УДК 615.3

# СОЗДАНИЕ ЛИОФИЛИЗАТА ГК-2 ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИОЛОВ

**Е.В. Блынская[1], С.В. Тишков[1]*, К.В. Алексеев[1], С.В. Минаев[1]**

**Резюме.** В рамках разработки состава и технологии лиофилизированной лекарственной формы с фармацевтической субстанцией (ФС) ГК-2, обладающей нейропротекторной активностью, исследованы модельные составы, технологические свойства при отличающихся температурных режимах производства. В связи с пептидной структурой и низкой стабильностью ФС предложено использование вспомогательных веществ (ВВ), стабилизирующих лекарственную форму (ЛФ) во время цикла лиофилизации (криопротекторы и лиопротекторы). В данном исследовании осуществлён подбор соотношений крио- и лиопротекторов при использовании в качестве криопротектора маннита или сорбита, а в качестве лиопротектора – сахарозы. Модельные составы с различными соотношениями ВВ изучены с помощью оптической микроскопии в поляризованном свете, чтобы продемонстрировать физическое состояние маннита при различных соотношениях ВВ. С помощью функции обобщённой желательности Харрингтона выбран наиболее оптимальный состав, соответствующий необходимым требованиям ГФ XIII и обладающий наиболее приемлемыми технологическими характеристиками и оптимальным технологическим процессом.

**Ключевые слова:** лиофилизат ГК-2 для приготовления раствора для инъекций, криопротектор, маннит, сорбит, лиопротектор.

## CREATION OF LOOPHILISATE OF GK-2 FOR PREPARATION OF SOLUTION FOR INJECTIONS WITH USE OF POLYOLS

**E.V. Blynskaya[1], S.V. Tishkov[1]*, K.V. Alekseyev[1], S.V. Minaev[1]**

**Abstract.** As part of the development of the composition and technology of the lyophilized dosage form with the pharmaceutical substance (FS) GK-2, which possesses neuroprotective activity, model compositions and technological properties are studied with different temperature regimes of production. In connection with the peptide structure and low stability of the FS, the use of excipients stabilizing dosage form during the lyophilization cycle (cryoprotectants and lyoprotectors) was suggested. In this study, we selected the ratios of cryo- and lyoprotectors when using mannitol or sorbitol as a cryoprotectant, and as a lyoprotector for sucrose. Model compositions with different exipients ratios were studied by optical microscopy in polarized light to demonstrate the physical state of mannitol at different ratios of explosives. Using the Harrington generalized desirability function, the most optimal composition is chosen, which meets the requirements of SF XIII and has the most acceptable technological characteristics and optimal technological process.

**Keywords:** lyophilizate GK-2 for solution for injection, cryoprotectant, mannitol, sorbitol, lyoprotektor.

1 – ФГБНУ «Научно исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, Россия, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

1 – Research Zakusov Institute of Pharmacology, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

*** адресат для переписки:**
**E-mail: Sergey-tishkov@ya.ru**

## ВВЕДЕНИЕ

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в отделе химии лекарственных средств (ЛС) под руководством Т.А. Гудашевой синтезирован низкомолекулярный дипептидный миметик 4-й петли NGF – гексаметилендиамид бис-(моносукинил-глутамил-лизина), получивший рабочий шифр ГК-2. В исследованиях *in vitro* и на животных изучено влияние ГК-2 на основные эффекты, вызываемые нативным NGF, – нейропротекторное и дифференцировочное действие. Фармацевтическая субстанция (ФС) ГК-2 проявляет нейропротективную активность [3, 5]. Предполагается предпочтительный инъекционный путь введения при использовании дипептида ГК-2, однако пептидные субстанции обладают низкой устойчивостью в традиционных жидких лекарственных формах (ЛФ), где происходит гидролиз и другие виды деструктивных процессов, окисление, дезаминирование в водной среде. Сроки хранения многих пептидных ЛС, находящихся в жидком виде, не превышают 24–48 ч [1]. Поэтому для пептидных и белковых молекул при создании лекарственных препаратов (ЛП) применяется технология лиофилизации, во время которой происходит удаление растворителя из замороженного материала, при этом не используются высокие температуры, приводящие к необратимой денатурации пептидной структуры [2]. Однако метод лиофилизации имеет ряд недостатков, связанных с физическими процессами, происходящими во время замораживания, первичной сублимации и досушивания, напри-

