

IMPROVING THE STABILITY OF BIOPHARMACEUTICALS BY APPLYING LYOPHILIZATION

Dragana Danilov

Faculty of Medical Sciences, University Goce Delchev, Shtip, North Macedonia,

dragana.397s@student.ugd.edu.mk

Marjan Dzevaroski

Faculty of Medical Sciences, University Goce Delchev, Shtip, North Macedonia,

marjan.dzevaroski@ugd.edu.mk

Abstract: Lyophilization in the pharmaceutical field continuously evolves and expands its applications, particularly in the design and formulation of biopharmaceutical products with critical stability during transport and long-term storage. This article aims to highlight the latest advancements and to explain the challenges in the lyophilization of the key groups of biological drugs.

This scientific paper is based on available scientific literature in the field of the application of lyophilization in biological drugs (Google Scholar, Science Direct, Scopus). Comparative and compilation methods were used.

Understanding the fundamental theoretical postulates of lyophilization is crucial for comprehending the physicochemical changes occurring in the structure of biologically active substances, blood components and modern delivery systems for biologically active substances. This review summarizes the expanded scope of pharmaceutical applications based on lyophilization by discussing specific aspects of lyophilization formulations of antibodies, peptides, vaccines, other therapeutic proteins, nanoparticles and nanocapsules, liposomes, blood components and non-gene vectors. New formulation aspects and storage systems, as well as the importance of the freezing step, are also discussed. Formulation development that involves selection of appropriate excipients, understanding their physical properties, and determining the mechanisms of action for achieving a stable pharmaceutical product are essential for a successful lyophilization program. Additionally, the study provides insight into new stabilization concepts for biopharmaceutical products, process analytical technology (PAT), and quality by design (QbD), which are highly relevant and will contribute to future advancements and improvements in the lyophilization process.

The broad range of pharmaceutical applications based on lyophilization highlights the continuous importance and significance of this process in the pharmaceutical field. Developing a stable lyophilized biopharmaceutical product can be challenging, as multiple factors must be considered to prevent its instability. By carefully evaluating and selecting key excipients and with optimization of the pH value, a stable lyophilized biopharmaceutical formulation with an acceptable shelf life can be designed successfully.

Keywords: lyophilization, stability, biological drugs, active substances, excipients

ПОДОБРУВАЊЕ НА СТАБИЛНОСТА НА БИОФАРМАЦЕВТСКИ ПРОИЗВОДИ СО ПРИМЕНА НА ЛИОФИЛИЗАЦИЈА

Драгана Данилов

Факултет за медицински науки, Универзитет Гоце Делчев, Штип, Северна Македонија,

dragana.397s@student.ugd.edu.mk

Марјан Џефароски

Факултет за медицински науки, Универзитет Гоце Делчев, Штип, Северна Македонија,

marjan.dzevaroski@ugd.edu.mk

Резиме: Лиофилизацијата во фармацевтската област е подложена на тековен развој и проширување на нејзината примена, особено во дизајн и формулација на биофармацевтски производи со критична стабилност при транспорт и долготрајно чување. Овој труд има за цел да ги истакне последните достигнувања и да ги образложи предизвиците во лиофилизацијата на основните групи на биолошките лекови.

Овој научен труд е изработен врз основа на достапната научна литература во областа на примената на лиофилизацијата на биолошки лекови (Google Scholar, Science Direct, Scopus). Користени се методи на компарација и компилација.

Познавањето на основните теоретски постулати на лиофилизација е критично за разбирање на физичко-хемиските промени кои настануваат во структурата на биолошките активни супстанции, крвните компоненти и современите системи за испорака на биолошки активни супстанции. Сумиран е проширениот опсег на фармацевтски апликации засновани на лиофилизација, преку дискусија на специфичните аспекти на лиофилизација на формулации на антитела, пептиди, вакцини и други терапевтски протеини, наночестички и нанокапсули, липозоми, крвни компоненти и негенски вектори. Дискутирани се и новите аспекти на формулација и новите системи за чување и важноста на чекорот на замрзнување. Развојот на формулација кој вклучува избор на соодветни ексципиенси, нивните поврзани физички својства и механизмот на дејство за постигнување стабилен производ на лекови се примарни размислувања за успешна програма за лиофилизација. Исто така даден е увид во новите концепти за стабилизација на биофармацевтските производи, процесната аналитичка технологија (PAT) и квалитетот преку дизајн (QbD), кои се доста актуелни и истите ќе допринесат за идни промени и унапредување на процесот на лиофилизација.

