DETERMINATION OF CRITICAL PARAMETERS OF PRODUCTION TECHNOLOGY FOR LESFAL

G.I.Borshchevsky
Farmak JSC, Kyiv

Key words: liposomes; technology; critical parameters of production

Currently some success has been achieved when using liposomes in development of new drugs with various actions. Scientists have demonstrated the use of phospholipids as the raw material for production of liposomes. Supercritical fluids are used for producing multilayer, large and small monolayer liposomes. The size and behaviour of liposomes are determined primarily by the presence of a closed membrane wall. As a result, liposomes remain undamaged under various unfavourable conditions, and their membrane is capable to self-regenerate after its structural damages. A positive factor is that flexibility and fluidity of the bilayer give liposomes a high ductility. An important task in development of the liposomal drug technology is to determine the critical parameters that affect obtaining of stable, well characterized liposomal dispersions in large quantities. Critical parameters of the production technology of Lesfal liposomal drug for injection have been determined. It has been found that the most critical step is to obtain a lipid film. The main factors affecting formation of impurities in the process of producing liposomes of Lesfal drug for injection are time; temperature and the vacuum level. The critical parameters for these factors such as time (45 min), temperature (43°C), the vacuum level (not less than 14 gPa) have been determined. They are the optimal values for producing a lipid film for Lesfal liposomes.

Materials and Methods

Ethanol determination was performed by gas chromatography (SPhU, 2.2.28) [4] on an Aglient 7890N gas
chromatograph with a flame-ionisation detector under the following conditions:
• a HP-INNOWax fused silica capillary column with the size of 30 m × 0.25 mm covered with a layer of polyethylene glycol with the layer thickness of 0.25 μm;
• the column temperature: 100°C;
• the injection temperature: 230°C;
• the detector temperature: 250°C;
• the split ratio: 1:25;
• the carrier gas: helium for chromatography \( R \);
• the flow rate: 0.7 mL/min.

The content of ethanol in 1 mL of the drug \( (X_2) \), mg, was calculated using the equation:

\[
X_2 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 10 \cdot P}{S_0 \cdot 100 \cdot 10 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot 10000},
\]

where: \( S_0 \) – is the average area of the peak of ethanol in the chromatogram obtained with Reference solution (b); \( S_1 \) – is the average area of the peak of ethanol in the chromatogram obtained with Test solution; \( m_0 \) – is the weighed amount of ethanol used for preparation of Reference solution (b), mg; \( P \) – is the content of the major substance in ethanol used for preparation of Reference solution (b), %.

Determination of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine was performed by liquid chromatography (SPHU, 2.2.29) [4] on an Agilent 1200 liquid chromatograph with an ultraviolet detector under the following conditions:
• the steel column with the size of 250×4.6 mm packed with Kromasil Si sorbent with the particle size of 5 μm, or equivalent meeting the requirements of the chromatographic system suitability;
• the mobile phase: isopropanol–n-hexane–water \( R \) (67:16.5:16) ultrasonically degassed;
• the flow rate: 1.0 mL/min;
• detection: at 205 nm;
• the column temperature: 40°C;
• the volume of injection: 10 μL for determination of phosphatidylcholine; 50 μL for determination of lysophosphatidylcholine.

Before the analysis the chromatographic column was equilibrated with the mobile phase in the volume of not less than 300 mL.

**Reference solutions** (a) and (b) were chromatographed.

The retention time of the peak of phosphatidylcholine is about 10 min; the retention time of the peak of lysophosphatidylcholine is about 18 min. The peaks are integrated as shown in Fig. below.

The chromatographic system is considered to be suitable if:
• the number of theoretical plates calculated by the peak of phosphatidylcholine is not less than 1000;
• the relative standard deviation is not more than 2.0% calculated for 5 areas of the peak of phosphatidylcholine in the chromatogram obtained with Reference solution (a) and the peak of lysophosphatidylcholine in the chromatogram obtained with Reference solution (b).

