

## ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ГЛФ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Т.В. Будыльская<sup>1</sup>, Д.В. Бырихина<sup>1</sup>, А.И. Государев<sup>1</sup>, В.Д. Гусарова<sup>1</sup>,  
Ф.М. Ижаева<sup>1</sup>, П.В. Михайлов<sup>1</sup>, Д.А. Гусаров<sup>1\*</sup>

**Резюме.** Биофармацевтические препараты, предназначенные для генной терапии, большей частью основаны на суперскрученных плазмидных ДНК, получаемых в клеточных линиях бактерий. Свойства, включая стабильность при хранении, готовых лекарственных форм на основе таких препаратов изучены крайне плохо. В данной статье нами была рассмотрена типичная фармацевтическая разработка готовых лекарственных форм в виде лиофилизата. С помощью валидированного комплекта аналитических методов производился контроль за стабильностью препарата, а также был подобран и оптимизирован состав готовой формы.

**Ключевые слова:** генная терапия, фармацевтическая разработка, суперскрученная плазида, биотехнология.

### PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF FORMULATION BASED ON BIOPHARMACEUTICAL PREPARATIONS FOR GENE THERAPY

T.V. Budylyskaya<sup>1</sup>, D.V. Byrikhina<sup>1</sup>, A.I. Gosudarev<sup>1</sup>, V.D. Gusarova<sup>1</sup>, F.M. Izhaeva<sup>1</sup>, P.V. Mikhailov<sup>1</sup>, D.A. Gusarov<sup>1\*</sup>

**Abstract.** Biopharmaceuticals intended for gene therapy are mostly presented by supercoiled plasmid DNA obtained with bacteria cell lines. The properties of their formulations, including stability under different storage conditions, are barely studied. This article describes the typical pharmaceutical development of freeze-dried gene therapeutics. By means of process analytical technological methods the preparations formulated were controlled during storage. Furthermore, the composition of the formulations was optimized for prolonged storage.

**Keywords:** gene therapy, pharmaceutical development, supercoiled plasmid, biotechnology.

## ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия – это методология коррекции различных дефектов путем введения в клетки организма недостающей или исправляющей генетической информации. На сегодняшний день наиболее безопасный способ подобного рода коррекции – использование плазмид, содержащих в своей структуре экспрессируемые целевые гены, в качестве средства внутригенетической доставки [1]. С этой целью плазмидная ДНК, закодированная в клеточных линиях прокариот, выделяется из продуцента, очищается до сверхвысоких степеней чистоты и формулируется для инъекционного введения. В России одним из наиболее известных препаратов для генной терапии является «Неоваскулген», применяемый для лечения ишемии нижних конечностей [2]. Кроме того, ряд плазмидных препаратов находится в стадии разработки и доклинических/клинических исследований (например, [3]).

Ранее мы описывали разработку технологии получения суперскрученной

плазмидной ДНК [4]. Кратко: продуцент на основе *Escherichia coli* выращивался в биореакторе волнового типа, затем культуру убивали с одновременным кислотным лизисом, перфузионно отделяли маточный раствор от белкового лизат-преципитата, целевой белок в составе маточного раствора последовательно очищали с помощью аффинной, ионообменной и гель-фильтрационной хроматографии с получением сверхчистого материала, который затем формулировали с помощью тангенциальной фильтрации и лиофилизировали. Получаемый в результате продукт – готовая лекарственная форма (ГЛФ) должна быть стабильна в течение длительного срока хранения, а вариант исполнения этой ГЛФ должен обеспечивать препарату стабильность и безопасность.

Цель настоящего исследования – провести фармацевтическую разработку состава ГЛФ на основе препарата из суперскрученной плазмиды, а именно оптимизировать процесс получения ГЛФ, разработать форму и компонентный состав.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Исходное сырье

Активная фармацевтическая субстанция (АФС), содержащая суперскрученную ДНК с концентрацией 1 мг/мл и декстрозы моногидрат в концентрации 60 мг/мл, растворенные в фосфатном буферном растворе (общая концентрация фосфатов натрия 10 мМ, из них натрия дигидрофосфата дигидрата 13%, натрия гидрофосфата додекогидрата 87%, pH 7,8).

### Входной и выходной контроль:

Метод ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ИО-ВЭЖХ). При аналитическом контроле содержания (количество и процент чистоты) плазмиды в препарате использовали систему для жидкостной хроматографии Akta Purifier 10\* (GE Healthcare, США), снабженную двумя двухплунжерными насосами высокого давления, детектором в УФ-области (длина волны 254 нм), полуавтоматическим аппаратом дозированного ввода образца (дозирующая петля 20 мкл), датчиками pH и проводимости, программным обеспечением Unicorn 5.1, используемым для получения, оцифровки и анализа данных. Применяли аналитическую колонку 4,0×250 мм IonPac AS14 (Dionex, Thermo Scientific, Германия). Для указанной хроматографической колонки были подобраны следующие условия анализа: подвижная фаза, включающая сульфат аммония и хлорид натрия (суммарная концентрация 2,1М), ЭДТА – 1 мМ (для нивелирования влияния возможных двухвалентных метал-

лов в воде на качество элюирования), трис – 100 мМ, pH 7,0; температура – комнатная; скорость потока – 120 см/ч.

Метод электрофореза в агарозном геле с окраской бромистым этидием (ЭФ). При аналитическом контроле содержания примесей в препарате использовали систему горизонтального электрофореза HE 33 Mini Submarine Unit (GE Healthcare, США), снабженную камерой для агарозного геля и источником напряжения; визуализацию осуществляли в УФ-свете под трансиллюминаторной лампой 260 нм. Электрофорез с бромистым этидием выполняли в соответствии с известной методикой [5] в 1% агарозном геле с использованием системы горизонтального электрофореза HE 33 Mini Submarine Unit (GE Healthcare, США), визуализацию осуществляли в УФ-свете под трансиллюминаторной лампой 260 нм.

Содержание влаги в лиофилизате анализировали методом Фишера [6].

### Оборудование

Для автоматизированного дозированного наполнения использовали станцию дилютер-диспенсер Microlab 600 (Hamilton, Великобритания).

Для лиофилизации препарата использовалась лиофильная сушка FreeZone Triad (Labconco, США).

Все операции проводились в чистых комнатах категории «Д» под ламинарным потоком в шкафу Maxisafe 2020 (Thermo, Великобритания).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Разработка формы ГЛФ

Суперскрученная плазмидная ДНК, составляющая основу ГЛФ, предназначена для непосредственного введения в организм больных, и поскольку суперскрученная плаزمида трансфецирует живую культуру клеток человека, то требования к ГЛФ должны быть такими же, как в случае любого препарата инъекционного введения. Основными требованиями к инъекционным препаратам являются: стабильность (в том числе при хранении), стерильность, прозрачность (свобода от частиц), апиrogenность, изотоничность; растворители, исходные и вспомогательные вещества, применяемые для приготовления лекарственных форм для инъекций, должны быть разрешенными к медицинскому применению и соответствовать требованиям нормативно-технической документации [7].

