

На правах рукописи



Биткина Татьяна Александровна

**РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ КОМБИНИРОВАННОГО
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ МИКРОСФЕР С
ДОКСОРУБИЦИНА ГИДРОХЛОРИДОМ И КОМЕНОВОЙ КИСЛОТЫ**

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Санкт-Петербург
2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Басевич Анна Викторовна

кандидат фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Саканян Елена Ивановна

доктор фармацевтических наук, профессор, Акционерное общество «Научно-производственное объединение по иммунобиологическим препаратам» «Микроген», директор по науке

Молохова Елена Игоревна

доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита состоится «20» сентября 2022 года в 16.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте организации (<https://sites.google.com/a/pharminnotech.com/dissovet>).

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.063.01,
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Во всем мире наблюдается рост онкологических заболеваний. По оценке ученых к 2040 году количество ежегодных случаев заболевания раком возрастет на 47 процентов. При стабильности данной динамики смертность от онкологических заболеваний в скором времени может занять первое место, опередив сердечно-сосудистые заболевания.

За последние годы достигнуты значительные успехи в диагностике, лечении, повышении качества жизни больных в данной медицинской области. Но все же многие вопросы, связанные с терапией онкологических заболеваний, остаются недостаточно изученными.

Одним из наиболее перспективных направлений терапии злокачественных новообразований является химиоэмболизация микросферами, заключающаяся в локальном закупоривании артерий сферическими частицами, насыщенными цитостатическим препаратом, в частности, доксорубицина гидрохлоридом. Однако микросферы для проведения эмболотерапии в основном поставляются на отечественный рынок из других стран и имеют малое количество аналогов, вследствие чего для них характерна высокая стоимость.

Поскольку онкологические заболевания зачастую сопровождаются выраженными болевыми синдромами, одной из наиболее острых проблем в их лечении является обезболивание. Терапия злокачественных новообразований, как правило, включает применение анальгетиков «большой группы» (опиаты, опиоиды). Однако прием данных препаратов сопровождается серьезными побочными действиями и может вызывать лекарственную зависимость, что делает актуальным поиск новых ненаркотических анальгетических субстанций. Производные гамма-пирона изучались учеными с применением разных подходов, позволяя выявлять все новые и новые свойства данной группы соединений. Однако особый интерес вызывает высокая анальгетическая активность 5-гидрокси-4-оксо-4Н-пиран-2-карбоновой кислоты (коеновой кислоты), метод лечения с использованием которой приводит к долговременному снятию болевого синдрома, в том числе у онкологических пациентов.

Вышеизложенное позволяет рассматривать комбинацию для эмболизации на основе полимерных микросфер, содержащих цитостатический препарат, и эффективного анальгетика – коеновой кислоты, как перспективное направление исследования в области онкотерапии и технологии получения лекарств.

Степень разработанности темы исследования. Большая часть научной литературы посвящена изучению механизмов терапевтического действия субстанции коеновой кислоты и полимерных микросфер, а также поиску и доказательству фармакологической активности в опытах *in vitro* и *in vivo*: Дербенев А.В. (1999); Крылов Б.В., Лопатина Е.В. (2008); Лопатина Е.В. (2010); Dick O.E. et al. (2015); Rogachevskii I.V. et al. (2021); Дунаев А.А., Блинов О.В. (2018); Долгушин Б.И. (2002); Гительзон Д.Г. и др. (2017); Бояринцев В.В. (2016); Абдулаев М.А. (2016); Kos S. et al. (2011); Doucet J. et al. (2018); Kunliang L. et al. (2020), Liu D.M. et al. (2012), Nouri Y.M. et al. (2019), Weng L. et al. (2011), Zhu C. et al. (2018).

Анализ публикаций за последние 20 лет показал ограниченность исследований, посвященных технологическим аспектам создания лекарственных форм на основе коеновой кислоты и полимерных микросфер.

В онкотерапии в настоящее время широко используется цитостатический антибиотик доксорубицина гидрохлорид, который обладает достаточно высокой эффективностью, но не снижает характерный для онкозаболеваний болевой синдром.

Представляется важным и актуальным разработка комбинированного лекарственного препарата, сочетающего цитостатическое действие (доксорубицина гидрохлорид), эмболизацию кровеносных сосудов, питающих опухоль (полимерные микросферы) и эффективный анальгетик (коеновая кислота). Технология получения такого комбинированного препарата предлагается впервые.

Цели и задачи исследования. Целью работы является разработка состава и технологии комбинированного лекарственного средства для парентерального введения, включающего лиофилизированные полимерные микросферы, насыщенные доксорубицина гидрохлоридом, и инъекционный раствор коеновой кислоты.

Для достижения поставленной цели необходимо решение следующих задач:

1. Отработать и стандартизировать способ получения полимерных микросфер. Определить и обосновать контрольные критические точки их производства. Установить показатели качества полимерных микросфер.

2. Изучить кинетику сорбции и динамику высвобождения доксорубицина гидрохлорида полимерными микросферами.

3. Определить физико-химические и технологические характеристики субстанции коеновой кислоты, установить ее показатели качества.

4. Разработать технологию получения растворов коеновой кислоты и изучить их стабильность. Установить показатели качества для инъекционных растворов коеновой кислоты. Изучить возможность сорбции коеновой кислоты полимерными микросферами.

5. Разработать комбинированное лекарственное средство на основе лиофилизата полимерных микросфер с доксорубицина гидрохлоридом и инъекционного раствора коеновой кислоты.

Научная новизна исследования. Впервые представлена технология получения полимерных микросфер, определены и обоснованы контрольные критические точки их производства.

Впервые предложена методика проведения десорбции доксорубицина гидрохлорида из полимерных микросфер.

Впервые разработаны состав и технология получения раствора коеновой кислоты, нейтрализованной гидроксидом натрия. Проведен сравнительный анализ стабильности растворов коеновой кислоты, нейтрализованной гидрокарбонатом натрия, и растворов коеновой кислоты, нейтрализованной гидроксидом натрия.

Впервые разработано комбинированное лекарственное средство на основе лиофилизированных микросфер с доксорубицина гидрохлоридом и инъекционного раствора коеновой кислоты.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретически обоснована и экспериментально разработана технология получения микросфер с доксорубицина гидрохлоридом. Показана зависимость динамики высвобождения доксорубицина гидрохлорида от размера микросфер с использованием разработанной методики. Изучен профиль высвобождения доксорубицина гидрохлорида из полимерных микросфер в течение 30 дней.

Установлены параметры технологического процесса получения полимерных микросфер с учетом анализа рисков. Проведена стандартизация технологии, позволяющей получать на каждой стадии производства полупродукт с заданными значениями показателей качества.

Впервые теоретически обоснован состав растворов коеновой кислоты, предложены показатели качества инъекционного раствора. Проведен трансфер технологии получения растворов коеновой кислоты для инъекций в ампулах на опытно-производственный участок на основании анализа рисков.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую деятельность кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (акт о внедрении от 15.02.2022), деятельность фармацевтических компаний ООО «Фарма Ген» (акт апробации от 15.10.2021) и ООО «НПК «СФЕРА» (акт апробации от 17.08.2021).

Методология и методы исследования. Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается использованием современных методов исследования, аппаратного и приборного оснащения.

Методология работы складывается из выполнения комплекса теоретических, физико-химических, технологических, биофармацевтических методов исследований, обеспечивающих получение лекарственной формы надлежащего качества.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методами математической статистики.

Положения, выносимые на защиту. На защиту выносятся следующие положения и результаты, определяющие новизну и практическую значимость исследования:

1. Технология способа получения полимерных микросфер: технологическая схема производства, контрольные критические точки производства, проект спецификации качества на полимерные микросферы.

2. Профили кинетики сорбции и динамики высвобождения доксорубицина гидрохлорида полимерными микросферами.

3. Физико-химические и технологические характеристики субстанции коеновой кислоты, проект спецификации качества на субстанцию коеновой кислоты.

4. Технология растворов коеновой кислоты и результаты исследования их стабильности,

проект спецификации качества на инъекционные растворы коеновой кислоты.

5. Состав и технология комбинированного лекарственного средства на основе лиофилизата микросфер с доксорубицином гидрохлоридом и инъекционного раствора коеновой кислоты. Технологическая схема и проект спецификации качества на комбинированное лекарственное средство.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Достоверность и обоснованность результатов исследования подтверждена воспроизводимостью данных, использованием современных методов анализа, методов статистической обработки результатов, применением поверенного и аттестованного аналитического оборудования и средств измерений.

Основные результаты работы диссертации соискателем были представлены на IX, X, XI, XII Всероссийских научных конференциях студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», (Санкт-Петербург, 2019, 2020, 2021, 2022); VI Всероссийской научно-практической конференции «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, 2018 г.); Международной научно-практической конференции «Внедрение результатов инновационных разработок: проблемы и перспективы» (Екатеринбург, 2019 г.); 1-ом и 2-м Международном симпозиуме «Инновации в науках о жизни» (Белгород, 2019 г., 2022 г.); III Международной научно-практической конференции «Абу Али Ибн Сино и инновации в современной фармацевтике» (Ташкент, 2020 г.); XVI научно-практической конференции молодых ученых и студентов ГОУ ТГМУ им. Абуали ибни Сино «Новые проблемы медицинской науки и перспективы их решений» (Душанбе, 2021 г.); Международной выставке и форуме по фармацевтике и биотехнологиям IPhEB Russia 2022 (Санкт-Петербург, 2022 г.).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 12 работ, из них 2 – в журналах, входящих в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Минобрнауки России», 2 – в журналах, индексируемых SCOPUS и Web of Science.

