

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА В ТЕХНОЛОГИИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Е.В. Блынская¹, кандидат фармацевтических наук, **С.В. Тишков**^{1*},
К.В. Алексеев², доктор фармацевтических наук, профессор,
А.И. Марахова³, кандидат фармацевтических наук

¹НИИ фармакологии им. В.В. Закусова;

Российская Федерация, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8.

²Московский медицинский университет «РЕАВИЗ»;

Российская Федерация, 107564, Москва, ул. Краснобогатырская, д.2, стр.2.

³Российский университет дружбы народов;

Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Лиофилизация белковых и пептидных препаратов – перспективный метод создания стабильных и эффективных парентеральных лекарственных форм. Рассматриваются основные вспомогательные вещества, используемые при лиофилизации белковых и пептидных препаратов, а также их функциональная классификация. Приводятся характеристики наполнителей, криопротекторов, лиопротекторов, модификаторов тоничности, сурфактантов и буферных систем. Даются рекомендации для решения проблем сохранения активности лекарственного вещества. Предлагаются оптимальные сочетания вспомогательных веществ для улучшения свойств и предотвращения разрушения таблетки лиофилизата.

Ключевые слова: белковые и пептидные препараты, лиофилизация, сублимационная сушка, вспомогательные вещества, лиопротекторы, криопротекторы.

E-mail: sergey-tishkov@yandex.ru

Разработка лекарственных препаратов (ЛП) на основе белковых и пептидных структур представляет собой сложную задачу, включающую решение целого ряда проблем для создания устойчивых и эффективных рецептур. Одна из основных проблем – склонность многих лекарственных средств (ЛС) данного класса разрушаться или инактивироваться в процессе производства твердых лекарственных форм (ЛФ), в связи с чем снижается их биодоступность сравнительно с парентеральным способом введения [1]. В связи с этим для упрощения технологического процесса, а также для повышения терапевтической эффективности наиболее предпочтительно производить белковые и пептидные препараты в виде водных жидких ЛФ. Однако в водном растворе белок проявляет чувствительность к множеству факторов, влияние которых приводит к необратимой денатурации и агрегации белковой структуры: нагревание, замораживание, изменение рН среды, влияние поверхностно-активных веществ или денатурирующих агентов [2]. Доказано, что даже в условиях, обеспечивающих термодинамическую стабильность нативной структуры белка, явление агрегации в водных растворах может

возникать в процессе хранения, а процесс деградации белковой молекулы в водном растворе происходит достаточно быстро (при хранении в течение 18–24 ч) [3].

Метод лиофилизационной сушки (лиофилизации) широко используется в промышленности, особенно в качестве технологического этапа разработки и создания пептидных и белковых ЛП в связи с их высокой чувствительностью к нагреванию, что не позволяет проводить сушку при высоких температурах, свойственных другим методам [4]. Следует также учитывать, что в лиофилизированном состоянии белок может сохранять физическую и химическую стабильность во время транспортировки и при длительном хранении при температуре окружающей среды. Следовательно, лиофилизация представляет собой процесс, имеющий много нюансов и часто возникающих проблем, избежать которых можно правильно подобрав вспомогательные вещества и режим сушки для них [5].

Общее описание производственного процесса сублимационной сушки включает в себя несколько этапов. После того, как флаконы загружаются на полки, они охлаждаются примерно до 5°C за счет снижения температуры полки сублимационной сушилки. Температуру полки снижают до -10°C

и выдерживают около 30 мин, чтобы обеспечить равномерное переохлаждение всей партии. Этап замораживания способствует быстрому охлаждению полки до нужной температуры замерзания и держит постоянную температуру для уравнивания массообменных процессов. После заморозки первичная сушка инициируется созданием вакуума в камерах. Давление в камере падает ниже давления насыщенных паров льда при температуре замерзания продукта. Разница между давлением паров льда и давлением в камере обеспечивает движущую силу для сублимации. При непрерывном нахождении камеры под вакуумом давление в ней постоянно поддерживается ниже давления насыщенных паров льда, и сублимация продолжается до удаления всей замороженной массы воды. Кроме того, некоторое количество связанной незамерзшей воды, оставшейся в продукте, которую можно удалить путем десорбции при более высокой температуре, достигаемой во время вторичной сушки. Поэтому температуру полки обычно поднимают до температуры окружающей среды или более высокой температуры, и проводят сушку до достижения желаемой остаточной влажности. Камеру затем аэрируют, чтобы частично нарушить вакуум перед укупоркой флаконов. Таков общий характер процесса, при этом возможны некоторые отклонения, обусловленные особенностями продукта и конструкцией оборудования [2,3,6].

