

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Técnicas de secagem para estabilização de produtos
biofarmacêuticos**

Adorino João Nunes Mendonça

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professor Doutor Pedro Ricardo Martins Lopes da Fonte

2021

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Técnicas de secagem para estabilização de produtos
biofarmacêuticos**

Adorino João Nunes Mendonça

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professor Doutor Pedro Ricardo Martins Lopes da Fonte

2021

Técnicas de secagem para estabilização de produtos biofarmacêuticos

Declaração de autoria do trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © 2021 Adorino João Nunes Mendonça

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Pedro Ricardo Martins Lopes da Fonte, por ter aceite ser orientador desta dissertação e, acima de tudo, pela ajuda e conselhos dados no decorrer da elaboração da mesma.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, por me apoiarem em todos os momentos do meu percurso e me motivarem sempre a dar-vos razões para se orgulharem de mim, principalmente, na chegada ao fim desta meta. Sem vocês, nada disto seria possível!

Ao meu irmão, por ser um pilar fundamental na minha vida e me dar força a enfrentar todas adversidades com um sorriso sentido no rosto.

Aos amigos e colegas que levo para a vida depois destes 5 anos, por tornarem única a experiência vivida até ao momento.

Em último lugar à minha guitarra que permitiu que os momentos de desespero se tornassem em inspiração fazendo com que tudo, eventualmente, fizesse sentido.

Resumo

O avanço da área da tecnologia farmacêutica aliada ao desenvolvimento de novos fármacos desencadeou a introdução no mercado de produtos biofarmacêuticos, como anticorpos monoclonais, vacinas, hormonas, fatores de crescimento, entre outros. Estes apresentam características que os tornam imprescindíveis no tratamento de diversas patologias severas como cancro, doenças autoimunes, diabetes, etc. A obtenção destes produtos é feita através de tecnologia de DNA recombinante em culturas de *Saccharomyces cervisiac* ou *E. coli* ou ainda através da extração em animais, no entanto, esta prática é cada vez menos usada. Os produtos biofarmacêuticos, no entanto, são sensíveis a variações de fatores como o pH e temperatura, devido à sua origem essencialmente proteica. Isto representa um problema de estabilidade, principalmente em solução, visto que esta forma de apresentação evidencia uma maior mobilidade estrutural e o facto de sofrerem ação hidrolítica pela água. Assim, a secagem dos produtos farmacêuticos transformando-os em formas farmacêuticas sólidas é uma estratégia para aumentar a sua estabilidade. A secagem, sendo um processo de desidratação, pode ser efetuada por diferentes técnicas como a atomização, a eletropulverização, a secagem a vácuo, a secagem em leito de espuma, a liofilização com e sem atomização e a secagem supercrítica. Apesar do aumento de estabilidade dos produtos farmacêuticos através da secagem, este é um processo que gera diferentes fontes de instabilidade dependente do método utilizado. É assim necessário garantir a sua estabilidade durante a secagem, bem como durante o armazenamento até à sua administração. Para tal, podem adicionar-se excipientes estabilizantes como açúcares, agentes surfactantes e aminoácidos que através de mecanismos específicos aumentam a estabilidade dos produtos biofarmacêuticos. O objetivo deste trabalho é dissertar sobre a importância da aplicação de diferentes técnicas de secagem na estabilização de produtos biofarmacêuticos. Serão descritos diferentes produtos biofarmacêuticos existentes no mercado e os processos de instabilidade física e química a que estão sujeitos. Fundamentalmente, os processos de desidratação e estabilizantes utilizados na secagem de produtos biofarmacêuticos serão escrutinados.

Palavras-chave: Atomização; Biofármaco; Degradação; Estabilidade; Estabilizante; Liofilização; Proteína terapêutica; Secagem.

Abstract

The advances in pharmaceutical technology combined with the development of new drugs triggered the market of biopharmaceutical products, such as monoclonal antibodies, vaccines, hormones, growth factors, among others. It has characteristics that make it indispensable in the treatment of several severe pathologies such as cancer, autoimmune diseases, diabetes, etc. The obtaining of these products is performed by recombinant DNA technology in cultures of *Saccharomyces cervisiac* or *E. coli* or even by extraction in animals, however, this practice is less and less used. Biopharmaceutical products, however, are sensitive to variations in factors such as pH and temperature due to their essentially protein origin. This represents a problem of stability, especially in solution, since this form of presentation evidences greater structural mobility and may undergo hydrolytic action by water. Thus, the drying of pharmaceutical products turning it into solid dosage forms is a strategy to increase its stability. Drying, being a dehydration process, can be performed by different techniques such as spray-drying, electrospraying, vacuum drying, foam drying, lyophilization, spray freeze-drying and supercritical drying. Despite the increased stability of pharmaceutical products through drying, this is a process that generates different sources of instability dependent on the method used. It is therefore necessary to ensure its stability during drying, as well as during storage until its administration. To this end, stabilizing excipients such as sugars, surfactant agents and amino acids can be added, which through specific mechanisms increase the stability of biological drugs. The objective of this work is to discuss the importance of applying different drying techniques in the stabilization of biopharmaceutical products. Different biopharmaceutical products available on the market, and the processes of physical and chemical instability to which they are subject are described. Fundamentally, the dehydration processes and stabilizers used in the drying of biopharmaceutical products will be scrutinized.

Keywords: Biopharmaceutical; Degradation; Drying; Lyophilization; Spray-drying; Stability; Stabilizer; Therapeutic protein.

Índice

Resumo	v
Abstract.....	vi
Índice de tabelas	ix
Índice de figuras	x
Lista de abreviaturas	xi
1. Introdução.....	1
2. Produtos biofarmacêuticos	3
2.1. Linfocinas	7
2.2. Hormonas.....	8
2.3. Fatores de crescimento hematopoiéticos	9
2.4. Anticorpos monoclonais	11
2.5. Enzimas.....	13
2.6. Fatores de coagulação.....	14
2.7. Vacinas.....	15
3. Instabilidade de produtos biofarmacêuticos	17
3.1. Instabilidade química.....	17
3.1.1. Oxidação.....	17
3.1.2. Desamidação.....	18
3.1.3. Hidrólise	19
3.2. Instabilidade física	21
3.2.1. Desnaturação	21
3.2.2. Adsorção.....	22
3.2.3. Agregação e precipitação.....	23
4. Técnicas de secagem de produtos biofarmacêuticos	25
4.1. Evaporação com atomização.....	27

4.1.1.	Atomização.....	28
4.1.2.	Eletropulverização.....	31
4.2.	Evaporação sem atomização.....	33
4.2.1.	Secagem a vácuo.....	33
4.2.2.	Secagem em leito de espuma.....	35
4.3.	Sublimação.....	37
4.3.1.	Liofilização.....	37
4.3.2.	Liofilização com atomização.....	39
4.4.	Precipitação.....	41
4.4.1.	Secagem supercrítica.....	41
5.	Excipientes estabilizantes para produtos biofarmacêuticos.....	44
5.1.	Açúcares e polióis.....	44
5.2.	Surfactantes.....	45
5.3.	Aminoácidos.....	46
5.4.	Agente tampão.....	47
5.5.	Polímeros.....	48

Índice de tabelas

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos produtos biofarmacêuticos	4
Tabela 2. Produtos biofarmacêuticos aprovados pela FDA em 2020 e 2021	6
Tabela 3. Vantagens e desvantagens das técnicas de secagem para a estabilização de produtos biofarmacêuticos.....	26

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura da insulina.....	5
Figura 2. Estrutura de um anticorpo	11
Figura 3. Reações de racemização e β -eliminação.....	20
Figura 4. Processo convencional de secagem por atomização	29
Figura 5. Mecanismos de fluxo de ar utilizados na técnica de atomização.....	30
Figura 6. Processo de eletropulverização	32
Figura 7. Processo de secagem a vácuo.....	34
Figura 8. Sistema de secagem por liofilização	38
Figura 9. Processo de liofilização com atomização.....	40
Figura 10. Processo de secagem supercrítica	42
Figura 11. Interações do agente surfactante com a proteína	46

Lista de abreviaturas

Asn – Asparagina

CF – *Cystic fibrosis*

CHO – *Chinese hamster ovaries*

CO₂-SC – Dióxido de carbono supercrítico

CsA – Ciclosporina A

Cys – Cisteína

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crónica

EPO – Eritropoietina

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

FSH – *Follicle-stimulating hormone*

GdnHCL – *Guanidine hydrochloride*

Gln – Glutamina

GMCSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HBV – Hepatitis B vírus

hCG – *Human chorionic gonadotrophin*

HD – Hidrodinâmico

HES – Hidroxielitamido

HGF – *Hematopoietic growth factor*

His – Histidina

hrDNase – *Human recombinant deoxyribonuclease*

hrGH – *Human recombinant human growth hormone*

huSCF – *Human stem cell factor*

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

K – Condutividade térmica

mAb – Anticorpo monoclonal

Met – Metionina

NK – *Natural killer*

PEG – Polietilenoglicol

pK_a – Constante de dissociação

PVP – Polivinilpirrolidona

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

TNF – *Tumor necrosis factor*

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

1. Introdução

Um dos maiores avanços da ciência moderna foi o desenvolvimento de produtos biofarmacêuticos. Estes apresentam um crescimento exponencial no que toca ao seu desenvolvimento e utilização, sendo usados em praticamente todas as áreas da medicina, por terem uma alta eficácia no tratamento de diferentes patologias, como cancro, doenças inflamatórias, cardiovasculares, respiratórias, autoimunes e vacinas. Em contraste com os fármacos de síntese química, os produtos biofarmacêuticos são produzidos a partir de sistemas biológicos e não através de síntese química [1,2]. Designam-se produtos biofarmacêuticos ou medicamentos biológicos os medicamentos nos quais a substância ativa é produzida ou extraída de uma fonte biológica. Incluem-se neste grupo de medicamentos derivados do sangue e plasma, medicamentos obtidos por processos biotecnológicos, vacinas e medicamentos de terapia avançada, como terapia genética [3].

Os biofármacos apresentam uma variedade de vantagens quando comparados com os fármacos convencionais. Uma vez que são obtidos a partir de fonte biológica e têm afinidade e atividade elevadas para moléculas específicas sendo considerados fármacos mais seguros, por causarem menos efeitos adversos. Além disso, a sua natureza biológica demonstra ter baixa probabilidade de provocar risco ambiental proveniente do uso, armazenamento e da sua eliminação, visto que é esperada uma degradação ou inativação rápida destes medicamentos no organismo ou meio ambiente [1,4,5]. A utilização destes produtos biológicos permite a adaptação do tratamento especificamente para cada paciente, o que leva ao aumento da taxa de sobrevivência e a diminuição da mortalidade, aumentando por exemplo a esperança média de vida em doentes com doença de Alzheimer [6].

Sendo os produtos biofarmacêuticos essencialmente proteínas terapêuticas, podem degradar-se facilmente durante o fabrico e armazenamento. Em solução aquosa, para dar-se alteração estrutural com consequente desnaturação da proteína, ou sofrer ação hidrolítica da água. Existem outros fatores de degradação como variações de temperatura e do pH e o oxigénio presente no meio, bem como os materiais utilizados na embalagem primária [7,8]. Algumas das reações promotoras de instabilidade química são oxidação, desamidação e hidrólise, podendo ocorrer também alterações físicas como desnaturação, adsorção, agregação e precipitação [7,9–11]. Uma vez que as formulações líquidas

de proteínas apresentam uma maior mobilidade molecular são mais suscetíveis a degradação físico-química. Assim sendo, a remoção de água reduz a mobilidade molecular, aumentando conseqüentemente a estabilidade. Para este fim existem diferentes técnicas de secagem com efeito estabilizador em produtos biofarmacêuticos [8]. Para além da estrutura primária complexa dos medicamentos biológicos, as suas propriedades podem ser alteradas através do método utilizado para a secagem.

A secagem pode ser efetuada através de mecanismos de evaporação, sublimação e precipitação. As técnicas mais utilizadas para a secagem de produtos biofarmacêuticos através do mecanismo de evaporação são a atomização, a eletropulverização, a secagem a vácuo e em leito de espuma. Já a liofilização e a secagem supercrítica são técnicas de secagem que se procedem através de mecanismos de sublimação e precipitação, respetivamente. Todas estas técnicas apresentam características diferentes, que se refletem nas propriedades do produto seco. Adicionalmente, a manipulação de parâmetros aquando da secagem, como o fluxo do líquido, o pH da amostra e a temperatura, permite a formulação de pós com características desejadas, como o tamanho e a forma [8,12–14].

Apesar da secagem conferir um aumento de estabilidade aos produtos biofarmacêuticos, também os submete a diferentes fatores de *stress*, pelo que a adição de agentes estabilizantes pode ajudar a colmatar este problema e aumentar o tempo de prateleira dos medicamentos biológicos. Estes agentes podem ser açúcares, surfactantes, aminoácidos, agentes tampão ou polímeros. Cada grupo de compostos atua de forma específica protegendo as proteínas de agressões e interações promotoras de instabilidade [8,15,16].

O objetivo deste trabalho é explorar e compreender em maior detalhe a importância dos produtos biofarmacêuticos na terapia e as técnicas de secagem mais utilizadas para a sua estabilização. Nesse sentido, será dado relevo aos diferentes processos físicos e químicos de degradação a que os produtos biofarmacêuticos estão sujeitos e os estabilizantes utilizados para os mitigar.

2. Produtos biofarmacêuticos

São considerados produtos biofarmacêuticos ou medicamentos biológicos biomoléculas com atividade farmacológica usada para terapia ou diagnóstico, quando produzidas a partir de fontes biológicas geneticamente modificadas, sendo normalmente proteínas e péptidos. A descoberta destes fármacos, produzidos através de tecnologia de ácido desoxirribonucleico (DNA) recombinante ou por processos biotecnológicos foi considerado um marco no desenvolvimento de fármacos, tal como a descoberta da morfina ou da aspirina, em 1804 e 1897, respetivamente [17]. A maioria dos biofármacos comercializados são produzidos através de culturas em *E. coli* ou em linhas celulares de ovários de hamsters chineses (CHO, do inglês *chinese hamster ovaries*). A *E. coli* é um sistema de expressão recombinante popular uma vez que para além de apresentar uma taxa de crescimento elevada encontra-se muito bem caracterizado no que concerne às características genéticas. No entanto, apresenta desvantagens, como o facto das proteínas recombinantes se acumularem intracelularmente, dificultando o processamento posterior, e não ser possível conter modificações pós translacionais, o que pode reduzir a sua atividade biológica, solubilidade ou tempo de semivida *in vivo* [5].

Os biofármacos podem ter dimensões que variam de 200 a 1000 vezes superiores aos fármacos convencionais, como o caso do ácido acetilsalicílico. Adicionalmente, estes produtos apresentam sensibilidade à degradação no trato gastrointestinal e têm absorção limitada no epitélio intestinal, pelo que são tipicamente administrados por via parentérica [1,2,4]. O desenvolvimento de medicamentos biológicos é um processo complexo, demorado e que envolve custos elevados. Em média a formulação de um novo composto tem custos associados que se encontram entre 1 e 3 biliões de dólares num espaço de tempo entre 10 e 15 anos [2]. Os péptidos são mais pequenos e menos complexos que as proteínas. Existem diversos péptidos que têm um papel preponderante atuando como sinalizadores em vários processos fisiológicos e reguladores, como crescimento, homeostase e imunidade. No entanto, mesmo sendo excelentes pontos de partida para o desenvolvimento de novos biofármacos, visto terem uma segurança, tolerância e eficácia elevadas em humanos, as características físicas e químicas dos péptidos representam um desafio: baixa estabilidade, tempo de semivida curto e incapacidade de atravessar membranas celulares [2].

Estes produtos, como têm na sua composição diferentes moléculas, podem formar cadeias poliméricas que apresentam uma grande variabilidade na sua estrutura. Assim, a sua natureza complexa e sensível é suscetível a alterações de fatores como a temperatura, o pH, agitação e contacto com solventes orgânicos. Isto pode desencadear instabilidade e, conseqüentemente, resultar numa atividade biológica alterada [1,4,8]. Assim, quando comparados com os fármacos de síntese química, apresentam vantagens e desvantagens (Tabela 1) [1,18–20].

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos produtos biofarmacêuticos. *Adaptado com autorização a partir de* [1,18–20].

Produtos biofarmacêuticos	
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Especificidade molecular e terapêutica • Elevada biopotência • Poucos efeitos adversos • Tratamento adaptado a cada doente
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Custo elevado • Processo de fabrico complexo e demorado • Instáveis e difíceis de caracterizar • Suscetíveis a degradação por diversos fatores (ex. temperatura, pH, agitação) • Administração invasiva que causa dor e desconforto • Immunogenicidade

Depois da primeira aprovação de insulina recombinante humana (Figura 1), em 1982, foram disponibilizados no mercado diversos biofármacos com diferentes aplicações clínicas incluindo tratamento de cancro, alterações metabólicas a nível hormonal e hematopoiético, doenças cardíacas, vacinas, entre outros [5,21,22]. Os produtos biofarmacêuticos podem ser categorizados em grupos de acordo com a sua atividade biológica, de acordo com J. Ryu, G. Walsh e a FDA [5,17,23]. Assim, podem agrupar-se em linfocinas, hormonas, fatores de crescimento hematopoiéticos, anticorpos monoclonais, enzimas, fatores de coagulação e vacinas. Torna-se especialmente relevante

descrever nesta secção cada um destes produtos farmacêuticos em maior detalhe de forma a perceber as suas características.

