

Biopharmaceuticals: A review of their development and contribution to healthcare

Produtos biofarmacêuticos: Uma análise do seu desenvolvimento e contribuição para os cuidados de saúde

Kai Bin Liew ^{1*} , Siew-Keah Lee ² , Long Chiau Ming ³ , A.B.M. Helal Uddin ⁴ , Zaidul Islam Sarker ⁴ ,
Yik-Ling Chew ⁵ , & Phei Er Kee ¹ 

Keywords: Biopharmaceuticals, manufacturing, recombinant, therapeutics, clinical

Palavras-chave: Biofarmacêuticos, fabrico, recombinante, terapêutica, clínica

To Cite:

Liew, K. B., *et al.* (2023) Biopharmaceuticals: A review of their development and contribution to healthcare. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(2), 118-142.

 [10.19277/bbr.20.2.321](https://doi.org/10.19277/bbr.20.2.321)

1 - Faculty of Pharmacy, University of Cyberjaya, Persiaran Bestari, 63000 Cyberjaya, Selangor, Malaysia

2 - M. Kandiah Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Tunku Abdul Rahman, Jalan Sungai Long, Bandar Sungai Long, 43000, Kajang, Selangor, Malaysia

3 - School of Medical and Life Sciences, Sunway University, Sunway City, 47500 Malaysia

4 - Faculty of Pharmacy, International Islamic University Malaysia, Bandar Indera Mahkota, Kuantan, Pahang, Malaysia

5 - Faculty of Pharmaceutical Sciences, UCSI University, Jalan Menara Gading, UCSI Heights, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

Correspondence to / Correspondência a:
liewkaibin@cyberjaya.edu.my

Received / Recebido: 24/8/2023
Accepted / Aceite: 14/12/2023

Abstract

Biopharmaceuticals play a crucial role in preventing, treating, and diagnosing a diverse range of diseases across various medical disciplines. The market for biopharmaceuticals has experienced significant growth, driven by tremendous demand, with their dynamic market potential believed to surpass that of conventional counterparts. This review provides insight into the manufacturing process of biopharmaceuticals, covering both upstream and downstream processing. Various types of biopharmaceutical products, such as monoclonal antibodies, enzymes, vaccines, stem cells, human growth hormones, cytokines, nucleic acids, and carbohydrates, are explored alongside their respective clinical applications. The review also addresses the challenges encountered in the development, formulation, and utilization of these biopharmaceuticals. In essence, this review contributes valuable knowledge to the understanding of the expansive field of biopharmaceuticals.

Resumo

Os produtos biofarmacêuticos têm um papel crucial na prevenção, no tratamento e no diagnóstico de uma gama diversificada de doenças em várias disciplinas médicas. O mercado dos produtos biofarmacêuticos registou um crescimento significativo, impulsionado por uma enorme procura, acreditando-se que o seu potencial de mercado dinâmico ultrapassa o dos seus homólogos convencionais. Esta análise fornece informações sobre o processo de fabrico de produtos biofarmacêuticos, abrangendo o processamento a montante e a jusante. São explorados vários tipos de produtos biofarmacêuticos, tais como anticorpos monoclonais, enzimas, vacinas, células estaminais, hormonas de crescimento humano, citocinas, ácidos nucleicos e hidratos de carbono, juntamente com as respectivas aplicações clínicas. A análise também aborda os desafios encontrados no desenvolvimento, formulação e utilização destes produtos biofarmacêuticos. Essencialmente, esta análise contribui com conhecimentos valiosos para a compreensão do vasto domínio dos produtos biofarmacêuticos.

Introduction

The global increase in population, coupled with longer life expectancies and a rising prevalence of chronic diseases, especially regarding auto-immune diseases, has generated a substantial market demand for safer and more effective drugs (1). Since the approval of the first biopharmaceutical, recombinant human insulin by *Escherichia coli*, for therapeutic use in 1982 by the Food and Drug Administration (FDA), the utilization of biopharmaceuticals has been steadily growing (2). The global biopharmaceutical market, valued at \$237.2 billion in 2018, is expected to reach \$389.0 billion by 2024, with a compound annual growth rate (CAGR) of 8.59% from 2019 to 2024 (2). Biopharmaceuticals play a crucial role in enhancing healthcare, extending healthy productive longevity, and reducing the prevalence of severe diseases. Studies report that biopharmaceutical innovation contributed to about 35% of the increase in life expectancy from 1990 to 2015, leading to an improvement in average life expectancy from 46.5 years to 65.0 for individuals (3).

Biopharmaceuticals refer to pharmaceutical products produced via biotechnological processes, employing techniques like recombinant DNA technology or the hybridoma technique. The biological sources and living organisms such as bacteria, viruses, yeast, animal, and plant cells are commonly employed for the production of biopharmaceuticals (4, 5). Biopharmaceuticals exhibit higher molecular weight and a more complex structure, typically 100-1000 times larger than synthetic drugs, owing to the formation of polymeric chains (5). These products comprise polysaccharides, proteins, nucleic acids, tissues, and living cells, finding extensive applications across various medical fields.

Biopharmaceutical products are recognized for their efficacy in diagnosing, preventing, treating, and curing a broad spectrum of chronic and life-threatening diseases, including metabolic disorders and cancers (6). Their specificity to certain targets enables biopharmaceuticals to recognize and target specific sites and diseases, minimizing undesirable side effects. Additionally, biopharmaceuticals can serve as an alternative treatment for patients with poor responses to conventional treatments, with high bioavailability, increased half-life, and lower immunogenicity (6). Due to the complexity and instability of the products, as well as low intestinal

Introdução

O aumento global da população, associado a uma maior esperança de vida e a uma prevalência crescente de doenças crônicas, com destaque para as doenças auto-imunes, gerou uma procura substancial no mercado de medicamentos mais seguros e eficazes (1). Desde a aprovação do primeiro biofármaco, para uso terapêutico - a insulina humana recombinante de *Escherichia coli*, em 1982 pela Food and Drug Administration (FDA), a utilização de biofármacos tem vindo a crescer de forma constante (2). O mercado biofarmacêutico global, avaliado em 237,2 mil milhões de dólares em 2018, deverá atingir 389,0 mil milhões de dólares em 2024, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 8,59% de 2019 a 2024 (2). Os produtos biofarmacêuticos desempenham um papel crucial na melhoria dos cuidados de saúde, no aumento da longevidade produtiva saudável e na redução da prevalência de doenças graves. Estudos indicam que a inovação biofarmacêutica contribuiu para cerca de 35% do aumento da esperança de vida entre 1990 e 2015, levando a uma melhoria da esperança média de vida dos indivíduos de 46,5 anos para 65,0 anos (3).

Os biofármacos são produtos farmacêuticos produzidos através de processos biotecnológicos, empregando técnicas como o ADN recombinante ou o hibridoma. As fontes biológicas e os organismos vivos, tais como bactérias, vírus, leveduras, células animais e vegetais, são normalmente utilizados para a produção de produtos biofarmacêuticos (4, 5). Os produtos biofarmacêuticos apresentam um peso molecular mais elevado e uma estrutura mais complexa, tipicamente 100-1000 vezes maior do que os medicamentos sintéticos, devido à formação de cadeias poliméricas (5). Estes produtos incluem polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, tecidos e células vivas, encontrando aplicações extensivas em vários domínios médicos.

Os produtos biofarmacêuticos são reconhecidos pela sua eficácia no diagnóstico, prevenção, tratamento e cura de um vasto espetro de doenças crônicas e potencialmente fatais, incluindo perturbações metabólicas e cancro (6). A sua especificidade em relação a determinados alvos permite que os biofármacos reconheçam e visem locais e doenças específicos, minimizando os efeitos secundários indesejáveis. Além disso, os biofármacos podem servir como tratamento alternativo para os doentes com fraca resposta aos tratamentos

absorption, oral administration is generally unsuitable for biopharmaceuticals. As there is the occurrence of substantial reduction in permeability across biological barriers such as skin, mucosal membranes and cell membranes, subcutaneous injection emerges as the preferred administration method (7, 8).

This review delves into the manufacturing process of biopharmaceutical products and explores various types of biopharmaceutical products, including monoclonal antibodies (mAbs), vaccines, enzymes, hormones, cell therapy products and cytokines, along with their clinical applications. The challenges encountered in the development and application of biopharmaceuticals are also discussed, providing a comprehensive overview of this dynamic field.

Manufacturing process

The manufacturing of biopharmaceuticals involves two complex stages, namely upstream processing and downstream processing. Figure 1 illustrates the flowchart of the biopharmaceutical manufacturing process. Upstream processing is related to the growth of microbes and the transformation of substrates into the desired biopharmaceutical products (9). Various activities, including cell line selection, culture medium composition, optimization of growth parameters and process, are performed to achieve optimal cell growth and biopharmaceutical productions (10). The fermentation process occurs under controlled conditions in a large-scale bioreactor system, where measures such as sterilization of materials and equipment, pH regulation, temperature control and oxygen supply are crucial to minimize the risk of contamination by other microorganisms (11).