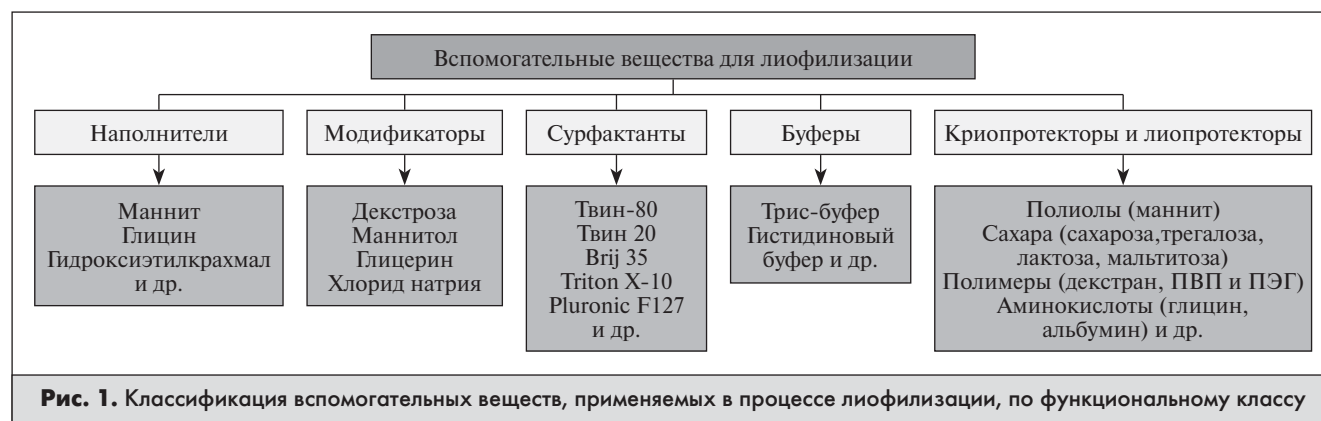
Поддержание биологической активности и стабильности белков и пептидов во время обычного производства, распределения, хранения и транспортировки должно быть приоритетным направлением при оптимизации рецептур данной группы ЛС. Для этого необходим тонкий баланс компонентов рецептуры и применяемых технологических методик [7]. Типичная рецептура (состав) лиофилизированного пептидного и белкового ЛП может содержать наполнитель, буфер, модификатор изотоничности, криопротекторы и лиопротекторы. В отличие от существующей дифференцировки по химическому строению, предложенной Государственной фармакопеей РФ XIII издания, представляется рациональным распределить

вспомогательные вещества по их функциональному назначению (рис. 1). Основные характеристики рассматриваемых групп вспомогательных веществ рассмотрены ниже.

Наполнители. Белковые и пептидные ЛП чаще всего являются микродозированными, поэтому для обеспечения четкого выполнения технологических процессов производства и для максимального заполнения объема флакона используют наполнители [5]. Они позволяют фармацевтической промышленности и производству получить лиофилизированный продукт, соответствующий всем установленным нормам качества. Обычно используют маннит, глицин и гидроксипропилкрахмал. Как правило, эта группа вспомогательных веществ характеризуется высокой температурой распада (около -10°C) и высокой температурой стеклования (T_g), а также фармакологической нейтральностью [8].

Модификаторы тоничности. Данную группу вспомогательных веществ (например, декстрозу, маннитол, глицерин, натрия хлорид и другие соли) применяют для создания осмотического давления раствора, соответствующего давлению в крови. Вне зависимости от своей химической природы, концентрация любых используемых модификаторов должна быть минимальной, чтобы избежать вероятного осаждения при замерзании [8]. Необходимо отметить, что при использовании натрия хлорида возможны проблемы во время лиофилизации, поскольку уменьшается температура распада рецептуры, даже если часть соли не кристаллизуется, а также повышается вероятность агрегации в процессе лиофилизации. Маннит или глицин, как кристаллические наполнители могут служить технологически более оптимальной альтернативой натрия хлориду [9]. Если невозможно отрегулировать тоничность до процесса лиофилизации, часто используют такой технологический прием, как добавление модификаторов с изотоническим разбавителем непосредственно перед применением [10].