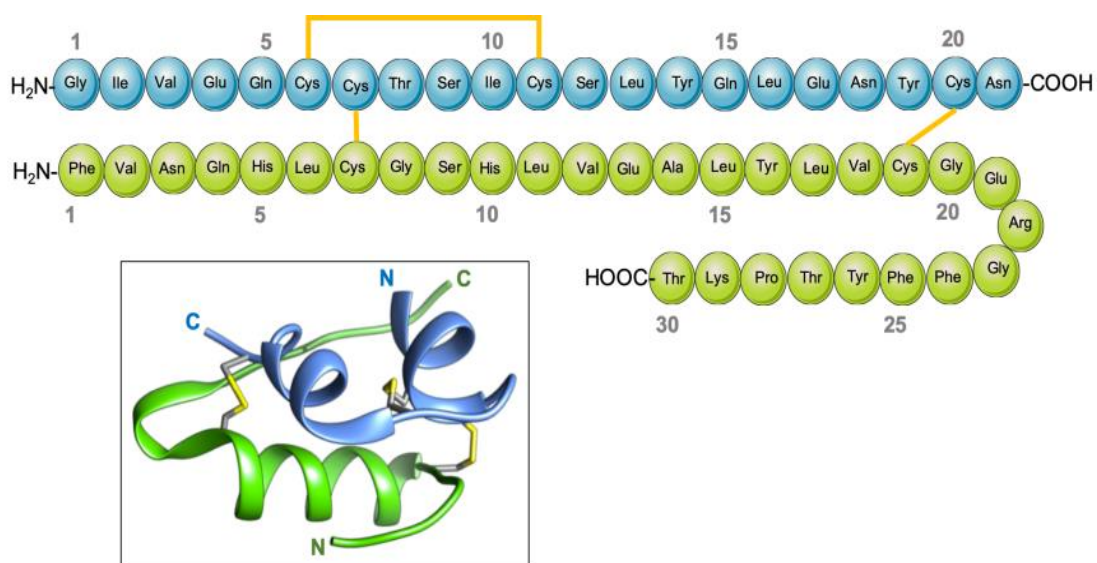


Figura 1. Estrutura da insulina. Retirado com autorização a partir de <https://pdb101.rcsb.org/global-health/diabetes-mellitus/drugs/insulin/insulin>.

Apenas entre janeiro de 2014 e julho de 2018 foram aprovados 155 produtos biofarmacêuticos na Europa e Estados Unidos da América (EUA), sendo que 129 deles são moléculas distintas. Estes incluem anticorpos monoclonais, como Humira[®] (adalimumab) e Enbrel[®] (etanercept), hormonas, como Lantus[®] (insulina glargina) e NovoMix[®] (insulina asparte) e anticoagulantes, como Nuwiq[®] (simoctocog alfa) e Alprolix[®] (eftrenonacog alfa) [24]. Em 2021, até à data, foram aprovados 41 medicamentos novos pela *Food and Drug Administration* (FDA), encontrando-se alguns exemplos de produtos biofarmacêuticos aprovados na Tabela 2 [25,26].

Tabela 2. Produtos biofarmacêuticos aprovados pela FDA em 2020 e 2021. *Adaptado com autorização a partir de [25,26].*

Nome comercial	Tipo de produto biofarmacêutico	Produto biofarmacêutico	Indicação terapêutica
Aduhelm[®]	Anticorpo	Aducanumab	Alzheimer
Blenrep[®]	Anticorpo	Belantamab	Mieloma múltiplo
Danyelza[®]	Anticorpo	Naxitamab	Neuroblastoma
Ebanga[®]	Anticorpo	Ansuvimab	Ébola
Jemperli[®]	Anticorpo	Dostarlimab	Cancro endometrial
Margenza[®]	Anticorpo	Margetuximab	Cancro de mama HER2+
Monjuvi[®]	Anticorpo	Tafasitamab	Linfoma de grandes células B
Rybrevant[®]	Anticorpo	Amivantamab	Cancro de pulmão de não-pequenas células
Saphnelo[®]	Anticorpo	Anifrolumab	Lúpus eritematoso
Sarclisa[®]	Anticorpo	Isatuximab	Mieloma múltiplo
Tepezza[®]	Anticorpo	Teprotumumab	Doença de Graves
Tivdak[®]	Anticorpo	Tisotumab vedotina	Cancro cervical
Trodelvy[®]	Anticorpo	Sacituzumab	Cancro de mama metastático
Uplizna[®]	Anticorpo	Inebilizumab	Neuromielite ótica
Vyepti[®]	Anticorpo	Eptinezumab	Enxaqueca
Zylonta[®]	Anticorpo	Loncastuximab	Linfoma de grandes células B
Skytrofa[®]	Hormona	Lonapegsomatropina	Baixa estatura
Sogroya[®]	Hormona	Somapacitan	Deficiência em hormona de crescimento
Rylaze[®]	Enzima	Asparaginase	Leucemia e linfoma linfoblásticos

2.1. Linfocinas

As linfocinas são proteínas secretadas principalmente pelos linfócitos e pertencem ao grupo das citocinas. Têm carácter regulador da resposta imunitária e são mediadores solúveis que apresentam atividade em concentrações bastante reduzidas. Estes biofármacos podem ser produzidos em larga escala através de processos biotecnológicos como o cultivo de linhas celulares geneticamente modificadas ou através de células procarióticas ou eucarióticas nas quais foram inseridos os genes relevantes por tecnologia de DNA recombinante. Estas encontram-se subdivididas em diferentes famílias moleculares que incluem interferões (IFN), interleucinas (IL) e fatores de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) [27,28].

Os interferões são produzidos por várias células do sistema imunitário e a suas atividades biológicas incluem a indução de resistência a ataques virais, a modulação da resposta imunitária e a regulação do crescimento e diferenciação de diversas células [5]. Existem três tipos de IFNs: I, que contempla o IFN- α e - β , II que corresponde ao IFN- γ e III, que é o tipo descoberto mais recentemente e inclui o IFN- λ [27]. Até Abril de 2021 foram aprovadas vinte e uma formulações de IFN na Europa e EUA, das quais cinco foram retiradas do mercado, não por problemas de segurança ou eficácia, mas devido a pedidos dos titulares da autorização de comercialização e pela existência de produtos similares no mercado. Exemplos de atividades biológicas destes fármacos incluem a resposta imunitária a agentes infecciosos como o vírus da hepatite B e C. O Roferon A[®] tem como substância ativa IFN- α 2a extraído de cultura com *E. coli* e encontra-se aprovado para tratamento de leucemias, sarcoma de Kaposi relacionado com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), hepatite B e C crónicas e melanoma [29,30]. A sua atividade antitumoral ou antiviral encontra-se diretamente relacionada com ação antiproliferativa de células tumorais, inibição da replicação viral e modulação da resposta imunitária do doente [30]. O mercado de IFN tem crescido ao longo dos últimos anos, sendo que em 2019 encontrava-se avaliado em 6,9 biliões de dólares e estima-se que com a alta procura destes biofármacos, em associação com antirretrovirais e antimaláricos no tratamento dos pacientes infetados com SARS-CoV-2 (COVID-19) o seu valor aumente [29].

As interleucinas (IL) foram inicialmente descobertas através de estudos na patogénese da febre e foram descritas como fatores secretados pelos linfócitos e que apresentam capacidade para regular a comunicação intercelular. Atualmente sabe-se que

as interleucinas são expressas por várias células pertencentes ao sistema imunitário e já foram descobertas, pelo menos, 17 subfamílias [27]. Adicionalmente têm uma elevada relevância no tratamento de cancro, visto que fazem parte do espectro de atividade das interleucinas a regulação dos processos de inflamação e de resposta imunitária [27]. A IL-2 é a interleucina mais bem caracterizada e atua como um fator de crescimento para os linfócitos e aumenta a produção de anticorpos por parte dos linfócitos B. Adicionalmente, promove diferenciação e ativação das células *natural killer* (NK), que têm um papel fundamental na destruição de células mutadas e/ou infetadas. Um exemplo deste biofármaco é o Proleukin[®] utilizado para tratamento de cancro renal e melanoma, sendo a sua ação farmacológica baseada na estimulação da atividade anti tumoral por ativação de células do sistema imunitário. Esta demonstrou uma taxa de remissão de doença entre 15% e 20% em pacientes com carcinoma de células renais e melanoma, bem como diversas reações adversas a nível cardiovascular, pulmonar, renal e gastrointestinal, como taquicardia, angina e disfunção renal [5,31,32].

Os TNF são sintetizados nos linfócitos e macrófagos e causam a lise de determinados tipos de células, especialmente, tumorais. Estes demonstram ser promissores para tratamento de aterosclerose, osteoporose, doenças autoimunes, rejeição de transplantes e cancro, uma vez que são expressos no sistema imunitário e apresentam uma sinalização rápida e potente. Estas são características fundamentais para coordenar a proliferação e as funções protetoras das células reativas a agentes patogénicos [33,34]. A superfamília de TNF tem diversos ligandos. Um deles é o TNF- α , que tem um carácter de destaque graças à sua importância na pro-inflamação e cancro e, como tal, é o que foi estudado em maior extensão. Este ligando é expresso em macrófagos, células NK, linfócitos B e T e demonstrou capacidade de suprimir tumores malignos em xenoinxertos, no entanto, quando injetado em murganhos e humanos apresentou toxicidade severa, incluindo hipercitocinemia e choque séptico. Ainda assim, o TNF- α recombinante encontra-se aprovado na Europa para tratamento de sarcoma nos membros superiores e inferiores, utilizando perfusão isolada em combinação com quimioterapia [27].

2.2. Hormonas

A insulina foi utilizada pela primeira vez na área médica em 1921 e desde então foi extraída do tecido pancreático de bovinos e suínos. No entanto, nos anos 70 foi desenvolvido um método que permitiu a conversão da insulina de suínos em insulina

humana, uma vez que a sequência destas diferem apenas num único aminoácido. Entretanto, foi desenvolvido um método alternativo para a obtenção de insulina humana através da expressão em culturas de *E. coli* [5]. A primeira insulina recombinante humana a ser aprovada como medicamento foi o Humulin[®] nos EUA em 1982 [5,35]. Entretanto, já foram aprovadas mais insulinas como Humalog[®] (insulina lispro) que tem uma ação terapêutica mais curta e rápida devido a uma inversão da sequência de uma das cadeias de aminoácidos. Esta também é obtida através de tecnologia de DNA recombinante [5].

Outras hormonas têm vindo a ser aprovadas, como é o caso da hormona recombinante humana de crescimento (hrGH, do inglês *human recombinant growth hormone*). Estruturalmente é uma proteína globular não glicosídea composta por 191 aminoácidos e é libertada durante o sono pela glândula pituitária anterior [35]. Com o nome comercial de Protropin[®] foi utilizada para o tratamento de problemas de crescimento em crianças. Ao contrário da insulina, a hormona de crescimento é relativamente específica para cada espécie, pelo que a extração proveniente de animais não exhibe praticamente nenhuma atividade biológica em humanos [5]. A hrGH tem aprovação pela *European Medicine Agency* (EMA) para ser utilizada na terapêutica em doentes pediátricos com falhas de crescimento devido à falta de secreção desta hormona e em adultos como terapia de substituição [35].

A hormona folículo-estimulante (FSH, do inglês *follicle-stimulating hormone*) pertence à família das gonadotrofinas, cuja atividade maioritária é a regulação da função reprodutiva. Esta, em combinação com hrCG é utilizada para tratar transtornos sexuais como infertilidade anovulatória. Neste âmbito, a FSH é tradicionalmente extraída da urina de mulheres após a menopausa e a hrCG purificada da urina de mulheres grávidas. Exemplos destes fármacos são Puregon[®] e Gonal-F[®] [5].

2.3. Fatores de crescimento hematopoiéticos

As células sanguíneas são vitais para a vida humana no aspeto em que são responsáveis por uma grande variedade de processos: transporte de oxigénio (eritrócitos), hemóstase (plaquetas), imunidade inata (granulócitos e monócitos) e imunidade adquirida (linfócitos B e T) que são garantidos através da rápida regeneração das células sanguíneas [36]. Os fatores de crescimento hematopoiético (HGFs, do inglês *hematopoietic growth factors*) são glicoproteínas que se distinguem entre si através da sequência de aminoácidos e que têm função reguladora tanto na hematopoiese, como na

atividade funcional de células sanguíneas, pelo que têm elevada importância aquando dos processos de renovação, maturação e sobrevivência para cada linha celular. Estes fatores atuam ligando-se a recetores específicos das células, induzindo proliferação, diferenciação ou ativação celular [36]. Existem essencialmente três HGFs recombinantes disponíveis no mercado para tratamento de transtornos clínicos envolvendo células sanguíneas. Estas são a eritropoietina (EPO), o fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e o multi-CSF [36].

A EPO tem um papel predominante na produção de eritrócitos e é sintetizada, nos adultos, por células renais e hepáticas e, nos fetos, apenas por células hepáticas. A produção e secreção de EPO é regulada conforme a capacidade de transporte e necessidade de oxigénio nos tecidos. O Epogen[®] é um exemplo de EPO utilizada no tratamento de anemia e redução de transfusão sanguínea em pacientes submetidos a cirurgias [35,36].

O GM-CSF estimula a diferenciação das células estaminais em granulócitos, monócitos e macrófagos. Além disso, induz a migração de células dendríticas imaturas para a área dos linfócitos T, aumentando assim a capacidade das células apresentadoras de antígeno em preparar linfócitos T naive. Desta forma, existem diversas aplicações para estes biofármacos como a correção de citopenias após quimio e/ou radioterapia, aceleração da recuperação em situações de transplante de medula e estimulação direta da atividade anti tumoral de granulócitos e monócitos. O Macrogen[®] (molgramostim) e o Neupogen[®] (filgrastim) são exemplos de biofármacos com este fator utilizados no tratamento de neutropenia severa e leucemia mieloide aguda, respetivamente [5,35,36].

O multi-CSF é expresso por linfócitos T ativados, células NK, queratinócitos, células endoteliais, mastócitos e neurónios. Tem um grande espectro de atividades na regulação de respostas biológicas, como a proliferação, sobrevivência, crescimento e diferenciação celular. Para além dos efeitos nas diferentes células hematopoiéticas, tem capacidade também para aumentar a apresentação de antígenos, aumentar a citotoxicidade e adesão de macrófagos e ainda participar em processos inflamatórios através da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais. O multi-CSF é utilizado em combinação com outros fatores hematopoiéticos para estimular a regeneração das células sanguíneas após transplantes de medula e quimioterapia. Para além disso foi utilizado para monitorizar as fases da leucocitopenia e para suprimir a medula óssea durante o tratamento da leucemia. Foi também utilizada em doentes com

deficiência na função da medula óssea causada por tumores bem como em tratamentos de cancro do pulmão, anemia e mielodisplasia [36].

2.4. Anticorpos monoclonais

A produção de anticorpos monoclonais terapêuticos (mAbs) (Figura 2) foi possível graças ao desenvolvimento da tecnologia de hibridoma nos anos 70. Apresentam uma elevada especificidade, sendo característica atrativa na terapia de diversas patologias. Adicionalmente, podem ser diferenciados de acordo com a sua obtenção, uma vez que podem ser extraídos de murinos ou através de tecnologia de DNA recombinante, podendo apresentar assim composição totalmente murínica, mista ou totalmente humana [5].

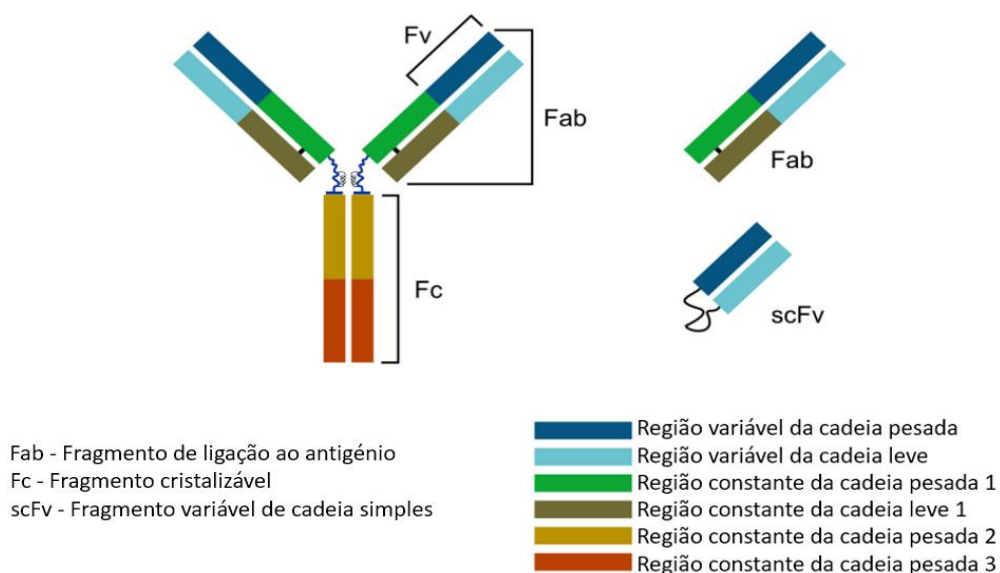


Figura 2. Estrutura de um anticorpo. Adaptado com autorização a partir de [48].

Os anticorpos monoclonais murínicos (-omab) são obtidos através da recolha de linfócitos B de murinos depois da sua sensibilização a antígenos humanos e apresentam bastantes reações adversas ao nível de respostas imunitárias. Um exemplo de biofármaco pertencente a este grupo é o Bexxar[®] (tositumomab), utilizado para tratamento de linfoma não-Hodgkin [37]. Os mAbs quiméricos (-ximab) consistem numa região constante humana com uma região variável completamente murínica e, quando comparados aos

completamente murínicos, apresentam menos respostas imunológicas adversas. O primeiro a ser comercializado foi o Reopro[®] (abciximab) para a prevenção de complicações isquémicas durante angioplastias [37]. A tecnologia de DNA recombinante permitiu produzir mAbs com ainda menor composição murínica. Os anticorpos monoclonais humanizados (-zumab) foram produzidos pela primeira vez em 1986 e apenas contêm a sequência murínica na região determinante de complementaridade. São exemplos o Herceptin[®] (trastuzumab) que se encontra aprovado para o tratamento de cancro da mama e Avastin[®] (bevacizumab) aprovado para tratamento de cancro colorretal e da mama [37]. Estirpes de ratos transgênicos com expressão de domínios e células derivadas de humanos permitem a síntese de mAbs totalmente humanos (-umab) e, visto possuírem as mesmas vias biossintéticas, minimizam o risco associado a respostas imunitárias anti-mAbs. Humira[®] (adalimumab) e Prolia[®] (denosumab) são utilizados no tratamento de artrite reumatoide e osteoporose pós-menopausa, respetivamente [37].

