

POMEN LIOFILIZACIJE V FARMACIJI

IMPORTANCE OF LYOPHILISATION IN PHARMACY

AVTORICI / AUTHORS:

asist. Maja Bjelošević, mag. ind. farm.
izr. prof. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: pegi.ahlingrabnar@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Liofilizacija oz. sušenje z zamrzovanjem je široko uporabljana metoda, za katero zanimanje v zadnjih letih strmo narašča. Gre za metodo sušenja, ki jo najpogosteje povezujemo s pripravo bioloških in biološko podobnih zdravil za parenteralno dajanje oz. sušenjem proteinskih učinkovin. Omogoča tudi izdelavo farmacevtskih oblik, kot so praški za pripravo kapljic za oči ter peroralnih liofilizatov. Slednji vse bolj pridobivajo na pomenu predvsem z vidika razvoja novih farmacevtskih oblik za otroke in starostnike. Uporabnost liofilizacije se kaže tudi pri izdelavi cepiv in stabilizaciji nanodostavnih sistemov (1). Liofilizacija povečuje stabilnost zdravilnih učinkovin zaradi odstranitve vode, povečuje topnost slabo topnih zdravilnih učinkovin preko njihove amorfizacije, omogoča zmanjšanje mase zdravil in

POVZETEK

Liofilizacija je danes metoda izbora za pripravo stabilnih formulacij s proteinskimi zdravilnimi učinkovinami, njena uporaba in globlje razumevanje pa postajata čedalje bolj pomembna tudi z vidika priprave novih, pacientu prijaznih farmacevtskih oblik. Skladno z intenzivnim povečanjem števila novih bioloških in biološko podobnih zdravil se farmacevtska industrija vse bolj usmerja k razvoju in optimizaciji procesa liofilizacije, z namenom zagotavljanja kakovostnih, varnih in učinkovitih zdravil. Namen članka je predstaviti proces liofilizacije in novosti na tem področju ter izpostaviti njegovo pomembnost na področju farmacije.

KLJUČNE BESEDE:

agresivno sušenje, biološka zdravila, liofilizacija, optimizacija, sušenje z zamrzovanjem

ABSTRACT

Today, lyophilisation is the method of choice for the preparation of stable formulations with protein active ingredients, and its use and deeper understanding have become increasingly important in terms of preparation of new, patient-friendly dosage forms. In line with the intensive increase in the number of new biologic and biosimilar drugs, the pharmaceutical industry is increasingly focusing on the development and optimisation of the lyophilisation process, with the aim of providing quality, safe and effective drugs. The purpose of the article is to present the process of lyophilisation and innovations in this field, and to highlight its importance in the field of pharmacy.

KEY WORDS:

aggressive drying, biopharmaceuticals, freeze-drying, lyophilisation, optimisation;

s tem lažji transport ter zaradi pretvorbe v suho obliko omogoča daljši rok uporabe zdravila.

Farmacevtska industrija se vse bolj usmerja v raziskovanje na področju bioloških zdravil, ki predstavljajo sedem od desetih najbolj prodajanih zdravil v letu 2018 (preglednica 1) (2). Pojav prvega biološkega zdravila sega v začetke osemdesetih let prejšnjega stoletja, ko je farmacevtsko podjetje »Eli Lilly and Company« začelo s prodajo zdravila s proteinsko učinkovino rekombinantnim inzulinom. V sploš-



Preglednica 1: Deset najbolj prodajanih zdravil v svetovnem merilu v letu 2018¹ (2).

Table 1: Ten best-selling drugs worldwide in 2018¹ (2).

ZDRAVILO	INDIKACIJA	PROIZVAJALEC	PRODAJA (mrd. \$)
Humira (adalimumab)	artritis	AbbVie	19,9
Revlimid (lenalidomide)	multipli mielom	Celgene	9,7
Keytruda (pembrolizumab)	rak	Merck & Co.	7,2
Herceptin (trastuzumab)	rak	Roche	7,1
Avastin (bevacizumab)	rak	Roche	7,0
Rituxan (rituximab)	rak	Roche	6,9
Opdivo (nivolumab)	rak	Bristol-Myers Squibb	6,7
Eliquis (apiksaban)	venska tromboza, pljučna embolija	Bristol-Myers Squibb	6,4
Prevnar (cepivo)	pnevmokokne okužbe	Pfizer	5,8
Stelara (ustekinumab)	luskavica	Johnson & Johnson	5,2

¹Odebeljeni tisk se nanaša na biološka zdravila.