Поскольку механизм денатурации белка при замерзании имеет свои особенности, необходимо учи-



тывать, в каких случаях следует использовать вспомогательные вещества, стабилизирующие белок при замерзании (криопротекторы), а в каких – стабилизирующие во время сушки (лиопротекторы). Подобный выбор обусловлен различием в физико-химических свойствах стабилизационного взаимодействия этой группы вспомогательных веществ и молекул белка в высушенном, растворенном или замороженном состоянии. Некоторые криопротекторы и лиопротекторы характеризуются способностью защищать белковую структуру и при замерзании, и при сушке, следовательно, подобные монокомпонентные протекторные системы можно рекомендовать для практического применения. Часто такую роль выполняют невосстанавливающие сахара (например, сахароза и трегалоза), которые могут выступать как крио- и лиофильный протектор и обеспечивать стекловидную матрицу, остающуюся аморфной во время лиофилизации [8].

Криопротекторы. К данному классу относятся вещества, которые защищают продукт от переохлаждения, преимущественно на этапе замораживания процесса лиофилизации. Это вспомогательные вещества из самых разнообразных химических классов соединений, объединенных способностью вытеснять воду с поверхности белков в водных растворах. Примером криопротекторов могут служить полиолы (маннит), сахара (сахароза, лактоза, мальтитоза), полимеры (декстран, поливинилпирролидон – ПВП и полиэтиленгликоль – ПЭГ), аминокислоты (глицин, альбумин) [8, 10].

Лиопротекторы. Иногда использование только криопротекторов недостаточно для сохранения белковых и пептидных ЛС, так как по термодинамическим причинам их способность вытеснять воду может повлиять на стабильность структуры в процессе сушки [2]. В таких случаях для получения качественного продукта необходимы лиопротекторы, представляющие собой соединения, которые в комбинации с пептидом или белком предупреждают и/или снижают их физическую нестабильность при лиофилизации и последующем хранении. Лиопротекторы стабилизируют белковые и пептидные ЛС путем взаимодействия с их молекулярной структурой в процессе сушки и образования защитного слоя на поверхности, выполняя роль «заменителя воды» при удалении гидратной оболочки белка. Наиболее широко применяются сахара как группа с высокой прочностью кислородных связей и аморфной структурой, повышающей расстояние между белками в твердом состоянии и, следовательно, предотвращающей агрегацию [9]. Полифункциональность группы сахаров обуславливает нижний предел оптимальных концентраций для лиопротекции от 0,3М или выше. Дисахариды (трегалоза, сахароза, мальтоза, лактоза) в целом более эффективны, чем моноса-

хариды, такие как глюкоза, или большие сахариды, такие как мальтогексоза. Так, например, особенно популярны трегалоза или мальтоза как стабилизаторы фосфофруктокиназы для сублимационной сушки [6]. При отсутствии этих стабилизаторов фермент полностью инактивируется. В присутствии вспомогательных веществ он сохраняет до 80% первоначальной активности после лиофилизации. Кроме того, хорошо зарекомендовал себя гидроксипропил- β -циклодекстрин (ГП-ЦД), что объясняется сравнительно высокой температурой распада (около -9°C), аморфным характером, хорошей растворимостью в воде и способностью к комплексообразованию. Необходимо отметить, что вспомогательные вещества с высокой степенью кристаллизации, такие как ПЭГ, проявляют не слишком выраженные лиопротекторные свойства, однако они могут быть эффективными в смеси с сахарами [1,6].

Сурфактанты. Неионогенные поверхностно-активные вещества широко используются для стабилизации белков, подавляют агрегацию и способствуют восстановлению белка. Полисорбат-80 и Полисорбат-20, известные как Твин-80 и Твин-20, широко представлены на рынке для создания фармацевтических композиций в диапазоне 0,0003-0,3%. В других случаях включают также Brij 35, Triton X-10, Pluronic F127 и натрия додецил сульфат [11].

