

RAZVOJ DOSTAVNIH SYSTEMOV NA OSNOVI LIPOSOMOV Z VGRAJENO KAKOVOSTJO

DEVELOPMENT OF LIPOSOMAL DELIVERY SYSTEMS BY QUALITY BY DESIGN APPROACH

AVTORJI / AUTHORS:

Nejc Klemenc, mag. farm.¹

doc. dr. Barbara Sterle Zorec, mag. farm.²

izr. prof. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.²

¹ Lek d. d., Razvojni Center Slovenija,
Farmacevtski razvoj,

Verovškova ulica 57, 1526 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko tehnologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: barbara.sterle.zorec@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Z naraščajočo intenzivnostjo raziskav in razvoja na področju liposomov kot dostavnih sistemov, ki se odraža v številnih s strani regulativnih organov odobrenih izdelkih, se nazorno kaže tudi široka uporabnost teh sistemov. Zaradi kompleksne narave liposomskih formulacij pa je zelo pomembno, da preiščeno pristopamo k razvoju tovrstnih farmacevtskih izdelkov. Kot močna strategija za obvladovanje te kompleksnosti se pojavlja pristop vgrajene kakovosti (QbD), ki poudarja, da sta za nadzor kakovosti ključna tako razumevanje formulacije, procesa in izdelka na osnovi znanstvenih dognanj kot sočasno učinkovito obvladovanje morebitnih tveganj. Za identifikacijo kritičnih dejavnikov in optimizacijo tako formulacij kot procesov je ključen sistematičen in načrtovan pristop k načrtovanju eksperimentov, ki vključuje vhodne spremenljivke (materiali, procesi, načrtovanje eksperimentov) in upošteva ključne attribute kakovosti liposomskih formulacij. Takšen pristop k razvoju nam omogoča, da kakovost vgradimo v izdelek, bolnikom pa nudimo kakovosten, varen in učinkovit napredni dostavni sistem.

KLJUČNE BESEDE:

kritične lastnosti vhodnih materialov, kritični atributi kakovosti, kritični procesni parametri, liposomi, vgrajena kakovost

ABSTRACT

With the increasing intensity of research and development in the field of liposomes as delivery systems, reflected in numerous regulatory approved products, the broad applicability of these systems is evident. However, due to the complex nature of liposomal formulations, it is crucial to approach the development of such pharmaceutical products thoughtfully. An effective strategy for managing this complexity is the quality by design (QbD) approach, which focuses on understanding the formulation, process and product based on scientific evidence, while effectively managing potential risks. To identify critical factors and optimize both formulations and processes, a systematic and planned approach to experimental design is crucial. This approach includes input variables (materials, processes, exper-



imental design) and considers the key quality characteristics of liposomal formulations. Such a development approach enables us to integrate quality into the product and provide patients with a high quality, safe and effective advanced drug delivery system.

KEY WORDS:

critical material attributes, critical process parameters, critical quality attributes, liposomes, quality by design

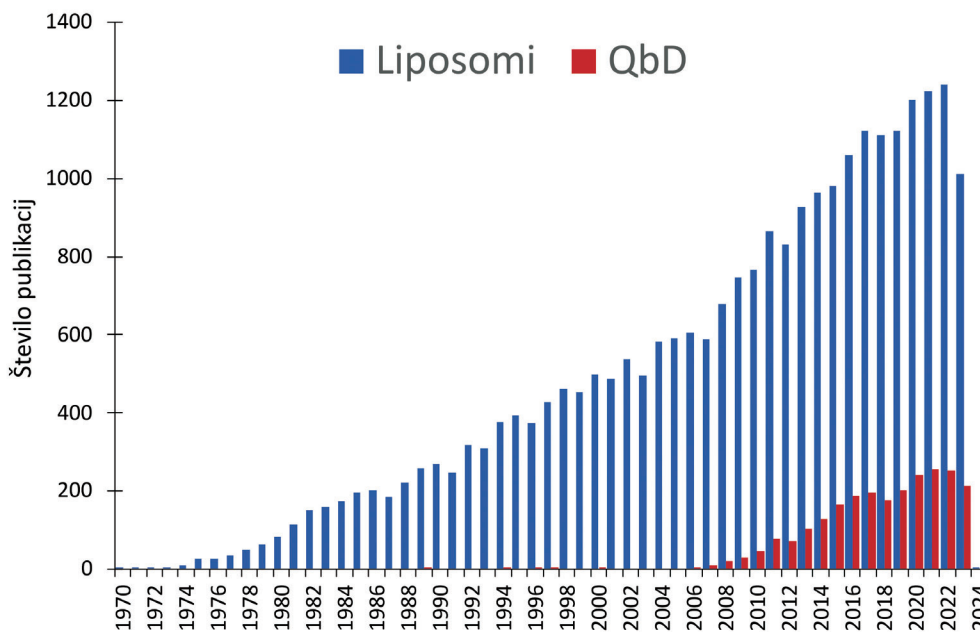
na osnovi liposomov, ki so namenjeni terapiji raka, glivičnih boleznih, protibolečinski terapiji idr. Zasedimo tudi liposomska protivirusna cepiva in pripravke za fotodinamično terapijo. Prvi liposomski dostavni sistem (Doxil[®], zdravilna učinkovina doksorubicin), ki je na trgu že od leta 1995 (2), je svoj prvi generični ekvivalent dobil šele februarja leta 2013 (Lipodox[®]), kar je bila ključna prelomnica za generično industrijo na področju liposomskih formulacij (3). Razvoj zdravil je v tem času zelo napredoval tudi zaradi vse bolj sistematične obravnave, ki vedno bolj podpira in upošteva vidik vgrajene kakovosti (*quality by design, QbD*). Kot je razvidno s slike 1, je tudi QbD v literaturnih virih vse bolj zastopan (4, 5).

