

Biorreactores y Generación de Biofarmacos.

Los biorreactores tienen como objetivo ser el lugar donde se cultivan las células o los microorganismos.

Existen 3 tipos de biorreactores: Cultivo superficial, cultivos sumergidos y células inmovilizadas

Biorreactor de cultivo superficial:

Son los más antiguos. Consiste en un sistema de cultivo en bandejas en los cuales se puede colocar el medio de cultivo para inocular los después mediante una bacteria/hongo que prolifera generando un crecimiento en superficie y acumulando los productos en esta bandeja. Estos tipos de reactores se utilizan para la generación de algunos ácidos orgánicos como citrato, ácido acético. La desventaja de estos biorreactores es que son mixtos, ya que a través del aire que va entrando se contaminan, no son puros de la cepa que nos interesa y estos otros organismos degradan parte de los productos generados lo que nos lleva a un rendimiento de producción extremadamente bajo con un sistema de purificación de muy alto costo.

Cultivos sumergidos

1. Estanque agitado:

Es el que se utiliza con mayor frecuencia en la actualidad, consta de un estanque que puede ser de vidrio o de acero inoxidable en la cual se coloca el medio de cultivo y el organismo crece de manera sumergida al interior del medio. Estos biorreactores poseen un motor que mediante turbinas le transfiere energía al líquido, son paletas que se mueven circular y horizontalmente y que están unidas a este eje central que tiene un motor. El reactor tiene un espacio "en blanco" ya que no se llena hasta el tope de líquido y aquí se podría producir contaminación en la entrada, esto se soluciona con sellos que impiden la entrada de contaminantes. La mayor parte de estos cultivos son aerobios por lo que se requiere suministro de oxígeno, este aire entra al reactor y las burbujas ascienden hacia la superficie, al chocar las burbujas con sus turbinas se diseminan en burbujas de menor tamaño permitiendo la correcta oxigenación del líquido. Elección para bacterias de tipo recombinante

2. Columna de Burbujeo

Son reactores verticales. El aire que entra en la parte inferior es quien le da la energía para mover el sistema, para mantener homogénea la solución en su interior y además transferir oxígeno a la solución. Entonces generan movimientos circulares a medida que las burbujas

van ascendiendo. Tienen una parte más ancha en la parte superior para permitir que la espuma generada debido a las proteínas no ascienda hacia la salida del gas, ya que si esto ocurre los filtros de aire se tapan y se pierde el cultivo. Menor costo de producción, elección de bacterias.

3. Reactores Airlift.

Estos reactores se basan en el movimiento del aire. El aire entra por un tubo central que permite que el aire ascienda por este tubo debido a que tiene menor densidad por la gran cantidad de burbujas y genere un movimiento hacia el exterior, circular, que aumenta la velocidad del reactor y que permite que las burbujas sean arrastradas de nuevo al interior del reactor, es decir aumenta el tiempo de residencia de las burbujas en el sistema, permitiendo una mayor transferencia de oxígeno.

Células inmovilizadas

En el caso de bacterias: Al inmovilizar las células bacterianas se forma una biopelícula sobre un material de soporte, al tener muchas bacterias adheridas sobre la superficie, hay mucho más biomasa en el sistema y se genera mayor cantidad de producto en reactores más pequeños, aumentando la eficiencia de producción.

1. Biorreactor de lecho fijo

Tiene material particulado que rellena todo su interior, el material de soporte pueden ser esferas de vidrio, plástico, cerámicos, eso se empaqueta todo en el reactor y permite que el líquido pase a través de él, va vertical en forma ascendente o descendente. Aquí se genera un gradiente en el flujo del líquido generando variación de concentraciones entre sustratos y productos que puede llevar a una disminución de la productividad

2. Biorreactor de lecho fluido

El material de soporte es más liviano y pequeño de manera que el flujo de recirculación del líquido al interior del reactor genera que los materiales de soporte se eleven y se mueven en el interior, generando movimientos continuos, eso permite que crezcan organismos adheridos sobre superficies de este material más pequeño y liviano y tener una solución más homogénea. El ascenso de las partículas tiene que llegar solo hasta cierto nivel de tal manera que no alcancen el punto de salida para evitar que estas pequeñas partículas salgan en el efluente.

- Cuando las proteínas de interés requieren un grado de glicosilación en específico ya no se puede hacer en bacterias/hongos/levaduras, entonces se requiere cultivar células animales.
- Recordar que los hongos y levaduras son capaces de glicosilar, pero hay algunos casos en que la glicosilación debe ser tal que solo puede ser realizada por células animales.

Cultivo de células animales

Los reactores de células animales son mucho más pequeños, además las células animales acumulan productos tóxicos como lactato que terminan por inhibir su crecimiento, para evitar que esto ocurra se debe sacar parte del medio de cultivo e irlo cambiando, por lo que sigue el requerimiento de una bomba que saque el mismo volumen que se está agregando de medio fresco para diluir estos productos tóxicos.