Biopharmaceuticals are generally produced through genetically engineered living cells, involving the introduction of DNA sequences into the host cell of the living organism. *E. coli* stands out as an efficient microorganism for recombinant protein production. By replacing codons rarely found in highly expressed *E. coli* genes with more favourable major codons,

convencionais, com elevada biodisponibilidade, semi-vida aumentada e menor imunogenicidade (6). Devido à complexidade e instabilidade dos produtos, bem como à baixa absorção intestinal, a administração oral é geralmente inadequada para os biofármacos. Dada a ocorrência de uma redução substancial da permeabilidade através de barreiras biológicas como a pele, as membranas mucosas e as membranas celulares, a injeção subcutânea surge como o método de administração preferido (7, 8).

Esta análise analisa o processo de fabrico de produtos biofarmacêuticos e explora vários tipos de produtos biofarmacêuticos, incluindo anticorpos monoclonais (mAbs), vacinas, enzimas, hormonas, produtos de terapia celular e citocinas, juntamente com as suas aplicações clínicas. Os desafios encontrados no desenvolvimento e aplicação de produtos biofarmacêuticos também são discutidos, fornecendo uma visão abrangente deste domínio dinâmico.

Processo de fabrico

O fabrico de produtos biofarmacêuticos envolve duas fases complexas, nomeadamente o processamento a montante e o processamento a jusante. A Figura 1 ilustra o fluxograma do processo de fabrico de produtos biofarmacêuticos. O processamento a montante está relacionado com o crescimento dos microrganismos e a transformação de substratos nos produtos biofarmacêuticos desejados (9). Várias actividades, incluindo a seleção de linhas celulares, a composição do meio de cultura, a otimização do processo e parâmetros de crescimento, são realizadas para obter o crescimento celular e uma produção ideais (10). O processo de fermentação ocorre em condições controladas num sistema de biorreactores de grande escala, onde medidas como a esterilização de materiais e equipamento, a regulação do pH, o controlo da temperatura e o fornecimento de oxigénio são cruciais para minimizar o risco de contaminação por outros microrganismos (11).

Os biofármacos são geralmente produzidos através de células vivas geneticamente modificadas, envolvendo a introdução de sequências de ADN na célula hospedeira do organismo vivo. A *E. coli* destaca-se como um microrganismo eficiente para a produção de proteínas recombinantes. Ao substituir códon raramente encontrados em genes

the expression level of the heterologous proteins can be improved (12). Moreover, complex and large therapeutic proteins can be secreted in the periplasm of *E. coli*, providing an oxidizing environment conducive to forming disulfide bonds that facilitate the proper folding of recombinant proteins (13). Heterologous proteins often accumulate in *E. coli* as inclusion bodies, which are insoluble misfolded aggregates. For instance, recombinant human insulin has been primarily expressed by *E. coli*, demonstrating its potential for the treatment of diabetes mellitus type I and II (14).

Additionally, yeast is commonly employed for expressing heterologous proteins that require post-translational modifications for its biological activity, including acetylation, acylation, phosphorylation, O-linked glycosylation and N-linked glycosylation (14). The yeast expression system yields soluble recombinant proteins that are properly folded and functionally active. Furthermore, yeasts can secrete proteins to the extracellular medium, thereby facilitating the subsequent purification process (15). Extensive research has been focused on *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*, both capable of performing human-like N-glycosylation patterns, including the terminal addition of sialic acid

altamente expressos de *E. coli* por códons principais mais favoráveis, o nível de expressão das proteínas heterólogas pode ser melhorado (12). Além disso, as proteínas terapêuticas complexas e de grandes dimensões podem ser segregadas no periplasma de *E. coli*, proporcionando um ambiente oxidante propício à formação de ligações dissulfureto que facilitam a dobragem adequada das proteínas recombinantes (13). As proteínas heterólogas acumulam-se frequentemente em *E. coli* sob a forma de corpos de inclusão, que são o agregados insolúveis mal dobrados. Por exemplo, a insulina humana recombinante tem sido expressa principalmente por *E. coli*, demonstrando o seu potencial para o tratamento da diabetes mellitus tipo I e II (14).

Além disso, a levedura é normalmente utilizada para a expressão de proteínas heterólogas que requerem modificações pós-translacionais para a sua atividade biológica, incluindo acetilação, acilação, fosforilação, glicosilação O-ligada e glicosilação N-ligada (14). O sistema de expressão da levedura produz proteínas recombinantes solúveis que estão corretamente dobradas e funcionalmente activas. Além disso, as leveduras podem segregar as proteínas para o meio extracelular, facilitando assim o processo de purificação subsequente (15). Foi efectuada uma investigação aprofundada em *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, ambas capazes de realizar padrões de N-glicosilação semelhantes

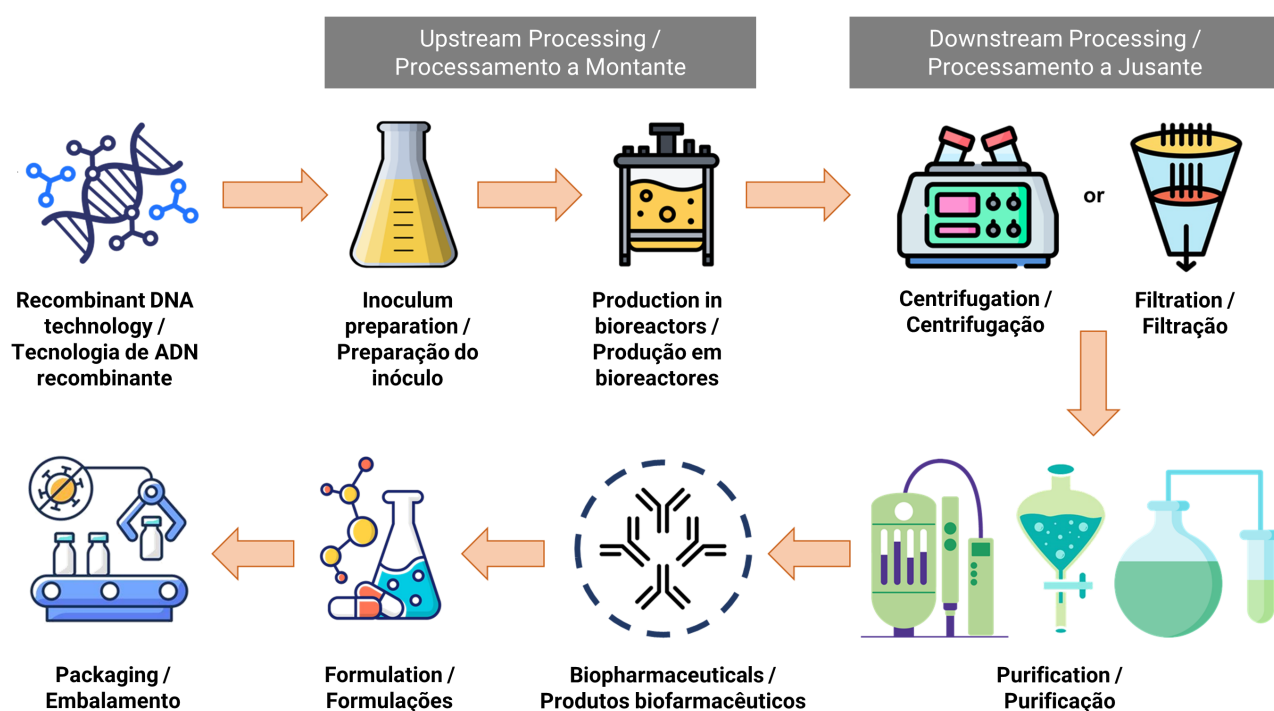


Figure 1 - Flowchart of biopharmaceutical manufacturing process

Figura 1 - Fluxograma do processo de fabrico de produtos biofarmacêuticos.

to glycoprotein. Yeasts are prominent producers of insulin precursor, human serum albumin, glucagon, hepatitis antigens, vaccine-like particles for various therapeutic applications (16, 17).

Mammalian cell cultures play a significant role in the production of biopharmaceuticals, with Chinese Hamster Ovarian (CHO) cell lines, baby hamster kidney (BHK21) cell lines, and murine myeloma cells being commonly employed (18, 19). Among these, CHO cell lines are particularly popular due to their ability to efficiently express complex therapeutic proteins with human-like glycopatterns, achieving high cell density and sufficient yields. CHO cell lines are capable of growing in chemically defined serum-free medium, making them suitable for high-volume bioreactors and simplifying the downstream processes. Advancements in genetic tools, such as zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated system have offered opportunities for engineering CHO cell lines, improving protein production and product quality (20). A variety of biopharmaceuticals including human growth hormones, cytokines, mAbs and clotting factors have been successfully produced using CHO cells (19).