Os mAbs correspondem à maior fração de biofármacos produzidos e são normalmente utilizados para tratamento de cancro, doenças inflamatórias, cardiovasculares, respiratórias e oftalmológicas, transplantes de órgãos e infeções [1]. O primeiro mAb a ser aprovado para uso médico foi o Orthoclone[®] OKT3 (muromonab-CD3) para reverter a rejeição aguda do transplante de rim, uma vez que vai reconhecer o antigénio nos linfócitos T e ligar-se induzindo a destruição das células que participam na rejeição [5].

Em determinadas doenças complexas como cancro apresentam carácter multifatorial, e para o seu tratamento é conveniente inibir diferentes fatores patogénicos e vias de sinalização, de forma a aumentar a eficácia terapêutica. Com este objetivo foram desenvolvidos anticorpos biespecíficos, proteínas artificiais compostas por fragmentos com dois anticorpos monoclonais diferentes com afinidade para dois tipos diferentes de antigénios. Assim, podem ligar-se a dois alvos, como uma célula tumoral e células citotóxicas. O Blincyto[®] (blinatumomab) é um exemplo utilizado para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda em adultos [1].

Existem ainda mAbs antigénio específicos para tratamento do cancro conjugados com isótopos ou com fármacos potentes. Quando conjugados com isótopos, emitem radiação no local de ligação ao tumor, levando à destruição específica de células cancerígenas, sendo o Zevalin[®] (ibritumomab tiuxetano) um exemplo. No segundo caso, o bioconjugado contém um mAb que se liga especificamente ao tumor e um fármaco potente que se encontra ligado ao anticorpo. Esta formulação permite uma elevada

especificidade e eficácia no tratamento de células cancerígenas, sem afetar geralmente os tecidos envolventes saudáveis [1].

2.5. Enzimas

As enzimas são moléculas biológicas que têm capacidade de catalisar diversos tipos de reações, sejam elas químicas, biológicas ou metabólicas. Maioritariamente, as enzimas são proteínas com boa especificidade e eficácia em converter substratos em produtos, sendo importantes na manutenção da viabilidade, função e renovação celular. Assim, estes biofármacos, podem ser usados como terapêutica de substituição nos casos em que há deficiência de enzimas ou quando a atividade destas se mostra comprometida, como agente terapêutico para dissolução de coágulos sanguíneos (trombolítico), ou para potencializar o efeito citotóxico no tratamento de neoplasias [38,39].

Estima-se que o mercado global das enzimas terapêuticas alcance aproximadamente os 11 milhões de dólares em 2024 [40]. Estas enzimas encontram-se, na maior parte das vezes, comercializadas em pós liofilizados e podem ser utilizadas independentemente ou em associação com outros medicamentos. Existem quatro enzimas terapêuticas maioritárias: colagenase, L-asparaginase, streptoquinase e uricase. As colagenases encontram-se na pele, dentes, ossos, vasos sanguíneos e tendões pelo que são utilizadas no tratamento da doença de Dupuytren, de glaucoma, de celulite e na reparação de cartilagens. A L-asparaginase tem propriedades anticancerígenas e é expressa por várias bactérias como *E. coli* e *Enterobacter aerogenes*. A streptoquinase apresenta atividade trombolítica, pelo que é usada em doenças cardíacas. Já a uricase é usada para tratamento da gota, hiperuricemia e osteoporose e é isolada de culturas de *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo. O Xiaflex[®] (colagenase) e Oncaspar[®] (asparaginase) foram aprovados pela FDA para o tratamento da doença de Dupuytren e leucemia, respetivamente [40].

Outro exemplo da sua utilização é no tratamento de doentes com fibrose cística (CF, do inglês *cystic fibrosis*). Nesta doença, o sintoma principal é a produção e acumulação de muco extremamente viscoso nos pulmões, que compromete a função respiratória. Uma vez que nesta patologia, os pulmões encontram-se mais suscetíveis a infeções, a destruição das células microbianas, leva à formação de depósitos de DNA livre, com viscosidade elevada. A Pulmozyme[®] (dornase alfa) é um aerossol composto por desoxirribonuclease (DNase) recombinante humana, que tem a capacidade de reduzir

a viscosidade do muco presente nos pulmões através da degradação do ADN depositado. Assim, o doente tem maior facilidade em expelir as secreções [5,38].

2.6. Fatores de coagulação

O corpo humano produz naturalmente 12 fatores de coagulação, designados em numeração romana, I-XIII, com a exceção do VI, que atualmente é considerada a forma ativada do fator V (Va) ao invés de uma entidade separada [41]. Os fatores são indispensáveis à formação de trombina, que, quando ativada, converte o fibrinogénio em fibrina que se deposita no local da lesão, de forma a reduzir a perda de sangue. Estes fatores são ativados sequencialmente durante a cascata da coagulação sanguínea, pelo que, possíveis defeitos genéticos possam resultar em patologias. Um indivíduo com fatores VIII ou IX pouco funcionais ou até mesmo disfuncionais apresentará hemofilia A ou B, respetivamente. Esta condição é apenas tratada através da administração do fator de coagulação apropriado [5,21].

O primeiro fator de coagulação no mercado foi o Recombinate[®], em 1992. Este é um fator de coagulação recombinante VIII utilizado para tratamento de doentes com hemofilia A [42]. Outro exemplo é o BeneFix[®] (fator IX recombinante) que foi geneticamente modificado através da inserção do gene humano do fator IX numa linha celular de ovários de hamster e encontra-se aprovado para controlo e prevenção de episódios hemorrágicos em doentes com hemofilia B em 1997 [21]. Estes produtos biofarmacêuticos apresentam problemas relacionados com a eficácia, uma vez que o organismo os deteta e inibe através do bloqueamento dos epítomos funcionais por parte de anticorpos. Os fatores de coagulação mais recentes apresentam na sua composição proteínas recombinantes ou péptidos como ligandos, de forma a evitar a inibição e ao mesmo tempo aumentar a seletividade [42].

Os tempos de semivida destes produtos biofarmacêuticos são geralmente curtos (8-12h) pelo que são necessárias três injeções por semana para profilaxia e tratamento. Isto leva a uma reduzida adesão à terapêutica. O Eloctate[®], obtido por fusão de domínios da IgG1 ao fator VIII, é um exemplo de fator comercializado para tratamento de hemofilia A que apresenta um tempo de semivida superior em 1,5 vezes aos primeiros fatores comercializados, bem como uma taxa de sangramento anual reduzida [42].

2.7. Vacinas

Quando ocorre uma ameaça ao organismo, o sistema imunitário procede ao reconhecimento dos epítomos (partes específicas dos antígenos às quais os anticorpos se ligam após reconhecimento) presentes nos antígenos, normalmente efetuado pelo sistema inato, embora os linfócitos B também possam executá-lo. Caso seja um antígeno viral, este vai desencadear imunidade mediada por células, enquanto se for um antígeno bacteriano ou parasítico vai desencadear imunidade mediada por anticorpos [43]. Uma das formas de proporcionar imunidade é através da administração de vacinas, o que se denomina de imunização ativa artificial, que é capaz de estimular o sistema imunitário, sem causar doença. As vacinas podem dividir-se como sendo atenuadas, inativadas, subunitárias e toxoides, de acordo com as suas características e forma de obtenção [43].

As vacinas atenuadas contêm versões enfraquecidas em laboratório do agente patogénico original pelo que têm a capacidade de produzir uma resposta forte a nível celular e dos anticorpos o que leva a imunidade a longo prazo com apenas uma ou duas doses. Estas têm de ser refrigeradas de forma a preservar a bioactividade, uma vez que contêm organismos vivos. São exemplos as vacinas contra o sarampo e a varicela [43].

As vacinas inativadas são produzidas pela destruição do agente patogénico com químicos, calor ou radiação o que permite tornar a vacina mais estável. Como não contém organismos vivos, não precisa de refrigeração e pode ser submetida a processos de secagem para facilitar o transporte. No entanto, estas vacinas apresentam uma resposta imunitária mais reduzida, pelo que necessitam de ser administradas doses de reforço de forma a manter a imunidade. Um exemplo é a vacina contra o vírus influenza ou gripe [43]. Num estudo conduzido entre 2019 e 2020 em vários países europeus no qual se avaliou a eficácia de diversas vacinas para a gripe, como a Vaxigrip Tetra[®] e Influvac Tetra[®] e verificou-se que o número de infeções por vírus *influenza* em pessoas vacinadas em pessoas com idade ≥ 65 anos foi 467 enquanto o número de infeções em pessoas não vacinadas na mesma faixa etária foi 933. Por outro lado, na faixa etária entre os 6 meses e os 6 anos, o número de infeções em crianças vacinadas foi 110 enquanto nas não vacinadas foi 917. Isto demonstra que as vacinas contra o vírus da gripe são eficazes na prevenção da infeção [44].

As vacinas subunitárias apresentam apenas epítomos que estimulam mais rapidamente o sistema imunitário e, uma vez que utilizam poucos antígenos específicos, apresentam probabilidade reduzida de desencadear reações adversas. Esta especificidade,

no entanto, aumenta a dificuldade de determinar quais os antígenos a incluir na vacina. A vacina recombinante contra o vírus da hepatite B (HBV, do inglês *Hepatitis B virus*) é um exemplo [5,43]. Foi realizado um estudo com o objetivo de estudar a eficácia das vacinas Engerix B[®] e Recombivax HB[™] em doentes sob hemodiálise, uma vez que estes se encontram suscetíveis a infeções por vírus da hepatite B. Os pacientes foram separados em função da hora da hemodiálise (antes das 8:30h e depois das 8:30h) para averiguar se a hora influencia a eficácia. No grupo de pacientes vacinados com a Engerix B[®] foi observado um sucesso aproximado de 73% independentemente da hora. Já no grupo de vacinados com a Recombivax HB[™] a eficácia foi de 66,9% para o grupo que fez hemodiálise antes das 8:30h e de 61,8% para o grupo que fez depois das 8:30h. Isto demonstrou que independentemente da hora da hemodiálise a vacinação destes pacientes é vantajosa para prevenção de infeção e que, uma maior seroconversão derivada de uma noite de sono maior após a vacinação aumenta a eficácia da vacinação [45].

Um outro tipo de vacinas são as toxoides. Estas são produzidas através da inativação das toxinas bacterianas com formaldeído e depois de administradas estimulam uma resposta imunitária contra as toxinas da bactéria aquando da infeção. Exemplos são a vacina contra o tétano e difteria [43].

3. Instabilidade de produtos biofarmacêuticos

Visto os biofármacos terem uma etiologia essencialmente proteica, a sua estabilidade estrutural encontra-se intimamente relacionada com a sua bioatividade. As proteínas são sensíveis a variações de pH e temperatura, à luz e ao oxigénio [11,15]. Adicionalmente, os excipientes utilizados, a agitação aquando do manuseamento e o material utilizado na embalagem primária podem ser também factores de instabilidade, pelo que devem ser considerados nos processos de produção e acondicionamento. Desta forma, podem ser adicionados estabilizantes à formulação, descritos na secção 5, que têm um efeito protetor aumentando a estabilidade dos produtos biofarmacêuticos aquando dos processos de fabrico e armazenamento [8,11,15]. No geral, podemos dividir os processos de instabilidade como sendo químicos e físicos.

3.1. Instabilidade química

A instabilidade química advém da formação ou quebra de ligações covalentes na estrutura da proteína ou polipéptido levando à alteração da sua bioatividade. Isto pode dever-se a reações irreversíveis de oxidação, desamidação, hidrólise, racemização e β -eliminação, descritas nesta secção [9,11].

3.1.1. Oxidação

Esta reação química é um dos processos principais de degradação que ocorre nas proteínas e pode advir do contacto da proteína com o oxigénio atmosférico, com determinados excipientes como são o caso de polissorbatos e polietilenoglicóis (PEGs), com o peróxido libertado de plásticos utilizados na embalagem primária como seringas pré-cheias, ou ainda derivado do contacto com a luz, fenómeno denominado de foto-oxidação [11]. A taxa à qual a oxidação ocorre é afetada por fatores intrínsecos da proteína como a flexibilidade e a estrutura e por fatores extrínsecos como o pH e o tipo de tampão usado em solução [9]. As proteínas e péptidos têm na sua composição alguns aminoácidos que reagem com radicais livres de oxigénio presentes no meio, pelo que se tornam sensíveis a danos oxidativos. Os aminoácidos mais suscetíveis a esta reação são a metionina (Met), a cisteína (Cys), a histidina (His), o triptofano (Trp) e a tirosina (Tyr).

Os dois primeiros, Met e Cys, devido aos seus átomos de enxofre e os restantes, His, Trp e Tyr, derivado dos seus anéis aromáticos [9,11].

A oxidação pode acontecer na fase de produção, purificação, formulação e armazenamento, pelo que tem a capacidade de alterar as características das proteínas e induzir posteriormente fenómenos físicos de agregação ou fragmentação. Pode ainda afetar a potência e imunogenicidade dependendo da posição dos aminoácidos afetados. A oxidação da Met no fator humano de crescimento de células-tronco (huSCF, do inglês *human stem cell factor*) obtido por cultura de *E. coli* provocou uma redução na sua biopotência em 40% e 60%, na Met-36 e Met-38, respetivamente. Esta diminuição na potência advém de alterações da estrutura terciária. Outro exemplo é a oxidação da Met no IFN- α 2b que afeta as estruturas primária, secundária e terciária impedindo o reconhecimento do epítipo por parte de um mAb [11].

A foto-oxidação ocorre quando um composto absorve um determinado comprimento de onda luminosa, o que induz um aumento da energia da molécula para o estado excitado. Neste, a molécula consegue fazer a transferência da energia para o oxigénio, levando à oxidação [9,11]. Na hrGH submetida a luminosidade intensa a oxidação ocorreu predominantemente na His-21, o que demonstra que a foto-oxidação é específica [11]. Em formulações com concentrações elevadas em mAbs contendo imunoglobulina G (IgG) a foto-oxidação levou à perda de bioatividade e à descoloração [9].

Por vezes, a instabilidade química pode gerar alterações físicas da formulação, como é o caso do fenómeno de agregação após ocorrer oxidação, e interferir com a segurança e eficácia do produto [11]. De forma a minimizar os efeitos prejudiciais da oxidação das proteínas, podem ser adicionados excipientes como polióis e açúcares, que têm como objetivo estabilizar a estrutura da proteína, diminuindo a taxa de oxidação (ver secção 5) [9,11].

3.1.2. Desamidação

A desamidação é uma reação química na qual um grupo funcional amida é removido de um aminoácido e é considerada a forma de degradação mais comum para proteínas e péptidos [9]. Esta reação ocorre com frequência, em proteínas recombinantes, nos resíduos glutamina (Gln) e asparagina (Asn). A perda da amina pode afetar negativamente a estabilidade estrutural e funcional, alterar o local de clivagem de

hormonas, aumentar a atividade de interferões e/ou diminuir a afinidade para moléculas alvo [11]. Algumas das consequências que podem ocorrer na estrutura da proteína são a isomerização, comum em desamidação não enzimática, racemização em pH alcalino e truncação a valores de pH reduzidos. No entanto, a taxa de desamidação depende da estrutura primária do aminoácido, da estrutura tridimensional e das propriedades da formulação (pH, temperatura, íões da solução tampão) [11].

A desamidação do IFN- β é um processo que normalmente é lento e não afeta a atividade em condições fisiológicas, no entanto, num estudo anterior verificou-se que a desamidação da Asn-46 do IFN- β pode ocorrer num espaço de dias até meses, com um tempo médio de degradação previsto de 23,1 dias o que é prejudicial, uma vez que este produto biofarmacêutico tem de se manter inalterado durante o tempo de prateleira que deverá chegar aos dois anos. Esta rápida degradação deve-se à elevada propensão da sequência para sofrer a desamidação que anula a proteção conferida pela conformação [46]. Noutro estudo, a desamidação da Asn no antígeno do fragmento C da toxina do tétano provocou uma redução do reconhecimento do mesmo por parte das células apresentadoras de antígeno o que resultou numa atividade e eficiência reduzida, dificultado o reconhecimento de epítomos o que desencadeia, subsequentemente, uma resposta imunitária deficiente [47].

É possível minimizar a taxa de desamidação através da utilização de soluções com valores de pH entre 3 e 5 e da secagem das proteínas em, por exemplo, pós liofilizados, visto que existe uma quantidade limitada de água livre na qual a reação pode acontecer. Por outro lado, a adição de solutos como glicerol, sacarose e etanol na solução de proteína, também reduz esta reação, visto diminuírem a força dielétrica, o que tem como resultado uma menor taxa de isomerização e desamidação [9,11].

3.1.3. Hidrólise

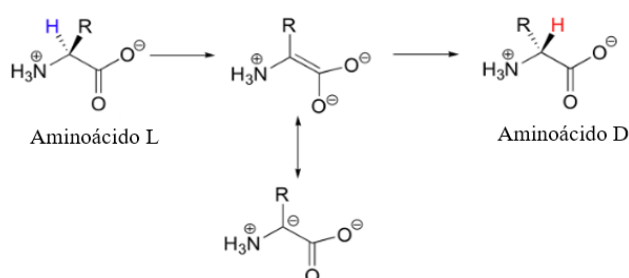
Proteínas com duas ou mais subunidades podem dissociar-se em monómeros que, posteriormente, podem fragmentar-se em péptidos. Normalmente, a fragmentação ocorre por hidrólise das ligações peptídicas entre aminoácidos libertando polipéptidos de menor peso molecular que a proteína intacta [9,11].

