

# ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ПРОЦЕССА ЛИОФИЛИЗАЦИИ БЕЛКОВЫХ И ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Е. В. Блынская<sup>1</sup>, С. В. Тишков<sup>1</sup>, К. В. Алексеев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

<sup>2</sup>ЧОУ ВПО «Медицинский университет «РЕАВИЗ»; Россия, 107564 Москва, ул. Краснобогатырская, 2, стр. 2

**Контакты:** Евгения Викторовна Блынская eaureus@mail.ru

*Лиофилизация противоопухолевых белковых и пептидных препаратов является перспективным методом создания стабильных и эффективных парентеральных лекарственных форм. В данном обзоре рассмотрены основные проблемы, возникающие во время лиофилизации белковых и пептидных препаратов, и описаны рекомендации для решения этих проблем. Приведены способы оптимизации и совершенствования лиофильной сушки. Предложены температурные режимы для улучшения свойств и предотвращения разрушения структуры лиофилизата.*

**Ключевые слова:** лиофилизация, белковые и пептидные препараты, сублимационная сушка, противоопухолевые препараты

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-6-11

## TECHNOLOGICAL APPROACHES TO IMPROVING THE PROCESS LYOPHILIZATION OF PROTEIN AND PEPTIDE DRUGS

E. V. Blynskaya<sup>1</sup>, S. V. Tishkov<sup>1</sup>, K. V. Alekseev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>V. V. Zakusov Research Institute of Pharmacology; 8 Baltijskaya St., Moscow 125315, Russia;

<sup>2</sup>Medical University "REAVIZ"; p. 2, 2 Krasnobogatyrskaya St., Moscow 107564, Russia

*Lyophilization of protein and peptide anticancer drugs is a promising method to create a stable and effective parenteral dosage forms. This article reviews the main problems encountered during lyophilization of protein and peptide drugs, and describes the best practices for solving these problems. The ways of optimization and improvement of the freeze-drying are given. Temperatures to improve the properties and prevent the destruction of the cake lyophilization are suggested.*

**Key words:** lyophilization, protein and peptide preparations, freeze-drying, anti-tumor drugs

### Введение

Систематизация основных путей совершенствования технологии лиофилизации для лекарственных средств (ЛС) белковой и пептидной структуры особенно актуальна для противоопухолевых препаратов, так как обеспечивает не только сохранение структурной стабильности ЛС данной терапевтической группы, но и высокие показатели биодоступности.

Пептидные препараты широко применяются в комплексном лечении онкологических заболеваний для усиления действия цитостатических препаратов в качестве антипролиферативных и восстанавливающих естественный противоопухолевый иммунитет. Такие вещества пептидной природы, как цитокины, например интерлейкины (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2), применяются в виде лиофилизата под торговыми наименованиями «Беталейкин»<sup>®</sup> и «Ронколейкин»<sup>®</sup> соответ-

ственно [1]. Рекомбинантный интерферон гамма человека (Ингарон<sup>®</sup>), разработанный НПП «Фармаклон» [2] и применяемый в виде инъекционных лекарственных форм (ЛФ), также обладает противоопухолевой активностью и пептидной структурой. Для создания белковых и пептидных препаратов, как перечисленных, так и еще только проходящих исследования, наиболее рациональной ЛФ является лиофилизат, позволяющий стабилизировать структуру лекарственного препарата (ЛП) и увеличить сроки хранения, предохраняя от воздействия повреждающих факторов [3, 4].

Таким образом, разработка противоопухолевых лиофилизированных пептидных и белковых препаратов имеет много нюансов. Очевидна потребность в систематизации знаний и понимании составляющих данного процесса: заморозки и сублимационной

сушки, механизмов тепло- и массообменных процессов, происходящих на различных стадиях лиофилизации. Совокупность перечисленных факторов определяет основные пути совершенствования процесса лиофилизации ЛП данного класса:

- оптимизация технологических аспектов лиофилизационной сушки и непосредственно подбора вспомогательных веществ исходя из физико-химических параметров процесса;
- выбор рациональных подходов к решению наиболее часто встречающихся технологических проблем лиофилизации белковых и пептидных ЛП.

