

УДК 66.049.6

М.А.ЖУЧЕНКО^{1,*}, М.А.ПАШКОВА², О.В. ПОТАПЕНКО¹

¹ООО «ФАРМАПАРК», Москва, 117246

²ООО «Химфармресурс», Москва, 117312

e-mail: axiflipper@gmail.com

Лиофилизация биопрепаратов в двухкамерных шприцах

Исследована возможность лиофилизации биопрепаратов в шприцах предварительного наполнения в зависимости от типа шприца и различных условий теплопереноса. Изучено влияние предварительного замораживания на пенообразование и качество лиофилизата. Проведена апробация алюминиевых блоков, предназначенных для равномерного теплопереноса внутри лиофилизованной серии, получен кондиционный продукт, соответствующий нормам спецификации.

Ключевые слова: биофармацевтические препараты, десорбция, лиофилизация, предварительное замораживание, сублимация, шприцы предварительного наполнения.

В рамках выполнения программы по импортозамещению биотехнологическая отрасль бурно развивается, нуждаясь в новых технологических решениях, которые представляют собой зачастую серьезные научные разработки, в том числе в области лиофилизации готовых лекарственных форм (ГЛФ).

Лиофилизация биофармацевтических препаратов направлена на увеличение стабильности термолабильных действующих веществ за счет максимального удаления свободной и частично связанной влаги, что существенно снижает скорость протекания химических реакций и биохимических процессов, вызывающих инактивацию биологически активных веществ. Высокопористая структура и гидрофильность лиофильно высушенных препаратов позволяет легко переводить их в исходное состояние путем добавления соответствующего растворителя. Несмотря на дороговизну, сложное аппаратное оформление и энергоемкость процесса этот метод остается одним из са-

мых востребованных и перспективных для получения стабильных иммунобиологических препаратов различной природы [1, 2]

Лиофилизацию можно разделить на три основные фазы: замораживание, сублимация (первичная сушка) и десорбция (вторичная сушка) [3]. Замораживание препарата определяет его структуру, от которой в свою очередь зависит его качество. Удаление влаги из замороженного материала путем сублимации описывается термобариметрическими зависимостями между парциальным давлением паров в камере лиофилизатора и давлением паров воды над слоем продукта [4]. Первичная сушка применяется для удаления свободной влаги, десорбция – связанной абсорбированной воды [5].

Наиболее часто применяемой в биофармацевтической промышленности первичной упаковкой лиофильных ГЛФ служат ампулы и флаконы, причем последние являются предпочтительными.

Жученко Максим Андреевич, Пашкова Мария Александровна, Потапенко Олег Владимирович.

Список сокращений: ГЛФ — готовая лекарственная форма; ppm (particle per million) — миллионная доля.

* Автор для переписки.



Рис. 1. Конструкция двухкамерного шприца

В последние годы на рынке первичной упаковки большое внимание производителей привлекают двухкамерные шприцы (рис. 1) [6, 7]. Известно использование двухкамерных шприцев для фасовки таких препаратов как, например, Abilify Maintena® (арипипразол), Хунта® (антигемофильный фактор), PegIntron® (пэг-интерферон-альфа-2b). В отличие от флаконов, поставляемых совместно с растворителем и шприцем, двухкамерные шприцы содержат лиофилизат и растворитель в двух отдельных камерах, что позволяет избежать смешивания компонентов до непосредственного введения пациенту. Система байпаса предназначена для проникновения растворителя в камеру с лиофилизатом, которое осуществляется движением верхнего и центрального плунжеров. Использование двухкамерных шприцев позволяет избежать ошибок при растворении лиофилизата и увеличивает точность дозирования. Поскольку лиофилизация раствора и наполнение растворителем происходят непосредственно в шприце, технологическая схема розлива, лиофилизации и укупорки для двухкамерных шприцев существенно отличается от таковых для традиционных флаконов.