1 UVOD

V skladu z večanjem intenzivnosti raziskav in razvoja na področju liposomov kot dostavnih sistemov že vse od prve objave leta 1964 kontinuirano narašča tudi število nanje vezanih publikacij (1), kar priča o njihovi široki uporabnosti (slika 1). Slednjo na področju farmacevtske tehnologije potrjujejo številni na trgu prisotni dostavni sistemi

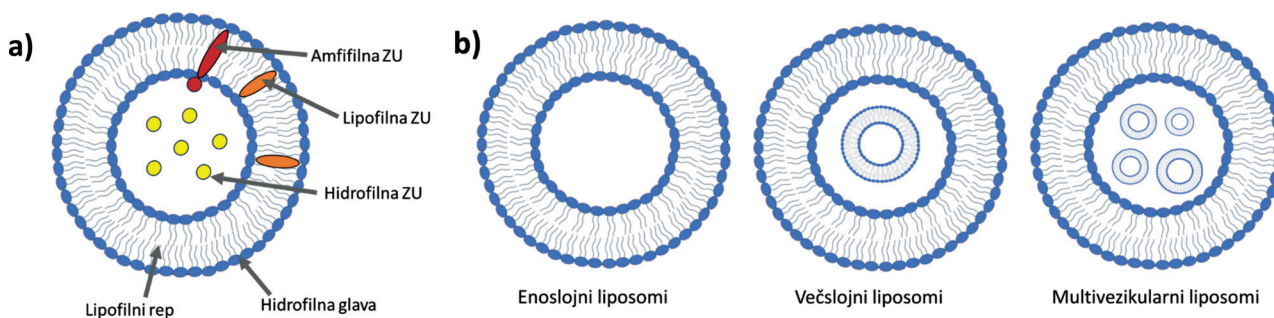
2 NAMEN UPORABE IN ZGRADBA LIPOSOMOV

Liposomi so sferični vezikli, sestavljeni iz enega ali več koncentričnih fosfolipidnih dvoslojev, ki v notranjosti zaobjemajo hidrofilno vsebino (6). Prvič sta jih opisala Bangham in Horne leta 1964 (6), in sicer predvsem v vlogi membranskih



Slika 1: Število objavljenih raziskav po letih, od leta 1970 do danes, s ključnima besedama »liposome« in »quality by design« v naslovu ali povzetku članka.

Figure 1: Number of studies published over the years, from 1970 to the present, with the key terms "liposomes" and "quality by design" in the title or abstract of the article.



Slika 2: a) Zgradba liposoma z vgrajenimi hidrofilnimi (v vodnem jedru liposoma), lipofilnimi (v lipidnem dvosloju) in amfifilnimi zdravilnimi učinkovinami (v medfazi); b) prikaz enoslojnega, večslojnega in multivezikularnega liposoma.

Figure 2: a) Structure of liposomes with incorporated hydrophilic (in the aqueous core of the liposome), lipophilic (in the lipid bilayer) and amphiphilic molecules (in the interphase); b) representation of unilamellar, multilamellar and multivesicular liposomes.

modelov. Dandanes jih večinoma uporabljamo kot nosilce zdravilnih učinkovin ali kozmetično aktivnih sestavin, saj jim zgradba v obliki fosfolipidnega dvosloja omogoča vgrajevanje tako hidrofilnih kot tudi lipofilnih in amfifilnih spojin (slika 2) (7).

Poleg tega lahko z vgradnjo v liposome povečamo topnost vgrajenih zdravilnih učinkovin (karvedilol, fenofibrat, indometacin, lovastatin ...) oz. preprečimo njihovo kemijsko ali biološko razgradnjo (8). Zmanjšamo lahko tudi njihovo toksičnost, kar vodi v zmanjšanje neželenih učinkov inkapsuliranih učinkovin (kot v primeru amfotericina B). Z ustreznim načrtovanjem lahko na površino liposomov pripravimo tudi specifične ligande (npr. protitelesa) in tako omogočimo ciljano dostavo in tam sproščanje vgrajenih učinkovin. Poleg farmacevtske industrije majhne lipidne vezikle uporabljajo tudi v prehrabeni in kozmetični industriji ter v diagnostične namene (7).

Liposomi so sestavljeni iz naravnih ali sintezno pridobljenih fosfolipidov, kot so fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin in fosfatidilglicerol, ki v vodnih raztopinah tvorijo enega ali več koncentričnih dvoslojev. Njihove polarne glave so orientirane k vodnemu mediju, nepolarne verige zae-strenih maščobnih kislin pa obrnjene druga proti drugi in sestavljajo notranjo strukturo dvosloja (slika 2). Poleg razvrščanja liposomov na osnovi njihove velikosti, ki se lahko giblje od nanometrskih do mikrometrskih velikosti (50 nm do 5 µm), jih razvrščamo tudi glede na število dvoslojev. Ločimo med enoslojnimi (sestavljajo jih en lipidni dvosloj) in večslojnimi (več koncentričnih lipidnih dvoslojev) vezikli. Slednji so večji od 0,5 µm, v primeru enoslojnih pa ločimo majhne in velike unilamelarne vezikle (*small/large unilamellar vesicles, SUV/LUV*) velikosti 20–100 nm oz. 100–500 nm (slika 2) (9). Poznamo tudi multivezikularne liposome, kjer

en zunanji dvosloj obdaja več manjših notranjih veziklov (10). Na interakcijo liposom-celica močno vpliva tudi narava in gostota naboja na površini veziklov, kar pa je odvisno od vrste fosfolipida.

Glede na funkcionalne lastnosti in namen uporabe pa liposome delimo še na konvencionalne, dolgo cirkulirajoče liposome, imunoliposome z modificirano površino za ciljano sproščanje vgrajenih učinkovin, kationske liposome za dostavo genske učinkovine in na pH odzivne liposome (7).

3 RAZVOJ Z VGRAJENO KAKOVOSTJO

Vgrajena kakovost – QbD je sistematičen pristop k razvoju, ki temelji na vnaprej določenih ciljih, poudarja razumevanje izdelka in procesa ter omogoča nadzor kakovosti na podlagi znanosti in ustreznega upravljanja tveganj (11). Koncept QbD je leta 1992 razvil Joseph M. Juran, ki je verjel, da mora biti kakovost izdelka vanj »vgrajena«, saj večina kasnejših težav izhaja ravno iz neoptimalnega načina razvoja in priprave samega izdelka (12).