Такие требования, как стерильность, прозрачность, апиrogenность, описываются фармакопейной статьей предприятия (проект), разработанной на основании ОСТ 91500.05.001.00 «Стандарты качест-



Гибкая и интуитивно-понятная хроматографическая система AKTA pure (модель, заменяющая систему жидкостной хроматографии Akta Purifier 10)

\* Модель снята с производства.

ва лекарственных средств. Основные положения» (таблица 1).

Таблица 1.

**Основные показатели, нормируемые проектом фармакопейной статьи на АФС**

Показатель	Метод
Содержание действующего вещества (в мкг/мл)	GeneJET Plasmid Miniprep и спектрофотометрический
Описание	Визуальный
Растворимость	Визуальный
Подлинность	Спектрофотометрический – Отношение D260/280 – Максимум поглощения, нм – Минимум поглощения, нм
Прозрачность раствора	ГФ XII
Цветность раствора	ГФ XII
pH	Потенциометрический, ГФ XII
Механические включения	РД 42-501-98, визуальный метод
Посторонние примеси (родственные соединения), % (суммарно)	ИО-ВЭЖХ, электрофорез
Бактериальные эндотоксины, ЕЭ/мл	ГФ XII, ЛАЛ-тест
Стерильность	ГФ XII (метод прямого посева или мембранной фильтрации)
Количественное определение, г/л	ИО-ВЭЖХ

Все растворители, используемые для создания ГЛФ, основаны на воде для инъекций. Поэтому в рамках фармацевтической разработки ГЛФ нами изучался компонентный состав ГЛФ (стабилизаторы и консерванты), обеспечивающий как химическую, так и микробиологическую стабильность суперскрученной плазмидной ДНК в составе препарата, а также способ получения ГЛФ.

### 1.1. Стабилизаторы

Стабилизаторы – это вещества, повышающие химическую устойчивость лекарственных средств в растворах для инъекций. Стабилизаторы могут выполнять функции предотвращения гидролиза основного компонента, его окисления или иных видов химической деградации. В рамках исследования мы изучали различные, разрешенные Министерством здравоохранения Российской Федерации стабилизаторы, а также стабильность плазмиды в составе ГЛФ без использования каких-либо стабилизаторов. При этом все растворы плазмиды (с добавлением и без добавления стабилизаторов) стерилизовались фильтрацией через фильтры 0,2 мкм в специально подготовленные (мытые и стерилизованные термически) флаконы объ-

емом 1 мл (объем заполнения 0,5 мл), которые хранились при комнатной температуре под ламинарным потоком в чистой зоне категории «А», закупоренные крышкой (ускоренное хранение в течение месяца при комнатной температуре соответствовало двухлетнему хранению при температуре ниже минус 5 °С [8]). Такой способ подготовки и хранения образцов был необходим во избежание попадания в раствор микроорганизмов и для исключения микробиологической нестабильности препарата из эксперимента. По истечении контрольного срока 1 месяц флаконы вскрывались, содержимое анализировали методом ИО-ВЭЖХ. В рамках эксперимента изучали снижение концентрации и процентного содержания (чистоты) плазмиды в растворах для оценки степени влияния стабилизаторов (таблица 2). Под степенью нестабильности мы понимали процент падения концентрации основного компонента в растворах. Под степенью деградации мы понимали процент снижения чистоты плазмиды в растворах.

Как видно из данных таблицы, при месячном хранении плазмиды без введения стабилизатора имеет тенденцию к деградации. Причину деградации (окисление, гидролиз или потеря третичной суперскрученной структуры) определить не удалось. Среди изученных стабилизаторов, давно и успешно используемых в составе различных лекарственных форм, большая часть никак не способствовала стабилизации плазмиды. Некоторые вещества (натрия цитрат, натрия тиосульфат и ЭДТА), наоборот, способствовали разрушению плазмиды. Использование хлорида натрия в физиологической концентрации, как нам кажется, способствовало стабилизации плазмиды, хоть и не стопроцентно. Тем не менее это единственное соединение, при использовании которого плазмиды не разрушались до чистоты менее 95%, предельного значения по ФСП. Возможно, повышение концентрации NaCl могло бы способствовать улучшению стабильности препарата. Однако это повысило бы и осмолярность ГЛФ, изменив ее изотонические свойства и сделав непригодной для использования для живых клеток.

### 1.2. Консерванты

Консерванты – это вспомогательные вещества, применяемые для предотвращения контаминации и размножения микроорганизмов в лекарственных препаратах. Для изучения микробиологической стабильности образцы готовили так же, как в предыдущем опыте 1.1, за тем исключением, что разлитые в чистой зоне категории «А» и закупоренные флаконы не хранились в этой чистой зоне, а выносились наружу. Они хранились в некатегорируемом помещении на лабораторном столе при комнатной температуре. Для каждого консерванта (и без него) брали по четыре флакона с образцом. По истечении контрольного срока 1 месяц флаконы вскрывались, содержимое анализировали методом ИО-ВЭЖХ, а также прямым посевом содержи-

Таблица 2.

Использование основных, разрешенных на территории России стабилизаторов для химической стабилизации плазмиды в составе ГЛФ