мер явления сверхконцентрации, кристаллизации или изменения конформации пептида при удалении воды из гидратной оболочки. Поэтому необходимо использовать крио- и лиопротекторы, помимо других видов вспомогательных веществ (ВВ) в технологии лиофилизации для предотвращения нежелательных эффектов на протяжении всего технологического процесса.

Криопротекторы применяют для поддержания стабильности пептидной субстанции преимущественно во время замораживания и частично первичной сублимации, лиопротекторы используются для конформационной устойчивости пептидной субстанции на этапе досушивания [1, 6, 7]. В качестве криопротекторов наиболее часто находят применение полиолы (маннит, сорбит), полимеры, такие как низкомолекулярные поливинилпирроллидоны, а в качестве лиопротекторов в основном сахара (сахароза, лактоза, трегалоза).

Маннит и другие полиолы наиболее распространены среди используемых криопротекторов в технологии лиофилизации из-за своей способности кристаллизоваться во время замораживания и сохранять макроскопическую структуру лиофилизата в широком диапазоне температур. Однако использование полиолов, и в частности маннита, ограничено способностью стабилизировать ФС во время замораживания и частично первичной сублимации, тогда как в течение этапа досушивания необходимо применение лиопротекторов [2, 6]. Поэтому в нашей разработке лиофилизата для парентерального применения использовали комбинации криопротекторов и лиопротектора. В представленном исследовании разработаны модельные составы и технология получения ЛФ лиофилизата для приготовления растворов для инъекций с использованием полиолов в качестве криопротекторов в соединении с лиопротектором для получения лиофилизата, соответствующего требованиям ГФ XIII.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанция: ГК-2 [гексаметиленамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)] (ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Россия) (рисунок 1); вспомогательные вещества, предназначенные для парентерального применения: лиопротектор – сахароза (CompriSugar®, CristalUnion, Франция), криопротекторы – маннит/маннитол (Pearlitol®, Roquette, Франция), сорбитол/сорбит [«Неосорб» (Neosorb®, Roquette, Франция)].

*Используемое оборудование и методики*

- лиофильная сушилка Edwards EF-6;
- методика определения времени растворения (ГФ XIII, ОФС.1.4.1.0010.15 «Порошки»);
- методика определения потери в массе при высушивании (по ГФ XIII, ОФС 1.2.1.0010.15), влагомер Sartorius MA-35;

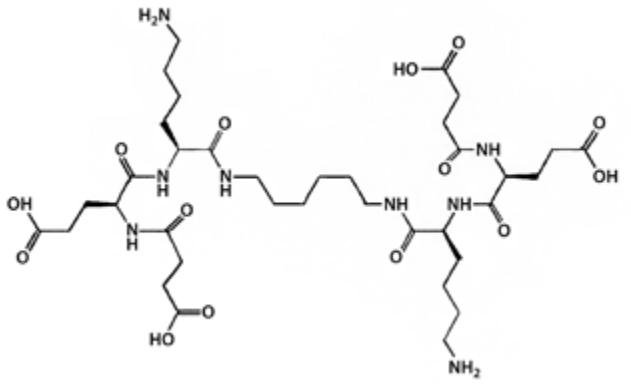

**Рисунок 1. Структурная формула ГК-2**

- методика определения pH (ГФ XIII, ОФС 1.2.1.0004.15), измеритель уровня кислотности (pH) раствора Sartorius Basic Meter PB-11;
- методика определения кристалличности (оптическая микроскопия в поляризованном свете; ГФ XIII, ОФС 1.1.0018.15), поляризационный микроскоп Olympus CX31-P;
- дифференциальная сканирующая калориметрия, дифференциальный сканирующий калориметр STA 449 F1 Jupiter®.