### Особенности влияния вспомогательных веществ на процесс лиофилизации белков и пептидов

При оптимизации рецептур белковых и пептидных препаратов, применяемых в онкологии, приоритетным направлением является поддержание биологической активности и стабильности во время производства, хранения и транспортировки. Это обеспечивает баланс компонентов рецептуры (рН, буферный агент, стабилизатор(ы), и/или модификаторы изотоничности), а также применяемых технологических методик.

В большинстве случаев рецептура (состав) лиофилизированного пептидного и белкового ЛП может содержать наполнитель, буфер, модификатор изотоничности, криопротекторы и лиопротекторы. В отличие от существующей классификации по химическому строению (Государственная фармакопея XIII), представляется рациональным распределить вспомогательные вещества по их функциональному предназначению (рис. 1). Вспомогательные вещества существенно влияют на процесс лиофилизации.

### Основные направления оптимизации процесса лиофилизации белков и пептидов

Заслуживают внимания технологические параметры лиофильной сушки и совершенствование про-

цесса за счет их правильного подбора [5–7]. В процессе лиофилизации выделены основные стадии:

- замораживание: непосредственно само замораживание продукта и создание прочной матрицы, подходящей для сушки;
- первичная сушка: лед удаляют путем сублимации при одновременном снижении давления окружающей среды продукта и повышением температуры; иногда перед сушкой проводится дополнительный этап – отжиг, или термоциклирование;
- вторичная сушка: связанная вода удаляется, пока не будет достигнут целевой уровень остаточного содержания влаги, обеспечивающий целостность полученного лиофилизата для приготовления раствора для инъекций (таблетки лиофилизата (ТЛ)) [8–10].

Оптимизация процесса лиофилизации требует решения наиболее частых технологических проблем, рационализации подходов к совершенствованию каждого этапа (замораживания, первичной и вторичной сушки) цикла лиофилизации.

### Оптимизация этапа замораживания

На этапе замораживания ключевыми параметрами являются минимальная температура замерзания и скорость замораживания. Метод замораживания существенно влияет на размер и форму кристаллов льда и, следовательно, морфологию окончательной структуры лиофилизата белкового и пептидного препарата и эффективность сублимации. Температура, обуславливающая ядрообразование, влияет на рост кристаллов и формирование матрицы в целом. Температура зарождения ядра определяется температурной обработкой образцов, которая начинается после того, как они помещаются на полку лиофилизатора. Для замораживания образцы либо медленно охлаждаются при температуре окружающей среды в сочетании с постепенным снижением температуры полки, либо быстро охлаждаются на предварительно охлажденной