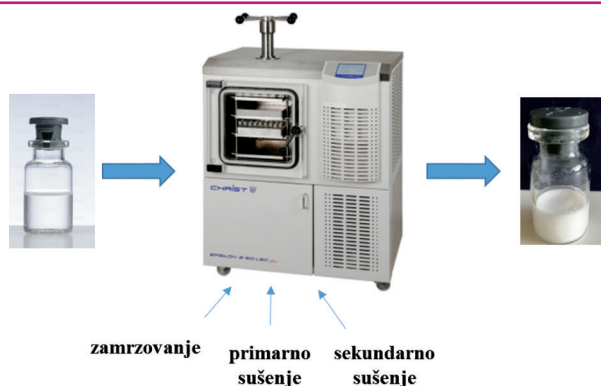
nem danes porast v razvoju in prodaji predstavljajo biološko podobna zdravila, ki se pojavljajo kot posledica izteka patentnih pravic originatorskim biološkim zdravilom (3).

Biološka in biološko podobna zdravila imajo številne prednosti v primerjavi s klasičnimi zdravili, a gledano s tehnološkega vidika sta oblikovanje in proizvodnja tovrstnih zdravil zapletena procesa, ki zahtevata veliko znanja in izkušenj. Gre namreč za občutljive in nestabilne, večinoma proteinske ali peptidne molekule, pri katerih preostri tehnološki pogoji izdelave lahko povzročijo izgubo oz. spremembo njihove biološke aktivnosti, kar vodi do pojava resnejših neželenih učinkov (4). Velika molekulska masa bioloških molekul ter njihova fizikalna in kemijska nestabilnost so bistveni parametri, po katerih se biološka zdravila razlikujejo od klasičnih sinteznih zdravil, obenem pa pri razvoju bioloških zdravil naletimo še na težave, kot so encimska razgradnja, imunogenost in kratek razpolovni čas (5). Vse ne-

šteto je razlog za običajno zelo nizko biološko uporabnost bioloških makromolekul po peroralni aplikaciji, zato kot omenjeno med biološkimi zdravili prevladujejo parenteralne farmacevtske oblike v obliki raztopin, suspenzij ali liofilizatov. Ravno slednji predstavljajo najbolj razširjeno farmacevtsko obliko bioloških zdravil, in sicer je bilo v preteklih desetih letih kar 40 do 50 % vseh odobrenih bioloških zdravil v liofilizirani obliki (1).

2 SUŠENJE Z ZAMRZOVANJEM – LIOFILIZACIJA

Liofilizacija (*freeze-drying, lyophilisation*) predstavlja obliko sušenja z uporabo nizkih tlakov in temperatur. Zdravilne učinkovine biološkega izvora so večinoma občutljive na povišano temperaturo, zato pri pretvorbi raztopin v suho obliko ne moremo uporabiti običajnih načinov sušenja. Nizke temperature in tlaki pri sušenju z zamrzovanjem omogočajo odstranitev vode iz vzorca in pretvorbo le-tega v trdno obliko, tj. v liofilizat, ki mora imeti ustrezne kritične lastnosti kakovosti produkta, kot sta izgled in delež rezidualne vode. Proces temelji na fizikalnem pojavu sublimacije, kjer snov iz trdnega agregatnega stanja preide neposredno v plinasto agregatno stanje brez predhodnega prehoda skozi tekočo fazo (slika 1). Liofilizacija sestoji iz treh zaporednih faz, ki so medsebojno odvisne. Na začetku vzorce zamrzujemo, nato sledi faza primarnega sušenja, kjer zaradi uvedbe visokega vakuumu prihaja do sublimacije proste vode. V zadnji fazi sekundarnega sušenja se zaradi desorpcije odstrani še vezana voda in tako končni produkti večinoma vsebujejo manj kot 2 % (m/m) rezidualne vode.



Slika 1: Shematski prikaz poteka liofilizacije.

Figure 1: Schematic representation of the lyophilisation.

Kljub številnim prednostim se je pri izbiri procesa liofilizacije potrebno zavedati, da gre za dolgotrajen in energetsko zelo potraten proces, posledica česar so visoki stroški proizvodnje. Proces liofilizacije mora biti zato ustrezno načrtovan in optimiziran.

