

Izazovi *in vitro* karakterizacije nebioloških kompleksnih lekova - primer parenteralnih preparata sa liposomskim nosačima lekovitih supstanci

Danina Krajišnik*, Jela Milić, Snežana Savić

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11 221 Beograd, Srbija

*Autor za korespondenciju: Danina Krajišnik

e-mail: danina.krajsnik@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Parenteralnim putem se primenjuju različiti tipovi farmaceutskih preparata čiji sastav može biti jednostavan (vodeni rastvori) i manje ili više kompleksan (emulzije, suspenzije, liposomi kao nosači lekovitih supstanci, čestični sistemi, čvrsti implantati/implantati). Napredak u bio- i nanotehnologiji omogućio je razvoj nove klase kompleksnih lekova, bioloških i tzv. nebioloških kompleksnih lekova (i njihovih „silara“- sličnih lekova), čiji dalji razvoj se očekuje u bliskoj budućnosti, a koji se, u velikom broju slučajeva, primenjuju parenteralnim putem.

Parenteralni preparati koji u svom sastavu sadrže lekovite supstance koje su inkapsulirane u nosače tipa liposoma predstavljaju nebiološke kompleksne lekove koji su do sada najduže u upotrebi i čije su osobine i definisana svojstva kvaliteta najviše ispitivana. U radu je dat pregled obaveznih i dodatnih (specifičnih) *in vitro* ispitivanja liposomskih nosača lekovitih supstanci za primenu parenteralnim putem. Činjenica da postupci izvođenja ovih ispitivanja u osnovi nisu propisani u relevantnim farmakopejama (Ph. Eur., USP i JP) i da se mogu značajno razlikovati između laboratorija, doprinosi velikoj varijabilnosti dobijenih rezultata i ograničenjima u njihovom međusobnom poređenju. Regulatorna tela EMA i FDA učestvovala su u pripremi određenih dokumenata i razvoju odgovarajućih standarda i smernica u pogledu ispitivanja kvaliteta farmaceutskih oblika sa liposomskim nosačima lekovitih supstanci za parenteralnu primenu.

Ključne reči: parenteralni preparati; nebiološki kompleksni lekovi; liposomi;
in vitro karakterizacija

Uvod

Parenteralni put primene lekova je najprihvatljiviji i najpraktičniji kada (per)oralna primena nije moguća i najčešći je put primene lekova u bolničkim uslovima. Pored toga, ovaj put primene je primarni za peptide, lekove proteinske prirode (biološke lekove) i mnoge hemoterapeutike, kao i određene lekove u terapiji urgentnih stanja (1, 2). Poslednjih godina sa razvojem nanotehnologije, omogućen je dizajn raznovrsnih nanomaterijala koji u sastavu odgovarajućih nanoterapeutika mogu da, između ostalog, obezbede ciljanu isporuku lekova, poboljšaju rastvorljivost lekovitih supstanci, produže poluvreme eliminacije leka, smanje imunogenost leka, odnosno doprinesu značajnom unapređenju terapije mnogih bolesti (3, 4). Najveći broj nanoterapeutika, koji su dobili dozvolu za stavljanje u promet/„registrovani lekovi” sadrži liposome, nanokristale, virosome, nanoemulzije, polimer-protein konjugate, polimerne lekove, nanokomplekse i nanočestice i najveći broj se primenjuje upravo parenteralnim putem. Pomenuti predstavnici nanoterapeutika svrstavaju se i u grupu nebioloških kompleksnih lekova (engl. *Non-Biological Complex Drugs, NBCDs*), koji su veoma aktuelni u poslednjih nekoliko godina (5).

Poznato je da parenteralni preparati moraju ispuniti stroge zahteve za kvalitet. Uporedo sa razvojem tehnologija za proizvodnju savremenih farmaceutskih oblika sa specifičnim nosačima lekovitih supstanci za parenteralnu primenu, razvijale su se i metode za njihovu karakterizaciju. Pored fizičko-hemijskih, mikrobioloških i farmaceutsko-tehnoloških ispitivanja koja su uobičajena za konvencionalne farmaceutske oblike za parenteralnu primenu, u literaturi se navodi veći broj ispitivanja predviđenih za ispitivanje farmaceutskih oblika sa specifičnim nosačima lekovitih supstanci. Postupci izvođenja ovih ispitivanja često nisu oficinalni i mogu se značajno razlikovati između laboratorija, što doprinosi velikoj varijabilnosti dobijenih rezultata i ograničenjima u njihovom međusobnom poređenju.

Potreba za usaglašenim i odgovarajućim standardima neophodnim u postupku podnošenja zahteva za dobijanje dozvole, nadzorom nad tržištem i slobodnim kretanjem i prometom lekova u što većem broju zemalja, prepoznata je u harmonizaciji između Evropske farmakopeje (Ph. Eur.), Američke farmakopeje (USP) i Japanske farmakopeje (JP) kao važan i izazovan zadatak. Takođe, regulatorna tela Evropska agencija za lekove (EMA) i Američka uprava za hranu i lekove (FDA) su učestvovala u pripremi određenih dokumenata i razvoju odgovarajućih standarda i smernica u pogledu ispitivanja kvaliteta savremenih farmaceutskih oblika/„nosača” koji se primenjuju parenteralnim putem (6).

Nebiološki kompleksni lekovi

Nebiološki kompleksni lekovi su lekovi nebiološkog porekla (u potpunosti su sintetski materijali), koji se sastoje iz većeg broja blisko povezanih, najčešće nanočestičnih jedinica. U sastavu nebioloških kompleksnih lekova ne postoji aktivna

supstanca u konvencionalnom smislu (homomolekularne strukture), koja može biti izolovana, kvantifikovana i u potpunosti okarakterisana i/ili opisana primenom savremenih fizičko-hemijskih i analitičkih tehnika i nije poznato koji deo u strukturi je odgovoran za terapijsko dejstvo, tako da se čitav kompleks posmatra kao aktivna supstanca (10-12). Nebiološki kompleksni lekovi ne ostvaruju svoje dejstvo direktno, vezivanjem za receptore, kao većina aktivnih supstanci male molekulske mase. Oni sadrže nanočestice iz kojih se aktivna supstanca oslobađa ili formira, prenosi na mesto dejstva i tek onda ostvaruje terapijski efekat. Čak i male razlike u isporuci aktivne supstance, npr. usled razlika u strukturi ili uređenosti nebiološkog kompleksnog leka, mogu da izmene njihovu efikasnost i bezbednost. Kao i u slučaju bioloških lekova, sastav, kvalitet i *in vivo* osobine nebioloških kompleksnih lekova u velikoj meri zavise od proizvodnog procesa za dobijanje aktivne supstance, kao i (u većini slučajeva) sastava formulacije (5, 12). Pokazano je da neznatne varijacije u proizvodnom procesu mogu značajno promeniti sastav finalnih proizvoda, što dalje može uticati na bezbednost i efikasnost ovih lekova (13).

U radu Cromellin i sar. (7)¹, navodi se da ova grupa lekova obuhvata različite predstavnike (engl. „*medicine-families*”) kao što su: glatiramoidi za supkutanu primenu, kompleksi gvožđa i ugljenih hidrata za *i.v.* primenu, liposomi, polimerne micelle, kompleksi albumina sa citostaticima i drugi nanoterapeutici. Takođe, među nebiološke kompleksne lekove svrstavaju se i niskomolekularni heparini (FDA), praškovi za inhalaciju, emulzije za oftalmološku i intravensku primenu, kao i transdermalni flasteri (5). Iako termin *Non-Biological Complex Drugs* nije zvanično priznat od strane EMA i FDA, smatra se da sve više dobija na značaju u naučnim krugovima (9).

Ispitivanja nebioloških kompleksnih lekova

Definisanje i procena kritičnih svojstava kvaliteta je od izuzetnog značaja za nebiološke kompleksne lekove, kako bi se osigurala njihova bezbednost i terapijska efikasnost. Procena kvaliteta ovih lekova zahteva multidisciplinarni pristup, kako bi se utvrdile njihove fizičko-hemijske karakteristike, *in vitro* i *in vivo* ponašanje, uz dodatna intenzivna istraživanja na razvoju novih metoda koje bi dodatno doprinele karakterizaciji ovih lekova (7, 9, 14, 15).