Из немногочисленных источников известно, что теплоперенос при лиофилизации в шприцах осуществляется путем конвекции и излучения, а не прямого теплообмена с полкой лиофилизатора [8]. Такой теплообмен невозможен из-за конструктивных особенностей шприцев — пластиково-эластомерные компоненты защитного колпачка шприца обладают крайне слабым теплопереносом и практически не контактируют с цилиндром шприца. После лиофилизации шприцы передают на стадию укупорки центральным, разделительным, плунжером; верхний плунжер вставляют после наполнения камеры растворителем.

Слабый теплоперенос представляет основную сложность процесса лиофилизации в шприцах. Детальное описание этого процесса в научной литературе практически отсутствует, поэтому целью настоящего исследования являлась разра-

ботка лабораторной технологии лиофилизации раствора в двухкамерных шприцах.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве раствора для лиофилизации использовали буферный раствор, содержащий 50 мг/мл сахарозы (Panreac), 1,5 мг/мл натрия дигидрофосфат дигидрата (Sigma), 1,5 мг/мл натрия гидрофосфата (Sigma) и 0,01 мг/мл полисорбата 80 (Fluka). Раствор для лиофилизации (0,7 мл) помещали в стеклянные шприцы различного типа: 1.0 ml long (Schott), 2.25 ml (Gerresheimer), 2.25 ml BYPASS (Gerresheimer). При укупорке шприцев типа 1,0 ml long использовали плунжеры производства Becton Dickinson, шприцев 2.25 ml и 2.25 ml BYPASS — плунжеры производства WEST.

Режим лиофилизации. Эксперименты проводили на лабораторном лиофилизаторе BETA 1-8KS (Martin Christ) колпакового типа. В качестве исходного использовали режим лиофилизации, ранее разработанный нами для флаконов 2R, содержащих 0,7 мл буферного раствора. Замораживание раствора проводили на заранее охлажденных до -29° полках лиофилизатора в течение 2 ч, сублимацию — при -26° в течение 24 ч и давления в камере 70—100 мТорр, переход на десорбцию — от -26° до $+20^{\circ}$ в течение 4 ч при давлении в камере 70—100 мТорр, десорбцию — при 20° в течение 6 ч при давлении 70—100 мТорр. Минимальная температура конденсера составляла -53° при минимальной температуре теплоносителя -29° .

Определение влажности. Определение содержания воды проводили на кулонометрическом титраторе C20 (Mettler Toledo) по Карлу Фишеру. Лيوфилизат из шприца количественно переносили в сухой флакон вместимостью 10 мл, затем добавляли 5 мл сухого растворителя.

Содержимое флакона перемешивали на шейкере Unimax 2010 (Heidolph) в течение 30 мин при частоте вращения 300 об/мин. Далее с помощью одноразового шприца отбирали около 0,3 мл раствора исследуемого образца и вводили в ячейку для титрования. Получали рассчитанное встроенным программным обеспечением значение содержания воды в аликвоте раствора образца в миллионных долях (ppm).

Содержание воды в лиофилизате (W) в процентах рассчитывали по формуле:

$$W = \frac{w \cdot (a_0 + a) - w_0 \cdot a_0}{10000 \cdot a_0},$$

где: w — содержание воды в аликвоте раствора субстанции; w_0 — содержание воды в растворителе;

a_0 — навеска растворителя; a — навеска субстанции.

В соответствии с внутренней спецификацией содержание остаточной влажности не должно превышать 3%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На предварительном этапе работ из-за отсутствия двухкамерных шприцев с байпасом использовали шприц предварительного наполнения типа 1.0 ml long, отличающийся от шприцев с байпасом диаметром и, как следствие, высотой столба раствора.

Предварительное замораживание обычно проводят при помощи программных замораживателей или непосредственно на полке лиофильной камеры; при этом замораживание на полке предпочтительнее. Однако достичь замораживания раствора в шприце 1.0 ml long представлялось крайне сложным из-за конструктивных особенностей колпачка иглы. Он состоит из эластомерного и пластикового фрагментов, разделенных воздушной прослойкой и практически не граничащих с раствором в цилиндре шприца (рис. 2, Б). Поэтому было предложено провести предварительное замораживание буферного раствора в жидком азоте с последующим позиционированием шприцев в несте, обеспечивающим вертикальное расположение шприцев на заранее охлажденной полке лиофилизатора. Информация по серии препарата 01 приведена в таблице.