Стабилизатор	Концентрация плазмиды, мг/мл		Степень нестабильности, %	Чистота ДНК, %		Степень деградации, %
	до хранения	после хранения		до хранения	после хранения	
Отсутствует	1,02	0,86	15,69	96,4	91,5	5,08
0,9% NaCl	1,02	0,98	3,92	96,4	95,4	1,04
50 мМ натрия цитрат	1,02	0,41	59,80	96,4	61,2	36,51
2 мМ ЭДТА	1,02	0,55	46,08	96,4	72,4	24,90
0,5 мМ метионин	1,02	0,87	14,71	96,4	90,4	6,22
2 мМ метионин	1,02	0,89	12,75	96,4	90,6	6,02
100 мМ аргинин	1,02	0,87	14,71	96,4	91,8	4,77
1 М аргинин	1,02	0,87	14,71	96,4	91,2	5,39
10 мМ цистеин	1,02	0,88	13,73	96,4	92	4,56
50 мМ цистеин	1,02	0,84	17,65	96,4	90,8	5,81
0,5 мМ тетацин	1,02	0,84	17,65	96,4	91	5,60
2 мМ тетацин	1,02	0,84	17,65	96,4	91,1	5,50
25 мМ натрия аскорбат	1,02	0,88	13,73	96,4	92,7	3,84
25 мМ натрия п-аминосалицилат	1,02	0,9	11,76	96,4	93,7	2,80
20 мМ натрия тиосульфат	1,02	0,31	69,61	96,4	66,6	30,91
50 мМ натрия нитрит	1,02	0,77	24,51	96,4	88,7	7,99
100 мМ натрия нитрит	1,02	0,77	24,51	96,4	88,9	7,78
1 мМ диоксид титана	1,02	0,84	17,65	96,4	90,9	5,71
20 мМ магния стеарат	1,02	0,88	13,73	96,4	91,7	4,88
10 мМ декстран	1,02	0,86	15,69	96,4	91,1	5,50
10 мМ целлюлоза	1,02	0,86	15,69	96,4	91,8	4,77
2 мМ диоксид титана	1,02	0,85	16,67	96,4	91	5,60
5 мМ диоксид титана	1,02	0,84	17,65	96,4	91,1	5,50
50 мМ магния стеарат	1,02	0,87	14,71	96,4	92,1	4,46
20 мМ E553b	1,02	0,86	15,69	96,4	91,6	4,98

мого каждого флакона на среде Сабуро. По ИО-ВЭЖХ определяли степень деградации. Пересев на питательной среде проводили для определения микробиологической контаминации [9]. Для каждого такого определения готовили взвеси тест-штаммов с конечной концентрацией 100 КОЕ/мл. ИО-ВЭЖХ-определения проводили сразу; микробиологические определения проводили через пять суток инкубирования опытных образцов при комнатной температуре. В том случае, если рост микроорганизмов на средах с образцами ГЛФ превышал их рост на контрольных растворах, такие флаконы определяли как нестерильные (таблица 3).

Как видно из представленной таблицы, некоторые общеиспользуемые в фармакологии консерванты являются губительными для структуры плазмиды. Так, все спирты и кислоты разрушают плазмиду, что очень хорошо подтверждается аналитическим контролем с помощью ИО-ВЭЖХ. Металлоорганические соединения и соли органических кислот и спиртов не так губительны и в целом обеспечивают стерильность. Однако без использования консерванта плазмиды, разлитая описанным выше способом по модельным флаконом, также оказалась стерильной, что говорит о том, что раствор ГЛФ может быть использован вообще без консерванта.

Итак, консервант для микробиологической стабилизации не требуется. Химической стабилизации в некоторой степени удалось добиться при добавлении к раствору плазмиды хлорида натрия до концентрации 0,9%. Однако даже в этом случае при ускоренном хранении при комнатной температуре в течение месяца плазмиды имеет тенденцию к частичной деградации (чистота плазмиды снизилась с 96,4 до 95,4%), поэтому полной химической стабилизации ГЛФ в жидкой форме добиться не удалось. В связи с этим было принято решение лиофилизировать раствор плазмиды без добавления стабилизаторов. Общеизвестно, что стабильность твердых (высушенных) препаратов выше, чем стабильность жидких. В следующем разделе описывается разработка способа лиофилизации ГЛФ плазмиды.

## 2. Разработка процесса получения ГЛФ

Приготовление ГЛФ (розлив и лиофильное высушивание) должно обеспечивать препарату стабильность и безопасность. То есть препарат в составе ГЛФ должен оставаться стерильным и не разрушаемым как во время операций по приготовлению ГЛФ, так и в ходе хранения.

Приготовление ГЛФ препарата состоит из следующих этапов:

- подготовка сырья, АФС (оттаивание замороженного раствора);
- стерильная фильтрация сырья;

Таблица 3.

Использование основных, разрешенных на территории России консервантов для микробиологической стабилизации плазмиды в составе ГЛФ

Консервант	Чистота ДНК (ИО ВЭЖХ), %		Степень деградации, %	Стерильность (прямой посев)*
	до хранения	после хранения		
Отсутствует	96,4	91,60	4,98	++++
5% этиловый спирт	96,4	45,40	52,90	++++
0,5% бензиловый спирт	96,4	46,10	52,18	++++
0,3% фенилэтиловый спирт	96,4	41,10	57,37	++++
0,25% фенол	96,4	28,10	70,85	++++
0,5% фенол	96,4	28,80	70,12	++++
0,1% хлоркрезол	96,4	28,10	70,85	++++
0,1% бензойная кислота	96,4	28,14	70,81	++++
0,2% бензойная кислота	96,4	29,10	69,81	++++
0,1% сорбиновая кислота	96,4	92,16	4,40	++++
0,01% бензалкония хлорид	96,4	91,92	4,65	++++
0,04% бететония хлорид	96,4	92,36	4,19	++++
0,01% додецилдиметилбетиламмония хлорид	96,4	90,31	6,32	++++
0,25% трикрезол	96,4	31,10	67,74	++++
0,1% крезол	96,4	24,80	74,27	++++
0,2% крезол	96,4	12,80	86,72	++++
0,5% нипагин	96,4	92,15	4,41	++++
0,5% нипазол	96,4	92,11	4,45	++++
0,5% бутабен	96,4	93,32	3,19	++++
1,0% бутабен	96,4	91,68	4,90	++++
0,5% бензойная кислота	96,4	24,40	74,69	++++
1,0% хлорбутанол-гидрат	96,4	91,95	4,62	++++
0,5% мертиолат	96,4	91,29	5,31	++++
0,5% цефиран	96,4	91,45	5,13	++++
0,5% цефирол	96,4	92,34	4,22	++++
0,02% фенилртути ацетат	96,4	91,14	5,46	++++
0,002% фенилртути нитрат	96,4	93,65	2,85	++++

**Примечание:** \*каждый плюс – это отсутствие микробной контаминации в одном флаконе; четыре плюса – отсутствие контаминации во всех четырех опытных флаконах.

– подготовка флаконов и пробок к розливу (мойка и стерилизация);

– розлив стерильного раствора АФС в стерильные чистые флаконы;

– замораживание разлитых флаконов;

– первичная лиофилизация при отрицательной температуре;

– доосушка лиофилизата при положительной температуре;

– закупорка флаконов, извлечение из лиофильной сушки, обкатка и маркировка.

С позиций оценки возможных нарушений, которые могут приводить к нарушению стабильности и безопасности, включая нарушение стерильности и деградацию плазмиды, можно выделить следующие критичные параметры, которые требуют детальной оптимизации (таблица 4). Стоит отметить, что возможные нарушения оценивались только в отношении стабильности и безопасности препарата, варианты отклонений в технологическом процессе, приводящие к отбраковке продукции, не рассматривались, так как не могли быть оптимизированы.