Буферные системы. К данной группе относятся вспомогательные вещества, используемые для создания определенного pH раствора с целью стабилизации белковой или пептидной молекулы. Основная проблема с выбором буферной системы для стабилизации пептидов и белков заключается в возможном осаждении солей буфера при замораживании и их способности вызывать резкие колебания pH среды. Например, кристаллизация двухосновной натриевой соли фосфорной кислоты приводит к снижению $\text{pH} < 4$, поэтому целесообразность такого буфера весьма сомнительна. В качестве альтернативы можно использовать Трис-буфер или гистидиновый буфер, которые не вызывают резких колебаний pH при замораживании [1,6,12].

Оптимизация состава лиофилизата необходима для решения таких часто встречающихся технологических проблем, как разрушение первичной структуры лиофилизата («коллапс») и возникновение явления обратного плавления.

«Коллапс» структуры лиофилизата определяется как процесс, при котором структуры, созданные в ходе сублимационной сушки, разрушаются при прохождении границы сублимационного раздела фаз. Кроме того, возможно проявление различных нежелательных свойств в результате «коллапса» таблетки лиофилизата (ТЛ) во время сублимационной сушки (например, путем забивания пути, по которому должна идти испаряющаяся влага, сни-

жение скорости сублимации). В результате конечный продукт имеет тенденцию удерживать более высокое содержание влаги, чем продукт, высушенный без разрушения, а остаточная вода может быть распределена неравномерно. Основным технологическим подходом для предотвращения «коллапса» является поддержание структурной целостности максимально замороженной концентрированной аморфной фазы, окружающей ледяные кристаллы, на этапе первичной сушки. Аморфная фаза существует как «стекло», которое представляет собой одновременно твердый и хрупкий материал с незначительной подвижностью в течение времени. Характерная температура, при которой начинается стеклование, коррелирует с температурой, при которой замороженная таблетка претерпевает разрушение структуры [5]. Поэтому очень важно во время первичной сушки поддерживать температуру образца ниже температуры начала стеклования состава для предотвращения разрушения структуры таблетки (рис. 2).

Для выбора рационального температурного режима необходимо использовать стандартные температуры стеклования и разрушения основных вспомогательных веществ, используемых в лиофилизации (см. таблицу). Для предотвращения «коллапса» ТЛ желателно подбирать составы с высокой температурой начала стеклования, так как для проведения процесса лиофилизации рекомендуются средние значения температуры продукта, а данный показатель не всегда достижим при низких значениях температуры стеклования в некоторых лиофилизаторах [10].

Другим способом предотвращения «коллапса» является включение в состав вспомогательных веществ, которые кристаллизуются и придают ТЛ жесткую макроскопическую структуру. При таком подходе распад аморфной фракции ТЛ будет проявляться только в микроскопических масштабах на участках между кристаллами. Этот технологический прием рекомендуется только в тех случаях, когда все другие варианты не приносят желаемых результатов, потому что даже микроскопический распад может привести к неблагоприятным последствиям, указанным выше [5].

Помимо «коллапса», характеризующегося изменением ТЛ по границе зоны су-

блимации, в процессе первичной сушки часто возникает явление обратного плавления. Обратное плавление – это плавление льда в лиофилизате при повышении температуры полки выше температуры плавления эвтектики. Данная проблема возникает в случае изменения температуры плавления эвтектической смеси сравнительно с температурами монокомпонентов и может привести к деградации белковой или пептидной структуры ТЛ. Следовательно, для предотвращения возникновения обратного плавления температура лиофилизата должна быть ниже температуры плавления эвтектики кристаллического компонента состава во время первичной сушки [10].



Рис. 2. Высушенные образцы α -амилазы: справа налево – без «коллапса», с «микроколлапсом» и с «коллапсом»