2.1 ZAMRZOVANJE

Zamrzovanje je prvi korak procesa liofilizacije, ki omogoča pretvorbo začetne raztopine v trdno stanje. Zamrznjena voda se loči od zdravilne učinkovine in pomožnih snovi, ki so vključene v formulacijo, posledično pride do nastanka intersticijskega prostora med kristali ledu. Zamrzovanje se prične s podhladitvijo raztopine, kjer pride do pojava nukleacije in rasti kristalov ledu. Ko se kristalizacija zaključi, kar označuje konec zamrzovanja v raztopini, temperatura po začetnem dvigu pade proti nastavljeni temperaturi polic, večinoma okrog $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nadaljnje ohlajanje vzorcev povzroči povečanje koncentracije topljencev v nastalem intersticijskem prostoru do kritične koncentracije. Temperaturo, pri kateri je raztopina maksimalno nasičena in le-ta preide iz zmehčanega stanja v steklasto stanje, označujemo kot temperaturo steklastega prehoda maksimalno koncentrirane zamrznjene raztopine (T_g'), ki je značilna za amorfne sisteme, medtem ko za kristalne sisteme velja temperatura tališča evtektika (T_e) (6).

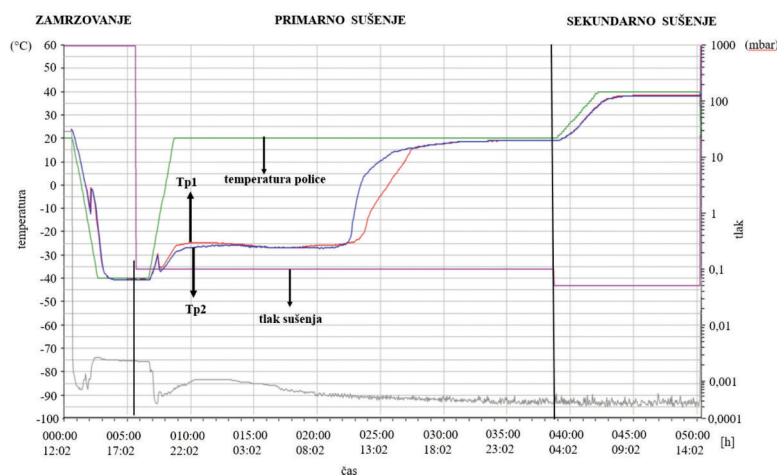
V fazo zamrzovanja pogosto vključimo tudi korak temperiranja (*annealing*), ki zagotavlja kristalizacijo pomožnih snovi in posredno preko tvorbe kristalov ledu vpliva na hitrost

sušenja. Temperiranje izvedemo tako, da vzorce segrejemo nad T_g' , to temperaturo nekaj časa vzdržujemo, nato pa vzorce ponovno zamrznemo na enako temperaturo, kot je bila dosežena pred fazo temperiranja (7).

Zamrzovanje je dehidracijski proces, ki lahko ogrozi stabilnost proteinskih učinkovin v primeru neustrezno izbranih procesnih parametrov. Glavni parametri, ki vplivajo na velikost in morfologijo nastalih kristalov, so temperatura in čas zamrzovanja ter hitrost ohlajanja. Počasno ohlajanje ($0,5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$) vodi do nastanka večjih homogenih kristalov, ki tvorijo boljše kanale za sublimacijo vodne pare v fazi sušenja, medtem ko za hitro ohlajanje velja ravno obratno (5, 8). Čas zamrzovanja je odvisen od učinkovitosti toplotnega prenosa med polico liofilizatorja in dnom vial, zato morajo biti časi za doseganje popolnoma zamrznjenega vzorca dovolj dolgi.

2.2 PRIMARNO SUŠENJE

Glavni cilj primarnega sušenja je odstranitev nastalega ledu s sublimacijo. Pojav sublimacije omogoča uvedba močno znižanega tlaka v sušilno komoro in izbira ustrezne temperature polic. Čas primarnega sušenja je funkcija temperature polic in tlaka v komori, ki neposredno vplivata na temperaturo produkta med sušenjem in hitrost sublimacije vodne pare. Na začetku primarnega sušenja tlak v komori hitro pada, medtem ko temperatura polic postopoma narašča (slika 2). Ker se produkt zaradi sublimacije hladi, se njegova temperatura postopoma približuje nastavljeni temperaturi polic. Ko temperatura produkta (T_p) doseže tem-



Slika 2: Primer poteka liofilizacijskega cikla. Zelena krivulja predstavlja nastavljeno temperaturo polic, rdeča in modra dejanski temperaturi produkta ter roza nastavljen tlak sušenja.