No caso dos anticorpos monoclonais, a hidrólise acontece recorrentemente na região dobradiça (Figura 2) potenciada pela flexibilidade dessa zona. No entanto, a valores de pH mais ácidos, a região na qual a hidrólise ocorre é alterada, podendo dar-se

noutra região (variável ou constante) [9,11,48]. As imunoglobulinas são compostos nos quais esta reação acontece com frequência, como a OKT3 abordada anteriormente, e que leva à sua fragmentação na zona variável ou constante. Nestes casos, a hidrólise não é específica para uma determinada ligação peptídica, mas sim para uma determinada sequência [9]. A fragmentação (Figura 2) tem efeito direto na potência do produto, uma vez que a ligação do anticorpo vai encontrar-se comprometida. Isto porque recorrentemente o recetor necessita do anticorpo completo para efetuar o reconhecimento e ligação [49]. A hidrólise pode ocorrer ainda devido à autoprotólise de proteínas enzimáticas, derivada da atividade proteolítica de proteases residuais ou contaminantes e pode também desencadear-se a reação de hidrólise pela presença de metais [11,49].

A racemização e a β -eliminação são outras duas formas de degradação por hidrólise que se encontram relacionadas, uma vez que o passo inicial é o mesmo e baseia-se na desprotonação de um átomo de hidrogénio ligado ao carbono- α [9]. A ligação C-H do aminoácido apresenta algum carácter ácido, pelo que a racemização (Figura 3) é um processo lento. Depois da ionização da ligação a pH básico, pode ocorrer a recombinação do carbanião e um grupo pode ser retirado do carbono- β , reação apelidada de β -eliminação. A temperaturas elevadas a reação de eliminação ocorre relativamente rápido em várias proteínas, no resíduo Cys. Um produto biofarmacêutico que sofre a reação de β -eliminação é a IgG1 que, quando armazenada por longos períodos, leva à fragmentação dos anticorpos em solução [9,11,50].

Racemização



β -Eliminação

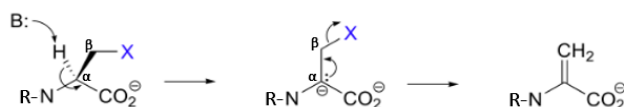


Figura 3. Reações de racemização e β -eliminação. *Adaptado com autorização a partir de [9].*

Estas reações de degradação podem ser diminuídas através da tamponação correta das soluções de proteína de forma a minimizar variações de pH no intervalo ótimo para cada proteína e pela purificação de forma a reduzir a presença de proteases. A utilização de agentes quelantes é também uma alternativa que permite reduzir também a taxa de degradação [9,11].

3.2. Instabilidade física

A instabilidade física manifesta-se quando ocorre alteração da estrutura da proteína sem alterar a sua composição, muitas vezes associada a interações não covalentes entre as proteínas e as superfícies. Isto pode resultar em fenómenos de adsorção, desnaturação, agregação e precipitação. Estes dois últimos encontram-se, muitas vezes, associados a um aumento do risco de imunogenicidade [9,10].

3.2.1. Desnaturação

A desnaturação proteica ocorre dependentemente da temperatura ou da presença de compostos como a guanidina e leva a que a proteína apresente uma capacidade de ligação reduzida, levando à perda da estrutura tridimensional ou globular que boa parte das proteínas apresentam. Assim, a proteína altera o estado físico, mas a composição química mantém-se. No entanto, uma vez que as condições de armazenamento de produtos biofarmacêuticos tipicamente envolvem refrigeração a temperaturas entre 2° C e 8° C, é um fenómeno que se pode mitigar [10]. Esta forma de instabilidade física pode resultar essencialmente de *stress* térmico ou químico [9].

A forma mais comum de desnaturação ocorre quando as proteínas são submetidas a temperaturas elevadas e é normalmente irreversível, visto as moléculas desdobradas associarem-se rapidamente em agregados. Por outro lado, a desnaturação também pode derivar da exposição da proteína a temperaturas baixas, algo conhecido desde 1961. Tendo em conta que a temperatura de transição para o estado vítreo para a maioria das proteínas é consideravelmente abaixo dos -20 °C, a mobilidade no estado sólido congelado a essa temperatura é semelhante ao estado líquido, o que significa que o potencial para ocorrer desnaturação é elevado. Num estudo realizado para estudar a desnaturação a baixas temperaturas observou-se que a IL-1 desnatura a temperaturas aproximadas a -10° C com facilidade. No entanto, quando a temperatura se encontra

abaixo dos -30°C o produto biofarmacêutico atinge o estado vítreo e não desnatura com tanta facilidade [9].

A desnaturação química deriva, comumente, da adição de agentes que aumentam a destabilização da proteína (agentes caotrópicos), como a ureia. Estes agentes ligam-se às proteínas reduzindo o seu potencial químico. Uma vez que, normalmente, a proteína no estado desdobrado tem uma área de superfície superior ao do estado nativo o potencial químico encontra-se bastante reduzido. Quando o potencial é inferior ao do estado nativo, a proteína desdobra devido a repulsões eletrostáticas [9].

A secagem dos produtos biofarmacêuticos e a adição de estabilizantes como surfactantes, polióis ou açúcares são formas de reduzir a desnaturação bem como a agregação subsequente [9,51].

3.2.2. Adsorção

A adsorção é o fenómeno no qual as moléculas ou iões, de uma solução, são atraídos ou retidos numa superfície sólida. As proteínas contactam com diversas superfícies durante o processo de fabrico, pelo que é importante a estabilização interfacial deste produto biológico. Este fenómeno, para além de alterar a estrutura da proteína pode induzir a sua degradação [9–11].

Em solução aquosa, as proteínas podem adsorver no vidro, plástico ou metal, por exemplo. Esta reação é mais propensa a acontecer quando a proteína se encontra parcialmente desdobrada pois existe uma maior exposição de aminoácidos, que normalmente se encontram numa zona central da proteína, logo a reação é energeticamente favorável. Depois da adsorção, a força de tensão superficial pode provocar agregação das moléculas que se encontram localizadas na região interfacial [9,10]. A adsorção proteica pode ser reversível ou irreversível e pode levar a desdobramento parcial ou completo da proteína ou até nem causar perturbações na estrutura. Caso a adsorção seja reversível é possível que quando voltem ao estado normal apresentem danos na sua estrutura, o que poderá desencadear agregação [52]. A IL-2, em solução aquosa demonstra apresentar adsorção irreversível em vidro e a IgG1 adsorve em plástico, o que provoca redução dos níveis de anticorpos, no entanto, em menor quantidade do que em vidro [9,52,53].

A proteína, enquanto solução, encontra-se em contacto com diversas interfaces: ar-líquido, sólido-líquido e líquido-líquido. De entre as várias interfaces com as quais a

proteína contacta a interface ar-líquido é a que potencialmente causa mais instabilidade induzida por agitação, visto que pode manifestar-se no manuseamento, armazenamento e transporte. Como resultado surge a agregação proteica na região interfacial [9,52]. Por exemplo, a agitação em vortex de uma hormona de crescimento porcina durante um minuto levou à sua agregação extensiva [9]. Foi observada ainda agregação promovida por agitação de produtos biofarmacêuticos como o fator recombinante XIII, hrGH e insulina [11].

A escolha de outros solutos na formulação tem elevada importância nesta forma de degradação, tendo em conta que excipientes como a sacarose, podem aumentar a adsorção uma vez que aumenta a tensão interfacial. De forma a reduzir estas reações de degradação adicionam-se à formulação de proteína agentes surfactantes que atuam reduzindo a tensão interfacial [9,10].

3.2.3. Agregação e precipitação

O fenómeno de agregação é de extrema importância no que concerne aos produtos biofarmacêuticos, pois pode estar relacionada a perda de bioatividade e imunogenicidade aumentada, o que pode ter efeitos prejudiciais na saúde dos pacientes [9]. Os agregados podem ativar o sistema imunitário para uma resposta antigénica derivada ao não reconhecimento da macromolécula e podem também alterar a dinâmica de fluidos no organismo. Mais ainda, estes fazem com que a solução fique turbida ou evidencie partículas em suspensão, reduzindo a sua qualidade aparente. A agregação pode ser causada desde a expressão incorreta da proteína até à alteração da conformação nativa durante a purificação, formulação, liofilização, transporte e/ou armazenamento. Por outro lado, agregação proteica pode ser espontânea uma vez que estes produtos biológicos apresentam capacidade para formar partículas autonomamente derivadas da associação de monómeros com a conformação alterada. No entanto é um fenómeno que pode ser induzido ou potenciado pela presença de materiais como silicone, o que se designa de agregação induzida pela superfície. Excipientes como trehalose e sorbitol são adicionados com o objetivo de reduzir a agregação proteica no estado congelado – crioprotectores [9–11].

A reação de agregação é um problema comum que deriva exponencialmente da exposição da proteína a ar, sólidos ou líquidos, formando interfaces e ainda da exposição a temperaturas extremas. Para além disso, *stresses* mecânicos de agitação e congelação

são outros dois fatores que podem levar à agregação proteica [9]. A temperatura, concentração, pH e força iônica da solução são fatores que afetam a quantidade de agregados formados, podendo estes serem solúveis ou insolúveis, reversíveis ou irreversíveis. Normalmente, os agregados solúveis são reversíveis através da alteração das características da solução como a temperatura ou através da ruptura da agregação por processos físicos como a filtração. Por outro lado, agregados insolúveis são tipicamente irreversíveis, pelo que sob agitação vigorosa ou congelamento podem formar precipitados [9,11]. Um estudo elaborado com o objetivo de avaliar a imunogenicidade de proteínas verificou que Betaferon[®] e Extavia[®], ambos interferão- β 1b, apresentaram uma elevada imunogenicidade derivada do elevado conteúdo em agregados induzidos por ultracentrifugação [54]. Noutro estudo, o bevacizumab perdeu 50% da IgG ativa depois de ser reconstituído para armazenamento em solução e apresentou um aumento de partículas nas soluções [11].

A precipitação pode advir da formação contínua de agregados solúveis até que o agregado atinja um estado em que não é solúvel. Isto resulta na turbidez da solução e é irreversível uma vez que a proteína se encontra parcial ou totalmente desdobrada. Por outro lado, quando a precipitação é causada pela adição de sais, as proteínas normalmente mantêm a sua atividade e estrutura e a precipitação é parcialmente reversível através de diluições [9]. Isto verificou-se num estudo em que se congelou a hormona estimulante da tiroide (TSH, do inglês *thyroid-stimulating hormone*). Quando armazenada a -80° C, 4° C e 24° C durante 90 dias manteve-se estável, no entanto, quando congelada a -20° C perdeu mais de 40% da bioactividade no mesmo período de tempo, derivado da dissociação das subunidades [11].

Os fenómenos de agregação e precipitação podem ser reduzidos através de medidas preventivas como a otimização das características da solução, a adição de açúcares ou surfactantes ou ainda a adição de agentes quelantes [9,11].

4. Técnicas de secagem de produtos biofarmacêuticos

A secagem é um processo fundamental na produção de produtos biofarmacêuticos. A remoção das moléculas de água serve diferentes propósitos: manutenção da estabilidade física e química, morfologia do sólido, e reprodutibilidade do produto final. Adicionalmente, a secagem tem a capacidade de aumentar o prazo de validade do medicamento, bem como a redução dos custos de transporte [55,56]. O aumento da estabilidade dos biofármacos através da secagem deve-se, principalmente, à diminuição da mobilidade das proteínas e da redução das vias de degradação provenientes da presença de água em formulação [8].

As características do pó são afetadas pelos parâmetros de secagem como a duração, a temperatura, a agitação e a presença de vácuo, pelo que estes têm de adequar-se ao objetivo. Portanto, dependendo do produto acabado pretendido e das suas propriedades, a escolha da técnica de secagem é fulcral, no aspeto em que cada uma submete as formulações a diferentes *stresses* podendo comprometer a estabilidade. Assim, um baixo conteúdo em água, uma rápida reconstituição e a estabilidade da proteína são condições fundamentais [57,58]. É ainda relevante ter em conta os fatores específicos para as vias de administração nasal e pulmonares. Uma vez que estas apresentam barreiras biológicas, como macrófagos alveolares, o tamanho de partícula deve ser inferior a 0,3 μm ou superior a 6 μm de forma a reduzir o reconhecimento pelos macrófagos. A aparência do produto biofarmacêutico a ser usado também tem importância de forma a garantir uma boa adesão à terapêutica e controlo de qualidade. Produtos biofarmacêuticos administrados como pós inaláveis como IgG1 e Omalizumab[®] são exemplos que têm de respeitar estas condições e são utilizados para o tratamento de asma, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e outras doenças pulmonares [8,10,59].

As técnicas de secagem podem ser classificadas de acordo com o seu mecanismo de remoção de solvente. A maioria das técnicas utiliza mecanismos de evaporação, como a atomização, a eletropulverização, a secagem a vácuo e secagem em leito de espuma, ou sublimação, como a liofilização e liofilização com atomização. Existe ainda outra técnica mais recente envolvendo um mecanismo de precipitação denominada de secagem supercrítica. As vantagens e desvantagens das diferentes técnicas de secagem abordadas estão expostas na Tabela 3. As características do produto pretendido e o tipo de

biofármaco têm um papel preponderante na escolha da técnica de secagem mais adequada [60].

Tabela 3. Vantagens e desvantagens das técnicas de secagem para estabilização de produtos biofarmacêuticos. *Adaptado com autorização partir de [8,14,61,62].*

Técnica de secagem	Vantagens	Desvantagens
Atomização	<ul style="list-style-type: none"> - Simples - Boa relação custo-efetividade - Rapidez - Utilidade em escala industrial - Design das características do produto 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessário temperaturas elevadas - Inadequado para produtos termossensíveis
Eletropulverização	<ul style="list-style-type: none"> - Proteção contra desnaturação - Atividade biológica intacta - Baixo custo 	<ul style="list-style-type: none"> - Difícil transposição de escala
Secagem a vácuo	<ul style="list-style-type: none"> - Baixo consumo energético - Rapidez - Mantém a integridade da amostra 	<ul style="list-style-type: none"> - Impossibilidade de design das características do produto - Inadequado para produtos com elevado conteúdo em água
Secagem em leito de espuma	<ul style="list-style-type: none"> - Estabilidade a elevadas temperaturas 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado risco de desnaturação e agregação - Aparência variável que dificulta o controlo de qualidade

Liofilização	<ul style="list-style-type: none"> - Adequado a produtos termolábeis - Baixo teor de humidade do produto - Fácil reconstituição do produto - Produto homogéneo e com bom aspeto 	<ul style="list-style-type: none"> - Custo - Tempo do processo
Liofilização com atomização	<ul style="list-style-type: none"> - Baixo consumo energético - Rendimento elevado 	<ul style="list-style-type: none"> - Processo complexo e demorado - Custo
Secagem supercrítica	<ul style="list-style-type: none"> - Rapidez - Possibilidade de manipulação das características do produto - Ajustável à escala industrial 	<ul style="list-style-type: none"> - Exposição a solvente orgânico - Custo elevado

4.1. Evaporação com atomização

Este é um mecanismo que se caracteriza pela remoção de solvente através da transferência de energia térmica à solução, por condução, convecção ou radiação. A energia induz o aquecimento do líquido, promovendo a sua vaporização. O vapor é subsequentemente separado e, muitas vezes, condensado [63]. Do ponto de vista económico, a eficiência da transferência de calor e da separação das fases são os fatores que têm maior influência nos custos, pelo que se tornam importantes na redução das perdas de produto. A transferência de calor pode ser feita através de condução, convecção ou radiação. Quando a transferência é feita por condução, a condutividade térmica (K) tem uma elevada importância na eficácia do mecanismo, uma vez que determina a capacidade de passagem de calor de um material para outro. Por exemplo o ar apresenta um valor de K de 0,024 J/smK enquanto o aço inoxidável apresenta um valor de 15,93

J/smK, o que significa que o aço inoxidável tem uma capacidade superior ao ar na transferência de calor [63].

Para evitar uma evaporação excessiva podem adicionar-se óleos no topo da amostra, para formar uma camada protetora sobre as proteínas terapêuticas estabilizando-as graças à manutenção do tamanho hidrodinâmico (HD) quando submetidas a temperaturas elevadas. Assim, o óleo tem o intuito de homogeneizar o tamanho dos produtos por toda a amostra, visto que uma evaporação excessiva leva a agregação proteica [64]. Sabe-se que o tamanho HD dos mAbs é aproximadamente 10 ± 2 nm e, como tal, foram feitos estudos para corroborar esta técnica de homogeneização nestes produtos biofarmacêuticos utilizando cetuximab, golimumab, panitumumab, bevacizumab e etanercept. Verificou-se que, sem adição de óleo, ocorreram flutuações no tamanho HD após 8 horas correspondentes à duração da avaliação. No entanto, após o mesmo período com a adição de óleo o tamanho HD manteve-se estável à exceção do bevacizumab e etanercept [64].

As técnicas de atomização e eletropulverização são exemplos de processos de secagem que usufruem de mecanismos de evaporação para remoção de solvente. A atomização baseia-se na dispersão de uma solução contendo o produto biofarmacêutico num meio de secagem composto por um gás a temperaturas elevadas. Já a eletropulverização baseia-se na criação de uma dispersão de gotículas através da aplicação de energia elétrica à solução contendo o produto biofarmacêutico [13,65].

4.1.1. Atomização

A técnica de atomização (ou *spray drying*) consiste na transformação do líquido para um estado particulado seco através da pulverização do líquido num meio de secagem gasoso. É uma técnica que se encontra patenteada desde 1872 e a sua primeira aplicação em âmbito farmacêutico foi para a obtenção de extratos secos de fármacos provenientes de plantas. Esta técnica teve um crescimento exponencial, aquando da 2ª Guerra Mundial, derivado da necessidade de transportar elevadas quantidades de comida, mantendo um volume e peso reduzidos [66–68]. A atomização é uma operação de secagem composta por três passos, sendo estes, atomização, desidratação e a recolha do sólido (Figura 4). Durante a atomização, ocorre uma dispersão do líquido num gás de secagem, o que induz

a exposição de grandes áreas de superfície à secagem, facilitando a transferência de calor do gás para o fluido, fazendo o solvente evaporar em segundos [65].