¹ Rad predstavlja osvrt na predstavljene prezentacije i panel diskusije tokom *The International Symposium on the Scientific and Regulatory Advances in Complex Drugs*, Budimpešta, Mađarska, 27-28. oktobra, 2014. Konferenciju je organizovala Katedra za farmaceutike (Department of Pharmaceutics of Semmelweis University) Zemeljavs Univerzita u Budimpešti u saradnji sa ostalim mađarskim naučnim organizacijama i pod pokroviteljstvom AAPS-a, FIP –a i EUFEPS-a.

Primena odgovarajućih metoda karakterizacije od posebnog je značaja prilikom podnošenja zahteva za registraciju inovativnih nebioloških kompleksnih i njima sličnih lekova (tzv. „nanosimilara”), odnosno lekova za koje se tvdi da su slični referentim (originatorskim/inovativnim) nanolekovima kojima je istekla patentna zaštita (15). Naime, klinička iskustva su pokazala da dokazivanje farmaceutske ekvivalencije ili klinički značajnih razlika između referentnog preparata i nanosimilara nije moguće, jer nebiološke kompleksne lekove nije moguće u potpunosti okarakterisati savremenim analitičkim metodama. Takođe, studije bioekvivalencije na zdravim dobrovoljcima ne mogu uvek da oslikaju terapijski odgovor na nebiološki kompleksni lek kao što je pokazano na primeru kompleksa gvožđa i ugljenih hidrata (11). Činjenica da se ovi lekovi koriste u okviru hronične terapije pacijenata koji su ozbiljno narušenog zdravstvenog stanja (npr. kompleksi gvožđa i ugljenih hidrata se primenjuju kod pacijenata na hemodijalizi, citostatici sa liposomima kao nosačima se primenjuju kod različitih oblika kancera, glatiramoidi se koriste u lečenju multiple skleroze) (16-18) zahteva dodatni oprez, jer primena lekova koji ispoljavaju i najmanje kliničke razlike može uticati na ishod lečenja, a samim tim i na mogućnost zamene referentnih preparata i nanosimilara (11).

Poznato je da se, generalno, nanočestice veličine između 150 i 300 nm raspodeljuju prevashodno u slezini i jetri, dok manje čestice mogu doći do kostne srži (19). Čestice koje su veće od 5 nm deponuju se u jetri, a izlučivanju preko glomerularne filtracije podležu čestice hidrodinamičkog prečnika između 5 i 10 nm (20). Ova saznanja iskorišćena su za dizajniranje lekova koji se ciljano deponuju na mestu dejstva, međutim, predviđanje raspodele sa visokom tačnošću nije moguće i raspodela u tkiva razlikuje se od slučaja do slučaja (15). Još uvek nije u potpunosti razjašnjeno na koji način su fizičko-hemijske osobine nanolekova, uključujući i površinske karakteristike kao rezultat proizvodnog procesa u vezi sa konačnim farmakokinetičkim profilom (19).

Kinetika oslobađanja aktivne supstance iz nosača *in vivo* je značajan aspekt koji može uticati na kliničku primenu leka (9). Zbog toga je važno ispitati svojstva slobodne i frakcije aktivne supstance koja je vezana za nosač (21, 22). Tako se u smernici FDA pri praćenju farmakokinetičkog profila liposomskog doksorubicina zahteva procena frakcije slobodnog i inkapsuliranog leka (23).

Poseban izazov predstavljaju novi predstavnici nebioloških kompleksnih lekova specifičnih osobina koje utiču na njihovu biološku distribuciju, efikasnost i toksičnost, što dodatno ukazuje na značaj sagledavanja bioloških interakcija kod ove grupe lekova (15, 24). EMA je izradila nekoliko dokumenata vezanih za liposome (25) i nano-preparate za i.v. primenu gvožđa (26) u kojima se navodi da trenutna generička paradigma sa ustanovljenim testovima ispitivanja ekvivalencije ne važi za ove kompleksne lekove (19).

Jedan od često diskutovanih slučajeva koji ukazuje koliko je karakterizacija nebioloških kompleksnih lekova složena i još uvek nedefinisana prilikom registracije inovativnih (originatorskih) i njima sličnih lekova je preparat doksorubicin-hidrohlorida sa liposomima kao nosačima aktivne supstance (zaštićeni naziv Doxil[®], proizvođač: Johnson & Johnson, SAD). Ovaj preparat formulisan je kao koncentrat za rastvor za infuziju i indikovao je u terapiji kancera ovarijuma, Kapošijevog sarkoma koji je uzrokovan HIV-om i multiplog mijeloma. Efekti Doxil[®]-a, kao složenog nanoterapeutika, zavise od niza međusobno povezanih fizičko-hemijskih osobina, kao što su: sastav lipida, veličina i raspodela liposoma, morfologija i površinske karakteristike liposoma, okruženje liposoma (vehikulum), tj. sastav preparata (npr. pH, zapremina vehikuluma, koncentracija sulfata, koncentracija amonijum-jona, itd.) (27). Tokom 2013. godine proizvođač koji je ugovorno proizvodio ovaj lek (Ben Venue Laboratories, Bedford, Ohajo, SAD) prekinuo je proizvodnju (28). U februaru 2013. godine FDA je odobrila registraciju leka Lipodox[®] (proizvođač: Sun Pharmaceuticals Industry, Mumbaj, Indija), nanosimilarna Doxil[®]-a, pre svega zbog nestašice originatorskog preparata na tržištu. Lipodox[®] se na američkom tržištu zadržao relativno kratko, zbog sumnje da uslovi proizvodnje u Indiji nisu bili usklađeni sa Dobrom proizvođačkom praksom (19). U Evropi lek Caelyx[®] prvi put je registrovan 1996. godine (nosilac dozvole Janssen-Cilag International NV, Belgija) (Tabela I), kao koncentrat za rastvor za infuziju koji je i dalje jedini dostupan parenteralni preparat doksorubicin-hidrohlorida inkapsuliranog u PEG-ilovane liposome prisutan na evropskom tržištu.

Prema nacrtu smernice koji je FDA objavila prvi put 2010. godine² (23), preparat sličan originatorskom preparatu doksorubicina sa liposomima kao nosačima mora pokazati ista fizičko-hemijska svojstva i profil brzine rastvaranja doksorubicina kao i originatorski preparat. Smernica upućuje na sajt FDA- *Recommended Dissolution Methods* (29) za preporučene uslove ispitivanja. Za disperziju liposoma za injekciju ne navodi se konkretna aparatura (prema USP), a za uslove ispitivanja navodi se da je potrebno razviti *in vitro* metodu, počevši od pH vrednosti $6,00 \pm 0,05$ na temperaturi $47 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Ispitivanje je potrebno izvesti na 12 bočica svake jačine ispitivanog preparata. Dodatno, zahteva se izvođenje ispitivanja distribucije veličine čestice i oslobađanje doksorubicina u različitim medijumima, kao i ispitivanja bioekvivalencije slobodnog i inkapsuliranog leka. U smernici koju je izdala EMA (25) takođe se zahteva fizičko-hemijsko poređenje i studija bioekvivalencije za originatorski i njemu sličan preparat doksorubicina, kao i studije bioekvivalencije slobodnog i inkapsuliranog leka. Potreba za kliničkim ispitivanjima efikasnosti se procenjuje od slučaja do slučaja.

Farmaceutski preparati koji pripadaju grupi nebioloških kompleksnih lekova, a koji se primenjuju parenteralnim putem, moraju da odgovaraju opštim zahtevima za

² Poslednja revizija navedene smernice bila je u septembru 2018. godine

parenteralne preparate navedenim u Ph. Eur. i USP, kao i dodatnim specifičnim ispitivanjima u okviru kontrole kvaliteta. Pored toga, regulatorna tela (EMA i FDA), donela su i dodatne smernice za određene grupe nebioloških kompleksnih lekova (25, 26, 30-33).