Las células animales crecen mucho más lentamente que las bacterianas y son mucho más sensibles a factores estresantes como :

- Agitación mecánica: La fuerza de corte es suficiente para dañar la estructura y generar lisis y muerte celular por eso se utilizan sistemas de agitación de paletas de mucha mayor superficie que se mueven mucho más lento
- Burbujas de aire: La membrana celular es hidrofóbica y las burbujas de aire tienen características hidrofóbicas por lo que al chocar con la membrana estiran la célula y generan estrés inhibiendo su crecimiento, es por esto que se deben utilizar tensioactivos que eviten el contacto entre la célula y la burbuja
- Variaciones de pH: Las células animales requieren un control de pH 7 ± 0.05 , para esto se utilizan controles automáticos o la agregación de ácido carbónico que acidifica mucho más débil que un ácido fuerte.

Se requiere la eliminación de sustancias tóxicas o recambio del medio mediante perfusión o diálisis y evitar efectos mecánicos de la agitación.

Muchas células animales solo crecen bien siempre que estén adheridas a un material de soporte como es el caso de las células CHO

Biorreactor de lecho fluidizado para células CHO:

Las células CHO cancerosas producen anticuerpos y necesitan adherirse a un material de soporte. En este sistema se airea la parte central, las burbujas sólo se mueven por el tubo central y se recircula el líquido oxigenado pero sin burbujas permitiendo que las células crezcan

Biorreactores de un solo uso

Se utilizan para células animales e hibridomas, los hibridomas pueden crecer de forma suspendida, sin material de soporte. Se colocan sobre un material mecánico que genera oscilación en superficie, una bolsa plástica en la cual está el medio de cultivo y son de un solo uso porque la bolsa plástica es la que se va cambiando,

El líquido se coloca en su interior y como oscila muy lentamente no hay efecto mecánico que pueda dañar la célula y como tenemos una gran superficie que le permite la correcta aireación para el cultivo animal. Para bacterias no sirve ya que las demandas de oxígeno son mucho más altas y crecen mucho más rápido.

- La primera capa no debe erosionar, debe resistir al medio, debe ser inerte, alta resistencia química a gases, ácidos, todo lo que pueda haber dentro del cultivo, puede ser de polietileno
- La segunda capa se ocupa polietileno de densidad ultra baja y esto reduce la transmisión de gases a través del film y provee al plástico de mayor durabilidad y

- mayor fuerza
- La tercera también intermedia se utiliza etileno vinil (alcohol vinílico) y esta capa es la más encargada de la minimización de transferencia de gas, que no haya un intercambio de gases entre medio externo ni interno, no puede pasar oxígeno ni co2
- La cuarta capa que está en contacto con el medio externo puede ser de poliéster o nylon o polietileno de baja densidad y su función es proteger al cultivo de la luz, resistencia y una limpieza de la bolsa y que aumenta la resistencia a la transmisión de gases en general

Genera gran cantidad de residuos plásticos.

Anticuerpos monoclonales

Hibridomas: Fusión celular de linfocitos B con células de mieloma, como células cancerosas que pueden proliferar sin problemas (los linfocitos B no pueden proliferar ni cultivarse por sí solos), entonces estos hibridomas producen solo un tipo de anticuerpo, específico y además único, es decir anticuerpos monoclonales, siempre la misma capacidad de unión antígeno, misma afinidad.

¿Cómo podemos producir anticuerpos monoclonales aquí en Chile?

Producción de Rituximab mediante el proceso del biorreactor de tanque agitado:

- Producción inicial y escalamiento en base a biorreactores de un solo uso partiendo con reactores de 0.2 litros, con muchos reactores en paralelo, hasta reactores en bolsa de 200 litros, esto para alimentar otros reactores de 2000 litros y finalmente para alimentar a reactores de producción de estanque agitado

Producción de Rituximab mediante el proceso del biorreactor de lecho fluidizado

- El escalamiento se hizo mediante reactores de un solo uso, pero en la etapa final se alimentó un reactor de lecho fluidizado utilizado partículas en las cuales se adhieren las células de CHO. La ventaja de esto es que la adherencia permite retirar el medio de cultivo libre de células y simplificar mucho el sistema de purificación y además el nuevo diseño permite aumentar la productividad de anticuerpos monoclonales y el crecimiento de las células debido a que están creciendo adheridas en esta etapa final

Separación, concentración y purificación:

Son productos biológicos aquellas formulaciones cuya obtención y /o producción involucra organismos vivos, así como sus fluidos y tejidos

Hay una etapa de fabricación del producto que son técnicas básicamente de fermentación y posteriormente cuando se obtiene una mezcla de cosas, esta mezcla hay que separarla y hay una serie de procedimientos de separación y purificación