Moreover, hybridoma technology provides another option for the production of mAbs, offering convenience, cost-effectiveness, and high production yields (21). Hybridoma cells are generated through the fusion of an activated B lymphocyte with an immortal myeloma cell. Each hybridoma cell consistently expresses a large quantity of one highly specific mAbs, and selected hybridoma clones can be cryopreserved for continuous mAbs production over an extended period. The Hybridoma generation process leverages a host animal's natural ability to produce functional, highly specific, and high affinity mAbs (22). Different animal species including mice, rabbits, guinea pigs, chickens, cows, goats, hamster, and sheep, have been employed for the development of mAbs. The selection of animal species depends on factors like the presence of a homologous protein in the immunized species, the quantity of protein or antigen available for immunization, the availability of suitable fusion partner, the duration needed to achieve an antibody response and the intended

aos humanos, incluindo a adição terminal de ácido siálico à glicoproteína. As leveduras são produtores proeminentes de precursores da insulina, albumina sérica humana, glucagon, antígenos da hepatite e partículas semelhantes a vacinas para várias aplicações terapêuticas (16, 17).

As culturas de células de mamíferos desempenham um papel importante na produção de produtos biofarmacêuticos, sendo as linhas de células de ovário de hamster chinês (CHO), as linhas de células de rim de hamster bebê (BHK21) e as células de mieloma murino as mais utilizadas (18, 19). Entre estas, as linhas celulares CHO são particularmente populares devido à sua capacidade de exprimir eficazmente proteínas terapêuticas complexas com glicopadrões semelhantes aos humanos, atingindo uma elevada densidade celular e rendimentos suficientes. As linhas celulares CHO são capazes de crescer em meio quimicamente definido sem soro, o que as torna adequadas para biorreatores de grande volume e simplifica os processos a jusante. Os avanços nas ferramentas genéticas, como as nucleases de dedo de zinco (ZFNs), as nucleases efectoras do tipo ativador da transcrição (TALENs) e o sistema associado à repetição palindrômica curta regularmente espaçada (CRISPR) ofereceram oportunidades para a engenharia de linhas celulares CHO, melhorando a produção de proteínas e a qualidade dos produtos (20). Uma variedade de produtos biofarmacêuticos, incluindo hormonas de crescimento humano, citocinas, mAbs e factores de coagulação, foram produzidos com êxito utilizando células CHO (19).

Além disso, a tecnologia de hibridoma constitui outra opção para a produção de mAbs, oferecendo comodidade, rentabilidade e elevados rendimentos de produção (21). As células de hibridoma são geradas através da fusão de um linfócito B ativado com uma célula de mieloma imortal. Cada célula de hibridoma expressa consistentemente uma grande quantidade de um mAbs altamente específico e os clones de hibridoma seleccionados podem ser criopreservados para a produção contínua de mAbs durante um período prolongado. O processo de geração de hibridomas aproveita a capacidade natural do animal hospedeiro para produzir mAbs funcionais, altamente específicos e de elevada afinidade (22). Foram utilizadas diferentes espécies animais para o desenvolvimento de mAbs, incluindo ratos, coelhos, porquinhos-da-índia, galinhas, vacas, cabras, hamsters e ovelhas. A seleção das espécies animais depende de factores como a presença de uma proteína homóloga na espécie imunizada, a quantidade de proteína ou antígeno disponível para imunização, a disponibilidade de um parceiro

purpose for which these mABs are needed (22, 23). Hybridomas are generally categorized into homo-hybridomas and hetero-hybridomas, where IgG-secreting B cells and fusion partners are from the same species and different species, respectively (24).

Following the upstream processes in the production of biopharmaceuticals, downstream processing becomes essential to purify the desired biological products from cell culture broth. This downstream process comprises multiple stages, including primary recovery, purification and polishing, aiming to eliminate both process- and product-related impurities to ensure the safety of biopharmaceuticals (25). In primary recovery, centrifugation or filtration is employed to separate cells from the supernatant. Subsequently, the sample undergoes concentration, purification, and polishing processes to eliminate the majority of impurities. In cases where biopharmaceuticals are secreted extracellularly in the culture medium, they can undergo the purification process directly. However, for intracellular biopharmaceuticals, cells need to undergo lysis through sonication or a high-pressure homogenizer, followed by clarification to remove cell debris. Additionally, an extra step involving protein refolding through buffer exchange is required to obtain active recombinant proteins if they are expressed as inclusion bodies (26).

Achieving a purity level of greater than 99% in biopharmaceuticals is crucial, and chromatography steps are commonly employed due to their conventional use in protein purification and polishing, offering high resolution capacity (25, 27). Numerous classes of chromatography techniques, such as ion-exchange, affinity, hydrophobic interactions, size exclusion and mix-mode are usually used for biopharmaceuticals purification (28). However, chromatography is often associated with high investment costs and long cycle times, affecting the throughput and scalability of biopharmaceuticals production (29). As alternatives, precipitation (30), microfiltration (31, 32), ultrafiltration (33), crystallization (34), aqueous two-phase system (35, 36), magnetic separation (37, 38) have also been employed for downstream processing of biopharmaceuticals. Currently, downstream processing steps are transitioning from batch to

de fusão adequado, a duração necessária para obter uma resposta de anticorpos e o objetivo pretendido para o qual estes mAbs são necessários (22, 23). Os hibridomas são geralmente classificados em homo-hibridomas e hetero-hibridomas, em que as células B secretoras de IgG e os parceiros de fusão são da mesma espécie e de espécies diferentes, respetivamente (24).

Após os processos a montante na produção de produtos biofarmacêuticos, o processamento a jusante torna-se essencial para purificar os produtos biológicos desejados a partir do caldo de cultura celular. Este processo a jusante compreende várias fases, incluindo a recuperação primária, a purificação e o polimento, com o objetivo de eliminar as impurezas relacionadas com o processo e com o produto, a fim de garantir a segurança dos produtos biofarmacêuticos (25). Na recuperação primária, utiliza-se a centrifugação ou a filtração para separar as células do sobrenadante. Subsequentemente, a amostra é submetida a processos de concentração, purificação e polimento para eliminar a maioria das impurezas. Nos casos em que os produtos biofarmacêuticos são segregados extracelularmente no meio de cultura, podem ser submetidos diretamente ao processo de purificação. No entanto, para os biofármacos intracelulares, as células têm de ser submetidas a lise através de sonicação ou de um homogeneizador de alta pressão, seguida de clarificação para remover os resíduos celulares. Além disso, é necessário um passo adicional que envolve a redobragem da proteína através da troca de tampão para obter proteínas recombinantes activas, se estas forem expressas como corpos de inclusão (26).

Nos produtos biofarmacêuticos, a obtenção de um nível de pureza superior a 99% é crucial, e as etapas cromatográficas são normalmente utilizadas devido ao seu uso convencional na purificação e polimento de proteínas, oferecendo uma elevada capacidade de resolução (25, 27). Para a purificação de produtos biofarmacêuticos, são normalmente utilizadas várias classes de técnicas de cromatografia, como as de permuta iónica, afinidade, interacção hidrofóbica, exclusão de tamanho e modo misto (28). No entanto, a cromatografia está frequentemente associada a custos de investimento elevados e a tempos de ciclo longos, o que afecta o rendimento e a escalabilidade da produção de produtos biofarmacêuticos (29). Como alternativas, a precipitação (30), a microfiltração (31, 32), a ultrafiltração (33), a cristalização (34), o sistema de duas fases aquosas (35, 36) e a separação magnética (37, 38) foram também utilizados para o processamento a jusante de produtos biofarmacêuticos. Atualmente, as etapas de processamento a jusante estão a passar

continuous processes, incorporating the use of single-used equipment, improving process control and employing scale-down models for more efficient process development (39, 40).

Biopharmaceutical products and clinical applications

Biopharmaceuticals are now widely used in the treatment of numerous diseases. Several types of biopharmaceutical products including monoclonal antibodies, vaccines, enzymes, hormones, cell therapies, cytokines, growth factors, nucleic acids and carbohydrates are discussed in the following subsections. These diverse categories of biopharmaceuticals play crucial roles in the therapeutic landscape, showcasing the versatility and effectiveness of this class of pharmaceutical products.

Monoclonal antibodies (mAbs)

Monoclonal antibodies (mAbs) are antibodies derived from a single clone of B cells, imparting them with monospecificity and homogeneity, making them well-suited for therapeutic applications (41). Following immunization, each B cell expresses antibodies specific to a particular antigen region (epitope), resulting in slight variations in epitope specificity among the antibodies. The predominant therapeutic mAbs belong to the IgGs due to their extended circulating half-life and ease of production compared to the other classes such as IgM, IgD, IgE and IgA (42). The majority of mAbs therapeutics are employed in the treatment of immunological, oncological and infectious diseases. Table 1 provides a summary of various types of mAbs used for different therapeutic applications, along with their respective targets.