Таким образом, указанные в таблице параметры оптимизировали с целью получения максимально стабильной и безопасной ГЛФ.

## 2.1. Подготовка сырья.

### Продолжительность оттаивания.

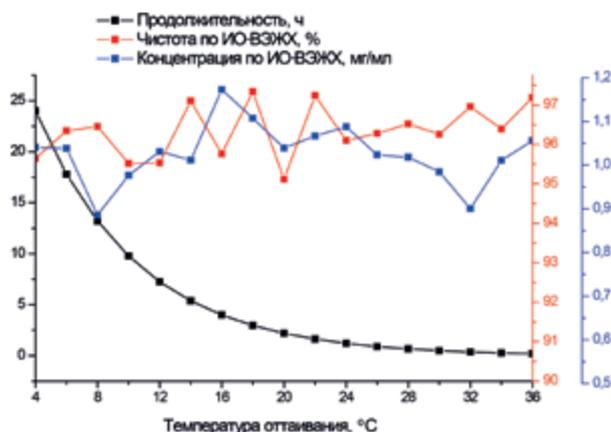
#### Температура оттаивания

Для оценки влияния продолжительности и температуры оттаивания растворов АФС проводили два аналитических контроля: входной контроль АФС до заморозки и выходной контроль после цикла заморозки (–15 °С в течение суток) и оттаивания, варьируя температуру разморозки и, следовательно, продолжительность процедуры. Оценивали возможное негативное влияние оттаивания, как-то: деградация продукта, потеря суперскрученности. Во всех экспериментах использовалась одна и та же АФС (серия КРП020614), содержащая 1,02 мг/мл плазмиды с чистотой 96,4% (ИО-ВЭЖХ). Оценку проводили изучая падение чистоты и/или концентрации (ИО-ВЭЖХ). Данные по результатам аналитического контроля представлены ниже (рисунок 1). Как видно из этих данных, температура и продолжительность оттаивания существенно не влияют ни на чистоту, ни на концентрацию плазмиды в растворе. Отличия в значениях чистоты и концентрации лежат в рамках воспроизводимости анализа ИО-ВЭЖХ и не являются статистически достоверными. Из чего следует сделать вывод, что размораживать АФС возможно при любой температуре в диапазоне от +4 до +36 °С. В дальнейших экспериментах оттаивание проводили при комнатной температуре.

Таблица 4.

Анализ возможных отклонений во время процесса получения ГЛФ

Этап процесса	Критичные параметры	Возможное влияние критичных параметров
Подготовка сырья	Продолжительность оттаивания. Температура оттаивания.	Нарушение третичной структуры плазмиды, образование продуктов деструкции и деградации.
Стерильная фильтрация сырья	Площадь фильтрации. Материал фильтра.	Потери вещества вследствие необратимой адсорбции на фильтре.
Подготовка флаконов и пробок к розливу	Нет параметров.	–
Розлив стерильного раствора АФС	Рабочий объем розлива по отношению к общему объему флакона.	Недостаточная эффективность лиофилизации. «Выкипание» раствора из флакона.
Замораживание разлитых флаконов	Температура заморозки. Продолжительность заморозки.	Недостаточная эффективность лиофилизации. «Выкипание» раствора из флакона.
Первичная лиофилизация	Начальная температура и градиент температуры процесса. Вакуум в камере. Температура конденсора.	Недостаточная эффективность лиофилизации. Деградация вещества при лиофилизации. «Выкипание» раствора из флакона.
Доосушка лиофилизата	Начальная температура и градиент температуры процесса.	Недостаточная эффективность лиофилизации. Деградация вещества при лиофилизации.
Закупорка флаконов, извлечение из лиофильной сушки, обкатка и маркировка	Нет параметров.	–



**Рисунок 1.** Влияние температуры оттаивания на продолжительность оттаивания и стабильность препарата

## 2.2. Стерильная фильтрация.

### Площадь фильтрации. Материал фильтра

Фильтрация на фильтрах с низкой пористостью (0,2 мкм или ниже) может быть критичным процессом в силу того, что плазида имеет значительный размер и может «застревать» в порах фильтра. Кроме того, некоторые фильтры обладают неспецифической сорб-

цией в отношении таких биотехнологических продуктов, как ДНК. В связи с этим было крайне важно изучить стерильную фильтрацию АФС в течение подготовки к розливу ГЛФ, с тем чтобы минимизировать возможные потери целевого вещества. Во всех экспериментах использовалась одна и та же АФС (серия КРП020614), содержащая 1,02 мг/мл плазмиды (ИО-ВЭЖХ). Оценку проводили изучая падение концентрации после фильтрации (ИО-ВЭЖХ). Оценивали фильтры различных марок от разных производителей, сертифицированных по GMP (таблица 5). Кроме этого, оценивали нагрузочную емкость фильтрации, то есть площадь фильтрации, необходимую для фильтрации определенного количества фильтранта.

Из данных таблицы становится очевидным, что такие материалы, как PA, CN, не подходят для стерильной фильтрации растворов, содержащих ДНК. Кроме того, статистическое сравнение результатов измерений, представленных в таблице, позволяет сделать вывод, что при использовании RC во всех случаях имеет место хоть и небольшой, но процент задержки продукта на фильтре. Поэтому в остальных экспериментах можно было использовать фильтры на основе PES, SFCA, PVDF, CA. Однако выбор остановили на фильтрах

Таблица 5.

ИО-ВЭЖХ-анализ фильтрата, прошедшего через различные материалы фильтров. Пять измерений для каждого материала с оценкой среднего значения концентрации и стандартного отклонения измерений. Потери рассчитывались как отношение среднего значения измерения к исходной концентрации 1,02 мг/мл

