

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

ФОРМУЛАЦИЈА ФИНАЛНОГ ПРОИЗВОДА

4. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

Крагујевац

Формулација финалног производа

- Након добијања протеина високе чистоће (98 - 99%) следећи корак у *downstream* процесима је формулација финалног производа. Како би се обезбедио терапијски ефикасан и безбедан производ, приликом формулације протеинских препарата активној супстанци се додају бројне помоћне супстанце - ексципијенси. На стабилност финалног производа, поред одабира одговарајућих ексципијенса, утичу и услови израде препарата, па стога успешна формулација биофармацеутика подразумева:
 - додатак **ексципијенаса** (супстанце које стабилизују финални производ или побољшавају његове карактеристике);
 - филтрацију финалног производа кроз филтер промера 0,22 μm , у циљу добијања **стерилног производа**, која је праћена пуњењем бочица у асептичним условима;
 - сушење смрзавањем (**лиофилизација**), уколико је финални производ у облику праха.

Формулација финалног производа

- У зависности од стабилности протеина у раствору (одређује се експериментално) производ се формулише у облику:
 - раствора;
 - лиофилизованог прашка;
 - компактних обликованих лиофилизата (таблета).
- Поједини протеини могу бити стабилни у раствору месецима/годинама, нарочито уколико садрже одговарајући ексципијенс (стабилизатор) и уколико се чувају у фрижидеру ($2 - 8^{\circ}\text{C}$), док поједини могу изгубити биолошку активност након свега пар сати/дана.

Модификације протеина

- Упркос високој чистоћи и сличности терапијских протеина са ендогеним хуманим протеинима, њихова поновљена примена често индукује стварање нежељених антитела на примењени лек. Нежељена имуногеност има утицај на ефикасност и безбедност биофармацеутика.
- Неколико фактора има улогу у имуногености биофармацеутика, од којих се посебно издваја присуство модификованих форми протеина од интереса у терапијским формулацијама.
- Многи физички и хемијски фактори индукују модификацију протеина и последично утичу на квалитет терапијских протеина.

Модификације протеина

- Зато је за одабир оптималне формулације биофармацеутика кључно познавање и разумевање:
 - механизма укључених у модификацију протеина од интереса;
 - потенцијалног утицаја модификације протеина на биолошку активност, полуживот и имуногеност биофармацеутика.
- Ови механизми могу бити сложени и могу обухватити многе међусобно повезане хемијске и физичке процесе. Модификација протеина настаје током производње, изолације, пречишћавања, формулације, складиштења и дистрибуције биофармацеутика.

Модификације протеина

- Модификација протеина и пептида може бити посредована:
 - хемијским механизмима - стварају се нове или раскидају постојеће везе;
 - физичким механизмима - промена у конформацији, адсорпција, агрегација и преципитација.
- Бројни фактори доводе до модификације протеина или њихове измене на неки други начин, при чему протеини постају мање активни или потпуно инактивни. Због тога је од великог значаја да се током *downstream* процеса и складиштења обезбеде одговарајући услови који ће у великој мери спречити губитак биолошке активности протеина. Фактори који утичу на биолошку активност протеина деле се на:
 - хемијске (детерџенти и оксидациона средства);
 - физичке (екстремне рН вредности, повишена температура и снажно мућкање);
 - биолошке (протеолитичка деградација).

Модификације протеина

- Како би се ризик од инактивације протеина свео на минимум потребно је да се током *downstream* процеса протеини у што мањој мери и краћем временском периоду излажу овим утицајима.
- Такође, протеини се могу заштитити и додатком одговарајућих стабилизујућих агенаса (ексципијенаса), који су од суштинског значаја за оптимални рок трајања финалног производа.

Хемијске модификације протеина

- Хемијска модификација протеина подразумева стварање нових или раскидање постојећих хемијских веза. Хемијска модификација протеина се одвија кроз реакције:
 - деамидације,
 - оксидације,
 - рацемизације,
 - хидролизе,
 - размене дисулфида,
 - стварања имида,
 - изомеризације,
 - фотодеградације,
 - гликације и
 - промене бочних ланаца угљених хидрата

Хемијске модификације протеина

- Најчешће се модификације протеина одвијају кроз процесе деамидације и оксидације.
- Познавање примарне структуре протеина од интереса је кључно за предвиђање потенцијалних модификација протеина. Међутим, за потпуно разумевање хемијских модификација протеина неопходно је и познавање виших структура.
- Хемијским модификацијама су подложне бочне групе аминокиселина које се налазе на спољашњој површини протеина. Додатно, код гликопротеина и угљенохидратна компонентна може бити модификована.

Деамидација

- Деамидација представља хидролизу амидне групе и то најчешће у бочном ланцу аминокиселине аспарагин, и у мањој мери код аминокиселине глутамин при чему настају аспарагинска и глутаминска киселина. Деамидација се дешава *in vivo* (биолошки процеси попут нпр. старења), али и *in vitro*. Уколико говоримо о биофармацеутицима, *in vitro* деамидација може утицати на физичко-хемијске особине протеина и:
 - нарушити кватернарну, терцијарну и секундарну структуру протеина;
 - променити наелектрисање (нпр. из неутралног у негативно);
 - снижити pI;
 - утицати и на формирање агрегата протеинског производа.

Деамидација

- Као последица свега наведеног биолошка активност протеинског производа може бити компромитована, а такође постоји могућност и повећане имуногености и измењеног полуживота.
- С обзиром да је деамидација фаворизована на вишим температурама и рН вредностима, један од начина да се деамидација смањи јесте формулација на рН вредностима 3–5 и нижим температурама, формулисањем лиофилизата, као и складиштењем на нижој температури.
- Деамидација представља најчешћи пут деградације инсулинских препарата.