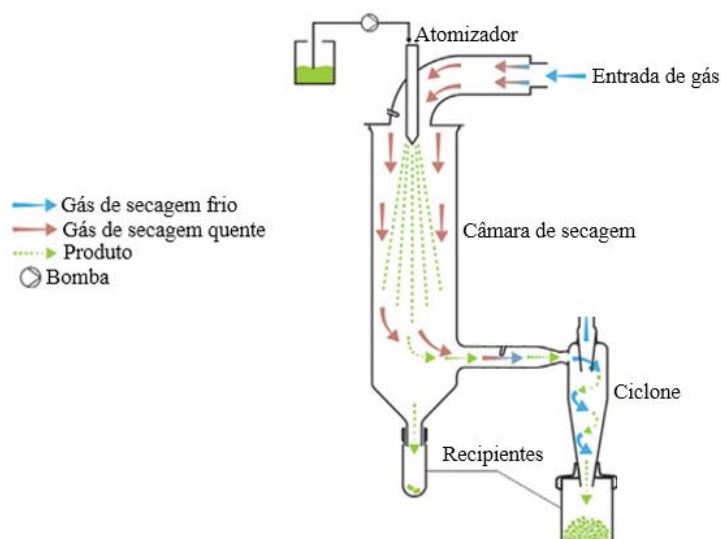


Figura 4. Processo convencional de secagem por atomização.
Adaptado com autorização de [68].

Existem diferentes tipos de atomizadores convencionais: rotativos, bocais hidráulicos e bocais pneumáticos. Os rotativos têm forma de disco horizontal, no qual o líquido é colocado. A força de centrifugação provoca a projeção da solução formando assim uma “nuvem” de gotas. Estes atomizadores são os mais eficazes nesta técnica, no entanto, para formulações dispendiosas, não se adequam visto produzirem mais depósitos de produto nas paredes da câmara de atomização [66]. Os bocais hidráulicos (ou de fluido único) provocam a circulação sob pressão do líquido num diâmetro decrescente. Desta forma, a solução, ao ser libertada vai aumentar a velocidade e atomizar. Este método de atomização não é adequado para soluções viscosas devido ao risco de entupimento. Para além disso, estes atomizadores apresentam um desgaste rápido quando são usadas suspensões [66]. Os bocais pneumáticos (ou de múltiplos fluidos) têm gás comprimido que induz fricção elevada quando colide com a solução, levando à desintegração desta em gotículas. Este é o atomizador mais popular para preparação de produtos

farmacêuticos, pois permite a produção eficaz de micro e nanocápsulas, dispersões sólidas, pós para inalação e pós de proteína com boa estabilidade [66].

Imediatamente após a atomização, as gotículas são imediatamente expostas ao gás de secagem, normalmente, ar atmosférico filtrado e pré-aquecido. Este processo ocorre numa câmara, frequentemente, vertical e com formato cilíndrico que tem um cone invertido no fundo, de onde é recolhido o pó. O fluxo do ar na câmara pode ser concorrente, contracorrente ou combinado ao das gotículas (Figura 5). O mecanismo concorrente (tanto as gotas como o fluxo de ar são descendentes, do topo para a base da câmara) é o mais utilizado, sendo usado para secar substâncias que são relativamente fáceis de secar a elevadas temperaturas sem correr risco de sobreaquecimento. No mecanismo contracorrente (as gotas descendem do atomizador e o ar ascende da base para o topo da câmara) as gotas com maior quantidade de solvente atingem o ar mais frio e ascendem até completarem a secagem a temperaturas mais elevadas. Este mecanismo é pouco utilizado e origina pós porosos de baixa densidade e com diâmetro elevado, pelo que a aglomeração é bastante comum. No mecanismo combinado, o líquido é atomizado na direção do topo da câmara enquanto o fluxo de ar desce para o fundo da câmara, a mistura de produto seco com húmido, o que pode ser problemático. Assim, este mecanismo é utilizado para secagem de substâncias termicamente estáveis [66].

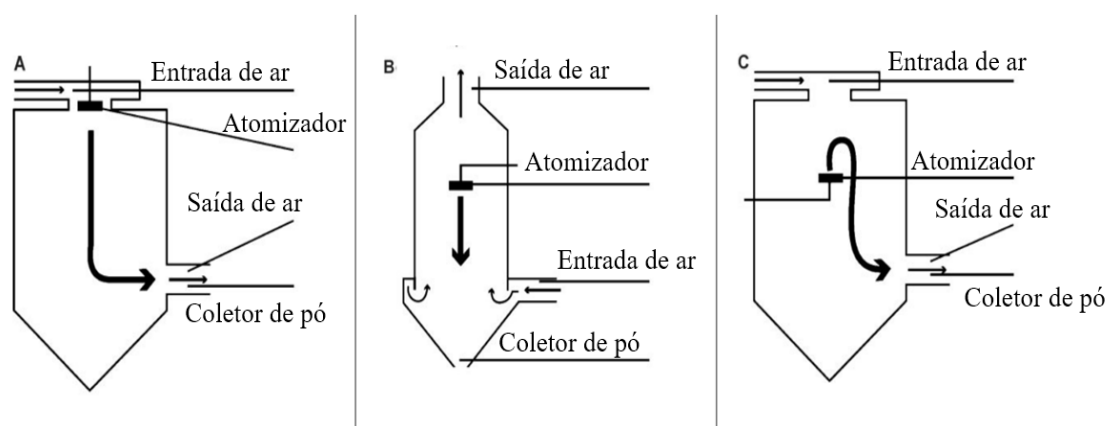


Figura 5. Mecanismos de fluxo de ar utilizados na técnica de atomização. A: *Concorrente*; B: *Contracorrente*; C: *Combinado*. Adaptado com autorização a partir de [66].

Depois do produto estar seco fica no fundo da câmara ou é expelido com o ar. A sua recolha é feita, na maior parte das vezes, por ciclones, que têm a capacidade de separar as partículas sólidas do ar através de movimento rotacional [66]. O primeiro produto biofarmacêutico obtido a partir da utilização desta técnica de secagem foi o Exubera[®], uma preparação de insulina inalável para o tratamento de diabetes [8,56].

Um dos desafios da produção de produtos biofarmacêuticos através desta técnica é a temperatura elevada à qual os fármacos são submetidos, pelo que a adição de estabilizantes e protetores tem uma importância elevada para impedir degradação [61]. A adição de agentes estabilizantes como polissorbato 20 durante a secagem de hrGH permitiu a formação de partículas de pó com propriedades para administração por via respiratória, derivado da proteção da proteína contra as interfaces ar-líquido durante a atomização [67]. Num estudo por Bowen et al. a utilização de trehalose como agente estabilizador na secagem de mAbs permitiu manter 95% da quantidade em mAbs da amostra inicial. Para além disso, Gikanga et al. deu seguimento ao estudo em condições de produção em maior escala. Aquando do armazenamento de pós de dois mAbs diferentes, a 25° C e 40° C durante 6 e 3 meses, respetivamente, verificou-se que, em comparação com a formulação líquida, um dos mAbs quando armazenado a menor temperatura apresentou uma menor agregação na forma de pó, enquanto no outro mAb o que se observou foi o inverso. Assim, concluiu-se que as condições de secagem têm de ser adaptadas de acordo com o produto biofarmacêutico [56].

4.1.2. Eletropulverização

A técnica de eletropulverização tem como objetivo a produção de sólido seco através de descargas elétricas e foi primeiramente descrita em 1600 [61]. Esta técnica tem quatro elementos principais: um sistema de bombeamento, um bocal metálico, uma fonte de alimentação de alta voltagem que se encontra conectada ao bocal e um substrato com ligação à terra, que atua como coletor. O diagrama do processo (Figura 6) começa com o líquido a passar no bocal carregado com corrente, ficando submetido a um campo elétrico. Como resultado, forma-se um jato de forma cónica que se quebra em gotas devido à influência do potencial elétrico. Durante a dispersão, a evaporação do solvente provoca o encolhimento das gotas, o que provoca o aumento da concentração da carga, levando à quebra em gotas menores – rotura de Coulomb. Estas gotas com carga irão depositar-se numa placa com um eletrodo terra [13,61,69,70].

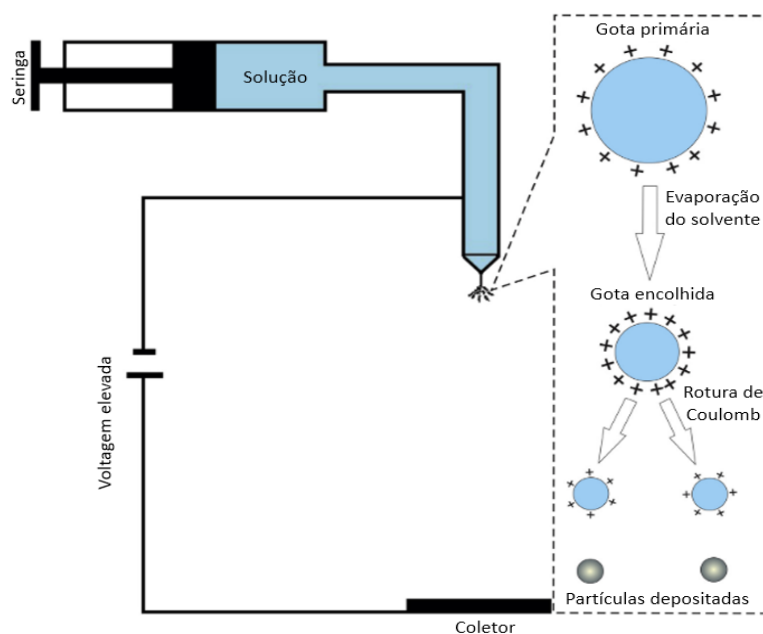


Figura 6. Processo de eletropulverização. *Adaptado a partir de [13].*

Através desta técnica é possível alcançar diferentes tipos de pulverização do líquido, controlando o *stress* elétrico, a velocidade de saída do líquido e a condutividade do mesmo. Fazendo variar a distância entre o bocal e o substrato coletor pode alterar-se o tamanho da partícula sólida, pois quanto maior a distância entre estes, menor é o tamanho do produto. Além disso, sabe-se que a concentração do líquido tem influência na obtenção do jato cônico e, utilizando uma concentração baixa com um fluxo reduzido alcançam-se partículas de menor tamanho do que se usasse concentração e fluxo elevados [61,69,71,72].

Encontra-se bem documentada a utilização deste método para a obtenção de partículas de pó monodisperso de tamanho muito fino [61,70]. Através da utilização de uma emulsão é possível controlar a dispersão e morfologia das partículas sem que ocorra desnaturação dos biofármacos. Não obstante, esta metodologia de secagem tem potencial para reduzir ou parar a degradação de proteínas, mantendo a sua atividade biológica [70]. Esta é uma técnica promissora para a secagem de produtos biofarmacêuticos. Num estudo anterior foi explorada a capacidade de produção de pó de insulina e observou-se que o pó obtido foi praticamente monodisperso, com diâmetro de 110 nm e a bioatividade da insulina foi preservada, quando comparada com a insulina no estado nativo. Noutro estudo foi explorada a capacidade para produção de enzimas terapêuticas utilizando como

modelo a ciclodextrina glucanotransferase e obteve-se pó com tamanho de 75 nm sem perda de atividade em comparação com a enzima nativa [13].

Esta técnica é bastante efetiva para aplicações farmacêuticas, visto que produz partículas de tamanho reduzido, com pequenas variações no tamanho e sem problemas de aglomeração, podem ser usados produtos sensíveis como proteínas, a linha de processos requer baixo investimento, não precisa de temperatura elevada, pode usar-se pouca ou nenhuma emulsão e o produto final pode não precisar de secagem adicional. No entanto, algumas dificuldades derivam de o jato cônico ser um requisito para a obtenção de partículas monodispersas e da condutividade e viscosidade do líquido [13,61,69].

4.2. Evaporação sem atomização

O mecanismo de evaporação sem atomização é utilizado quando se tem conhecimento de que o produto a manipular é vulnerável ao processo de atomização devido a uma elevada interface ar-água. As técnicas executadas com este mecanismo baseiam-se na evaporação a partir de uma solução a pressão reduzida. Para concretização destas técnicas, é necessário uma câmara de secagem, um condensador e uma bomba de vácuo [60].

4.2.1. Secagem a vácuo

Esta técnica tem semelhanças à liofilização, com a diferença principal de que as amostras são secadas por evaporação, pelo que se encontram no estado líquido antes da remoção de água [73]. As amostras contendo produtos biofarmacêuticos são submetidas a pressões reduzidas dentro da câmara de secagem, o que permite a utilização de temperaturas reduzidas para uma secagem rápida. O calor é normalmente fornecido por vapor ou água quente que se desloca em prateleiras ocas, pelo que na maior parte do processo, a amostra encontra-se a temperatura aproximada à do solvente. Assim, conclui-se que a transferência de calor é feita de forma indireta, por condução entre a superfície aquecida e a amostra. Estas são características que tornam esta técnica promissora para a formulação de compostos sensíveis ao calor [14].

A temperatura à qual o processo de secagem ocorre é inferior à utilizada na técnica de atomização, pelo que se pode considerar um processo menos agressivo no que respeita a uma possível degradação térmica, o que diminui o risco de inviabilidade aquando da

secagem de produtos sensíveis ao calor. Além deste fator, como o processo se dá em vácuo e dessa forma não existe oxigênio no ambiente, o *stress* oxidativo é limitado [14,73].

O aparelho mais comum para uso laboratorial ou de pequena escala é o secador de tabuleiros, que se encontram dentro de uma câmara de vácuo, garantindo a homogeneidade do calor em todas as plataformas (Figura 7). Uma vez que o resultado da secagem é um aglomerado de pó, regularmente, requer procedimentos adicionais de moagem ou tamisação de forma a obter partículas de pó individualizadas [14].

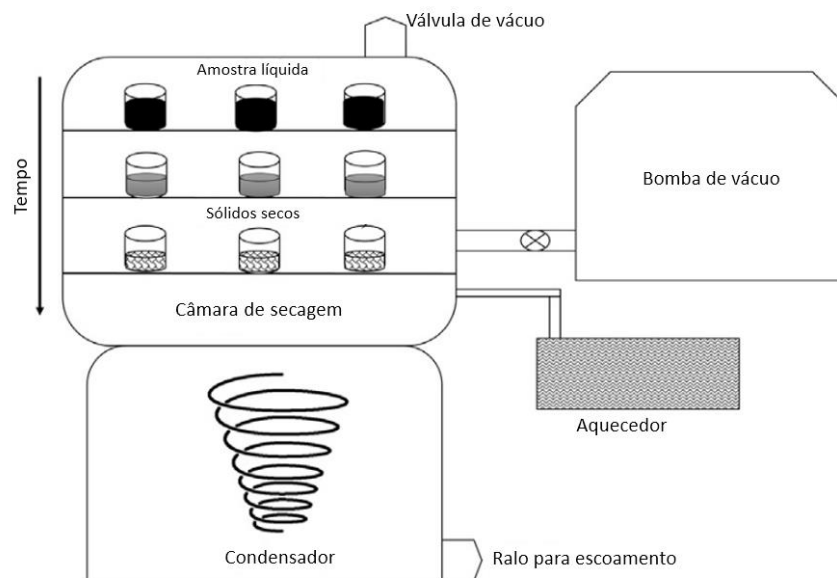


Figura 7. Processo de secagem a vácuo. *Adaptado com autorização a partir de [73].*

Uma variação promissora é a utilização de uma câmara de vácuo com capacidade de emissão de microondas. As microondas são uma forma de radiação eletromagnética com frequências que variam entre 300 GHz até 300 MHz e a sua utilização nesta técnica é feita com o intuito da transferência de energia ser feita com base nas interações moleculares quando a amostra é submetida a um campo eletromagnético. Uma vez que quando submetidas a estas radiações as moléculas invertem a sua orientação rapidamente conforme a orientação do campo elétrico, a sua energia cinética e fricção aumentam e, conseqüentemente, dá-se a conversão de energia elétrica em térmica. Esta metodologia de secagem chama-se secagem a vácuo com microondas (*microwave vacuum drying*) e é considerada a técnica de secagem mais rápida em sistemas de um único aparelho de processamento [14]. Num estudo utilizou-se esta técnica para avaliar a secagem de

vacinas de vírus vivo em comparação com a liofilização. Observou-se que o ciclo de secagem foi 87% mais reduzido em comparação com a técnica de liofilização e a secagem deu-se em 6,5h. Já na liofilização a secagem demorou aproximadamente 50 horas. Para além disso, o liofilizado e o pó seco por microondas apresentaram uma recuperação de atividade de 80,9% e 78,3%, respetivamente [74].

Uma das aplicações da técnica de secagem a vácuo é na formulação de pós de proteínas após a precipitação com PEGs. É um processo simples, económico e rápido, que tem a capacidade de preservar a estrutura e conformação das proteínas durante a secagem e armazenamento e ainda as protege da desnaturação [14,75,76]. Num estudo no qual foi aplicada a técnica de secagem a vácuo para a secagem de IFN- α 2a com e sem precipitação por PEGs verificou-se que o tempo de reconstituição das formulações secas por vácuo foi o dobro em comparação às secas por liofilização, o que não foi considerada uma diferença significativa. As formulações mantiveram-se estáveis nos estudos de estabilidade durante seis meses com temperatura de 40 °C, com destaque para o pó previamente precipitado. Para além disso, nenhuma das formulações apresentou qualquer fenómeno de agregação ao fim dos seis meses, o que demonstra que esta técnica é adequada para a formulação de produtos biofarmacêuticos mantendo a sua estabilidade [76].

4.2.2. Secagem em leito de espuma

Esta técnica baseia-se num processo de vitrificação no qual a remoção da humidade é feita através da utilização de vácuo seguida de uma evaporação rápida, obtendo-se uma espuma. Uma espuma sólida não é necessariamente o produto final e pode ser submetida a outros processos, como liofilização. Assim, a secagem em leito de espuma pode relacionar-se com qualquer processo que envolva um estado de espuma, seja no produto final ou intermediário [62,75].