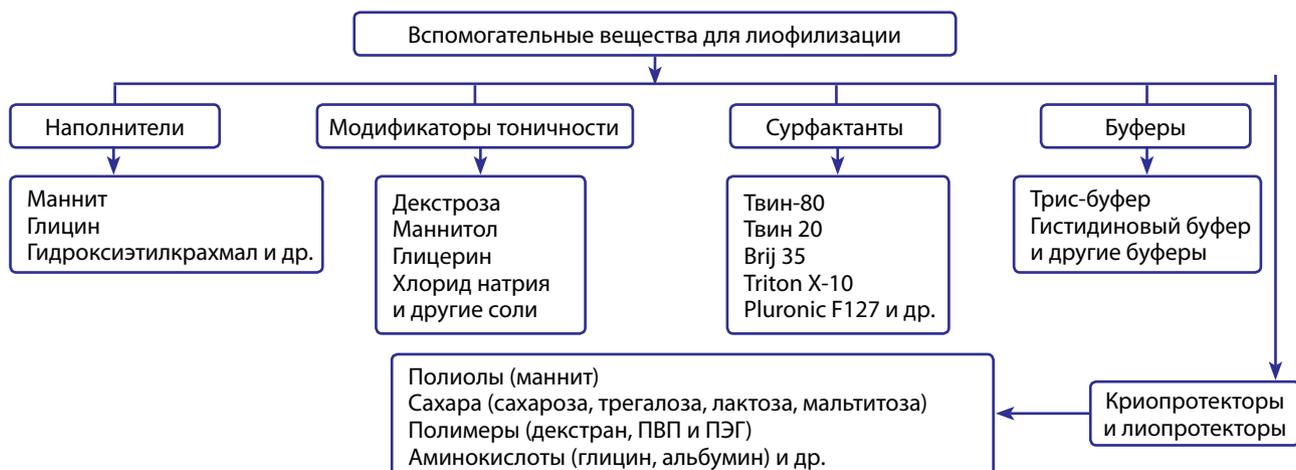


Рис. 1. Классификация вспомогательных веществ, применяемых в процессе лиофилизации, по функциональному классу

полке. Состояние переохлаждения характерно для каждого метода заморозки, однако быстрое снижение температуры приводит к формированию кристаллов льда с высокой степенью однородности. Различия в морфологии кристаллов льда, полученных быстрым и медленным охлаждением, показывает растровая электронная микроскопия (рис. 2). Образец, замороженный медленным охлаждением, имеет относительно однородные кристаллы льда; образец, подвергнутый быстрой заморозке с помощью жидкого азота, содержит неоднородные по форме кристаллы с большими по площади поверхностями.

Таким образом, температура замерзания должна быть достаточно низкой, чтобы инициировать зарождение ядра кристаллизации наполнителя, а скорость замерзания — достаточно большой, чтобы форма и размеры кристаллов были оптимальны для последующей сушки. Для определения соответствующих значений лиофильные сушки проводят в малом масштабе и как опытно-промышленные.

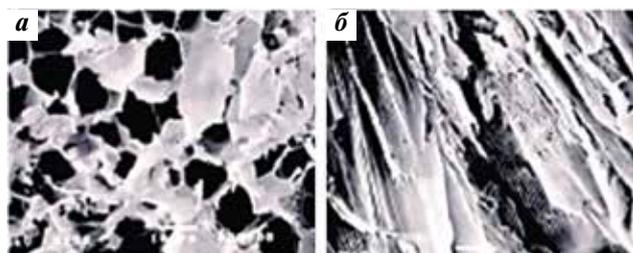


Рис. 1. Растровая электронная микроскопия образцов декстрана, лиофилизированных при медленной (а) и быстрой (б) заморозке

### Отжиг и его преимущества

После завершения заморозки продукт может быть термически обработан, чтобы произошла кристаллизация метастабильных наполнителей (отжиг), например маннита и глицина, которые находятся в частично аморфном состоянии, и/или для увеличения размера кристаллов льда. Этот дополнительный шаг может значительно увеличить начальную скорость просушивания и улучшить однородность и внешний вид конечного продукта. Завершение кристаллизации вспомогательных веществ при заморозке может дополнительно увеличить срок хранения за счет меньшего высвобождения влаги в результате перекристаллизации остаточной аморфной или гидратированной формы.

Ключевым параметром данного процесса является температура отжига. Ее выбирают с учетом температуры эвтектики, которая определяется дифференциальной сканирующей калориметрией. Выбранная температура должна быть выше температуры эвтектики примерно на 10 °С. Высокая температура отжига обеспечивает увеличение степени кристалличности и более быстрое достижение кристаллич-

ности. Однако важно не допустить такого повышения температуры отжига, чтобы происходило эвтектическое плавление. После отжига температура полки приводится к желаемой рабочей температуре для первичной сушки [11].

Отжиг также может быть применен для увеличения размера кристаллов льда, так как при повышении температуры полки мелкие кристаллы льда активно расплавляются, не затрагивая структурную целостность крупных образований. Использование температуры, при которой скорость роста кристаллов льда превышает скорость ядрообразования, и последующее охлаждение полки позволяют аморфной воде кристаллизоваться на существующих более крупных кристаллах льда (рис. 3).

Процесс отжига зачастую рекомендуется с целью оптимизировать процесс лиофильной сушки. Он дает следующие преимущества: более стабильную структуру лиофилизата, предназначенного для приготовления раствора для инъекций, и повышение скорости сушки за счет расширения температурных пределов процесса.