Стварање сукцинимиди и изомеризација

- Циклични имиди (сукцинимиди) настају када азот из α -амино групе аспарагина, аспарагинске киселине, глутамина или глутаминске киселине “нападне” карбонилну групу у бочном ланцу ових аминокиселина, при чему настају аспартимиди или глутаримиди. Настали циклични имиди су уједно и интермедијери у процесу изомеризације поменутих аминокиселина и њиховом настанку погодује ниска рН вредност ($< 5,5$).
- Реакција деамидације аспарагина при физиолошкој рН одвија се преко цикличног имидног интермедијера, при чему настаје аспарагинска или изоаспарагинска киселина.

Стварање сукцинимидида и изомеризација

- Изомеризација аспарагинске киселине, сродна је реакцији деамидације, јер се одвија преко истог цикличног имидног интермедијера. У малим пептидним фрагментим фаворизовано је превођење аспарагина до изоаспарагинске киселине у односу на аспарагинску киселину, иако то може зависити и од секундарне или терцијарне структуре протеина. Додатно, реакција деамидације се одвија брже када се одређени аминокиселински остаци попут глицина налазе у суседству аспарагина (нпр. пептид Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala).
- Изомеризација је фаворизована такође када се глицин налази у суседству аспарагинске киселине у киселим условима, док се реакција деамидације брже одвија у алкалним условима.

Рацемизација

- Рацемизација аминокиселина је спонтана конверзија L-енантиомера у D-енантиомере.
- На рацемизацију аминокиселина у протеину утиче висока рН вредност, повишена температура и време (дужина чувања).
- Аспарагинска киселина и аспарагин су најподложније рацемизацији.

Оксидација

- Метионин, цистеин, триптофан, тирозин и хистидин су аминокиселине које лако оксидују, стога су протеини богати овим аминокиселинама подложни оксидативној деградацији. Оксидација било које аминокиселине у протеину може драстично смањити биолошку активност биофармацеутика и чешће се дешава при неутралној и алкалној рН вредности. Оксидација се смањује тако што се:
 - производ формулише на рН вредностима нижим од 7;
 - у финално паковање производа уместо кисеоника дода инертни гас (нпр. азот);
 - током формулације биофармацеутика додаје антиоксиданс (аскорбинска киселина или ацетилцистеин). Додатак антиоксиданаса треба пажљиво размотрити јер они могу имати дестабилишући ефекат на протеине (нпр. аскорбинска киселина може деловати као оксиданс у присуству тешких метала).

Оксидација

- Оксидација бочних ланаца цистеина се дешава након излагања ваздуху или јачим оксидансима (нпр. пероксиди, супероксид, хидроксилни радикали или хипохлорит).
- Када се оксидација дешава под утицајем ваздуха, бочни остаци цистеина најпре оксидују до сулфенске киселине, а затим долази до грађења дисулфидне везе, то јест формира се дисулфидни дериват - цистин.
- Док се оксидација цистеина под дејством јачих оксиданаса одвија преко сулфенске и сулфинске до сулфонске киселине (цистеинске киселине).

Оксидација

- Метионин се оксидује деловањем ваздуха или потентнијих оксиданаса, при чему иницијално настаје сулфоксид, а потом сулфон.
- Оксидација метионина је фаворизована при ниским рН вредностима, као и у присуству различитих металних јона.
- Метионински остаци на површини протеина су нарочито осетљиви на оксидацију, док су метионински остаци у унутрашњости протеина мање доступни деловању оксиданаса.

Оксидација

- Триптофан је ароматична аминокиселина која је веома подложна оксидацији и подлеже модификацији до више различитих хидрокси деривата триптофана (4-, 6- и 7-хидрокси-триптофан) током процеса производње, формулације и складиштења. Многи физички и хемијски процеси доприносе модификацији триптофана, првенствено оксидација високо реактивног индоловог прстена.
- Кључни фактори који доприносе оксидацији су присуство реактивних врста кисеоника, као што су синглетни кисеоник, водоник пероксид и хидроксилни радикали, светлост, јони метала и топлота.

Фотодеградација

- Триптофан је једна од најосетљивијих аминокиселина на светлост, а у мањој мери су и аминокиселине тирозин, цистеин и фенилаланин, тако да код протеина богатим овим аминокиселина постоји ризик од фотодеградације.
- Фотодеградацијом може се нарушити структура, стабилност и биолошка активност производа. Излагање протеина светлу могуће је у различитим фазама производње, транспорту, дистрибуцији, примени код пацијената. Нпр. током пречишћавања коришћењем хорматографије неизбежно је излагање UV светлости која служи за детекцију елуираног протеина.
- Један од начина спречавања фотодеградације је паковање у тамне бочице које спречавају да светлост дође у контакт са производом, или у случају течних препарата, паковање у шприцеве за једнократну употребу.

Фотодеградација

- Најчешћи производи фото-оксидације триптофана су кинуренин, N-формил-кинуренин и 3-хидроксикинуренин.
- Оксидација тирозина је једна од главних оксидативних модификација у пептидима и протеинима. Оксидација тирозина иницирана је светлошћу и одвија се стварањем нестабилних ендопероксида који се преводе у хидропероксиде, а крајњи продукти оксидације тирозина су најчешће DOPA (3,4-дихидроксифенилаланин) и C-C и C-O-димери тирозина.
- Оксидација хистидина се одвија услед присуства светлости или јона метала, а погодује јој базна и неутрална pH вредност. Главни производи оксидације хистидина су 2-оксо-хистидин и производи настали унакрсним повезивањем два хистидина.

Хидролиза

- Хидролизи је подложна пептидна веза између аспарагина и пролина, и између аспарагина и тирозина, као и амидна веза бочних остатака аспарагина и глутамина, нарочито при ниској рН вредности.
- Процес хидролизе резултује трансформацијом аспарагина у аспарагинску киселину (долази до деамидације) и формирањем фрагмената протеина, јер долази до хидролитичке деградације пептидне везе. Хидролизу ових веза је могуће избећи уколико се биофармацеутик формулише на рН вредностима преко 7.

Дисулфидне измене

- Дисулфидне везе учествују у стварању терцијарних структура и стабилизацији секундарних структура протеина.
- Дисулфидне измене су могуће код цистеин-цистеин веза, при чему настаје агрегација протеина.
- Агрегација се спречава додатком ексципијенаса.