Liposomi/Liposomski nosači aktivnih supstanci za parenteralnu primenu

Liposomi predstavljaju sferične vezikule koje se sastoje od vodenoj jezgra okruženog jednom ili sa više dvoslojnih membrana (lamela) koje se naizmenično smenjuju sa vodenim odeljcima (4). Razlikuju se po veličini, broju dvoslojeva, njihovoj rigidnosti i naelektrisanju. Fosfatidilholin, fosfatidilglicerol, fosfatidildietilamin, fosfatidilserin i sfingomijelin su fosfolipidi koji najčešće ulaze u sastav liposomskih vezikula i obično se kombinuju sa holesterolom, katjonskim lipidima i/ili lisofosfatidilholinom u cilju obezbeđivanja specifičnih osobina kao što su: stabilizacija dvoslojeva, pozitivno naelektrisanje ili osetljivost na stimuluse (npr. promenu pH vrednosti sredine, prisustvo određenih enzima, promenu redoks potencijala ili dejstvo svetlosti) (34, 35). Površinskom modifikacijom liposoma koja se postiže oblaganjem hidrofilnim polimerima kao što su polietilenglikoli, linearni dekstrani, polivinilpirolidon i polivinilalkohol, postiže se sterno ometanje za opsonizaciju i obezbeđuje njihovo produženo zadržavanje u sistemskej cirkulaciji (3, 34, 36, 37).

Morfologija liposoma i njihove fizičko-hemijske karakteristike zavise od izbora lipida i postupka dobijanja, a ove karakteristike kasnije utiču na vreme zadržavanja u cirkulaciji, distribuciju u određena tkiva i brzinu oslobađanja lekovite supstance *in vivo* (34). Liposomi kao nosači lekovitih supstanci predstavljaju nebiološke kompleksne lekove koji su do sada najduže u upotrebi u Evropi i SAD (Tabela I) i čije su osobine i definisana svojstva kvaliteta najviše ispitivana.

Tabela I Primeri registrovanih lekova sa aktivnom supstancom inkapsuliranom u nosače tipa liposoma (34, 36-42)

Table I Examples of the marketed products with an active substance encapsulated in liposomal carriers (34, 36-42)

Ime leka (nosilac dozvole/proizvođač)	Aktivna supstanca	Nosač lekovite supstance (veličina)	Farmaceutski oblik	Sastav lipida*	Način primene	Kliničke indikacije	Godina registracije
AmBisome® (Astellas/Gilead Sciences)	Amfotericin B	Konvencionalni bilamelarni liposomi (< 100 nm)	Prašak za koncentrat za disperziju za infuziju	HSPC, DSPG, HOL, Amfotericin B; molarni odnos: 2:0,8:1:0,4	i.v.	Sistemske gljivične infekcije	Evropa (1990), SAD (1997)
DaunoXome® (Galen/Gilead Sciences)	Daunorubicin-hidrochlorid	Mali unilamelarni liposomi (45–80 nm)	Koncentrat za rastvor za infuziju	DSPC, HOL (molarni odnos 2:1)	i.v.	<i>Kapoši</i> sarkom kod bolesnika sa AIDS-om	Evropa (1997), SAD (1997)
DepoCyt® (Sigma-Tau Pharmaceuticals/Pacira)	Citarabin	DepoFoam® multivezikularni liposomi (20 µm)	Suspenzija za injekciju	DOPC, DPPG, HOL, triolein	intratekalno	Intratekalna terapija limfomatoznog meningitisa	SAD (1999)
DepoDur® (Flynn Pharma Ltd/Almac Pharma Services Ltd)	Morfin-sulfat, pentahidrat	DepoFoam® multivezikularni liposomi (17-23 µm)	Suspenzija za injekciju	DOPC, DPPG, HOL, triolein	epiduralno	Postoperativna terapija bola. Primenjuje se kao jednodozna epiduralna injekcija	Evropa (2006), SAD (2004)
Doxil®/Caelyx® (Ortho Biotech, Johnson & Johnson/Janssen-Cilag)	Doksorubicin-hidrochlorid	PEG-ilovani liposomi (80 – 100 nm)	Koncentrat za rastvor za infuziju	HSPC, HOL, PEG-2000-DSPE; molarni odnos: 56:39:5	i.v.	Metastazirani kancer dojke Multipli mijelom <i>Kapoši</i> sarkom kod bolesnika sa AIDS-om	SAD (1995), Evropa (1996)
Exparel® (Pacira Pharmaceuticals Inc.)	Bupivakain-hidrochlorid	DepoFoam® multivezikularni liposomi (24-31 µm)	Suspenzija za injekciju	DOPC, DPPG, HOL, trikaprilin	lokalna i regionalna infiltracija	Postoperativna terapija bola	SAD (2011)

Tabela I (nastavak) Table I (continued)							
Ime leka (nosilac dozvole/proizvođač)	Aktivna supstanca	Nosač lekovite supstance (veličina)	Farmaceutski oblik	Sastav lipida*	Način primene	Kliničke indikacije	Godina registracije
Lipodox® (Sun Pharma)	Doksorubicin-hidrohlorid	PEG-ilovani liposomi (100 nm)	Koncentrat za infuziju	HSPC, HOL, PEG-2000-DSPE; molarni odnos: 56:39:5	i.v.	Metastazirani kancer ovarijuma Metastazirani kancer dojke <i>Kapoši</i> sarkom kod bolesnika sa AIDS-om	SAD (2013)
Marquibo® (Talon Therapeutics)	Vinkristin-sulfat	Liposomi (100 nm)	Dispersija liposoma za injekciju	SPD, HOL; molarni odnos 60:40	i.v.	Akutna limfoblastna leukemija	SAD (2012)
Mepact® (Takeda Pharmaceutical Limited)	Mifamurtid	Multilamelarni liposomi (< 100 nm)	Prašak za koncentrat za disperziju za infuziju	DOPC, DOPS; molarni odnos 3:7	i.v.	Terapija nemetastatskog osteosarkoma kod dece, adolescenata i mladih osoba	Evropa (2004)
Myocet® (TEVA/Elan Pharmaceuticals)	Doksorubicin-hidrohlorid	Mali unilamelarni liposomi (80–90 nm)	Prašak, disperzija i rastvarač za koncentrat za disperziju za infuziju	EPC, HOL; molarni odnos 55:45	i.v.	Metastazirani kancer dojke	Evropa (2000)
Visudyne® (Novartis)	Verterporfin	Liposomi	Prašak za rastvor za infuziju	EPG, DMPC	i.v.	Fotodinamska terapija senilne degeneracije makule	SAD (2000), Japan (2003)

* HSPC (engl. *hydrogenated soy phosphatidylcholine*); PEG (polietilenglikol); DSPE (engl. *distearoyl-sn-glycerophosphoethanolamine*); DSPC (engl. *distearoylphosphatidylcholine*); DOPC (engl. *dioleoylphosphatidylcholine*); DPPG (engl. *dipalmitoylphosphatidylglycerol*); EPC (engl. *egg phosphatidylcholine*); DOPS (engl. *dioleoylphosphatidylserine*); POPC (engl. *palmitoyloleoylphosphatidylcholine*); SM (sfingomijelin); MPEG (engl. *methoxy polyethylene glycol*); DMPC (engl. *dimyristoyl phosphatidylcholine*); DMPG (engl. *dimyristoyl phosphatidylglycerol*); DSPG (engl. *distearoylphosphatidylglycerol*); DEPC (engl. *dierucoylphosphatidylcholine*); DOPE (engl. *dioleoyl-sn-glycero-phosphoethanolamine*); HOL (holesterol).

Prema Ph. Eur. 9.0 (43), opšta ispitivanja parenteralnih preparata (*Parenteralia*) obuhvataju ispitivanja *Mehanička onečišćenja: čestice ispod granice vidljivosti (2.9.19)* i *Sterilnost (2.6.1)*, dok su kod pojedinih vrsta parenteralnih preparata predviđena i dodatna ispitivanja (Tabela II), koja se mogu primeniti na odgovarajuće farmaceutske oblike sa inkapsuliranom aktivnom supstancom u nosače tipa liposoma (Tabela I).

