

Biološki lekovi: farmaceutsko-tehnološke specifičnosti

Snežana Savić*, Jela Milić

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija

Kratak sadržaj

Polje farmaceutske biotehnologije razvija se izuzetno velikom brzinom. Za one koji rade u oblasti farmacije i farmaceutskih nauka potpuno nove tehnike i proizvodi kontinuirano dospevaju na tržište ili se nalaze u fazi razvoja, uz gotovo imperativni zahtev za dodatnim obrazovanjem, budući da biofarmaceutici nastaju kao plod multidisciplinarnog nastupa više nauka: molekularne biologije, molekularne genetike, bioinženjeringa, hemije proteina, kao i niza farmaceutskih nauka, među kojima u razvoju formulacije i proizvodnji važno mesto pripada farmaceutskoj tehnologiji. Najveći broj biofarmaceutika primenjuje se u obliku parenteralnih preparata zbog velike osetljivosti proteina (rastvori za injekcije, koncentracije za infuzije, liofilizirani praškovi koje treba rekonstituisati). Kako njihova stabilnost, biološka aktivnost i farmakološki efekti zavise od primarne, sekundarne, tercijarne i kvaternerne strukture, cilj razvoja formulacije parenteralnih proizvoda jeste da se dodatkom pogodnih ekscipijenasa i izborom pravilnog postupka proizvodnje (sterilizacija) očuvaju struktura, stabilnost i time aktivnost leka. Izuzetno je važno znati pod kojim uslovima treba čuvati ovu osetljivu grupu lekova i kako rukovati njima.

Ključne reči: biofarmaceutik, proizvodi rDNK tehnologije, monoklonska antitela, formulacija, ekscipijens, liofilizat, hladni lanac.

* Autor za korespondenciju: snexs@pharmacy.bg.ac.rs

Uvod

Termin *biotehnologija* odnosi se na bilo koju tehniku koja koristi žive organizme (npr. mikroorganizme) u proizvodnji ili modifikaciji proizvoda. Klasičan primer biotehnoloških lekova su proteini dobijeni tehnologijom rekombinantne DNK (**rDNK tehnologija**). Međutim, biotehnologija danas obuhvata i upotrebu kultura tkiva, živih ćelija, ili ćelijskih enzima koji se koriste pri izradi/proizvodnji definisanog proizvoda. Tehnologija rDNK i tehnologija dobijanja monoklonskih antitela - Mabs (**hibridoma tehnologija**) obezbedile su u prethodne tri decenije velike mogućnosti u razvoju novih lekova (biofarmaceutika, biotehnoloških odnosno bioloških lekova), kao i inovativne pristupe u dijagnozi, tretmanu i prevenciji teških oboljenja.

Danas, biotehnološki proizvodi/biofarmaceutici nastavljaju da ostvaruju sve veći udeo na tržištu lekova i vrše izražen uticaj na farmaceutsku praksu (1, 2). Na međunarodnom kongresu,

8th *World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, održanom marta 2012. jedan od vodećih istraživača u oblasti farmaceutske biotehnologije, dr Garry Walsh, saopštio je sledeće podatke, koji se, s obzirom na brzinu razvoja novih biofarmaceutika, mogu prihvatiti kao novi: na globalnom nivou ukupno je 215 biofarmaceutika odobreno za humanu primenu; godišnja zarada koja se ostvaruje od prodaje ovih lekova, prema informaciji iz 2010. godine, iznosila je 107 mld. dolara; u opticaju je 210 novih aktivnih farmaceutskih supstanci (*active pharmaceutical ingredient*, API) iz ove grupe; neki podaci ukazuju na činjenicu da se oko 2000 novih biofarmaceutika nalazi u različitim fazama razvoja; 50 Mabs (28 potpuno novih molekula) i 30 proteinskih lekova nalazi se u fazi III kliničkih ispitivanja; u periodu 2006-2011. godine odobreno je 14 biološki sličnih lekova (eng. *biosimilars*), i 32 nova biofarmaceutika, od čega 14 reformulisanih proizvoda (3). Ove brojke mogu se smatrati respektivnim, a u prilog potvrdi da postoji potreba za poznavanjem svih aspekata biofarmaceutika od strane farmaceuta ide i činjenica da su još u Šestoj evropskoj farmakopeji (2008. godine) svoje mesto našle opšte monografije dve najveće grupe biofarmaceutika: proizvodi dobijeni rDNK tehnologijom i monoklonska antitela. Ove monografije su proširene u novom sedmom izdanju Ph. Eur. (2011. godine) (4, 5).

Farmakopejski status biofarmaceutika: definicije, zahtevi za kvalitet i smernice za proizvodnju

Opšta monografija **Proizvoda rekombinantne DNK tehnologije** data u Ph. Eur. 7 (5) (lat. *Producta ab arte ADN recombinandorum*) daje generalne smernice i postavlja zahteve za razvoj i proizvodnju ovih proizvoda. U uvodnom delu naglašava se da se monografija ne odnosi na modifikovane žive organizme koji se primenjuju direktno kod

ljudi ili životinja, kao što su npr. žive vakcine (koje u širem smislu spadaju u biotehnoške proizvode). Prema monografiji, proizvodi rDNK tehnologije definišu se kao proizvodi dobijeni genetskom modifikacijom u kojoj se DNK kodirana za dati proizvod uvodi posredstvom bakterijskog plazmida ili viralnog vektora u pogodan mikroorganizam ili ćelijsku liniju, u kojoj potom dolazi do ekspresije kodirane DNK i prevođenja odgovarajuće šifre (translacija) u željeni protein. Slede složeni postupci ekstrakcije i prečišćavanja, kojima se protein izdvaja u oblik koji se može koristiti za formulaciju/dobijanje finalnog biofarmaceutika/biotehnoškog farmaceutskog proizvoda. Ćelijska linija ili mikroorganizam u koji se insertuje vektor sa šifrom za protein od interesa, označava se kao ćelija-domaćin, a stabilna veza ovo dvoje u proizvodnom procesu kao **domaćin-vektor sistem**. Proizvodnja rekombinantnih proteina bazirana je na primeni validiranih „*seed-lot*” sistema (matična šarža) primenom domaćin-vektor kombinacije, za koju se pokazalo da ispunjava zahteve regulatornih tela. „*Seed-lot*” sistem koristi tzv. **banku matičnih ćelija** (eng. *master cell bank*) i tzv. **banku radnih ćelija** (eng. *working cell bank*) koje su dobijene iz matične kombinacije domaćin-vektor. Za svaki određeni proizvod (rekombinantni peptid ili protein) neophodno je dati detaljan opis pojedinih koraka kultivacije, ekstrakcije i prečišćavanja, odnosno neophodno je sprovesti niz ispitivanja koja bi što bolje definisala svaku proizvodnu šaržu.