In the context of immunological diseases, mAbs target various components of the immune system to minimize excessive responses characteristic of autoimmune diseases. This involves actions such as blocking T cells or B cells, inhibiting the interaction between T cells and antigen-presenting cells, preventing the recruitment of T cells and B cells, hindering T cells differentiation and activation, as well as blocking pro-inflammatory cytokines (67). A notable example of therapeutic mAbs is Adalimumab, the world's first fully human IgG1 mAbs, which targets TNF- α . Adalimumab is used for the treatment

de processos descontínuos para processos contínuos, incorporando a utilização de equipamento de utilização única, melhorando o controlo do processo e empregando modelos de redução de escala para um desenvolvimento mais eficiente do processo (39, 40).

Produtos biofarmacêuticos e aplicações clínicas

Os produtos biofarmacêuticos são atualmente muito utilizados no tratamento de numerosas doenças. Nas subsecções seguintes são abordados vários tipos de produtos biofarmacêuticos, incluindo anticorpos monoclonais, vacinas, enzimas, hormonas, terapias celulares, citocinas, factores de crescimento, ácidos nucleicos e hidratos de carbono. Estas diversas categorias de produtos biofarmacêuticos desempenham papéis cruciais no panorama terapêutico, demonstrando a versatilidade e a eficácia desta classe de produtos farmacêuticos.

Anticorpos monoclonais (mAbs)

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são anticorpos derivados de um único clone de células B, o que lhes confere monoespecificidade e homogeneidade, tornando-os adequados para aplicações terapêuticas (41). Após a imunização, cada célula B expressa anticorpos específicos para uma determinada região do antígeno (epítipo), o que resulta em ligeiras variações na especificidade do epítipo entre os anticorpos. Os mAbs terapêuticos predominantes pertencem às IgGs devido à sua semi-vida circulante alargada e à facilidade de produção em comparação com as outras classes, como IgM, IgD, IgE e IgA (42). A maioria das terapêuticas com mAbs é utilizada no tratamento de doenças imunológicas, oncológicas e infecciosas. O quadro 1 apresenta um resumo dos vários tipos de mAbs utilizados para diferentes aplicações terapêuticas, juntamente com os respectivos alvos.

No contexto das doenças imunológicas, os mAbs têm como alvo vários componentes do sistema imunitário para minimizar as respostas excessivas características das doenças auto-imunes. Isto envolve ações como o bloqueio das células T ou das células B, a inibição da interação entre as células T e as células apresentadoras de antígenos, a prevenção do recrutamento de células T e de células B, o impedimento da diferenciação e da ativação das células T, bem como o bloqueio das citocinas pró-inflamatórias (67). Um exemplo notável de mAbs terapêuticos é o Adalimumab, o primeiro mAbs IgG1 totalmente humano do mundo, que tem como alvo o TNF- α . O adalimumab é utilizado

Table 1 - mAbs used for therapeutic applications.
Tabela 1 - mAbs utilizados para aplicações terapêuticas.

Antibody / Anticorpo	Target / Alvo	Therapeutic applications / Aplicações terapêuticas	References / Referências
Immunological / Imunologia			
Alemtuzumab	CD52	Multiple sclerosis / Esclerose múltipla	43
Belimumab	BAFF	Systemic lupus erythematosus / Lúpus eritematoso sistêmico	44
Benralizumab	IL-5(R α)	Asthma / Asma	45
Canakinumab	IL-1 β	Cryopyrin-associated periodic syndrome / Síndrome periódica associada à criopirina	46
Certolizumab pegol	TNF- α	Crohn's disease, rheumatoid arthritis, axial spondyloarthritis, psoriatic arthritis / Doença de Crohn, artrite reumatoide, espondiloartrite axial, artrite psoriática	47
Ixekizumab	IL-17A	Plaque psoriasis / Psoríase em placas	48
Omalizumab	CD23	Allergic asthma / Asma alérgica	49
Reslizumab	IL-5	Asthma, nasal polyposis, hypereosinophilic syndrome, eosinophil gastroenteritis / Asma, polipose nasal, síndrome hipereosinofílica, gastroenterite eosinofílica	50
Secukinumab	IL-17A	Psoriasis, psoriatic arthritis, axial spondyloarthritis / Psoríase, artrite psoriática, espondiloartrite axial	51
Vedolizumab	Integrin α 7 β 4	Crohn's disease, ulcerative colitis / Doença de Crohn, colite ulcerosa	52
Oncological / Oncológico			
Atezolizumab	PD-L1	Breast cancer / Cancro da mama	53
Bevacizumab	VEGF	Colorectal cancer, renal cell carcinoma, lung cancer / Cancro colorrectal, carcinoma de células renais, cancro do pulmão	54
Daratumumab	CD38	Relapsed multiple myeloma / Mieloma múltiplo recidivante	55
Dinutixumab	GD2	Neuroblastoma	56
Elotuzumab	SLAMF7	Multiple myeloma / Mieloma múltiplo	57
Ipilimumab	CTLA-4	Metastatic melanoma / Melanoma metastático	58
Necitumumab	EGFR	Non-small-cell lung cancer / Cancro do pulmão de células não pequenas	59
Ofatumumab	CD20	Chronic lymphocytic leukemia / Leucemia linfocítica crónica	60
Pembrolizumab	PD-1	Melanoma and multiple cancers / Melanoma e cancros múltiplos	61
Trastuzumab	HER2	Breast cancer, gastric/gastroesophageal junction carcinoma / Cancro da mama, carcinoma da junção gástrica/gastroesofágica	62
Infectious / Infecioso			
Bezlotoxumab	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i> colitis / Colite por <i>Clostridium difficile</i>	63
Ibalizumab	CD4	Multidrug-resistant HIV-1 infection / Infecção por VIH-1 multirresistente	64
Ormutivimab	Rabies virus / Vírus da raiva	Rabies postexposure prophylaxis / Profilaxia pós-exposição à raiva	65
Raxibacumab	Anthrax toxin / Toxina do carbúnculo	Inhalation anthrax / Carbúnculo por inalação	66

of rheumatoid arthritis, psoriasis, psoriatic arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, juvenile idiopathic arthritis and ankylosing spondylitis (10, 68).

Additionally, mAbs-based immunotherapy plays a crucial role in anticancer therapy by targeting tumour antigens and promoting the induction of long-lasting anti-tumour immune responses (69). Therapeutic MAbs mainly target growth factor receptors (e.g. EGFR, HER2, etc.) overexpressed in tumour cells, where blocking these receptors hinders ligand binding or signalling. This, in turn, decreases the tumour growth rate, induces apoptosis and sensitizes tumours to chemotherapy (70). Furthermore, mAbs function to selectively deliver radioisotopes to cancer cells and inhibit angiogenesis by targeting the tumour microenvironment. mAbs-based therapy also targets immune cells by inhibiting immune checkpoints such as cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4) and programmed cell death protein 1 (PD-1)/PD1 ligand 1 (PD-L1), thus enhancing antitumor immune responses (71).

The use of mAbs in the treatment of infectious diseases offers several advantages, including low risk of pathogen transmission, low lot-to-lot variability, and negligible immunological complications associated with the use of heterologous sera (70). Palivizumab, the first approved mAbs for infectious disease, is used for the prevention of respiratory disease resulting from respiratory syncytial virus through the inhibition of virus replication (72). Other mAbs, such as erenumab, fremanezumab and galcanezumab have been employed for the treatment of migraines (73).

Enzymes

Enzymes have emerged as essential biopharmaceuticals, finding applications in enzyme therapy or enzyme replacement therapy for the treatment of disorders that were previously difficult to address (74). These biologically active molecules exhibit significant catalytic potential, characterized by high substrate specificity and affinity, low toxicity, and minimal side effects (75). Enzymatic catalysis enables the conversion of multiple targets into desired products, allowing for the administration of therapeutics in small quantities (76). Microorganisms play a key role in the widespread production of enzymes owing to their physiological, geographic,

no tratamento da artrite reumatoide, da psoríase, da artrite psoriática, da doença de Crohn, da colite ulcerosa, da artrite idiopática juvenil e da espondilite anquilosante (10, 68).

Além disso, a imunoterapia baseada em mAbs desempenha um papel crucial na terapêutica anticancerígena, visando os antígenos tumorais e promovendo a indução de respostas imunitárias antitumorais duradouras (69). Os mAbs terapêuticos visam principalmente os receptores de fatores de crescimento (por exemplo, EGFR, HER2, etc.) sobre-expressos nas células tumorais, sendo que o bloqueio destes receptores impede a ligação ou a sinalização do ligando. Isto, por sua vez, diminui a taxa de crescimento do tumor, induz a apoptose e sensibiliza os tumores à quimioterapia (70). Além disso, os mAbs funcionam para fornecer radioisótopos de forma selectiva às células cancerígenas e inibir a angiogénese, visando o microambiente tumoral. A terapêutica baseada em mAbs também visa as células imunitárias, inibindo os pontos de controlo imunitário, como o antígeno 4 associado aos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e a proteína 1 de morte celular programada (PD-1)/ligando 1 de PD-1 (PD-L1), aumentando assim as respostas imunitárias antitumorais (71).