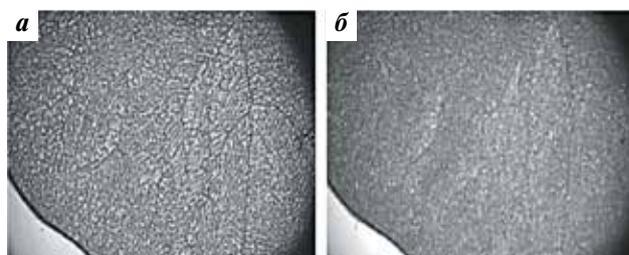


Рис. 2. Сублимационная микроскопия кристаллов льда, полученных при -40 °С с отжигом (а) и без него (б)

### Оптимизация этапа первичной сушки

Во время первичной сушки из продукта удаляется большая часть воды и одновременно инициируется введение вакуума в камере. Этап требует временных и энергетических затрат, а значит, удорожает весь процесс. Оптимизация цикла лиофилизации, как правило, нацелена на минимизацию времени сушки. Данный показатель регулируется двумя основными параметрами: температурой полки и давлением в камере. На основной процесс сушки значительно влияют параметры, которые не требуют процессного управления, но явно заслуживают внимания: контейнер, состав, заполняемый объем, затвор, полная загрузка продукта, емкость конденсатора, температура конденсатора, расположение конденсатора, изменчивость температуры внутри и вне полки. Наиболее эффективная сушка требует соблюдения следующих рекомендаций:

- температуру полки следует установить и поддерживать на верхних пределах стабильности системы и продукта;

- давление должно оставаться в пределах эффективного взаимодействия процессов сублимации и сохранения температурного режима для предотвращения перегрузки конденсатора.

Таким образом, следует задать температуру на несколько градусов ниже температуры распада эвтектической смеси. При условии что достигнута заданная температура продукта, существует несколько комбинаций температуры полки и давления в камере, приводящих к повышению эффективности данного этапа. Как правило, сочетание высокой температуры полки и низкого давления в камере оптимально, потому что происходит более выраженное увеличение скорости сублимации, чем в случае сочетания низкой температуры полки с повышенным давлением в камере. Рекомендуется установить в камере давление на уровне около 10–30 % от давления пара льда при заданной температуре продукта (табл. 1).

**Таблица 1.** Давление насыщенного пара льда при отрицательных температурах

Температура, °С	Давление пара, мм рт. ст.				
	0	–2	–4	–6	–8
0	4579	3880	3280	2765	2326
–10	1950	1632	1361	1132	939
–20	776	640	526	437	351
–30	286	232	187	151	121
–40	96,6	76,8	60,9	48,1	37,8
–50	29,6	23,0	17,8	13,8	10,6
–60	8,08	6,14	4,64	3,49	2,61
–70	1,94	1,43	1,05	0,77	0,56

Ключевым параметром завершающей стадии первичной сушки является подбор оптимальной скорости нагрева лиофилизата. При низких показателях скорости нагрева и сублимации увеличиваются энергозатраты, при высоких – повышается вероятность разрушения структуры лиофилизата остаточной влагой. Следовательно, для перехода к этапу вторичной сушки необходимо постепенное медленное повышение температуры, коррелирующее с изменением скорости испарения остаточной влаги [12–14].

### Коллапс структуры лиофилизата

Рассмотренный выше главный этап процесса лиофильной сушки позволяет понять особенности рецептуры и технологии данного метода и создать соответствующий алгоритм. Сложность и многофакторность физико-химических взаимодействий компонентов и систем в процессе сублимационной сушки обуславливают высокую частоту потенциальных нежелательных явлений в ходе ее осуществления. Соответственно, для оптимизации процесса в целом необходимо рассмотреть подходы к таким явлениям, как разрушение первичной структуры лиофилизата (коллапс)

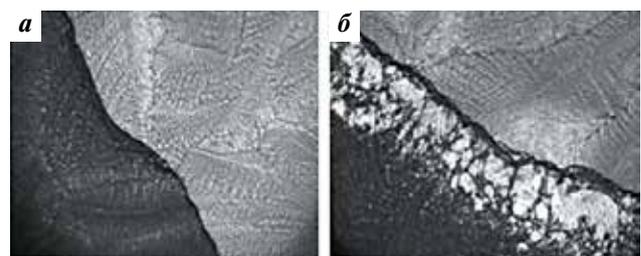
и возникновение обратного плавления, эти технологические проблемы встречаются чаще всего.