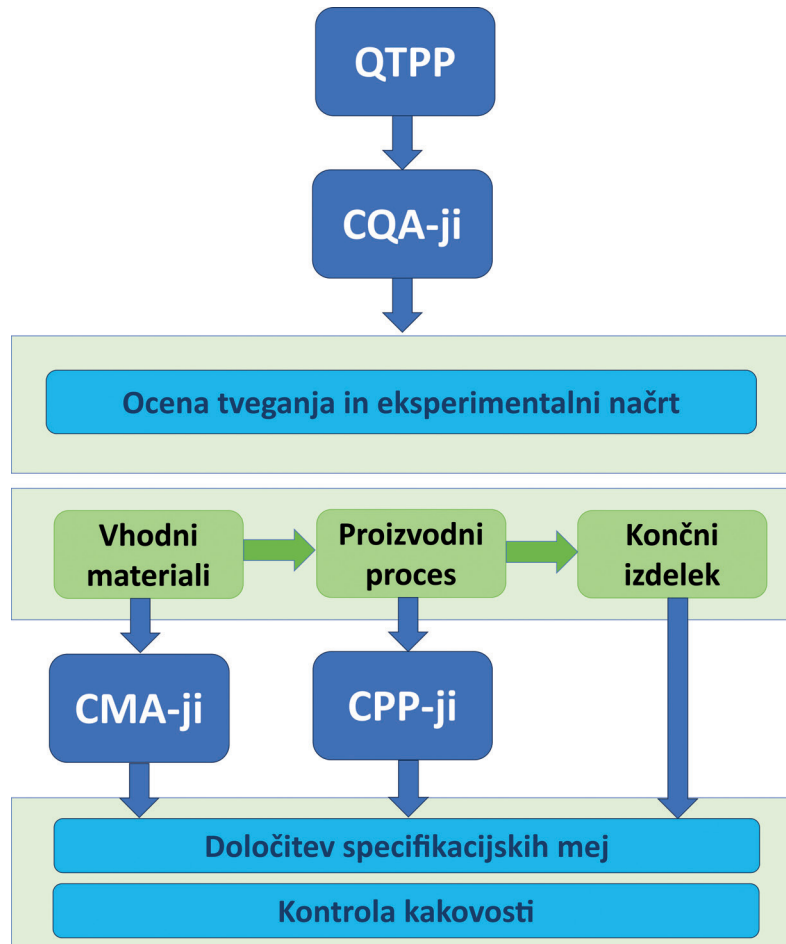
Ob sodelovanju FDA (*Food and Drug Administration*) in EMA (*European Medicines Agency*) so nastale smernice ICH za kakovost (*The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), ICH 8 in ICH 9, v katerih podajajo informacije o načinih implementiranja koncepta izdelka z vgrajeno kakovostjo v prakso (4, 5). Cilji takšnega pristopa pri razvoju izdelka so naslednji:



- določiti smiselne specifikacije, ki ustrezno opisujejo kakovost izdelkov – zdravil in zagotavljajo klinično učinkovitost;
- povečati zmogljivost procesa, zmanjšati variabilnost in pomanjkljivosti izdelka na podlagi razumevanja procesa oz. izdelka in ustrezne kontrole kakovosti;
- povečati učinkovitost razvoja in proizvodnje izdelkov;
- izboljšati analizo temeljnih vzrokov (*root cause analysis*) in upravljanje sprememb.

QbD v farmacevtski industriji služi kot orodje, ki omogoča razumevanje vplivov vhodnih materialov, procesnih parametrov in lastnosti izdelanega produkta na kakovost farmacevtskih izdelkov. Na tak način definiramo sestavo izdelka in razvijemo proces, ki omogoča izdelavo farmacevtskega izdelka z vnaprej določenimi atributi kakovosti (slika 3). Vidik QbD je sestavljen iz naslednjih elementov:

- določitev ciljnega profila kakovosti izdelka (*quality target product profile, QTPP*), v katerem za slednjega identificiramo tudi kritične attribute kakovosti (*critical quality attributes, CQA*);
- razvoj in razumevanje izdelka, vključno z identifikacijo kritičnih lastnosti vhodnih materialov (*critical material attributes, CMA*);
- razvoj in razumevanje procesa, vključno z identifikacijo kritičnih procesnih parametrov (*critical process parameters, CPP*) in razumevanjem »scale-up« principov s povezovanjem CMA-jev, CPP-jev s CQA-ji;
- kontrolna strategija, ki vključuje specifikacije za zdravilne učinkovine, pomožne snovi in končne izdelke kot tudi kontrolne parametre za vsak korak proizvodnje;
- spremljanje sposobnosti (tehnološkega) procesa in njegove nenehne izboljšave (11).



Slika 3: Načrt QbD ter ključni elementi QTPP in CQA-jev; povzeto po (13).

Figure 3: QbD plan and key elements of QTPP and CQAs; summarised from (13).

4 OPREDELITEV CILJNIH PROFILOV KAKOVOSTI IZDELKA IN IDENTIFIKACIJA KRITIČNIH ATRIBUTOV KAKOVOSTI LIPOSOMOV

QTPP v smernicah ICH definirajo kot povzetek vseh atributov kakovosti zdravila, ki morajo biti doseženi za zagotovitev njegovih varnosti in učinkovitosti. Izdelan je na podlagi predhodnega znanja o izbranem farmacevtskem izdelku in njegovem obnašanju *in vivo*. V QTPP-ju moramo navesti način aplikacije, farmacevtsko obliko, dostavni sistem, lastnosti, ki vplivajo na stabilnost in sterilnost, ter farmakokinetiko in profil sproščanja vgrajene zdravilne učinkovine (11). V nadaljevanju predstavljamo primer QTPP-ja za parenteralno liposomsko formulacijo s ciljano dostavo.

Pripravljen je na podlagi smernic za liposomske izdelke, ki jih je leta 2018 izdala FDA (preglednica 1) (11).