Figure 2: An example of a lyophilisation cycle. Green curve represents the set shelf temperature, red and blue curves represent actual product temperatures, and pink curve represents the set chamber pressure.

peraturo polic, je sublimacija v celoti zaključena in primarno sušenje se konča.

Z izbiro ustreznih tlaka in temperature sušenja vplivamo tako na trajanje sušenja kot tudi na lastnosti produkta. Izbira tlaka in temperature sušenja je odvisna od specifičnosti sestave formulacije oz. fizikalno-kemijskih parametrov zdravilne učinkovine. Slednje je še posebej pomembno pri proteinskih učinkovinah, kjer morata tlak in temperatura sušenja zagotavljati fizikalno in kemijsko stabilnost proteinskih molekul ter ustrezen videz liofilizata, obenem pa še vedno vzorec posušiti do sprejemljive vsebnosti rezidualne vode. Najpogosteje uporabljamo tlak sušenja v območju med 0,1 in 0,3 mbar. Previsoki tlaki sušenja lahko povzročijo porušitev strukture liofilizata (kolaps), medtem ko lahko prenizki tlaki povzročijo kontaminacijo sušenega materiala z oljem vakuumске črpalke, obenem pa vplivajo na zmanjšanje kapacitete kondenzatorja (9).

Temperatura sušenja mora biti skrbno izbrana z namenom optimizacije trajanja primarnega sušenja. Odvisna je od termičnih lastnosti sušenih formulacij, in sicer sta omejujoča dejavnika temperatura T_g' in temperatura kolapsa (T_c). Slednja je najvišja temperatura vzorca, ki ne povzroči kolapsa liofilizacijske pogače. Kolaps definiramo kot izgubo strukture liofilizacijske pogače, ki se pojavi na makro ali mikro nivoju ter tako lahko vpliva na izgled in kakovost produktov. Porušena struktura povzroči zaporo por znotraj liofilizata, kar predstavlja oviro za sublimacijo vodne pare ter posledično močno upočasni potek sušenja. Kljub dejstvu, da gre za neželen pojav, pa je iz znanstvenih člankov razvidno, da kolaps velikokrat vpliva le na končni izgled liofilizacijske pogače, medtem ko so kritične lastnosti kakovosti produkta, kot sta rekonstitucijski čas in vsebnost rezidualne vode, še vedno ohranjene (10, 11).

Dolgo je veljalo, da mora biti temperatura zamrznjenega vzorca med primarnim sušenjem pod T_c ali celo pod T_g' , z namenom doseganja ustreznega videza liofilizacijske pogače, kar strokovno opišemo kot konzervativno sušenje (12). Naprotno se danes na področju sušenja z zamrzovanjem vse bolj uveljavlja uporaba agresivnih pogojev sušenja, tj. sušenja vzorcev pri temperaturah, višjih

od kritičnih temperatur T_g' in v nekaterih primerih celo T_c ($T_p > T_g'$ in T_c), ki večinoma ne vplivajo negativno na kritične lastnosti kakovosti produkta (slika 3), medtem ko so časi sušenja bistveno krajši kot pri konzervativnem načinu sušenja (13, 14).

2.3 SEKUNDARNO SUŠENJE

Sekundarno sušenje predstavlja zaključno fazo procesa, pri kateri se zaradi povišanja temperature polic (slika 2) in pogosto tudi nekoliko nižjega tlaka preko procesa desorpcije iz vzorca odstrani še preostala vezana voda. Pomembno je, da na začetku sekundarnega sušenja, ko je delež vezane vode velik, temperaturo polic dvigujemo postopoma, da s prehitrim povišanjem temperature ne povzročimo kolapsa pogače, kar je še posebej pomembno za amorfnе komponente (15). Pri določanju časa sekundarnega sušenja si lahko pomagamo z neposrednim merjenjem deleža zaostale vlage v vzorcih in ko je le-ta na sprejemljivem nivoju, običajno pod 2 % (m/m), lahko sekundarno sušenje zaključimo. Kljub temu da vsebnost vlage v vzorcih močno znižamo in s tem zagotovimo mikrobiološko in fizikalno-kemijsko stabilnost vzorcev, pa deleži vlage, manjši od 0,5 % (m/m), niso priporočljivi (15, 16).