Коллапс определяется как процесс, при котором структуры, созданные в ходе сублимационной сушки, разрушаются при прохождении границы сублимационного раздела фаз. Это может привести не только к изменению функциональных свойств лиофилизата белковых и пептидных препаратов, но и к уменьшению эффективности сублимационной сушки по причине перекрытия путей испарения, в результате влага удерживается и распределяется неравномерно. Зачастую разрушение лиофилизированной пористой массы, уплотненной в «таблетку», может стать причиной нарушения структуры белка.

Для предотвращения коллапса необходимо сохранить структурное соотношение кристаллической и аморфной фаз, достигнутое к моменту первичной сушки. Данный этап определяется оптимизацией температурного режима с учетом температуры стеклования аморфного компонента. Для поддержания структуры ТЛ температура во время первичной сушки должна быть ниже температуры стеклования аморфного компонента (рис. 3). При подборе температурного режима необходимо выбирать стандартные температуры стеклования и разрушения вспомогательных веществ, используемых в лиофилизации (табл. 2).

Другой подход к предотвращению коллапса ТЛ состоит в подборе вспомогательных веществ с высокой температурой стеклования аморфного компонента, так как для проведения лиофилизации белковых и пептидных препаратов рекомендуется среднее значение температуры продукта, что не всегда достижимо при низких значениях температуры стеклования в некоторых лиофилизаторах.

Если рассмотренные выше технологические приемы оказались недостаточно эффективны, можно включить в состав рецептуры вспомогательные вещества, которые кристаллизуются и придают ТЛ жесткую макроскопическую структуру. Предотвратить распад аморфной фракции не удастся, однако деструкция будет проявляться только на границе между аморфной и кристаллической фракциями. Эта методика рекомендуется в тех случаях, когда все другие варианты



**Рис. 3.** Сублимационная микроскопия 2 % раствора сахарозы: сушка ниже (а) и выше (б) температуры стеклования

не приносят желаемых результатов, потому что даже микроскопический распад может привести к неблагоприятным последствиям, указанным выше.

**Таблица 2.** Температуры стеклования и разрушения основных вспомогательных веществ, используемых в лиофилизации

Класс вещества	Компонент состава	Температура, °C	
		стеклования	разрушения
Сахара	Сахароза	-32	-31
	Трегалоза	-29	-28,5
	Лактоза	-28	-30,5
	Мальтоза	-30	-
Аминокислоты	Глицин	-62	--
	$\beta$ -аланин	-65	-
	Гистидин	-33	-
Полиолы	Глицерол	-65	--
	Сорбитол	-46	-54
	Маннитол	-35	-
Полимеры	Полиэтиленгликоль (ПЭГ 6000)	--	-13
	Декстран	-	-11
	Поливинилпирролидон	-20,5	-24
Буферные компоненты и соли	Натрия ацетат	-64	--
	Натрия цитрат	-41	-
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	-55	-
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	-65	-
	Трис*HCl	-65	-
	$\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-60	-
	$\text{CaCl}_2$	-95	-
$\text{ZnCl}_2$	-88	-	

### Оптимизация вторичной сушки

Вторичная сушка, как правило, осуществляется при температурных режимах, одновременно обеспечивающих эффективное удаление влаги и сохранение стабильности пептидов и белков. Выбор данного режима и продолжительность его применения определяется ключевым параметром данного этапа – остаточной влажностью лиофилизата.

Допустимый уровень остаточной влажности определяется, прежде всего, на основе данных о стабильности лиофилизата. При дальнейшей оптимизации процесса рекомендуется учитывать обратную зависимость остаточной влажности от температурных показателей и давления. Как правило, определяющей является температура полки, поскольку принято считать, что во время вторичной сушки ЛС на основе белков и пептидов скорость сушки достигает оптимальных значений при давлении меньше

200 мм рт. ст., температуру полки рекомендуется устанавливать около 25–30 °C [15].