Za navedeno ispitivanje *Mehanička onečišćenja: čestice ispod granice vidljivosti (2.9.19)*, propisane su: Metoda 1 - Metoda zasnovana na blokiranju svetlosti (engl. *Light Obscuration Particle Count Test*) i Metoda 2 – Mikroskopska metoda brojanja čestica (engl. *Microscopic Particle Count Test*). Svi parenteralni preparati ne mogu se ispitati na prisustvo čestica ispod granice vidljivosti primenom jedne ili obe navedene metode. Kada Metoda 1 nije primenjiva, npr. u slučaju preparata koji nisu bistri ili su viskozni, treba primeniti Metodu 2, na primer za emulzije, preparate koloidne prirode i preparate koji sadrže liposome. Tako se u okviru ovog ispitivanja navodi da parenteralni preparati mogu da sadrže liposome, iako to nije navedeno u opštoj monografiji *Parenteralia*.

Tabela II Ispitivanja navedena u opštim monografijama (Ph. Eur. 9.0) pojedinih vrsta parenteralnih preparata (6)

Tabela II The tests listed in the general monographs (Ph. Eur. 9.0) of specific parenteral preparations (6)

Parenteralni preparat	Ispitivanje
Injekcije	<p>Ujednačenost doze (dozne jedinice)*. Jednodozne suspenzije za injekciju odgovaraju zahtevima ispitivanja za ujednačenost doziranog oblika (2.9.40) ili, ako je drugačije propisano i odobreno, testu za ujednačenost sadržaja, navedenom ispod. Biljne droge i aktivne supstance biljnog porekla u ovim farmaceutskim oblicima ne podležu zahtevima ovog paragrafa.</p> <p>Ujednačenost sadržaja (2.9.6) Ukoliko nije drugačije propisano i odobreno, jednodozne suspenzije za injekcije kod kojih je količina lekovite supstance manja od 2 mg, ili koja čini manje od 2% u odnosu na ukupnu masu, moraju da odgovaraju zahtevima testa A za Ujednačenost sadržaja lekovite supstance u jednodoznim preparatima. Ukoliko preparat sadrži više od jedne lekovite supstance, ispitivanje se odnosi samo na supstance koje ispunjavaju gore navedene uslove.</p> <p>Bakterijski endotoksini – pirogeni. Izvodi se ispitivanje na bakterijske endotoksine (2.6.14), ili ako je drugačije propisano i odobreno test na pirogene (2.6.8). Preporuke za granice sadržaja bakterijskih endotoksina navedene su u opštem poglavlju 5.1.10.</p>
Infuzije	<p>Bakterijski endotoksini – pirogeni. Izvodi se ispitivanje na bakterijske endotoksine (2.6.14), ili ako je drugačije propisano i odobreno test na pirogene (2.6.8). Za pirogeni test injicira se 10 ml/kg mase u svakoga zeca, ukoliko nije drugačije propisano i odobreno.</p>

Tabela II (nastavak) Table II (continued)	
Parenteralni preparat	Ispitivanje
Koncentrati za injekcije i infuzije	Bakterijski endotoksini – pirogeni. Posle razblaživanja do određene zapremine, odgovaraju zahtevima propisanim za injekcije ili infuzije.
Praškovi za injekcije i infuzije	<p>Ujednačenost doze (dozne jedinice)*. Praškovi za injekcije i infuzije odgovaraju zahtevima ispitivanja za ujednačenost doziranog oblika (2.9.40) ili, ako je drugačije propisano i odobreno, testu za ujednačenost sadržaja/variranja mase navedenim ispod. Biljne droge i aktivne supstance biljnog porekla u ovim farmaceutskim oblicima ne podležu zahtevima ovog paragrafa.</p> <p>Ujednačenost sadržaja (2.9.6). Ukoliko nije drugačije propisano i odobreno, praškovi za injekcije i intravenske infuzije kod kojih je količina lekovite supstance manja od 2 mg, ili koja čini manje od 2% u odnosu na ukupnu masu, ili kod kojih je pojedinačna masa jednaka ili manja od 40 mg, moraju da odgovaraju zahtevima testa A za <i>Ujednačenost sadržaja lekovite supstance u jednodoznim preparatima</i>. Ukoliko preparat sadrži više od jedne lekovite supstance, ispitivanje se odnosi samo na supstance koje ispunjavaju gore navedene uslove.</p> <p>Variranje mase (2.9.5) Praškovi za injekcije i intravenske infuzije moraju da odgovaraju zahtevima ispitivanja variranja mase jednodoznih preparata. Ispitivanje variranja mase se ne izvodi ukoliko se za sve lekovite supstance vrši ispitivanje ujednačenosti sadržaja.</p> <p>Bakterijski endotoksini – pirogeni. Posle rastvaranja ili suspendovanja u određenoj zapremini vehikuluma, odgovaraju zahtevima propisanim za injekcije ili infuzije.</p>

* Poglavlje je prošlo farmakopejsku harmonizaciju. Pogledati 5.8. *Pharmacopoeial Harmonisation* (Ph. Eur. 9.0)

Prema USP 40/NF 35 (44) farmaceutski oblici za parenteralnu primenu obuhvataju rastvore, suspenzije, sterilne praškove za rastvore i suspenzije (uključujući liposome), implante (uključujući mikročestice), kao i proizvode koji se sastoje od lekovite supstance i odgovarajućeg sredstva/uređaja kao što su stentovi obloženi lekom. Za razliku od Ph. Eur. 9.0, u delu poglavlja <1> (USP 40) koji se odnosi na liposome navodi se da je kod parenteralnih preparata koji sadrže ove nosače potrebno izvođenje *Univerzalnih i Specifičnih ispitivanja*. Univerzalna ispitivanja obuhvataju fizičko-hemijska, biološka i farmaceutsko-tehnološka koja se uobičajeno izvode kod parenteralnih preparata. U okviru specifičnih ispitivanja navode se ispitivanja:

- Lipida i sastav masnih kiselina, uključujući stepen nezasićenosti ili specifičnosti u lancu masnih kiselina i kritične proizvode degradacije kao što su lizolipidi;
- Veličine čestica;
- Distribucije veličine liposomskih vezikula;
- Lamelnosti;

- Sastava fosfolipida;
- Procenta slobodnih vs. Procenta inkapsuliranih lipida;
- Slobodnog lek vs. Inkapsuliranog leka;
- Jonske jačine i Osmotske jačine.

Za navedena specifična ispitivanja navodi se da ne postoji farmakopejsko (oficinalno) ispitivanje, kao i da je potrebno koristiti validiranu metodu sa granicama prihvatljivosti.

U smernicama (25), kao kritični atributi kvaliteta koji mogu imati značajan uticaj na *in vivo* farmakokinetičke i *in vitro* farmakodinamske osobine navedeni su:

- brzina oslobađanja lekovite supstance iz liposoma, jer može uticati na farmakokinetičke i farmakodinamičke osobine aktivne supstance, odnosno efikasnost i bezbednost leka;
- sadržaj inkapsulirane lekovite supstance u liposomu izražen u odnosu na masu liposoma (engl. *drug loading*), a koja može biti zaštićena od metaboličke razgradnje, kao i razgradnje aktivne supstance koja je inkorporirana;
- fizičko-hemijska svojstva liposoma i inkapsulirane lekovite supstance, kao i ponašanje liposoma u organizmu, koji utiču na farmakokinetiku aktivne supstance;
- sastav preparata, koji može uticati na distribuciju lekovite supstance u tkivima.

U Tabeli III dat je prikaz preporučenih ispitivanja za karakterizaciju preparata sa liposomima kao nosačima lekovitih supstanci za parenteralni put primene (25, 33).