1. Fermentación, fabricación del producto
2. Mezcla multicomponentes que se limpia por técnicas de tecnología de membranas, a nivel de laboratorio se utiliza diálisis y a nivel industrial se utiliza técnica de filtración, con esto se eliminan los contaminantes o fracciones que nos interesan
3. Concentración : Mediante técnicas de ultrafiltración
4. Purificación: Mediante técnicas cromatográficas donde los productos se separan mediante las propiedades fisicoquímicas del producto de interés
5. Estabilización por técnicas de liofilización, finalmente el producto se liofiliza y se obtiene el producto en polvo en ampolla

Ruptura celular:

Hay distintas maneras de cómo se pueden romper las células:

- No mecánicas, químicas: Rupturas mediante detergentes, solventes o exposición a condiciones alcalinas. Esta extracción funciona mejor cuando se acopla a técnicas de ultrasonido o sonicación que permiten una mejor separación del PA de la matriz.
- Mecánicas: Molienda con molino de perla; Ruptura mediante ultrasonido en donde se aprovecha la cizalla del líquido para producir la ruptura de la célula ; Técnica de homogenización a altas presiones, esta técnica produce lisis celular generando la muerte de bacterias y hongos

Tecnología de Membranas, separación:

Esto tiene que ver como se destruye la célula mediante técnica de centrifugación o filtración para liberar el contenido citoplasmático que contiene el producto de interés, luego tenemos la mezcla de múltiples componentes que debemos separar.

- Separación por tamaño
- Microfiltración: Se separan los glóbulos de la grasa, bacterias esporas
- Ultrafiltración: Para separar proteínas por tamaño, las membranas se caracterizan por el corte molecular, se separan por tamaño molecular las proteínas. Por lo general se utilizan las técnicas de ultrafiltración asociadas a ultrasonido, esta combinación permite alcanzar tamaños en escalas nanométricas
- Nanofiltración y ósmosis reversa : separan hidratos de carbono, sales

Las técnicas están basadas en diferencias de presión para mover los fluidos y después cada vez que las partículas son más pequeñas se asocian dos fuerzas físicas para lograr la separación: La presión y separación por gradiente eléctrico.

Entonces en resumen del flujo de la etapa de fabricación de un producto biológico y sus operaciones:

1. Banco de células
2. Biorreactores : De superficie, Cultivos sumergidos, Células inmovilizadas
3. Cultivos celulares
4. Obtención del producto biológico
5. Separación mecánica: Centrifugación y separación por membrana
 - Técnicas de filtración
 - Técnicas de cromatografía por afinidad
 - Cromatografía de pulido (intercambio iónico)
 - Purificación

Métodos de purificación de proteínas:

1. Separación del material, ruptura mecánica del material y obtención del extracto libre de las células que contienen la proteína de interés. Extracción en medio alcalino
2. Precipitación isoelectrica, la proteína de interés se separa del resto de las proteínas y del resto de componentes del extracto, se obtiene una proteína separada que está en medio de sales, azúcares de bajo pm
3. Se limpia mediante tecnica de diálisis que es cuando se utiliza la tecnología de membrana, es un proceso de filtración, básicamente la diálisis es lavado, sale un extracto sucio, donde entre medio está la proteína que nos interesa, se hace un lavado usando membranas de distinto porte molecular y una vez que se obtiene este producto más purificado, se concentra
4. Concentración mediante técnicas de ultrafiltración, aquí se utiliza una membrana de corte molecular que esté cercana a la masa molecular de la proteína que nos interesa.
5. Purificación cromatográfica: Una vez obtenido este concentrado se utiliza la purificación cromatográfica que está dirigida por el tamaño y carga de la proteína.
 - Cromatografía de intercambio iónico
 - Cromatografía de afinidad
 - Cromatografía por grupos hidrofóbicos

El enfoque que se haga de estas técnicas depende del tipo de proteína que uno quiera separar.

Ejemplo de Separación y purificación proteínas de Quínoa

Las semillas de la quinoa tiene del orden del 12-22% de proteínas, también tiene una composición de ácidos grasos, fitoestrógenos, no contienen gluten y la proteína de interés para purificar y separar de la semilla es la globulina..

En primer lugar las semillas se pulen, raspar y lavar con agua para eliminar las saponinas superficiales que tienen que le dan el sabor amargo, luego se muelen las semillas y se hace una harina, está harina se somete a un proceso de desgrasado con solvente orgánico para eliminar el aceite presente en la semilla.

Lo que queda en la harina son proteínas, quedan: albúminas, globulinas, sales, y CHO de distintos PM. Esta es la mezcla inicial a partir de la cual queremos recuperar la globulina que es de determinada masa molecular.