Određivanje pogodnosti kombinacije domaćin-vektor i validacija „*seed-lot*” sistema uključuje niz elemenata od kojih su neki:

- vezano za **fazu kloniranja i ekspresije** - karakterizacija ćelije domaćina, uključujući izvor dobijanja, fenotip i genotip i procenu medijuma za kultivaciju ćelija; neophodno je dokumentovanje strategije kloniranja gena i karakterizacija rekombinantnog vektora, uključujući poreklo i karakterizaciju gena, analizu nukleotidne sekvence kloniranog gena, kontrolu bočnih regiona ekspresionog vektora...
- u sklopu karakterizacije domaćin-vektor sistema potrebno je definisati mehanizme transfera vektora u ćelije domaćina, broj kopija, fizičko stanje i stabilnost vektora unutar ćelije domaćina, kao i mere koje se koriste da promovišu i kontrolišu ekspresiju.

Kada su u pitanju sistemi banaka ćelija, „*master cell bank*” je homogena suspenzija originalnih ćelija koje su već transformisane ekspresionim vektorom koji sadrži željeni gen, distribuirane u jednakim zapreminama u pojedinačna pakovanja (najčešće ampule/bočice od stakla visokog kvaliteta) u tečnom azotu. U nekim slučajevima može biti neophodno da se ustanove odvojene *master* banke ćelija za ekspresioni vektor i ćelije domaćina. „*Working cell bank*” je takođe homogena suspenzija ćelijskog materijala koji se dobija iz banke matičnih ćelija i distribuira u jednakim volumenima u pojedinačna pakovanja u tečnom azotu. Kod oba tipa banaka ćelija, svi kontejneri tretiraju se na identičan način tokom čuvanja i kada se jednom

otvore, kontejneri se više ne vraćaju u skladište. Ovakva banka ćelija može se koristiti za proizvodnju kultura ćelija u ograničenom broju koraka, odnosno udvajanja populacija ćelija, i taj broj se tokom proizvodnog procesa ne sme prekoračiti, ili za kontinuirani/neprekidni proizvodni proces, kod koga broj koraka, odnosno udvajanja populacija ćelija nije ograničen. Kriterijum za određivanje momenta ubiranja/žetve (eng. *harvesting*) proizvoda, odnosno okončanje proizvodnog procesa, treba da bude definisan od strane proizvođača.

Nepohodno je konstantno praćenje kvaliteta kulture ćelija: informacije o molekularnom integritetu gena, koje se izražavaju kroz karakteristike fenotipa i genotipa ćelija domaćina. **Validacija banaka ćelija** uključuje: praćenje stabilnosti merenjem vijabilnosti i vremena zadržavanja vektora; identifikaciju ćelija preko fenotipskih karakteristika; kada je pogodno, pružanje dokaza da su banke ćelija čiste - bez prisustva potencijalno onkogenih ili infektivnih agenasa (viralni, bakterijski, plesni, mikoplazme); posebna pažnja posvećuje se virusnoj kontaminaciji, npr. neke ćelijske linije sadrže endogene viruse (retroviruse), koji se ne mogu lako eliminisati...

Kada je u pitanju kontrola ćelija, Ph. Eur. 7 (5) naglašava potrebu za potpunim dokumentovanjem porekla, oblika, uslova čuvanja, upotrebe i stabilnosti pri predviđenoj brzini upotrebe za sve banke ćelija.

Proizvodni proces mora biti validiran, naročito **koraci ekstrakcije i prečišćavanja** u kojima se uklanjaju i/ili inaktiviraju kontaminirajuće supstance poreklom iz ćelija domaćina ili medijuma za kultivaciju, uključujući virusne čestice, proteine, nukleinske kiseline i ekscipijense. Validacione studije sprovode se u cilju potvrde da dati proizvodni proces rutinski zadovoljava sledeće kriterijume:

- isključivanje spoljnih agenasa iz proizvoda, npr. virusa, sa utvrđenim fizičko-hemijskim procedurama koje treba sprovesti, uz utvrđivanje kapaciteta za smanjenje nivoa kontaminiranosti proizvoda pri svakom koraku prečišćavanja;
- adekvatno uklanjanje vektora, ćelija-domaćina, medijuma za kultivaciju i kontaminanata iz proizvoda;
- smanjenje sadržaja proteina animalnog porekla koji se mogu odrediti imunohemijskim metodama;
- održavanje unutar zadatih granica prinosa proizvoda iz kulture (specifikacija proizvoda)...

Karakterizacija supstance sprovodi se procenom čistoće, potentnosti, stabilnosti finalnog „*bulk*” proizvoda primenom niza hemijskih, fizičkih, imunohemijskih i bioloških testova. Pre puštanja u promet, svaka šarža proizvoda ispituje se od strane proizvođača u pogledu identiteta i stepena čistoće primenom pogodnih metoda. Takođe, sprovode se pogodni testovi za potvrdu konzistentnosti proizvodnje, posebno faze prečišćavanja. U cilju međuprocenke kontrole i testiranja finalnog proizvoda potrebno je

proceniti brojne parametre: aminokiselinski sastav, molekulsku masu, analizu hibridizacije DNK, tehnike za procenu sekvenci...

Kada su u pitanju **Monoklonska antitela za humanu upotrebu** (lat. *Anticorpora monoclonalia ad usumhumanum*) Ph. Eur. 7 (5) ih definiše kao imunoglobuline ili fragmente imunoglobulina, npr. F(ab')₂, sa definisanom specifičnošću, proizvedene iz jednog klona ćelija. Oni mogu biti konjugovani sa drugim supstancama, uključujući radiobeleživače. Mogu se dobijati iz imortalizovanih B limfocita koji su klonirani i produkovani kao kontinuirane ćelijske linije ili iz ćelijskih linija koje su dobijene rDNK tehnologijom. Trenutno raspoloživa rDNK-inženjerizovana antitela uključuju sledeće grupe:

- **himerna monoklonska antitela** – varijabilni domeni teškog i lakog lanca humanog antitela zamenjeni su onim od nehumanih vrsta (npr. mišjeg porekla), koja poseduju željene antigene specifičnosti;
- **humanizovana monoklonska antitela** - tri kratke hipervarijabilne sekvence (komplement određujući regioni, CDR regioni) nehumanih varijabilnih domena za svaki lanac inženjerizovani su u varijabilni domen humanog antitela; druge promene na sekvenci mogu se načiniti da bi se poboljšala svojstva vezivanja antigena;
- **rekombinantna humana monoklonska antitela** –varijabilni domeni teškog i lakog lanca humanog antitela kombinuju se sa konstantnim regionom humanog antitela. Monoklonska antitela dobijena iz ćelijskih linija modifikovanih rDNK tehnologijom treba da su u saglasnosti sa zahtevima iz monografije proizvoda rDNK tehnologije. Ova monografija primenjuje se na monoklonska antitela za terapijsku i profilaktičku upotrebu i za primenu kao *in vivo* dijagnostika; ne odnosi se na monoklonska antitela koja se koriste kao reagensi u proizvodnji medicinskih proizvoda.