3 OPTIMIZACIJA LIOFILIZACIJE

Optimizacija ciklov se posredno začne že v fazi razvoja formulacije, in sicer preko vključitve ustreznih pomožnih snovi. Poleg tega, da moramo v proteinske formulacije vključiti stabilizatorje, kot sta saharoza ali trehaloza, je priporočljivo, da formulacijam dodamo tudi ustrezna polnila. Namen polnil, med katerimi sta najpogostejša glicin in manitol, je zagotavljati ustrezno strukturo liofilizacijske pogače tudi v primerih, ko je T_c amorfnе faze presežena. Polnila med zamrzovanjem oz. temperiranjem kristalizirajo in tvorijo rešetko, ki predstavlja mehansko oporo za amorfnе komponente, in s tem preprečujejo kolaps liofilizacijske pogače (17). Dokazali so, da povišanje temperature za 10 °C med temperiranjem skrajša čas primarnega sušenja za do 34 % (18). Uporaba ustreznih pomožnih snovi tako omogoča sušenje pri višjih temperaturah produkta, s čimer vplivamo na skrajšanje časa primarnega sušenja in posledično tudi celotnega cikla, nasprotno vključitev neustreznih pomožnih snovi vodi v porušenje liofilizacijske pogače.

KRITIČNE LASTNOSTI KAKOVOSTI PRODUKTA



izgled
rekonstitucijski čas
delež rezidualne vode

Slika 3: Kritične lastnosti kakovosti produkta.

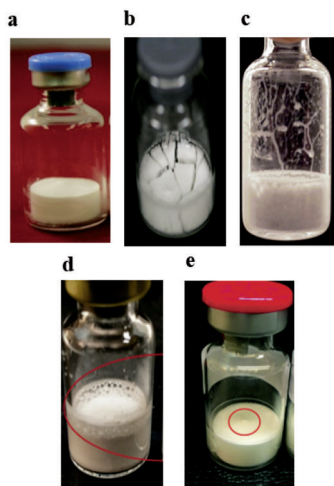
Figure 3: Critical quality attributes of lyophilisates.

3.1 IZGLED LIOFILIZACIJSKE POGAČE

Izgled liofilizacijske pogače po koncu sušenja je eden najbolj kritičnih parametrov kakovosti produkta pri pripravi liofilizatov, ki vpliva na uporabnost končnega izdelka. Nepravilnosti v izgledu liofilizacijske pogače so nezaželeni predvsem z vidika uporabnika, ki jih lahko poveže s slabšo kakovostjo produkta. Vendar pa je pomembno ločiti med kolapsom kot »kozmetično« nepravilnostjo in kolapsom, ki vpliva neposredno na kakovost, varnost in učinkovitost zdravila (10). Na pojav kolapsa v veliki meri vplivamo z izbiro ustreznih temperature in hitrosti zamrzovanja ter temperature in tlaka sušenja, kar je še posebej pomembno pri sušenju formulacij s proteini. Najpogostejše nepravilnosti liofilizacijske pogače, ki v večini primerov ne pomenijo neustreznosti izdelka, so skrčenje in manjše pokanje liofilizacijske pogače, t. i. meglenje notranje stene vial, penjenje vzorca ter pojav vulkana kot posledica dviga manjše količine pogače (slika 4).

3.2 UPORABA PROCESNO-ANALIZNIH TEHNOLOGIJ IN MODELIRANJA NA PODROČJU LIOFILIZACIJE

K optimizaciji ciklov danes močno pripomore uporaba sodobnih orodij procesno-analiznih tehnologij (PAT), ki omo-



Slika 4: Nepravilnosti v izgledu liofilizacijske pogače: skrčenje pogače (a), popokanje pogače (b), meglenje vzorca (c), penjenje vzorca (d) in vulkan (e). Prirejeno po 10.

Figure 4: Irregularities in cake appearance: cake shrinkage (a), cake cracking (b), fogging (c), foaming (d) and volcano (e). Adapted after 10.