Связь задач исследования с планом фармацевтических наук. Исследование выполнено в соответствии с планом исследовательских работ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках темы: «Разработка технологий производства, методов анализа, стандартизации и фармакологической оценки лекарственных растений, новых или модифицированных фармацевтических субстанций и препаратов» (государственная регистрация № 01201252028).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств, а именно: пункту 2 – Проектирование и разработка технологий получения фармацевтических субстанций и лекарственных форм, утилизация производственных отходов с учетом экологической направленности. Стандартизация и валидация процессов и методик, продуктов и материалов. Оптимизация организационных и технологических процессов при разработке и получении лекарственных средств; пункту 4 – Организация фармацевтической разработки. Трансфер (перенос) фармацевтических технологий и аналитических методик из научных лабораторий в промышленное производство.

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов. Автор принимал непосредственное участие в выборе темы и постановке цели исследования. Автор лично планировал ход экспериментальной работы, выполнил весь спектр исследований и произвел обобщение полученных результатов. Автором самостоятельно проведена обработка и интерпретация полученных экспериментальных данных. На базе ООО «Фарма Ген» выполнены работы по получению опытно-промышленной партии растворов коеновой кислоты и полимерных микросфер. Доля участия автора составляет не менее 90%. Диссертация представляет собой научный труд, включающий исследования автора за период с 2018 по 2022 год.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертационная работа изложена на 170 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 40 рисунками и 24 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, 6 глав экспериментальных исследований, заключения, списка сокращений, списка литературы, включающего 113 источников (из них 32 на иностранных языках) и приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы приведена сравнительная характеристика эмболизирующих материалов для эндоваскулярной хирургии и перспектива использования микросфер в данной области. Представлена характеристика коеновой кислоты и направления ее фармакологической активности, в частности, доказанная анальгетическая эффективность.

Обзор литературы также содержит анализ современных технологических аспектов производства инъекционных лекарственных форм и особенности разработки парентеральных препаратов в рамках действующего предприятия с учетом концепции Quality-by-Design.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Объектами исследования стали полимерные микросферы на основе этилакрилата и винилацетата размерных диапазонов 55-70 мкм, 80-105 мкм, 125-145 мкм, 160-200 мкм, субстанция коеновой кислоты (ООО «Фарма Ген», Россия), доксорубицина гидрохлорид (Доксорубин-ЛЭНС, АО «Верофарм», Россия), используемый в исследовании в качестве цитостатического препарата, и вспомогательные вещества для разработки растворов коеновой кислоты – натрия гидрокарбонат (Panreac, Германия) и натрия гидроксид (Panreac, Германия).

Количественное содержание веществ в образцах определяли методом спектрофотометрии при помощи спектрофотометра СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе жидкостном/ионном «Стайер» (НПК «Аквилон», Россия).

Полученные результаты исследования обрабатывали методами математической статистики в соответствии с рекомендациями ГФ РФ XIV ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

Глава 3. Стандартизация технологии получения полимерных микросфер

Исследуемые полимерные микросферы получают путем сополимеризации винилацетата с метилакрилатом. Они представляют собой лиофилизированный порошок белого цвета из сферических гидрофильных частиц разных размерных диапазонов.

Полимерные микросферы используют для эмболизации – локальной искусственной окклюзии (закупорки) кровеносного канала с целью ограничения или прекращения питания тканей, в которых наблюдается развитие нежелательного образования.

Наиболее эффективным методом эмболизации является химиоэмболизация, которая предполагает предварительное насыщение полимерных микросфер лекарственным средством, что позволяет параллельно с тромбированием угнетать опухоль, уничтожая ее клетки.

В результате проведенного анализа существующего способа получения полимерных микросфер установлено отсутствие четких границ технологических параметров ведения процесса и контрольных точек производства, в следствии чего, качество готового продукта было непостоянным и сложно прогнозируемым. Контроль качества готовых полимерных микросфер был осложнен отсутствием регламентированных методик, описания контролируемых параметров и спецификации качества на готовую продукцию.

Поскольку полимерные микросферы являются перспективным продуктом для фармацевтического рынка, было принято решение провести совершенствование технологии их получения с целью стандартизации процесса производства.

В рамках данной работы была разработана технологическая схема получения микросфер с постадийным контролем, а также определены и изучены потенциальные опасные риски, связанные с технологическим процессом.

В ходе изучения и стандартизации производства полимерных микросфер был использован метод анализа рисков ХАССП (Hazard Analysis and Critical Control Points (НАССП)). При реализации данного метода анализа рисков в рамках стандартизации технологического процесса было проведено 7 этапов:

1 этап: проведен анализ опасностей для каждой стадии технологического процесса на основании анализа процессуальной схемы, в результате была составлена технологическая схема;

2 этап: определены критические контрольные точки для каждой технологической стадии;

3 этап: установлены критические пределы приемлемости для критических контрольных точек;

4 этап: в результате повторения экспериментов были предложены и апробированы методы контроля контрольных критических точек;

5 этап: установлены корректирующие действия для процесса получения полимерных микросфер при нахождении значений параметров критических контрольных точек вне пределов приемлемости, определены значения параметров критических контрольных точек, при достижении которых не целесообразно применять корректирующие действия;

6 этап: проведена отработка технологии с контролем критических контрольных точек на 9 сериях;

7 этап: разработаны шаблоны заполняемых рабочих документов для ведения записей и мониторинга технологического процесса.

В соответствии с технологической схемой и описанием стадий производства при помощи инструментов метода ХАССП были определены контрольные критические точки основного производственного процесса полимерных микросфер (табл. 1).

Таблица 1 – Критические контрольные точки производства полимерных микросфер

Наименование операции	Критические контрольные точки	Значения критических контролируемых параметров и показателей качества	Методы контроля
ТП.4 Полимеризация	температура реакционной массы	68-72°C	контактная термометрия
	скорость перемешивания	в соответствии с техническим заданием	контроль при помощи датчика измерения скорости мешалки
	внешний вид частиц	сферическая форма, целостность частиц, частицы не слипаются между собой	микроскопия
ТП.6 Сепарация	размер частиц	от 0,1 до 3000 мкм (в соответствии с техническим заданием)	микроскопия
ТП.7 Гидролиз полимерных частиц щелочью	внешний вид частиц	сферическая форма, целостность частиц	микроскопия
	размер частиц	увеличение размера частиц при насыщении физ. раствором в 3-4 раза	
ТП.8 Концентрирование дисперсии частиц и отмывка этанолом	насыщаемость	равномерное насыщение доксорубицина гидрохлоридом	микроскопия
	внешний вид частиц	частицы не слипаются между собой, отсутствуют побочные продукты синтеза	
	показатель сорбции	сорбция доксорубицина гидрохлорида не менее 95% (при насыщении микросфер доксорубицина гидрохлоридом 1:2)	спектрофотометрия
ТП.9 Розлив и укупорка флаконов	объем наполнения флакона	в соответствии с техническим заданием	калиброванный цилиндр
ТП.10 Лиофилизация	внешний вид частиц	сферическая форма, целостность частиц	микроскопия
	насыщаемость	равномерное насыщение доксорубицина гидрохлоридом	микроскопия
	показатель сорбции	сорбция доксорубицина гидрохлорида не менее 95% (при насыщении микросфер доксорубицина гидрохлоридом 1:2)	спектрофотометрия
ТП.12 Радиационная стерилизация	стерильность	стерильность	в соответствии с ГФ
	пирогенность	апирогенность	в соответствии с ГФ
	внешний вид частиц	сферическая форма, целостность частиц	микроскопия
	насыщаемость	равномерное насыщение доксорубицина гидрохлоридом	микроскопия
	показатель сорбции	сорбция доксорубицина гидрохлорида не менее 95% (при насыщении микросфер доксорубицина гидрохлоридом 1:2)	спектрофотометрия

Мониторинг контрольных критических точек производства полимерных микросфер показал, что ряд стадий требуют повышенного внимания к полученному полупродукту. В частности, ТП.4

Полимеризация, ТП.10 Лиофилизация и ТП.12 Радиационная стерилизация отличаются тем, что при получении некondиционного полупродукта на данных стадиях он подвергается утилизации вследствие необратимости проводимых технологических процессов.

В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи и на основании выявленных критических контрольных точек производства был разработан проект спецификации качества на полимерные микросферы (табл. 2).

Таблица 2 – Проект спецификации качества на полимерные микросферы

Наименование показателя	Метод определения	Требования
Описание	органолептический	лиофилизат белого цвета, без запаха
Однородность массы	в соответствии с ГФ	25+1,25 мг или 50+2,5 мг
Размер микросфер	микроскопия	55-70 мкм, или 80-105 мкм, или 125-145 мкм, или 160-200 мкм; содержание микросфер, не входящих в размерный диапазон, не более 10%
Остаточное количество спирта	в соответствии с ГФ	не более 0,5%
Потеря в массе при высушивании	в соответствии с ГФ	не более 0,5%
Насыщаемость	насыщение раствором доксорубина гидрохлоридом, микроскопия	микросферы должны быть равномерно окрашены доксорубина гидрохлоридом
Показатель сорбции	насыщение раствором доксорубина гидрохлорида, спектрофотометрия	сорбция доксорубина гидрохлорида не менее 95% (при насыщении микросфер доксорубина гидрохлоридом 1:2)
Герметичность	в соответствии с ГФ	флаконы должны быть герметичными
Стерильность	в соответствии с ГФ	микросферы должны быть стерильными
Пирогенность	в соответствии с ГФ	микросферы должны быть апиrogenными
Упаковка	в соответствии с ГФ	флакон из стекла 1-ого гидролитического класса, пробка резиновая, колпачок комбинированный
Хранение	в соответствии с ГФ	при температуре +15-25°C, в защищенном от света месте
Срок годности	3 года	

В ходе проведения испытаний установлено, что полученные по стандартизованной технологии полимерные микросферы соответствуют требованиям данной спецификации.

Одним из основных критических параметров для анализа полупродукта и готового продукта является показатель сорбции, определяющий возможность насыщения полимерных микросфер лекарственным средством.