*Методика расчёта обобщённой желательности Харрингтона*

Функция желательности отражает зависимость оценок или показателей желательности ($d$) от безразмерных показателей ($y$), в которые переводят размерные (натуральные) показатели качества. Эта зависимость выражается уравнением:

$$d = e^{-e^{-y}}. \quad (1)$$

Обобщенный показатель желательности ($D_i$) рассчитывается по формулам:

– без учета коэффициентов весомости:

$$D = \sqrt[n]{\prod_i^n d_i}, \quad (2)$$

– с учетом коэффициентов весомости:

$$D' = \prod_{i=1}^{n} (d_i)^{m_i}, \quad (3)$$

где $m_i$ – коэффициент весомости, причем $\sum_{i=1}^{n} m_i$ очность комплексной оценки повышается при учете коэффициентов весомости показателей свойств. Перевести значения размерных (натуральных) показателей

($x$) качества гранулята и модельных таблеток в безразмерные ($y$) при линейной зависимости между ними можно по формуле:

$$y = a_0 + a_1 x \quad (4)$$

и при нелинейной (в частности, квадратичной) связи [4]:

$$y = a_0 + a_1 x + a_2 x^2 \text{ [4].} \quad (5)$$

где $a_0$, $a_1$, $a_2$ – коэффициенты уравнения линейной зависимости между исследуемым показателем и безразмерными значениями.

### *Температурный режим замораживания*

Медленное замораживание: препарат загружали на полку лиофильной сушилки при температуре +24±2 °С, охлаждали полку до –25±2 °С за 1 ч при скорости 0,84 °С/мин. Далее полки охлаждали от –25±2 до –35±2 °С за 1 ч при скорости 0,167 °С/мин, затем понижали температуру полок от –35±2 до –45±2 °С за 1 ч и выдерживали 2 ч. Общее время заморозки – 5 ч и средняя скорость заморозки – 0,383 °С/мин.

Быстрое замораживание: препарат загружали на полку лиофильной сушилки при температуре +24±2 °С, охлаждали полку за 0,5 ч до –25±2 °С, за 1 ч – до –45±2 °С. Выдерживали при данной температуре 2 ч. Общее время заморозки – 3 ч, скорость заморозки – 1,15 °С/мин.

### *Условия проведения лиофилизации*

Флаконы с модельными составами ГК-2, а также крио- и лиопротекторами в различных соотношениях, растворенными в воде для инъекций, устанавливаются на полку камеры сублимационной установки Edwards. Затем герметично закрывают камеру сушки и включают охлаждение полки до –45±2 °С и ведут охлаждение при описанных ранее режимах замораживания до достижения указанной температуры. Процесс заморозки идёт до достижения температуры –45±2 °С примерно 3–5 ч в зависимости от режима замораживания. За 30 мин до начала сублимации начинают охлаждение конденсатора. После охлаждения конденсатора до –60±4 °С включают вакуумный насос. Выключают охлаждение полок, включают нагрев полок до температуры от –33±2 до –35±2 °С в зависимости от состава модельной смеси.

Вакуум в пределах 0,08 мбар достигается в течение 15 мин. Процесс первичной сушки длится приблизительно 20 ч. После завершения этапа первичной сублимации, фиксируемого манометром Пирани, поднимают температуру до +8±2 °С и сушат флаконы при указанной температуре. Процесс вторичной сушки длится 21 ч. По истечении указанного времени выключают нагрев полок, вакуум и конденсатор, выравнивают давление в камере, укупоривают флаконы резиновыми крышками и вынимают флаконы с продуктом. Об окончании процесса досушивания можно судить по изменению давления в камере.