Inicialmente hacemos una ruptura mecánica para liberar las proteínas que están en el citoplasma, posteriormente viene la primera separación gruesa mediante precipitación isoeléctrica, se ubica el PI de la proteína, es decir el punto de menor solubilidad y para la proteína de la quinoa se ubica entre 4 - 4,5, se lleva al extracto alcalino, el medio fuertemente alcalino ayuda a la ruptura celular y a la salida de la proteína que está dentro de la célula. A nosotros nos interesan las globulinas de la quinoa, que son las globulinas de la quinoa, estas tienen un peso de 54 KDa y queremos separarlas de las albúminas que tienen tamaños menores a 20 KDa. Luego se hace una prefiltración y luego una ultrafiltración para concentrarla y posteriormente obtener un producto en polvo, una liofilización.

- Caracterización:

Para determinar el contenido de proteínas solubles se hace una electroforesis en gel, se puede determinar su tamaño, su potencial Z. Mediante espectroscopia de fluorescencia se determina la parte hidrofóbica y si se quiere ver cambios en la estructura secundaria, es decir cuánto hay de alfa hélice y beta plegada se utiliza dicroísmo circular

Proceso desde el biorreactor

1. Primero conseguir las células, puede ser por filtración o centrifugación. Se produce una lisis para desintegrar las células. Lo más común es homogeneizar: pasan por presión en un margen estrecho que combina todo con una fuerza de cizalla y alta presión logra lisis. Tras haber roto las células se eliminan los restos celulares y se obtiene separación de los compuestos. Se obtiene mediante el medio de fermentación que contiene el producto.
2. El proceso de concentración es para obtener menores volúmenes de producto, se logra induciendo la precipitación del producto usando sales o solvente (como etanol), la ultrafiltración es la más usada igual y se usan distintos puntos de corte. Con la ultrafiltración se consiguen altos índices de recuperación del producto.
3. La purificación se hace con técnicas cromatográficas dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del analito. La bio especificidad de la cromatografía de afinidad es la más utilizada.
4. Luego de la purificación viene la formulación del producto final, se filtra el producto final y se añaden los excipientes. El producto debe ser estéril y quedar en ampollas, sino también liofilización para obtener un polvo. Al producto purificado se le pueden añadir excipientes para estabilizar, como aminoácidos (glicina, ya que ayuda a estabilizar interferón), también están los polioles al tener grupos OH ayudan a estabilizar, también están tensoactivos que si están bien diluidos entregan estabilidad en algunas proteínas ya que disminuyen la tensión superficial de la mezcla. Finalmente pasa por un filtro esterilizador. Cuando está en contenedor final estéril debe entrar en cuarentena y entrar a revisión final por control de calidad.

Principal problema que surge al liofilizar un producto y qué moléculas se usan para solucionarlo:

- Se usan crioprotectores, ya que se pierden estructuras proteicas ya que la extracción de agua y enfriamiento es un proceso violento para las proteínas, por lo tanto se usan excipientes como azúcar varias para estabilizar, aminoácidos y polioles igual se usan.
- Cromatografía de afinidad: se usa cromatografía de proteína a para anticuerpos monoclonales cuando se unen a la fracción Fc, y así se separan todos los anticuerpos presentes.
- Agregado intercambio iónico: intercambio iónico es el que atrae aniones o sea carga negativas, por lo tanto debe estar cargado positivamente, igual que el catiónico está cargado negativo para atraer cationes. Hay que tener en consideración el punto isoeléctrico y dependiendo de la carga que queremos retener va a ser el intercambiador que se va a utilizar.
- Se puede hacer gradiente de pH lo que ayuda demasiado a una alta definición ya que las separa aunque el punto isoeléctrico sea muy similar.

Desafíos para purificar anticuerpos biespecíficos:

Anticuerpos biespecíficos: tienen la capacidad de unirse a dos antígenos diferentes o dos epítopos del mismo antígeno. Se usan los mismos métodos pero con algunas modificaciones. Estos anticuerpos generan más residuos, lo que puede generar más dificultad en la purificación.

Formulación de Biofarmacos:

Características generales de fármacos biológicos:

- Alto peso molecular
- Múltiples grupos funcionales con un rango de pKA que modifican estabilidad: Determinarán si la formulación será líquida o sólido liofilizado. Estos grupos modifican la estabilidad de la interacción a distintos pJ que pueden tener estas moléculas
- Estructura compleja tridimensional: Por un lado es lo que le entrega la interacción de alta afinidad pero también da pie a posibles inestabilidades de estas moléculas. Estas moléculas pueden dejar sus regiones más hidrofílicas expuestas hacia el interior y sus regiones hidrofóbicas pueden tender a la aglomeración hacia el interior, más alejadas del solvente o del medio continuo fisiológico
- Alta solubilidad en agua y aumento de la viscosidad, como son polímeros (de aminoácidos) en su estructura 3D captan mucha agua aumentando la viscosidad y por lo tanto complicar la administración por inyección ya que si son más viscosas son más dolorosas
- Interacción con el material de empaque primario, los materiales primarios pueden capturar moléculas de fármaco en la superficie disminuyendo la dosis, cambiando la concentración del seno de la solución.