Изучение кинетики сорбции проводили путем насыщения микросфер раствором доксорубина гидрохлорида. Данный препарат позволяет сделать количественный и качественный анализ насыщения микросфер, поскольку раствор доксорубина гидрохлорида имеет яркое оранжево-красное окрашивание.

В ходе исследования 25 мг микросфер насыщали 50 мг доксорубина гидрохлорида. Кинетику сорбции лекарственного средства полимерными микросферами исследовали на микросферах размерных диапазонов: 55-70 мкм, 80-105 мкм, 125-145 мкм, 160-200 мкм. Результаты представлены на рис. 1.

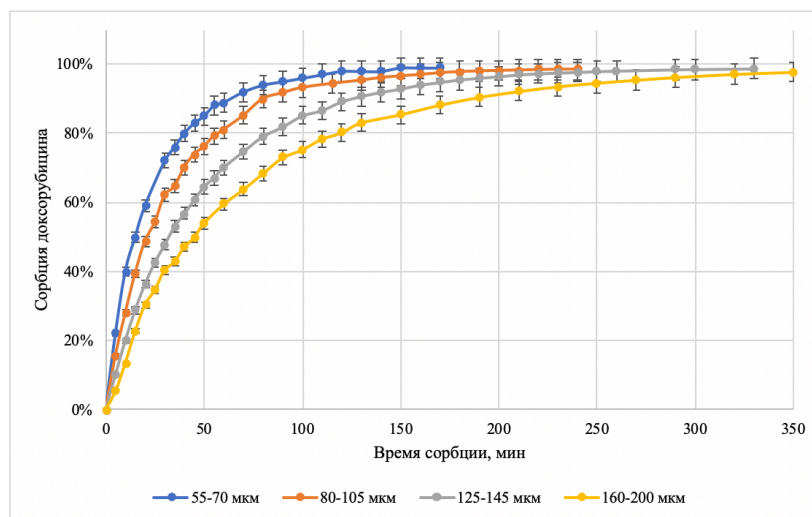


Рисунок 1 – Кривые сорбции доксорубина гидрохлорида микрофферами различного диаметра

Согласно полученным кривым сорбции (рис. 1) наиболее быстро насыщаются доксорубина гидрохлоридом микрофферы размерного ряда 55-70 мкм (95% за 1,5 ч), медленнее всего сорбируют лекарственное вещество микрофферы с диаметром 160-200 мкм (95% за 4,2 ч).

Анализируя полученные результаты, можно сделать выводы о зависимости скорости насыщения полимерных микроффер доксорубина гидрохлоридом от их размера, а именно: чем меньше диаметр микроффер, тем быстрее они сорбируют лекарственное средство. Это связано с тем, что суммарная площадь поверхности микроффер увеличивается с уменьшением их диаметра.

Однако, чтобы удостовериться в функциональных свойствах полимерных микроффер, исследовали динамику высвобождения полимером лекарственного средства. Для этого была разработана методика проведения десорбции с учетом таких параметров, как: растворитель (среда для десорбции) и его замена в модельной системе, интенсивность перемешивания, температура.

Были предложены условия, максимально приближенные к условиям высвобождения доксорубина гидрохлорида из полимерных микроффер при закупоривании артерии. В качестве среды десорбции использовали стерильный 0,9% раствор натрия хлорида. Поскольку при окклюзии артерии местное кровоснабжение нарушается, опытным путем была установлена скорость перемешивания, при которой сферы находятся в состоянии покоя и лишь слегка омываются надосадочной жидкостью (50 об/мин). Ежедневно часть надосадочной жидкости заменяли для предотвращения достижения равновесной концентрации доксорубина гидрохлорида в растворе.

Апробация данной методики показала, что микрофферы в данных условиях проведения десорбции остаются целостными и сферичными, постепенно высвобождая доксорубина гидрохлорид. Данную методику использовали при дальнейших исследованиях полимерных микроффер.

Изучение динамики десорбции доксорубина гидрохлорида из полимерных микроффер проводили на микрофферах размерных диапазонов: 55-70 мкм, 80-105 мкм, 125-145 мкм, 160-200 мкм. Предварительно 25 мг микроффер насыщали 50 мг доксорубина гидрохлорида. Результаты представлены на рис. 2.

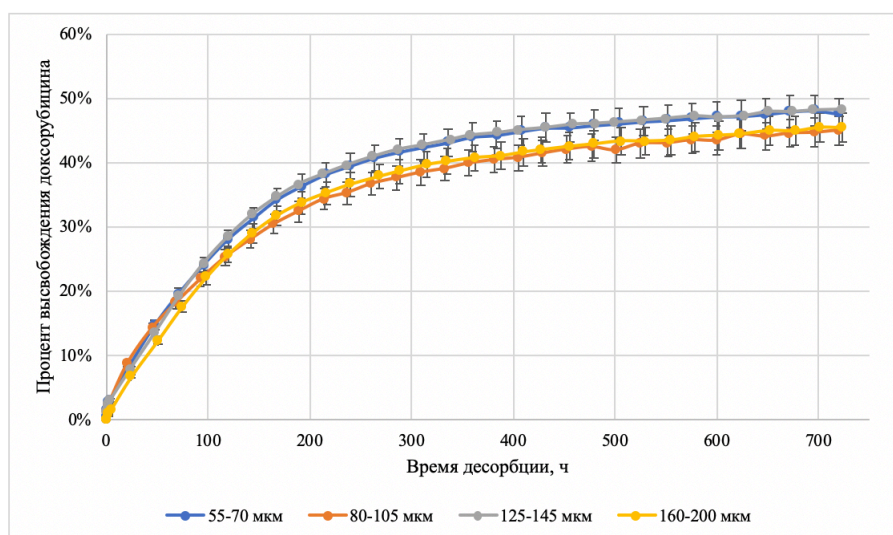


Рисунок 2 – Кривые десорбции доксорубина гидрохлорида микро сферами различного диаметра

Из рис. 2 видно, что в первую неделю из микро сфер высвобождается около 30% доксорубина гидрохлорида, что соответствует 15 мг лекарственного средства, затем процесс десорбции замедляется и за 30 дней в среду растворителя переходит около 45% лекарственного средства. Это свидетельствует о том, что функциональные свойства исследуемых полимерных микро сфер не нарушены в ходе их получения по стандартизированной технологии.

Анализируя кривые десорбции (рис. 2), можно сделать вывод об отсутствии зависимости скорости высвобождения доксорубина гидрохлорида из полимерных микро сфер от их размерного диапазона.

Было интересно сравнить полученные результаты исследования высвобождения лекарственного средства из изучаемых микро сфер с динамикой процесса десорбции доксорубина гидрохлорида из широко используемых в области рентгенохирургии микро сфер Herasphere/QuadraspHERE, выпускаемых фирмой Merit Medical, South Jordan, UT. Они представляют собой сферические частицы из полимера (SAP) (амин-акрилат). Согласно научным источникам, при схожих условиях насыщения доксорубина гидрохлоридом и использовании в качестве среды десорбции 0,9% раствора натрия хлорида данные микро сферы размерного ряда 50-100 мкм (в ненасыщенном состоянии) высвобождали около 44% доксорубина гидрохлорида за 28 дней, что сопоставимо с изучаемыми в нашей работе микро сферами.

Таким образом, показано, что исследуемые полимерные микро сферы могут являться перспективным продуктом для импортозамещения иностранного средства для эмболизации Herasphere/QuadraspHERE.

Глава 4. Изучение субстанции коеновой кислоты

Поскольку хирургические вмешательства с использованием полимерных микро сфер и заболевания, для которых используются методы терапии с их применением, сопровождаются сильными болями, особый интерес представляет получение комбинированного лекарственного средства на основе полимерных микро сфер и коеновой кислоты, обладающей высокой анальгетической активностью.

Так как данная комбинация предполагает разработку и изучение растворов коеновой кислоты, были исследованы физико-химические и технологические свойства субстанции, наиболее важные для производства растворов для парентерального применения.

В качестве объекта исследования использовали субстанцию, полученную на базе фармацевтического предприятия ООО «Фарма Ген».

В ходе изучения физико-химических свойств субстанции коеновой кислоты установлено, что она мало растворима в большей части исследуемых растворителей, применяемых для получения парентеральных лекарственных средств, что свидетельствует о целесообразности использования вспомогательных веществ, повышающих растворимость коеновой кислоты при разработке парентеральной лекарственной формы.

Установлено, что субстанция коеновой кислоты обладает удовлетворительными технологическими свойствами для получения парентерального лекарственного средства: постоянной насыпной плотностью, незначительной потерей в массе при высушивании, удовлетворительной сыпучестью.

В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи (ОФС.1.1.0006.15) был разработан проект спецификации качества на субстанцию коеновой кислоты (табл. 3).

Таблица 3 – Проект спецификации качества на субстанцию коеновой кислоты

Наименование показателя	Метод определения	Требования
Описание	органолептический	мелкокристаллический порошок белого цвета с желто-серым оттенком с легким специфическим запахом
Растворимость	в соответствии с ГФ	мало растворима в воде и этаноле 96%
Прозрачность	в соответствии с ГФ	раствор должен быть прозрачным
Цветность	в соответствии с ГФ	раствор должен выдерживать сравнение с эталоном Y ₃
pH	потенциометрический	от 4,0 до 6,0
Количественное содержание коеновой кислоты	ВЭЖХ; в соответствии с ГФ	не менее 97%
Примеси идентифицируемые	ВЭЖХ; в соответствии с ГФ	не более 2,5%
Примеси неидентифицируемые	ВЭЖХ; в соответствии с ГФ	не более 0,5%
Подлинность	ВЭЖХ; в соответствии с ГФ	время удерживания основного пика должно соответствовать времени удерживания пика раствора РСО
Потеря в массе при высушивании	в соответствии с ГФ	не более 0,5%
Тяжелые металлы	в соответствии с ГФ	не более 0,001%
Сульфатная зола	в соответствии с ГФ	не более 0,1%
Остаточное количество спирта	в соответствии с ГФ	не более 0,5%
Микробиологическая чистота	в соответствии с ГФ	общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) не более 10 ² КОЕ в 1 г; отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г; отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г; отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г
Пирогенность	в соответствии с ГФ	субстанция должна быть апиrogenна
Упаковка	в соответствии с ГФ	в банках стеклянных из коричневого стекла по 0,5 или 1 кг
Хранение	в соответствии с ГФ	при температуре +8-15°C, в защищенном от света месте
Срок годности	2 года	

В ходе проведения исследований использовалась субстанция, прошедшая контроль качества по показателям проекта спецификации.