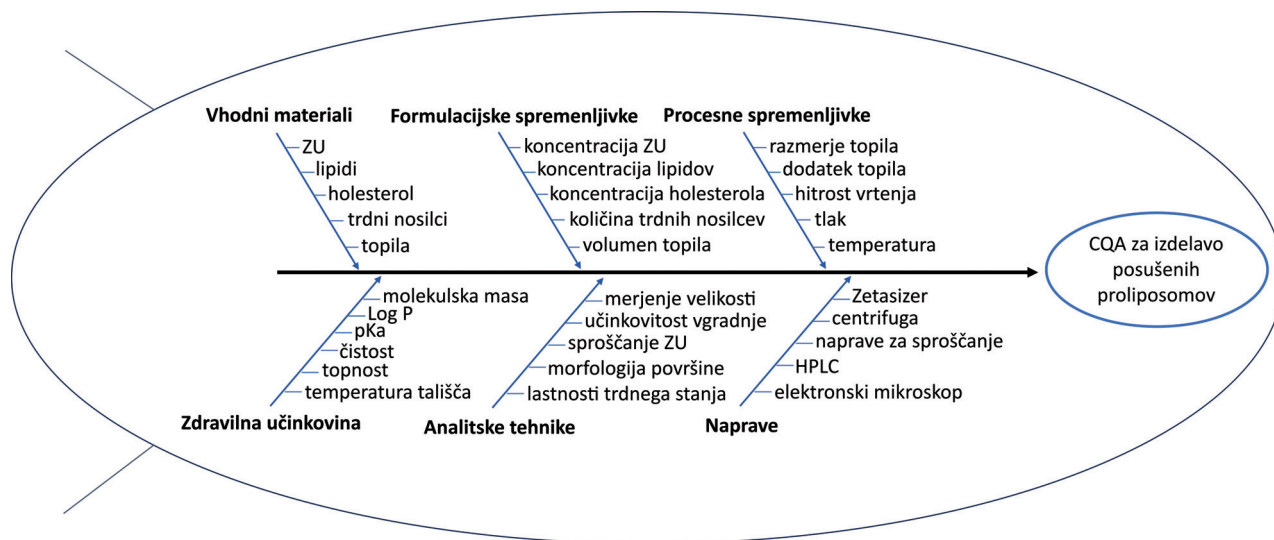
Naslednji korak pri uporabi pristopa QbD je definiranje CQA-jev izdelka, ki so v ICH Q8 definirani kot fizikalne, kemične, biološke ali mikrobiološke lastnosti, ki morajo biti znotraj definiranega razpona, vrednosti ali distribucije, da zagotavljajo ustrezno kakovost izdelka (4). Običajni CQA-ji liposomskih formulacij so povprečna velikost in porazdelitev velikosti liposomov ter zeta potencial (fizikalni CQA-ji), vsebnost zdravilne učinkovine (kemijski CQA), stabilnost *in vivo* in profil sproščanja zdravilne učinkovine (biološki CQA) ter sterilnost (mikrobiološki CQA). Na podlagi vzorčnih diagramov (diagrami Ishikawa) analiziramo, kateri dejavniki (lastnosti vhodnih materialov in učinkovin, procesni parametri itd.) bi lahko vplivali na izbrane CQA-je liposomov, in na osnovi tega izdelamo oceno tveganja (slika 4) (13, 15).

Preglednica 1: Primer QTPP-ja za liposomsko formulacijo, namenjeno parenteralni aplikaciji in ciljni dostavi.

Table 1: Example of a QTPP for a liposomal formulation for parenteral administration and targeted delivery.

| Elementi QTPP | | Cilj |
|--|---|---|
| Farmacevtska oblika Način sproščanja Način aplikacije Odmerek | | nanoformulacija za injiciranje ciljno sproščanje parenteralna aplikacija, enkratna aplikacija x mg/mL oz. x mg/vialo |
| Atributi kakovosti liposomskega izdelka | biokompatibilnost mikrobiološka kakovost bakterijski endotoksini | brez hemolitske aktivnosti sterilen izdelek odsotni; apirogen izdelek |
| | fizikalne lastnosti (velikost in morfologija liposomov, lamelarnost, pH, površinske lastnosti, viskoznost, zeta potencial, osmolarnost, izgled) Identifikacija zdravilne učinkovine vsebnost (koncentracija, učinkovitost vgradnje in vsebnost) stabilnost <i>in vivo</i> sproščanje zdravilne učinkovine razpadni produkti/nečistote zaostanki topil | morajo ustrezati standardom specifikacije podobnega odobrenega izdelka oz. specifikaciji, postavljeni na podlagi raziskav |
| Ovojnina | | ustrezna ovojnina, ki vzdržuje sterilnost in stabilnost izdelka med celotnim rokom uporabe |
| Stabilnost | | rok uporabe: 24 mesecev pri sobni temperaturi |





Slika 4: Analiza dejavnikov, ki bi lahko vplivali na kritične attribute kakovosti (CQA) liposomov, s pomočjo vzročnega diagrama Ishikawa; povzeto po (14).

Figure 4: Analysis of factors that could influence the critical quality attributes (CQA) of liposomes using an Ishikawa cause-effect diagram (adapted from (14)).

4.1 VELIKOST LIPOSOMOV

Povprečna velikost liposomov in porazdelitev velikosti liposomov sta glavna fizikalna CQA-ja liposomskih formulacij, saj zelo pomembno vplivata na porazdeljevanje *in vivo* ter sproščanje in sposobnost ciljane dostave zdravilnih učinkovin. Manjši liposomi (20–30 nm) se iz telesa izločijo skozi ledvice, medtem ko so večji (do 300 nm) privzeti v retikuloendotelijski sistem. Z zmanjšanjem velikosti liposomov pod 100 nm lahko bistveno zmanjšamo privzem v retikuloendotelijski sistem in omogočimo njihovo ciljano dostavo na planirano mesto delovanja (17). V primeru liposomov velikosti pod 200 nm je olajšana tudi priprava sterilnih formulacij, saj lahko poleg aseptične priprave izvedemo tudi membransko filtracijo (18). Tudi pri filtraciji manjših liposomov lahko mašenje filtrov predstavlja velik izziv. Velikost liposomov vpliva tudi na kinetiko sproščanja zdravilne učinkovine; z zmanjševanjem velikosti povečamo razmerje med površino in volumnom, kar pomeni, da je več molekul učinkovine bližje površini liposoma in se posledično hitreje sproščajo (19). Pomemben fizikalni parameter, povezan z velikostjo liposomov, je tudi polidisperzni indeks, ki definira homogenost porazdelitve velikosti liposomov; za liposomske formulacije so ustrezni polidisperzni indeksi manjši od 0,3 (idealno čim bližje vrednosti 0), ki nakazujejo na monodisperznost formulacije (19).

4.2 ZETA POTENCIAL

Zeta potencial je merilo za električni naboj na površini delcev in je zelo pomemben parameter za karakterizacijo stabilnosti liposomov. Delci z visokim negativnim ali pozitivnim zeta potencialom (več kot 30 mV) se medsebojno odbijajo, kar omogoča njihovo fizikalno stabilnost. Zmanjšanje zeta potenciala na nevtralno vrednost lahko vodi v agregacijo. Vrsta naboja takih sistemov vpliva na čas kroženja liposomov v telesu in na njihovo interakcijo s tkivi. Kationski liposomi imajo večjo afiniteto do negativno nabitih (rakavih) celičnih membran kot nevtralni ali negativni, kar se kaže tudi v njihovi večji selektivnosti in posledično učinkovitosti. Prav zaradi tega lahko z vgradnjo v kationske liposome izboljšamo varnost in učinkovitost zdravilnih učinkovin, ki se uporabljajo v terapiji rakavih bolezni (20, 21). Vendar tega ne moremo posplošiti na vse liposomske formulacije, saj so v nekaterih raziskavah poročali tudi o nasprotnih rezultatih (22).

