе лиофилизации особое значение приобретает такое важное свойство вещества, как температура эвтектики (коллапса), которая зависит от природы, состава, концентрации и других характеристик продукта. Чем больше компонентов в системе, подвергаемой высушиванию, тем ниже температура эвтектики смеси. В основном, для иммунобиологических препаратов она находится в диапазоне $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Есть мнение, что для нанолипосом как тонких биологически активных структур особенно важно не нарушать эту температурную границу в ходе лиофилизации до тех пор, пока вся свободная влага не будет удалена из препарата [8].

В начале процесса лиофилизации, когда имеется большое количество несвязанной влаги, температура обусловлена не только степенью предварительного замораживания агента, но и величиной вакуума в камере. При этом испарение воды в замороженном состоянии (сублимация кристаллов льда) под вакуумом сопровождается еще большим снижением тем-

Таблица 1. Влияние различных криопротекторов на эффективность лиофилизации

№ п/п	Криопротектор	Количество липосом в 1 мл препарата:		Растворимость препарата	Целостность структуры липосом
		До лиофилизации	После лиофилизации		
1.	Сахароза 40%	1·10 ⁵	1·10 ⁵	+++	+++
2.	Сахароза 40% + желатин 10%	1·10 ⁵	3·10 ⁴	-	+
3.	Контроль	1·10 ⁵	-	-	-

пературы вещества, и чем выше вакуум, тем сильнее охлаждение препарата. Следует отметить, что условия лиофилизации препаратов на современном оборудовании отличаются от традиционных режимов, применяемых на сублимационных установках предыдущего поколения, возможностью использования глубокого вакуума менее 0.1 мм рт. ст. (≈ 13 Па). Новые технологии позволяют многократно ускорить процесс. Тем не менее, ускоренная сублимация несвязанной влаги после ее полного испарения может вызвать резкий скачок температуры, что приводит к значительной или полной потере свойств высушенных препаратов [6, 7].

В наших исследованиях мы имели возможность наблюдать частичное вспенивание препарата в первые часы сушки из-за наличия глубокого вакуума более 0.15 гПа. Резкий подъем температуры, представленный на графике сушки (рис. 1), сопровождался потерей активности препарата и разрушением липосом после лиофилизации и регидратации.

Таким образом, резкие скачки температуры, возникающие при попытке сократить время высушивания, могут сопровождаться потерей нативных свойств лиофилизированного препарата после его регидратации.

Для устранения неблагоприятных факторов нами была разработана программа, при которой в ходе плавного повышения температуры от -70°C

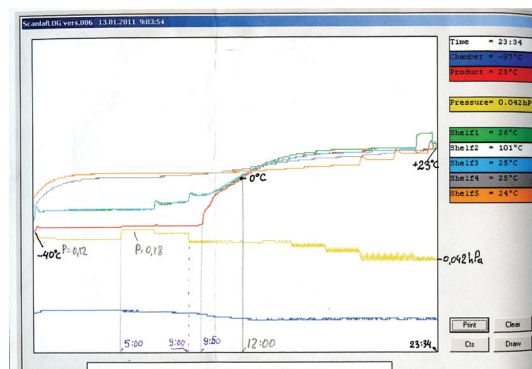


Рис. 1. График производственной сушки (зависимость температуры препарата от времени), сопровождавшейся резким подъемом температуры препарата.

(температура замораживания) до комнатной температуры (22±2)°C и постепенного снижения вакуума от 30 до 10 Па без скачков и перепадов лабильные препараты нанолипосом не теряли своих исходных характеристик.

Предложенная программа включала 10 ступеней, позволяющих под контролем компьютера добиваться медленного и равномерного возрастания температуры замороженного продукта (табл. 2). Точный контроль давления в камере обеспечивала система автоматического регулирования вакуума, входящая в комплект лиофильного оборудования.

Таблица 2. Режим лиофилизации нанолипосомальных препаратов

№ ступени	Продолжительность (ч)	Температура (°C)	Давление (гПа)
1	4.0	-70	0.30
2	2.0	-20	0.25
3	2.0	-15	0.20
4	2.0	-10	0.20
5	2.0	-5	0.20
6	2.0	0	0.20
7	2.0	5	0.15
8	2.0	10	0.15
9	2.0	20	0.15
10	4.0-6.0	25	0.10

Как следует из представленных данных, длительность лиофилизации в целом составляла от 24 до 26 ч, а совместное изменение параметров темпера-

тура-вакуум позволяло обеспечить режим плавного изменения температуры препарата и перехода через 0°C за период около 12 ч.