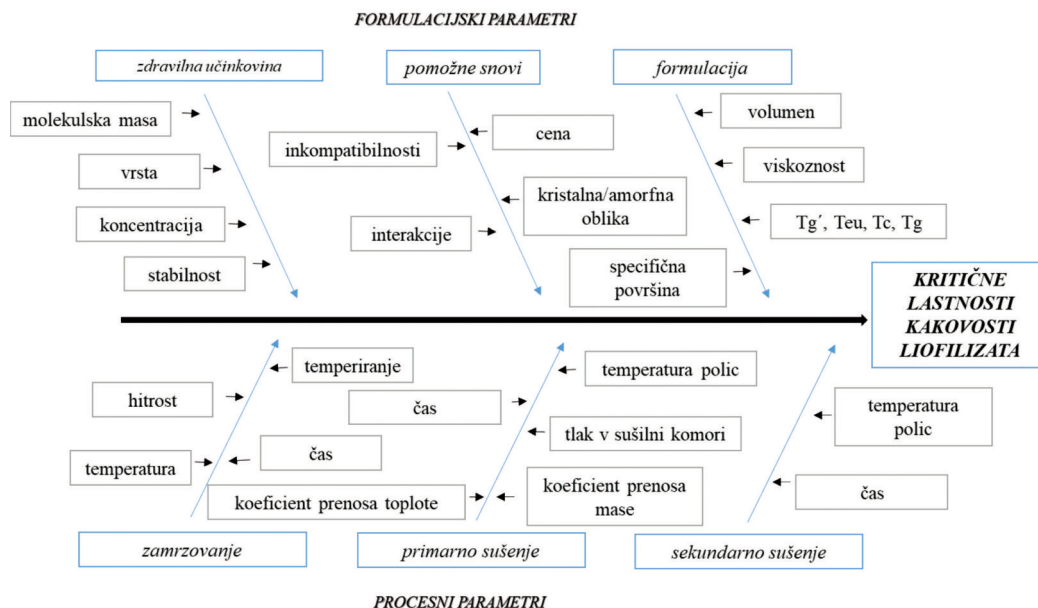
gočajo vpeljavo koncepta načrtovanja kakovostnih izdelkov in procesov »Quality by Design« (QbD). QbD predstavlja novo paradigmo, katere cilj je vgrajevanje kakovosti v proces in proizvod, ki temelji na predhodni identifikaciji ključnih značilnosti izdelka in kritičnih procesnih parametrov (19). Cilj uvedbe QbD je sistematičen pristop k razvoju proizvoda in procesa, njenemu razumevanju in vzpostavitvi procesne kontrole, z namenom pridobivanja kakovostnih proizvodov (20). Pri uvedbi QbD si lahko pomagamo s t. i. diagramom Ishikawa, kjer definiramo glavni problem in parametre, ki vplivajo na definirani problem (slika 5).

S pojavom PAT so se pojavile stroge regulatorne zahteve glede vpeljave teh orodij v farmacevtsko industrijo, kljub temu pa so tovrstna orodja že del vsakodnevne proizvodnega procesa farmacevtskih izdelkov (21). Tako so se orodja PAT pojavila tudi na področju sušenja z zamrzovanjem.

Sistem TEMPRIS (*temperature remote interrogation system*) sestavlja 8 do 16 temperaturnih senzorjev, ki jih vstavimo neposredno v vzorce v vialah (slika 6a). Senzorji preko oddajnika pošiljajo signal do sprejemne enote, ki signal pretvori v temperaturno vrednost. Slednja se z uporabo ustrezne programske opreme izpiše na računalniku, ki je povezan z liofilizatorjem. Sistem tako omogoča stalen nadzor nad T_p med sušenjem (22). Sistem TrackSense Pro je v osnovi podoben sistemu TEMPRIS, le da senzorje napaja baterija (slika 6b). Sistem ne omogoča sprotnega prikaza temperature, ampak se podatki hranijo in so dostopni šele po koncu procesa (23).

Manometrično določanje temperature (MTM, *manometric temperature measurement*) predstavlja neinvazivno tehnologijo, kjer z razliko od prejšnjih dveh sistemov ne posegamo neposredno v vzorce. Sistem uporabljajo za spremljanje kritičnih lastnosti produktov in procesa sušenja za celotno serijo sušenih vzorcev. MTM temelji na periodičnem dvigovanju tlaka znotraj komore, ki je med meritvijo izolirana od kondenzatorja. Dvig tlaka v komori popišemo z uporabo MTM-enačbe, ki na podlagi toplotnega in masnega prenosa posredno preko parnega tlaka ledu in upornosti trdne plasti proti toku vodne pare omogoča določitev najpomembnejših parametrov produkta in procesa, kot so hitrost sublimacije, temperatura produkta, debelina suhe snovi in koeficient prenosa toplote. V primerih, ko je MTM sklopljen s programsko opremo SMART™, je omogočena neposredna optimizacija primarnega sušenja, preko predhodno izbranih zahtev operaterja in dejanske povratne informacije o izdelku med merjenjem (23).