Производитель	Материал	Изм. 1, мг/мл	Изм. 2, мг/мл	Изм. 3, мг/мл	Изм. 4, мг/мл	Изм. 5, мг/мл	Ср. зн., мг/мл	Потери, %
Sartorius, Германия	PES (полиэфирсульфон)	1,007	0,982	1,013	0,978	1,041	1,00±0,03	1,5
Sartorius, Германия	PA (полиамид)	0,419	0,482	0,463	0,393	0,491	0,45±0,04	55,9
Sartorius, Германия	RC (регенерированная целлюлоза)	1,044	1,049	0,931	0,988	0,971	1,00±0,05	2,3
Sartorius, Германия	SFCA (безсурфактантная ацетилованная целлюлоза)	1,013	1,108	1,087	0,972	1,004	1,04±0,06	-1,7
Millipore, Германия	PES (полиэфирсульфон)	0,987	0,983	1,058	0,906	1,099	1,01±0,07	1,3
Millipore, Германия	PVDF (поливинилдифторид)	1,064	1,076	1,031	1,064	0,910	1,03±0,07	-0,9
Pall, Германия	PES (полиэфирсульфон)	1,019	1,089	1,136	0,976	0,962	1,04±0,07	-1,6
Pall, Германия	PVDF (поливинилдифторид)	0,930	1,024	1,042	1,102	1,001	1,02±0,06	0
Corning, США	PES (полиэфирсульфон)	0,998	1,086	0,987	1,067	1,099	1,05±0,05	-2,7
Corning, США	CA (ацетат целлюлозы)	0,952	0,950	0,961	1,042	1,107	1,00±0,07	1,7
Corning, США	RC (регенерированная целлюлоза)	0,942	0,985	1,038	1,007	0,970	0,99±0,04	3,1
Corning, США	CN (нитрат целлюлозы)	0,097	0,147	0,082	0,211	0,092	0,13±0,05	87,7
Corning, США	PVDF (поливинилдифторид)	0,983	0,959	0,990	1,012	0,969	0,98±0,02	3,7

из PES, как наиболее доступных и дешевых. Все последующие эксперименты проводили на фильтрах из PES.

Важным показателем фильтрации является скорость. Чем быстрее проходит процесс, тем меньше вероятность деградации продукта и тем выше производительность процесса. Мы изучали скорость фильтрации для фильтров различного диаметра, оценивая емкость фильтра, то есть площадь фильтрации, необходимую для фильтрации всего количества полупродукта, а также время фильтрации. Нормальный процесс должен обеспечивать время фильтрации не выше 60 с. Однако чем больше диаметр фильтра, тем выше потери раствора из-за «мертвого» объема. Во всех экспериментах фильтровали раствор АФС в количестве 25 мл через каждый фильтр, засекая время фильтрации, а также оценивая потери в объеме (рисунок 2).

Как видно из представленных графических данных, ни в одном из случаев не произошло «забивания» фильтра, что привело бы к необходимости его замены и увеличению времени фильтрации (1); однако при

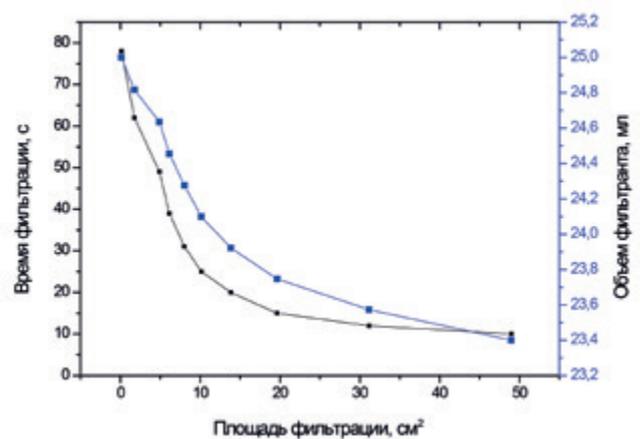


Рисунок 2. Зависимость времени фильтрации и объема фильтрата от площади фильтрации

площадях ниже 8 см<sup>2</sup> процесс «забивания» фильтра уже начинался, что характеризовалось резким геометрическим повышением времени фильтрации (2); при слишком больших фильтрах, диаметром более 42 мм

(площадь фильтрации 13,85 см<sup>2</sup>), потери из-за «мертвого» объема превышают 5%, это значение слишком велико (3). Таким образом, наиболее оптимальными следует считать фильтры диаметром 32 и 36 мм (площади фильтрации 8,03 и 10,17 см<sup>2</sup> соответственно).

Итак, для дальнейшей работы были выбраны фильтры диаметром 32 или 35 мм из материала PES (полиэфирсульфон). Через фильтр пропускали раствор АФС, а затем проверяли стерильность полученного раствора методом прямого посева на питательных средах [10]. Колоний микроорганизмов не возникало, что подтверждало стерильность отфильтрованного раствора. Отфильтрованный раствор поступал на станцию розлива во флаконы.

### **2.3. Розлив стерильного раствора АФС. Рабочий объем розлива по отношению к общему объему флакона**

Производство различных биофармацевтических продуктов всегда осложнено их ограниченной физической и/или химической стабильностью. А в отношении ГЛФ стабильность приобретает одно из ключевых значений. Зачастую увеличить стабильность препаратов можно, превратив их в твердую форму, чего можно добиться с помощью лиофилизации. Лиофилизация, по существу являющаяся совокупностью процессов замораживания и сушки, может оказать достаточно негативное (и даже пагубное) влияние на препарат. Поэтому лиофилизация, как и любой другой процесс, нуждается в оптимизации. Лиофилизация состоит из трех основных этапов: замораживание образца, первичная сушка, доосушка. Подготовительным этапом перед замораживанием образца является розлив стерильного раствора в подготовленные (мытые и стерилизованные) флаконы. Критичным параметром является объем образца, который попадает во флакон. Если раствор образца будет занимать слишком большую часть объема флакона, то время лиофилизации может значительно увеличиваться. Кроме того, возможно «выкипание» избыточного объема раствора из флакона как в самом начале лиофилизации, так и при переходе к третьему этапу, доосушке. Если же объем раствора во флаконе будет слишком мал, то потребуются большое число флаконов, что сильно увеличивает себестоимость продукта не столько из-за стоимости дополнительных флаконов и операций по их подготовке, сколько из-за стоимости хранения и логистики.

Поэтому задачей оптимизации этапа розлива является подбор максимального рабочего объема образца во флаконе, который будет с достаточной эффективностью лиофилизироваться без «выкипания». Под эффективной лиофилизацией мы понимаем процесс, который занимает не более 50 ч и приводит к получению продукта с остаточной влажностью не более 10%.

Во всех экспериментах использовали АФС (серия КРП020614) и инсулиновые флаконы вместимостью 5 мл. Оценивали влияние приведенного рабочего объема раствора АФС во флаконах (то есть отношение объема раствора к общему объему флакона в % об.) на остаточную влажность в лиофилизате (при одинаковой программе лиофилизации: длительности 49 ч и вакууме не более 0,06 мбар – см. далее). Эксперимент проводили для десяти флаконов для каждого приведенного объема (таблица 6).