Одним из самых сложных моментов в цикле лиофилизации является переход от первичной к вторичной сушке, так как нерационально подобранные условия данного этапа могут привести к обратному плавлению.

### Обратное плавление

Обратное плавление – плавление льда в лиофилизате при повышении температуры полки выше температуры плавления эвтектики. Это может произойти во время перехода ко вторичной сушке, если температура будет подниматься слишком быстро и лиофилизат недостаточно высушен при первичной сушке, в результате возможна деградация белковой или пептидной структуры ЛС. Поэтому переход ко вторичной сушке требует медленного повышения температуры лиофилизата, в котором полностью завершился процесс первичной сушки.

Рассмотренные подходы к оптимизации технологических этапов лиофилизации позволяют с достаточной высокой вероятностью получить продукт, имеющий заданные характеристики.

### Заключение

Лиофилизация противоопухолевых пептидных и белковых ЛС является перспективным методом увеличения стабильности, особенно в случае жидких парентеральных ЛФ.

Для предотвращения структурных изменений и агрегации белковых и пептидных ЛС необходимо подбирать и оптимизировать условия замораживания, первичной и вторичной сушки путем изменения температурного и временного режима каждого этапа с одновременным подбором оптимального диапазона давления в камере.

Наиболее часто встречаются такие нежелательные явления, как коллапс лиофилизата и обратное плавление. Для их предотвращения необходимо придерживаться температурного режима ниже точки стеклования и эвтектического плавления, избегать преждевременного повышения температуры в не до конца высушенном лиофилизате во время первичной сушки.

Использование отжига позволяет повысить температуру стеклования аморфного компонента, увеличить размер образующихся кристаллов и скорость первичной сушки.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей. Вестник Московского онкологического общества 2008;1:6–10.
2. Киселев О.И., Ершов Ф.И., Деева Э.Г. Интерферон гамма: новый цитокин в клинической практике. Ингарон. М.: Димитрейд График Групп, 2007. 348 с.
3. Banga A.K. Therapeutic peptides and proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 3rd ed. Atlanta: CRC Press, 2015:139–67.
4. Аршинова О.Ю., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов. Разработка и регистрация лекарственных средств 2013;2(2):20–5.
5. Mazzobre M.F., Longinotti M.P., Corti H.R., Buera M.P. Effect of salts on the properties of aqueous sugar systems, in relation to biomaterial stabilization. 1. Water sorption behavior and ice crystallization/melting. Cryobiology 2001;43(3):199–210. DOI: 10.1006/cryo.2001.2345. PMID: 11888214.
6. Sarciaux J.M., Mansour S., Hageman M.J., Nail S.L. Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying. Journal of pharmaceutical sciences 1999;88(12):1354–61. PMID: 10585234.
7. Tang X.C., Pikal M.J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharmaceutical research 2004;21(2):191–200. PMID: 15032301.
8. Carpenter J.F., Chang B.S., Garzon-Rodriguez W., Randolph T.W. Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice. Rational design of stable protein formulations. Pharm Biotechnol 2002;109–33. PMID: 11987749.
9. Chang L.L., Shepherd D., Sun J. 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? J Pharm Sci 2005; 94(7):1427–44. DOI: 10.1002/jps.20364. PMID: 15920775.
10. 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.
11. 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. J Pharm Sci 2001;90(7):872–87. PMID: 11458336.
12. Chang B.S., Patro S.Y. Freeze-drying process development for protein pharmaceuticals. In: Lyophilization of Biopharmaceuticals. Eds.H.R. Costantino, M.J. Pikal. Arlington: AAPS Press, 2004:113–38.
13. 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. J Pharm Sci 1999;88(7):688–95. DOI: 10/1021/jps980445+. PMID: 10393566.
14. Searles J.A. Freezing and Annealing Phenomena in Lyophilization. In: Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. Eds.L. Rey, J.C. May. New York: Informa Healthcare 2016:52–81.
15. Liu J. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development. Pharm Dev Technol 2006;11(1):3–28. DOI: 10/1080/10837450500463729. PMID: 16544906.