Широкиот спектар на фармацевтски апликации врз основа на лиофилизација ја потенцира континуираната важност и значењето на овој процес во фармацевтската област. Развојот на стабилен лиофилизиран биофармацевтски производ може да биде предизвик, бидејќи треба да се земат во предвид бројни фактори кои можат да придонесат за нестабилност. Со внимателно скенирање и евалуација на клучните ексципиенси и со оптимизација на pH вредноста, успешно може да се дизајнира формулација на стабилен лиофилизиран биофармацевтски производ со прифатлив рок на траење.

Клучни зборови: лиофилизација, стабилност, биолошки лекови, активни супстанции, ексципиенси

1. ВОВЕД

Во доцната половина на дваесеттиот век, сушењето со замрзнување еволуира од лабораториско истражување до добро воспоставена метода за презервација на биофармацевтски производи. Денес лиофилизацијата сè уште е метод на избор на фармацевтски апликации, подложни на развој и постојана експанзија (Kasper, Winter, & Friess, 2013).

Леофилизираните формулации нудат предности како што се постигнување соодветен рок на траење за лабилни протеини и инхибиција на автолиза од биолошките активности на протеолитичките ензими. Друга предност е потенцијалот за модификација на формулацијата после производство, како што се воведување испарливи адитиви или промена на pH, вискозност и волумен; иницирање реакции или разредување со пуфери за посебни апликации (B. S. Chang, Reilly, & Chang, 2015).

Иако лиофилизираните формулации имаат предности во однос на течните, тие имаат и значителни недостатоци, како што се проблемите при реконституција, дополнителни чекори за развој и оптимизација на циклусот, скапа опрема и високи трошоци за производство. Изборот на лиофилизација бара добра стратегија за максимизирање на предностите и минимизирање на недостатоците.

Леофилизацијата е скап и долготраен процес, па оптимизацијата на циклусот сушење-замрзнување е клучна. Тоа бара разбирање на настаните поврзани со процесите на замрзнување и сушење од физички аспект (L. Remmele, Krishnan, & J. Callahan, 2012). Леофилизацијата вклучува замрзнување, жарење, примарно и секундарно сушење. Важно е да се земат во предвид можните отстапувања за време на процесот на сушење со замрзнување и влијанието врз лиофилизираната активна супстанција.

Процесот на лиофилизација вклучува фаза на мраз и аморфна фаза. Аморфната фаза формира стакло на доволно низки температури, што овозможува постигнување висок процент на вискозност. Својствата на стаклената фаза се важни за стабилноста на исушениот производ. Стабилната конформација во стакло е важна за да се постигне прифатлива стабилност на дозираната форма. Температурите на транзиција на стакло (T_g , T_g') и температурата на колапс (T_c) се важни за стабилизација на протеинската терапија (Remmele, Stushnoff, & Carpenter J.F., 1997).

Ексципиенсите се додаваат за да се манипулира со својствата на лиофилизираниот производ и да се постигне стабилност и својства на реконституција. Типичен лиофилизиран производ се состои од протеини, стабилизатори, агенси за зголемување и пуфери. Испитувањето на типовите на ексципиенси кои се користат во таквите препарати е важно кога се размислува за биофармацевтска дозирана форма.

2. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Овој научен труд е изработен врз основа на достапната научна литература во областа на примената на лиофилизацијата на биолошки лекови – научни трудови и книги, објавени во базите за научна литература (Google Scholar, Science Direct, Scopus). Притоа, користени се следните методи:

- Метод на компарација: метод на споредба на научни факти, процеси и постапки од повеќе извори на научна литература, со утврдување на нивните сличности и разлики, врз основа на кои авторот генерира и изнесува сопствени заклучоци.
- Метод на компилација: метод на превземање на информации, резултати и факти од повеќе извори на научна литература со примена на индивидуален пристап при обработката, изнесувањето и коментирање на истите.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Прегледот на научната литература ќе биде поделен на повеќе подпоглавја, започнувајќи со аспекти на лиофилизација на биолошки лекови – протеини, крвни компоненти (плазма, еритроцити), наночестички и нанокапсули, липозоми и невирусни генски системи за испорака. Ќе се дискутираат и развојните аспекти при формулација на лиофилизирани биофармацевтски препарати, со акцент на изборот на ексципиенси и примената на квалитет преку дизајн (QbD) и процесна аналитичка технологија (PAT).