Гликација

- Гликација је још један вид хемијске модификације терапијског протеина који настаје услед формулације терапијског протеина у присуству редукујућих угљених хидрата као што су глюкоза, лактоза, фруктоза и малтоза. Ови угљени хидрати могу да интерагују са аминок групама протеина, и то најчешће, бочним ланцем лизина и N-терминусом полипептидног ланца.
- За разлику од гликозилације терапијских протеина која је посредована ензимима и од есенцијалног је значаја за испољавање биолошке активности, гликација је случајан неензимски процес који подразумева ковалентно везивања угљенохидратне компоненте на протеин, који онемогућава његово правилно функционисање.
- Избегавање употребе редукујућих угљених хидрата приликом формулације терапијског протеина је један од начина за минимизирање гликације.

Промена бочних ланаца угљених хидрата

- Многи терапијски протеини су гликозилирани, а угљенохидратна компонента протеина може утицати на њихову функцију, стабилност и структуру.
- Хемијске или ензимске модификације угљенохидратне компоненте производа могу утицати на њихова терапијска својства (нпр. присуство ензима гликозидазе у сировом препарату доводи до делимичне деградације угљенохидратне компоненте - то се може ефикасно умањити спровођењем *downstream* процеса у што краћем временском периоду на ниској температури).

Физичке модификација протеина

- Физичке модификације протеина подразумевају промене у њиховој секундарној, терцијарној или кватернарној структури. Физичке модификације протеина настају након процеса:
 - Денатурације;
 - Агрегације;
 - Преципитације;
 - Адсорпције.
- Услед ових промена у структури, протеини губе и потентност, тако да је од суштинске важности одржати конформацију протеина како би се сачувала њихова потентност и стабилност.

Агрегација и преципитација

- Формирање протеинских агрегата је од посебног значаја, јер је присуство агрегата у терапијским формулацијама у корелацији са већим ризиком за настанак нежељене имуногености. Штавише, формирање агрегата се често повезује са другим врстама модификација, што их чини добрим показатељима укупне нестабилности, као и квалитета производа. Сви терапијски протеини имају склоност ка агрегацији.
- Овај процес може бити убрзан разним спољним факторима, као што су варијације температуре, замрзавање-одмрзавање, мешање, присуство нечистоћа, промене формулације, излагање прелазима између две фазе (нпр. вода/ваздух), излагање светлости и дуготрајно складиштење.

Агрегација и преципитација

- Протеински агрегати се могу састојати од протеина који су претрпели више различитих облика физичких и хемијских модификација, стога је њихова карактеризација сложена и захтева комбинацију различитих аналитичких техника.
- Агрегати се могу разликовати у многим аспектима, као што су величина, тип интермолекулских веза, реверзибилност, морфологија и хидрофобност.
- Агрегати протеина могу бити растворни и/или нерастворни и могу се таложити. Агрегација протеина настаје услед стварања ковалентних (дислуфидна веза, унакрсно формирање дитиروزина) или нековалентних веза (водоничне везе, хидрофобне Ван дер Валсове и електростатичке интеракције).

Агрегација и преципитација

- Агрегација може бити реверзибилна или иреверзибилна при чему се иреверзибилни агрегати могу трајно елиминисати процесима сепарације, као што је нпр. филтрирање. Формирање реверзибилних агрегата је најчешће последица самоудруживања протеинских молекула.
- У факторе који иницирају агрегацију убрајају се:
 - повишена температура;
 - лиофилизација;
 - интеракција са хидрофобним површинама;
 - реконституција лиофилизата;
 - светлост;
 - присуство органских растварача;
 - присуство тешких метала;
 - присуство воде у лиофилизату;
 - мућкање током производње, испоруке и руковања.

Агрегација и преципитација

- Агрегација смањује биолошку активност и повећава имуногеност биофармацеутика. Нерастворљиви агрегати мењају физичке карактеристике производа, при чему могу бити присутни преципитати или опалесценција. Иако агрегација код већине протеина доводи до губитка потентности, постоје и изузеци као што је инсулин (димери или хексамери).
- Агрегација протеина у биофармацеутским препаратима се може предвидети и спречити у раној фази развоја кроз пажљив дизајн формулације, укључујући концентрацију терапијског протеина, адекватан избор пуфера и ексципијенаса.

Адсорпција

- Водени раствори биофармацеутика се могу адсорбовати на чврсте површине бочице и тиме се смањује њихова концентрација у раствору. Адсорпција лека на површину бочице или на филтере за стерилизацију представља значајан проблем за биофармацеутике.
- Протеински молекули имају различите афинитете за филтере и бочице. Адсорпција се брзо дешава и може се спречити додатком различитих ексципијенса. Одређени ексципијенси се додају како би се умањила адсорпција терапијског протеина на прелазима између две фазе (интерфејс).

Адсорпција

- Наиме, неки протеини када се нађу на прелазима између две фазе имају тенденцију да излажу спољашњој средини хидрофобне делове који су иначе смештени у унутрашњости нативног протеина. Тај прелаз може бити прелаз - вода/ваздух, вода/зид бочице или прелаз формиран између водене фазе и прибора који се користи за примену лека (нпр. катетер, игла). Овако адсорбовани, делимично савијени протеински молекули формирају агрегате, који се одвајају од површине на коју су се адсорбовали, враћају се у водену фазу, формирају веће агрегате и талог.

Денатурација

- Денатурација подразумева промене у секундарној, терцијарној или кватернарној структури протеина, а узрокују је загревање, хлађење, замрзавање (циклуси замрзавања-одмрзавања), присуство денатуришућих агенаса, различите рН вредности и органски растварачи.
- Денатурација може бити реверзибилна или иреверзибилна. Појава денатурације може се користити као метод за упоређивање стабилности протеинских препарата у различитим формулацијама.
- Када се протеински производ примењује помоћу уређаја за испоруку, тада се и утицај уређаја на денатурацију мора размотрити (нпр. инсулинска пумпа).