Несмотря на сильное замораживание серия 01 высохла неоднородно. Замороженный раствор в шприцах, расположенных на периферии полки

растаял и потек, более того, в 10% шприцев произошло поднятие лиофилизата, также связанное с оттаиванием раствора. Образцы препарата в шприцах, находящихся в центре несты (50% серии), высохли до требуемого уровня (см. таблицу). Основное количество воды удалялось в первые часы сублимации, когда замороженный раствор в шприцах не успел оттаять. Лиофилизат в шприцах, расположенных в центре несты, смог высохнуть из-за наиболее глубокого погружения в полку лиофилизатора.

Для устранения проблемы неравномерного замораживания–высушивания было предложено использовать алюминиевый блок, обеспечивающий равномерный подвод тепла к шприцам. Алюминий был выбран благодаря его высокой теплопроводности, легкости и простоте механической обработки. Конструкция блока, соответствующая по размерам чертежу несты, предполагает возможность прямого переноса несты со шприцами из тубы в блок без дополнительных манипуляций (рис. 3).

100 шприцев типа 1.0 ml long (серия 02) вместе с нестой разместили в блоке, после чего изучали кинетику замораживания блока и раствора в шприце. Определено, что блок достигает температуры полки через 2,5 ч после размещения, а по истечении 2 ч температура раствора в шприцах становится равной температуре полки и блока (рис. 4).

Лиофилизацию серии 02 проводили по оригинальному режиму. Гибкие термомпары лиофилизатора использовали для контроля температуры раствора, блока и полок. При вакуумировании камеры и переключении на режим сублимации тем-

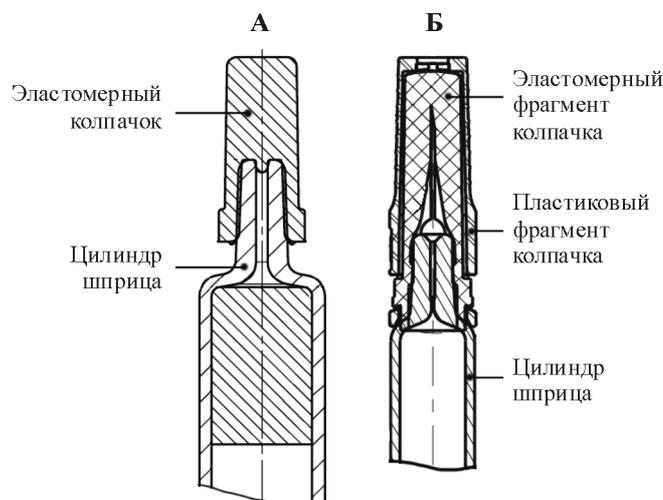


Рис. 2. Конструктивные особенности колпачков и иглы шприцев различных типов: А — 2.25 ml и 2.25 ml BYPASS; Б — 1.0 ml long