Tabela III Pregled ispitivanja preporučenih za karakterizaciju farmaceutskih preparata sa liposomima za parenteralnu primenu

Table III Overview of the tests recommended for characterization of liposomal drug products for parenteral application

Prilagođeno iz reference 25	Prilagođeno iz reference 33
<ul style="list-style-type: none"> • Karakteristike lipidnih ekscipijenasa: opis, poreklo i karakterizacija, proces proizvodnje, prisustvo nečistoća i izomera, stabilnost; • Kvalitet, čistoća i stabilnost ostalih kritičnih ekscipijenasa; • Identifikacija i kontrola ključnih faza u procesu proizvodnje; • Odnos lekovita supstanca/lipidne komponente koji treba da bude u prihvatljivom opsegu koji će obezbediti konzistentne osobine formulacije; • Morfologija, veličina i distribucija veličine liposoma, prisustvo agregata; • Udeo inkapsulirane lekovite supstance (odnos slobodne/inkapsulirane); • Stabilnost lekovite supstance, lipida i funkcionalnih ekscipijenasa u konačnom proizvodu, uključujući kvantifikaciju kritičnih degradacionih proizvoda (npr. fosfatidilholina, oksidovanih i hidrolizovanih supstanci); • Ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz nosača tipa liposoma, ispitano pod fiziološki relevantnim uslovima³; • Praćenje stabilnosti u toku čuvanja i obezbeđivanje konzistentnosti između serija proizvoda; • Ispitivanje stabilnosti u okviru <i>in-use</i> testova; • Robustnost procesa rekonstitucije i/ili izrade preparata. <p>U zavisnosti od specifičnih zahteva za liposomsku formulaciju, moguće je razmatranje dodatnih parametara:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Očuvanje integriteta liposoma u plazmi; • Karakterizacija faznog ponašanja lipidnog dvosloja (određivanje temperature faznog prelaza ili entalpije faznog prelaza); • Površinsko naelektrisanje liposoma; • pH liposomskog jezgra kod inkapsulacije zasnovane na pH-gradijentu • Karakterizacija fizičkog stanja supstance unutar liposoma (npr. precipitacija u slučaju doksorubicina). 	<ul style="list-style-type: none"> • Sastav i karakteristike lipidnih ekscipijenasa; • Sastav i karakteristike nelipidnih ekscipijenasa; • Hemijski sastav liposoma; • Odnos aktivne supstance i lipida (engl. <i>drug-to-lipid ratio</i>) i količina aktivne supstance u liposomu (engl. <i>drug loading</i>); • Efikasnost inkapsulacije aktivne supstance; • Morfologija, uključujući određivanje lamelarne faze i površinske karakteristike liposoma; • Površinske karakteristike, ukoliko je primenjivo; • Veličina i raspodela veličina liposoma, ukoliko je moguće definisano za konstantnu masu ili zapreminu, ako je gustina čestica poznata; • Površinsko naelektrisanje liposoma, uobičajeno određeno merenjem zeta potencijala; • Određivanje temperature faznog prelaza; • Ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz nosača tipa liposoma, ispitano pri definisanim, fiziološki relevantnim uslovima; • Brzina „curenja“ lekovite supstance iz liposoma tokom čuvanja preparata • Promene integriteta liposoma (npr. brzina rastvaranja lekovite supstance, veličina, efikasnost) u zavisnosti od primenjene koncentracije soli; • Spektroskopska analiza u cilju potvrde pretpostavljene strukture liposoma (npr. <i>phosphorus nuclear magnetic resonance</i>); • Ispitivanje prisustva rezidualnih rastvarača upotrebljenih u procesu proizvodnje; • Sterilnost, prisustvo pirogena ili bakterijskih endotoksina • Ispitivanje fizičke, hemijske i mikrobiološke stabilnosti.

³ Potrebno je pratiti oslobađanje lekovite supstance iz liposoma u fiziološki/klinički relevantnim medijumima. Ukoliko je odobren, *in vitro* test „curenja“ (engl. *leakage*) pod različitim uslovima (npr. promene temperature i pH) može biti pogodan.

Dodatno, za preparate sa konjugovanim (tj. PEG-ilovanim) liposomima, prema smernici EMA (25) navodi se da je potrebno sprovesti ispitivanja:

- kvaliteta i čistoća početnog PEG materijala koji su od velikog značaja za kvalitet konačnog proizvoda;
- hemijski način vezivanja (npr. PEG-lipid ili sličnih veza sa ili bez PEG-a);
- molekulske mase konjugovanih lipida i njihove distribucije po veličini;
- raspodele PEG-a na površini liposoma;
- stabilnosti konjugata.

U literaturi se navode primeri primene različitih metoda u cilju karakterizacije liposomskih nosača lekovitih supstanci:

- hemijski sastav liposoma: spektroskopske metode (nuklearna magnetna rezonancija (npr. ^{31}P -NMR), infracrvena spektroskopija, UV-VIS spektroskopija, transmisiona elektronska mikroskopija sa energetsom disperzivnom spektroskopijom (engl. *Transmission Electron Microscopy Energy Dispersive Spectroscopy*, TEM EDS), masena spektrometrija sa induktivno kuplovanom plazmom (engl. *Inductively Coupled Plasma Mass-Spectroscopy*, ICP-MS) (7, 25);
- morfologija i površinske karakteristike liposoma: skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy*, SEM), TEM (45);
- karakterizacija lamelarne faze: nuklearna magnetna rezonancija (^{31}P -NMR) (46) i rasipanje X-zraka na malim uglovima (engl. *Small Angle X-ray Scattering*) (47);
- veličina i raspodela veličine liposoma, prisustvo agregata: dinamičko rasipanje svetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering*, DLS), SEM, TEM, mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*, AFM) (7, 48-50);
- površinsko naelektrisanje liposoma: određivanje zeta potencijala (33, 50);
- lipofilnost/particioni koeficijent aktivne supstance između liposoma i pufera: kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis Frontal Analysis*, CE-FA) (51, 52);
- ponašanje lipidnog dvosloja u međufazi: diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) i infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) (53);
- separacija frakcije slobodne od inkapsulirane aktivne supstance u liposomima: kapilarna elektroforeza-masena spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (engl. *Capillary Electrophoresis-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, CE-ICP-MS) (54, 55)
- brzina rastvaranja lekovite supstance iz liposomskih nosača: metoda sa dijaliznom kesicom/vrećicom i modifikovanom protočnom ćelijom (44, 56-61).

Ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance

S obzirom na predstavljenu heterogenost i kompleksnost sastava savremenih nosača lekovitih supstanci koje se primenjuju parenteralnim putem, još uvek ne postoji

jedinstvena metoda za ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iako su navedena istraživanja veoma aktuelna i podržana su od strane različitih stručnih tela i istraživačkih grupa. Posebno je naglašena potreba za standardizacijom *in vitro* metoda ispitivanja i izradom vodiča koji su neophodni za uspostavljanje *in vitro* – *in vivo* korelacije.

Za ispitivanje preparata sa liposomima (liposomskih preparata) uobičajeno se koriste metode dijalizne kesice ili reverzne dijalizne kesice, kao i metoda modifikovane protočne ćelije. Ove metode su pogodne jer omogućavaju separaciju liposoma od medijuma. S obzirom da se radi o nestandardnim metodama, to otežava poređenje dobijenih rezultata između laboratorija. U Tabeli IV navedene su prednosti i nedostaci metoda koje su korišćene za ispitivanje liposomskih formulacija. Zbog složenog sastava ovih formulacija, pri izboru odgovarajuće metode ispitivanja čest je pristup od slučaja do slučaja u zavisnosti od vrste liposomskog nosača (59).

Tabela IV Poređenje različitih metoda za analizu kinetike oslobađanja lekovite supstance iz liposomskih formulacija (prilagođeno iz reference 59)