4.3 VSEBNOST ZDRAVILNE UČINKOVINE

Vsebnost zdravilne učinkovine v liposomih podamo na tri različne načine, in sicer kot koncentracijo zdravilne učin-

kovine (mg/mL disperzije), kot učinkovitost vgradnje (entrapment/encapsulation efficiency), ki podaja (v %) količino v notranjost liposomov vgrajene učinkovine v primerjavi s celotno količino učinkovine, in vsebnost učinkovine (*drug loading*), ki večinoma opisuje maso učinkovine glede na celotno maso liposomov v formulaciji (16, 17).

4.4 STABILNOST *IN VIVO*

Stabilnost *in vivo* je še zlasti pomembna pri parenteralni aplikaciji liposomov s podaljšanim sproščanjem, pri čemer hidro- oz. lipofilnost njihove površine vpliva na obseg interakcij med liposomi in krvjo. Bolj kot so liposomi lipofilni, večja je verjetnost za njihovo fagocitozo, saj se v večjem obsegu vežejo na plazemske proteine (19). Z vezavo hidrofilnih polimerov na površino liposomov (npr. PEG) lahko povečamo njihovo hidrofilitnost in tako preprečimo njihovo hitro eliminacijo preko retikuloendotelijskega sistema (t. i. »*stealth*« liposomi) oz. podaljšamo čas zadrževanja liposomov v krvnem obtoku (t. i. dolgo cirkulirajoči liposomi) (24, 25).

4.5 SPROŠČANJE ZDRAVILNE UČINKOVINE

Poleg stabilnosti je za doseganje zelene učinkovitosti liposomskih formulacij bistven tudi optimalen profil sproščanja vgrajene zdravilne učinkovine. Naloga liposomov je, da učinkovino v ustreznem odmerku dostavijo na točno določeno mesto v organizmu ob zelenem času. Za ciljno dostavo liposomov je pri tem bistvena identifikacija interakcij s tarčnimi celicami. Ligandi, vezani na površino liposomov, morajo biti primerni, da se ustrezno vežejo na tarčne receptorje celic, kar vodi v endocitozo liposomov in posledično sproščanje učinkovine na tarčnem mestu. Za ciljno dostavo na površino liposomov priprimo ligande, kot so monoklonska protitelesa, fragmenti protiteles, peptidi, proteini, nukleinske kisline, ogljikovi hidrati, pa tudi nekatere male molekule (24).

5 IZDELAVA OCENE TVEGANJA ZA LIPOSOMSKE DOSTAVNE SISTEME IN VREDNOTENJE VPLIVOV NA RAZLIČNE CQA-JE

Lastnosti vhodnih materialov in izbrane procesne parametre, ki lahko vplivajo na CQA-je izdelka, identificiramo preko

izdelave ocene tveganja (*risk assessment*). To običajno naredimo s pomočjo načrtovanja eksperimentov (*design of experiments – DoE*), s čimer tudi ovrednotimo interakcije med različnimi dejavniki in jih kvantificiramo. Na podlagi pridobljenih podatkov nato izdelamo kontrolno strategijo, v kateri definiramo sprejemljiv razpon identificiranih kritičnih parametrov (npr. CMA, CPP) (11).

5.1 IZDELAVA OCENE TVEGANJA

Na začetku razvoja izdelka postavimo začetno oceno tveganja, kjer na podlagi trenutnega znanja ocenimo vplive različnih materialov in procesnih korakov na izbrane CQA. V preglednici 2 je prikazan primer začetne ocene tveganja za liposomsko formulacijo, ki vključuje zdravilno učinkovino, fosfolipide, holesterol in trdni nosilec. Primer je postavljen na procesu, pri katerem učinkovino in lipide raztopimo v mešanici organskih topil, nato pa primešamo vodotopen trdni nosilec. Nastalo mešanico posušimo z vakuumskim sušenjem, da dobimo proliposomski prašek. Prašek hidratiramo pred aplikacijo v vodnem mediju, pri čemer nastanejo liposomi (15).

Visoka in srednje velika tveganja med razvojem podrobneje raziskujemo, da ovrednotimo in razumemo njihov vpliv. Na podlagi novih eksperimentov in pridobljenega znanja o vplivu različnih dejavnikov na CQA-je tveganja med razvojem ustrezno zmanjšujemo, definiramo CMA-je, CPP-je in kontrolno strategijo.

5.2 VREDNOTENJE VPLIVOV NA VSEBNOST ZDRAVILNE UČINKOVINE

Vsebnost zdravilne učinkovine večinoma optimiziramo glede na doseženo učinkovitost vgradnje (EE), ki nam pove več o učinkovitosti in robustnosti procesa izdelave liposomov kot podatek o koncentraciji učinkovine v disperziji. Najpomembnejši parametri, ki vplivajo na učinkovitost vgradnje, so lastnosti učinkovine in lipidov ter molsko razmerje med lipidi in učinkovino, koncentracija holesterola, interakcije med vhodnimi materiali ter različni procesni parametri. Večja količina lipidov tako vodi v oblikovanje večjega števila liposomov z večjim notranjim volumnom in višjo učinkovitostjo vgradnje učinkovine (17). Večja količina holesterola pa povzroči nastanek t. i. žepkov v fosfolipidnem dvosloju, v katerega se lahko potem vgradijo tudi hidrofilne učinkovine (26). Slednje pa lahko vpliva na stabilnost lipidnega dvosloja in posledično tudi na njegovo permeabilnost.



Preglednica 2: Primer začetne ocene tveganja za izdelavo proliposomskega praška z lopinavirom; povzeto in prirejeno po (15).