A utilização de mAbs no tratamento de doenças infecciosas oferece várias vantagens, incluindo o baixo risco de transmissão de agentes patogénicos, a baixa variabilidade de lote para lote e complicações imunológicas insignificantes associadas à utilização de soros heterólogos (70). O palivizumab, o primeiro mAbs aprovado para doenças infecciosas, é utilizado para a prevenção de doenças respiratórias resultantes do vírus sincicial respiratório através da inibição da replicação do vírus (72). Outros mAbs, como o erenumab, o fremanezumab e o galcanezumab, têm sido utilizados para o tratamento de enxaquecas (73).

Enzimas

As enzimas emergiram como biofármacos essenciais, encontrando aplicações na terapia enzimática ou na terapia de substituição enzimática para o tratamento de doenças que anteriormente eram difíceis de tratar (74). Estas moléculas biologicamente activas apresentam um potencial catalítico significativo, caracterizado por uma elevada especificidade e afinidade do substrato, baixa toxicidade e efeitos secundários mínimos (75). A catálise enzimática permite a conversão de múltiplos alvos em produtos desejados, permitindo a administração de terapêuticas em pequenas quantidades (76). Os microrganismos desempenham um papel fundamental na produção generalizada de enzimas,

and genomic diversity. Microbial enzymes have become a promising resource as therapeutic and diagnostic purposes in healthcare sector because of their consistency, economic feasibility, ease of isolation, and potential for product modification and optimization. Moreover, microorganisms can produce enzymes in high yields using cost-effective medium within a short period of time, without the issues related to seasonal fluctuations (77).

Enzymatic anti-inflammatory drugs are employed as alternatives to conventional Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) for the treatment of inflammation (78). Serratiopeptidase, a historically effective anti-inflammatory agent, has been used in the degradation of atherosclerotic plaque, wound healing, reduction of viscosity and thickness of mucus in allergic reactions and surgical pain management. It has demonstrated clinical applications in treating various conditions, including breast disease, Alzheimer's diseases, sinusitis, hepatitis, lung disorders, atherosclerosis, and uterine fibroids (79). Collagenase is another enzyme that can be used to yield collagen-derived peptides, enhancing macrophage chemotaxis and increasing cytokine secretion, thereby promoting wound healing. Collagenase has found applications in the treatment of Dupuytren's disease and Peyronie's disease. Moreover, superoxide dismutase (SODs) represents an anti-inflammatory agent that transform membrane-impermeable superoxide anions into membrane-diffusible hydrogen peroxide, which can then be detoxified by catalase and peroxidase. SODs disrupt the inflammatory cascade by scavenging damaging free radicals, thereby limiting disease progression. These enzymes are incorporated into drug preparations for various conditions, including myocardial ischemia, Peyronie's disease, colitis, multiple sclerosis, and breast cancer (80).

Enzybiotics constitutes a promising class of unique antibacterials involving enzymes like lysins, autolysins and lysozymes to combat infectious pathogenic bacteria. Lysins, encoded by double-stranded DNA bacteriophages during the lytic cycle, play a crucial role in cleaving covalent bonds in the peptidoglycan layer of bacterial cell walls or destabilizing the bacterial plasma membrane, leading to the death of bacteria (81). Previous studies have employed various lysins such as Cpl-1, Pal, Ply GBS, PlyC, targeting different *Streptococcus* sp. (75). Autolysins represent

devido à sua diversidade fisiológica, geográfica e genómica. As enzimas microbianas tornaram-se um recurso promissor para fins terapêuticos e de diagnóstico no sector da saúde devido à sua consistência, viabilidade económica, facilidade de isolamento e potencial de modificação e otimização do produto. Além disso, os microrganismos podem produzir enzimas com elevados rendimentos, utilizando um meio económico num curto período de tempo, sem os problemas relacionados com as flutuações sazonais (77).

Os anti-inflamatórios enzimáticos são utilizados como alternativas aos anti-inflamatórios não esteróides convencionais (AINE) para o tratamento da inflamação (78). A serratiopeptidase, um agente anti-inflamatório historicamente eficaz, tem sido utilizado na degradação da placa aterosclerótica, na cicatrização de feridas, na redução da viscosidade e da espessura do muco em reacções alérgicas e no controlo da dor cirúrgica. Tem demonstrado aplicações clínicas no tratamento de várias doenças, incluindo doenças da mama, doenças de Alzheimer, sinusite, hepatite, doenças pulmonares, aterosclerose e miomas uterinos (79). A colagenase é outra enzima que pode ser utilizada para produzir péptidos derivados do colagénio, melhorando a quimiotaxia dos macrófagos e aumentando a secreção de citocinas, promovendo assim a cicatrização de feridas. A colagenase tem encontrado aplicações no tratamento da doença de Dupuytren e da doença de Peyronie. Além disso, a superóxido dismutase (SOD) representa um agente anti-inflamatório que transforma os aniões superóxido impermeáveis à membrana em peróxido de hidrogénio difusível à membrana, que pode depois ser desintoxicado pela catalase e pela peroxidase. As SODs interrompem a cascata inflamatória eliminando os radicais livres nocivos, limitando assim a progressão da doença. Estas enzimas são incorporadas em preparações medicamentosas para várias doenças, incluindo a isquemia do miocárdio, a doença de Peyronie, a colite, a esclerose múltipla e o cancro da mama (80).

Os enziobióticos constituem uma classe promissora de antibacterianos únicos que envolvem enzimas como lisinas, autolisinas e lisozimas para combater bactérias patogénicas infecciosas. As lisinas, codificadas por bacteriófagos de ADN de cadeia dupla durante o ciclo lítico, desempenham um papel crucial na clivagem de ligações covalentes na camada de peptidoglicano das paredes celulares bacterianas ou na desestabilização da membrana plasmática bacteriana, levando à morte das bactérias (81). Estudos anteriores utilizaram várias lisinas, tais como Cpl-1, Pal, Ply GBS, PlyC, visando diferentes *Streptococcus* sp. (75). As autolisinas

another type of lytic enzymes with Lyt A amidase being the first autolysin used as an antibacterial agent for the treatment of *Streptococcus pneumoniae* (82). Lysozymes, hydrolytic enzymes that specifically cleave β -1,4 glycosidic bonds in the peptidoglycan layer, induce bacterial lysis (83). Lysozymes exhibit anti-inflammatory, anticancer, antibacterial, and antiviral activity, making them suitable for therapeutic applications such as wound healing and killing oral bacteria (84, 85).

Microbial fibrinolytic enzymes demonstrate fibrinolysis, a process that breaks down the fibrin network of blood clots without side effects, thereby restoring normal blood flow in the blood vessels (86). Streptokinase, a type of enzyme-based fibrinolytic drug, exhibits thrombolytic activity by forming an active complex with plasminogen which promotes the cleavage of the Arginine-Valine bond in plasminogen. This results in the formation of proteolytic enzyme plasmin that degrades the matrix of the thrombus, leading to the dissolution of blood clots (75). Another type of fibrinolytic enzyme is known as staphylokinase which possesses similar thrombolytic activity to streptokinase. Nattokinase enzyme exhibits strong fibrinolytic activity and can inactivate Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (87). Nattokinase offers advantages over other fibrinolytic enzymes due to its potential for oral administration, sustained effects, stability in gastrointestinal tract and improved plasminogen activators production (88).

Vaccines

Vaccines, a category of biopharmaceuticals, play a crucial role in enhancing the human immune response against various infections or diseases. They can be derived from various components of pathogens, such as surface proteins, nucleic acids, glycoproteins, or biomanufactured (89). Antigens that stimulate the immune system are the main component of vaccines, and additional elements like stabilizers, antibiotics, preservatives, trace components, excipients, and adjuvants are often added to boost immunogenicity and improve shelf life. Prophylactic vaccines are primarily developed for infectious diseases and are commonly administered to healthy individuals to produce antibodies for disease prevention. Prophylactic vaccines have been highly effective against life-threatening diseases such

representam outro tipo de enzimas líticas, sendo a Lyt A amidase a primeira autolisina utilizada como agente antibacteriano para o tratamento de *Streptococcus pneumoniae* (82). As lisozimas, enzimas hidrolíticas que clivam especificamente as ligações β -1,4 glicosídicas na camada de peptidoglicano, induzem a lise bacteriana (83). As lisozimas apresentam atividade anti-inflamatória, anticancerígena, antibacteriana e antiviral, o que as torna adequadas para aplicações terapêuticas como a cicatrização de feridas e a eliminação de bactérias orais (84, 85).