ТЕМПЕРАТУРЫ СТЕКЛОВАНИЯ И РАЗРУШЕНИЯ ОСНОВНЫХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Классы веществ	Компоненты состава	T _g /°C (температура стеклования)	T _c /°C (температура разрушения)
Сахара	Сахароза	-32	-31
	Трегалоза	-29	-28,5
	Лактоза	-28	-30,5
	Мальтоза	-30	
Аминокислоты	Глицин	-62	
	β -Аланин	-65	
	Гистидин	-33	
Полиолы	Глицерол	-65	-54
	Сорбитол	-46	
	Маннитол	-35	
Полимеры	Полиэтиленгликоль (ПЭГ 6000)		-13
	Декстран		-11
	Поливинилпирролидон	-20,5	-24
Буферные компоненты и соли	Натрия ацетат	4	
	Натрия цитрат	-41	
	KH_2PO_4	-55	
	K_2HPO_4	-65	
	Трис \cdot HCl	-65	
	$\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-60	
	CaCl_2	-95	
	ZnCl_2	-88	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лиофилизация пептидных и белковых лекарственных средств является перспективным методом увеличения стабильности, особенно при производстве жидких парентеральных лекарственных форм.

Для оптимизации состава пептидных и белковых лекарственных препаратов в процессе лиофилизации рекомендуется использовать или аморфные наполнители, такие как сахара (сахароза, трегалоза), или их сочетание с кристаллизующимися агентами (маннит, глицин, ПЭГ) для фиксации структуры таблетки лиофилизата.

Для предотвращения нежелательных явлений (в частности, «коллапс» лиофилизата и обратное плавление) необходимо придерживаться температурного режима ниже точки стеклования и эвтектического плавления, а также использовать в рецептуре кристаллизующие вспомогательные вещества, придающие таблетке лиофилизата жесткую макрокристаллическую структуру (например, маннит и ПЭГ).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Tang X.C., Pikal M.J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical research*, 2004; 21(2): 191–200.
2. Chang B.S., Patro S.Y. Freeze-drying process development for protein pharmaceuticals. *Lyophilization of biopharmaceuticals*. American Association of Pharmaceutical Scientists. Arlington, 2004; 113–8.
3. Banga A.K. *Therapeutic peptides and proteins: Formulation, processing, and delivery systems*. CRC press, 2015.
4. Overcashier D.E., Patapoff T.W., Hsu C.C. Lyophilization of protein formulations in vials: Investigation of the relationship between resistance to vapor flow during primary drying and small-scale product collapse. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1999; 88 (7): 688–95.
5. Liu J. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development. *Pharmaceutical development and technology*, 2006; 11 (1): 3–28.
6. Chi E.Y. *Excipients and their Effects on the Quality of Biologics*. VA, USA: American Association of Pharmaceutical Scientists. FDD Tech Corner, 2012.
7. Carpenter J.F. et al. Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice. *Rational design of stable protein formulations*. Springer US, 2002: 109–33.
8. Chang L.L. et al. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? *Journal of pharmaceutical sciences*, 2005; 94 (7): 1427–44.
9. Hottot A., Vessot S., Andrieu J. Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2007; 46 (7): 666–74.
10. Searles J.A., Carpenter J.F., Randolph T.W. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine T_g' in pharmaceutical lyophilization. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2001; 90 (7): 872–87.
11. Rey L. (ed.). *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. CRC Press, 2016.
12. Sarciaux J.M. et al. Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1999; 88 (12): 1354–61.

Поступила 9 ноября 2016 г.

EXCIPIENTS IN THE TECHNOLOGY OF LYOPHILIZATION OF PEPTIDES AND PROTEINS

E.V. Blynskaya¹, PhD; S.V. Tishkov¹; Professor K.V. Alekseev², PhD; A.I. Marakhova³, PhD

¹*V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology; 8, Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russian Federation;*

²*Moscow Medical University REAVIZ; 2, Krasnobogatyrskaya St., Build. 2, Moscow 107564, Russian Federation;*

³*Peoples' Friendship University of Russia; 6, Miklukho-Maklai St., Moscow 117198, Russian Federation*

SUMMARY

Lyophilization of protein and peptide drugs is a promising method for designing stable and effective parenteral dosage forms. The paper considers the basic excipients used in the lyophilization of protein and peptide drugs, as well as their functional classification. It gives the characteristics of vehicles, cryoprotectants, lyoprotectants, tonicity modifiers, surfactants, and buffer systems. It also provides recommendations to solve the problems of preservation of the activity of a drug. The optimal combinations of excipients are proposed to improve the properties of lyophilisate tablets and to prevent their destruction.

Key words: protein and peptide drugs, lyophilization, sublimation, excipients, lyoprotectants, cryoprotectants.