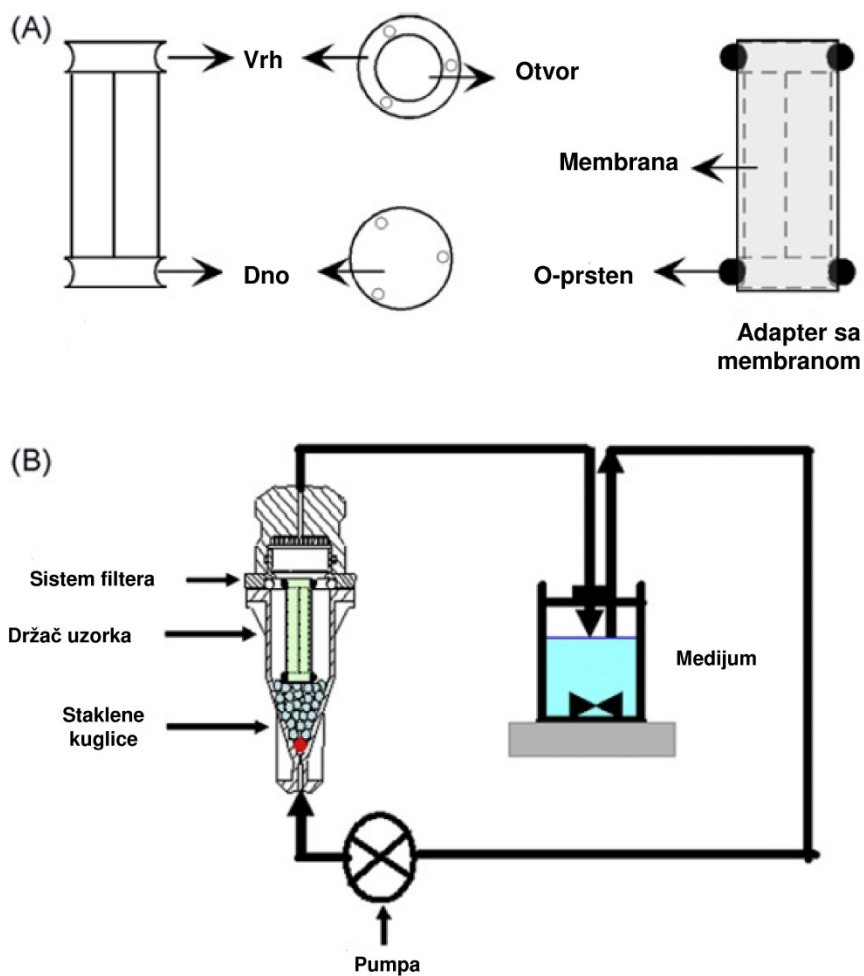
Table IV Comparison of different drug dissolution analysis methods for liposomal formulations (adapted from the reference 59)

Metoda	Oslobađanje lekovite supstance	Oštećenje liposoma	Kontinuirano uzorkovanje	Prednosti	Nedostaci
Dijaliza	Trenutno i produženo	Ne	Da	Jednostavna/ekonomična	Sink uslovi/zavisi od membrane
Reverzna dijaliza	Trenutno i produženo	Ne	Da/više kesica	Jednostavna/dugo vreme uzorkovanja/ekonomična	Membrana kontroliše brzinu rastvaranja
Frakciona dijaliza	Trenutno i produženo	Ne	Da	Idealni <i>sink</i> uslovi	Potrebna je dodatna validacija
Mikrodijaliza	Trenutno i produženo	Ne	Da	Minimalna manuelna manipulacija	Nezavisno od lekovite supstance
Ultracentrifugiranje	Produženo	Da	Ne	Nezavisno od lekovite supstance	Sedimentacija sastojaka
Centrifugalno ultracentrifugiranje	Produženo	Da	Ne	Male centrifugalne sile	Zapušavanje filtera/deformacija čestica
Ultrafiltracija pod pritiskom	Trenutno i produženo	Da	Ne	Fina filtracija pri niskim pritiscima	Zapušavanje filtera/deformacija čestica

Tabela IV (nastavak) Table IV (continued)					
Metoda	Oslobađanje lekovite supstance	Oštećenje liposoma	Kontinuirano uzorkovanje	Prednosti	Nedostaci
Hromatografija zasnovana na veličini molekula	Trenutno i produženo	Ne	Da	Mogućnost izbora stacionarne faze različitog promera pora	Neophodno je kondicioniranje kolone
<i>In situ</i> metode	Trenutno i produženo	Ne	Da	Direktno određivanje	Ograničena na polarografiju i UV/VIS spektroskopiju
Kontinuirane metode proticanja	Trenutno i produženo	Ne	Ne/da	Praćenje trenutnog oslobađanja	Zapušavanje filtera/fizička ograničenja
USP (aparatura 4)	Trenutno i produženo	Ne	Da	Dugo vreme uzorkovanja	Velika zapremina medijuma za oslobađanje
USP (aparatura 1)	Trenutno i produženo	Ne	Da	Konstantna površina za uzorkovanje	Difuzija u dve faze

Metoda modifikovane protočne ćelije uz primenu odgovarajućeg adaptera predložena je kao alternativna metoda za analizu preparata sa liposomima deksametazona pripremljenih različitim metodama (sa i bez ekstruzije) i upotrebom različitih fosfolipida: DPPC (engl. *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), DMPC (engl. *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) i DSPC (engl. *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) (56).

Dijalizni adapter predstavlja šuplji cilindar koji na dnu i vrhu ima teflonske "O" prstenove na mestima za pričvršćivanje (Slika 1). Kroz donji i gornji teflonski deo prolaze žice koje predstavljaju okvir adaptera. Otvor gornjeg teflonskog dela se može zatvoriti zavrtanjem. Membrana za dijalizu se postavlja preko adaptera i pričvršćuje pomoću "O" prstenova na dnu i vrhu. Ovako pripremljeni adapter se postavlja u uspravnom položaju u protočnu ćeliju. Ispitivani uzorak se unosi u dijalizni adapter koji se zatvara zavrtanjem.



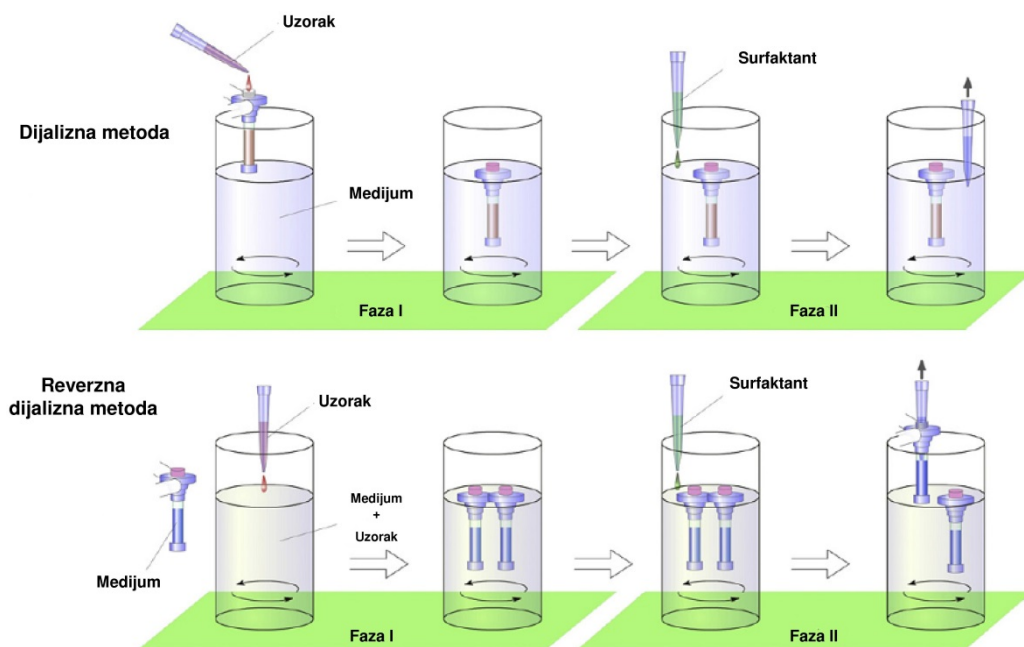
Slika 1. (A) Shematski prikaz dijaliznog adaptera: (levo) prednji deo adaptera, (sredina) dno i gornji deo, (desno) adapter sa dijaliznom membranom pričvršćenom pomoću O-prstenova. (B) Postavljanje adaptera u aparaturu sa protočnom ćelijom (prilagođeno iz reference 56)

Figure 1. (A) Schematic of the dialysis adapter design: (left) the front of the dialysis adapter, (middle) top and bottom parts, (right) adapter with dialysis membrane sealed with O-rings. (B) The placement of the adapter in USP apparatus 4 (adapted from the reference 56)

Metoda je predložena kao naprednija u odnosu na metodu sa dijaliznom i reverznom dijaliznom kesicom jer omogućava: ravnomerno i adekvatno mešanje izvan dijalizne kesice, postizanje ujednačene temperature unutar uzorka i male varijacije između uzoraka u toku ispitivanja.

Modifikovane metode sa protočnom ćelijom korišćene su za analizu brzine oslobađanja doksorubicin-hidrohlorida (60) i amfotericina B (61) iz različitih liposomskih formulacija za parenteralnu primenu. Kao prednosti primene opisanih metoda navodi se njihova diskriminatornost u uspostavljanja razlika između generičkih i inovativnih lekova koji sadrže navedene lekovite supstance u sastavu liposomskih nosača.