As enzimas fibrinolíticas microbianas demonstram fibrinólise, um processo que quebra a rede de fibrina dos coágulos sanguíneos sem efeitos secundários, restaurando assim o fluxo sanguíneo normal nos vasos sanguíneos (86). A estreptoquinase, um tipo de fármaco fibrinolítico à base de enzimas, apresenta atividade trombolítica ao formar um complexo ativo com o plasminogénio, que promove a clivagem da ligação arginina-valina no plasminogénio. Isto resulta na formação da enzima proteolítica plasmina que degrada a matriz do trombo, levando à dissolução dos coágulos sanguíneos (75). Outro tipo de enzima fibrinolítica é conhecida como estafloquinase, que possui uma atividade trombolítica semelhante à da estreptoquinase. A enzima natokinase apresenta uma forte atividade fibrinolítica e pode inativar o inibidor do ativador do plasminogénio-1 (PAI-1) (87). A natokinase oferece vantagens em relação a outras enzimas fibrinolíticas devido ao seu potencial para administração oral, efeitos sustentados, estabilidade no trato gastrointestinal e melhor produção de ativadores do plasminogénio (88).

Vacinas

As vacinas, uma outra categoria de produtos biofarmacêuticos, desempenham um papel crucial no reforço da resposta imunitária humana contra várias infecções ou doenças. Podem ser obtidas de vários componentes de agentes patogénicos, tais como proteínas de superfície, ácidos nucleicos, glicoproteínas, ou biomanufaturadas (89). Os antígenos que estimulam o sistema imunitário são o principal componente das vacinas, e elementos adicionais como estabilizadores, antibióticos, conservantes, componentes vestigiais, excipientes e adjuvantes são frequentemente adicionados para aumentar a imunogenicidade e melhorar o prazo de validade. As vacinas profiláticas são desenvolvidas principalmente para doenças infecciosas e são normalmente administradas a indivíduos saudáveis para produzir anticorpos para a prevenção de doenças. As vacinas profiláticas têm sido altamente eficazes contra doenças potencialmente mortais,

as smallpox and viral poliomyelitis (90). On the other hand, therapeutic vaccines are used as post-exposure therapy to boost the individual's immune system against chronic disease, premalignant condition or cancer. These vaccines are designed to induce cell-mediated immunity, induce tumour regression, eradicate minimal residual disease (91).

Live attenuated vaccines, a conventional type of vaccine, have demonstrated effectiveness against tuberculosis, chickenpox, influenza, measles, mumps rotavirus and polio (92). In contrast, whole inactivated vaccines, which are safer due to the prevention of replication and mutations, are introduced for diseases like poliovirus, Hepatitis A Virus and Japanese Encephalitis Virus (92). Virus-like particles vaccines are utilized for viruses like Human Papilloma Virus (HPV), Hepatitis B virus, Hepatitis E virus, influenza virus, SARS-CoV-2 virus and respiratory syncytial virus. These vaccines are expressed in different systems including yeast, insect cells and plant (93). Polysaccharide or polysaccharide conjugated vaccines, derived from polymers forming the capsular structure of bacterial pathogens, protect against invasive meningococcal disease, pneumococcal disease, and typhoid (94-96).

Novel vaccines platforms have emerged to enable rapid responses to emerging pathogens, particularly those with pandemic pathogens. These platforms are designed for large-scale manufacturing with low costs, a small footprint and easier deployment. Advances in molecular biology, bioinformatics, and technologies like NexGen sequencing contribute to the development of these platforms. (89). Bacterial-vectored vaccines involve the use of live non-pathogenic bacterial cells, like *Lactobacillus* sp., as carriers to facilitate mucosal administration of vaccines. Virus-vectored vaccines are derived from viruses engineered to encode genes for antigens cloned into the vector backbone. These vaccines are particularly used for the rapid production of prophylactic vaccines during epidemic or endemic situations (97). An example is JNJ-78436735 by Janssen Biotech Inc., a viral vector vaccine for SARS-CoV-2 virus. DNA vaccines deliver genes encoding immunogenic antigens to the host's cells using DNA plasmids as a vector, including both humoral and cell-mediated immune response (98). mRNA vaccines, on the other hand, deliver antigen-encoding mRNA into immune cells to trigger an immune response. Examples include COMINARTY® and SpikeVax®, two mRNA vaccines for SARS-CoV-2 virus.

como a varíola e a poliomielite viral (90). Por outro lado, as vacinas terapêuticas são utilizadas como terapia pós-exposição para reforçar o sistema imunitário do indivíduo contra doenças crônicas, doenças pré-malignas ou cancro. Estas vacinas são concebidas para induzir a imunidade mediada por células, induzir a regressão do tumor e erradicar a doença residual mínima (91).

As vacinas vivas atenuadas, um tipo convencional de vacina, demonstraram eficácia contra a tuberculose, a varicela, a gripe, o sarampo, a papeira, o rotavírus e a poliomielite (92). Em contrapartida, as vacinas inteiras inativadas, que são mais seguras devido à prevenção da replicação e das mutações, são introduzidas para doenças como o poliovírus, o vírus da hepatite A e o vírus da encefalite japonesa (92). As vacinas de partículas semelhantes a vírus são utilizadas para vírus como o vírus do papiloma humano (HPV), o vírus da hepatite B, o vírus da hepatite E, o vírus da gripe, o vírus SARS-CoV-2 e o vírus sincicial respiratório. Estas vacinas são expressas em diferentes sistemas, incluindo leveduras, células de insectos e plantas (93). As vacinas polissacáridas ou conjugadas com polissacáridos, derivadas de polímeros que formam a estrutura capsular de agentes patogénicos bacterianos, protegem contra a doença meningocócica invasiva, a doença pneumocócica e a febre tifoide (94-96).

Novas plataformas de vacinas vêm surgindo para permitir respostas rápidas a agentes patogénicos emergentes, em especial aos agentes patogénicos pandémicos. Estas plataformas foram concebidas para o fabrico em grande escala, com custos reduzidos, uma pegada pequena e uma implantação mais fácil. Os avanços na biologia molecular, na bioinformática e em tecnologias como a sequenciação NexGen contribuem para o desenvolvimento destas plataformas. (89). As vacinas com vetor bacteriano implicam a utilização de células bacterianas vivas não patogénicas, como o *Lactobacillus* sp., como transportadores para facilitar a administração de vacinas na mucosa. As vacinas vectorizadas por vírus são derivadas de vírus concebidos para codificar genes para antígenos clonados na espinha dorsal do vetor. Estas vacinas são particularmente utilizadas para a produção rápida de vacinas profiláticas durante situações epidémicas ou endémicas (97). Um exemplo é a JNJ-78436735 da Janssen Biotech Inc., uma vacina de vetor viral para o vírus SARS-CoV-2. As vacinas de ADN fornecem genes que codificam antígenos imunogénicos às células do hospedeiro utilizando plasmídeos de ADN como vetor, incluindo uma resposta imunitária humoral e mediada por células (98). As vacinas de ARNm, por outro lado, fornecem

Stem cells

Stem cell therapy involves introducing stem cells into the body cells to induce self-regenerative and differentiation capacity, aiming to regenerate damaged cells and tissues or replace them with new, healthy, and fully functional cells (99). Stem cells are classified as autologous, using the patient's own cells, or allogeneic, using cells from a healthy donor. Human pluripotent stem cell (hPSCs), characterized by their self-renewable ability, have the potential to differentiate into various cellular phenotypes to treat a wide range of diseases (100). Furthermore, mesenchymal stem cells (MSCs), originating from the early mesoderm and self-renewing mesodermal cells possess multidirectional differentiation potential (101). hPSCs and MSCs are derived from bone marrow, adipose tissue, or umbilical cord for the treatment of human diseases such as pulmonary dysfunctions, metabolic/endocrine-related diseases, neurological disorders, digestive system diseases reproductive disorders, cardiovascular conditions, wound healing, and skin burns.

In addition to hPSCs and MSCs, stem cell-based therapy for liver diseases involves hematopoietic stem cell (HSCs) and liver progenitor cells (102). The administration of MSCs has been proven to reduce bone lesions, enhance bone regeneration, and stimulate the vascularization process in degenerative cartilage, making it a potential treatment for arthritis (102). In cancer treatment, MSCs demonstrate the ability to migrate toward damaged sites through inherent tropism controlled by growth factors, chemokines, and cytokines. The unique capacity of MSCs to regulate tissue repair and recovery contributes to both the protumor and antitumor functions (99). In the generation of burn tissue, MSCs contribute to the generation of keratinocytes and secretion profiles that greatly enhance the skin regeneration process (103).

ARNm que codifica o antígeno às células imunitárias para desencadear uma resposta imunitária. Exemplos incluem COMINARTY® e SpikeVax®, duas vacinas de ARNm para o vírus SARS-CoV-2.