Глава 5. Разработка технологии получения растворов коеновой кислоты

Для изучения влияния составов растворов коеновой кислоты на их стабильность исследования первоначально проводили в лабораторных условиях. После этого осуществляли трансфер технологии на производственную площадку и изучали стабильность образцов, полученных опытно-промышленным путем.

С точки зрения концепции Quality-by-Design, чтобы знать критические точки и распределение их значений, необходимо изучить влияние максимального количества параметров на стабильность лекарственного препарата. Вследствие этого исследовали стабильность растворов коеновой кислоты в различной первичной упаковке при разных условиях хранения.

Содержание действующего вещества в растворе определяли, основываясь на терапевтических свойствах коеновой кислоты, описанных в литературе, согласно которым предпочтительная доза коеновой кислоты составляет от 0,05 до 300 мг в один или несколько дневных приемов. Превышение дозы 300 мг в сутки нецелесообразно, поскольку анальгетический эффект не увеличивается, но при этом начинает проявляться седативный эффект.

Разработка растворов с концентрацией коеновой кислоты 30 мг/мл и 35 мг/мл была обусловлена пролонгированным действием коеновой кислоты при модифицированном высвобождении из полимерных микросфер. Также были разработаны составы растворов с концентрациями коеновой кислоты 10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл и 25 мг/мл, введение которых возможно в качестве раствора для инъекций.

В связи с малой растворимостью коеновой кислоты было принято решение использовать вспомогательные вещества, повышающие растворимость субстанции, одним из которых, по данным литературы, является натрия гидрокарбонат. Улучшение растворимости в данном случае основано на переводе коеновой кислоты в солевую форму. Согласно научной литературе, данный процесс не влияет на фармакологический эффект субстанции. Полученные составы растворов коеновой кислоты представлены в табл. 4.

Таблица 4 – Состав растворов коеновой кислоты с натрия гидрокарбонатом

Компоненты	Состав на 100 мл раствора в зависимости от концентрации коеновой кислоты					
	1%	1,5%	2%	2,5%	3%	3,5%
Коеновая кислота, г	1,01	1,52	2,02	2,53	3,03	3,54
Натрия гидрокарбонат, г	0,56	0,83	1,10	1,37	1,65	1,93
Вода для инъекций, мл	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100

Недостатком использования гидрокарбоната натрия в данном случае является выделение диоксида углерода, что может приводить к выбросу коеновой кислоты вместе с образующимся углекислым газом. В связи с этим был разработан состав растворов с альтернативным способом нейтрализации коеновой кислоты – добавлением 10% раствора натрия гидроксида (табл. 5). Гидроксид натрия использовали в виде раствора с целью предотвращения сильного нагрева суспензии коеновой кислоты.

Таблица 5 – Состав растворов коеновой кислоты с натрия гидроксидом

Компоненты	Состав на 100 мл раствора в зависимости от концентрации коеновой кислоты					
	1%	1,5%	2%	2,5%	3%	3,5%
Коеновая кислота, г	1,01	1,52	2,02	2,53	3,03	3,54
Натрия гидроксид, раствор 10%, мл	2,59	3,89	5,17	6,47	7,75	9,05
Вода для инъекций, мл	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100

Для приготовления растворов коеновой кислоты взвешивали 50 г воды для инъекций. В воду добавляли отвешенное количество субстанции коеновой кислоты при постоянном перемешивании. В полученную суспензию добавляли нейтрализатор коеновой кислоты (гидрокарбонат натрия или 10% раствор натрия гидроксида) при постоянном измерении водородного показателя потенциала, раствор постепенно становился прозрачным. Далее добавляли оставшееся количество воды для инъекций и перемешивали в течение 5 минут. При необходимости доводили рН нейтрализатором. Полученные растворы хранили в герметично закрытых стеклянных колбах при температуре +15-25°C.

Для изучения влияния рН разработанных составов на их стабильность были приготовлены растворы с различными диапазонами значений водородного показателя потенциала: 4,0-6,0; 6,0-7,0 и 7,0-8,0.

Полученные образцы представляли собой прозрачные бесцветные или с желтоватым оттенком растворы коеновой кислоты без осадка. В ходе исследования стабильности растворы контролировали по следующим параметрам: внешний вид, рН, количественное содержание коеновой кислоты в растворе.

Установлено, что растворы коеновой кислоты наиболее стабильны в диапазоне значений рН 4,0-6,0. Растворы с рН 6,0-7,0 и 7,0-8,0 с течением времени значительно меняли цветность, в некоторых образцах наблюдалось выпадение осадка. Растворы с концентрациями коеновой кислоты 30 мг/мл (3,0%) и 35 мг/мл (3,5%) наименее стабильны во всех исследуемых диапазонах рН.

Изучение стабильности растворов коеновой кислоты, полученных с использованием гидроксида натрия, проводили с учетом результатов, полученных в ходе изучения стабильности растворов коеновой кислоты, нейтрализованной натрия гидрокарбонатом. При приготовлении образцов исключили концентрации раствора 30 мг/мл (3,0%) и 35 мг/мл (3,5%) как наименее стабильные, исследуемый диапазон рН ограничили значениями 4,0-6,0 – каждый раствор готовили в трех вариантах рН 4,5±0,1; 5,0±0,1, 5,5±0,1. Для доведения значения рН до необходимого использовали нейтрализатор – 10% раствор гидроксида натрия.

Полученные образцы представляли собой прозрачные бесцветные или с желтоватым оттенком растворы коеновой кислоты без осадка. В ходе исследования стабильности растворы контролировали по следующим параметрам: внешний вид, рН, количественное содержание коеновой кислоты в растворе.

Установлено, что исследуемые образцы в течение 30 дней стабильны по показателям внешний вид, рН и количественное содержание коеновой кислоты за исключением образцов с концентрацией 25 мг/мл, в которых выпал осадок.

При сравнении результатов стабильности растворов коеновой кислоты, нейтрализованной натрия гидрокарбонатом и растворов коеновой кислоты, нейтрализованной 10% раствором натрия гидроксида было установлено, что при нейтрализации натрия гидроксидом значения показателя рН растворов более стабильны. Это может быть связано с агрегатным состоянием нейтрализатора. При добавлении в раствор натрия гидрокарбоната реакция нейтрализации и, вместе с тем, повышение рН происходит по мере растворения нейтрализатора в воде, поэтому при недостаточном времени перемешивания рН может измениться уже в готовом растворе. Таким образом, использование нейтрализатора в виде предварительно подготовленного раствора имеет явные преимущества и может рассматриваться в качестве альтернативного способа получения растворов коеновой кислоты.

Глава 6. Изучение стабильности опытно-промышленных партий растворов коеновой кислоты

Проведенные лабораторные испытания растворов коеновой кислоты позволили определить концентрации и диапазон рН, при которых исследуемые растворы наиболее стабильны. В результате трансфера технологий на опытно-промышленный участок были получены составы, соответствующие заданным критериям стабильности: внешний вид, рН и количественное содержание коеновой кислоты, для изучения влияния первичной упаковки и условий хранения на стабильность растворов коеновой кислоты.

Основной технологический процесс производства исследуемых растворов по большей части совпадает с типовой схемой получения парентеральных лекарственных средств. Однако была необходима адаптация технологии разработанных составов под используемые производственные мощности с учетом технологических и физико-химических свойств субстанции.

Наработка опытно-промышленных партий растворов коеновой кислоты была проведена с учетом требований надлежащей производственной практики к производству лекарственных средств для парентерального введения.

В качестве первичной упаковки использовали бесцветные и коричневые ампулы формы D (закрытого типа) из стекла первого гидролитического класса Schott FIOLAX, обладающего хорошими технологическими параметрами, химической нейтральностью, непроницаемостью и прочностью.

Из производственного процесса была исключена стадия финишной стерилизации, что предполагало осуществление розлива растворов коеновой кислоты в асептических условиях. Это связано с тем, что при автоклавировании ампул с раствором коеновой кислоты при температуре 121±1°C под давлением 120 кПа в течение 8 мин (ОФС 1.1.0016.18) наблюдалось изменение цветности и значения рН растворов сразу после стерилизации, что свидетельствует о термоллабильности растворов коеновой кислоты.

В соответствии с рекомендациями Международной ассоциации фармацевтического инжиниринга Евразийского экономического союза (ISPE ЕАЭС) первым этапом трансфера был

проведен аудит производственной площадки для установления соответствия выбранного производственного участка требованиям надлежащей производственной практики.

При переносе технологии с лабораторного оборудования на опытно-промышленный участок был проведен анализ рисков методом FTA (Fault tree analysis), на основании которого определены критические точки процесса получения растворов коеновой кислоты (табл. 6).