Леофилизација на протеини. Најчести биофармацевтски производи во леофилизирани формулации се протеините, особено антителата, Fc-фузиските протеини, пептиди, антитело-лек конјугати (ACD), ензими, цитокини и антихемофилични фактори. Антителата се формулираат со сахароза или трехалоза како стабилизатори и модификатори на тоничност. Fc-фузиските протеини или ACD имаат помала стабилност и бараат дополнителни стабилизатори. Овие стабилизатори се обично специфични за производот и се додаваат за да се подобри стабилноста (B. S. Chang et al., 2015).

Бидејќи производите со антитела имаат висока стабилност, други терапевтски протеини бараат дополнителни стабилизатори како манитол или глицин, и кристални средства за зголемување на волуменот. Антихемофилните фактори, на пример, бараат висока јонска јачина и специфични стабилизатори како калциум хлорид. Дополнителните ексципиенси, како шеќери или манитол, помагаат во оптимизацијата на формулацијата и процесот на леофилизација.

Леофилизација на плазма. Леофилизацијата на плазма збогатена со тромбоцити е метод за стандардизација на производот и подобрена стабилност. Масовната трансфузија на леофилизирана плазма започна за време на Втората светска војна, но беше прекината поради пренос на болести. Денес, безбедноста се осигурува со скрининг на донации и други методи за инактивација на вируси (Andia et al., 2020).

Леофилизација на тромбоцити. Тромбоцитите се чувствителни на ниски температури и при чување на температури под 20°C може да дојде до промени во нивната форма и функција. Конзерванси како Me₂SO, хидроксиетил скроб и глицерол-глукоза се користат за да се зачува нивната активност. Леофилизираните тромбоцити со трехалоза имаат висока стапка на зачувување на тромбогенската активност (Fernandez-Moure et al., 2018).

Леофилизација на еритроцити. Леофилизираните еритроцити елиминираат потреба од ладно складирање и нудат продолжен рок на траење. Клучни фактори за леофилизација на еритроцити вклучуваат зачувување на метаболичките патишта и капацитетот за транспорт на кислород. Додавањето на криоконзерванси како трехалоза ја намалува денатурацијата и формирањето на кристали на мраз, дозволувајќи стабилно чување на собна температура (Fernandez-Moure et al., 2018).

Леофилизација на наночестички и нанокапсули. Леофилизацијата на полимерни наноматеријали и биокоњугати може да доведе до стабилни формулации со подолг рок на траење, кои можат да се чуваат на повисоки температури. Губиток на стабилноста може да се случи по замрзнувањето поради van der Waals-ови интеракции помеѓу честичките. Површинската модификација со јонски активни супстанции може да спречи агрегација и да го подобри биодистрибуцијата (Hirsjärvi et al., 2009). Дестабилизацијата може да се појави поради поместување на стабилизирачките супстанции или флокулација во разредени дисперзии (Abdelwahed et al., 2006).

Најчесто користени стабилизатори во леофилизираните формулации на наночестички и нанокапсули се:

- поликиселини (полиакрилна киселина, лимонска киселина): предизвикуваат коагervација на преципитацијата поради водородно врзување на кислородот од површинската PEG-група и карбоксилната група на поликиселината.
- високомолекуларни PEG: PEG со молекуларна маса во опсег 0,4-20.0 kDa се користат како криопротектанти.
- површинска стабилизација со кватернерни амониумови соли: лактоза, микрокристална целулоза и калциум фосфат се користат како секундарен криопротектант. Овозможуваат подобро навлажнување на површината на полимерите со минимално формирање на филм, особини кои придонесуваат за подобра редисперзија на полимерни наночестички од формулации на таблети, гранули и пелети.

- поливинил алкохол (PVA): примена на 5% w/v PVA резултира со целосно ресуспендирање на лиофилизирани наночестички.
- трехалоза: се користи за модификација на слојот на растворање околу биомолекулите поради поголем хидратиран волумен, со што се постигнува намалена флокулација.
- лактоза, сахароза: формирање стаклест слој околу честичките со цел да се спречи нивна агрегација. Во отсуство на овие криопротектори, температурата на замрзнување е повисока, а со тоа и флокулацијата.
- декстран: додаден во формулации на наночестички и нанокапсули, декстранот формира стабилизирачки слој на површината на честичките што резултира со формирање површина меѓу водата и честичките. Со зголемување на количината на декстран во формулацијата се зголемува и дебелината на слојот, а големината по редиспергирање по лиофилизација е поблиску до иницијалната големина. Со зголемување на молекулската маса на декстран, помала количина на декстран (w/w) е потребна за подобро ресуспендирање на честичките.