Анализируя данные результатов контроля остаточной влажности методом титрования по Фишеру, можно сделать выводы, что заполнение флакона больше чем на 35% его общего объема приводит либо к «выкипанию» образца при старте лиофилизации, либо к оттаиванию образца на момент запуска доосушки вследствие недостаточно эффективной лиофилизации (часть влаги, которая осталась в полусухом продукте, размораживается при доосушке и уже не испаряется). Наполняемость флакона на 35% от общего объема является граничным: несмотря на то, что образец во всех флаконах высушился без «выкипания» и оттаивания, есть флаконы, которые должны быть отбракованы из-за слишком высокого содержания остаточной влажности – таких флаконов три, то есть брак на этом этапе при таком заполнении флакона составляет 30%. Нами было решено, что флакон должен заполняться не более чем на 30% от общего объема. В этом случае можно гарантировать низкое содержание остаточной влаги, отсутствие «выкипания» и/или оттаивания.

### **2.4. Замораживание разлитых флаконов. Температура заморозки. Продолжительность заморозки**

Первый этап лиофилизации – заморозка: образец замораживают с тем, чтобы перевести воду в лед. Этот этап получил название «витрификация», т.е. процесс перевода образца в стеклоподобное твердое аморфное состояние [11]. В течение этого этапа вода начинает превращаться в кристаллы, уходя из системы, тем самым белок концентрируется, что способствует быстрому повышению вязкости, переводящему образец в аморфное состояние. Критичными параметрами процесса являются температура стеклования образца (glass-transition temperature, T<sub>g</sub>), ниже которой резко снижается молекулярная подвижность молекул образца в растворе, а также скорость замораживания образца [12]. Последняя может существенно влиять на окончательный вид конечного лиофилизованного препарата, хотя до конца не ясно, в соответствии с каким механизмом. Предполагается, что скорость замораживания влияет на размер и количество образующихся кристаллов, которые, в свою очередь, определяют пористость высушиваемого слоя образца [13]. Чем выше число кристаллов и, следовательно, меньше

Таблица 6.

Анализ влияния приведенного объема образца во флаконе на остаточную влажность после лиофильной сушки

	Приведенный объем во флаконе, %	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Остаточная влажность во флаконе, %	фл.1	1,01	1,57	1,75	2,51	4,51	7,39	9,88	000	17,61	BBB
	фл.2	1,05	1,59	1,75	2,40	4,40	7,50	10,17	12,71	000	BBB
	фл.3	0,91	1,68	1,65	2,57	4,52	7,47	9,82	12,82	BBB.	BBB
	фл.4	0,99	1,55	1,72	2,60	4,44	7,46	9,92	12,95	17,70	BBB
	фл.5	1,00	1,60	1,67	2,45	4,47	7,58	9,91	13,05	000	BBB
	фл.6	1,03	1,54	1,76	2,45	4,45	7,70	9,90	12,72	000	BBB
	фл.7	1,00	1,60	1,70	2,54	4,52	7,53	10,21	12,85	000	BBB
	фл.8	0,90	1,61	1,59	2,50	4,48	7,65	9,97	12,21	17,55	BBB
	фл.9	0,97	1,68	1,74	2,47	4,45	7,48	10,02	12,76	000	BBB
	фл.10	1,05	1,68	1,72	2,50	4,54	7,51	9,90	12,60	000	BBB

Примечание: 000 – оттаивание образца в момент запуска доосушки; BBB – «выкипание» образца в момент запуска лиофилизации.

пористость, тем дольше будет длиться процесс первичной сушки. Таким образом, в рамках оптимизации этапа заморозки исследовалось влияние скорости заморозки (точнее, времени и температуры заморозки) на длительность лиофилизации. Замораживали три флакона, наполненных не более чем на 30% общего объема. В один флакон помещали датчик влажности. Лيوфилизацию вели до показателя влажности в контролируемом (с онлайн-датчиком измерений) флаконе 8% (так как датчик влажности имеет погрешность измерений 1%). Время, требуемое для лиофилизации указанной партии, вносили в журнал показаний. Затем вели процесс для другой партии флаконов, замороженных при других условиях. Всего изучали 49 различных условий (температура от -70 до -10 °C и время заморозки от 2 до 8 ч). Флаконы, влажность содержимого которых не достигала 10%, отбраковывались и в расчетах не участвовали (1 флакон с влажностью по методу Фишера 10,3%). Затем по значениям в журнале показаний строили графическую зависимость времени лиофилизации от времени заморозки и температуры заморозки (рисунок 3).

По результатам эксперимента были сделаны следующие выводы: 1) аморфность кристаллизации суперскрученной плазмиды, а следовательно, время сублимации очень сильно зависит от температуры заморозки; при температурах выше -40 °C вести замо-

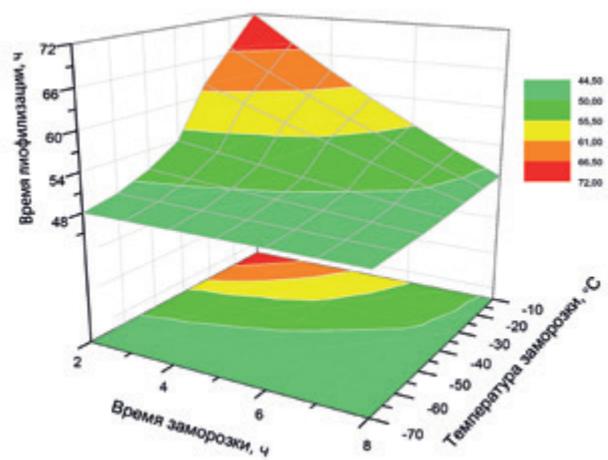


Рисунок 3. Влияние времени и температуры заморозки на время лиофилизации

розку нецелесообразно, так как это приводит к слабой аморфности кристаллов льда в образце, лиофилизированный образец выглядит как монолитная таблетка, поры невооруженным глазом не заметны; процесс идет долго, дольше 60 ч; 2) при высоких температурах (-40 °C) процесс заморозки занимает много времени (больше 6 ч), что неудобно для планирования производства; 3) оптимальным режимом заморозки является следующий: температура ниже -55 °C, время 2 ч.

## 2.5. Первичная лиофилизация.

### Начальная температура и градиент температуры процесса. Вакуум в камере. Температура конденсора

После замораживания образец подвергают первичной сушке, а точнее, сублимации ледяной воды за счет создания вакуума. Помимо вакуума, критическим параметром процесса является еще и величина температуры. Она должна быть ниже  $T_g$ , чтобы предотвратить плавление льда и не нарушить стеклоподобное состояние препарата. В противном случае увеличивающаяся подвижность молекул белка может приводить к фазовому разделению, нарушающему массоперенос [14]. Первичная сушка является наиболее продолжительным этапом всего процесса. Поэтому оптимизация первичной сушки очень важна, хотя и затруднительна, так как процесс занимает очень много времени.