С целью компенсации явления снижения температуры во время высушивания к полкам в камере лиофильной установки подвели дополнительное тепло. Однако подогрев полок на начальном этапе также может вызвать переход границы сублимации и вскипание влаги даже при низких температурах в рабочей камере, в связи с чем, очевидно, важное значение имеет температурный контроль процесса лиофилизации.

В ходе многократных экспериментов нами был отмечен факт значительного отличия задаваемой температуры полки от температуры самого препарата, что, по-видимому, связано с испарением кристаллов льда, особенно на первых стадиях лиофилизации, когда вещество еще содержит большое количество несвязанной влаги.

Для контроля истинной картины лиофилизации датчик температуры был размещен непосредственно внутри ампулы с препаратом, что позволило с максимальной точностью следить за процессом его лиофилизации.

График лиофилизации препарата по предложенной программе представлен на рис. 2.

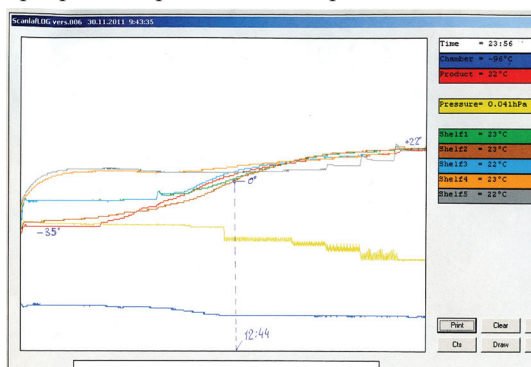


Рис 2. График лиофилизации (зависимость температуры препарата от времени) липосомального гентамицина по предложенной программе.

Представленный режим сушки позволял получать лиофилизированные нанолипосомальные препараты с сохраненными исходными характеристиками – во всех образцах перекисный индекс Клейна составлял 0.9 ± 0.5 ; концентрация гентамицина соответствовала 0.08 г/мл липосом; размер частиц не превышал 100 нм, их форма не изменилась (рис. 3).

Список литературы:

1. Швец В.И., Краснопольский Ю.М. Липосомы в фармации. Продукты нанобиотехнологии // Провизор. 2008. № 3. http://www.provisor.com.ua/archive/2008/N03/lipos_308.php
2. Маякова С. Липосомальные препараты // Вместе против рака. 2015. № 4. http://www.vmpr.ru/index.php?id=242&Itemid=496&option=com_content&view=article
3. Ланцова А.В., Котова Е.А., Санарова Е.В., Полозкова А.П., Барышникова М.А., Оборотова Н.А.

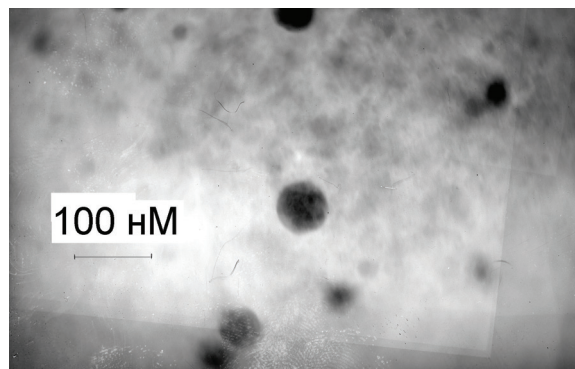


Рис. 3. Микрофотография липосомального гентамицина после лиофилизации и регидратации (электронно-лучевой микроскоп «JEM-101-SX»), увеличение $\times 10\,000$.

Таким образом, снижение интенсивности сублимации позволяет полностью избежать потери активности нанолипосомальных препаратов. Это достигается уменьшением на первоначальном этапе сушки (пока температура не пройдет порог эвтектики) глубины вакуума до $25-30$ Па, далее вакуум можно постепенно увеличивать. Автоматизация этапов лиофилизации позволяет осуществлять контроль за всеми параметрами процесса и обеспечить их плавное регулирование.

Выводы

1. Разработан режим лиофилизации нанолипосом с включенным антибиотиком гентамицином (липосомального гентамицина) на современном сублимационном оборудовании со встроенной системой контроля вакуума с целью увеличения срока хранения образцов и удобства их использования;
2. Для сохранения исходной активности препарата время выхода лиофилизата на 0°C не должно быть менее 12 ч. Оптимальным режимом сублимации для нанолипосом является плавное повышение температуры продукта от -70°C (точка замораживания) до комнатной (22 ± 2) $^\circ\text{C}$ температуры без скачков и перепадов при постепенном снижении вакуума от 30 до 10 Па.