Леофилизација на липозоми. Леофилизацијата е добро воспоставена во производството на липозомни фармацевтски формулации. Предизвици вклучуваат оксидација, формирање агрегати и фузија на везикули, што влијае на дистрибуцијата и ефикасноста. Стабилизацијата се постигнува со избор на ексципиенти како дисахариди, кои ја заменуваат водата со водородни врски меѓу јаглехидратите и фосфолипидните групи (Franzé et al., 2018). Дополнителен механизам е витрификацијата, која го намалува површинскиот напон на липозомите. Често користени стабилизатори се манитол, глюкоза, лактоза, сахароза, малтоза, и сложени јаглехидрати како декстрини и малтодекстрини (Ozaki & Hayashi, 1997). Флавонолните гликозиди и аминокиселини (аргинин, хистидин, лизин, и пролин) се исто така користени за стабилизација (Franzé et al., 2018).

Леофилизација на невирусни генски системи за испорака. Леофилизацијата е важна за зачувување на фармацевтски производи базирани на нуклеинска киселина. Леофилизацијата ги заштитува нуклеинските киселини и одржува интегритетот на наночестичките (S. Dean Allison & Anchordoquy, 2001). За успешна генска терапија, векторите треба да ги чуваат своите биофизички својства и трансфекциската активност за време на сушење и чување.

Агрегацијата е основен механизам на оштетување, а други механизми како пертурбацијата на интеракцијата помеѓу поликатионите и ДНК исто така влијаат на активността. Витрификацијата не е неопходна, но може да биде корисна за долгорочно чување. Истражувањата покажуваат дека шеќерите можат да спречат оштетување за време на сушењето (S.D. Allison & Anchordoquy, 2000). Потребни се дополнителни истражувања за целосно да се разберат механизмите за стабилизација на невирусни генски вектори.

Квалитет преку дизајн (QbD) и процесна аналитичка технологија (PAT) во леофилизација на биолошки препарати. Во почетокот на 21 век, FDA почна да преминува од традиционален пристап, кој вклучува ригорозно тестирање на финалниот производ, кон пристап заснован на ризик, познат како квалитет преку дизајн (QbD). Клучни аспекти на QbD се идентификацијата, разбирањето и контрола на критичните параметри на процесот и производот (ICH Guideline Q8 (R2) on Pharmaceutical Development, 2017). Контролата на критичните параметри бара имплементација на Процесна Аналитичка Технологија (PAT) (Guidance for Industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, 2004). Овие регулаторни промени се широко усвоени од фармацевтската индустрија, а QbD и PAT се клучни за развој на леофилизирани формулации на биолошки лекови.

Традиционално, термпарови (TS) или отпорни температурни детектори (RTD) се користеле за мерење на температурата на производот во избрани вијали. Последниве години развиени се безжични температурни сензори за автоматско вчитување при масовно производство на сушење со замрзнување (Schneid & Gieseler, 2008). Воведен е систем со оптички влакна за неинвазивно следење на температурата за време на леофилизацијата, овозможувајќи автоматизирано следење на процесот (Kasper et al., 2013). За определување на крајната точка на примарното сушење, манометриското мерење на температурата (MTM), засновано на податоците за пораст на притисокот, се користи како неинвазивен сериски метод за предвидување на температурата на производот (Tang et al., 2006). MTM се користи и за мерење на топлинските параметри, пренос на маса и отпорност на сув слој.

Неодамна беше воведена технологијата на приспособлива диодна ласерска апсорпциона спектроскопија (TDLAS) како PAT алатка во леофилизацијата. TDLAS е применета за мерења на флуksот на масата на водена пара и неинвазивно мерење на температурата на производот (Patel & Pikal, 2009). Оваа технологија покажува потенцијал за следење на развојот и за процеси за разширување на леофилизацијата (Kasper, Winter, et al., 2013).