Administración convencional de biológicos:

- Inyecciones subcutáneas o IM
- Estudios de preformulación: Estabilidad química y estabilidad física. Esto se estudia en cuánto al nivel de pH de acuerdo al mapa de pKa que se pueda caracterizar de la molécula, la solubilidad disminuye en el punto isoeléctrico. También se piensa en la fuerza iónica, que sales o qué aminoácidos se pueden ocupar para proveer al medio de disolución la fuerza iónica suficiente para que entre en solución la molécula y evitar agregación
 - Impurezas: Las impurezas pueden ser moléculas que contribuyan a respuestas inmunogénicas
- Interacciones con el material primario: Se puede recubrir la superficie interna del material de envase, de modo de convertir esa superficie en una superficie de baja unión a proteínas
- Excipientes: Nos permiten regular la viscosidad final de la formulación.

Estabilidad:

- La estabilidad nos va a informar acerca de la vida útil del producto. Dependiendo de los residuos aminoacídicos que se tengan pueden ocurrir inestabilidades químicas como:
 - Residuos aminoacídicos lábiles a oxidación: Tirosina, Metionina, Cisteína, Histidina, Triptofano
 - Residuos aminoacídicos lábiles a desaminación Asparagina, Glutamina
- Inestabilidades físicas como:
 - Denaturación o pérdida de la estructura terciaria
 - Agregaciones irreversibles y adsorción a superficies, el problema con la adsorción a superficies es que algunas moléculas al adsorberse despliegan sus regiones hidrofóbicas, entonces abren regiones que normalmente no deberían estar expuestas y la molécula adquiere una nueva estructura 3D que pierde eficacia, esto ocurre sin necesariamente una modificación química.
- La determinación de la estabilidad en uso de un producto biotecnológico es útil para confirmar su compatibilidad con medios empleados para su dilución y administración al paciente y para evaluar el solvente para reconstituir un producto liofilizado.

pH y Fuerza iónica

- Cuando la proteína está en su punto isoeléctrico, es decir cuando la suma de las cargas positivas y negativas es igual a 0, las repulsiones electrostáticas ya no son capaces de proveer de estabilidad coloidal a la molécula y se puede producir la agregación de distintas moléculas unas con otras y esa agregación tiende a ser irreversible.

- A pH bajos los grupos aminos van a estar ionizados y se manifiestan cargas positivas.
- A pH altos tendremos deficiencia de protones y los grupos carboxílicos están desprotonados manifestando cargas negativas
- El exceso de una carga es suficiente para que haya repulsión electrostática y 2 moléculas no se agreguen. La fuerza iónica contribuye a la estabilización de esas cargas superficiales que manifiestan las moléculas.

Efecto de la temperatura:

Las proteínas son estables sólo en un rango de temperatura, un aumento de la temperatura disminuye la estabilidad de los puentes de hidrógeno y aumenta la fuerza de interacciones hidrofóbicas hasta 60°C, después de ahí las fuerzas de interacciones hidrofóbicas tampoco son estabilizadas, todo lo cual puede llevar a pérdidas de la estructura terciaria.

- Estos cambios en la temperatura conllevan cambios físicos como agregación o denaturación y esta denaturación puede ser reversible o irreversible.
- El efecto de la temperatura va a depender del pH y la fuerza iónica
- Baja de temperatura: Hay riesgo de denaturación en frío, ya que las fuerzas hidrofóbicas disminuyen en condiciones muy bajas de T°, de aquí nace la necesidad de los excipientes claves en el proceso de liofilización, que es secado en frío o secado por congelación, este proceso debe incluir crioprotectores o lioprotectores
- Los pH extremos van a inestabilizar a la estructura, produciendo un elevado número de cargas y resultando en soluciones que no pueden ser administradas
- La estabilidad termodinámica se alcanza en el punto isoeléctrico, ya que el sistema disminuye su energía, pero esto significa una inestabilización del producto farmacéutico ya que se pueden agregar o precipitar estos agregados.

Excipientes en la formulación de formas farmacéuticas para biológicos

- Crioprotectores o Lioprotectores:
 - Azúcares no reductores como sucrosa y trehalosa
 - Se utilizan con el propósito de estabilizar a la molécula activa en el proceso de congelación y después en la salida del solvente del medio
 - Son moléculas hidrofílicas que interactúan íntimamente con la molécula que se quiere congelar y reemplazan a las moléculas del solvente manteniendo la estructura nativa o responsable del efecto
 - PEG : Se utiliza con fines similares, sin embargo su interacción con el fármaco no es muy íntima por lo que se necesitan concentraciones relativamente altas, produce una estabilización estética, aumenta la viscosidad y disminuye la movilidad estructural
- Surfactantes no iónicos
 - Reducción de adsorción y agregación, también es una forma de reducir la viscosidad de la solución resultante y mejorar la adherencia a la terapia.
- Aminoácidos, sales ,buffers: Controlan la fuerza iónica de la solución
- Recipiente y envase

- Vidrio inerte, en los estudios de preformulación determinar si la superficie de ese vidrio podría ser una superficie de alta interacción con la molécula
- Las gomas y sellos que forman parte de las tapas también pueden ser otros elementos del envase que podrían interactuar con el seno de la solución y por ende también son parte del estudio de formulación y reformulación,.