Таблица 6 – Критические точки получения растворов коеновой кислоты

Наименование операции	Критические показатели	Диапазон значений	Уровень критичности
ВР.3 Взвешивание сырья			
Взвешивание	масса коеновой кислоты	отклонение $\pm 0,1$ г	К
	масса/объем нейтрализатора	отклонение $\pm 0,1$ г/мл	К
	масса воды для инъекций	отклонение $\pm 0,1$ г	К
ТП.4 Приготовление и фильтрация растворов коеновой кислоты			
Приготовление раствора	скорость перемешивания	220÷250 об/мин	Н
	рН раствора	отклонение $\pm 0,1$	З
	время перемешивания после добавления всех компонентов	10÷15 мин	З
Предварительная фильтрация	целостность фильтра	целостный	Н
	размер пор фильтра	1 мкм	Н
Стерилизующая фильтрация	целостность фильтра	целостный	К
	размер пор фильтра	0,2 мкм	З
ТП.5 Розлив раствора в ампулы			
Розлив раствора в ампулы	объем наполнения	10,5 \pm 0,1 мл	Н
	запайка ампул	отсутствие нагара, визуальная целостность	З

В табл. 6 представлено описание технологических операций, наиболее критических параметров ведения процесса и диапазон возможного отклонения. Также отражена качественная оценка критичности данных операций в соответствии со следующим буквенным выражением уровней критичности:

К – критическое отклонение: может оказать явное влияние на качество, эффективность или безопасность продукции;

З – значительное отклонение: потенциально может вызвать риски в отношении качества, эффективности или безопасности продукции, но не критичное для качества продукции;

Н – незначительное отклонение: не оказывает влияние на качество, эффективность или безопасность продукции, может быть легко устранено в рамках системы качества.

На основании проведенного качественного анализа рисков были разработаны технологические инструкции на производство опытно-промышленных партий растворов коеновой кислоты.

При трансфере технологий для наработки опытно-промышленной партии растворов коеновой кислоты, нейтрализованной натрия гидрокарбонатом, была разработана комбинированная технологическая инструкция, подробно описывающая процесс приготовления и розлива растворов и содержащая заполняемую форму для регистрации оператором значений параметров производственных процессов. В соответствии с разработанной технологической инструкцией было наработано три опытно-промышленной партии растворов коеновой кислоты.

Растворы готовили в помещении класса чистоты С, стерилизующую фильтрацию раствора, розлив в ампулы и запайку осуществляли в зоне А класса чистоты В. Приготовленные растворы фильтровали через предварительный фильтр КФВг.П-100-К-60 из микроволокна полипропилена повышенной прочности (1 мкм). Затем проводили стерилизующую фильтрацию при помощи фильтра МКМ.ПС-020 (полиэфирсульфоновая миникапсула 0,2 мкм).

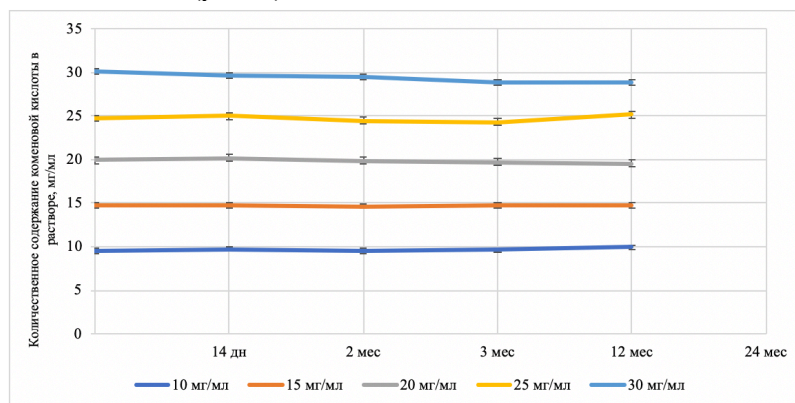
К основным сложностям, возникшим в процессе наработки опытно-промышленной партии растворов коеновой кислоты, можно отнести стадию приготовления растворов, поскольку при добавлении натрия гидрокарбоната наблюдали выделение тепла и активное газо- и пенообразование, вследствие чего возможны потери активного вещества вместе с парами углекислого газа. В связи с этим нейтрализатор к водной суспензии коеновой кислоты добавляли небольшими порциями при постоянном перемешивании.

Полученные образцы были исследованы по показателям качества: описание, механические включения, герметичность, подлинность, количественное содержание коеновой кислоты, pH, стерильность и пирогенность. Некондиционные образцы забраковывали и исключали из дальнейших исследований.

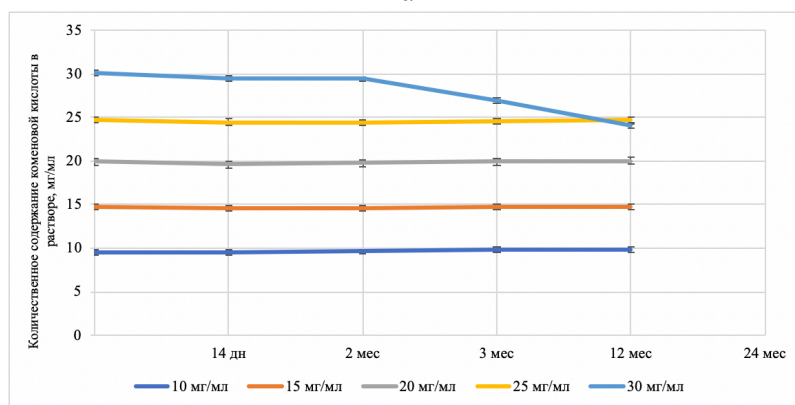
Образцы, прошедшие контроль по показателям качества, закладывали на хранение при разных температурных условиях: +4-8°C, +8-15°C, +15-25°C и изучали стабильность растворов с течением времени.

Для исследования влияния первичной упаковки и условий хранения на стабильность растворов коеновой кислоты образцы, наработанные в рамках опытно-промышленной партии, контролировали по ряду параметров.

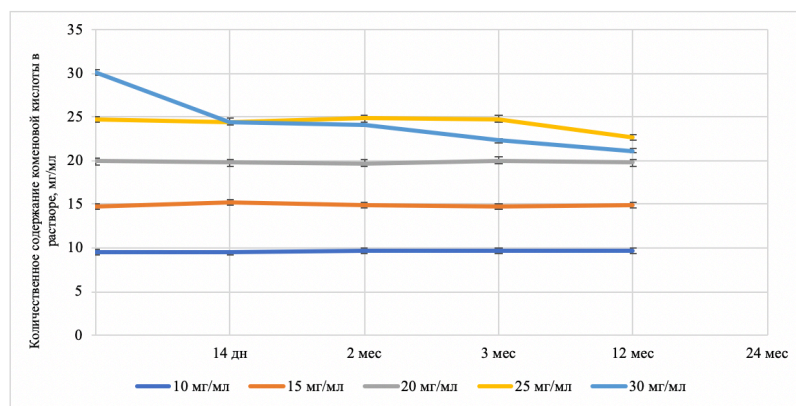
Изучение стабильности растворов коеновой кислоты проводили по следующим критериям: внешний вид, pH, количественное содержание коеновой кислоты, подлинность. Для построения графиков, характеризующих стабильность растворов, исследование образцов по заданным критериям проводили со следующей периодичностью: 1 день (нулевая точка), 2 недели, 2 месяца, 3 месяца, 12 месяцев, 24 месяца (рис. 3).



а



б



В

Рисунок 3 – Кривые стабильности растворов коеновой кислоты при температуре хранения +15-25°C (а), +8-15°C (б), +4-8°C (в) по критерию «количественное содержание коеновой кислоты в растворе» в светлых ампулах

Из рис. 3 видно, что содержание коеновой кислоты в растворе с концентрацией действующего вещества 30 мг/мл спустя 12 месяцев снизилось примерно на 1 мг/мл при температуре хранения +15-25°C, на 5-6 мг/мл при температуре хранения +8-15°C и на 8 мг/мл при температуре хранения +4-8°C. Остальные образцы (10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл и 25 мг/мл) сохраняли стабильность по критерию «количественное содержание коеновой кислоты в растворе».

Установлено, что раствор коеновой кислоты с концентрацией 30 мг/мл (3,0%) нестабилен в изучаемых условиях хранения. Для данной концентрации раствора характерно выпадение осадка спустя две недели после получения раствора и постепенное снижение количественного содержания коеновой кислоты в течение всего срока хранения. В связи со значительными изменениями значений показателей стабильности была проведена идентификация растворов путем проведения испытаний на подлинность (рис. 4).

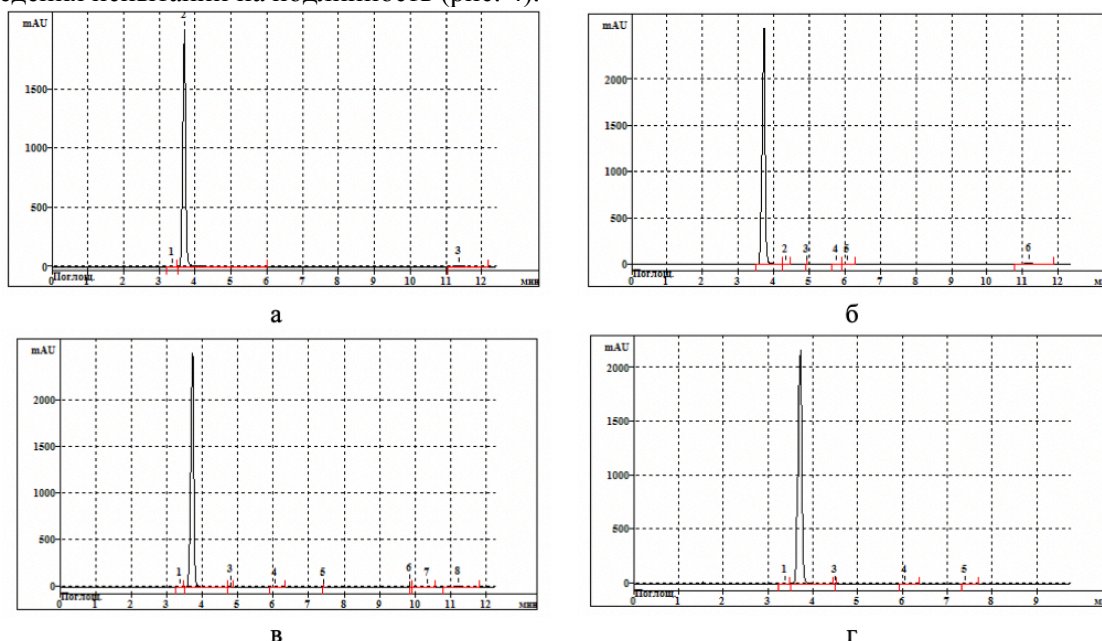


Рисунок 4 – Хроматограмма раствора РСО коеновой кислоты (а), хроматограммы растворов коеновой кислоты 30 мг/мл после хранения в течении 12 месяцев при температуре +15-25°C (б), +8-15°C (в), +4-8°C (г)

На хроматограммах растворов коеновой кислоты 30 мг/мл после хранения в течении 12 месяцев (рис. 4, б,в,г) время удерживания основного пика соответствует времени удерживания на хроматограмме раствора РСО коеновой кислоты (рис. 4, а), что свидетельствует о подлинности растворов. Из этого следует, что, несмотря на выпадение осадка и изменение цветности, химический состав растворов остается неизменным.