Дополнително, спектроскопски алатки како инфрацрвена спектроскопија / блиска област (NIR) или Раман спектроскопија се користат како PAT алатки за следење на цврстата состојба на манитол, нуклеацијата на

мразот и сублимацијата (De Beer et al., 2009). Во 1997 година, инфрацрвената спектроскопија беше применета за следење на лизозими во реално време за време на лиофилизацијата (Remmele et al., 1997). NIR спектроскопија е искористена за следење на расклопување на протеини и интеракции со ексципиенси (Pieters et al., 2012). Комбинацијата на овие алатки обезбедува вредни информации за подобро разбирање на процесите на лиофилизација.

Објавени се студии за примената на QbD во лиофилизација. Првично, дизајн-просторот се добивал преку експериментални студии (S. B. Chang & Fischer, 1995), а подоцна експерименталната работа била намалена со мерења во линија (Nail & Searles, 2008). Во следниот чекор, се предлага симулација на процесот наместо експериментални тестови, што го скратува времето за развој на QbD (Giordano et al., 2011). Постојат и методи кои ја земаат во предвид мерната неодреденост, што доведува до “смалување” на просторот за дизајн.

4. ЗАКЛУЧОК

Развојот на стабилен лиофилизиран биофармацевтски производ претставува предизвик, бидејќи треба да се земат во предвид бројни фактори кои можат да придонесат за нестабилност. Внимателното испитување на ексципиенсите и нивната потенцијална деградација, реактивност и физички својства треба да помогне во изборот и составот на формулираниот производ за да истите послужат како соодветен стабилизатор и/или агенс за зголемување на волуменот и можната потреба од сурфактант за минимизирање на формирање на високомолекуларни производи. Може да бидат потребни и дополнителни ексципиенси за контрола на хемиската деградација. Формулирањето на мултидозни лиофилизиран биофармацевтски препарати диктира употреба на конзерванси, која бара понатамошна евалуација во контекст на ефектите врз активната супстанција и антимикробната ефикасност. pH вредноста на формулацијата е критичен параметар кој треба да се утврди, за да се минимизираат и ковалентната и физичката деградација. Со внимателно скенирање и евалуација на клучните ексципиенси дискутирани во овој труд и со оптимизација на pH вредноста, успешно може да се дизајнира формулација на стабилен лиофилизиран биофармацевтски производ со прифатлив рок на траење.

Со проширување на спектарот на формулациите диктирани од потребите во медицината, воведувањето на нови контејнерски системи, обезбедувајќи посеопфатно разбирање на механизмите за стабилизација и решавање на барањата на добра производна пракса, QbD и PAT, развојот на подобрени формулации и дизајнот на оптимизирани процеси се многу олеснети, што резултира со зголемен квалитет на производот, а со тоа и задоволувањето на потребите на пациентите и здравствените професионалци од модерни, односно современи високо-технолошки развиени производи.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688–1713. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>
- Allison, S. Dean, & Anchordoquy, T. J. (2001). Lyophilization of Nonviral Gene Delivery Systems. In M. A. Findeis, *Nonviral Vectors for Gene Therapy* (Vol. 65, pp. 225–252). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-139-6:225>
- Allison, S.D., & Anchordoquy, T. J. (2000). Mechanisms of protection of cationic lipid-DNA complexes during lyophilization. *J.Pharm.Sci.*, 89, 682–691.
- Andia, I., Perez-Valle, A., Del Amo, C., & Maffulli, N. (2020). Freeze-Drying of Platelet-Rich Plasma: The Quest for Standardization. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6904. <https://doi.org/10.3390/ijms21186904>
- Cao, W., Piedmonte, D. M., Ricci, M. S., & Yeh, P. Y. (2014). Formulation, Drug Product, and Delivery: Considerations for Fc-Fusion Proteins. In S. M. Chamow, T. Ryll, H. B. Lowman, & D. Farson (Eds.), *Therapeutic Fc-Fusion Proteins* (1st ed., pp. 115–154). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527675272.ch05>
- Chang, B. S., Reilly, M., & Chang, H. (2015). Lyophilized Biologics. In D. Varshney & M. Singh (Eds.), *Lyophilized Biologics and Vaccines*. New York: Springer. Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2383-0_6
- Chang, S. B., & Fischer, N. L. (1995). Development of an efficient single-step freeze-drying cycle for protein formulations. *Pharmaceutical Research*, 12(6), 831–837. <https://doi.org/doi:10.1023/a:1016200818343>
- De Beer, T. R. M., Vercruyse, P., Burggraef, A., Quinten, T., Ouyang, J., Zhang, X., ... Baeyens, W. R. G. (2009). In-line and real-time process monitoring of a freeze drying process using Raman and NIR spectroscopy