Kao i u slučaju proizvoda rDNK tehnologije i u ovoj monografiji daje se prikaz generalnih zahteva za proizvodnju Mabs i validaciju procesa proizvodnje, sa posebnim osvrtom na metode i kriterijume za ekstrakciju, fazu prečišćavanja i ubiranje (žetvu) finalnog proizvoda (aktivne supstance – monoklonskog antitela), te njegovu karakterizaciju. Proizvod se karakteriše u cilju dobijanja potpunih informacija o strukturnom integritetu, izotipu, aminokiselinskoj sekvenci, sekundarnoj strukturi, ugljenohidratnim jedinicama, disulfidnim vezama, konformaciji, specifičnosti, afinitetu, specifičnoj biološkoj aktivnosti i heterogenosti (karakterizacija izoformi). U ovom cilju koristi se baterija pogodnih analitičkih tehnika uključujući hemijske, fizičke, imunohemijske i biološke testove (npr. mapiranje peptida, sekvencioniranje aminokiselina na N- i C-terminusu, masena spektrometrija, hromatografija, elektroforetske i spektroskopske tehnike). Izvode se i dodatni testovi da bi se dobile informacije o unakrsnoj reaktivnosti sa humanim tkivima.

U ovoj monografiji daju se i zahtevi za kvalitet finalnog „*bulk*” proizvoda pripremljenog iz jedne ili više šarži prečišćenog monoklonskog antitela. Pogodni stabilizatori i drugi ekscipijensi mogu se dodati tokom izrade finalnog „*bulk*” proizvoda. Samo finalni „*bulk*” koji odgovara sledećim zahtevima za kvalitet može da posluži za pripremu finalne šarže proizvoda koji se može koristiti u formulaciji finalnog biofarmaceutika namenjenog terapiji ili profilaksi određenih oboljenja:

- sterilnost, odnosno ispitivanje sterilnosti;
- odustvo bakterijskih endotoksina (treba da odgovara limitima ustanovljenim za svaki pojedinačni proizvod);
- prisustvo nečistoća koje potiču od proizvodnog procesa.

Finalna šarža distribuira se pod aseptičnim uslovima u sterilne kontejnere, koji se potom zatvaraju da se spreči kontaminacija. Obično su u obliku bistrih do slabo opalescentnih, bezbojnih ili slabo žućkastih tečnosti bez prisustva vidljivih čestica. Liofilizovani proizvodi dobijeni sušenjem smrzavanjem (eng. *freeze-dried*) najčešće su beli do slabo žuti praškovi ili su u obliku čvrste friabilne mase. Po rekonstituciji oni pokazuju iste karakteristike kao tečni preparati.

Identifikacija se obavlja pogodnim validiranim metodama poređenjem proizvoda sa referentnim preparatom. Testovi koji se sprovode ispituju izgled, rastvorljivost, pH proizvoda, osmolalnost, volumen punjenja, sadržaj ukupnih proteina, distribuciju molekula po veličini, identitet molekula i integritet strukture, stepen čistoće, sadržaj stabilizatora, sadržaj vode/vlage u liofilizovanim proizvodima, sterilnost, odsustvo/prisustvo bakterijskih endotoksina...

Naglašava se da se proizvod mora čuvati u skladu sa deklaracijom, a rok upotrebe se računa od datuma sterilne filtracije, datuma punjenja (za tečne preparate) ili datuma sušenja smrzavanjem/lioofilizacije (gde je primenjivo).

Proizvod se obeležava na sledeći način:

- navodi se broj internacionalnih jedinica po mililitru, gde je primenjivo;
- sadržaj proteina po kontejneru;
- sadržaj monoklonskog antitela u kontejneru;
- kod tečnih preparata, volumen preparata u kontejneru;
- kod liofilizovanog proizvoda, navodi se naziv i zapremina vehikuluma za rekonstituciju;
- vreme za koje se monoklonsko antitelo može upotrebiti nakon rekonstitucije;
- i razblaženje koje se mora primeniti pre upotrebe proizvoda, gde je primenjivo (5).

Formulacija biofarmaceutika

Prema nekim autorima, a posebno kada se razmatra aspekt formulacije, biofarmaceutici se definišu kao farmaceutski proizvodi koji sadrže (gliko)proteine i/ili nukleinske kiseline (6, 7). Stoga su stabilnost, biološka i farmakološka aktivnost proteina i peptida, odnosno njihovo očuvanje, jedan od ključnih ciljeva formulacije biofarmaceutika. Proteini i peptidi se mogu lako modifikovati različitim fizičkim i hemijskim agensima. Tabela I daje pregled glavnih puteva degradacije proteina i peptida, onih čije se razmatranje mora uzeti u obzir prilikom razvoja formulacije biofarmaceutika (8).

Efekti degradacije mogu biti veoma kompleksni: gubitak biološke aktivnosti, promene u farmakokinetici leka, njegovoj farmakodinamiji, toksičnosti, biodistribuciji, putevima eliminacije, antigenosti, imunogenosti... (8). Realno je broj puteva i mogućnosti za degradaciju proteina/peptida daleko veći, pošto su neki u cilju postizanja biološke aktivnosti hemijski modifikovani, odnosno glikozilovani ili fosforilovani, na primer. Ove neproteinske modifikacije mogu takođe značajno da utiču na karakteristike leka, npr. glikozilacija često kontroliše cirkulišuće polu-vreme, mehanizam eliminacije leka i imunogenost, dok fosforilacija u mnogim slučajevima doprinosi biološkoj aktivnosti i specifičnom delovanju, te bi formulacija trebalo da štiti i ove modifikacije. Ne postoje opšte smernice za rutinsko predviđanje efekata pojedinih degradacionih promena; uticaj sličnih promena je široko varijabilan u odnosu na karakteristike različitih proteinskih lekova. Sa regulatornog aspekta, degradacioni proizvodi se generalno razmatraju kao nečistoće i sadržani su u specifikaciji proizvoda. One bi trebalo da reflektuju klinički sigurne nivoe nečistoća, što treba da bude praćeno pouzdanim analitičkim tehnikama ili čak kliničkim studijama (8, 9).