The content of lysophosphatidylcholine in 1 mL of the drug \( (X_i) \), mg, was calculated using equation 2:

\[
X_i = \frac{S_i \cdot m_0 \cdot 50 \cdot P \cdot \rho}{S_0 \cdot m_1 \cdot 200},
\]

where: \( S_0 \) – is the average area of the peak of lysophosphatidylcholine in the chromatogram obtained with Reference solution (b); \( S_i \) – is the average area of the peak of lysophosphatidylcholine in the chromatogram obtained with Test solution; \( m_0 \) – is the weighed amount of lysophosphatidylcholine used for preparation of Reference solution (b), mg; \( m_1 \) – is the weighed amount of the drug used for preparation of Test solution, g; \( P \) – is the content of the major substance in lysophosphatidylcholine used for preparation of Reference solution (b), %; \( \rho \) – is the density of the drug.

The content of lysophosphatidylcholine per 1 mL of the drug should be:
• not more than 4 mg at the time of release;
• not more than 6.62 mg on the expiration date.

Evaporation of the alcoholic solution of Lipoid EPCS 100 was performed on a BUCHI rotary evaporator R-215 using the nitrogen blanketing. This rotary evaporator comprises the following major components: a vacuum controller, a flask rotation speed controller and a vapour temperature sensor, a water-bath, a vacuum pump. Temperature and the vacuum level are automatically maintained in the equipment.

**Results and Discussion**

During the experiment when evaporating the alcoholic solution of Lipoid EPCS 100 the following parameters were changed: 1) the time of evaporation at constant temperature and the vacuum level, 2) the temperature at vacuum of 20 gPa and the time of 45 min, 3) the temperature at constant temperature and the vacuum level at constant temperature and time. The results of the study are presented in Tab. 1, 2, 3.

As shown by the data from Table 1, with the time of evaporation from 35 to 45 min the content of lysophosphatidylcholine impurity is within the allowed limit range, but the content of ethanol does not comply with the specification. The data from Tab. 2 indicate that the results are best approximated to the optimal ones at the temperature of 43°C and the time of 45 min, however, the content of lysophosphatidylcholine is at the upper limit, and the content of ethanol is too high. The required content of impurities in the drug is achieved at the given values of time, temperature, and at the vacuum level of 12 and 14 gPa (Tab. 3).
The optimal parameters of production of a lipid film are given in Tab. 4.

Taking into account the physical and chemical properties of Lipoid EPCS the terminal sterilization of the drug is impossible. Sterilization was performed by filtration through a 0.1 µm filter, which is acceptable according to the requirements of the SPhU, article Methods of Preparation of Sterile Products. The drug was aseptically filled in the volume of 5.0 mL into dark-glass ampoules previously blown with sterile nitrogen [1].

The material of ampoules (glass of hydrolytic class 1) was selected according to the requirements of the SPhU, article 3.2.1 Glass Containers for Pharmaceutical Use.

The preliminary stability study of the drug has confirmed suitability of the primary package.

CONCLUSIONS

1. The major factors that affect formation of impurities when producing liposomes of Lesfal drug for injection are time, temperature and the vacuum level.

2. The critical parameters for these factors such as time (45 min), temperature (43°C), the vacuum level (not less than 14 gPa) have been determined. They are the optimal values for producing a lipid film for Lesfal liposomes.

REFERENCES

1. Борщевский Г.И., Омельченко И.О., Скрынский В.С. и др. // Вісник фармації. – 2014. – №1. – С. 39-44.