- as complementary process analytical technology (PAT) tools. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9), 3430–3446. <https://doi.org/10.1002/jps.21633>
- Fernandez-Moure, J., Maisha, N., Lavik, E. B., & Cannon, J. W. (2018). The Chemistry of Lyophilized Blood Products. *Bioconjugate Chemistry*, 29(7), 2150–2160. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00271>
- Franzé, S., Selmin, F., Samaritani, E., Minghetti, P., & Cilurzo, F. (2018). Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging. *Pharmaceutics*, 10(3), 139. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030139>
- Giordano, A., Barresi, A. A., & Fissore, D. (2011). On the Use of Mathematical Models to Build the Design Space for the Primary Drying Phase of a Pharmaceutical Lyophilization Process. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(1), 311–324. <https://doi.org/10.1002/jps.22264>
- Guidance for Industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, manufacturing, and Quality Assurance. (2004). US Food and Drug Agency. Retrieved from <https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/PAT-FDA-6419fnl.pdf>
- Hirsjärvi, S., Peltonen, L., & Hirvonen, J. (2009). Effect of Sugars, Surfactant, and Tangential Flow Filtration on the Freeze-Drying of Poly(lactic acid) Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*, 10(2), 488–494. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9236-z>
- ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development. (2017). European Medicines Agency, Committee for Human Medicinal Products. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-considerations-ich-guideline-q8-r2-pharmaceutical-development-step-5_en.pdf
- Kasper, J. C., Wiggernhorn, M., Resch, M., & Friess, W. (2013). Implementation and evaluation of an optical fiber system as novel process monitoring tool during lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83(3), 449–459. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.009>
- Kasper, J. C., Winter, G., & Friess, W. (2013). Recent advances and further challenges in lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(2), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.05.019>
- Kasraian K, Deluca PP. (1995). The effect of tertiary butyl alcohol on the resistance of the dry product layer during primary drying. *Pharm Res* 12:491–5.
- L. Remmele, R., Krishnan, S., & J. Callahan, W. (2012). Development of Stable Lyophilized Protein Drug Products. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(3), 471–496. <https://doi.org/10.2174/138920112799361990>
- Miyajima, K. (1997). Role of saccharides for the freeze-thawing and freeze drying of liposome. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 24(2–3), 151–159. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00454-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00454-1)
- Nail, S. L., & Johnson, W. (1992). Methodology for in-process determination of residual water in freeze-dried products. *Dev.Biology*, 137–151.
- Nail, S. L., & Searles, J. A. (2008). Elements of quality by design in development and scaleup of freeze-dried parenterals. *Biopharm International*, 21(1), 44–52.
- Ozaki, K., & Hayashi, M. (1997). The Effects of Glucose Oligomers (Maltodextrins) on Freeze-Drying Liposomes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45(1), 165–170. <https://doi.org/10.1248/cpb.45.165>
- Patel, S. M., & Pikal, M. (2009). Process Analytical Technologies (PAT) in freeze-drying of parenteral products. *Pharmaceutical Development and Technology*, 14(6), 567–587. <https://doi.org/10.3109/10837450903295116>
- Ghadiri, M., Ebrahim, A., & Shojaosadati, S. A. (2021). Freeze-drying of nanoparticles: A review on recent advances and future trends. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 21(6), 3250–3265. <https://doi.org/10.1166/jnn.2021.19583>
- Zhang, X., Zhang, Y., Li, Y., & Chen, Y. (2020). Recent developments in lyophilization of biopharmaceutics: Challenges and future directions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 153, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.06.014>
- Kumar, S., Arora, R., & Garg, R. (2021). Lyophilization of protein therapeutics: Advances and challenges. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(8), 2607–2618. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.03.015>
- Lee, S. M., Kim, D. K., & Han, J. (2020). Application of process analytical technology (PAT) in lyophilization of biologics: Current status and future prospects. *International Journal of Pharmaceutics*, 577(1), 119052. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119052>
- Liu, X., Wu, C., & Wang, S. (2021). Advances in freeze-drying of liposomes for pharmaceutical applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 47(5), 703–710. <https://doi.org/10.1080/03639045.2021.1884184>
- Ochoa, N., Fajardo, R., & Santoyo, A. (2021). Lyophilization of therapeutic antibodies: Critical factors and recent advances. *Pharmaceutical Research*, 38(2), 344–356. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02883-0>