В рамках оптимизации варьировались следующие параметры в программе лиофилизационного процесса: температура полок на старте, градиент температур полок, время исполнения градиента, глубина вакуума. Постоянным поддерживалось значение температуры конденсера ( $-84\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Было опробовано четыре различных варианта программ (рисунки 4–7), каждый из которых позволил получить высушенный продукт (влажность ниже 10%). Продукт после лиофилизации подвергался аналитическому контролю методами ИО-ВЭЖХ и ЭФ: оценивалась возможность деградации продукта при сублимации. Для этого лиофилизированную ГЛФ, полученную в результате запуска той или иной программы, растворяли в 1 мл физраствора и проводили анализы (таблица 7).

Как видно из представленной таблицы, градиенты температуры полок и вакуума оказались не очень

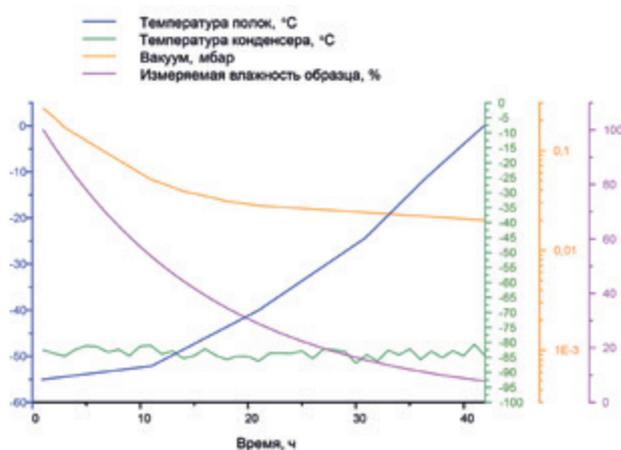


Рисунок 4. Программа первичной сушки № 1

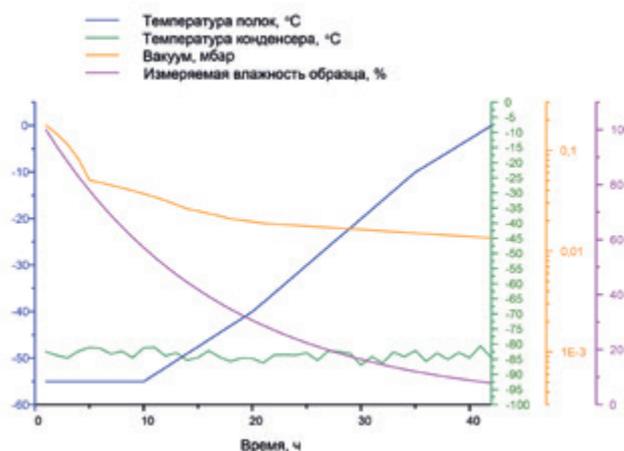


Рисунок 5. Программа первичной сушки № 2

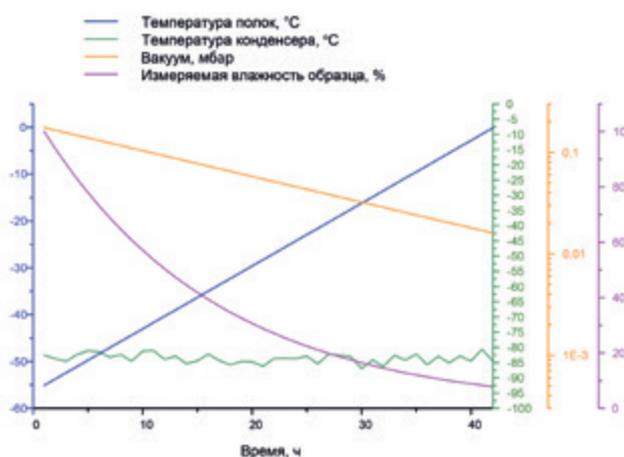


Рисунок 6. Программа первичной сушки № 3

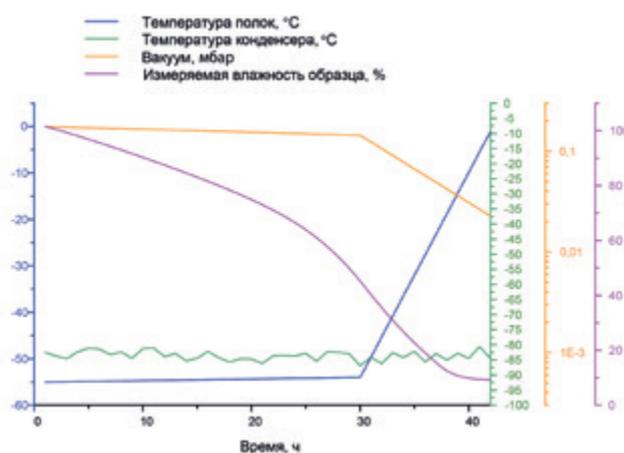
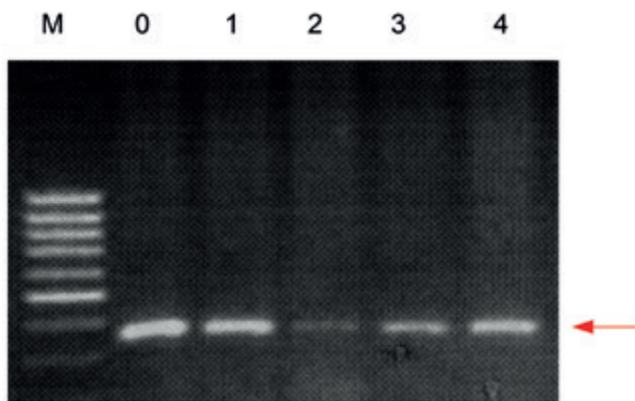


Рисунок 7. Программа первичной сушки № 4

удачными в случае второй и третьей программ. Потери целевой ДНК при высушивании особенно хорошо заметны на электрофорезе (рисунок 8).