2. Борщевський Г.І., Комуров І.В., Кулінич А.В. // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2013. – №6. – С. 10-14.
3. Водовозова Е.Л., Евдокимов Д.В., Молотковский Юл.Г. // Биоорг. химия. – 2004. – Т. 30, №2. – С. 663.
4. Державна фармація України. – Вид. 1. – Х.: РІРЕГ, 2004. – 532 с.
5. Barani H., Montazer M. // J. of Liposome Res. – 2008. – Vol. 8, №3. – P. 249-262.
6. Gomez-Hens A., Fernandez-Romero J.M. // Trends Anal. Chem. – 2006. – Vol. 25. – P. 167-178.
7. Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I. et al. // J. Drug Deliv. Sci. Technol. – 2009. – Vol. 19. – P. 51.
8. Maruyama К. // Biol. Pharm. Bull. – 2000. – Vol. 23. – P. 791-799.
9. Meure L.A., Knott R., Foster N.R. et al. // Langmuir. – 2009. – Vol. 25. – P. 326-337.
10. Mozafari M.R., Johnson C., Hatziantoniou S. et al. // J. of Liposome Res. – 2008. – Vol. 18, №4. – P. 309-327.
11. Torchilin V.P. // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2006. – Vol. 1, №58. – P. 1532-1555.
12. Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K. et al. // Eur. J. Cancer. – 2000. – Vol. 36. – P. 942.
13. Zhang L., Gu F.X., Chan J.M. et al. // Clin. Pharmacol. and Therapeutics. – 2008. – Vol. 83, №5. – P. 761-769.

ВИЗНАЧЕННЯ КРИТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТУ «ЛЕСФАЛЬ»
Г.І.Борщевський

Ключові слова: ліпосоми; технологія; критичні параметри виробництва

У теперішній час досягнуті певні успіхи при використанні ліпосом у створенні нових лікарських препаратів різної спрямованості дії. Вченими доведено застосування фосфоліпідів в якості сировини для приготування ліпосом. Найбільш часто для отримання ліпосом використовують технологію надкритичних розчинів. За її допомогою можна отримати багатошарові, великі і дрібні одношарові ліпосоми. Розміри ліпосом і їх поведінка визначаються, насамперед, наявністю у них замкнutoї мембранної оболонки. Внаслідок цього ліпосоми зберігають цілісність при різних несприятливих умовах, а їх мембрана має здатність до самоініціації при структурних пошкодженнях. Оптимальним фактором є те, що згущеність бішару і його плинність надають ліпосомам високу пластичність. Іншими варіантами для отримання стабільних, добре характеризованих ліпосомальних дисперсій є технології ін'єкційного ліпосомального препарату «Лесфаль». Встановлено, що найкращою є стадія отримання ліпосомальних дисперсій у великих кількостях. Основними факторами, які впливають на отримання стабільних, добре характеризованих ліпосомальних дисперсій є температура і рівень вакууму. Оценені критичні параметри технології отримання ін'єкційного препарату «Лесфаль»: час (45 хв), температура (43°С), величина вакууму (не менше 14 гПа), які є оптимальними для процесу отримання ліпосомальних дисперсій.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА «ЛЕСФАЛЬ»
Г.И.Борщевский

Ключевые слова: липосомы; технология; критические параметры производства

В настоящее время достигнуты определенные успехи при использовании липосом в создании новых лекарственных препаратов различной направленности действия. Ученые доказали применение фосфолипидов в качестве сырья для приготовления липосом. Наиболее часто для получения липосом используют технологию сверхкритических растворов. С её помощью можно получить многослойные, крупные и мелкие однослойные липосомы. Размеры липосом и их поведение определяются, прежде всего, наличием у них замкнутой мембранной оболочки. В результате этого липосомы сохраняют целостность при различных неблагоприятных условиях, а их мембрана обладает способностью к самовосстановлению при структурных повреждениях. Важным фактором является то, что гибкость бислоя и его текучесть придают липосомам высокую пластичность. Важной задачей при разработке технологии липосомальных препаратов является определение критических параметров, влияющих на получение стабильных, хорошо характеризуемых липосомальных дисперсий. Определены критические параметры технологии получения инъекционного липосомального препарата «Лесфаль». Установлено, что наиболее критичной является стадия получения лиофилизированной пленки. Основными факторами, влияющими на образование пленок в процессе получения липосом инъекционного препарата «Лесфаль», являются время (45 мин), температура (43°С), уровень вакуума (не менее 14 гПа), которые являются оптимальными для процесса получения лиофилизированной пленки липосом препарата «Лесфаль». 