Tabela I Glavi putevi degradacije proteina i peptida (8)

Table I Main degradation pathways of proteins and peptides (8)

Putevi degradacije	
Fizički	Hemijski
Denaturacija (δT , pH)	Oksidacija (O_2 , h * v), npr. Met, Cys, His, Trp,
Nekovalentno agregiranje	Deamidacija (δT , pH), npr. Asn, Gin
Precipitacija	Cepanje peptida (δT), npr. Asp-X
Adsorpcija	Disulfidne izmene (pH), Cys
	Beta-eliminacija (pH), npr. Ser, Thr, Cys, Lys
	Formiranje disulfida (pH, O_2) Cys
	Kovalentno agregiranje
	Ciklizacija (pH), npr. Asp, Glu

Kao što je navedeno u Tabeli I, nekoliko je ključnih inicijatora nestabilnosti proteina/peptida, npr. prisustvo kiseonika, velike promene pH vrednosti formulacije, povišena temperatura... Mada su neki pristupi češći od drugih, npr. primena površinski aktivnih materija (PAM)/surfaktanata da se smanji agregacija molekula, ili primena antioksidanasa (askorbinska kiselina) da se uspori oksidacija proteina, nema generalne strategije za stabilizaciju koja bi bila model za formulaciju svakog biofarmaceutika. Proizvođači, takođe, moraju da dokumentuju da proizvodni proces može da rezultuje reproduktivnim kvalitetom primenom adekvatne validacije, uz niz visokospecifičnih analitičkih tehnika (8, 10).

Putevi primene proteina i peptida

Od samog početka terapijske primene proteina i peptida, parenteralne formulacije su bile od ključne važnosti, kao npr. supkutana (*sc*) primena insulina. Ovo je posledica niza aspekata koji se mogu svrstati u tri različite grupe (8):

- suboptimalne fizičko-hemijske karakteristike ovih lekova za apsorpciju kroz biološke membrane;
- nestabilnost lekova tokom neparenteralne primene;
- specifični terapijski zahtevi u odnosu na početak nastupa i trajanje dejstva biofarmaceutika.

Specifične fizičko-hemijske karakteristike proteina, kao što su velika molekulska masa (često preko 500 kDa), u mnogim slučajevima visoka hidrofilitnost, veliko naelektrisanje, uslovljavaju nemogućnost ovih lekova da lako permeiraju biološke membrane i na taj način umanjuju njihovu biološku raspoloživost. Aspekti stabilnosti mogu da igraju značajnu ulogu tokom primene, a takođe i apsorpcije. Osetljivost većine proteina na ekstremne vrednosti pH, u prvom redu jako kiseli pH u želucu, i enzimsku aktivnost u GIT-u ograničava mogućnost formulacije oralnih farmaceutskih oblika. Visoko specifični terapijski zahtevi, na primer brz nastup dejstva leka (primena insulina u kontekstu uzimanja hrane) takođe direktno utiču na izbor parenteralnog puta primene proteina/peptida kao optimalnog terapijskog rešenja. Kod nekih indikacija, s druge strane, očekuje se kontinuirana isporuka leka (npr. održavanje bazalnog nivoa insulina ili primena β -interferona u tretmanu multiple skleroze). Međutim, godinama unazad raste pritisak i sprovode se brojna istraživanja u sklopu razvoja alternativnih neparenteralnih puteva primene biofarmaceutika (proteina/peptida); u prilog tome ide mogućnost poboljšane komplijanse (pogodnosti neinvazivne primene). U to smislu, da bi se obezbedila pouzdana i bezbedna primena proteina potrebno je razviti specijalne formulacije i sisteme za isporuku leka, sa jedne strane, a takođe, u cilju kompenzacije značajno niže iskoristljivosti leka (niža biološka raspoloživost) nakon neparenteralne primene, proizvodni procesi za dobijanje proteina treba da se optimizuju što može dovesti do smanjenja troškova, i terapiju učiniti dostupnom većem broju pacijenata. Kao

najviše obećavajuće alternativne rute za neparentalnu primenu, sa najviše rezultata u dosadašnjim istraživanjima, u literaturi se pominju oralni, pulmonarni i intranazalni putevi isporuke biofarmaceutika (11). U ovom radu, s obzirom na predviđeni obim i aktuelno stanje na tržištu, biće date specifičnosti formulacija namenjenih parenteralnoj primeni biofarmaceutika.

Parenteralna primena biofarmaceutika

Naješće korišćeni vidovi parenteralne primene su intravenska (i.v.), intramuskularna (i.m.) i supkutana (s.c.). Primena proteinskog leka različitim putevima može imati izražen uticaj na njegovo farmakološko dejstvo; kada se lek primeni i.v., odmah je na raspolaganju u cirkulaciji za ispoljavanje efekta, dok je nakon i.m. i s.c. primene potrebno više vremena za postizanje odgovarajućeg nivoa u krvi (depo efekat), a usled toga, farmakokinetički profili mogu biti različiti. Takođe, mogu se javiti i razlike u antigenosti i imunogenosti leka. Trajanje i tok terapije takođe određuju preferirajuću opciju parenteralne primene leka (2, 8).

Parenteralne formulacije biofarmaceutika

Mikrobiološka razmatranja – sterilnost, viralna dekontaminacija i uklanjanje pirogena

Jasno je da parenteralne formulacije biofarmaceutika treba da budu sterilne. Generalno, proteini su osetljivi na toplotu i na druge uobičajeno primenjive metode sterilizacije; ne mogu da podnesu sterilizaciju vlažnom toplotom (autoklaviranje), gasnu sterilizaciju, ili sterilizaciju jonizujućim zračenjem, odnosno sterilizacija finalnog proizvoda nije moguća nekom od ovih metoda. Usled toga, proteinski biofarmaceutik treba da se izradi pod aseptičnim uslovima u skladu sa dobrom praksom za proizvodnju parenteralnih proizvoda pod aseptičnim uslovima (FDA dokument *Guidance for industry for Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice* (11)). Ekscipijensi i oprema tretiraju se odvojeno, autoklaviranjem ili suvom toplotom (sterilizacija suvim vrućim vazduhom na temperaturama $> 160^{\circ}\text{C}$), hemijskim tretmanom ili gama zračenjem da bi se smanjio „bioburden” (opterećenje biološkim materijalom). Filtracione tehnike se koriste za uklanjanje mikrobioloških kontaminanata, najpre prefiltracija koja uklanja mehaničke čestice i smanjuje „bioburden”, a potom finalna sterilizacija kroz membranske filtre promera pora (0,20-0,22 μm). Proizvodnja se sprovodi u čistim sobama klase čistoće A (maksimalno 100 čestica $> 0,5 \mu\text{m}$ po kubnoj stopi vazduha), sa laminarnim protokom vazduha, koji prolazi kroz HEPA (eng. *high efficiency particulate air*) filtre (2). Podrazumeva se poštovanje svih pravila dobre proizvođačke prakse za proizvodnju parenteralnih proizvoda (11).