Table 2: Example of an initial risk assessment for the preparation of proliposomal powder with lopinavir; adapted and summarized from (15).

| Začetna ocena tveganja | | | | | | | | | | |
|--|---------|------------|------------|----------------|---------|---|-------------------|--------------------|-----------|--|
| CQA | ZU | Fosfolipid | Holesterol | Trdni nosilec* | Topila | Priprava mešanice ZU:lipidi:trdni nosilec | Odpapevanje topil | Rehidracija praška | Pakiranje | |
| Vsebnost ZU | visoko | visoko | visoko | visoko | srednje | srednje | srednje | srednje | srednje | |
| Vsebnost (fosfo)lipidov | nizko | visoko | visoko | srednje | srednje | srednje | srednje | srednje | srednje | |
| Učinkovitost vgrajenje (EE) | visoko | visoko | visoko | visoko | visoko | srednje | srednje | srednje | srednje | |
| Velikost liposomov | srednje | srednje | srednje | visoko | srednje | srednje | nizko | visoko | srednje | |
| Morfologija | srednje | srednje | srednje | srednje | srednje | srednje | nizko | visoko | srednje | |
| Lamelarnost | srednje | srednje | srednje | srednje | srednje | srednje | nizko | visoko | srednje | |
| pH | srednje | visoko | visoko | srednje | nizko | nizko | nizko | nizko | nizko | |
| Zeta potencial | visoko | visoko | visoko | srednje | srednje | nizko | nizko | nizko | srednje | |
| Sproščanje | srednje | visoko | visoko | visoko | srednje | srednje | nizko | visoko | srednje | |
| Razpadni produkti | visoko | visoko | visoko | srednje | visoko | srednje | srednje | srednje | nizko | |
| Zaostanki topil | nizko | nizko | nizko | nizko | srednje | srednje | visoko | nizko | nizko | |
| Stabilnost in-vivo | visoko | visoko | visoko | srednje | visoko | srednje | nizko | visoko | srednje | |
| Vidni in s prostim očesom nevidni delci | srednje | srednje | srednje | srednje | nizko | srednje | nizko | srednje | srednje | |

Legenda: ZU – zdravilna učinkovina, *npr. maltodekstrin, sorbitol, mikrokristalna celuloza, manitol.

Če povečamo količino učinkovine in zmanjšamo količino lipidov, se učinkovitost vgradnje zniža (27). Učinkovitost vgradnje zdravilne učinkovine, ki imajo od pH odvisno topnost, lahko povečamo tudi z dodatkom pufrov, ki imajo učinkovini prilagojeno vrednost pH (22). CPP-ji, ki vplivajo na učinkovitost vgradnje, so temperatura medija za hidratacijo in število ciklov zamrzovanja-odtajanja s tekočim dušikom, ki jim je bila izpostavljena hidratirana zmes; večje število ciklov in višja temperatura hidratacije sta negativno vplivala na vgradnjo učinkovine (28). Pri filmski metodi izdelave liposomov uporaba visokih temperatur (tj. nad temperaturo steklastega prehoda lipidov) prav tako negativno vpliva na učinkovitost vgradnje učinkovine (zaradi vpliva na prepustnost membrane liposomov), medtem ko hitrost vrtenja bučke vpliva na debelino in na hitrost hidratacije nastalega lipidnega filma (29).

5.3 VREDNOTENJE VPLIVOV NA VELIKOST LIPOSOMOV

V okviru optimizacije velikosti liposomov moramo ovrednotiti več različnih parametrov, kot so koncentracija fosfolipidov, količina zdravilne učinkovine, razmerje med fosfolipidi in holesterolom, pH vrednost pufrnih raztopin, procesna temperatura idr. Višja koncentracija lipidov ponavadi vodi v nastanek večjih liposomov z ožjo porazdelitvijo velikosti (30).

5.4 VREDNOTENJE VPLIVOV NA ZETA POTENCIAL

Na zeta potencial vplivajo predvsem formulacijske spremenljivke, kot so ionska moč in pH uporabljenega pufrja, naboj lipidov in sestava dvosloja ter procesni parametri, kot je čas soniciranja (v primeru homogenizacije disperzije z uporabo ultrazvoka). Za uravnavanje zeta potenciala imamo na voljo različne stabilizatorje, kot so stearilamin, diacetil fosfat in modificirani lipidi, pri čemer je za doseganje optimalne stabilnosti končnega izdelka njihovo koncentracijo potrebno prilagoditi posamezni formulaciji (31).

5.5 VREDNOTENJE VPLIVOV NA STABILNOST *IN VIVO* IN SPROŠČANJE

Povečano stabilnost *in vivo* lahko dosežemo z izbiro ustrezne sestave lipidnega dvosloja. Njegovo stabilnost lahko izboljšamo z dodatkom holesterola, kar zmanjša obseg

fagocitoze liposomov. Slednjo lahko tudi sterično oviramo; v tem primeru za izdelavo liposomov uporabimo določene pomožne snovi (npr. fosfatidil inozitol) ali pa liposome PEG-iliramo. Pri tem molekulska masa PEG predstavlja CMA (32). V raziskavi (33) navajajo, da so formulacije z rahlo negativno nabito površino izkazovale večji privzem v tumorske celice in manjši privzem v jetra, kar je podaljšalo zadrževanje v telesu. V primeru na pH občutljivih liposomov lahko sproščanje načrtujemo z izbiro (in koncentracijo) pomožnih snovi, ki destabilizirajo membrane liposomov pri določeni vrednosti pH (22).

6 OPREDELITEV KRITIČNIH LASTNOSTI MATERIALOV IN KRITIČNIH PROCESNIH PARAMETROV ZA LIPOSOMSKE DOSTAVNE SISTEME

6.1 KRITIČNE LASTNOSTI MATERIALOV

V okviru kritičnih lastnosti (vhodnih) materialov (CMA) vrednotimo vse sestavine formulacije; v primeru liposomskih izdelkov so to zdravilne učinkovine, lipidi in pufrne raztopine (11).

Fizikalno kemijske lastnosti posameznih učinkovin lahko pomembno vplivajo na kakovost izdelka. Glede na njeno hidro- oz. lipofilnost se lahko učinkovina vgradi ali v vodno jedro ali v lipidni dvosloj liposomov. Pri sočasnem vgrajevanju več različnih učinkovin je potrebno oceniti še njihov medsebojni vpliv na proces vgradnje. Pozorni moramo biti tudi na porazdelitveni koeficient; v eni izmed raziskav so dokazali, da učinkovina z zelo nizkim porazdelitvenim koeficientom (pod $-2,66$) izkazujejo podaljšano sproščanje iz liposomov, medtem ko so pri vrednostih slednjega med $-0,3$ in $1,7$ opazili hitro sproščanje učinkovine (32).