Денатурација

- Денатурација се може избећи коришћењем нижих температура током производње и формулације, као и адекватним чувањем протеинских раствора на ниским температурама.
- Контролисањем услова производње и формулације, као и додатком одређених ексципијенаса може се спречити денатурација терапијског протеина.

Биолошка модификација протеина - Протеолиза

- Протеолиза протеина подразумева хидролизу једне или више пептидних (амидних) веза у протеину у присуству протеаза и доводи до губитка биолошке активности. Протеини се у великој мери разликују према подложности за напад протеаза.
- Протеазе се класификују у групе на основу аминокиселина које се налазе на активном месту ензима, нпр. серин представља есенцијалну компоненту активног места серин протеазе. Протеазе се класификују као:
 - Серин протеазе I (код сисара) или II (код бактерија)
 - Цистеин протеазе
 - Аспартат протеазе
 - Металопротеазе I (код сисара) или II (код бактерија)
 - Треонин протеазе
 - Глутамат протеазе

Протеолиза

- Постоје екзопротеазе које катализују раскидање терминалних пептидних веза и ендопротеазе које раскидају унутрашње пептидне везе при чему настају пептидни фрагменти. Чак и делимична екзо- или ендодеградација биофармацеутика мења или уништава њихову биолошку активност.
- Отпорност на протеолизу зависи од виших нивоа протеинске структуре (нпр. секундарна и терцијарна структура), јер „чврсто“ паковање штити пептидне везе од напада ензима.

Протеолиза

- Постоје бројне стратегије за смањење ризика од протеолизе:
 - смањење дужине трајања процеса производње (ограничава се време током којег протеазе долазе у директан контакт са протеинским производом);
 - производња на нижим температурама (око 4⁰ C, смањује се ниво протеолитичке активности);
 - примена специфичних инхибитора протеаза.
- Додатак специфичних инхибитора протеаза у пуфере за производњу (нарочито у пуфер за хомогенизацију) ефикасно спречава неконтролисану протеолизу. За сваку од класа протеаза постоји одређени број ефикасних инхибитора, али још увек ниједан од њих не може да инхибира све класе.

Протеолиза

- Комбинацијом ових инхибитора ефикасније се спречава протеолиза, али се повећава ризик за испољавање токсичности. У већини случајева, додатне мере предострожности су неопходне како би се протеини заштитили од протеолизе у раним фазама пречишћавања.
- Током каснијих фаза већина протеаза је већ уклоњена из производа. Један од главних циљева процеса пречишћавања производа је комплетно уклањање протеаза, јер њихово присуство и у малим количинама може довести до значајне протеолизе финалног производа током времена.

Употреба ексципијенаса у формулацији финалног производа

- Велики број супстанци које се додају пречишћеном терапијском протеину могу на различите начине повећати његову стабилност. Велики недостатак протеина, посебно оних који нису гликозилирани, је склоност ка агрегацији и таложењу. Овај недостатак се превазилази побољшањем растворљивости протеина, што се може постићи на различите начине: додатком ексципијенаса, подешавањем одговарајуће рН и јонске јачине.
- Механизам деловања ексципијенаса који се користе као појачивачи растворљивости зависи од њихове врсте као и од природе протеина, стога је врло битно њихово познавање при одабиру за формулацију. Затим, избор пуфера је изузетно важан део процеса формулације, јер је растворљивост протеина рН зависна.

Употреба ексципијенаса у формулацији финалног производа

- Растворљивост се може повећати и променом јонске јачине раствора, тако што се у раствор додају растворне соли које имају јоне различите од јона који граде талог. Терапијски протеини се углавном примењују парентерално, стога је врло важно да имају прилагођену тоничност, која се такође подешава додатком одговарајућих ексципијенаса (сланим растворима и растворима моно- или дисахарида).
- Главне групе ексципијенаса које се користе за стабилизацију финалног производа су:
 - хумани серумски албумин;
 - аминокиселине;
 - угљени хидрати;
 - полихидроксилни алкохоли;
 - сурфактанти;
 - полимери;
 - јонска једињења;
 - конзерванси;
 - средства за подешавање тоничности.

Хумани серумски албумин као ексципијенс

- Хумани серумски албумин (HSA) је стабилан молекул, способан да издржи услове ниске рН вредности и повишене температуре (> 10 сати је стабилан на температури од 60⁰ C). Такође, поседује одличне карактеристике у погледу растворљивости. Сматра се да албумин испољава директне и индиректне стабилишуће ефекте.
- HSA смањује ниво адсорпције биофармацеутика за унутрашње зидове бочице у којој се налази (антиадхезив). Такође, може бити и алтернативна мета за деловање протеаза или других агенаса који су штетни за производ. HSA је ефикасан криопротектант за неколико биофармацеутика (нпр. IL-2, tPA и неке интерфероне).
- HSA се често користи у комбинацији са додатним стабилишућим агенсима, као што су аминокиселине (углавном глицин) и угљени хидрати. Међутим, употреба HSA може бити ризична, јер се путем њега могу случајно пренети патогени микроорганизми преносиви путем крви. Употребом рекомбинантног HSA могу се превазићи ови недостаци.

Аминокиселине као ексципијенси

- Најчешће коришћене аминокиселине као ексципијенси у биофармацеутицима су: глицин, аргинин, хистидин, аланин, пролин, аспарагинска киселина, глутаминска киселина и лизин. Аминокиселине се додају у финални производ у концентрационом опсегу 0,5 - 5%.
- Због комплексности њиховог дејства аминокиселине се додају биофармацеутицима у различите сврхе:
 - смањење агрегације (аспарагинска киселина, глутаминска киселина, глицин, аргинин и лизин);
 - смањење адсорпције (аминокиселине се могу понашати као хелатирајућа средства, па могу смањити површинску адсорпцију протеинских производа);

Аминокиселине као ексципијенси

- заштита протеина од непожељних утицаја екстремних промена температуре - замрзавања - криопротектант или сушења - лиопротектант (аргинин, глицин);
- повећање растворљивости протеинског производа (на пример лизин или аргинин користе за повећање растворљивости ткивног активатора плазминогена - t-PA);
- као антиоксиданси (хистидин – хватач слободних радикала);
- као пуфери (хистидин се користи као пуферски агенс за антитела - одржава оптималну рН вредност утиче и на стабилизацију нековалентних интеракција између антитела. Глицин се може користити као пуферски агенс - одржава рН протеинске формулације у пожељном опсегу 3-10)
- средство за допуњавање у процесу лиофилизације (глицин).