Информация о высушенных сериях биопрепарата

Номер серии	Тип шприца, количество шприцев	Условия обработки	Тип штатива	Показатели качества		Однородность серии
				Описание	Влажность, %	
01	1.0 ml long, 40 шприцев	Жидкий азот, -190° , 5 мин, сублимация сразу после размещения на полке	Неста для 1.0 ml long	Центр несты — однородная плотная таблетка, свободно перемещающаяся внутри шприца; 15 шприцев	1,81 2,95 2,02	Серия неоднородна
				Периферия несты — растаявшие и поднявшиеся таблетки; 25 шприцев	Не определяли	
02	1.0 ml long, 100 шприцев	Алюминиевый блок, замораживание при -27° , 150 мин, сублимация по исходному режиму	Алюминиевый блок на 100 шприцев 1.0 ml long	Все таблетки неоднородные, неплотные, прилипшие к цилиндру шприца	Не определяли	Серия однородна
03	2.25 ml, 100 шприцев	Жидкий азот, -190° , 5 мин, сублимация сразу после размещения на полке	Неста для 2.25 ml	Центр несты — однородная плотная таблетка; 33 шприца	0,56 0,54	Серия однородна
				Периферия несты — поднявшиеся таблетки; 67 шприцев	1,1 1,94	
04	2.25 ml BYPASS, 4 шприца	Алюминиевый блок, замораживание до -27° , 120 мин, сублимация по исходному режиму	Алюминиевый блок на 4 шприца 2.25 ml	Однородные, плотные таблетки, свободно перемещающиеся внутри шприца	1,11 0,91 0,87 0,98	Серия однородна

температура блока и раствора постепенно увеличивалась и через сутки выходила на плато, составляющее -12° : разница этой температуры с температурой полки лиофилизатора составляла 10° (рис. 5). Это различие наблюдалось и ранее в экспериментах с флаконами 2R и обусловлено уменьшением теплопередачи вследствие колпачной конструкции сушки.

Лиофилизат серии 02 содержал множество просветов и пустот, однако в сравнении с лиофилизацией в несте в препарате этой серии не было оттаявших и поднявшихся образцов, он являлся внутрисерийно однородным. Таким образом, использование алюминиевого блока в модельных экспериментах с шприцами типа 1.0 ml long позволило получить серию, однородную по внешнему

виду, значительно увеличив теплоперенос от полки к раствору в шприце.

На следующем этапе исследования проводили лиофилизацию буферного раствора в шприцах типа 2.25 ml (без байпаса). Так же, как и при работе с шприцами 1.0 ml long, оценивали влияние раз-

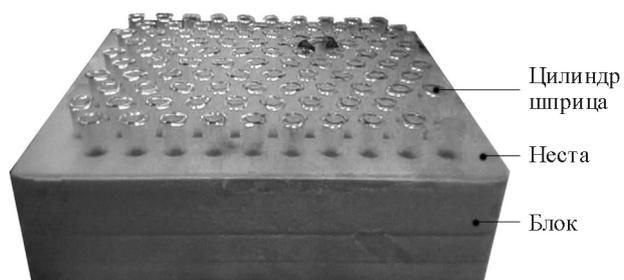


Рис. 3. Алюминиевый блок для шприцев типа 1.0 мл long

ЛИОФИЛИЗАЦИЯ БИОПРЕПАРАТОВ В ДВУХКАМЕРНЫХ ШПРИЦАХ

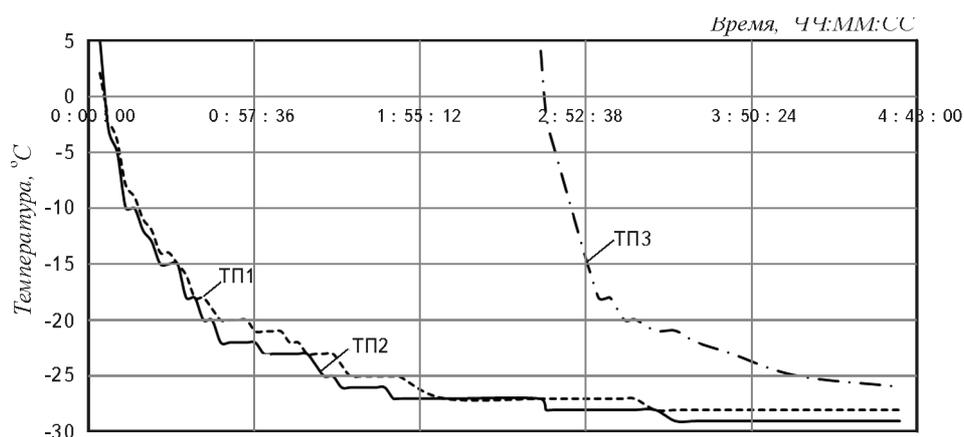


Рис. 4. Температурные кривые замораживания раствора в шприцах типа 1.0 ml long в блоке: ТП1 — температура блока; ТП2 — температура полки; ТП3 — температура раствора в шприце

личных условий замораживания на качество лиофилизата. После поступления шприцев объемом 2,25 мл был изготовлен соответствующий им алюминиевый блок вместимостью 4 шприца.