Вакуум создают по завершении этапа замораживания, он инициирует процесс первичной сублимации, когда давление в камере падает ниже 0,01 мбар. В течение первичной сублимации (20 ч) давление в камере равно $(6{,}8–8{,}0)\cdot10^{-2}$ мбар. На этапе досушивания (21 ч) давление опускается примерно до $(5{,}9–6{,}0)\cdot10^{-2}$ мбар. Окончание сушки определяют с помощью измерения давления в камере при закрытии переходного клапана.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Выбор температурных режимов замораживания и сублимации*

Основными параметрами при выборе температурных режимов лиофилизации, влияющими на качество конечного продукта, являются режимы замораживания и температура первичной сублимации. Модельные составы исследовались при двух режимах замораживания, подробно описанных в разделе «Материалы и методы»: быстром и медленном, скорость снижения температуры при которых составляет 1,15 °С/мин и 0,383 °С/мин соответственно. Два режима замораживания исследовались в связи с полиморфизмом маннита, который в зависимости от скорости замораживания и состава рецептуры может кристаллизоваться или затвердевать в аморфном состоянии [9]. В конечном итоге структура маннита оказывает влияние на стабильность ФС, а также на сложность трансфера и масштабирования на производственной площадке [8]. Поэтому при разработке состава необходимо нивелировать воздействие скорости замораживания на ФС.

Режимы первичной сублимации подобраны исходя из эвтектических температур замораживания модельных смесей, исследованных на дифференциальном сканирующем калориметре (ДСК): температура первичной сублимации для предупреждения «коллапса» должна быть более чем на два градуса ниже эвтектической температуры лиофилизата. Температура досушки определена исходя из стабильности субстанции и требуемого уровня содержания воды в полученном лиофилизате, поэтому с учетом свойств субстанции ГК-2, а именно термолабильности (так как субстанция подвергается деструкции при температуре выше 10 °С), выбран режим досушивания при температуре 8±2 °С и соответственно времени досушивания 21 ч.

В данной разработке лиофилизирование ФС без ВВ оказалось невозможным, так как полученный лиофилизат не соответствовал показателям, изложенным в ГФ XIII, поэтому на первом этапе исследовали сублимацию различных ВВ и моносмеси с криопротекторами, лиопротекторами, однако оптимальное соотношение показали только комбинированные модельные составы, содержащие крио- и лиопротектор, соответственно полиолы (маннит, сорбитол) и сахарозу. Модельные составы с сорбитолом и сахарозой показали низкую устойчивость ФС и не соответствовали ГФ XIII, к тому же из-за низкой температуры эвтектики (менее 50 °С) использование сорбитола нецелесообразно.

В таблице 1 приведены модельные составы с маннитом в качестве криопротектора, эвтектические температуры, режимы замораживания и результаты теста на прозрачность, характеризующие стабильность ФС и соответствие ГФ XIII.

Среди разработанных модельных составов для дальнейшего исследования и выбора наиболее оптимального состава отобраны 6 составов, показавших прозрачность в сравнении с растворителем (в качестве эталона) при повторном разведении водой после лиофилизации, то есть сохранившие стабильность и структуру ФС в процессе лиофилизации. В ходе исследований выявлены оптимальные соотношения криопротектора и лиопротектора – 70:30, 80:20, 90:10. Представленные значения согласуются с положениями о том, что при преобладании аморфных ВВ маннит при замораживании практически не образует кристаллов и соответственно меньше подвергает ФС деструктивным процессам. Кристалличность структуры лиофилизата изучена оптической микроскопией в поляризованном свете, на рисунке 2 показаны кристаллы маннита после лиофилизации и кристалличность ВВ в модельных составах.