Uporaba spektroskopskih tehnik (sonde NIR in RAMAN) med procesom sušenja predstavlja neinvazivno in nede-



Slika 5: Diagram Ishikawa, ki opredeljuje bistvene parametre, ki vplivajo na proces liofilizacije. Prirejeno po: http://file.scirp.org/Html/1-4600131_63220.htm. Tg' – temperatura steklastega prehoda maksimalno koncentrirane zamrznjene raztopine; Teu – temperatura tališča evtektika; Tc – temperatura kolapsa; Tg – temperatura steklastega prehoda.

Figure 5: Ishikawa diagram defining the main parameters influencing the lyophilisation process. Adapted after: http://file.scirp.org/Html/1-4600131_63220.htm. Tg' – glass transition temperature of the maximally freeze-concentrated solution; Teu – eutetic temperature; Tc – collapse temperature; Tg – glass transition temperature.

struktivno »in line« metodo. Postavitev sond v sušilno komoro omogoča neprestano spremljanje poteka procesa in nadzor nad spremembami v vzorcih. Podatki se ves čas shranjujejo in v določenih časovnih intervalih izpisujejo v

obliki spektrov. Z uporabo sond lahko dobimo podatke o poteku kristalizacije znotraj vzorcev, iz česar lahko sklepamo o koncu faze zamrzovanja. Prav tako lahko spremljamo potek sublimacije in določimo končno točko primarnega sušenja, obenem pa nam sonde omogočata detekcijo vsebnosti vlage v produktih, kar je pomemben podatek pri določanju časa sekundarnega sušenja (25). Trenutno je najpogostejše uporabljan sistem TDLAS, ki deluje na principu bližnje IR-spektroskopije. LyoTrack predstavlja senzor za določanje vlage oz. količine vodne pare v sušilni komori. Največkrat ga uporabljamo za določanje konca primarnega sušenja, kar senzor zazna kot zmanjšanje deleža vodne pare. Programska oprema omogoča izrisovanje procesnega grafa, kjer spremljamo delež vlage v komori v odvisnosti od temperature in časa (24).

Modeliranje pri liofilizaciji zmanjša število poskusov po principu »poskusi in napake«, kar vodi v povišanje stroškov procesa. S sistemom načrtovanja eksperimentov (DoE, design of experiments) ugotovimo vpliv in interakcije med različnimi faktorji, ki temeljijo na povezavi kritičnih lastnosti vhodnih surovin (CMA), kritičnih procesnih parametrov (CPP) in kritičnih lastnosti kakovosti liofilizatov (CQA). Pri tem lahko v ospredje postavimo modeliranje same formu-



Slika 6: Senzor TEMPRIS za nadzor temperature (a) in senzor TrackSense Pro (b). Prirejeno po: <https://www.tempris.com/>; <http://www.ellab.com/products/find-the-right-data-logger/tracksense-pro>

Figure 6: TEMPRIS sensor for temperature monitoring (a) and TrackSense Pro sensor (b). Adapted after: <https://www.tempris.com/>; <http://www.ellab.com/products/find-the-right-data-logger/tracksense-pro>.

lacije oz. procesa. V literaturi najpogosteje najdemo modeliranje faze primarnega sušenja. V okviru slednjega posledično definiramo eksperimentalni prostor, pri čemer modeliranje najpogosteje temelji na teoriji koeficienta prenosa toplote in upornosti prenosa mase (19, 25).

4 SKLEP

Proizvodnja bioloških zdravil predstavlja enega najzahtevnejših postopkov, ki je sestavljen iz množice zaporednih korakov in katerega glavni cilj je priprava varnega, kakovostnega in učinkovitega zdravila. Liofilizacija je metoda izbora pri sušenju raztopin termolabilnih zdravilnih učinkovin, med katere uvrščamo tudi proteinske molekule. V izogib visokim stroškom liofilizacije so trendi na tem področju usmerjeni v iskanje rešitev za optimizacijo stroškov procesa, pri čemer novost predstavlja agresivno sušenje, torej sušenje nad kritičnimi temperaturami produkta, brez vpliva na izgled liofilizata in stabilnost zdravilne učinkovine. Večjo ekonomičnost procesa danes omogočajo tudi številna orodja PAT, ki zagotavljajo ustrezno kakovost liofiliziranih produktov ter implementacija sodobnih matematičnih modelov za vrednotenje sočasnega vpliva več faktorjev, ki vse bolj nadomeščajo številne empirične ponovitve eksperimentalnih poskusov.