Обнаружена следующая закономерность: количество осадка больше в образцах при температуре хранения +4-8°C. Однако в изменении цветности выявлена противоположная

зависимость: интенсивность цветности более выражена в образцах, хранившихся при температуре +15-25°C.

В растворах с концентрациями коеновой кислоты от 10 мг/мл до 25 мг/мл спустя 12 месяцев не выявлено существенных изменений по заданным критериям стабильности. Разницы в стабильности растворов коеновой кислоты при сравнении образцов в ампулах из темного и светлого стекла не наблюдалось.

В дальнейшем планируется получить еще одну точку (24 мес.) для построения кривых стабильности исследуемых растворов.

Для сравнения способов нейтрализации коеновой кислоты была разработана технологическая инструкция на получение опытно-промышленных партий растворов с использованием в качестве нейтрализующего агента 10% раствора натрия гидроксида, в соответствии с которой были наработаны три опытно-промышленные партии растворов коеновой кислоты.

Наработку опытно-промышленных партий растворов коеновой кислоты, нейтрализованной натрия гидроксидом, осуществляли по технологии, аналогичной технологии получения растворов коеновой кислоты, нейтрализованной натрия гидрокарбонатом. Из опыта был исключен раствор коеновой кислоты с концентрацией 30 мг/мл из-за его нестабильности в ходе хранения.

В отличие от технологии получения растворов коеновой кислоты с натрия гидрокарбонатом использование в качестве нейтрализатора 10% раствора натрия гидроксида предполагает увеличение числа операций на стадии ТП.4.1 Приготовление раствора коеновой кислоты, поскольку требуется предварительная подготовка раствора нейтрализатора и его охлаждение. Однако к существенным преимуществам 10% раствора натрия гидроксида можно отнести отсутствие пенообразования и выделения тепла при приготовлении растворов коеновой кислоты. Это может стать критерием для выбора данного способа нейтрализации при масштабировании производственных процессов.

Исследование стабильности растворов коеновой кислоты, нейтрализованной 10% раствором натрия гидроксида, проводили аналогично исследованию стабильности растворов коеновой кислоты, нейтрализованной натрия гидрокарбонатом.

Спустя два месяца в исследуемых растворах коеновой кислоты не выявлено существенных изменений по заданным критериям стабильности.

В дальнейшем планируется получить еще три точки (3, 12, 24 мес.) для построения графиков стабильности исследуемых растворов.

В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи к лекарственным формам для парентерального применения был разработан проект спецификации качества на инъекционный раствор коеновой кислоты (табл. 7).

Таблица 7 – Проект спецификации качества на инъекционный раствор коеновой кислоты

Наименование показателя	Метод определения	Требования
Описание	органолептический	прозрачная жидкость от бесцветного до желтоватого цвета без запаха
pH	потенциометрический	от 4,0 до 6,0
Прозрачность	в соответствии с ГФ	раствор должен быть прозрачным
Цветность	в соответствии с ГФ	раствор должен выдерживать сравнение с эталоном Y ₃
Количественное содержание коеновой кислоты, мг/мл	ВЭЖХ	для концентрации 10 мг/мл – от 9 до 11 мг/мл; для концентрации 15 мг/мл – от 13,5 до 16,5 мг/мл; для концентрации 20 мг/мл – от 18 до 22 мг/мл; для концентрации 25 мг/мл – от 22,5 до 27,5 мг/мл; для концентрации 30 мг/мл – от 27 до 33 мг/мл
Подлинность	ВЭЖХ	время удерживания основного пика должно соответствовать времени удерживания пика раствора РСО
Механические включения	в соответствии с ГФ	раствор должен соответствовать требованиям ГФ
Герметичность	в соответствии с ГФ	ампулы должны быть герметичными
Стерильность	в соответствии с ГФ	раствор должен быть стерильным
Пирогенность	в соответствии с ГФ	раствор должен быть апиrogenным

Упаковка	в соответствии с ГФ	ампулы из стекла 1-го гидролитического класса (темные или светлые)
Хранение	–	+8-15°C
Срок годности	2 года	

Разработанная спецификация содержит 13 показателей качества, по которым следует контролировать инъекционный раствор коеновой кислоты. В ходе наработки опытно-промышленных партий образцов растворов коеновой кислоты все растворы соответствовали требованиям спецификации за исключением раствора коеновой кислоты, нейтрализованной натрия гидрокарбонатом, с концентрацией 30 мг/мл (3,0%), вследствие чего данный опытный образец был исключен из дальнейших исследований.

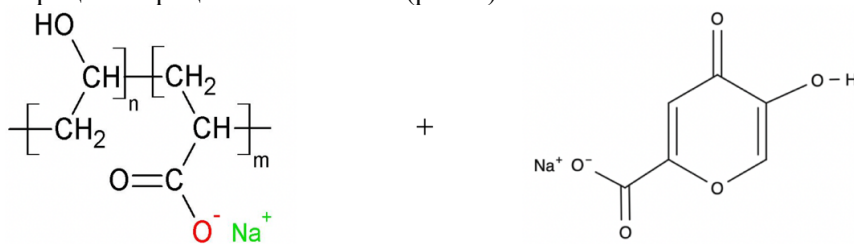
Глава 7. Разработка комбинированного лекарственного средства на основе микросфер с доксорубицина гидрохлоридом и инъекционного раствора коеновой кислоты

Проведенный анализ литературных данных показал перспективность создания комбинации на основе полимерных микросфер с доксорубицина гидрохлоридом и коеновой кислоты как лекарственного средства для химиоэмболизации.

На первом этапе исследования микросферы насыщали раствором коеновой кислоты, изучали надосадочную жидкость в течение трех месяцев, определяя количественное содержание коеновой кислоты и подлинность.

В ходе эксперимента наблюдали насыщение раствором микросфер, однако в процессе контроля надосадочной жидкости было установлено, что микросферы насыщены растворителем, но коеновая кислота микросферами не сорбируется.

При анализе данного процесса было сделано предположение о том, что функциональные группы микросфер и коеновой кислоты имеют одинаковый (отрицательный) ионный заряд, в следствие чего процесс сорбции не возможен (рис. 5).



Формула звена полимерной микросферы

Формула натриевой соли коеновой кислоты

Рисунок 5 – Структура коеновой кислоты и полимерных микросфер

В связи с этим в составе комбинированного препарата раствор коеновой кислоты использовался в виде инъекционного раствора в ампулах.

Известно, что в химиоэмболизации для насыщения микросфер используют цитостатические лекарственные средства, в частности доксорубицина гидрохлорид. Насыщение микросфер препаратом, как правило, производится специалистами в лечебных учреждениях непосредственно перед применением. Такая подготовка многостадийна (растворение лиофилизата доксорубицина гидрохлорида в физиологическом растворе, введение раствора доксорубицина гидрохлорида во флакон с микросферами, выдержка микросфер в растворе доксорубицина гидрохлорида для насыщения) и занимает не менее 2 часов. С целью оптимизации времени и стандартизации предоперационной подготовки была разработана готовая лекарственная форма, представляющая собой микросферы, насыщенные доксорубицина гидрохлоридом.

Для увеличения стабильности в процессе хранения микросферы, насыщенные доксорубицина гидрохлоридом в соотношении 1:2 (микросферы:доксорубицина гидрохлорид), сушили путем лиофилизации. В ходе исследования было получено четыре варианта исполнения сухих микросфер с доксорубицина гидрохлоридом в соответствии со схемой, изображенной на рис. 6.