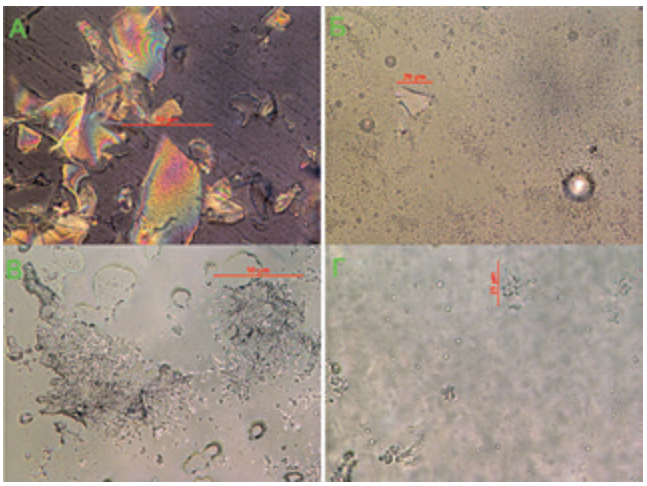


**Рисунок 2. Оптическая микроскопия в поляризационном свете лиофилизатов (50х): а) ГК-2 : маннит – 1:30 (мг); б) ГК-2 : сахароза : маннит – 1:70:30 (мг); в) ГК-2 : сахароза : маннит – 1:80:20 (мг); г) ГК-2 : сахароза : маннит – 1:90:10 (мг)**

**Таблица 1.**

**Составы лиофилизатов ГК-2 с сахарозой и маннитом**

| Номер образца | ГК-2, мг | Сахароза, мг | Маннит, мг | Режим заморозки | Прозрачность | $T_э$, °С |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 2 | 8 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –32,6 |
| 2 | 1 | 10 | 10 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –33,3 |
| 3 | 1 | 10 | 20 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –33,6 |
| 4 | 1 | 10 | 30 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –34,2 |
| 5 | 1 | 10 | 40 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ прозр. | –34,5 |
| 6 | 1 | 10 | 50 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –34,5 |
| 7 | 1 | 20 | 20 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –33,5 |
| 8 | 1 | 20 | 40 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –33,6 |
| 9 | 1 | 20 | 60 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –33,7 |
| 10 | 1 | 20 | 80 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –34,5 |
| 11 | 1 | 20 | 10 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –32,6 |
| 12 | 1 | 35 | 15 | Медленный/ Быстрый | прозр./ прозр. | –32,6 |
| 13 | 1 | 40 | 10 | Медленный/ Быстрый | прозр./ прозр. | –32,6 |
| 14 | 1 | 45 | 5 | Медленный/ Быстрый | прозр./ прозр. | –32,6 |
| 15 | 1 | 60 | 10 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –32,4 |
| 16 | 1 | 80 | 10 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ прозр. | –32,5 |
| 17 | 1 | 90 | 10 | Медленный/ Быстрый | прозр./ прозр. | –32,3 |
| 18 | 1 | 40 | 20 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –32,6 |
| 19 | 1 | 60 | 20 | Медленный/ Быстрый | прозр./ непрозр. | –32,7 |
| 20 | 1 | 80 | 20 | Медленный/ Быстрый | прозр./ прозр. | –32,6 |
| 21 | 1 | 30 | 30 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –33,5 |
| 22 | 1 | 50 | 30 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –32,5 |
| 23 | 1 | 70 | 30 | Медленный/ Быстрый | прозр./ прозр. | –32,9 |
| 24 | 1 | 60 | 40 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –33,2 |
| 25 | 1 | 50 | 50 | Медленный/ Быстрый | непрозр./ непрозр. | –30 |

Данные оптической микроскопии в поляризованном свете наглядно демонстрируют физическое состояние, в котором находится маннит при различных соотношениях сахарозы и без её добавления. Более высокая степень аморфизации компонентов может служить в качестве способа дополнительной термодинамической стабилизации во время вторичного досушивания.

### *Обоснование выбора состава лиофилизата для приготовления инъекций функцией обобщенной желательности Харрингтона*

Оптимальный состав определяли методом математической обработки данных, используя функцию обобщенной желательности Харрингтона. Для определения значения обобщённой желательности изучались следующие параметры: время растворения (с), значение pH после лиофилизации, остаточная влажность (%). Значение обобщённой желательности получали из суммы частных желательностей (d) по каждому параметру, так как функция обобщённой желательности Харрингтона представляет собой среднее геометрическое частных желательностей. Частная и соответственно обобщенная желательности, равные нулю, определяются как абсолютно неудовлетворительные, а желательности, равные единице, как наиболее приемлемые.