É um processo similar à liofilização, no entanto, no primeiro passo de secagem a remoção de água é feita através de temperaturas intermédias visto a aplicação de vácuo reduzir a temperatura necessária para evaporar o solvente. Apesar do produto não ser inicialmente congelado, este fenómeno pode acontecer devido ao arrefecimento aquando da evaporação. Assim, conforme a quantidade de água reduz, a viscosidade da formulação aumenta e começa a formar-se uma espuma. Na secagem secundária, a aplicação subsequente de vácuo e calor, promove a remoção da humidade restante resultando numa

espuma com estruturas macroscópicas como sendo o produto final. Como a espuma apresenta, desta forma, uma relação superfície volume reduzida, pode ter tempos de reconstituição mais prolongados, em comparação com um liofilizado [62,77].

A temperatura é um parâmetro que tem de ser cuidadosamente monitorizado, de forma a evitar o congelamento aquando do arrefecimento na evaporação. Da mesma forma, é necessário um controlo rigoroso do vácuo uma vez que a formação de espuma é inibida se a pressão diminuir demasiado lentamente enquanto a concentração e viscosidade da solução aumentam [75]. O destaque principal deste método de secagem é a estabilidade a elevadas temperaturas que confere a biofármacos, mas também uma temperatura de ebulição menos elevada (bastante inferior a 100°C) e ambiente asséptico dentro da câmara durante o processo, o que dá um grande potencial para a secagem e preservação de produtos biofarmacêuticos sensíveis. Além disso, o facto de a espuma apresentar uma menor área de superfície, quando comparada com liofilizados, reduz a taxa de dessecção, conferindo uma maior estabilidade [75]. É então possível a redução dos custos associados ao armazenamento e ainda permitir o alcance de biofármacos a populações que não têm capacidade de refrigeração, por exemplo, visto que a espuma é estável à temperatura ambiente [56,62,78].

No entanto, a técnica de secagem em leito de espuma apresenta desafios, como o *stress* do processo: a fervura da amostra pode danificar o biofármaco, provocando a desnaturação proteica. Além disso, o impacto da desidratação sofrida pode provocar agregação proteica, pelo que se devem usar excipientes estabilizantes para minimizar estes problemas [78]. Por outro lado, como a aparência da espuma não é uniforme, mas sim altamente variável, existe a dificuldade de aplicar os mesmos requisitos aquando do controlo de qualidade, como noutras técnicas de secagem de biofármacos, bem como uma maior resistência à aceitação por parte dos doentes e profissionais de saúde [62,75,77].

Na indústria farmacêutica esta técnica de secagem é utilizada para a preservação de vacinas virais e ainda de anticorpos monoclonais, demonstrando uma estabilidade aumentada quando comparada a secagem através de outras técnicas, como atomização ou liofilização [62,77]. Num estudo conduzido por A. Abdul-Fattah *et al* foi utilizada esta técnica de secagem para a estabilização de mAbs em comparação com a técnica de liofilização e atomização. A secagem em leito de espuma foi feita num liofilizador equipado com um condensador [79,80]. O processo de *foaming* começou pela redução da pressão da câmara para 66Pa a uma temperatura de 15 °C, posteriormente reduzida para temperaturas entre -20 e 5 °C permanecendo assim durante a maior parte da secagem

primária (1h). Este passo é muito mais curto do que a secagem primária num ciclo de liofilização. Já a secagem secundária foi realizada através do aumento da temperatura das prateleiras para 33 °C a uma taxa de 1 °C/min e a pressão reduzida para 33Pa durante 72h. Este tempo longo pouco usual é atribuído à pequena área de superfície específica das espumas. A estabilidade foi estudada após armazenamento a temperaturas de 40 °C e 50 °C e verificou-se que, em associação com sacarose, a espuma obtida foi a que apresentou a maior estabilidade em comparação com os pós obtidos por liofilização e atomização [79].

4.3. Sublimação

O mecanismo de secagem por sublimação baseia-se na transformação de uma formulação que se encontra no estado sólido diretamente num composto gasoso sem a passagem pelo estado líquido. Na secagem de produtos biofarmacêuticos sublima-se o gelo presente numa amostra congelada, de forma a obter partículas secas de produto sem água remanescente, aumentando a sua estabilidade. Como resultado obtém-se vapor e produto seco. A sublimação é feita em condições de vácuo, sendo um processo vantajoso para compostos termosensíveis [81].

A liofilização e a liofilização com atomização são exemplos de técnicas que usam a sublimação como mecanismo de remoção do solvente. A primeira é a técnica mais usada para a secagem de produtos biofarmacêuticos e envolve o congelamento da solução para subsequentes secagens. Já a segunda técnica envolve um passo de atomização antes do congelamento, que leva a uma solidificação quase imediata do produto [59].

4.3.1. Liofilização

Freeze-drying ou liofilização é a técnica de secagem mais comumente utilizada para a secagem de proteínas terapêuticas e preparação de pós para administração parentérica. Nesta técnica, a secagem é feita quando a amostra se encontra no estado sólido, o que é preferível do ponto de vista de estabilidade, principalmente em compostos termolábeis [55,59,60].

Esta metodologia (Figura 8) envolve três etapas principais: congelamento, secagem primária e secagem secundária. A primeira etapa tem uma curta duração e envolve a produção de uma mistura composta por gelo e produto sólido, que contém uma

percentagem significativa de água, na qual os solutos se encontram todos na forma amorfa. No seguimento do processo, na secagem primária, é feita a remoção do solvente através da sublimação do gelo, o que pode levar de algumas horas a vários dias dependendo da temperatura de transição vítrea da amostra. Esta fase deve ser sempre efetuada a 2-5°C abaixo da temperatura de colapso de forma a manter a estrutura do produto. Depois de todo o gelo ter sido removido começa a secagem secundária, feita por dessecção a uma temperatura entre 25-50°C, que tem como fim remover a água presente na fase amorfa e cujo vapor resultante é convertido em gelo pelo condensador. Esta última etapa do processo tem menor duração e é executada a temperaturas mais elevadas, pelo que a transição de temperatura da secagem primária para a secundária deve ser feita lentamente, para evitar a fusão do produto. O mecanismo de transferência de calor é feito por condução de vapor [55,60,73,81,82].

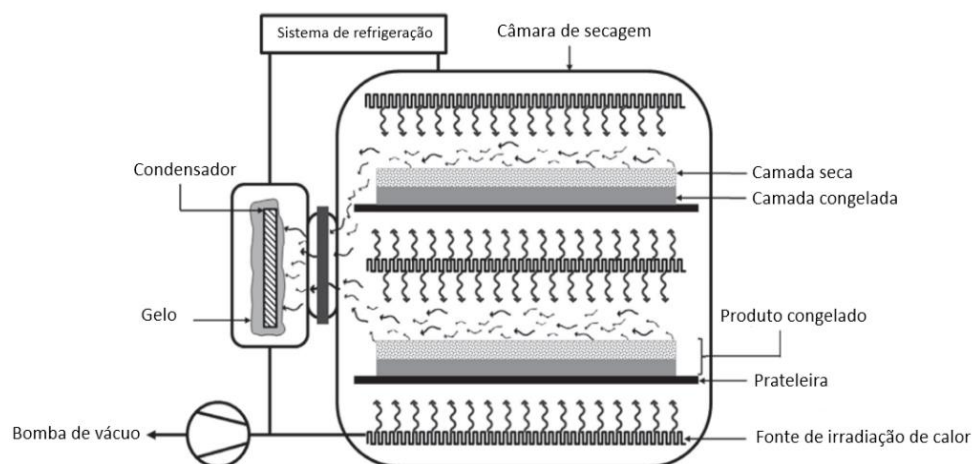


Figura 8. Sistema de secagem por liofilização. *Adaptado com autorização a partir de [81].*

A taxa de congelação é um parâmetro importante a controlar tendo em conta que, por exemplo, ao produtos podem sofrer degradação aquando da etapa de congelamento. Assim, é preferível que esta taxa seja elevada, através da utilização de temperaturas mais baixas, porque leva à formação de cristais de gelo de menor tamanho, o que evita danos consideráveis a nível celular. Para além disso, a remoção de água pode alterar a estruturas das proteínas terapêuticas, o que reduz a sua bioatividade. De forma a proteger o produto destes danos, podem ser utilizadas algumas estratégias, como a adição de crio- ou lioprotetores [73,82].

A liofilização pode ainda incluir um passo de *annealing* no qual as amostras congeladas são mantidas a uma temperatura entre 0° C e a temperatura de transição vítrea durante um período de tempo. Este passo tem como objetivo a cristalização de agentes de estabilização, por exemplo manitol e glicina, bem como aumentar o tamanho dos cristais de gelo e, conseqüentemente, aumentar o tamanho dos poros da amostra onde o vapor pode circular, reduzindo assim o tempo de secagem primária [60]. São várias as utilidades que se podem dar a esta técnica, como a produção de pós de proteína liofilizados e anticorpos [55]. São exemplos, Afrezza[®] (pó de insulina para inalação), NeoRecormon[®] (eritropoietina), NovoSeven[®] (eptacog alfa), Nutropin[®] (somatropina), RNase e IgG [8,59,83,84].

Foi conduzido anteriormente um estudo de estabilidade acelerada com objetivo de comparar a estabilidade de anticorpo IgG no estado sólido (liofilizado) e no estado líquido em condições de transporte. Neste, as formulações foram expostas a forças de agitação de forma a simular um ambiente real durante 5 min, 2h, 6h e 15h. Verificou-se que o liofilizado apresentou uma baixa formação de agregados em todos os intervalos de tempo à exceção das 15h, ao contrário do observado no estado líquido, o que demonstra uma estabilidade aumentada da IgG enquanto pó liofilizado [85]. Para além disso, foram estudados os efeitos de excipientes como glicerol, sacarose e trehalose na estabilização de pós liofilizados de lisozimas. Foi ainda observado que a adição deste tipo de estabilizantes, bem como a sua concentração, aumentam a estabilidade durante a liofilização uma vez que aumentam a temperatura de transição para o estado vítreo [8].

4.3.2. Liofilização com atomização

Esta técnica de secagem, relativamente recente, envolve partes do processo de liofilização e atomização, pelo que os passos para a obtenção do produto seco são atomização, congelação rápida, secagem primária e secagem secundária [8,75,86,87]. A atomização é feita diretamente num meio criogénico o que induz a formação de partículas vítreas congeladas e, derivado do congelamento rápido, o solvente é evaporado evitando o fluxo dos sólidos residuais – secagem primária (Figura 9). Estas partículas no estado sólido vão ser transferidas para prateleiras pré arrefecidas, tipicamente a -40 °C, de um liofilizador para secagem subsequente – secagem secundária [8,59,75,86,87].

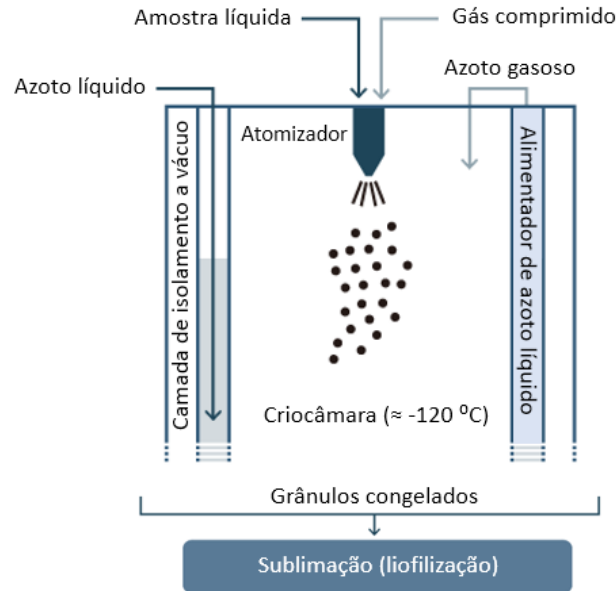


Figura 9. Processo de liofilização com atomização.
Adaptado com autorização de [88].

O controlo dos parâmetros do processo contribui para as características do pó. Por exemplo, um aumento na taxa de fluxo de massa - razão entre a massa de azoto e a massa de amostra líquida - resulta na formação de um produto mais friável. Tal como na técnica de atomização, o atomizador ou bocal são escolhidos conforme as características pretendidas para o produto. Para além disso, a composição química, a concentração da amostra e a temperatura influenciam a densidade e tamanho das partículas do produto [8,75].

Uma característica importante desta técnica é a rapidez da sublimação e secagem secundária, quando comparada com outras técnicas, visto que as partículas congeladas apresentam uma área de superfície aumentada, bem como uma maior solubilidade aparente de produtos pouco solúveis em água. Para além dos *stresses* comuns da congelação e secagem, este processo de secagem apresenta ainda *stresses* resultantes de forças de cisalhamento aquando da atomização e da exposição à interface ar-água que pode desencadear adsorção, desdobraimento e/ou agregação das proteínas. De forma a minimizar estas dificuldades, adicionam-se lioprotetores como excipientes estabilizantes [8,59,75,86-88].

A técnica de liofilização com atomização apresenta vantagens comparativamente à liofilização, como tempos de secagem mais reduzidos, menor consumo energético e maior flexibilidade. Adicionalmente, como esta técnica não submete a amostra a

temperaturas elevadas é adequada para a formulação de produtos biofarmacêuticos termossensíveis de forma otimizada [59,75]. São diversas as aplicações possíveis desta técnica em âmbito biofarmacêutico. Entre elas destacam-se a microencapsulação, a administração pulmonar sistêmica e a produção de vacinas em pó [75,86,87]. A produção de vacinas trivalentes contra a gripe através desta técnica foi explorada num estudo e verificou-se que a estabilidade, bioactividade e imunogenicidade apresentaram pequenas variações quando comparadas com a versão comercial, Fluvirin[®], uma vez que as quantidades em IgG presentes após a secagem foram bastante aproximadas. Isto demonstrou que a técnica de liofilização com atomização apresenta capacidade de secagem sem afetar a estabilidade de antígeno [89].

4.4. Precipitação

Este mecanismo de secagem de biofármacos tem em vista aumentar a concentração de produto de tal modo que o mesmo precipite. Isto baseia-se no princípio de que quando se atinge a supersaturação de soluto, a fase líquida deixa de ser um bom solvente, induzindo a formação de partículas por precipitação. Após a precipitação o solvente é removido através de secagem por liofilização com atomização [8].

4.4.1. Secagem supercrítica

Esta é uma técnica desenvolvida com o objetivo da produção de partículas com elevada pureza, com tamanho da ordem dos micrómetros e com morfologia controlada sem recorrer a temperaturas extremas [75]. Um fluido supercrítico encontra-se na fase em que a densidade das fases líquida e sólida são a mesma, o que resulta num fluido na fase supercrítica. O mais frequentemente utilizado com o fim de secagem de proteínas é o dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC), visto ser um fluido não tóxico, não inflamável e relativamente barato, que apresenta pressão e temperatura crítica moderadas (31° C) e reverte à fase gasosa em condições ambientais.

Destacam-se duas possibilidades de utilização de fluidos supercríticos na secagem de proteínas [8,75,90]. Na primeira, o fluido supercrítico é utilizado em substituição de um gás de secagem num processo que se assemelha à atomização. Assim, a secagem dá-se por precipitação do soluto nas gotículas. A amostra de proteína supersaturada precipita conforme a água é extraída do fluido supercrítico através de processo de liofilização com atomização, resultando na formação de partículas de pó. Na segunda possibilidade (Figura 10), a proteína é misturada com o fluido supercrítico antes da atomização, sendo a mistura atomizada em condições atmosféricas. Então, o fluido é utilizado como um anti solvente que induz a precipitação da proteína, uma vez que esta apresenta uma baixa solubilidade no mesmo. Quando o CO₂-SC expande durante a atomização, as gotas quebram em gotículas mais finas, que secam rapidamente ao contactarem com fluxo de gás, dando origem ao pó [8,75,91].

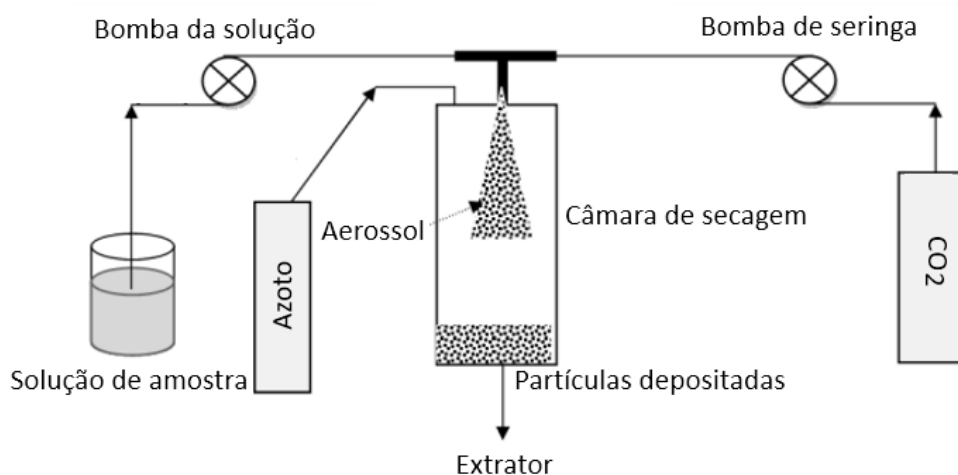


Figura 10. Processo de secagem supercrítica. *Adaptado com autorização de [91].*

Visto que nesta técnica a temperatura à qual ocorre a secagem é moderada, torna-se útil para processar proteínas termicamente instáveis. Para além disso, existem outras características-chave, como a segurança e o baixo custo dos materiais. Por outro lado, a pressão à qual as proteínas são submetidas pode ter impacto negativo na estabilidade proteica e a dissolução do dióxido de carbono na amostra pode reduzir o pH da solução, caso o tamponamento não seja apropriado. Outra desvantagem é a falta de controlo na formação das partículas, visto que o nível de supersaturação é dificilmente o mesmo ao longo de todo o processo e ainda é possível ocorrer aglomeração derivada da baixa viscosidade do fluido [75,90,92].