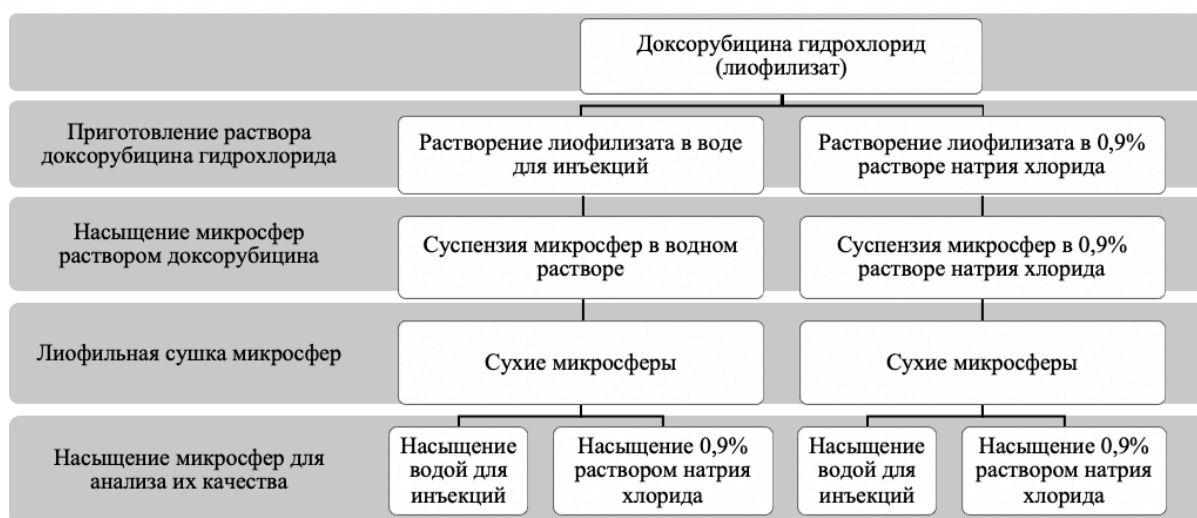
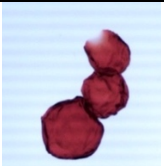
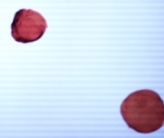
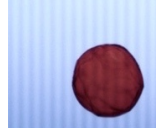



Рисунок 6 – Схема получения микросфер с доксорубицина гидрохлоридом

Получение микросфер с доксорубицина гидрохлоридом начинали с подготовки раствора доксорубицина. Для этого лиофилизат препарата растворяли в воде для инъекций или физиологическом растворе. Затем проводили насыщение микросфер доксорубицина гидрохлоридом, после чего осуществляли лиофильную сушку микросфер.

Для проверки качества полученные микросферы насыщали растворителями: водой для инъекций или физиологическим раствором и анализировали внешний вид полученных частиц методом микроскопии (табл. 8).

Таблица 8 – Варианты исполнения полимерных микросфер, насыщенных доксорубицина гидрохлоридом

Вариант исполнения	Фотографическое изображение, увеличение в 40 раз	Наблюдения
1. Доксорубицина гидрохлорид + 0,9% раствор натрия хлорида + микросферы ⇒ сушка ⇒ сухие микросферы с доксорубицина гидрохлоридом + 0,9% раствор натрия хлорида		Наблюдали значительную деформацию микросфер, сферичность частиц была нарушена, однако частицы при насыщении после сушки были эластичными и ярко окрашенными доксорубицина гидрохлоридом.
2. Доксорубицина гидрохлорид + 0,9% раствор натрия хлорида + микросферы ⇒ сушка ⇒ сухие микросферы с доксорубицина гидрохлоридом + вода для инъекций		
3. Доксорубицина гидрохлорид + вода для инъекций + микросферы ⇒ сушка ⇒ сухие микросферы с доксорубицина гидрохлоридом + вода для инъекций		Наблюдали небольшую деформацию микросфер, сферичность частиц менее нарушена, в сравнении с вариантами исполнения 1 и 2.
4. Доксорубицина гидрохлорид + вода для инъекций + микросферы ⇒ сушка ⇒ сухие микросферы с доксорубицина гидрохлоридом + 0,9% раствор натрия хлорида		Микросферы эластичны, ярко окрашены доксорубицина гидрохлоридом.

Исследование высушенных после насыщения доксорубицина гидрохлоридом микросфер показало, что в качестве раствора для насыщения предпочтительно использовать водный раствор доксорубицина гидрохлорида для минимизации деформации полимера (табл. 8, вариант исполнения 3 и 4). Полученные таким образом микросферы при насыщении водой почти не отличались по внешнему виду от микросфер, насыщение которых производили 0,9% раствором натрия хлорида. Однако предпочтительным является 4 вариант исполнения, поскольку использование воды для инъекций в качестве «рабочего раствора» (раствора для насыщения микросфер перед введением) может приводить к изменению размера полимера, что приведет к его бесконтрольному перемещению по кровеносным каналам.

На основе выбранной схемы получения насыщенных доксорубицина гидрохлоридом микросфер была разработана технологическая схема их производства (рис. 7).

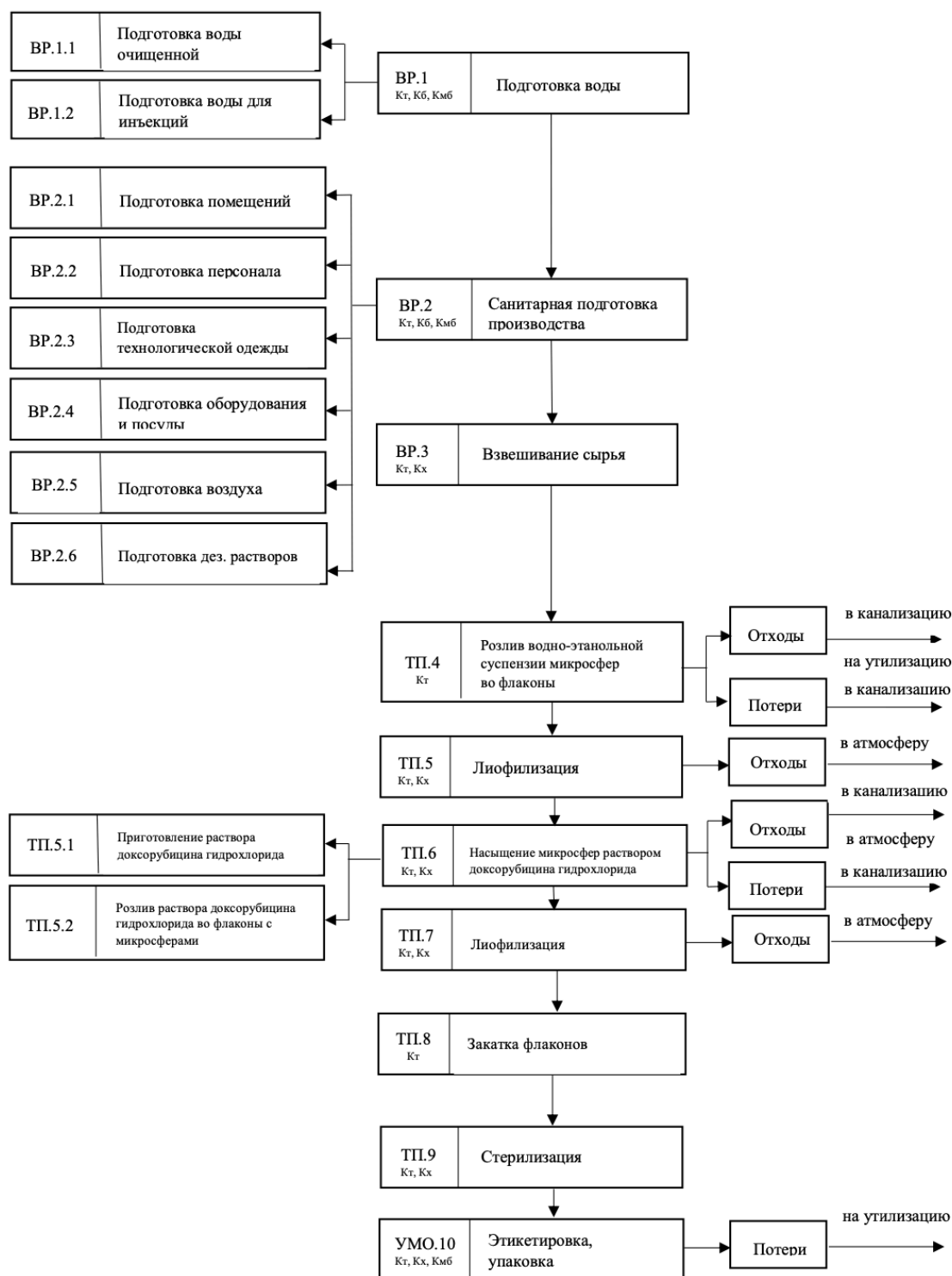


Рисунок 7 – Технологическая схема производства полимерных микросфер, насыщенных доксорубина гидрохлоридом

(Кт, Кх, Кмб – контроль технологический, химический, микробиологический)

В качестве первичной упаковки для насыщенных доксорубина гидрохлоридом микросфер выбраны светлые стеклянные флаконы, резиновая пробка и быстросъемный колпачок flip-off. В качестве первичной упаковки для инъекционного раствора коеновой кислоты используются стеклянные ампулы из темного или светлого стекла.

Один флакон, содержащий 25 мг сухих микросфер размерного ряда 55-70 мкм, или 80-105 мкм, или 125-145 мкм, или 160-200 мкм, насыщенных доксорубина гидрохлоридом, и одну ампулу с раствором коеновой кислоты в дозировке 20 мг/мл объемом 10 мл помещают в пачку картонную с инструкцией. Варианты исполнения готовой лекарственной формы комбинированного препарата представлены в табл. 9.

Таблица 9 – Варианты исполнения готовой лекарственной формы

Характеристики готовой лекарственной формы	Варианты исполнения готовой лекарственной формы
Флакон с лиофилизатом полимерных микросфер с доксорубицина гидрохлоридом	
Типоразмеры полимерных микросфер	Типоразмер 1: 55-70 мкм Типоразмер 2: 80-105 мкм Типоразмер 3: 125-145 мкм Типоразмер 4: 160-200 мкм
Масса полимерных микросфер	25 мг
Содержание доксорубицина гидрохлорида в микросферах	50 мг
Ампула с инъекционным раствором коеновой кислоты	
Концентрации растворов коеновой кислоты	20 мг/мл
Объем раствора в ампуле	10 мл

Использование данной комбинации предполагает предварительное насыщение микросфер 0,9% раствором натрия хлорида с последующим введением полученной суспензии локально через катетер с целью эмболизации сосудов и проведения химиотерапии. Раствор коеновой кислоты вводится внутривенно до или после проведения процедуры эмболизации для купирования болевого синдрома. Содержание в растворе 200 мг коеновой кислоты будет обеспечивать высокое анальгетическое действие в течение 6 часов, что позволит проводить процедуру эмболизации, снижая болевые ощущения при проведении процедуры и/или после нее.