Liofilización:

El proceso de liofilización otorga estabilidad, es un proceso que transforma el líquido en sólido. La liofilización es un secado por congelación y corresponde a transformar la salida del solvente a su cambio de fase de sublimación. Se congela esta solución a alta velocidad por una exposición a muy bajas temperaturas rápidamente y es muy importante contar con el crioprotector. Entonces se parte del líquido se congela rápidamente y se empieza a disminuir la presión hasta llegar al punto triple, debajo de este punto pequeños incrementos de temperatura harán que podamos pasar de sólido a gaseoso a través del proceso de sublimación, esta alza de temperatura solo saca el solvente del estado sólido al gaseoso.

- El enfriamiento rápido es clave para que no ocurran cristalizaciones ni agregaciones después de la recomposición de la muestra, el enfriamiento rápido se hace con nitrógeno líquido
- El secado primario es el secado principal que saca el grueso del solvente, es importante que no haya una refundición
- El crioprotector lo que hace es reemplazar moléculas de solvente durante todo el proceso de congelación y así evitamos que se agreguen las proteínas, cuando empieza el proceso de reconstitución de este sólido se hidrata primero el crioprotector y después la proteína, volviendo a retomar su estructura nativa

Rutas no invasivas

Enfasis en administración oral

La tecnología de recubrimiento con polímero pH sensible es muy eficiente para atravesar la barrera del pH ácido del estómago.

En el intestino hay más problemas:

- Sales biliares, Ácidos biliares que pueden desnaturar o permitir la agregación del fármaco biológico.
- También hay una barrera enzimática en el intestino ya que normalmente es ahí donde se absorben proteínas y hay enzimas encargadas de degradar esas cadenas proteicas en unidades aminoacídicas que son las que se absorben y llegan al torrente sanguíneo.
- Microbiota: Pueden haber interacciones con el fármaco de interés.
- Uniones íntimas: Existen estas uniones que son la barrera para poder sobrepasar desde el lumen hacia la circulación enterohepática
- Efecto primer paso

Parches intestinales y microagujas

- Parches intestinales se administra en cápsulas que tienen recubrimiento entérico y pasan enteras del estómago al intestino, se disuelve a pH intestinal, el parche se abre y se adhiere sobre la superficie del intestino y genera un depósito que se adhiere y comienza a liberar, la ventaja es que genera un gradiente de concentración mucho más concentrada en una parte del intestino.
- Microagujas: Se disponen en cápsulas que se disuelven al llegar al intestino y lo que se espera es que las microagujas inyecten sobre el epitelio
- Líquidos iónicos para péptidos : Se hace un cristal, como una sal que termina por aumentar su biodisponibilidad.

Para proveer de un tránsito potenciado a través del epitelio intestinal y lograr que el fármaco biológico llegue a la circulación se utilizan :

- Potenciadores de la permeación
- Inhibidores enzimáticos.

Entonces lo que se busca es que los 3 componentes, fármaco, potenciador e inhibidor sean liberados en el mismo sitio del intestino de modo que el inhibidor enzimático cree un ambiente menos nocivo para que persista la molécula y el potenciador se haga cargo de la interacción con la barrera de absorción, la haga más laxa y entonces el fármaco pueda atravesar y ganar biodisponibilidad.

Potenciadores de la permeación:

- Quitosano - Incrementa el tiempo de retención/ Promueve apertura de uniones íntimas
- Surfactantes y sales biliares - para celular
- Ácidos grasos- transcelular
- Etanol -paracelular
- Azona -para/transcelular

Todos los potenciadores modifican algunas vías de operación, ya sea para celular o transcelular, siendo la transcelular la más importante para péptidos y proteínas.

La paracelular modifica uniones íntimas donde difícilmente puede pasar una proteína.

Los potenciadores de la permeación son por lo general estructuras anfipáticas que pueden interactuar con la bicapa lipídica, ya sea fluidizar o extraer micelas o vesículas de la bicapa lipídica

Modificaciones No covalentes a la estructura

Todo esto en contexto de administración oral de péptidos.