Esta técnica é utilizada para a formulação de pós de proteínas e micropartículas contendo proteínas [90,92]. A insulina é um exemplo de biofármaco que pode ser secado através desta técnica. Num estudo em que foi utilizado CO₂-SC como anti solvente, foi demonstrado que, com a utilização de polímeros como excipientes estabilizantes é possível, com a concentração adequada, obter pó sem aglomeração e manter a sua estrutura e estabilidade mesmo depois do armazenamento a 4° C durante um ano [93].

5. Excipientes estabilizantes para produtos biofarmacêuticos

Apesar da aplicação das técnicas de secagem com o intuito da estabilização de biofármacos, muitas vezes, estas submetem estes produtos a *stresses* como forças de cisalhamento e contacto com interfaces e, estando ainda submetidos a várias fontes de degradação físico-química, abordadas anteriormente. Assim sendo, a garantia da estabilidade de produtos biofarmacêuticos continua a ser um desafio na a ter em conta na tecnologia farmacêutica [8].

Os estabilizantes são compostos que demonstram capacidade de garantir a estabilidade da proteína a agressões térmicas ou cinéticas e, algumas vezes, com a adição de um estabilizante é possível proteger a proteína de alterações químicas e físicas [94]. Estes agentes promotores de estabilidade podem dividir-se em dois grupos principais: as substâncias lioprotetoras, que propiciam estabilidade termodinâmica às proteínas durante o processo de secagem, de desidratação e de armazenamento e as substâncias crioprotetoras, que concedem estabilidade em solução e durante a congelação [8,15].

Existem diversos excipientes que podem atuar a nível do aumento da estabilidade como açúcares que têm a capacidade de estabilizar as proteínas através da sua imobilização, os agentes surfactantes, como polissorbatos, que aumentam a estabilidade destes produtos prevenindo a agregação, os agentes tampão que potenciam a estabilidade das proteínas mantendo o pH ótimo para a qual a proteína apresenta o maior valor de estabilidade, e aminoácidos, que atuam melhorando a estrutura do produto e polímeros, que têm a capacidade de proteger os produtos biofarmacêuticos aquando de processos de congelação [94].

5.1. Açúcares e polióis

Existem diferentes hipóteses definidas para as vias de estabilização por açúcares e polióis. Na hipótese de reposição da água entende-se que alguns excipientes estabilizantes com grupos hidroxilo formam pontes de hidrogénio com as proteínas, o que favorece a remoção das moléculas de água. Isto porque as pontes de hidrogénio formadas com os aditivos vão compensar a perda dos átomos de hidrogénio presentes nas moléculas de água, reduzindo o *stress* derivado da desidratação. Consequentemente, esta via garante a estabilidade da proteína durante o processo de secagem. Por outro lado, na hipótese da

matriz vítrea alguns excipientes de elevado peso molecular fornecem uma matriz rígida que resiste a reações de degradação, pois permite diminuir a mobilidade molecular. Assim, a reação de degradação é mitigada, mesmo que seja termodinamicamente favorável, pois a proteína está acoplada à matriz, não podendo alterar o estado de equilíbrio [8,15,16].

A concentração utilizada de excipiente afeta a estabilidade, sendo que se for demasiado elevada, pode ser alcançado o limite de estabilização e até mesmo desencadear a destabilização da proteína durante o armazenamento ou secagem. Portanto, o ideal é utilizar a concentração mínima efetiva de excipiente, para impedir fenómenos de degradação, como cristalização. A concentração de açúcar para proteína de 1:1 é necessária para obter estabilidade, sendo que concentrações entre 3-5:1 costumam ser ótimas. Os compostos mais frequentemente utilizados com este fim são a sacarose e a trehalose [15]. Num estudo anterior foram utilizadas sacarose e trehalose para avaliar a estabilização de hrGH liofilizada e verificou-se uma diminuição da agregação, desamidação e oxidação quando comparada a utilização de apenas hidroxietilamido (HES) [95]. Noutro estudo foram utilizados açúcares, como a sacarose, trehalose e sorbitol para estabilizar formulações de IgG1. A razão de excipiente para proteína foi sempre de 1:1 e a temperatura de armazenamento utilizada foi de 50 °C durante 9 semanas. Verificou-se que o sorbitol teve baixa capacidade de proteger a proteína contra agregação, no entanto, a trehalose e a sacarose aumentaram significativamente a estabilidade do produto, demonstrando perdas de monómero de apenas 0,4% e 0,3%, respetivamente [96].

5.2. Surfactantes

Os surfactantes apresentam a sua ação estabilizante por dois mecanismos principais. Um baseia-se na redução da superfície de adsorção, uma vez que vão localizar-se na superfície interfacial. Desta forma, existe um menor número de proteínas terapêuticas localizadas nas superfícies das partículas disponíveis para interações adicionais, inibindo a degradação. O outro deriva da preferência de interações interfaciais com as moléculas de surfactante. Tendo em conta que estas são de menor tamanho, a sua ligação com superfícies hidrofóbicas é favorecida quando comparada com as moléculas de maior tamanho da proteína [8,15,16].

O Tween[®] 20 (polissorbato-20) é um exemplo que reduz a formação de agregados inibindo o contacto intermolecular bem como o contacto com as interfaces. Adicionalmente, o surfactante pode atuar como *chaperone* uma vez tem capacidade para ligar-se a uma estrutura intermediária no desenrolamento da proteína, favorecendo o *refold* ao invés da agregação. É importante a fase – secagem ou durante a reconstituição – na qual este agente estabilizante é adicionado pois influencia a capacidade de estabilizar a formulação [8,16]. Um estudo anterior procurou estabilizar uma preparação inalável de ciclosporina A (CsA) submetida a secagem por atomização utilizando monooleato de glicerol como agente surfactante. Observou-se uma melhor dissolução e biodisponibilidade quando comparada com a mesma preparação mas sem qualquer excipiente, bem como menos efeitos secundários [8,97].

Para o surfactante ter o efeito pretendido de estabilização máxima, a concentração tem de ser elevada o suficiente de forma a garantir interações com a proteína e com a interface (Figura 11). Caso a concentração seja insuficiente a proteína pode não ficar completamente revestida pelo estabilizante e continuam a ocorrer interações com as interfaces, o que pode derivar em falta de estabilidade [15,98].

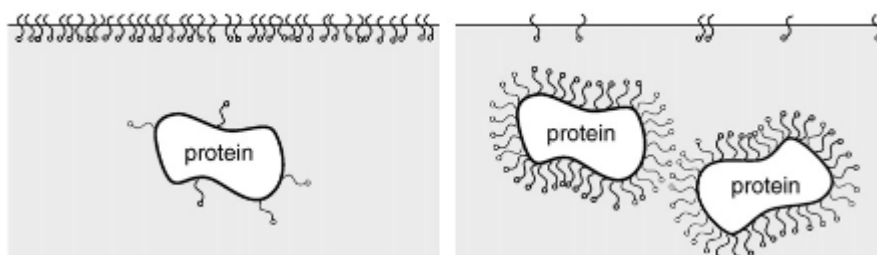


Figura 11. Interações do agente surfactante com a proteína. Na esquerda em baixa concentração à superfície da proteína e à direita em concentração elevada envolvendo a proteína. *Adaptado com autorização de [98].*

5.3. Aminoácidos

Compostos como a histidina e a arginina podem ser utilizados como agentes estabilizantes de formulações proteicas, caso estejam presentes na mesma fase amorfa. O que se verifica é que estes compostos vão interagir com a proteína via pontes de hidrogénio durante a secagem, resguardando a estrutura nativa da proteína. Como consequência, a estabilidade de armazenamento a longo prazo aumenta [16]. Os aminoácidos, quando adicionados como estabilizantes também têm ação protetora contra a agregação das proteínas. Foi demonstrado que a arginina, uma vez que aumenta a solubilidade de moléculas suscetíveis a agregação, reduzindo assim a degradação por esta

via [51]. A utilização de aminoácidos é preferida a nível biotecnológico, uma vez que são substâncias seguras e de baixo custo. Este grupo de estabilizantes é quase sempre empregue em concomitância com sacarose ou trehalose, visto que o seu efeito protetor individual é reduzido [15,51].

A arginina é o aminoácido mais estudado para a estabilização de pós e é utilizada comumente na forma de cloridrato. A adição deste composto permite a redução da agregação proteica em pelo menos duas vezes mais do que quando comparada a trehalose utilizada isoladamente [15]. Num estudo no qual se utilizou a leucina para a estabilização de produtos biofarmacêuticos, como IgG, na secagem por atomização verificou-se que esta atua como um lubrificante de pós inaláveis. Uma vez que a sua adição leva à formação de partículas irregulares com superfície enrugada as interações interparticulares do pó são reduzidas, reduzindo as forças co adesivas e melhorando a performance do aerossol [97,99].

5.4. Agente tampão

O pH é um fator determinante da estabilidade da proteína antes da secagem e após a reconstituição. A histidina, o fosfato, o acetato, o citrato e o succinato de sódio, são os agentes mais utilizados com a finalidade de manter o pH próximo do desejado para garantir a estabilidade. Idealmente estes compostos são selecionados de acordo com a constante de dissociação (pK_a), sendo a capacidade máxima de tamponamento quando $pH = pK_a$ [15,94]. Para além disso, o valor de pH deve encontrar-se dentro de um limite fisiológico, de forma a prevenir irritações, dor ou efeitos adversos após a administração do produto biofarmacêutico. O tampão citrato é, normalmente, preferido tendo em conta que os seus componentes salinos apresentam baixa tendência a cristalizar [94].

Num estudo feito com o intuito de explorar a influência do agente tampão na estabilidade do mAb LA298 demonstrou que o pH, a temperatura de armazenamento e a sua duração encontram-se intimamente ligadas com tampão citrato. Isto porque com uma temperatura de 25 °C a um valor de pH 4 e pH 7 ocorreu uma degradação de anticorpo ao longo do tempo, enquanto a pH 5 em ambiente com temperaturas inferiores demonstrou apresentar uma boa estabilidade [100].

Noutro estudo foi comparada a eficácia do tamponamento da arginina com a do cloridrato de guanidina (GdnHCL, do inglês *guanidine hydrochloride*) para impedimento de desdobraimento induzido por temperaturas elevadas da IL-6. Ambos os tampões

demonstraram reduzir a agregação. No entanto, verificou-se que o GdnHCL aumenta a solubilidade das proteínas, mas ao mesmo tempo as desdobra enquanto a arginina não altera a estrutura terciária da IL-6. Para além disso, o GdnHCL alterou a estrutura da IL-6 à temperatura ambiente, ou seja, abaixo de temperaturas que induzam desdobraimento [101].

5.5. Polímeros

Compostos como o PEG têm capacidade de preservar proteínas quando estas são submetidas a processos de congelação, no entanto, não tem capacidade de estabilização durante a secagem. Já compostos como o dextrano e polivinilpirrolidona (PVP) protegem a proteína durante a secagem. Adicionalmente, este grupo de estabilizantes apresentam capacidade de provocar o *refold* da proteína para o seu estado conformacional nativo, sendo úteis em proteger as proteínas de fenómenos de agregação [15,51]. No entanto, como estes compostos não têm capacidade de interação com os grupos polares que se encontram na superfície da proteína, são utilizados normalmente em associação com açúcares. Adicionalmente, como os polímeros apresentam uma estrutura com uma rigidez considerável, esta combinação aumenta a flexibilidade formando um agente estabilizante mais efectivo. Na estabilização de uma formulação de mAb através de liofilização, foi feita uma mistura de dextrano (40kDa) com sacarose (1:1) que garantiu a estabilidade do produto após armazenamento durante 14 dias a 40° C, no entanto, quando os pesos moleculares de dextrano foram muito elevados, verificou-se um aumento considerável do tempo de reconstituição [15].

Em outro estudo no qual se adicionou PEGs a lactase, uma enzima terapêutica, foi demonstrado que a PEGuilação não apresentou efeito na atividade e estabilidade a temperaturas variáveis. No entanto, a valores de pH entre 2,5 e 4,5 a adição do polímero protegeu a enzima de degradação proteolítica por pepsina ou pancreatina e de inativação a valores de pH reduzidos. Para além disso, a retenção de atividade na enzima PEGuilada foi de 25% enquanto que na enzima sem polímero foi de apenas 12% [39].

6. Conclusão

Os produtos biofarmacêuticos representam parte importante da evolução da terapêutica e do desenvolvimento de medicamentos. Estes têm elevada importância em diversas patologias, sendo utilizados frequentemente devido à sua baixa imunogenicidade e alta afinidade para alvos específicos, aumentando a segurança e eficácia dos tratamentos. No entanto, a sua composição proteica apresenta problemas de estabilidade, derivados de reações químicas, como oxidação e desamidação ou de reações físicas, como a agregação. A instabilidade das proteínas deriva essencialmente do facto de se encontrar em solução aquosa, visto que a sua mobilidade molecular é superior do que no estado sólido, para além da própria ação hidrolítica da água.

A secagem dos produtos biofarmacêuticos é uma forma de promover uma maior estabilidade dos mesmos uma vez que as interações moleculares serão reduzidas em comparação com o mesmo produto em solução. Para tal existem diversas técnicas que se podem classificar de acordo com o método de remoção do solvente: evaporação, sublimação e precipitação. Todas evidenciam vantagens e desvantagens, de acordo com os parâmetros dos processos envolvidos na secagem, pelo que a escolha de cada técnica tem de ser adequada a cada produto visto que as condições do processo podem induzir instabilidade, o contrário do pretendido. De forma a proteger os biofármacos de degradação durante ou após a secagem pode ainda ser aplicada outra estratégia que consiste na incorporação de excipientes estabilizantes. Estes podem ser açúcares, agentes surfactantes, agentes tampão, aminoácidos e polímeros. Todos eles atuam através de ações diferentes, como a manutenção do pH ideal ou o envolvimento das moléculas, de forma a evitar interações físicas e químicas mantendo a sua bioatividade.

Assim, congregando todos os aspetos mencionados ao longo desta dissertação, de acordo com o objetivo, esta é uma área da tecnologia farmacêutica que continua em franco desenvolvimento. No futuro é esperada uma maior utilização e desenvolvimento de técnicas promissoras como a secagem supercrítica, eletropulverização e a secagem em leito de espuma para a estabilização de produtos biofarmacêuticos. Para além disso, a pandemia da COVID-19 veio demonstrar a importância da necessidade da secagem de produtos biofarmacêuticos de forma a garantir a sua estabilidade. Além disso, é fundamental o contínuo desenvolvimento e aplicação de técnicas de secagem mais rápidas e com elevado rendimento.

7. Bibliografia

- [1] M. Kesik-Brodacka, *Progress in biopharmaceutical development*, Biotechnology and Applied Biochemistry 65, 306–322 (2018).
- [2] M. Hannappel, *Biopharmaceuticals: From peptide to drug*, em *AIP Conference Proceedings*, Vol. 1871 (American Institute of Physics Inc., 2017), p. 060004.
- [3] A. Severiano, A. S. Martins, C. Mousinho, E. De Fátima Costa, F. Bragança, F. Hergy, F. Marques, M. Pedro, M. Silva, M. Antunes, e S. Duarte, *Vol. 23, Número 3, Março de 2019*.
- [4] A. S. B. Rasmussen, A. Hammou, T. F. Poulsen, M. C. Laursen, e S. F. Hansen, *Definition, categorization, and environmental risk assessment of biopharmaceuticals*, Science of The Total Environment 789, 147884 (2021).
- [5] G. Walsh, *Biopharmaceuticals, an overview*, em *Biopharmaceuticals, an Industrial Perspective*, Vol. 34 (Springer Netherlands, Dordrecht, 1999), pp. 1–34.
- [6] M. Haas, V. Mantua, M. Haberkamp, L. Pani, M. Isaac, F. Butlen-Ducuing, S. Vamvakas, e K. Broich, *The European Medicines Agency's strategies to meet the challenges of Alzheimer disease*, Nature Reviews Drug Discovery 14, 221–222 (2015).
- [7] A. Shirwaikar, K. Srinivasan, J. Alex, S. Prabu, R. Mahalaxmi, R. Kumar, e S. Jacob, *Stability of proteins in aqueous solution and solid state*, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 68, 154–163 (2006).
- [8] F. Emami, A. Vatanara, E. Park, e D. Na, *Drying technologies for the stability and bioavailability of biopharmaceuticals*, Pharmaceutics 10, 1–23 (2018).
- [9] M. C. Manning, D. K. Chou, B. M. Murphy, R. W. Payne, e D. S. Katayama, *Stability of protein pharmaceuticals: an update*, Pharmaceutical Research 27, 544–575 (2010).
- [10] H.-C. Mahler e A. Allmendinger, *Stability, formulation, and delivery of biopharmaceuticals*, em (John Wiley & Sons, Ltd, 2017), pp. 469–491.
- [11] J. Patel, R. Kothari, R. Tunga, N. M. Ritter, e B. S. Tunga, *Overview of Protein and Peptide Degradation Pathways*, 2011.
- [12] A. Langford, B. Bhatnagar, R. Walters, S. Tchessalov, e S. Ohtake, *Drying of biopharmaceuticals: recent developments, new technologies and future direction*, Japan Journal of Food Engineering 19, 15–24 (2018).
- [13] D. N. Nguyen, C. Clasen, e G. Van den Mooter, *Pharmaceutical applications of electrospraying*, Journal of Pharmaceutical Sciences 105, 2601–2620 (2016).
- [14] D. M. Parikh, *Vacuum drying: basics and application: part 1*, Chemical Engineering 122, 48–55 (2015).
- [15] S. Thakral, J. Sonje, B. Munjal, e R. Suryanarayanan, *Stabilizers and their interaction with formulation components in frozen and freeze-dried protein formulations*, Advanced Drug Delivery Reviews 173, 1–19 (2021).
- [16] L. (Lucy) Chang e M. J. Pikal, *Mechanisms of protein stabilization in the solid state*, Journal of Pharmaceutical Sciences 98, 2886–2908 (2009).
- [17] J. K. Ryu, H. S. Kim, e D. H. Nam, *Current status and perspectives of biopharmaceutical drugs*, Biotechnology and Bioprocess Engineering.
- [18] H. X. Ngo e S. Garneau-Tsodikova, *What are the drugs of the future?*, MedChemComm 9, 757–758 (2018).
- [19] K. Ghanemi, *Biopharmaceutical Innovation: Benefits and Challenges*, Open Access Journal of Science 1, (2017).
- [20] B. Sekhon e V. Saluja, *Biosimilars: an overview*, Biosimilars Volume 1, 1–11 (2011).