Interesantan pristup u ispitivanju brzine oslobađanja predstavlja i dvostepena metoda reverzne dijalize koja je razvijena za liposomske preparate sa pasivnim ciljnim karakteristikama (58). Prva faza testa odgovara cirkulaciji liposoma u telu, dok druga faza odgovara oslobađanju lekovite supstance (tenovira) na ciljnom mestu isporuke. Na Slici 2 shematski su prikazane obe metode i faze u toku ispitivanja.



Slika 2. Shematski prikaz dijalizne (a) i reverzne dijalizne metode (b). Kao dijalizator korišćen je Float-A-Lyzer® (1 ml, 50 kDa MWCO celulozni estar) (Spectrum Laboratories, SAD) (prilagođeno iz reference 58)

Figure 2. Schematic representation of dialysis (a) and reverse dialysis method (b) Float-A-Lyzer® (1 ml, 50 kDa MWCO cellulose ester) (Spectrum Laboratories, USA) as dialysis tube was used (adapted from the reference 58)

U *in vitro* uslovima prva faza (faza cirkulacije) odvijala se u 10 mM natrijum-4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonat rastvoru pH 7,4 (HEPES pufer), dok je u drugoj fazi u medijum dodat Triton X-100 (oktoksinol-9) u koncentraciji od 1% (m/V). Pokazano je da je varijabilnost rezultata brzine oslobađanja između uzoraka bila znatno manja u odnosu na rezultate dobijene uobičajenom dijaliznom metodom. S obzirom na potvrđenu mogućnost diskriminatornosti uzoraka različitog sastava, autori predlažu primenu navedene metode u okviru ispitivanja kvaliteta proizvoda za različite parenteralne preparate kompleksnog sastava (58).

Zaključak

Parenteralni preparati moraju ispuniti brojne zahteve koji se odnose na procenu njihovog kvaliteta. Pored fizičko-hemijskih, mikrobioloških i farmaceutsko-tehnoloških ispitivanja koja su uobičajena za konvencionalne farmaceutske oblike za parenteralnu primenu, u literaturi se navodi veći broj ispitivanja predviđenih za ispitivanje farmaceutskih oblika sa specifičnim nosačima lekovitih supstanci, kao i nove klase kompleksnih lekova, bioloških i tzv. nebioloških kompleksnih lekova (i njihovih „similara“- sličnih lekova), čiji dalji razvoj se očekuje u bliskoj budućnosti, a koji se, u velikom broju slučajeva, primenjuju parenteralnim putem.

Parenteralni preparati sa liposomskim nosačima lekovitih supstanci, kao predstavnici nebioloških kompleksnih lekova primenjuju se u terapiji već duže od dve decenije. Uporedo sa intenzivnim istraživanjima navedenih nosača lekovitih supstanci za parenteralni put primene, razvijale su se i metode njihove *in vitro* karakterizacije. Upravo činjenica da ova ispitivanja u osnovi nisu propisana u najznačajnijim svetskim farmakopejama (Ph. Eur., USP i JP), kao i da se postupci njihovog izvođenja mogu značajno razlikovati između laboratorija, doprinosi velikoj varijabilnosti dobijenih rezultata i ograničenjima u njihovom međusobnom poređenju.

Regulatorna tela EMA i FDA su učestvovala u pripremi određenih dokumenata i razvoju odgovarajućih standarda i smernica u pogledu ispitivanja kvaliteta liposomskih nosača lekovitih supstanci za parenteralnu primenu. S obzirom na aktuelni razvoj savremenih farmaceutskih oblika i nosača lekovitih supstanci za parenteralni put primene očekuje se i uporedno usavršavanje metoda za sveobuhvatna ispitivanja njihovog kvaliteta, što će doprineti bezbednoj i efikasnoj primeni ovog vida terapije.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na podršci posredstvom projekata TR34031 i OI172018.

Literatura

1. Broadhead J, Gibson M. Parenteral Dosage Forms. In: Gibson M, editor. Pharmaceutical preformulation and formulation: A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form. 2nd ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 2009. p. 325-47.
2. Ludwig JD. Parenteral dosage forms: introduction and historical perspective. In: Nema S, Ludwig JD, editors. Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications. 3rd ed. Volume 1: Formulation and Packaging. London, New York: Informa Healthcare; 2010. p.1-6.
3. Lowe R. Parenteral drug delivery. In: Aulton ME, Taylor KMG, editors. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2018. p.638-52.
4. Perrie Y. Pharmaceutical nanotechnology and nanomedicines In: Aulton ME, Taylor KMG, editors. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2018. p.784-803.
5. Crommelin DJA, de Vlieger JSB, Mühlebach S. Introduction: Defining the Position of Non-Biological Complex Drugs. In: Crommelin, DJA, de Vlieger, JSB, editors. Non-Biological Complex Drugs: The Science and the Regulatory Landscape. Heidelberg: Springer. 2015. p.1-8.
6. Krajišnik D. Metode ispitivanja konvencionalnih i savremenih farmaceutskih oblika za parenteralnu primenu. Specijalistički rad. Beograd: Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, 2017.
7. Crommelin DJ, Shah VP, Klebovich I, McNeil SE, Weinstein V, Flühmann B *et al.* The similarity question for biologicals and non-biological complex drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2015;76:10-7.
8. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm Res.* 2016;33:2373-87.
9. Husaarts L, Mühlebach S, Shah VP, McNeil S, Borchard G, Flühmann B *et al.* Equivalence of complex drug products: advances in and challenges for current regulatory frameworks. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1407(1):39-49.
10. Crommelin DJ, de Vlieger JS, Weinstein V, Mühlebach S, Shah VP, Schellekens H. Different pharmaceutical products need similar terminology. *AAPS J.* 2014;16(1):11-4.
11. Mühlebach S, Vulto A, de Vlieger J, Weinstein V, Flühmann B, Shah VP. The authorization of non-biological complex drugs (NBCDs) follow-on versions: specific regulatory and interchangeability rules ahead. *GaBI Journal.* 2013;2(4):204-7.
12. Schellekens H, Stegemann S, Weinstein V, de Vlieger JS, Flühmann B, Mühlebach S *et al.* How to regulate nonbiological complex drugs (NBCD) and their follow-on versions: points to consider. *AAPS J.* 2014;16(1):15-21.
13. Borchard G, Crommelin DJA. Equivalence of glatiramer acetate products: challenges in assessing pharmaceutical equivalence and critical clinical performance attributes. *Expert Opin Drug Deliv.* 2018;15(3):247-59.
14. Grossman, JH, Crist RM, Clogston JD. Early Development Challenges for Drug Products Containing Nanomaterials. *AAPS J.* 2017; 19(1):92-102.

15. Ehmann F, Sakai-Kato K, Duncan R, Hernán Pérez de la Ossa D, Pita R, Vidal JM *et al.* Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines. *Nanomedicine*. 2013;8(5):849-56.
16. Borchard G, Flühmann B, Mühlebach S. Nanoparticle iron medicinal products - Requirements for approval of intended copies of non-biological complex drugs (NBCD) and the importance of clinical comparative studies. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2012;64(2):324-8.
17. Bakshi S, Chalifa-Caspi V, Plaschkes I, Perevozkin I, Gurevich M, Schwartz R. Gene expression analysis reveals functional pathways of glatiramer acetate activation. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17(4):351-62.
18. Varkony H, Weinstein V, Klinger E, Sterling J, Cooperman H, Komlosch T *et al.* The glatiramoid class of immunomodulator drugs. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2009;10(4):657-68.
19. Mühlebach S, Borchard G, Yildiz S. Regulatory challenges and approaches to characterize nanomedicines and their follow-on similars. *Nanomedicine*. 2015;10(4): 659-74.
20. Kettiger H, Schipanski A, Wick P, Huwyler J. Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism. *Int J Nanomed*. 2013;8:3255-69.
21. Ambardekar VV, Stern ST. NBCD pharmacokinetics and bioanalytical methods to measure drug release. 2015. In: Crommelin, DJA, de Vlieger, JSB, editors. *Non-Biological Complex Drugs: The Science and the Regulatory Landscape*. Heidelberg: Springer. 2015. p.261-87.
22. Skoczen S, McNeil SE, Stern ST. Stable isotope method to measure drug release from nanomedicines. *J Control Release*. 2015;220:169-74.
23. Draft guidance on doxorubicin hydrochloride [Internet] FDA [cited 2019 May 1] Available from: <https://wayback.archive-it.org/7993/20190208133123/https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM199635.pdf>
24. Tinkle S, McNeil SE, Mühlebach S, Bawa R, Borchard G, Barenholz YC *et al.* Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Ann NY Acad Sci*. 2014;1313:35-56.
25. Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal products, 2013. [Internet] EMA/CHMP/806058/2009/Rev. 02 [cited 2019 May 1] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/03/WC500140351.pdf
26. Reflection paper on nonclinical studies for generic nanoparticle iron medicinal product applications, 2011. [Internet] EMA/CHMP/SWP/100094/2011 [cited 2019 May 1] Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/04/WC500105048.pdf
27. Barenholz YC. Doxil[®]—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*. 2012;160(2):117-34.
28. Moghimi SM, Farhangrazi ZS. Defining and characterizing non-biological complex drugs (NBCDs)—Is size enough? The case for liposomal doxorubicin generics ('liposomal nanosimilars') for injection. *GaBI Journal*. 2014;3:56-7.