Анализ полученных значений функции частных и обобщённых желательностей показал, что абсолютно неудовлетворительные модельные составы (D>0>0,2) отсутствуют. Составы 12, 23, 20 имеют самые близкие к единице значения функции обобщённой желательности (D), однако состав № 23 обладает наибольшей функцией обобщённой желательности 0,872, данное значение находится в промежутке 0,8–1,0 и соответствует отличному значению желательности. Модельные составы также сравнивались по технологическим параметрам лиофилизации. На рисунках 3, 4 продемонстрированы графики изменения температур на полках и в препаратах при быстром и медленном замораживании.

**Таблица 2.**

**Значения параметров, частных желательностей и обобщённой желательности Харрингтона**

| Номер серии | Время растворения, с | Значение pH после лиофилизации | Остаточная влажность, % | d1 | d2 | d3 | D |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 12 | 15,47±0,05 | 4,15±0,02 | 2,76±0,11 | 0,802 | 0,372 | 0,642 | 0,718 |
| 13 | 19,81±0,05 | 4,25±0,02 | 3,21±0,11 | 0,73 | 0,460 | 0,541 | 0,711 |
| 14 | 21,51±0,05 | 4,38±0,02 | 3,57±0,11 | 0,696 | 0,567 | 0,451 | 0,708 |
| 23 | 16,22±0,05 | 4,75±0,02 | 1,8±0,11 | 0,791 | 0,793 | 0,802 | 0,872 |
| 20 | 27,26±0,05 | 4,62±0,02 | 2,83±0,11 | 0,561 | 0,728 | 0,628 | 0,761 |
| 17 | 33,83±0,05 | 4,77±0,02 | 3,87±0,11 | 0,372 | 0,802 | 0,372 | 0,644 |

Различия в температурных профилях препаратов небольшие и обусловлены различным количественным и качественным составом, при этом со схожими значениями эвтектических температур, которые были измерены на ДСК: так, для состава 12 температура t=–32,6 °C, 20 – t=–32,6 °C, 23 – t=–32,9 °C. Исходя из приведённых данных, самым приемлемым является состав 23, который обладает наибольшим значением желательности Харрингтона и при этом характеризуется оптимальным технологическим процессом.

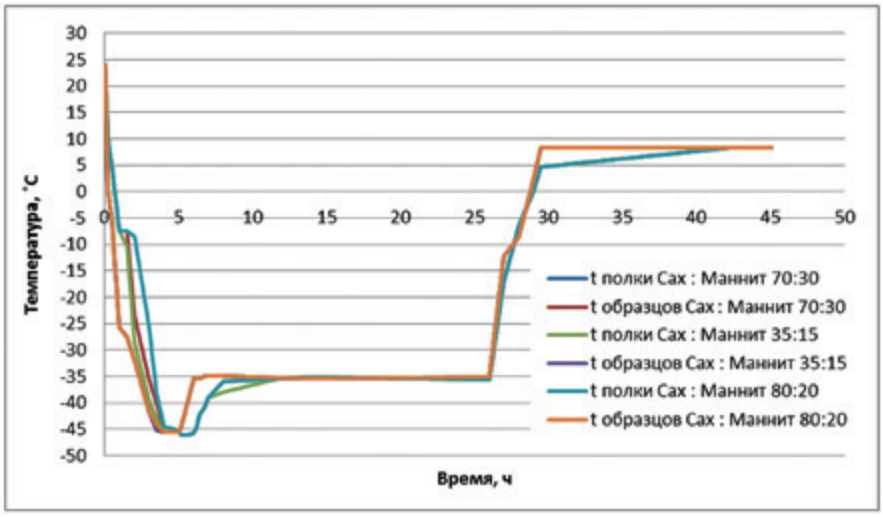


**Рисунок 3.** **Изменение температуры полок и раствора ГК-2 в течение лиофильной сушки при использовании медленного режима заморозки**