References:

1. Shvets V.I., Krasnopolsky Yu.M. Liposomy v farmacii. Produkty nanobiotehnologii (Liposomes in pharmacy. The products of nanobiotechnology) // Provisor [Pharmacist]. 2008. № 3. http://www.provisor.com.ua/archive/2008/N03/lipos_308.php
2. Mayakova S. Liposomal'nye preparaty (Liposomal preparations) // Vmeste protiv raka (Stand up to cancer). 2015. № 4. http://www.vmpr.ru/index.php?id=242&Itemid=496&option=com_content&view=article
3. Lantsova V.A., Kotova E.A., Sanarova E.V., Polozkova A.P., Baryshnikova M.A., Oborotova N.A.

// Российский биотерапевтический журнал. 2015. Т. 14. № 2. С. 79–84.

4. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В., Ланцова А.В., Оборотова Н.А. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 11 (11). С. 96–112.

5. Шанская А.И., Иванова Р.П., Булушева Е.В., Яковлева Т.Е., Милицина Т.В. Способ получения лиофилизированных липосом: пат. 2144352 Рос. Федерация. заявл. 16.07.1997; опубл. 20.01.2000.

6. Пушкарь В.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Павлова К.А., Степурина А.М. Способ лиофильной сушки эритроцитарного диагностикума: пат. 2476791 Рос. Федерация. № 2011127595/06; заявл. 05.07.2011; опубл. 27.02.2013. Бюл. № 6.

7. Пушкарь В.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Павлова К.А., Степурина А.М. // Вестник Волгоград. гос. мед. университета. 2011. № 4 (40). С. 65–68.

8. Бердоносос С.С., Горелик А.Г. // Химическая промышленность. 1993. № 8. С. 391–398.

9. Klein R.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1970. № 210. P. 486–489.

10. Шалаев Е.Ю., Франкс Ф., Вараксин Н.А., Руквишников М.Ю. Способ лиофильной сушки биопрепарата: пат. 2111426 Рос. Федерация. заявл. 03.11.1995; опубл. 20.05.1998.

11. Пиотровский Л.Б., Кац Е.А. // Экология и жизнь. 2010. № 9. С. 12–21. <http://www.ecolife.ru>.

12. Szoka F., Papahadjopoulos D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. № 9 (75). P. 4194–4198.

13. Семенов Г.В. Вакуумная сублимационная сушка. М.: ДеЛи плюс, 2013. 264 с.

14. Аршинова О.Ю., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 20–24.

// Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal [The Russian Biotherapeutic Journal]. 2015. V. 14. № 2. P. 79–84.

4. Gulyakin I.D., Nikolaeva L.L., Sanarova E.V., Lantsova A.V., Oborotova N.A. // Razrabotka i registratsiya lekarstvennyh sredstv (Development and Registration of Medicines). 2015. № 11 (11). P. 96–112.

5. Shanskaya A.I., Ivanova R.P., Bulusheva E.V., Yakovleva T.E., Militsina T.V. Sposob polucheniya liofilizirovannyh liposom (The method of obtaining freeze-dried liposomes): pat. 2144352 Russian Federation. appl. 16.07.1997; publ. 20.01.2000.

6. Pushkar V.G., Novitskaya I.V., Kulakov M.Ya., Pavlova K.A., Stepurina M.A. Sposob liofil'noy sushki eritrotsitarnogo diagnostikuma (The method of freeze drying erythrocytic antigen): pat. 2476791 Russian Federation. № 2011127595/06; appl. 05.07.2011; publ. 27.02.2013. Bull. № 6.

7. Pushkar V.G., Novitskaya I.V., Kulakov M.Ya., Pavlova K.A., Stepurina M.A. // Vestnik Volgogradskogo gos. med. universiteta [Journal of VSMU]. 2011. № 4 (40). P. 65–68.

8. Berdonosov S.S. Gorelik A.G. // Khimicheskaya promyshlennost' [Chemical Industry]. 1993. № 8. P. 391–398.

9. Klein R.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1970. № 210. P. 486–489.

10. Shalaev E.Yu., Franks F., Varaksin N.A., Rukavishnikov M.Yu. Sposob liofil'noy sushki biopreparata (The method of freeze-drying biologicals): pat. 2111426 Russian Federation. appl. 03.11.1995; publ. 20.05.1998.

11. Piotrovsky L.B., Katz E.A. // Ecology and Life. 2010. № 9. P. 12–21. <http://www.ecolife.ru>.

12. Szoka F., Papahadjopoulos D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. № 9 (75). P. 4194–4198.

13. Semenov G.V. Vakuumnaya sublimatsionnaya sushka (Vacuum freeze-drying). M. DeLi plus, 2013. 264 p.

14. Arshinova O.Yu., Oborotova N.A. Sanarova E.V. // Razrabotka i registratsiya lekarstvennyh sredstv (Development and Registration of Medicines). 2013. № 1(2). P. 20–24.