Kako se proizvodi rDNK tehnologije dobijaju u živim ćelijama (npr. mikroorganizama), trebalo bi testirati ove organizme na prisustvo viralnih kontaminanata i preduzeti pogodne mere da se ne dogodi viralna kontaminacija (npr. ekscipijensi humanog porekla, kao što je humani serum albumin).

U cilju uklanjanja pirogena (bakterijskih endotoksina) opremu i kontejnere treba tretirati toplotnim metodama sterilizacije (temperature iznad 160°C u toku produženog perioda, npr. 30 min suva toplota na 250°C). Uklanjanje pirogena iz rDNK proizvoda poreklom iz bakterijskih izvora treba da bude integralni deo procesa proizvodnje. Jonoizmenjivačka hromatografska procedura (primena negativnog naelektrisanja pirogena) može efikasno da smanji nivo endotoksina u rastvoru. Ekscipijensi koji se koriste u formulacijama proteina trebalo bi da su bez endotoksina (eng. *endotoxin-free*). Kada se izrađuju rastvori *Voda za injekcije* (Ph. Eur. 7) treba da je sveže destilisana ili dobijena reversnom osmozom. Uklanjanje endotoksina pre punjenja u finalno pakovanje/kontejner može se postići i primenom adsorbujućih materijala sa velikom površinom i sposobnošću hidrofobnog interagovanja (2).

Ekscipijensi koji se koriste u parenteralnim formulacijama biofarmaceutika

U Tabeli II dat je pregled najčešće korišćenih grupa farmaceutskih ekscipijenasa u formulacijama parenteralnih biofarmaceutika (2).

Tabela II Komponente koje ulaze u sastav parenteralnih formulacija biofarmaceutika

Table II Components found in parenteral formulations of biopharmaceutics

Aktivna supstanca
Sredstva za poboljšanje rastvorljivosti (eng. <i>solubility enhancers</i>)
Antiagregirajuća sredstva i antiadsorbensi
Puferi
Konzervansi i antioksidansi
Lioprotektanti/sredstva za formiranje lio-kolača
Sredstva za izotonizaciju
Sistemi nosača (napredni sistemi za isporuku biofarmaceutika)

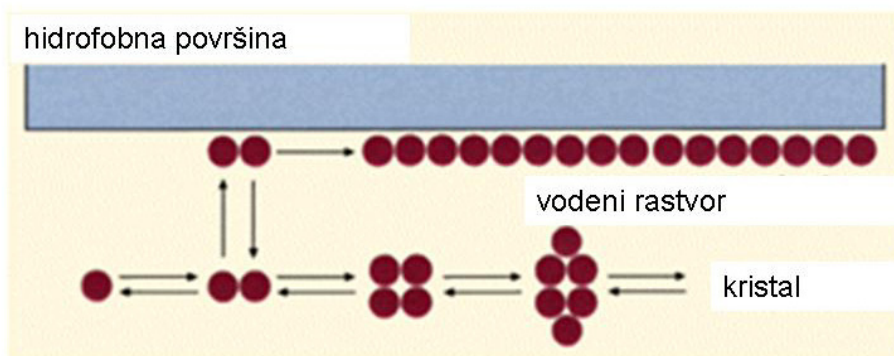
Sredstva za poboljšanje rastvorljivosti/ Solubilizatori

Proteini, posebno oni koji nisu glikozilovani, imaju tendenciju da agregiraju i precipitiraju. Pristupi kojima može da se poboljša rastvorljivost uključuju izbor odgovarajuće pH vrednosti i jonske jačine rastvora, dodatak aminokiselina (npr. arginin

ili lizin u solubilizaciji tkivnog plazminogen aktivatora, t-PA), ili surfaktanata, npr. primena natrijum-laurilsulfata u solubilizaciji glikozilovanog interleukina-2 (IL-2). Mehanizmi delovanja ovih sredstava za poboljšanje rastvorljivosti zavise od tipa inhensera (eng. *solubility enhancers*) i datog proteina i nisu potpuno razjašnjeni (2).

Anti-adsorbensi i anti-agregirajući agensi

Dodaju se da smanje adsorpciju aktivnih proteina u međufazi. Neki proteini imaju tendenciju da izlože svoja hidrofobna mesta, normalno prisutna u središtu strukture nativnog proteina, kada se nađu u međufazi (na granici dve faze) (2).



Slika 1. Reverzibilno samo-asociranje insulina, njegova adsorpcija na hidrofobnoj međufazi i ireverzibilna agregacija u adsorbovani proteinski film.

Figure 1. Reversible self-association of insulin, its adsorption to the hydrophobic interface and irreversible aggregation in the adsorbed protein film.

Ovo može biti međufaza voda/vazduh, voda/zid kontejnera, ili međufaza formirana između vodene faze i uređaja koji se koriste za primenu leka (npr. kateter, injekciona igla..).

Ovi adsorbovani, parcijalno odmotani proteinski molekuli obrazuju agregate i precipitiraju. Na Slici 1 prikazan je, kao primer, predloženi mehanizam agregacije insulina u vodenom medijumu kroz kontakt sa hidrofobnom površinom (ili voda-vazduh međufazom). Nativni insulin u rastvoru prisutan je u ravnotežnom stanju između monomernog, dimernog, tetramernog i heksamernog oblika. Relativno obilje različitih agregacionih stanja zavisi od pH, koncentracije insulina, jonske jačine i specifičnih ekscipijenasa (npr. jona Zn^{2+} i fenola). Smatra se da dimerna forma insulina adsorbuje u hidrofobnoj međufazi i postepeno nastaju veći agregati na međupovršini. Ova

adsorpcija objašnjava zašto anti-adhezivi mogu istovremeno igrati ulogu anti-agregacionih sredstava. Albumin ima jaku tendenciju da adsorbuje na određene površine i zbog toga se dodaje u relativno visokim koncentracijama (npr. 1%) u proteinske formulacije kao anti-adheziv. Albumin se kompetitivno vezuje za vezna mesta na koja bi se inače adsorbovali proteini i usled toga sprečava njihovu adheziju kombinacijom visokog afiniteta za vezivanje i visoke koncentracije (2).

Pored toga, insulin je jedan od mnogih proteina koji može da formira fibrilarne precipitate (duge štapičaste strukture prečnika 0,1 μm). Niske koncentracije fosfolipida i surfaktanata mogu da inhibiraju ovu pojavu. Izbor pogodnog pH takođe može da spreči ovaj neželjeni fenomen. Pored albumina, surfaktanti/PAM mogu takođe da spreče adheziju proteina u međufazi i precipitaciju. Molekuli PAM lako adsorbuju u hidrofobnoj međufazi preko svojih hidrofobnih/lipofilnih grupa i tako međufazu hidrofiluju izlažući svoje hidrofilne grupe ka vodenj fazi.