Na lastnosti liposomov pomembno vplivajo tudi fizikalno-kemijske lastnosti lipidov. Lipidi z večjo vsebnostjo nenasičenih maščobnih kislin so bolj dovzetni za oksidacijo in hidrolizo, medtem ko imajo lipidi z večjim deležem nasičenih maščobnih kislin višjo temperaturo faznega prehoda. Pomembna je tudi dolžina lipidnih verig; fosfolipidi s kratko-verižnimi maščobnimi kislinami tvorijo liposome s tanjšim dvoslojem in večjim notranjim volumnom, v katerega lahko vgradimo hidrofilne zdravilne učinkovine. Lastnosti lipidov vplivajo tudi na naboj in fluidnost fosfolipidnega dvosloja in



posledično na permeabilnost snovi skozi liposomsko membrano (15).

V času razvoja je potrebno ustrezno ovrednotiti tudi sestavine, s katerimi modificiramo površinske lastnosti liposomov, saj lahko vplivajo na sproščanje vgrajene učinkovine. V primeru hitosana je znano, da njegove topnost, koncentracija in molekulska masa vplivajo na velikost izdelanih liposomov. Še bolj izrazit vpliv je značilen za PEG, katerega molekulska masa in gostota na površino liposoma pripetih verig vplivata tako na velikost izdelanih liposomov kot tudi na njihovo kasnejšo porazdelitev v telesu. Pomembni pa niso le materiali, ki jih uporabljamo pri izdelavi liposomov, temveč tudi njihovo masno razmerje. V različnih raziskavah zasledimo, da na lastnosti liposomov pomembno vplivajo tako razmerje med holesterolom in fosfolipidi kot med zdravilno učinkovino in lipidi, razmerje med organsko in vodno fazo ter sestava organske faze (npr. razmerje med kloroformom in metanolom) (34).

6.2 KRITIČNI PROCESNI PARAMETRI

Za pripravo liposomov uporabljamo različne metode, kot so metoda tankih filmov, metoda z injiciranjem, metode na osnovi visokih tlakov in metoda odparevanja organske faze. Najpogosteje uporabljamo prvo, ki vključuje hidratacijo tankega lipidnega filma. Kritični procesni parametri (CPP), ki vplivajo na učinkovitost vgrajevanja zdravilne učinkovine pri tej metodi, so temperatura in hitrost vrtenja bučke v fazi izhlapevanja topila ter faza hidratacije. Ker po hidrataciji nastanejo veliki multilamelarni liposomi, je za pripravo enoslojnih liposomov disperzijo potrebno še homogenizirati, da zmanjšamo in poenotimo velikost liposomov. V ta na-

men lahko uporabimo metodo ekstruzije skozi polimerno membrano, pri kateri so kot CPP-ji identificirani velikost membranskih por, število prehodov skozi membrano, temperatura in tlak filtracije. V industrijskem merilu sta bolj uporabni ultrazvočna homogenizacija (pri kateri sta kot CPP identificirana kritična amplituda in čas soniciranja) in metoda (ponavljajočega) zamrzovanja in odtajevanja s številom ciklov kot glavnim CPP (35).

7 KONTROLNA STRATEGIJA

Za zagotavljanje ponovljive kakovosti zdravila, je potrebno postaviti ustrezno kontrolno strategijo, s katero nadzorujemo vhodne materiale, procesne parametre, vmesne produkte, ovojnino in končni izdelek (11). Smernice ICH kontrolno strategijo definirajo kot načrtovan niz kontrol, ki izhajajo iz trenutnega znanja o izdelku in procesa ter zagotavljajo učinkovitost procesa in kakovosten izdelek (5). Kontrolna strategija lahko vključuje parametre in lastnosti tako zdravilnih učinkovin, pomožnih snovi, opreme, proizvodnih pogojev kot tudi medprocesne kontrole, specifikacije končnega produkta ipd. V preglednici 3 predstavljamo primer kontrolne strategije za izdelavo proliposomskega praška z lopinavirom (15). Poleg spremljanja in preverjanja sposobnosti procesa pa je potrebno zagotavljati tudi njegove nenehne izboljšave. Le tako lahko sočasno s proizvodnjo učinkovitega, varnega in kakovostnega farmacevtskega izdelka sledimo tudi željam in trendom trga.

Preglednica 3: Primer kontrolne strategije za izdelavo proliposomskega praška z lopinavirom; prirejeno po (15).

Table 3: Example of control strategy for the preparation of proliposomal lopinavir powder; adapted from (15).

| Faktor | Zahteva | Način kontrole |
|---|--|---------------------------------|
| Tip lipida | fosfolipid s steklastim prehodom pri 54 °C | analiza ob sproščanju materiala |
| Povprečni premer delcev Pearlitola® d50 | < 160 µm | analiza ob sproščanju materiala |
| Razmerje lipid : zdravilna učinkovina | 10 : 1 | definirano v postopku |
| Razmerje kloroform : metanol | 60 : 40 | definirano v postopku |
| Temperatura rotirajoče bučke | 54 ± 2 °C | definirano v postopku |
| Hitrost vrtenja bučke | 100 ± 5 rpm | definirano v postopku |

8 SKLEP

Liposomski izdelki veljajo za dokaj kompleksne sisteme, zato je za uspešen razvoj takšnih farmacevtskih izdelkov zelo pomembna izbira ustreznega razvojnega pristopa. Za najbolj sistematičnega velja pristop QbD, ki ga priznavajo tudi regulativne agencije, kot sta FDA in EMA. Takšen pristop poudarja, da je formulacijo, proces in izdelek potrebno razumeti na podlagi znanstvenih dognanj in istočasno ustrezno upravljati z morebitnimi tveganji. Pri liposomskih formulacijah kot kritične lastnosti kakovosti največkrat spremljamo velikost liposomov, zeta potencial, vsebnost zdravilne učinkovine, stabilnost *in vivo* in sproščanje. Da zagotovimo ustrezno kakovost končnega liposomskega produkta, je na podlagi razumevanja tako izdelka kot procesa potrebno definirati in nadzorovati tudi CMA-je in CPP-je. Le z ustreznim načrtovanjem razvoja dostavnih sistemov na osnovi liposomov lahko namreč kakovost vgradimo v izdelek, bolnikom pa nudimo kakovostno, varno in učinkovito zdravilo.

9 IZJAVA

Pregledni članek je rezultat projekta P1-0189, financiranega s strani ARIS.