Угљени хидрати као ексципијенси

- Угљени хидрати штите протеине од денатурације и најчешће се користе као криопротектанти. Као ексципијенси се користе: трехалоза, сахароза, малтоза, фруктоза, рафиноза, лактоза и глукоза.
- Угљени хидрати могу стабилизovati структуру протеина тако што побољшавају интеракцију растварача са протеинима, па долази до хидратације протеина. Међутим, ови ексципијенси нису инертни, па тако могу утицати на структурну стабилност протеина, јер претеран ефекат хидратације појачава склоност протеина ка самоасоцијацији. За оптималну дугорочну стабилност препоручују се дисахариди попут трехалозе и сахарозе.

Угљени хидрати као ексципијенси

- Услед редукције угљених хидрата долази до превођења амидне групе у кетоамино групе и настанка смеђе боје производа. Због тога се као стабилизатори и средства за подешавање тоничности користе угљени хидрати који се не редукују.
- Угљени хидрати се додају и у биофармацеутике непосредно пре лиофилизације, као средства за допуњавање са циљем да обезбеде физичку масу за “колач” (енгл. *sake*) који настаје сушењем.

Полихидроксилни алкохоли као ексципијенси

- Полихидроксилни алкохоли се користе за стабилизацију протеина, било да се они формулишу у облику раствора или лиофилизата, јер смањују ризик од денатурације. Најчешће коришћени су: циклодекстрини, манитол, сорбитол, глицерол, ксилитол и инозитол.
- Полихидроксилни алкохоли стабилизују протеине у раствору директно. Глицерол омогућава паковање молекула воде око протеина, што резултује селективним растварањем протеина и њиховом стабилизацијом. Циклодекстрин спречава агрегацију протеина.

Полихидроксилни алкохоли као ексципијенси

- Стабилизација протеина полихидроксилним алкохолима је осмотски регулисана. Заправо се сматра да ови ексципијенси појачавају и фаворизују интеракцију растварача са протеином тј. промовишу хидратацију протеина. Сам алкохол се не налази на површини (већ је „искључен“), и омогућава да протеин буде на површини и да лакше интерагује са молекулима воде. Међутим, при већим концентрацијама, ови ексципијенси нису инертни и могу утицати на структурну стабилност, чак и евентуално изазвати денатурацију протеина. У неким случајевима постоји и ризик од повећаног самоудруживања протеинских молекула.

Сурфактанти као ексципијенси

- Сурфактанти (нејонски и анјонски) се често користе за стабилизацију протеинских производа. Протеини имају тенденцију да се накопљају на површинама између фаза (гас-течна или течно-течна) што повећава могућност денатурације. Додатком сурфактаната смањује се површински напон између фаза и повећава растворљивост протеина у воденом раствору, што помаже да се смањи денатурација протеина на површинама између фаза. У сврху повећања растворљивости негликозилираног IL-2 се користи сурфактант натријум додецилсулфат (SDS).
- Површински активне супстанце (РАМ) се користе за спречавање:
 - Адсорпције;
 - Агрегације (изазване мућкањем, замрзавањем и отапањем, као и агрегације изазване уређајима за испоруку);
 - Преципитације;
 - Денатурације услед смрзавања и отапања (РАМ су мање ефикасне у заштити од термички изазване денатурације.)

Сурфактанти као ексципијенси

- Најчешће коришћене РАМ за формулацију биофармацеутика су:
 - полксамер 407, полксамер 188,
 - полисорбат 80, полисорбат 20,
 - октоксинол-9, полиоксиетилен-(23) лаурил алкохол,
 - полиоксиетилен-(20) олеил алкохол,
 - натријум лаурил сулфат.
- Од посебне важности је одабрати добру концентрацију РАМ, јер њихова концентрација директно утиче на агрегацију протеина. Веће концентрације површински активних супстанци могу дестабилизovati протеински производ, међутим када се довољно разблаже стабилизују поједине протеине. На пример, полисорбати се најчешће користе у опсегу концентрација од 0,001–0,1% (v/v).

Сурфактанти као ексципијенси

- Одговарајућа концентрација сурфактанта бира се на основу експерименталних резултата добијених из студија излагања протеина стресу (замрзавање-одмрзавање, мућкање, транспорт, итд.) при различитим концентрацијама сурфактанта, при чему се прате и анализирају честице и агрегати. Такође, јако је важно да се сурфактант у процесу производње додаје после ултрафилтрације-дијафилтрације, а пре корака замрзавања, јер штити протеин од ледене воде.
- С обзиром да се полисорбати разграђују деамидацијом и хидролизом, могу индуковати продукцију реактивних кисеоничних врста попут пероксида који може хемијски деградирати протеин од интереса. Због ових недостатака полисорбата као сурфактанти се у протеинским производима данас чешће користе полуксамери.

Полимери као ексципијенси

- Полимери се додају у биофармацевтике како би спречили агрегацију и као криостабилизатори. Најчешће коришћени полимери у биофармацевтицима су: полиетилен гликол (PEG), декстран и поливинилпиролidon (PVP). Ниске концентрације PVP се са успехом користе за инхибицију агрегације моноклонских антитела. Са друге стране концентрације PVP више од 1% појачавају агрегацију моноклонских антитела.
- Декстран се најчешће користи у лиофилизатима као криостабилизатор, тј. супстанца која ублажава температурни шок.