Puferi

Izbor pufera smatra se važnim tokom formulacije biofarmaceutika, budući da pH jako utiče na rastvorljivost i fizičko-hemijsku stabilnost proteina. Uobičajeno se koriste fosfatni, citratni i acetatni pufer. Važno je istaći da čak i kratkotrajne promene pH rastvora mogu da dovedu do agregacije proteina (npr. tokom faze smrzavanja u postupku sušenja smrzavanjem/liofilizacije kada jedna od komponenti pufera kristališe, a druga ne). Kod fosfatnog pufera, natrijum-hidrogenfosfat kristališe brže od natrijum-dihidrogenfosfata. Ovo uzrokuje izražen pad pH tokom faze smrzavanja formulacije biofarmaceutika, što se značajno odražava na stabilnost proizvoda. Neke druge puferske komponente ne kristališu, ali obrazuju amorfnе sisteme i tada su promene pH rastvora značajno manje (2).

Konzervansi, anti-oksidansi i sredstva za izotonizaciju

Metionin, cistein, triptofan, tirozin i histidin su aminokiseline koje se lako oskidišu. Proteini sa visokim sadržajem ovih aminokiselina podložni su oksidativnoj degradaciji. Zamena kiseonika primenom inertnog gasa u kontejnerima i primena antioksidanasa (npr. askorbinska kiselina) pomažu smanjenju oksidativnog stresa.

Kada su u pitanju konzervansi, oni se mogu dodavati u višedozna pakovanja određenih proteinskih formulacija (npr. benzil alkohol, fenol...).

I kod proteinskih formulacija primenjuju se generalna pravila za izotonizaciju parenteralnih preparata. Najčešće se koriste soli i rastvori mono- i disaharida. Međutim, ponekad mogu stupiti u interakcije, što se mora pažljivo razmotriti.

Stabilnost formulacija biofarmaceutika i rukovanje

Proteini se čuvaju kao 1) vodeni rastvori; 2) u liofilizovani praškovi u 3) kompaktni oblikovani liofilizati (tablete). Stabilnost rastvora proteina jako zavisi od pH, jonske jačine, temperature i prisustva stabilizatora. Veoma često rastvori proteina ne mogu da zadovolje zahteve za stabilnošću industrijski proizvedenih farmaceutskih proizvoda (> 2 godine), i pored permanentnog čuvanja u uslovima frižidera (hladni lanac). Velika količina vode promoviše procese hemijske i fizičke degradacije proteina. Ove formulacije su jeftinije, što je prihvatljivije i za industriju i za pacijente. S druge strane, čuvanje i rukovanje tečnim formulacijama je zahtevnije: potreban je hladni lanac tokom transporta, i velika pažnja zbog izraženog penjenja rastvora proteina. Proizvođač mora da osigura integritet sistema kontejner-zatvarač (bočice, napunjeni špricevi, različiti tipovi injektora...) (2, 8, 12).

S druge strane, postupak liofilizacije (sušenje smrzavanjem) formulacije proteina, mada veoma skup, može da obezbedi zadovoljavajuću stabilnost. Tokom liofilizacije iz proizvoda se uklanja voda sublimacijom, kroz sledeće tri faze: 1) faza smrzavanja; 2) korak primarnog sušenja; 3) korak sekundarnog sušenja. Međutim, sam proces može dovesti do ireverzibilnih oštećenja proteina, ukoliko se ne koriste odgovarajući ekscipijensi (Tabela III) (2).

Tabela III Ekscipijensi koji se često koriste u liofilizovanim formulacijama biofarmaceutika
Table III Typical excipients in a freeze-dried protein formulations

Sredstva za dopunjavanje: manitol/glukoza	Razlog: elegancija/prevenција gubitka proteina prilikom isparavanja formulacije (<i>*blowout prevention</i>)
Modifikatori t-kolapsa: dekstran, albumin/gelatina	Razlog: porast temperature kolapsa
Lioprotektanti: šećeri i albumini	Razlog: zaštita fizičke strukture proteina**

*Dešava se kada je u bočici prisutna mala količina čvrste faze.
**Mehanizam delovanja lioprotektanata nije potpuno jasan. Od značaja su:

1. Lioprotektanti zamenjuju vodu kao stabilišući agens.
2. Povećavaju T_g (temperaturu ostakljivanja) smeše kolač/zamrznuti sistem.
3. Lioprotektanti će apsorbovati vlagu iz zatvarača.
4. Lioprotektanti će usporiti proces sekundarnog sušenja i smanjiti mogućnost za presušenje proteina (sadržaj rezidualne vode jako nizak).

Preporuke za čuvanje i rukovanje biofarmaceuticima u kliničkim uslovima (namenjene su i farmaceutima) predstavljene su još 2003. godine (13). Njima se naglašava da neadekvatno čuvanje i rukovanje jako utiču na integritet biofarmaceutika. Regularno čuvanje i rukovanje uključuje ne samo održavanje hladnog lanca, već i izbegavanje mućkanja i izlaganja sunčevoj svetlosti i korišćenje odgovarajućih tehnika sterilizacije. Ističe se velika odgovornost bolničkog farmaceuta u održavanju, odnosno upravljanju hladnim lancem u kliničkim uslovima. Kada je u pitanju distribucija biofarmaceutika, vreme koje lek ostaje van frižidera mora da bude što je moguće kraće. Biofarmaceutici osetljivi na temperaturne promene treba da se transportuju od bolničke apoteke do odeljenja u izolatorskim tranzitnim pakovanjima. Validirana, izolatorska pakovanja treba da su na raspolaganju i pacijentima koji su na terapiji biofarmaceuticima, koje dodatno treba štititi od mućkanja i svetlosti. Pre injektovanja dati biofarmaceutik treba dovesti na sobnu temperaturu postepeno u toku vremenskog intervala specifičnog za određeni lek. Sve biofarmaceutike prisutne u apoteci treba čuvati u frižideru sa dvadesetčetvoročasovnim praćenjem temperature i alarmnim sistemom. Potrebna su jasna uputstva čije će sprovođenje osigurati održavanje hladnog lanca u čitavom sistemu transporta/prenosa leka od skladišta do pacijenta. Sva postrojenja i transportni sistemi moraju biti validirani sa istim ciljem – osiguranje integriteta hladnog lanca.