- [21] R. J. Y. Ho e M. Gibaldi, *Hematopoietic growth and coagulation factors* (John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2013).
- [22] U.S National Library of Medicine, Insulin human, PubChem, 2017.
- [23] U.S. Food & Drug Administration, *Biological Product Definitions*, 1–2 (2018).
- [24] G. Walsh, *Biopharmaceutical benchmarks 2018*, Nature Biotechnology 36, 1136–1145 (2018).
- [25] *Novel Drug Approvals for 2021*, <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2021>.
- [26] U.S. Food and Drug Administration (FDA), *Novel drug approvals for 2020*, U.S. Food and Drug Administration (FDA).
- [27] M. Yao, G. Brummer, D. Acevedo, e N. Cheng, *Cytokine Regulation of metastasis and tumorigenicity*, em *Advances in cancer research*, Vol. 132 (Academic Press Inc., 2016), pp. 260–328.
- [28] *Production and quality control of cytokine products derived by biotechnological processes: ad hoc working party on biotechnology/pharmacy*, Pharmacology & Toxicology 67, 353–358 (1990).
- [29] L. S. Castro, G. S. Lobo, P. Pereira, M. G. Freire, M. C. Neves, e A. Q. Pedro, *Interferon-based biopharmaceuticals: overview on the production, purification, and formulation*, Vaccines 9, 1–51 (2021).
- [30] K. D. Price e G. K. Rao, *Biological Therapies for Cancer*, em *Nonclinical development of novel biologics, biosimilars, vaccines and specialty biologics* (Elsevier, 2013), pp. 303–342.
- [31] J. Cho, J. Ritz, e C. Zylberberg, *Comparing the functionality of proleukin® and akron interleukin-2 through an analysis of key T cell subsets*, Cytotherapy 22, 121–122 (2020).
- [32] J. K. Bruton e J. M. Koeller, *Recombinant Interleukin-2*, Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy 14, 635–656 (1994).
- [33] R. M. Locksley, N. Killeen, e M. J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies*, Cell 104, 487–501 (2001).
- [34] B. B. Aggarwal, S. C. Gupta, e J. H. Kim, *Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey*, Blood 119, 651–665 (2012).
- [35] T. R. Gelzleichter, *Early characterization of biosimilar therapeutics*, em *Nonclinical development of novel biologics, biosimilars, vaccines and specialty biologics* (Elsevier, 2013), pp. 185–210.
- [36] T. A., *Hematopoietic growth factors as biopharmaceuticals: an overview*, Pharmacophore 3, 81–108 (2012).
- [37] J. E. Schiel, A. Mire-Sluis, e D. Davis, *Monoclonal antibody therapeutics: the need for biopharmaceutical reference materials*, ACS Symposium Series 1176, 1–34 (2014).
- [38] R. J. Y. Ho e M. Gibaldi, *Enzymes* (John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2013).
- [39] M. Â. Taipa, P. Fernandes, e C. C. C. R. de Carvalho, *Production and purification of therapeutic enzymes*, em *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 1148 (Springer New York LLC, 2019), pp. 1–24.
- [40] S. Tandon, A. Sharma, S. Singh, S. Sharma, e S. J. Sarma, *Therapeutic enzymes: discoveries, production and applications*, Journal of Drug Delivery Science and Technology 63, 102455 (2021).
- [41] P. L. F. Giangrande, *Six characters in search of an author: the history of the nomenclature of coagulation factors*, British Journal of Haematology 121, 703–

- 712 (2003).
- [42] K. Swiech, V. Picanço-Castro, e D. T. Covas, *Production of recombinant coagulation factors: are humans the best host cells?*, Bioengineered.
- [43] A. Clem, *Fundamentals of vaccine immunology*, Journal of Global Infectious Diseases 3, 73 (2011).
- [44] A. L. Stuurman, J. Bicler, A. Carmona, A. Descamps, J. Díez-Domingo, C. Muñoz Quiles, H. Nohynek, C. Rizzo, e M. Riera-Montes, *Brand-specific influenza vaccine effectiveness estimates during 2019/20 season in Europe – results from the DRIVE EU study platform*, Vaccine 39, 3964–3973 (2021).
- [45] M. Han, X. Ye, S. Rao, S. Williams, S. Thijssen, J. Hymes, F. W. Maddux, e P. Kotanko, *Hepatitis B vaccination response in hemodialysis patients: the impact of dialysis shift*, Blood Purification 50, 628–635 (2021).
- [46] J. R. Lorenzo, L. G. Alonso, e I. E. Sánchez, *Prediction of spontaneous protein deamidation from sequence-derived secondary structure and intrinsic disorder*, PLOS ONE 10, 1–14 (2015).
- [47] C. X. Moss, S. P. Matthews, D. J. Lamont, e C. Watts, *Asparagine deamidation perturbs antigen presentation on class II major histocompatibility complex molecules*, Journal of Biological Chemistry 280, 18498–18503 (2005).
- [48] A. Shahidian, M. Ghassemi, J. Mohammadi, e M. Hashemi, *Immunotherapy*, em *Bio-engineering approaches to cancer diagnosis and treatment* (Elsevier, 2020), pp. 69–114.
- [49] J. Vlasak e R. Ionescu, *Fragmentation of monoclonal antibodies*, mAbs 3, 253–263 (2011).
- [50] S. L. Cohen, C. Price, e J. Vlasak, *β -Elimination and peptide bond hydrolysis: Two distinct mechanisms of human IgG1 hinge fragmentation upon storage*, Journal of the American Chemical Society 129, 6976–6977 (2007).
- [51] H. Hamada, T. Arakawa, e K. Shiraki, *Effect of additives on protein aggregation*, Current Pharmaceutical Biotechnology 10, 400–407 (2009).
- [52] J. S. Bee, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, S. M. Bishop, e M. N. Dimitrova, *Effects of surfaces and leachables on the stability of biopharmaceuticals*, Journal of Pharmaceutical Sciences 100, 4158–4170 (2011).
- [53] P. M. Doran, *Loss of secreted antibody from transgenic plant tissue cultures due to surface adsorption*, Journal of Biotechnology 122, 39–54 (2006).
- [54] W. Jiskoot, G. Kijanka, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, A. V. Koulov, H.-C. Mahler, M. K. Joubert, V. Jawa, e L. O. Narhi, *Mouse models for assessing protein immunogenicity: lessons and challenges*, Journal of Pharmaceutical Sciences 105, 1567–1575 (2016).
- [55] P. Chakravarty e K. Nagapudi, *Importance of drying in small molecule drug product development*, em *Drying technologies for biotechnology and pharmaceutical applications* (Wiley, 2020), pp. 23–90.
- [56] A. Langford, B. Bhatnagar, R. Walters, S. Tchessalov, e S. Ohtake, *Drying technologies for biopharmaceutical applications: recent developments and future direction*, Drying Technology 36, 677–684 (2018).
- [57] E. W. Conder, A. S. Cosbie, J. Gaertner, W. Hicks, S. Huggins, C. S. MacLeod, B. Remy, B.-S. Yang, J. D. Engstrom, D. J. Lamberto, e C. D. Papageorgiou, *The pharmaceutical drying unit operation: an industry perspective on advancing the science and development approach for scale-up and technology transfer*, Organic Process Research & Development 21, 420–429 (2017).
- [58] M. Guerrero, C. Albet, A. Palomer, e A. Guglietta, *Drying in pharmaceutical and biotechnological industries*, Food Science and Technology International 9, 237–

- 243 (2003).
- [59] M. J. Maltesen e M. van de Weert, *Drying methods for protein pharmaceuticals*, Drug Discovery Today: Technologies 5, e81–e88 (2008).
- [60] A. M. Abdul-Fattah, D. S. Kalonia, e M. J. Pikal, *The challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implications*, Journal of Pharmaceutical Sciences 96, 1886–1916 (2007).
- [61] I. Abraham, E. Ali Elkordy, R. Haj Ahmad, Z. Ahmad, e A. Ali Elkordy, *Effect of spray-drying and electrospraying as drying techniques on lysozyme characterisation*, em *Electrospinning and electrospraying - techniques and applications* (IntechOpen, 2019).
- [62] P. M. Lovalenti e V. Truong-Le, *Foam drying*, Drying Technologies for Biotechnology and Pharmaceutical Applications 257–282 (2020).
- [63] P. H. Ferguson, *Evaporation: basic principles*, em *Encyclopedia of food sciences and nutrition* (Elsevier, 2003), pp. 2201–2205.
- [64] A. A. Bhirde, M.-J. Chiang, R. Venna, S. Beaucage, e K. Brorson, *High-throughput in-use and stress size stability screening of protein therapeutics using algorithm-driven dynamic light scattering*, Journal of Pharmaceutical Sciences 107, 2055–2062 (2018).
- [65] M. Ameri e Y.-F. Maa, *Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations*, Drying Technology 24, 763–768 (2006).
- [66] K. Cal e K. Sollohub, *Spray drying technique. I: hardware and process parameters*, Journal of Pharmaceutical Sciences 99, 575–586 (2010).
- [67] K. Sollohub e K. Cal, *Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology*, Journal of Pharmaceutical Sciences 99, 587–597 (2010).
- [68] C. Arpagaus, P. John, A. Collenberg, e D. Rützi, *Nanocapsules formation by nano spray drying*, em *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries* (Elsevier, 2017), pp. 346–401.
- [69] L. Peltonen, H. Valo, R. Kolakovic, T. Laaksonen, e J. Hirvonen, *Electrospraying, spray drying and related techniques for production and formulation of drug nanoparticles*, Expert Opinion on Drug Delivery 7, 705–719 (2010).
- [70] A. Gomez, D. Bingham, L. d. Juan, e K. Tang, *Production of protein nanoparticles by electrospray drying*, Journal of Aerosol Science 29, 561–574 (1998).
- [71] N. K. Zolkepali, N. F. A. Bakar, M. N. Naim, N. Anuar, e M. R. A. Bakar, *Nanoparticle preparation of mefenamic acid by electrospray drying*, em Vol. 1586 (2014), pp. 113–118.
- [72] E. Boel, R. Koekoekx, S. Dedroog, I. Babkin, M. R. Vetrano, C. Clasen, e G. Van den Mooter, *Unraveling particle formation: from single droplet drying to spray drying and electrospraying*, Pharmaceutics 12, 625 (2020).
- [73] G. Broeckx, D. Vandenheuvell, I. J. J. Claes, S. Lebeer, e F. Kiekens, *Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics*, International Journal of Pharmaceutics 505, 303–318 (2016).
- [74] A. Bhambhani, J. Stanbro, D. Roth, E. Sullivan, M. Jones, R. Evans, e J. Blue, *Evaluation of microwave vacuum drying as an alternative to freeze-drying of biologics and vaccines: the power of simple modeling to identify a mechanism for faster drying times achieved with microwave*, AAPS PharmSciTech 22, 1–16 (2021).
- [75] R. H. Walters, B. Bhatnagar, S. Tchessalov, K.-I. Izutsu, K. Tsumoto, e S. Ohtake, *Next generation drying technologies for pharmaceutical applications*, Journal of Pharmaceutical Sciences 103, 2673–2695 (2014).

- [76] V. Kumar, V. K. Sharma, e D. S. Kalonia, *In situ precipitation and vacuum drying of interferon alpha-2a: development of a single-step process for obtaining dry, stable protein formulation*, International Journal of Pharmaceutics 366, 88–98 (2009).
- [77] A. Langford, B. Balthazor, B. Bhatnagar, S. Tchessalov, M. J. Hageman, A. Lukas, M. Plitzko, B. Luy, e S. Ohtake, *Beyond freeze-drying of biologics: vacuum-foam drying and spray freeze-drying*, em *Proceedings of 21th International Drying Symposium* (Universitat Politècnica València, Valencia, 2018), pp. 41–48.
- [78] R. Jangle e S. Pisal, *Vacuum foam drying: an alternative to lyophilization for biomolecule preservation*, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 74, 91 (2012).
- [79] A. M. Abdul-Fattah, V. Truong-Le, L. Yee, L. Nguyen, D. S. Kalonia, M. T. Cicerone, e M. J. Pikal, *Drying-induced variations in physico-chemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability (I): stability of a monoclonal antibody*, Journal of Pharmaceutical Sciences 96, 1983–2008 (2007).
- [80] *SP VirTis Genesis Pilot Lyophilizer*, https://www.spscientific.com/Products/Freeze_Dryers/_Lyophilizers/VirTis/Flo or_Model_Tray/Pilot_Lyophilizers/Genesis_Pilot_Lyophilizer/.
- [81] L. E. Garcia-Amezquita, J. Welti-Chanes, F. T. Vergara-Balderas, e D. Bermúdez-Aguirre, *Freeze-drying: the basic process*, em *Encyclopedia of Food and Health* (Elsevier, 2016), pp. 104–109.
- [82] A. Arsiccio, P. Giorcello, L. Marengo, e R. Pisano, *Considerations on protein stability during freezing and its impact on the freeze-drying cycle: a design space approach*, Journal of Pharmaceutical Sciences 109, 464–475 (2020).
- [83] V. P. Heljo, H. Harju, T. Hatanpää, G. Johannes, e A. M. Juppo, *The effect of freeze-drying parameters and formulation composition on IgG stability during drying*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 85, 752–755 (2013).
- [84] I. Roy e M. N. Gupta, *Freeze-drying of proteins: some emerging concerns*, Biotechnology and Applied Biochemistry 39, 165 (2004).
- [85] S. Telikepalli, O. S. Kumru, J. H. Kim, S. B. Joshi, K. B. O’Berry, A. W. Blake-Haskins, M. D. Perkins, C. R. Middaugh, e D. B. Volkin, *Characterization of the physical stability of a lyophilized IgG1 mAb after accelerated shipping-like stress*, Journal of pharmaceutical sciences 104, 495 (2015).
- [86] P. T. Ingvarsson, M. Yang, H. Mø. Nielsen, J. Rantanen, e C. Foged, *Stabilization of liposomes during drying*, Expert Opinion on Drug Delivery 8, 375–388 (2011).
- [87] S. Wanning, R. Süverkrüp, e A. Lamprecht, *Pharmaceutical spray freeze drying*, International Journal of Pharmaceutics 488, 136–153 (2015).
- [88] *Freeze Granulator*, <https://www.preci.co.jp/en/freeze-granulator-category-2/freeze-granulator/>.
- [89] Y.-F. Maa, M. Ameri, C. Shu, L. G. Payne, e D. Chen, *Influenza vaccine powder formulation development: spray-dreeze-drying and stability evaluation*, Journal of Pharmaceutical Sciences 93, 1912–1923 (2004).
- [90] S. Devahastin e M. Jinorose, *A concise history of drying*, em *Drying Technologies for Biotechnology and Pharmaceutical Applications* (Wiley, 2020), pp. 9–21.
- [91] R. Parhi e P. Suresh, *Supercritical fluid technology: a review*, Journal of Advanced Pharmaceutical Science And Technology 1, 13–36 (2013).
- [92] N. Jovanović, A. Bouchard, G. W. Hofland, G.-J. Witkamp, D. J. A. Crommelin, e W. Jiskoot, *Stabilization of proteins in dry powder formulations using supercritical fluid technology*, Pharmaceutical Research 21, 1955–1969 (2004).

- [93] M. Amidi, H. C. Pellikaan, A. H. de Boer, D. J. A. Crommelin, W. E. Hennink, e W. Jiskoot, *Preparation and physicochemical characterization of supercritically dried insulin-loaded microparticles for pulmonary delivery*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68, 191–200 (2008).
- [94] M. Bjelošević, A. Zvonar Pobirk, O. Planinšek, e P. Ahlin Grabnar, *Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation*, *International Journal of Pharmaceutics* 576, 119029 (2020).
- [95] Y. Xu, J. F. Carpenter, M. T. Cicerone, e T. W. Randolph, *Contributions of local mobility and degree of retention of native secondary structure to the stability of recombinant human growth hormone (rhGH) in glassy lyophilized formulations*, *Soft Matter* 9, 7855 (2013).
- [96] L. Chang, D. Shepherd, J. Sun, D. Ouellette, K. L. Grant, X. Tang, e M. J. Pikal, *Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix?*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 1427–1444 (2005).
- [97] L. Chen, T. Okuda, X.-Y. Lu, e H.-K. Chan, *Amorphous powders for inhalation drug delivery*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 100, 102–115 (2016).
- [98] H. J. Lee, A. McAuley, K. F. Schilke, e J. McGuire, *Molecular origins of surfactant-mediated stabilization of protein drugs*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 63, 1160–1171 (2011).
- [99] H. Faghihi, A. Vatanara, A. R. Najafabadi, V. Ramezani, e K. Gilani, *The use of amino acids to prepare physically and conformationally stable spray-dried IgG with enhanced aerosol performance*, *International Journal of Pharmaceutics* 466, 163–171 (2014).
- [100] J. Y. Zheng e L. J. Janis, *Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298*, *International Journal of Pharmaceutics* 308, 46–51 (2006).
- [101] T. Arakawa, Y. Kita, D. Ejima, K. Tsumoto, e H. Fukada, *Aggregation suppression of proteins by arginine during thermal unfolding*, *Protein & Peptide Letters* 13, 921–927 (2006).