Јонска једињења као ексципијенси

- Јонска једињења као што су соли и пуфери ступају у неспецифичне или специфичне интеракције са протеинским производом. У зависности од врсте интеракција, соли могу:
 - повећати стабилност при променама температуре;
 - повећати растворљивост;
 - смањити обим агрегације;
 - служити за подешавање тоничности раствора протеина.
- Међутим, потребан је опрез код додатка соли, јер се протеини денатуришу при високим концентрацијама соли. Ефекти јона на протеине последица су сложених јон-протеин и јон-растварач интеракција. Управо због тога је тешко унапред предвидети ефекте соли на стабилност и активност одређеног биофармацеутика.

Јонска једињења као ексципијенси

- Избор соли би требало да се заснива на претходним примерима и експерименталним проценама утицаја одређене соли на одређени протеин.
- Најчешће коришћене соли у формулацијама биофармацеутика су: натријум сулфат, амонијум сулфат, магнезијум сулфат, натријум ацетат, натријум лактат, натријум сукцинат, натријум пропионат и калијум фосфат.
- Пуферски системи који се најчешће користе у биотехнолошким формулацијама су фосфатни, цитратни и ацетатни.

Конзерванси

- Када је протеински производ спакован у амбалажу за вишекратну употребу то значајно повећава ризик од контаминације препарата микроорганизмима што захтева да се у формулацију дода и конзерванс који ће инхибирати раст микроорганизама, тј. деловати бактериостатски.
- Конзерванси у биофармацеутским формулацијама морају бити ефикасни (тј. широког спектра и испољавати довољну токсичност), хемијски и физички стабилни и изазивати минималне штетне ефекте на терапијски протеин.
- Најчешће коришћени конзерванси у формулацији биофармацеутика су фенилмеркури-нитрат, тимеросал и *p*-хидроксибензоева киселина, фенол, *m*-крезол, хлоро-крезол, бензил алкохол, хлоробутанол.

Средства за подешавање тониčnosti

- Биофармацеутици намењени за супкутану или интрамускуларну примену се формулишу тако да буду изотонични са хуманом плазмом како би се избегле нежељене реакције на месту примене (бол, иритација, оштећење ткива). Стога се у ове сврхе додају средства за подешавање тониčnosti.
- Најчешће коришћени агенси за подешавање тониčnosti биофармацеутика су: манитол, сорбитол, лактоза, декстроза, трехалоза, натријум хлорид и глицерол.

Остали ексципијенси

- Хелатирајући агенси и антиоксиданси се углавном користе за спречавање хемијске разградње.
- Хелатирајући агенси везују јоне метала и на тај начин спречавају разградњу протеина оксидацијом, и то најчешће у комбинацији са антиоксидансима. Најчешће коришћени хелатирајући агенси у формулацији биофармацеутика су:
 - етилендиамин-тетрасирћетна киселина (EDTA);
 - трис(хидроксиметил)аминометан (TRIS);
 - диетилентриамин-пентасирћетна киселина (DTPA);
 - хексафосфат;
 - етилендиамин-бис(2-хидроксифенил-сирћетна киселина) (EDDHA);
 - десферал.

Остали ексципијенси

- На пример, EDTA и DTPA се рутински користе у формулацијама моноклонских антитела и фактора раста у сврхе спречавања оксидације.
- Најчешће коришћени антиоксиданси у формулацији биофармацеутика су аскорбинска киселина, глутатион, ацетилцистеин, натријум бисулфит, натријум метабисулфит и монотиоглицерол.
- Липиди, масне киселине или њихови деривати користе се за стабилизацију протеина. Стабилизација масним киселинама или њиховим дериватима, посебно фосфолипидима, резултат је повезивања њихових поларних и неполарних делова са реактивним групама на протеину.

Финално пуњење производа

- Након додатка ексципијенаса добија се финални производ, који проверава сектор за контролу квалитета. Проверава се да ли добијени производ одговара спецификацијама за финални производ. Иако се примењује Добра произвођачка пракса, финални производ може садржати малу количину микроорганизама, јер у овој фази производ није стерилан. Због тога се производ пропушта кроз филтер промера 0,22 μm и на тај начин стерилише.
- Стерилисане бочице (најчешће стаклене) се пуне стерилним производом у асептичним условима ламинара, класа чистоће А. Већина корака у процесу пуњења бочица је високо аутоматизована.

Финално пуњење производа

- Након пуњења, бочица са производом се или затвара (аутоматизованим системом асептичног затварања), или се прво садржај бочице суши смрзавањем (лиофилизација), након чега следи затварање.
- Сва опрема која долази у директан контакт са производом мора бити стерилна. Такође, бочице у које се пакује финални производ морају бити претходно стерилисане аутоклавирањем или проласком бочица кроз врелу водену пару, добијену од воде за инјекције, након чега се следи стерилизација сувом топлотом и третман UV зрацима.

Лиофилизација

- Раствори протеина често не могу да задовоље захтеве за стабилност индустријски произведених фармацеутских производа (>2 године) и поред перманентног очувања хладног ланца. Велика количина воде поспешује процесе физичке и хемијске модификације протеина, те се формулишу као лиофилизати.
- Лиофилизација (сушење смрзавањем) је процес који подразумева уклањање растварача из раствора док је у смрзнутом стању. Лиофилизација је призната метода за сигурно и дуготрајно чување многих парентералних препарата. То је благ процес уклањања воде из раствора протеина, при чему се директно из смрзнутог биофармацеутика добија производ у прашкастом стању, садржај воде је до 3%.

Лиофилизација

- Уклањањем воде из биофармацеутика смањује се могућност хемијске/физичке/биолошке модификације и последичне инактивације производа.
- Лиофилизати имају дужи рок трајања у односу на производе који се налазе у облику раствора. Преко 50% биофармацеутика доступних на тржишту формулишу се у облику лиофилизата због бројних предности. Поред, претходно наведених предности у погледу стабилности, лиофилизација такође омогућава и лакше руковање производом приликом транспорта и складиштења. Међутим, лиофилизација може довести до иреверзибилног оштећења протеина уколико се не користе адекватни ексципијенси.