Primeri nekih biofarmaceutika

Na domaćem tržištu (14) prisutan je veći broj biofarmaceutika, bilo kao rekombinantni proteini/peptidi (biofarmaceutici I ili II generacije), ili monoklonska antitela. Neki od njih su: iz grupe eritropoetina – epoetin alfa, epoetin beta, darbepoetin alfa, epoetin zeta, metoksipolietilenglikol-epoetin beta; iz grupe faktora stimulanja kolonija (citokini) - filgrastim; iz grupe faktora koagulacije – humani faktor IX, humani faktor VIII; iz grupe interferona – interferon beta-1a i 1b, interferon alfa-2a i 2b, peginterferon alfa-2a, peginterferon alfa-2b, veliki broj različitih tipova insulina, veći broj monoklonskih antitela – omalizumab, palivizumab, tocilizumab, ustekinumab, bevacizumab, cetuksimab, adalimumab, alemtuzumab, rituksimab, infliksimab, baziliksimumab, daklizumab...

Eritropoetin (EPO) (1) je glikoprotein koji sadrži sijalinsku kiselinu i poboljšava eritropoezu stimulisanjem formiranja proeritroblasta i oslobađanjem retikulocita iz kostne srži. Sekretuju ga bubrezi u odgovoru na hipoksiju i transportuju do kostne srži u plazmu. Više nego bilo koji drugi citokin liči na endokrini hormon. *Anemija* (deficit crvenih krvnih zrnaca) je česta komplikacija kod hroničnog oštećenja bubrega, kancera, ili se javlja kao rezultat terapije kancera. Iako se takva stanja mogu rešiti transfuzijom krvi, eritropoetini mogu da tretiraju najteže oblike anemije, budući da ne održavaju masu eritrocita na nivou potrebnom za normalnu aktivnost i dobro stanje organizma.

Kako anemični pacijenti sa solidnim tumorima često imaju snižene serumske nivoe eritropoetina, korigovanje deficita eritropoetina primenom odgovarajuće terapije može biti korisno za pacijente sa kancerogenim oboljenjima, kao i kod pacijenata sa uremijom. Imajući u vidu potencijalne probleme sa transfuzijom krvi (izloženost infektivnim agensima kao što su HIV i virus hepatitisa) u svrhu terapije pomenutih oblika anemije danas se koriste genetski inženjerizovani eritropoetini, npr. epoetin alfa ili darbepoetin alfa (15, 16). **Epoetin alfa**, glikoprotein proizveden rDNK tehnologijom, sadrži 165 aminokiselina u identičnom redosledu (sekvenci) kao endogeni humani EPO. Indikacije za primenu su (14): anemija kao posledica hronične insuficijencije bubrega (bolesnici na hemodijalizi, peritoneumskoj dijalizi, ili pred dijalizom), lečenje sekundarnih anemija kod obolelih od AIDS-a, lečenje anemije kod onkoloških bolesnika na hemioterapiji preparatima platine, za prikupljanje autologne krvi za hirurške zahvate, kao i za prevenciju anemije kod novorođenčeta male telesne mase. Na tržištu je prisutan u obliku rastvora za injekciju (bočice) u jačinama: 1000 i.j./0,5 ml; 2000 i.j./0,5 ml; 10000 i.j./0,5 ml; 4000 i.j./0,4 ml i 3000 i.j./0,3 ml, ili u obliku napunjenog šprica u različitim volumenima: 0,3; 0,4; 0,5 i 1 ml. Preporuka je da se čuva u toku 18 meseci na temperaturi od 2-8°C.

EPO alfa se primenjuje intravenski ili supkutano u dozi od 50 do 100 i.j./kg telesne mase tri puta nedeljno. Naglašava se da formulacija epoetina alfa nije konzervisana, a da u njen sastav ulazi humani albumin da bi se sprečili gubici adsorbovanjem. Proizvod se ne sme zamrzavati, niti mućkati, budući da ovo denaturiše glikoprotein, koji postaje biološki neaktivan. Svaka bočica leka se primenjuje kao pojedinačna doza, i bilo koja neupotrebljena količina rastvora mora biti odbačena. Na svetskom tržištu postoje i višedozna pakovanja, koja su konzervisana benzil alkoholom i takođe sadrže humani albumin kao anti-adheziv. Rok upotrebe nakon prvog otvaranja (prve primenjene doze) je 21 dan. Epoetin alfa ne treba primenjivati u kombinaciji sa drugim rastvorima. Međutim, neposredno pre supkutane primene, rastvor se može mešati u špricu u odnosu 1:1 sa izotoničnim 0,9% rastvorom natrijum-hlorida, koji sadrži i 0,9% benzil alkohola kao lokalnog anestetika (smanjenje bola pri aplikaciji) (1). **Darbepoetin alfa** (dobijen rDNK tehnologijom u liniji ćelija ovarijuma kineskog hrčka) najpre je bio odobren za tretman anemije povezane sa hroničnim oštećenjem bubrega, a potom i za tretman hemioterapijom-indukovane anemije kod pacijenata sa nemijeloidnim malignim tumorima. Lek je na raspolaganju kao rastvor za injekciju; formulacija je bez konzervanasa, sa humanim albuminom, natrijum-dihidrogenfosfatom, dinatrijum- hidrogenfosfatom i natrijum-hloridom. Na tržištu je bio prisutan proizvod sa polisorbitom 80 i glicinom, ali je nakon primene ove formulacije dolazilo do pojave teškog neželjenog dejstva **eritroblastopenije** (eng. *pure red-cell aplasia* (**PRCA**)) kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom koji su više meseci/godina pod terapijom epoetinom alfa ili darbepoetinom alfa (*s.c.*), sa incidencom

~ 20 na 100 000 pacijenata godišnje. Promena formulacije (zamena albumina sa glicinom i polisorbatom 80) i puta primene (supkutana umesto intravenska primena) dovela je do ovog teškog neželjenog dejstva. Zapravo, reformulisani proizvod pokazao se kao imunogen, što je kasnije objašnjeno asocijacijom više molekula EPO na površine micela nastalih prisustvom polisorbata 80, a dodatno pospešeno produženim kontaktom sa ćelijama imunog sistema (supkutana primena); usled toga Evropska agencija za lekove (EMA) ograničila je upotrebu ove formulacije kod obolelih od bubrežne insuficijencije na *i.v.* aplikaciju (15). Pre primene darbepoetina alfa bočicu treba proveriti na prisustvo čestica mehaničkih onečišćenja ili promenu boje (takve proizvode ne treba koristiti). Bočicu ne treba mućkati, niti rastvor razblaživati ili primenjivati sa rastvorima drugih lekova. Ukoliko neki deo proizvoda ostane neupotrebljen, treba ga odbaciti. Proizvod se ne sme zamrzavati, čuva se u frižideru na temperaturi od 2-8°C (1).