10 LITERATURA

1. Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*. 1964 Jan 1;8(5):660-666.
2. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*. 2017 Mar 27;9(2):12.
3. Gaspari S, Milani B. Access to liposomal generic formulations: beyond AmBisome and Doxil/Caelyx - *GaBI Journal*. *GaBI Journal*. 2013 Apr 30;2(2):60-2.
4. EMA. European Medicines Agency. 2018 [cited 2023 Nov 27]. Quality: Quality by Design (QbD). Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/quality/quality-quality-design-qbd>
5. U.S. Food and drug administration. Q8(R2) Pharmaceutical Development [Internet]. FDA; 2020 [cited 2023 Nov 27]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q8r2-pharmaceutical-development>
6. Agarwal K. Liposome Assisted Drug Delivery: An Updated Review. *Indian J Pharm Sci*. 2022 Aug;84(4):797-811.
7. Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem Rev*. 2015 Oct 14;115(19):10938-66.
8. Lee MK. Liposomes for Enhanced Bioavailability of Water-Insoluble Drugs: In Vivo Evidence and Recent Approaches. *Pharmaceutics*. 2020 Mar 13;12(3):264.
9. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine*. 2006 Sep;1(3):297-315.
10. Lu B, Ma Q, Zhang J, Liu R, Yue Z, Xu C, et al. Preparation and characterization of bupivacaine multivesicular liposome: A QbD study about the effects of formulation and process on critical quality attributes. *Int J Pharm*. 2021 Apr 1;598:120335.
11. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, et al. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *AAPS J*. 2014 May 23;16(4):771-83.
12. Juran JM. *Juran on Quality by Design: The New Steps for Planning Quality Into Goods and Services*. Simon and Schuster; 1992. 552 p.
13. Alshaer W, Nsairat H, Lafi Z, Hourani OM, Al-Kadash A, Esawi E, et al. Quality by Design Approach in Liposomal Formulations: Robust Product Development. *Molecules*. 2022 Dec 20;28(1):10.
14. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. ICH Q8(R2) Pharmaceutical Development. Workshop: Quality by Design in pharmaceutical. 2009;8(November):28.
15. Patel GM, Shelat PK, Lalwani AN. QbD based development of proliposome of lopinavir for improved oral bioavailability. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Oct 15;108:50-61.
16. Zhou Y, Gong XJ, Yang JB. Introduction to the guidance for industry on liposome drug products: chemistry, manufacturing, and controls; human pharmacokinetics and bioavailability; and labeling documentation issued by FDA. *Chinese Journal of New Drugs*. 2018 Aug 30;27:1835-40.
17. Xu X, Khan MA, Burgess DJ. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: II. Screening of critical variables, and establishment of design space at laboratory scale. *Int J Pharm*. 2012 Feb 28;423(2):543-53.
18. Gabizon A. Stealth liposomes and tumor targeting: one step further in the quest for the magic bullet. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* [Internet]. 2001 Feb 1 [cited 2023 Nov 27]; Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Stealth-liposomes-and-tumor-targeting%3A-one-step-in-Gabizon/296936015e52248679aa92efc0f7a74d1e8e11f4>
19. Panigrahi D, Sahu PK, Swain S, Verma RK. Quality by design prospects of pharmaceuticals application of double emulsion method for PLGA loaded nanoparticles. *SN Appl Sci*. 2021 May 17;3(6):638.
20. He K, Tang M. Safety of novel liposomal drugs for cancer treatment: Advances and prospects. *Chem Biol Interact*. 2018 Nov 1;295:13-9.
21. Shekholeslami B, Lam NW, Dua K, Haghi M. Exploring the impact of physicochemical properties of liposomal formulations on their *in vivo* fate. *Life Sci*. 2022 Jul 1;300:120574.



22. Rehman AU, Omran Z, Anton H, Mély Y, Akram S, Vandamme TF, et al. Development of doxorubicin hydrochloride loaded pH-sensitive liposomes: Investigation on the impact of chemical nature of lipids and liposome composition on pH-sensitivity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018 Dec 1;133:331–8.
23. Li M, Du C, Guo N, Teng Y, Meng X, Sun H, et al. Composition design and medical application of liposomes. *Eur J Med Chem*. 2019 Feb 15;164:640–53.
24. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer Nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Feb;66:2–25.
25. Taher M, Susanti D, Haris MS, Rushdan AA, Widodo RT, Syukri Y, et al. PEGylated liposomes enhance the effect of cytotoxic drug: A review. *Heliyon*. 2023 Mar 1;9(3):e13823.
26. Xu X, Costa AP, Khan MA, Burgess DJ. Application of quality by design to formulation and processing of protein liposomes. *Int J Pharm*. 2012 Sep 15;434(1–2):349–59.
27. Porfire A, Tomuta I, Muntean D, Luca L, Licarete E, Alupeu MC, et al. Optimizing long-circulating liposomes for delivery of simvastatin to C26 colon carcinoma cells. *J Liposome Res*. 2015;25(4):261–9.
28. Toyota H, Asai T, Oku N. Process optimization by use of design of experiments: Application for liposomalization of FK506. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017 May 1;102:196–202.
29. Sylvester B, Porfire A, Muntean D, Vlase L, Tomuta I. Formulation optimization of pravastatin loaded long-circulating liposomes using a design of experiments. *FARMACIA*. 2016;Vol. 64(3):449–58.
30. Tefas LR, Sylvester B, Tomuta I, Sesarman A, Licarete E, Banciu M, et al. Development of antiproliferative long-circulating liposomes co-encapsulating doxorubicin and curcumin, through the use of a quality-by-design approach. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:1605–21.
31. Smith MC, Crist RM, Clogston JD, McNeil SE. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem*. 2017 Sep;409(24):5779–87.
32. Abu Lila AS, Ishida T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(1):1–10.
33. Aghahari V, Aghahari V. Facilitating the translation of nanomedicines to a clinical product: challenges and opportunities. *Drug Discov Today*. 2018 May;23(5):974–91.
34. Porfire A, Achim M, Barbalata C, Rus I, Tomuta I, Cristea C. Pharmaceutical Development of Liposomes Using the QbD Approach. Catala A, editor. 2019 Sep 4 [cited 2023 Dec 4]; Available from: <https://www.intechopen.com/books/liposomes-advances-and-perspectives/pharmaceutical-development-of-liposomes-using-the-qbd-approach>
35. Simões A, Veiga F, Figueiras A, Vitorino C. A practical framework for implementing Quality by Design to the development of topical drug products: Nanosystem-based dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018 Sep 5;548(1):385–99.