Сушка шприцев 2.25 ml в несте с предварительным замораживанием в жидком азоте (100 шприцев, серия 03), проведенная в соответствии с условиями, разработанными для серии 01, показала результаты, схожие с полученными для серии 01 (см. таблицу). Около 5% периферийных шприцев подверглось оттаиванию, в 20% шприцев наблюдалось поднятие лиофилизата (данные не приведены). Несмотря на то, что сушка, проведенная со шприцами 2.25 ml, позволила получить более однородную серию, было подтверждено, что даже глубокое замораживание в жидком азоте не позволяет в данном случае поддерживать раствор в замороженном состоянии на протяжении 24 ч сублимации.

При высушивании серии 04, замороженной в блоке для шприцев (4 шприца, -29° , 2.25 ml BYPASS), было определено, что блок достигает температуры полки через 2 ч после размещения на ней, а температура раствора достигает температуры полки после 1 ч замораживания. По окончании лиофилизации было установлено, что таблетки получились однородными, без оттаиваний и пустот: прилипание лиофилизата к стенкам цилиндра шприца, а также его поднятие не наблюдалось. Показатель остаточной влажности для всех 4 шприцев соответствовал установленной норме.

Проведенное исследование продемонстрировало исключительную важность стадии замораживания, предшествующей лиофилизации модельного раствора в шприцах предварительного наполнения. Замораживание определяет структуру, от которой зависят условия сублимации и качество конечного продукта. Конечными целями

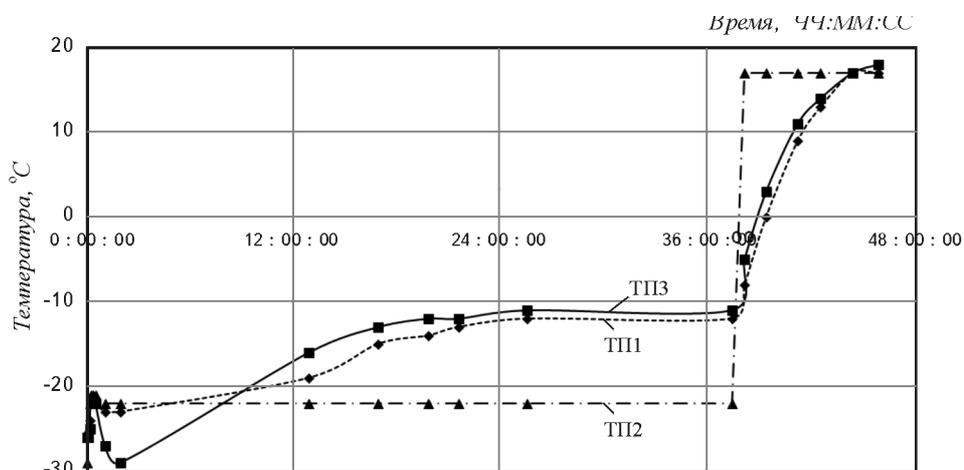


Рис. 5. Температурные кривые лиофилизации буферного раствора, серия 02: ТП1 — температура блока; ТП2 — температура полки; ТП3 — температура раствора в шприце

при этом являются предотвращение пенообразования в условиях вакуума, сохранение формы лиофилизата и снижение скорости температурозависимых реакций.