5 LITERATURA

1. Kasper JC, Winter G, Friess W. Recent advances and further challenges in lyophilization. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85:162-9.
2. Urquhart L. Top drugs and companies by sales in 2018. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18:245.
3. Štrukelj B. Razvoj, delitev in vloga bioloških zdravil. In: Štrukelj B, Kos J, editors. *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007. p. 3-24.
4. Kocbek P. Od klasičnih do sodobnih dostavnih sistemov za biofarmacevtike. In: Kočev Glavač N, Zvonar A, editors. *Biološka zdravila*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2015. p. 51-64.
5. Fjokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: A formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:298-306.
6. Kasper JK, Friess W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78:248-63.
7. Searles JA, Carpenter JF, Randolph TW. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine $T(g)^*$ in pharmaceutical lyophilization. *J Pharm Sci.* 2001;90:872-87.
8. Connolly BD, Le L, Patapoff TW, Cromwell MEM, Moore JMR, Lam P. Protein Aggregation in Frozen Trehalose Formulations: Effects of Composition, Cooling Rate, and Storage Temperature. *J Pharm Sci.* 2015;104:4170-84.
9. Sp scientific. Basic Principles of Freeze Drying [Internet]. Stone Ridge, NY: Sp scientific, 2009 [updated 2020 June 5; cited 2020 June 15]. Available from: <https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics>
10. Patel SM, Nail SL, Pikal MJ, Geidobler R, Winter G, Hawe A, Davagnino J, Gupta SR. Lyophilized Drug Product Cake Appearance: What Is Acceptable? *J Pharm Sci.* 2017;106:1706-21.
11. Wang DQ, Hey JM, Nail SL. Effect of collapse on the stability of freeze-dried recombinant factor VIII and alpha-amylase. *J Pharm Sci.* 2004;93:1253-63.
12. Depaz RA, Pansare S, Patel SM. Freeze-Drying Above the Glass Transition Temperature in Amorphous Protein Formulations While Maintaining Product Quality and Improving Process Efficiency. *J Pharm Sci.* 2016;105:40-9.
13. Bjelošević M, Bolko Seljak K, Trstenjak U, Logar M, Brus B, Ahlin Grabnar P. Aggressive conditions during primary drying as a contemporary approach to optimise freeze-drying cycles of biopharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2018;122:292-302.
14. Johnson R, Lewis L. Freeze-Drying Protein Formulations above their Collapse Temperatures: Possible Issues and Concerns. *American Pharmaceutical Review.* 2011;14:50-4.
15. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm Res.* 2004;21: 191-200.
16. Remmele RL, Krishnan S, Callahan WJ. Development of stable lyophilized protein drug products. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:471-96.
17. Bjelošević M, Zvonar Pobirk A, Planinšek O, Ahlin Grabnar P. Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation. *Int J Pharm.* 2020;576.
18. Smith G, Arshad MS, Polygalov E, Ermolina I. Through-vial impedance spectroscopy of the mechanisms of annealing in the freeze-drying of maltodextrin: the impact of annealing hold time and temperature on the primary drying rate. *J Pharm Sci.* 2014;103:1799-810.
19. Koganti VR, Shalaev EY, Berry MR, Osterberg T, Youssef M, Hiebert DN, Kanka FA, Nolan M, Barrett R, Scalzo G, Fitzpatrick G, Fitzgibbon N, Luthra S, Zhang L. Investigation of design space for freeze-drying: use of modeling for primary drying segment of a freeze-drying cycle. *Pharm Sci Tech.* 2011; 12:854-61.
20. Yu LX. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. *Pharm Res.* 2008;25:781-91.
21. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. [Internet]. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Office of Regulatory Affairs (ORA), 2004 [cited 2020 June 20]. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070305.pdf>



22. Schneid S. *Investigation of Novel Process Analytical Technology (PAT) Tools for Use in Freeze-Drying Processes*. Doktorsko delo. Nürnberg: der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 2009.
23. Gieseler H, Kramer T, Pikal MJ. Use of manometric temperature measurement (MTM) and SMART freeze dryer technology for development of an optimized freeze-drying cycle. *J Pharm Sci*. 2007;96:3402-18.
24. De Beer TR, Vercruysse P, Burggraefe A, Quinten T, Ouyang J, Zhang X, Vervaet C, Remon JP, Baeyens WR. In-line and real-time process monitoring of a freeze drying process using Raman and NIR spectroscopy as complementary process analytical technology (PAT) tools. *J Pharm Sci*. 2009;98:3430-46.
25. Preskar M, Videc D, Vrečer F, Gašperlin M. Investigation of design space for freeze-drying injectable ibuprofen using response surface methodology. *Acta Pharm*. 2021; 71:81-98.