Леофиллзација

- Леофиллзација започиње у финалном паковању и одвија се кроз три фазе:
 - фаза смрзавања
 - фаза примарног сушења
 - фаза секундарног сушења

Фаза смрзавања

- Ова фаза започиње смањењем температуре (температура се регулише хлађењем полица на којима се налазе бочице у комори за леофиллзацију). Како се температура смањује, кристали леда почињу да се формирају и умножавају. То резултује ефикасним концентрисањем свих растворених супстанци у преосталој воденој фази, укључујући протеин и све додатне ексципијенсе (нпр. концентрација соли може порасти до нивоа који је 3 mol/l).

Фаза смрзавања

- Повећање концентрације растворене материје може убрзати хемијске реакције које могу оштетити протеине. Поред тога, услед концентрисања протеина, они долазе у ближи контакт једни са другима, настају интеракције и последично агрегација. Како се температура даље смањује неке од растворених супстанци кристалишу и уклањају се из раствора (сублимација). У неким случајевима, одређене компоненте пуфера могу кристалисати у раствору на различитим температурама, што може значајно пореметити рН вредност преосталог раствора и инактивирати протеин. Даљим снижењем температуре, густина незамрзнутог дела раствора значајно расте док молекулска активност не престане.

Фаза смрзавања

- Овај незамрзнути део раствора садржи протеин, ексципијенсе и око 50% воде. Заустављањем молекулске активности зауставља се и хемијска реактивност.
- Конзистентност овог „раствора“ се постиже када се формира стакласта структура на одговарајућој температури, означеној са T_g (g од енгл. *glass* - стакло) и она представља температуру „остакљивања“. T_g за већину протеинских раствора износи од -40° C до -60° C.
- Примарни циљ иницијалне фазе процеса лиофилизације је да се температура производа снизи испод његове T_g , и то што брже, како би се избегли претходно описани потенцијални нежељени догађаји.

Фаза смрзавања

- Ова фаза представља најкритичнији део лиофилизације. Сам процес смрзавања директно утиче на број, величину и облик формираних кристала леда. Својства кристала леда се подешавају рано у процесу смрзавања подешавањем T_g . На ова својства додатно утиче и брзина смрзавања и време потребно за потпуно очвршћавање. Све ово директно утиче и на особине и квалитет биофармацеутика као што су морфологија, униформност производа, физичко стање, садржај заостале влаге и време реконституције, а такође и на наставак лиофилизације, примарно и секундарно сушење.

Фаза примарног сушења

- Наредна фаза лиофилизације је фаза примарног сушења и подразумева примену вакуума. Када се вакуум успостави, температура расте до пар степени изнад 0°C , што доводи до сублимације насталих водених кристала при чему производ остаје у облику прашкастог „колача“. Током ове фазе вода из чврстог стања (лед) прелази у водену пару, не пролазећи кроз течно стање.
- У почетку се притисак у комори за сушење значајно смањује, а температура полица постепено повећава. Оптимални притисак у фази примарног сушења је 0,1 - 0,2 mbar, како би се убрзао процес сублимације. Међутим, одабир оптималног притиска зависи од особина терапијског протеина.

Фаза примарног сушења

- Избор температуре полице за формулацију одређеног терапијског протеина зависи од T_g (температуре „остакљивања“) и T_c (температуре колапса) или највише потенцијалне температуре сушења која неће индуковати топљење или колапс производа.
- По завршетку ове фазе, производ још увек може да садржи око 15 – 20% несмрзнуте воде, која се затим уклања током фазе секундарног сушења. Примарно сушење може трајати и до неколико дана, за разлику од секундарног сушења које траје пар сати. Стога је развој лиофилизације сада усмерен на оптимизацију тј. скраћивање фазе примарног сушења подешавањем температуре полице и притиска у комори, а да се при том не утиче на квалитет производа.

Фаза секундарног сушења

- Потом следи фаза секундарног сушења, током које се уклањају последњи трагови воде лаганим загревањем. Током секундарног сушења температура полице се додатно повећава, док је притисак константан, а у одређеним случајевима и нижи у односу на фазу примарног сушења. Препорука је да се на почетку секундарног сушења температура полице постепено повећава (тј. за аморфне производе: $0,1 - 0,15 \text{ }^{\circ}\text{C/min}$; за кристалне производе: $0,3 - 0,4 \text{ }^{\circ}\text{C/min}$), како би се избегао колапс терапијског протеина. Међутим, формулација на температурама изнад $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ и трајање ове фазе дуже од 6 часова се не препоручује. Циљ је да на крају процеса сушења заостала влага у лиофилизату буде мања од 1%.
- Непосредно након пуњења бочица (пре почетка лиофилизације) гумени чепови се делимично утискују у отвор бочица, тако да не спречавају излазак водене паре из бочице током лиофилизације.

Фаза секундарног сушења

- Након што се заврши процес лиофилизације (најчешће траје 3 дана или дуже), полице на којима се налазе бочице се померају на горе. Гумени чепови, који су били делимично утиснути у отвор бочице, чим дођу у контакт са дном полице која се налази директно изнад њих, у потпуности затварају бочицу. Комора за сушење код процеса лиофилизације је повезана са чистом собом, што олакшава директан трансфер бочица са производом у комору. Коморе за сушење имају неколико редова полица, а на сваку од полица може са сместити неколико стотина бочица. Ове полице су повезане са системом цеви који омогућава њихово хлађење и грејање.
- Након што се производи изнесу из коморе, комора се затвара и стерилише топлотом (користећи сопствени механизам коморе за загревање), након чега је спремна за нови циклус лиофилизације.

Ексципијенси у лиофилизатима

- Ексципијенси не утичу само на стабилност протеина и других биолошких лекова, већ одређују и одговарајуће радне параметре у процесу лиофилизације. Према томе ексципијенси су кључни за развој исплативих операција сушења смрзавањем помоћу којих се добијају чврсти облици терапијског протеина одговарајућег изгледа и својстава.