Технология лиофилизации в шприцах предварительного наполнения является сравнительно новой, как и сама форма лекарственного препарата — двухкамерный шприц с байпасом. Имеющаяся информация о путях теплопередачи при замораживании сводит их к конвекции и излучению, однако осуществить эти пути на практике автору не удалось при работе ни со шприцами типа 1.0 ml long, ни со шприцами типа 2.25 ml. Было установлено, что даже глубокое предварительное замораживание при -190° не позволяет получить однородную кондиционную серию. Несмотря на существенные отличия в характеристиках высушиваемого материала, лиофилизация в обеих сериях прошла некачественно. Тем не менее стоит отметить, что серия 03, высушенная в шприцах типа 2.25 ml показала лучшие результаты в сравнении с серией 02, высушенной в шприцах 1.0 ml long. Высота столба раствора в шприце 1.0 ml long составляла приблизительно 12 мм, а в шприце 2.25 ml — 6 мм, что способно было повлиять на качество препарата и скорость сушки. Видно также, что конструктивные особенности колпачков иглы для шприцев различного типа (см. рис. 2) обуславливают разницу в площади контакта полки с цилиндром шприца. Так, для шприца 2.25 ml этот контакт больше, что приводит к увеличению теплопередачи.

Частично решить проблему неоднородности серий удалось с использованием алюминиевых блоков. Блок, размещенный на полке лиофилизатора, обеспечивает равномерную теплопередачу к цилиндру шприца и, как следствие, к сублимируемому раствору. Важно отметить, что при промышленном масштабировании технологии также возможно использование блоков. Несмотря на значительную массу блоки легко подвергаются стерилизации, не контактируют с готовым продуктом и адаптированы под загрузку/выгрузку несты со шприцами после стадии розлива. Использование блока обеспечило получение кондиционного продукта в шприце типа 2.25 ml BYPASS.

Получено 10.09.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Звягин И.В., Хорьков И.А., Токарик Э.Ф. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания — высушивания биологических препаратов. — М.: Профиздат, 1981. — 34 п.
2. Долинов К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов. — М.: Медицина, 1969. — 231 с.
3. Шевелев К.Ю. Сублимационная сушка. Описание технологии: Материалы научно-технической конференции. — М., 2005. — С. 114—127.
4. Aurelie, H. Sublimation kinetics during freeze-drying of pharmaceutical protein formulation / H.Aurelie, A.Julien, V.Severine // *Drying Technol.* — 2007. — V. 25. — N 4—6. — P. 753—758.
5. Wei, W. Issues in Freeze Drying of Aqueous Solutions / W. Wei, C. Mo, C. Guohua // *Chinese J. Chem. Eng.* — 2012. — V. 20. — N 3. — P. 551—559.
6. www.vetter-pharma.com: [сайт]. URL: <https://www.vetter-pharma.com/en/services-solutions-en/vetter-packaging-solutions/specialized-technologies/vetter-dual-chamber-systems>
7. www.unilife.com: [сайт]. URL: <http://www.unilife.com/product-platforms/reconstitution-and-mixing/ezmix>
8. Zimmermann, J. Comparing Lyophilization in Vials and Dual-Chamber Systems//www.pharmtech.com. 2012. URL: <http://www.pharmtech.com/comparing-lyophilization-vials-and-dual-chamber-systems>

M.A. ZHUCHENKO^{1,*}, M.A. PASHKOVA²,
and O.V. POTAPENKO¹

¹The Closed Stock Venture FARMAPARK, 117246, Moscow Russia

²The Closed Stock Venture Khimfarmresurs, 117312, Moscow Russia

e-mail: axiflipper@gmail.com

Freeze-drying of Biopreparations in Dual-Chamber Syringes

A possibility of biologicals freeze-drying in pre-filled syringes depending on syringe type and various conditions of heat-transfer has been investigated. The effect of preliminary freezing on foaming and lyophilisate quality was studied. An approbation of aluminium blocks destined to the homogenous heat-transfer within a freeze-dried series was performed. A high-quality product that falls within the existing specifications was obtained.

Key words: biopharmaceuticals, desorption, freeze-drying, pre-filled syringes, pre-freezing, sublimation.

* Author for correspondence.