- Salcaprosato de sodio SNAC: Se tiene una estructura nativa que no puede permear a través de las membranas biológicas, entonces lo que hacen estas moléculas carrier es que transforman a la proteína en un intermediario que sí se puede transportar y llegar a la circulación sistémica, la gradiente de concentración llega a la circulación sistémica y una vez ahí las moléculas transportadoras se desagregan y vuelve a adoptar la estructura nativa activa

Modificaciones covalentes:

- Existen modificaciones peptídicas que permiten transformar estructuras no permeables en estructuras permeables. Se les ponen fragmentos de reconocimiento que gatillan internalización por vesícula, por ejemplo un fragmento que gatille endocitosis
- Modificaciones covalentes significa que estamos modificando la estructura química por lo que hay que realizar estudios preclínicos y clínicos nuevos.

Administración bucal:

- Evita el efecto primer paso: Acceso directo a vena yugular
- Alta vascularización

Extrusión por Fundido

La extrusión por fundido es una técnica de fabricación farmacéutica incorporada a la industria de los plásticos. Se generan tornillos que giran al mismo tiempo y están alojados en una seguidilla de tambores que enfrentan a esos dos tornillos a altas temperaturas. Entonces tenemos dos tornillos a lo largo de un túnel térmico y si agregamos río arriba los materiales sólidos, droga, excipientes y a través de los tornillos y sus giros se empiezan a mezclar íntimamente y se empieza a fundir.

Entonces consiste en mezclar materiales sólidos en un principio que luego avanzan a través de los tornillos cuya temperatura es cada vez más alta, obteniendo al final materiales fundidos mezclados homogéneamente para finalmente salir como pellets o lámina

- Ventajas: Está mezcla íntima en estado líquido permite generar una solución sólida, es decir todas las moléculas que fueron disueltas en la estructura predominante funciona como solvente sólido y se obtiene un sólido altamente homogéneo a la salida. El objetivo es generar una solución sólida o dispersión sólida de alta homogeneidad.
 - Permite incrementar la velocidad de disolución de fármacos clase 2 o 4
 - Permite detener liberación abrupta de fármacos altamente solubles de clase clase 1 o 2
- Desventaja:
 - Estabilidad de la molécula a través de estos incrementos de temperatura
 - Temperaturas de fusión de los materiales y temperaturas de transición vítrea
 - Sobrepasando la temperatura de transición vítrea se logra procesar ese sólido como si fuera líquido
- Solución:
 - El uso de plastificantes reducen la temperatura a la cual se produce este cambio de fase en el material (temperatura de transición vítrea)
 - El PEG logra reducir la temperatura de transición vítrea por debajo de los 60 grados que es como el límite más alto de procesamiento de moléculas biológicas.

Temperatura de transición vítrea: Es la temperatura de transformación de un estado más gomoso a un estado de vidrio que es más fluido sin estar transformado en líquido

Análisis de productos biológicos

Calidad:

- Se asocian 3 conceptos a la calidad de los productos farmacéuticos: Eficacia, Seguridad y Estabilidad
 - Eficacia: Medicamento con dosis correcta
 - Seguridad: Contenga una pureza adecuada sin contaminantes que afecten a la seguridad
 - Estabilidad: Mantiene sus características de calidad en el tiempo establecido con la fecha de caducidad

Clasificación

Se debe conocer la naturaleza, procedencia, propiedades fisicoquímicas y propiedades biofarmacéuticas

- Moléculas simples:
 - Obtenidas por síntesis Química
 - PM pequeño < 2000 DA
 - Organicas e inorganicas
 - Base-sal
 - Caracterización con técnicas instrumentales convencionales
- Macromoléculas
 - Origen biotecnológico
 - PM > 10.000 DA
 - Polímeros lineales y/o ramificados
 - Difícil caracterización
- Entidades Complejas:
 - Cocristales
 - Conjugados
 - Nanopartículas
 - Caracterización difícil y técnicas no convencionales

En el caso de los medicamentos biotecnológicos es importante su origen ya que, se requiere su maquinaria celular para generar la molécula de interés, por lo tanto, en los medios de cultivo se pueden generar otras moléculas que pueden afectar a la seguridad del paciente.

Se pueden generar proteínas derivadas del huésped que pueden generar una respuesta inmunológica en el paciente, por lo que es importante eliminarlas.

Uno de los controles es la densidad óptica para ver la concentración del rendimiento del producto obtenido.

Impurezas:

Impurezas relacionadas al proceso contaminante:

- Derivados del sustrato: Proteína derivada del western blot, ácidos nucleicos
- Derivados de los cultivos celulares: Antibióticos, inductores

- Componentes derivados de downstream process (Procesos llevados a cabo para lograr la purificación del producto): Enzimas, reactivos bioquímicos y químicos, sales inorgánicas, solventes, carriers, ligandos.