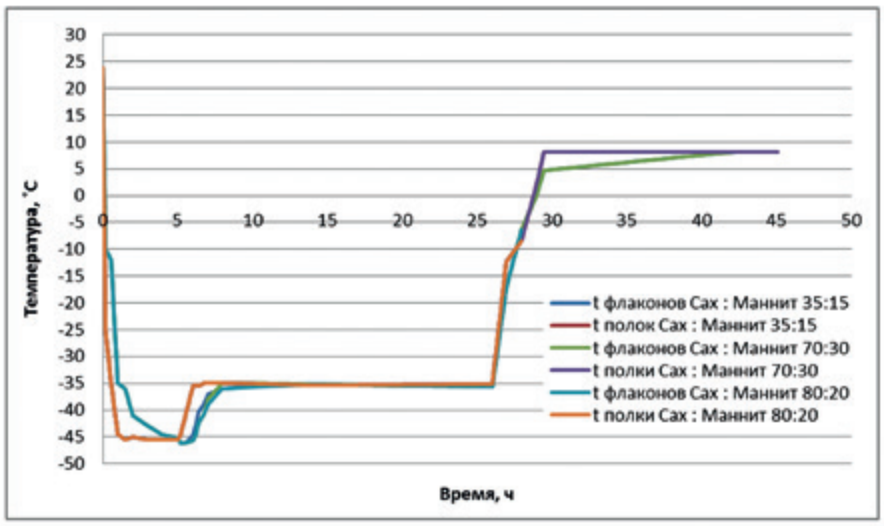


**Рисунок 4. Изменение температуры полок и раствора ГК-2 в течение лиофильной сушки при использовании быстрого режима заморозки**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовались рецептуры с различными соотношениями и количеством крио- и лиопротекторов методом математического обобщения Харрингтона подобран состав, сохраняющий ФС и ВВ в аморфном состоянии в течение всего цикла лиофилизации, стабилизирующий ФС и отвечающий требованиям ГФ XIII, обладающий наиболее приемлемыми технологическими характеристиками, и оптимизирован технологический процесс получения лиофилизата.

## ЛИТЕРАТУРА


1. Е.В. Блынская, С.В. Тишков, К.В. Алексеев. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов // Российский биотерапевтический журнал. 2017. № 1. С. 6–11.
2. Е.В. Блынская, С.В.Тишков, К.В. Алексеев, А.И. Марахова. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации пептидов и белков // Фармация. 2017. Т. 66. № 1. С. 14–18.
3. В.А.Крайнева, Т.А. Гудашева, С.О. Котельникова, Т.А. Антипова, С.Б. Середенин. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 ограничивает проявления геморрагического инсульта у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 154. № 11. С. 598–601.
4. А.С. Михеева, Е.В. Блынская, К.В. Алексеев. Применение дисперсионного анализа при разработке состава и технологии таблеток кемантана с модифицированным высвобождением // Фундаментальные исследования. 2015. Т. 2. № 2.
5. П.Ю.Поварнина, О.Н. Воронцова, Т.А. Гудашева, Р.У. Островская, С.Б. Середенин. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 восстанавливает нарушенные когнитивные функции в крысиных моделях болезни Альцгеймера // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2013. Т. 5. № 3(48).
6. B.S. Chang, S.Y. Patro. Freeze-drying process development for protein pharmaceuticals // Lyophilization of Biopharmaceuticals. 2004. Т. 2.
7. J.F. Carpenter et al. Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice // Rational design of stable protein formulations. – Boston: Springer, 2002. С. 109–133.
8. K. Izutsu, S. Yoshioka, T. Terao. Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying // Chemical and pharmaceutical bulletin. 1994. Т. 42. № 1. С. 5–8.
9. A.I. Kim, M.J. Akers, S.L. Nail. The physical state of mannitol after freeze-drying: Effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute // Journal of pharmaceutical sciences. 1998. Т. 87. № 8. С. 931–935.