В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи был разработан проект спецификации качества на комбинированное лекарственное средство на основе полимерных микросфер с доксорубицина гидрохлоридом и раствора коеновой кислоты. Он включает в себя проект спецификации на инъекционный раствор коеновой кислоты (табл. 7) и проект спецификации на лиофилизированные микросферы, содержащие доксорубицина гидрохлорид (табл. 10).

Таблица 10 – Проект спецификации качества на лиофилизат полимерных микросфер с доксорубицина гидрохлоридом

Наименование показателя	Метод определения	Требования
Описание	органолептический	лиофилизат темно-красного цвета, без запаха
Однородность массы	в соответствии с ГФ	25±1,25 мг
Размер микросфер	микроскопия	Вариант 1: 55-70 мкм Вариант 2: 80-105 мкм Вариант 3: 125-145 мкм Вариант 4: 160-200 мкм Содержание микросфер, не входящих в размерный диапазон, не более 10%
Количественное содержание доксорубицина гидрохлорида	ВЭЖХ; в соответствии с ГФ	50±2,5 мг
Потеря в массе при высушивании	в соответствии с ГФ	не более 0,5%
Герметичность	в соответствии с ГФ	флаконы должны быть герметичными
Стерильность	в соответствии с ГФ	микросферы должны быть стерильными
Пирогенность	в соответствии с ГФ	микросферы должны быть апиrogenными
Упаковка	в соответствии с ГФ	флакон из стекла 1-ого гидролитического класса, пробка резиновая, колпачок комбинированный
Хранение	в соответствии с ГФ	при температуре +15-25°C, в защищенном от света месте
Срок годности		3 года

Проект спецификации на комбинированное лекарственное средство представлен двумя таблицами (табл. 7, 10). В ходе проведения испытаний установлено, что полученное комбинированное лекарственное средство на основе полимерных микросфер с доксирубицина

гидрохлоридом и инъекционного раствора коеновой кислоты соответствует требованиям проекта спецификации.

Заключение

1. Проведена стандартизация способа получения полимерных микросфер с учетом анализа рисков. Представлена технологическая схема производства микросфер, определены и обоснованы контрольные критические точки их получения. Составлен проект спецификации качества на готовые полимерные микросферы.

2. Определена кинетика сорбции доксорубина гидрохлорида полимерными микросферами. Установлена зависимость скорости насыщения полимерных микросфер доксорубина гидрохлоридом от их размера, а именно: скорость насыщения возрастает по мере уменьшения размера и увеличения удельной поверхности микросфер.

Разработана и апробирована методика проведения десорбции доксорубина гидрохлорида из полимерных микросфер. Установлены оптимальные условия для высвобождения доксорубина гидрохлорида микросферами *in vitro* максимально приближенные к высвобождению в организме человека: использование в качестве среды десорбции стерильного 0,9% раствора натрия хлорида; термостатирование при $37 \pm 1^\circ\text{C}$; перемешивание на орбитальном шейкере со скоростью 50 об/мин; ежедневная замена надосадочной жидкости до окончания эксперимента.

Определена динамика десорбции доксорубина гидрохлорида из полимерных микросфер. Установлено отсутствие зависимости скорости высвобождения доксорубина гидрохлорида из полимерных микросфер от их размера в диапазоне от 55 до 200 мкм.

3. Изучены физико-химические и технологические свойства субстанции коеновой кислоты. Установлено, что исследуемая субстанция мало растворима в большей части исследуемых растворителей, применяемых для получения парентеральных лекарственных средств: воде, растворе натрия хлорида 0,9%, растворе глюкозы 5%, бензиловом спирте 1% и 10%, этаноле 50%, что требует введения в состав инъекционного раствора вспомогательных веществ.

Разработан проект спецификации качества на субстанцию коеновой кислоты.

4. Разработан состав растворов для инъекций коеновой кислоты (10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 30 мг/мл, 35 мг/мл) и изучена стабильность растворов, полученных в лабораторных условиях.

Установлено, что растворы коеновой кислоты, нейтрализованные гидрокарбонатом натрия, наиболее стабильны в диапазоне pH 4,0-6,0, в концентрациях от 10 мг/мл до 20 мг/мл, как и растворы коеновой кислоты, нейтрализованные гидроксидом натрия.

Проведен трансфер технологии получения растворов коеновой кислоты для инъекций в ампулах на опытно-производственный участок на основании анализа рисков.

Изучена стабильность опытно-промышленных партий растворов коеновой кислоты с концентрациями от 10 мг/мл до 30 мг/мл при хранении в течение 12 месяцев при температурах $+4-8^\circ\text{C}$, $+8-15^\circ\text{C}$, $+15-25^\circ\text{C}$. Экспериментально обоснована температура хранения растворов коеновой кислоты для инъекций в ампулах из темного или светлого стекла: $+8-15^\circ\text{C}$.

Проведено сравнение способов нейтрализации коеновой кислоты при получении растворов. Установлено, что использование 10% раствора натрия гидроксида в качестве нейтрализатора более технологично по сравнению с нейтрализацией гидрокарбонатом натрия. Однако на стабильность растворов коеновой кислоты исследуемые способы нейтрализации не влияют.

Определены показатели качества для растворов коеновой кислоты, в соответствии с которыми разработан проект спецификации качества на готовый раствор для инъекций на основе коеновой кислоты.

5. Установлено, что при насыщении микросфер раствором коеновой кислоты не возникает процесса сорбции.

Разработана технология получения насыщенных доксорубина гидрохлоридом полимерных микросфер, представлена технологическая схема их производства.

Разработано комбинированное лекарственное средство, предназначенное для применения в области рентгенохирургии, содержащее:

- флакон с лиофилизатом полимерных микросфер размерного ряда 55-70 мкм, 80-105 мкм, 125-145 мкм, 160-200 мкм, насыщенных доксорубина гидрохлоридом в соотношении 1:2, предназначенных для проведения химиоэмболизации;

- ампулу с раствором, содержащим 20 мг/мл коеновой кислоты, предназначенным для внутривенного введения с целью купирования болей.

Разработан проект спецификации качества на комбинированное лекарственное средство на основе полимерных микросфер с доксорубицина гидрохлоридом и инъекционного раствора коеновой кислоты.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Биткина, Т.А.** Разработка состава и технологии комбинированного лекарственного средства на основе микросфер с доксорубицина гидрохлоридом и коеновой кислоты / **Т.А. Биткина, А.В. Басевич** // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 2. – С. 115-122.

2. **Биткина, Т.А.** Исследование полимерных микросфер как перспективного эмболизационного материала и носителя лекарственных веществ / **Т.А. Биткина, А.В. Басевич, И.Е. Каухова, В.А. Вайнштейн** // Innovations in life sciences: сборник материалов IV международного симпозиума, г. Белгород, 25-27 мая 2022 г. – С. 202-203.

3. **Биткина, Т.А.** Разработка и изучение стабильности растворов коеновой кислоты / **Т.А. Биткина, А.В. Басевич** // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10, № 4 (Приложение 1). – С. 108-114.

4. **Биткина, Т.А.** Разработка методики десорбции лекарственного вещества из полимерных микросфер / **Т.А. Биткина** // Сборник материалов XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего», 15 марта – 23 апреля 2021 г.: в 2 т. Т.1. – СПб.: Изд-во СПХФУ. – 2021. – С. 120-123.

5. **Биткина, Т.А.** Актуальность включения лекарственных средств в полимерные микросферы / **Т.А. Биткина, А.В. Басевич** // Сборник материалов XVI Научно-практической конференции молодых ученых и студентов ГОУ ТГМУ им. Абуали ибни Сино «Новые проблемы медицинской науки и перспективы их решений», Душанбе, 2021. – С. 348-349.

6. **Биткина, Т.А.** Актуальность разработки изделий медицинского назначения для рентгенохирургии / **Т.А. Биткина, А.В. Басевич** // Абу Али ибн Сино и инновации в современной фармацевтике: сборник III международной научно-практической конференции, 22.05.2020 Ташкент. – Узбекистан, 2020. – С. 69-70.

7. **Биткина, Т.А.** Критические точки производства полимерных микросфер, используемых в рентгенохирургии / **Т.А. Биткина, А.В. Басевич, В.М. Родин** // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 28-35.

8. **Биткина, Т.А.** Разработка схемы получения полимерных микросфер, предназначенных для эмболизации / **Биткина Т.А.** // Сборник материалов X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего», Санкт-Петербург, 2020. – СПб.: Изд-во СПХФУ. – 2020. – С. 480-483.

9. **Биткина, Т.А.** Внедрение и поддержание системами контроля PIC/S и ЕАЭС гармонизированных стандартов GMP качества производства стерильных лекарственных средств / **Т.А. Биткина, А.В. Басевич, И.Е. Каухова, А.А. Кодаш, Е.М. Смирнова, В.И. Степченков** // Формулы фармации. – 2020. – Т. 2, № 2. – С. 8-19.

10. **Bitkina T.** Audit of the Production of Sterile Medicines for Compliance with the Requirements of the Draft EU GMP Annex 1 with Risk Analysis / **T. Bitkina, A. Kodash, A. Basevich, E. Smirnova, I. Kaukhova** // Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences (ISILS 2019). – 2019. – Т. 7. – С. 153-155.

11. **Биткина, Т.А.** Изучение физико-химических и технологических свойств субстанции – производных гамма-пирона / **Биткина Т.А.** // Сборник материалов IX Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего», Санкт-Петербург, 22–23 апреля 2019. – СПб.: Изд-во СПХФУ. – 2019. – С. 208-210.

12. **Биткина, Т.А.** Обоснование актуальности разработки анальгетического лекарственного средства на основе производных гамма-пирона / **Т.А. Биткина, А.В. Басевич** // Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 14-15 ноября 2018. – СПб.: Изд-во СПХФУ. – 2018. – С. 28-31.