Impurezas relacionadas al producto incluido los productos de degradación:

- Formas truncadas, para caracterizar estas impurezas se utiliza electroforesis, cromatografía SEC (exclusión por tamaño) Secuenciación N- terminal
- Formas modificadas por desaminación: Para caracterizar está impureza se utiliza cromatografía de intercambio ionico, se debe ver el punto isoelectrico
- Formas modificadas por oxidación: Para caracterizar está impureza se tiene el mapeo triptico, cromatografía de fase reversa y análisis de aminoácidos
- Isomerización
- Unión de puentes disulfuro
- Formas conjugadas alteradas: Glicosilación, fosforilación
- Agregados: Para caracterizar está impureza se utiliza la cromatografía de exclusión por tamaño, dispersión dinámica de la luz, análisis de la partícula

Deaminacion:

- Grupos funcionales susceptibles: Aspartamo y Asparagina

Oxidación:

Residuos aminoacídicos que contienen azufre: Metionina y cisteína

Residuos aminoacídicos que contengan grupos laterales aromáticos: Histidina, triptófano y tirosina

- La catalizacion de está reacción puede ocurrir por factores externos, como por la presencia de metales o radiación ultravioleta

Agregación:

La proteína nativa produce un intermediario donde están presentes ambos equilibrios. Finalmente este equilibrio puede pasar a una proteína principalmente agregada o pueden ser formados agregados en donde ocurre un desplazamiento de las cadenas, formando agregados desordenados o agregados parciales

Cromatografía Líquida HPLC

La cromatografía es una técnica de separación en que el corazón del sistema corresponde a la columna cromatográfica donde ocurre la separación de los distintos analitos de interés de lo que son las impurezas

- Se caracteriza a través del concepto de platos teóricos y hay dos formas de mejorar la eficiencia:
 1. Alargar la columna . 2. Disminuir el tamaño de partícula

Tipos de cromatografía para moléculas biológicas:

- **Cromatografía en filtración en gel:** Separa el tamaño de las moléculas
- **Interacción hidrofóbica:** Los residuos hidrofóbicos de las moléculas biológicas interactúan con el relleno cromatográfico
- **Cromatografía de intercambio iónico:** Las proteínas cargadas pueden ser separadas por intercambio iónico con el relleno de las partículas
- **Cromatografía por afinidad:** Un anticuerpo se inmoviliza en el relleno cromatográfico y los analitos pueden interactuar específicamente a través de un reconocimiento antígeno/anticuerpo
- **Fase reversa:** Péptidos con residuos hidrofóbicos pueden interactuar con estas cadenas y lograr la separación de los distintos analitos de interés.

Análisis y caracterización de impurezas HPLC - SEC

- Las columnas están rellenas de partículas que tienen distintos tamaños de poro.
- Los analitos más pequeños que sean capaces de pasar por estos poros se demorarán más tiempo en salir de la columna.
- Los analitos más grandes pasarán por los intersticios saliendo más rápido.

Análisis y Caracterización de Impurezas SEC-ELS

- Se estudió el efecto del pH sobre una proteína nativa y por cromatografía de exclusión por tamaño, se observó que a pH 12 se forman agregados, por lo que los agregados al ser más grandes, salen antes que las moléculas nativas.

Análisis y caracterización de impurezas HPLC - Fase reversa.

La sílica es funcionalizada con partículas o cadenas hidrofóbicas, por lo que el péptido o proteína pueden interactuar con la fase estacionaria

- Se puede reconocer la oxidación del analito
- La metionina puede oxidarse formando sulfóxidos y posteriormente formando sulfonas que tardarán más en salir.

Análisis y Caracterización de impurezas: HPLC - IEX

Cromatografía de intercambio iónico.

- El PI de la proteína es cuando esta se encuentra con carga neta igual a 0, por debajo de este punto tiene carga positiva y por sobre tendrá carga negativa
- Intercambio aniónica: Las isoformas ácidas saldrán más tempranamente que las básicas
- Como regla general si el PI es conocido, se puede elegir intercambio aniónico y el buffer debe tener un pH de al menos una unidad más grande que el PI para que la proteína esté con carga negativa

- En intercambio cationico el pH debe estar una unidad por debajo del PI para tener la proteína con carga positiva

Oligoperfil

Caracterizacion de modificación postraduccionales

Controles de proceso:

El objetivo es verificar que se lleve a cabo de forma correcta y garantizar que no ingresen contaminantes en el producto final

- Concentración de células
- Viabilidad celular
- Test de contaminantes: Mioplasma
- Control de glucosa y pH
- Titulación de un anticuerpo y pruebas de esterilidad para asegurar la calidad del cultivo

Controles de proceso: Purificación:

- HP-SEC: Cromatografía de exclusion por tamaño
- IEC; HIC; IEF : Tecnicas de enfoque isoeléctrico y tecnicas cromatograficas

Controles de calidad producto terminado:

- Ensayos ELISA
- Porcentaje de inhibicion
- Inmunoensayos