29. Dissolution Methods [Internet] FDA [cited 2019 May 1] Available from: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm
30. Draft reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product, 2015 [Internet] EMA/CHMP/SWP/620008/2012 [cited 2019 May 1] Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-data-requirements-intravenous-iron-based-nano-colloidal-products-developed_en.pdf
31. Draft Guidance on Iron Sucrose [Internet] FDA [cited 2019 May 1] Available from: <https://wayback.archive-it.org/7993/20170406171330/https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM297630.pdf>
32. Draft Guidance on Glatiramer Acetate Injection [Internet] FDA [cited 2019 May 1] Available from: <https://wayback.archive-it.org/7993/20180908115552/https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM495029.pdf>
33. Guidance for Industry - Liposome Drug Products, 2018. [Internet] FDA/CDER [cited 2019 May 1] Available from: <http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/UCM070570.PDF>
34. Crommelin DJA, Metselaar JM, Storm G. Liposomes: The Science and the Regulatory Landscape. In: Crommelin, DJA, de Vlieger, JSB, editors. *Non-Biological Complex Drugs: The Science and the Regulatory Landscape*. Heidelberg: Springer. 2015. p.77-106.
35. Lee Y, Thompson DH. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2017; 9(5). e1450
36. Đekić Lj. *Nanomaterijali u farmaceutskim preparatima: karakteristike i primena*. Specijalistički rad. Beograd: Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, 2013.
37. Đekić L. Liposomes: Properties and Therapeutic Applications. In: Keservani RK, Sharma AK, Kesharwani RK, editors. *Novel Approaches for Drug Delivery*. Hershey: IGI Global; 2017. p. 27-51.
38. Dailymed [Internet] NIH U.S. National Library of Medicine [cited 2019 May 1] Available from: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/>
39. Kraft JC, Freeling JP, Wang Z, Ho RJ. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *J Pharm Sci*. 2014;103(1):29-52.
40. Zylberberg C, Matosevic S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv*. 2016; 23(9):3319-29.
41. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*. 2017;9(2). pii: E12.
42. EMC, 2019. [Internet] The electronic Medicines Compendium (eMC) [cited 2019 May 1] Available from: <https://www.medicines.org.uk/emc/>
43. *European Pharmacopoeia*, 9th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2016.
44. *The United States Pharmacopoeia 40, The National Formulary 35*. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2017.

45. Yang T, Cui FD, Choi MK, Cho JW, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2007; 338(1):317-26.
46. Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv.* 2007; 4(4):297-305.
47. Boyd BJ, Rades T. Applications of small angle X-ray scattering in pharmaceutical science. In: Müllertz A, Perrie Y, Rades T, editors. *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences.* Springer-Verlag New York Inc., 2016; p. 339-60.
48. Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, McNeil SE, Wilkhu J, Lattmann E *et al.* Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. *Int J Pharm.* 2011;417(1-2):138-50.
49. Almgren M, Edwards K, Karlsson G. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. *Coll Surf A* 2000;174:3-21.
50. Onyesom I, Lamprou DA, Sygellou L, Owusu-Ware SK, Antonijevic M, Chowdhry BZ *et al.* Sirolimus encapsulated liposomes for cancer therapy: physicochemical and mechanical characterization of sirolimus distribution within liposome bilayers. *Mol Pharm.* 2013;10(11):4281-93.
51. Østergaard J, Jørgensen L, Engelbrecht Thomsen A, Weng Larsen S, Larsen C, Jensen H. Drug-liposome distribution phenomena studied by capillary electrophoresis-frontal analysis. *Electrophoresis.* 2008;29(16):3320-4.
52. Franzen U, Jørgensen L, Larsen C, Heegaard NHH, Østergaard J. Determination of liposome-buffer distribution coefficients of charged drugs by capillary electrophoresis frontal analysis. *Electrophoresis* 2009;30:2711-19.
53. Pentak D. Alternative methods of determining phase transition temperatures of phospholipids that constitute liposomes on the example of DPPC and DMPC. *Thermochim Acta.* 2014;584:36-44.
54. Nguyen TT1, Østergaard J, Stürup S, Gammelgaard B. Investigation of a liposomal oxaliplatin drug formulation by capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry (CE-ICP-MS). *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(6):2131-9.
55. Nguyen TT1, Østergaard J, Stürup S, Gammelgaard B. Determination of platinum drug release and liposome stability in human plasma by CE-ICP-MS. *Int J Pharm.* 2013;449(1-2):95-102.
56. Bhardwaj U, Burgess DJ. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. *Int J Pharm.* 2010;388(1-2):287-94.
57. Panwar P, Pandey B, Lakhera PC, Singh KP. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes. *Int J Nanomed.* 2010;5:101-8.
58. Xu X, Khan MA, Burgess DJ. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for targeted liposomes. *Int J Pharm.* 2012;426(1-2):211-8.
59. Solomon D, Gupta N, Mulla NS, Shukla S, Guerrero YA, Gupta V. Role of in vitro release methods in liposomal formulation development: challenges and regulatory perspective. *AAPS J.* 2017;19(6):1669-81.
60. Yuan W, Kuai R, Dai Z, Yuan Y, Zheng N, Jiang W *et al.* Development of a flow-through USP-4 apparatus drug release assay to evaluate doxorubicin liposomes. *AAPS J.* 2017;19(1):150-160.

61. Tang J, Srinivasan S, Yuan W, Ming R, Liu Y, Dai Z *et al.* Development of a flow-through USP 4 apparatus drug release assay for the evaluation of amphotericin B liposome. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019;134:107-116.

Challenges of *in vitro* characterization of non-biological complex drugs - example of parenteral preparations with liposomal drug carriers

Danina Krajišnik*, Jela Milić, Snežana Savić

University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology Vojvode Stepe 450, 11 221 Belgrade, Serbia

*Corresponding author: Danina Krajišnik
e-mail: danina.krajsnik@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

A greater variety of pharmaceutical preparations can be administered by the parenteral route, the composition of which can be simple (aqueous solutions) and more or less complex (emulsions, suspensions, liposomes as carriers of active pharmaceutical ingredients, particle systems, solid implants/implants). In addition, advances in bio- and nano- technology have enabled the development of new classes of complex drugs, so-called non-biological complex drugs (and their similars) whose further development is expected in the near future, and which are in many cases applied by parenteral route.

Parenteral preparations containing active substances encapsulated in the liposome-type carriers represent a class of non-biological complex drugs which have the longest use so far and whose properties and defined quality characteristics are being most examined. In this paper, an overview of mandatory and additional (specific) *in vitro* tests for parenteral liposomal drug carriers is presented. The fact that standard testing procedures are often not available in relevant pharmacopoeias (Ph. Eur., USP and JP), so that they can vary significantly between laboratories, contributes to the great variability of the results obtained and constraints in their mutual comparison. EMA and FDA, as regulatory agencies, have also participated in the preparation of certain documents and development of appropriate standards and guidelines for quality control of liposomal drug carriers for parenteral application.

Keywords: parenteral preparations, non-biological complex drugs, liposomes;
in vitro characterization