Наиболее удачными результатами, как нам показалось, следует считать результаты программы № 1



**Рисунок 8.** ЭФ (М – маркеры молекулярных весов; 0 – АФС до лиофилизации; 1 – первая программа лиофилизации; 2 – вторая программа; 3 – третья программа; 4 – четвертая программа)

**Таблица 7.**

Результаты аналитического контроля лиофилизата, полученного с помощью той или иной программы процесса

	Программа № 1	Программа № 2	Программа № 3	Программа № 4
ИО-ВЭЖХ, %	96,6	94,2	96,1	96,5
ИО-ВЭЖХ, мг/мл	1,01	0,92	0,98	1,00
ЭФ, денситометрический расчет, %	98,1	97,5	98,0	98,1

### 2.6. Доосушка лиофилизата.

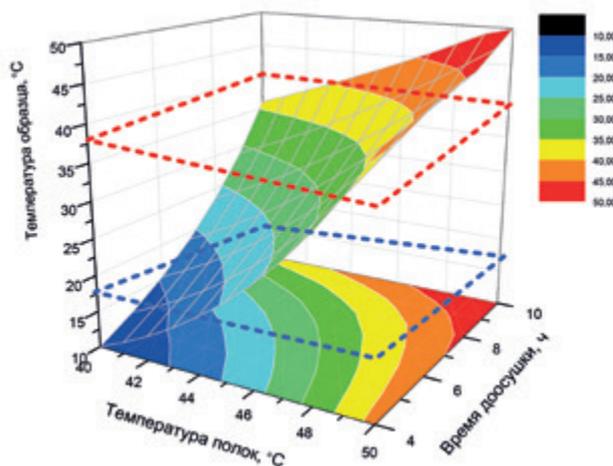
#### Начальная температура и градиент температуры процесса

Чем ниже температура, тем медленнее обезвоживание образца. Ускорить процесс позволяет последний этап, доосушка. Физический смысл этого шага заключается в том, что за счет подвода избыточного тепла ускоряется испарение остаточной воды образца.

Однако подвод тепла должен компенсироваться повышением температуры полок. В результате повышения температуры полок и длительности процесса образец, который прогревается медленнее полков, попадает в градиент температур. Задача оптимизации этого этапа – избежать длительного воздействия высоких температур на продукт. Для этого оптимизируется время доосушки и градиент повышения температуры

полок. Оцениваются, с одной стороны, время, которое образец находится при избыточно высокой температуре (выше +37 °С, измеряется с помощью термодатчика, опущенного в образец), а с другой – чистота полученной ГЛФ, то есть степень ее деградации.

Анализируя данные, полученные в ходе различных экспериментов с перегревом полок (рисунок 9), мы смогли установить, что оптимальный диапазон температур полок – от 40 до 46 градусов, а оптимальное время доосушки – от 5 до 9 ч.



**Рисунок 9.** Влияние температуры полок и длительности прогрева на температуру образца. Красный ободок отсекает область, в которой образец подвергается критическому перегреву, а синий ободок отсекает область, в которой образец прогревается недостаточно

Внутри этих диапазонов образец не подвергался деградации, что подтверждалось данными ИО-ВЭЖХ и электрофореза (не было потери чистоты или концентрации плазмиды). В дальнейшей работе было решено использовать средние значения диапазонов: доосушка в течение 7 ч при 43 градусах.

Итак, был разработан способ получения лиофилизованной ГЛФ. Опытные флаконы (пять штук) с лиофильно высушенной таблеткой препарата хранились в течение месяца в некатегорируемом помещении на лабораторном столе при комнатной температуре. Затем в каждый флакон вводили шприцем физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме 1 мл, тщательно перемешивали и проводили аналитические контроли методами ИО-ВЭЖХ и прямым посевом на питательную среду Сабуру. Результаты ИО-ВЭЖХ-анализа оценивали сразу, а результаты прямого посева – через пять дней после инкубирования при комнатной температуре. Во всех образцах концентрация плазмиды составила 1,0±0,05 мг/мл, чистота – 96,2±0,1%. Все образцы оказались стерильными.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Был разработан состав ГЛФ на основе суперскрученной плазмидной ДНК. Форма представляет собой стерильный закупоренный резиновой пробкой флакон 5 мл с лиофильно высушенной плазмидой 1 мг. Пробку флакона следует проткнуть стерильной апиrogenной иглой от медицинского шприца, а затем рядом с местом укола проткнуть флакон второй раз иглой, надетой на шприц, заполненный 1 мл 0,9% NaCl, ввести содержимое шприца во флакон и тщательно перемешать до получения прозрачного бесцветного раствора. Проткнуть иглой без шприца пробку необходимо по той причине, что внутри флакона отсутствует воздух (флакон закупоривается под вакуумом в камере лиофильного агрегата).

Такая форма препарата подтвердила свою стабильность, стерильность, апиrogenность, изотоничность (за счет 0,9% NaCl) и может быть использована для инъекционного введения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е.А. Савищенко, С.С. Илизавский, А.И. Гинак, Т.Д. Алейникова, М.М. Шавловский. Наночастицы на основе производных гидрокортизона в качестве векторов доставки генетического материала в эукариотические клетки *in vivo* // Биотехнология. 2009. Т. 1. С. 31–38.
2. Неоваскулген. URL: <http://hsci.ru/produkty-i-uslugi/neovaskulgen> (дата обращения 20.01.2016).
3. Ю.А. Жогина, Д.В. Глазкова, А.С. Ветчинова, Е.В. Богословская, Г.М. Цыганова, Г.А. Шипулин. Сравнительная оценка активности различных генетических конструкций, направленных на подавление репликации ВИЧ-1 // Биофармацевтический Журнал. 2014. Т. 6(5). С. 11–18.
4. П.В. Михайлов, Е.К. Курбанова, В.Д. Гусарова, А.М. Лящук, Ю.Н. Новиков, Д.А. Гусаров. Периодический режим культивирования бактериального продуцента *E. coli* с подпиткой для продукции генно-терапевтической суперскрученной плазмиды // Биофармацевтический Журнал. 2014. Т. 6(3). С. 31–35.
5. J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. Gel electrophoresis of DNA. In *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. – N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989. Chapter 6.
6. Потеря в массе при высушивании // Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. Ч. 1. – М. 2007.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII издание. Ч. 1. – М. 2007.
8. ОФС 42-0075-07 // Государственная фармакопея XII, Ч.1. – М. 2007.
9. ОФС 42-0066-07 // Государственная фармакопея XII, Ч.1. – М. 2007.
10. Контроль стерильности методом прямого посева // Государственная фармакопея СССР. XI издание. Ч. 2. – М. 1989.
11. M.J. Maltesen, M. van de Weert. Drying methods for protein pharmaceuticals // *Drug Discovery Today: Technologies*. 2008. V. 5. № 2-3. P. e81-e88.
12. S. Bhattacharya, R. Suryanarayanan. Local mobility in amorphous pharmaceuticals-characterization and implications on stability // *J. Pharm. Sci.* 2009. V. 98. № 9. P. 2935–2953.
13. M.J. Pikal. Freeze Drying // *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* / Ed. by J. Swabrick, J.S. Boyland. – N.Y.: Marcel Dekker, 2001.
14. S. Tsinontides, P. Rajniak, D. Pham, W. Hunke, J. Placek, S.D. Reynolds. Freeze Drying – Principles and Practice for Successful Scale-up to Manufacturing // *Int. J. Pharm.* 2004. V. 280. P. 1–16.