Células estaminais

A terapia com células estaminais envolve a introdução nas células do corpo para induzir a capacidade auto-regenerativa e de diferenciação, com o objetivo de regenerar células e tecidos danificados ou substituí-los por células novas, saudáveis e totalmente funcionais (99). As células estaminais são classificadas como autólogas, utilizando as células do próprio doente, ou alogênicas, utilizando células de um dador saudável. As células estaminais pluripotentes humanas (hPSC), caracterizadas pela sua capacidade de auto-renovação, têm o potencial de se diferenciar em vários fenótipos celulares para tratar uma vasta gama de doenças (100). Além disso, as células estaminais mesenquimais (MSC), originárias da mesoderme primitiva e das células mesodérmicas auto-renováveis, possuem um potencial de diferenciação multidirecional (101). As hPSC e as MSC são derivadas da medula óssea, do tecido adiposo ou do cordão umbilical para o tratamento de doenças humanas, tais como disfunções pulmonares, doenças metabólicas/endócrinas, perturbações neurológicas, doenças do sistema digestivo, perturbações reprodutivas, doenças cardiovasculares, cicatrização de feridas e queimaduras cutâneas.

Para além das hPSCs e das MSCs, a terapia baseada em células estaminais para doenças do fígado envolve células estaminais hematopoiéticas (HSCs) e células progenitoras do fígado (102). Está provado que a administração de MSCs reduz as lesões ósseas, melhora a regeneração óssea e estimula o processo de vascularização na cartilagem degenerativa, tornando-a um potencial tratamento para a artrite (102). No tratamento do cancro, as MSC demonstram a capacidade de migrar para locais danificados através de um tropismo inerente controlado por factores de crescimento, quimiocinas e citocinas. A capacidade única das MSC para regular a reparação e recuperação dos tecidos contribui para as funções protumoral e antitumoral (99). Na geração de tecido de queimaduras, as MSC contribuem para a geração de queratinócitos e perfis de secreção que melhoram consideravelmente o processo de regeneração da pele (103).

Human growth hormone

Human growth hormone (hGH), also known as somatotropin, is released into bloodstream and plays a crucial role in numerous biological functions, including the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, lactation, immune regulation, and cell proliferation (104). hGH has diverse effects such as accelerating wound healing, increasing insulin-like growth factor (IGF)-1 osteocalcin, type I pro-collagen pro-peptide (PICP) and bone density, as well as enhancing the absorption of calcium, magnesium, and phosphate in the body (105, 106). Clinically, hGH has been used in the treatment of conditions such as bone fractures, skin burns, AIDS-related wasting, and bleeding ulcers as well as in disorders like Down's syndrome, Noonan's syndrome and Prader-Willi syndrome (104, 107). Recombinant hGH exhibits minimal side effects, low cytotoxicity, high selectivity, and low non-specific interactions, making it a valuable therapeutic option (108).

Cytokines

Cytokines, a distinctive class of biopharmaceuticals, are immunoregulatory proteins responsible for regulating cell proliferation, differentiation, and immune responses. Biological therapies for cancer, autoimmune disorders, viral diseases, infectious diseases, inflammatory conditions, and multiple sclerosis often utilize cytokines such as interleukins (IL), interferons (IFNs), and growth factors (109, 110).

Interleukin-2 (IL-2) stands out as a prominent cytokine in tumor therapy such as melanoma and renal cancer, activating, differentiating, and maintaining T cells. Initially, these T cells express a low-affinity dimeric receptor with β - and γ -chains, and upon T cell activation, they acquire the trimeric high-affinity IL-2 receptor (IL-2R), which includes the α -chain (111). Tumor necrosis factor- α (TNF- α), another pro-inflammatory cytokine, acts on endothelial cells to contain infections by increasing vasculature permeability and blood clotting. It also attracts and activates adjacent immune cells, inducing direct apoptosis of certain tumor cells, eliciting hemorrhagic necrosis, and enhancing the influx of immune effector cells. As a result, TNF- α finds extensive use in cancer therapy for the treatment of soft tissue sarcomas and

Hormona do crescimento humano

A hormona de crescimento humana (hGH), também conhecida como somatotropina, é libertada na corrente sanguínea e desempenha um papel crucial em numerosas funções biológicas, incluindo o metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, a lactação, a regulação imunitária e a proliferação celular (104). A hGH tem diversos efeitos, como a aceleração da cicatrização de feridas, o aumento do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1, da osteocalcina, do pró-peptídeo de colagénio tipo I (PICP) e da densidade óssea, bem como o aumento da absorção de cálcio, magnésio e fosfato no organismo (105, 106). Clinicamente, a hGH tem sido utilizada no tratamento de doenças como fracturas ósseas, queimaduras cutâneas, perda de peso relacionada com a SIDA e úlceras hemorrágicas, bem como em doenças como a síndrome de Down, a síndrome de Noonan e a síndrome de Prader-Willi (104, 107). A hGH recombinante apresenta efeitos secundários mínimos, baixa citotoxicidade, elevada seletividade e poucas interações não específicas, o que a torna uma opção terapêutica valiosa (108).

Citocinas

As citocinas, uma classe distinta de produtos biofarmacêuticos, são proteínas imunoreguladoras responsáveis pela regulação da proliferação, diferenciação e respostas imunitárias das células. As terapias biológicas para o cancro, as doenças auto-imunes, as doenças virais, as doenças infecciosas, as doenças inflamatórias e a esclerose múltipla utilizam frequentemente citocinas como as interleucinas (IL), os interferões (IFN) e os factores de crescimento (109, 110).

A interleucina-2 (IL-2) destaca-se como uma citocina proeminente na terapia de tumores como o melanoma e o cancro renal, activando, diferenciando e mantendo as células T. Inicialmente, estas células T expressam um recetor dimérico de baixa afinidade com cadeias β e γ e, após a ativação das células T, adquirem o recetor de IL-2 trimérico de alta afinidade (IL-2R), que inclui a cadeia α (111). O fator de necrose tumoral- α (TNF- α), outra citocina pró-inflamatória, actua nas células endoteliais para conter as infecções, aumentando a permeabilidade da vasculatura e a coagulação sanguínea. Também atrai e ativa células imunitárias adjacentes, induzindo a apoptose direta de determinadas células tumorais, provocando necrose hemorrágica e aumentando o influxo de células imunitárias efectoras. Consequentemente, o TNF- α é amplamente utilizado na terapia do cancro para o tratamento de sarcomas de tecidos moles

metastatic melanomas (112). IL-12, a different type of cytokine, plays a crucial role in regulating T-cell and natural killer-cell responses. It induces the production of interferon- γ (IFN- γ), promotes the differentiation of T helper 1 (TH1) cells, and serves as a vital link between innate resistance and adaptive immunity (113).

Interferons (IFNs) can be classified into Type I, II, and III based on the type of receptor and amino acid sequence. Among Type I IFNs, IFN- α has received approval for treating multiple myeloma and chronic hepatitis B and C, while IFN- β is employed in the treatment of multiple sclerosis. Type II IFN, IFN- λ , has shown promise as an alternative therapy for conditions such as atherosclerosis, tuberculosis, cancers, fungal infections, and chronic granulomatous disease (114). Type III IFNs induce a more targeted antiviral or immunomodulatory response, displaying antiviral activity against various gastrointestinal and respiratory viruses, including respiratory syncytial virus, influenza virus, rotavirus, metapneumovirus, and coronavirus (115, 116).

Recombinant growth factors exhibit the ability to stimulate cell growth and facilitate the healing of both normal and pathological wounds. Hepatocyte growth factor, for example, has been utilized in the treatment of inflammatory bowel disease, promoting hepatocyte proliferation and modulating intestinal epithelial cell proliferation and migration, leading to the rapid repair of intestinal epithelial cells (117). Additionally, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor have proven effective in addressing coronary artery disease (118, 119). Insulin-like growth factor signaling in central nervous system-resident macrophages plays a role in regulating the morphology and transcriptome of these cells, thereby mitigating the severity of autoimmune inflammation (120). In the wound healing process, various growth factors act through autocrine, paracrine, or endocrine mechanisms by binding to membrane or cytoplasmic receptors. This initiates a cascade of events that activate cellular machinery to facilitate wound healing. Examples of growth factors used in surgical applications include epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, fibroblast growth factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, transforming growth factor-beta, platelet-derived growth factor, and vascular endothelial growth factor (121, 122).

e melanomas metastáticos (112). A IL-12, um tipo diferente de citocina, desempenha um papel crucial na regulação das respostas das células T e das células assassinas naturais. Induz a produção de interferon- γ (IFN- γ), promove a diferenciação das células T helper 1 (TH1) e funciona como um elo vital entre a resistência inata e a imunidade adaptativa (113).

Os interferões (IFN) podem ser classificados em Tipo I, II e III com base no tipo de recetor e na sequência de aminoácidos. Entre os IFN de tipo I, o IFN- α foi aprovado para o tratamento do mieloma múltiplo e da hepatite crónica B e C, enquanto o IFN- β é utilizado no tratamento da esclerose múltipla. O IFN de tipo II, IFN- λ , tem-se mostrado promissor como terapia alternativa para doenças como a aterosclerose, a tuberculose, o cancro, as infecções fúngicas e a doença granulomatosa crónica (114). Os IFN de tipo III induzem uma resposta antiviral ou imunomoduladora mais específica, apresentando atividade antiviral contra vários vírus gastrointestinais e respiratórios, incluindo o vírus sincicial respiratório, o vírus da gripe, o rotavírus, o metapneumovírus e o coronavírus (115, 116).