Interferon beta-1b (IFNB) je tip I interferon koji je dobijen u kulturi *E.coli* primenom rDNK tehnologije; razlikuje se od endogenog interferona beta po promeni rezidue serina cisteinom na poziciji 17. Ova manipulacija poboljšava stabilnost leka, dok se specifična aktivnost prirodnog interferona beta zadržava. IFNB je efikasan u tretmanu relapsne i remitentne multiple skleroze u dozi od 0,25 mg (8 Mi.j.) injektovanih supkutano svakog drugog dana. Liofilizovani IFNB 0,3 mg (9,6 Mi.j.) rekonstituiše se primenom sterilnog šprica i igle za injektovanje 1,2 ml diluensa (rastvor 0,54% natrijum-hlorida) direktno u bočicu. Diluens treba dodati niz zid bočice, a potom bočicu blago zavrteti između palca i kažiprsta, ali ne mućkati dok se lek u potpunosti ne rastvori. U formulaciji proizvoda prisutni su dekstroza i albumin (da spreči adsorpciju na zidove bočice, ili šprica). Budući da proizvod nije konzervisan, sadržaj bočice može se koristiti samo za jednokratnu upotrebu. Pre i nakon rekonstitucije proizvod se mora čuvati u frižideru, a ne duže od 3 sata nakon rekonstitucije mora se primeniti (1).

Rituksimab je bio prvo monoklonsko antitelo odobreno u SAD 1997. za tretman kancera. U pitanju je himerno (humano-mišje antitelo) usmereno protiv CD20 antigena koji se nalazi na površini normalnih i malignih B limfocita. Fab domen rituksimaba vezuje se za CD20 antigen na B limfocitima, a Fc domen pokreće imunološke efektorske funkcije koje posreduju lizu B limfocita. Lek je indikovano kod recidivantnog ili hemiorezistentnog indolentnog B ćelijskog non-Hodgin limfoma ili kod agresivnog non-Hodgin limfoma. Druga indikacija je reumatoidni artritis, sa specifičnim tokom terapije. Lek je na raspolaganju u obliku: 1) koncentrata za rastvor za infuziju 500 mg/50 ml, bočica, 1x50 ml (rok upotrebe 30 meseci, čuva se na temperaturi frižidera (2-8°C)), odnosno u obliku 2) koncentrata za rastvor za infuziju, 100 mg/10 ml, bočica, 2x10 ml; rok upotrebe 30 meseci, čuva se na temperaturi frižidera (2-8°C)) (1).

Kod non-Hodgin limfoma primenjuje se 50 mg/h leka. Ukoliko dođe do hipersenzitivnosti ili reakcije povezane sa primenom infuzije (npr. groznica, jeza,

mučnina, urtikarija, slabost, glavobolja, bronhospazam) infuzija se prekida ili usporava. Ove reakcije su generalno prisutne u toku 30 min do 2 sata prve infuzije. Infuzije koje slede mogu se primeniti i većom brzinom (100 mg/h) i povećavati (po 100 mg/h) do maksimalno 400 mg/h. Premedikacija sa paracetamolom i difenhidraminom može da smanji neželjene događaje vezane za primenu infuzije. Takođe, savetuje se da se ne uzimaju antihipertenzivi 12 sati pre infuzije rituksimaba. Razblaživanje koncentrata za infuziju vrši se 0,9% rastvorom natrijum-hlorida ili injekcijom 5% rastvora glukoze direktno u infuzionoju kesi koja se lagano izokrene da bi se promešali rastvori. Neupotrebljena količina infuzije se odbacuje (1).

Literatura

1. Allen VL, Popovich GN, AnselCH, eds. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 9th ed. Walters Kluwer i Lippincott Williams&Wilkins, 2011.
2. Crommelin DJA, Sindelar RD, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 3rd ed. Taylor & Francis Group, London and New York, 2007.
3. Walsh G. Posttranslational modifications of protein biopharmaceuticals. *8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, 2012.
4. European Pharmacopoeia 6.0, 6th Edition, Council of Europe, Strasbourg, 2008.
5. European Pharmacopoeia 7.0, 7th Edition, Council of Europe, Strasbourg, 2011.
6. Crommelin DJA, Storm G, Verrijk R, de Leede L, Jiskoot W, Hennink W. Shifting paradigms: biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs. *Int J Pharm.* 2003; 266: 3-16.
7. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nature Rev Drug Disc.* 2002; 1:457-462.
8. Kayser O, Müller RH, eds. Pharmaceutical Biotechnology. Drug Discovery and Clinical Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2004.
9. Groves MJ, ed. Pharmaceutical Biotechnology, 2nd ed., Taylor&Francis Group, Boca Raton, 2006.
10. Walsh G. Pharmaceutical Biotechnology – Concepts and Applications, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England, 2007.
11. Guidance for industry for Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2003.
12. Jiskoot W, Randolph TW, Volkin DB, Middaugh CR, Schöneich C, Winter G, Friess W, Crommelin DJA, Carpenter JF. Protein instability and immunogenicity. Roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release. *J Pharm Sci* 2012; 101(3): 946-954.
13. Cromellin D. Recommendation for storage and handling of biopharmaceuticals in hospitals. *EJHP* 1/2003.
14. Nacionalni registar lekova 2011, Agencija za lekove i medicinska sredstva, Beograd, 2011.
15. Wang ZY, Zhao KK, Zhao PQ. Erythropoietin therapy for early diabetic retinopathy through its protective effects on retinal pricytes. *Medical Hypotheses* 2011; 76: 266-68.
16. Wang YJ, Hao SJ, Liu YD, Hu T, Zhang GF, Zhang X, et al. PEGylation markedly enhances the in vivo potency of recombinant human non-glycosylated erythropoietin: A comparison with glycosylated erythropoietin. *J Control Release* 2010; 145: 306–313.

Biologics: pharmaceutical-technological specificities

Snezana Savić*, Jela Milić

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, 11 000 Belgrade, Serbia

Summary

The field of pharmaceutical biotechnology is developing rapidly. For those working in the field of pharmacy and pharmaceutical sciences, completely new and novel techniques and product appear at a rapid pace, with an almost imperative request for an additional/continual education, since the biopharmaceuticals are result of the interplay between a number of different disciplines; among those must be mentioned: molecular biotechnology, molecular genetics, (bio-)engineering, chemistry of proteins, and, last but not least, pharmaceutical sciences with pharmaceutical technology as well. The huge number of biopharmaceuticals belongs to the group of parenteral preparations for the reason of great protein sensitivity (solutions for injections, concentrate for infusions, lyophilized products (freeze-dried powders which need reconstitution). As the stability, biological activity, and pharmacological activity of proteins and peptides are largely dependent on their intact primary, secondary, tertiary, and quaternary structure, the aim of paranterals' development is to keep their structure, stability, and therefore the activity using the proper excipients and choosing an optimal production procedure (sterilization steps are crucial). It is of utmost importance also to learn about biopharmaceuticals storage and handling from the moment of their production to the patient administration.

Key words: biopharmaceutical, rDNA products, monoclonal antibodies, formulation, excipients, lyophilized product, the cold chain.