Криопротектанти

- Криопротектанти се додају у производ да би се смањила инактивација одређених врста протеина током процеса лиофилизације. Најчешће коришћени криопротектанти су угљени хидрати (глукоза, сукроза), протеини (HSA) и аминокиселине (лизин, аргинин или глутаминска киселина). У неким случајевима као криопротектанти се могу користити полихидроксилни алкохоли.

Ексципијенси у лиофилизатима

Модификатори температурног колапса

- Леофилизација аморфног материјала захтева да се температура примарне фазе сушења одржава испод температуре колапса протеина. Међутим, неки ексципијенси у аморфном стању имају веома ниску температуру колапса, (T_c) чиме се трајање фазе примарног сушења значајно пролонгира. У таквим случајевима се користе модификатори температурног колапса, који померају укупну температуру колапса (због њихових високих индивидуалних T_c), и на тај начин скраћују фазу примарног сушења, без угрожавања квалитета производа. Најчешће коришћени модификатори температурног колапса су декстран, албумин, желатин и хидроксиетил скроб.

Ексципијенси у лиофилизатима

Средства за допуњавање

- Средства за допуњавање су често неопходна у лиофилизованим формулацијама како би се добила адекватна структура колача, механички довољно јака да не подлеже температурном колапсу и/или еутектичком топљењу.
- Ако се колач механички распадне, не само да ће бити естетски неприхватљив, већ ће и садржати доста заостале воде и његова реконституција ће бити отежана. Овај тип ексципијенаса се користи за потентне лекове у ниским дозама, који немају довољну масу да обезбеде адекватну структуру колача.
- Средства за допуњавање физички формирају структуру колача, и то током корака сушења који следи након фазе смрзавања, током којег средство за повећање масе кристалише око кристала леда.
- Последишно, формира се веома порозна структура колача кроз коју вода може сублимовати током сушења. Најчешће се као средства за допуњавање користе манитол, глукоза и глицин.

Ексципијенси у лиофилизатима

Антиоксиданси

- Антиоксиданси се такође додају лиофилизатима, при чему је важно да буду стабилни на рН вредности формулације. Најчешће се користе аскорбинска киселина, натријум-сулфит и селен-сулфат.

Конзерванаси

- Додавање конзерванаса лиофилизованим производима најчешће није неопходно, и разматра се само у случају вишедозних паковања.

Ексципијенси у лиофилизатима

Пуфери

- У лиофилизатима рН вредност није од великог значаја. Међутим, рН вредност треба одржавати у течним формулацијама пре сушења смрзавањем, током сушења смрзавањем и након реконституције. Већина лиофилизованих протеинских лекова на тржишту је формулисана у опсегу рН вредности 4 - 8.
- Пуферски агенси не би требало да буду испарљиви или да показују промене рН вредности након смрзавања. Нпр. сирћетна киселина сублимује током сушења смрзавањем, што за резултат има, присуство ниже концентрације пуфера након лиофилизације, што може изазвати варијабилност рН вредности и смањен капацитет пуфера реконституисаног лека.
- Пуфери који не сублимују под вакуумом, попут хистидина и TRIS пуфера, су пожељнији у односу на ацетатни пуфер.

Ексципијенси у лиофилизатима

Корастварачи

- Вода је најчешће коришћени растварач за лиофилизацију. Међутим, органски растварачи се понекад користе како би се повећала брзина примарног сушења повећањем брзине сублимације и на тај начин побољшала и стабилност производа, смањило време реконституције лека побољшањем влажења или растворљивости лека. Пошто лиофилизација функционише по принципу различитих притисака на којим испаравају супстанце, неопходно је да ексципијенси имају особину испаравања при ниским притисцима, како би се њихов губитак (испаравање) током процеса лиофилизације свео на минимум.

Ексципијенси у лиофилизатима

- Управо због тога, корастварачи се могу додавати као ексципијенси јер испаравају при високим притисцима, тако да се брже уклањају током процеса сушења и на тај начин се убрзава процес лиофилизације. Најчешће коришћен корастварач у лиофилизатима је терц-бутил алкохол, а поред тога користе се и изопропил алкохол, етанол, глицерол, дихлорметан и ацетон. Терц-бутил алкохол модификује кристализацију леда и промовише сублимацију, чиме се смањује трајање фазе примарног сушења.
- Коришћење етанола као корастварача захтева огроман пораст потрошње енергије, јер је потребна температура полице од око $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ да би се постигло замрзнуто стање, док употреба терц-бутил алкохола не захтева додатно хлађење.

Обележавање и паковање производа

- Након што се бочице напуне финалним производом и затворе, запослени у контроли квалитета одвајају одређени број бочица за тестирање, како би се упоредила усклађеност добијеног производа са спецификацијама за финални производ.
- Најважније спецификације односе се на:
 - потентност производа;
 - стерилност;
 - запремину производа;
 - одсуство ендотоксина и других потенцијално токсичних супстанци.

Обележавање и паковање производа

- Тек након што се добије потврда из контроле квалитета да производ одговара спецификацијама, производ се обележава и пакује. Ова операција је високо аутоматизована. Када је серија производа обележена и спакована, контрола квалитета обавља нову проверу како би се обезбедило да обележавање и паковање одговарају спецификацији за обележавање и паковање. Након тога, менаџер контроле квалитета издаје и потписује сертификат о спроведеној анализи. Након овог корака производ је спреман да заједно са издатим сертификатом, стигне до пацијената.

Обележавање и паковање производа

- Обележавање је веома битно, јер неадекватно обележавање представља најчешћи разлог за повлачење производа са тржишта. До грешке може доћи релативно лако, нарочито уколико произвођач производи више различитих производа или пак један исти производ у неколико различитих доза.
- На етикети најчешће се налазе следеће информације:
 - назив и јачина/потентност производа;
 - серијски број производа;
 - датум производње и датум истека рока;
 - услови чувања.
- Додатне информације су:
 - назив произвођача;
 - листа ексципијенаса;
 - кратак опис правилне употребе производа.