Os factores de crescimento recombinantes têm a capacidade de estimular o crescimento celular e facilitar a cicatrização de feridas normais e patológicas. O fator de crescimento dos hepatócitos, por exemplo, tem sido utilizado no tratamento da doença inflamatória intestinal, promovendo a proliferação dos hepatócitos e modulando a proliferação e a migração das células epiteliais intestinais, o que conduz à rápida reparação das células epiteliais intestinais (117). Além disso, o fator de crescimento endotelial vascular e o fator de crescimento dos fibroblastos revelaram-se eficazes no tratamento da doença arterial coronária (118, 119). A sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina nos macrófagos residentes no sistema nervoso central desempenha um papel na regulação da morfologia e do transcriptoma destas células, atenuando assim a gravidade da inflamação autoimune (120). No processo de cicatrização de feridas, vários factores de crescimento actuam através de mecanismos autócrinos, parácrinos ou endócrinos, ligando-se a receptores de membrana ou citoplasmáticos. Isto dá início a uma cascata de eventos que activam a maquinaria celular para facilitar a cicatrização de feridas. Exemplos de factores de crescimento utilizados em aplicações cirúrgicas incluem o fator de crescimento epidérmico, o fator de crescimento dos queratinócitos, o fator de crescimento dos fibroblastos, o fator estimulador das colónias de granulócitos-macrófagos, o fator de crescimento

transformador beta, o fator de crescimento derivado das plaquetas e o fator de crescimento endotelial vascular (121, 122).

Nucleic acids

Nucleic acids (NAs) therapeutics encompass a wide range of DNA and RNA, including oligonucleotides, antisense oligonucleotides, short interfering RNA (siRNA), and mRNA (123). Oligonucleotides refer to short DNA or RNA molecules, while antisense oligonucleotides are short, single-stranded DNA. siRNA consists of small and double-stranded DNA, and mRNA comprises thousands of nucleotides. Table 2 provides examples of NA therapeutics based on biological classification, along with their respective targets and therapeutic applications.

NAs are directly administered to target cells or tissues, but their complexity and high hydrophilic often pose stability challenges. Naked and unmodified NAs exhibit short half-lives due to enzymatic and chemical degradation. Therefore, the development of high-quality formulations with effective drug delivery systems is a safeguard to protect NAs from degradation and ensure their successful delivery to target cells or tissues (135). Various options for these therapeutics include lipid-based nanoparticles, polymeric nanoparticles, gold nanoparticles porous nanoparticles. Notably, lipid nanoparticles demonstrate a higher compatibility compared to polymeric and metal-based counterparts (136). For instance, Patisiran (Onpattro®) is the first lipid nanoparticle formulation commercially available, delivered in liposome vesicles (137). Moreover, lipid nanoparticles find application in COVID-19 mRNA vaccines, contributing to enhanced stability and efficiency (135).

Carbohydrates

Carbohydrate-based therapeutics play a significant role in cardiovascular and haematological treatments, addressing conditions including inflammatory diseases, anti-thrombotic treatment, and wound healing. Carbohydrates are characterized by their high density of functional groups, diverse molecular structures, and ideal biocompatibility, as they are ubiquitous in the body (138). Historically, heparin

Ácidos nucleicos

As terapêuticas com ácidos nucleicos (AN) abrangem uma vasta gama de ADN e ARN, incluindo oligonucleótidos, oligonucleótidos *antisense*, ARN de interferência curta (ARNi) e ARNm (123). Os oligonucleótidos referem-se a moléculas curtas de ADN ou ARN, enquanto os oligonucleótidos *antisense* são ADN curto de cadeia simples, o ARNi é constituído por ADN pequeno e de cadeia dupla e o ARNm é constituído por milhares de nucleótidos. A Tabela 2 apresenta exemplos de terapêuticas de NA com base na classificação biológica, juntamente com os seus respectivos alvos e aplicações terapêuticas.

Os ANs são diretamente administradas a células ou tecidos-alvo, mas a sua complexidade e elevado grau de hidrofília colocam frequentemente desafios à sua estabilidade. Os ANs simples e não modificados apresentam meias-vidas curtas devido à degradação enzimática e química. Por conseguinte, o desenvolvimento de formulações de alta qualidade com sistemas eficazes de administração de fármacos é uma salvaguarda para proteger os NA da degradação e garantir o êxito da sua administração às células ou tecidos-alvo (135). As várias opções para estas terapêuticas incluem nanopartículas à base de lípidos, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de ouro e nanopartículas porosas. As nanopartículas lipídicas em particular, demonstram uma maior compatibilidade em comparação com as contrapartes poliméricas e metálicas (136). Por exemplo, o Patisiran (Onpattro®) é a primeira formulação de nanopartículas lipídicas disponível no mercado, administrada em vesículas de lipossomas (137). Além disso, as nanopartículas lipídicas têm aplicação nas vacinas de ARNm contra a COVID-19, contribuindo para uma maior estabilidade e eficácia (135).

Hidratos de carbono

As terapêuticas à base de hidratos de carbono desempenham um papel significativo nos tratamentos cardiovasculares e hematológicos, abordando condições que incluem doenças inflamatórias, tratamento antitrombótico e cicatrização de feridas. Os hidratos de carbono caracterizam-se pela elevada densidade de grupos funcionais, estruturas moleculares diversas e biocompatibilidade ideal, uma vez que são omnipresentes no organismo (138). Historicamente,

Table 2 - Examples of nucleic acids therapeutics.
Tabela 2 - Exemplos de terapêuticas com ácidos nucleicos.

NAs-based drug / Medicamento à base de ANs	Target / Alvo	Therapeutic applications / Aplicações terapêuticas	References / Referências
Oligonucleotides / Oligonucleótidos:			
Defibrotide / Defibrotido	Adenosine receptors A1, A2a, A2b / Receptores de adenosina A1, A2a, A2b	Hepatic veno-occlusive disease / Doença veno-oclusiva hepática	124
Mipomersen	mRNA of apoB-100 / ARNm da apoB-100	Familial hypercholesterolemia / Hipercolesterolemia familiar	125
Pegaptanib	VEGF165	Age-related macular degeneration / Degenerescência macular relacionada com a idade	126
Antisense oligonucleotides / Oligonucleótidos antisense:			
Casimersen	Exon 45 of dystrophin gene / Exão 45 do gene da distrofina	Duchenne muscular dystrophy / Distrofia muscular de Duchenne -127	127
Inotersen	Transthyretin mRNA / ARNm da transtirretina	Polyneuropathy / Polineuropatia	128
Nusinersen	Survival motor neuron-2 protein / Proteína de sobrevivência do neurónio motor-2	Spinal muscular atrophy / Atrofia muscular espinal	129
Volanesorsen	Apolipoprotein C-111 mRNA / Apolipoproteína C-111 ARNm	Familial chylomicronemia syndrome / Síndrome de quilomicronemia familiar	130
siRNA / ARNsi:			
Givosiran	ALAS1 mRNA / ARNm da ALAS1	Acute hepatic porphyria / Porfíria hepática aguda	131
Inclisiran	Hepatic translation proprotein convertase subtilisin-Kexin type 9 / Convertase de tradução hepática da proteína subtilisina-Kexina tipo 9	Hypercholesterolemia / Hipercolesterolemia	132
Patisiran	Hydroxyacid oxidase-1 mRNA / Hidroxiácido oxidase-1 ARNm	Primary hyperoxaluria type 1 / Hiperoxalúria primária tipo 1	133
Vutrisiran	Transthyretin mRNA / ARNm da transtirretina	Polyneuropathy / Polineuropatia	134

has been utilized as an intravenously injected anticoagulant and antithrombotic agent, crucial in cardiovascular surgeries and haemodialysis (139). Oligosaccharides and polysaccharides find application in the treatment of gastrointestinal tract disease treatment due to their low lipophilicity, where limited absorption is acceptable. Additionally, lactulose is employed in the treatment of chronic constipation by promoting intraluminal gas formation and facilitating bowel movement (140). An example of a pure carbohydrate drug is the ^{18}F -fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) injection, used for cancer diagnosis as this compound can be taken up by tumor cells, enabling the identification of tumor sites and determining cancer stage (141)

Moreover, carbohydrates can serve as conjugates in other drugs, increasing bioactivity, improving physicochemical properties, and enabling targeted drug delivery. ^{18}F -FDG, for instance, is a valuable component for glycoconjugate targeting in breast,

a heparina tem sido utilizada como um agente anticoagulante e antitrombótico injetado por via intravenosa, crucial em cirurgias cardiovasculares e hemodiálise (139). Os oligossacáridos e os polissacáridos têm aplicação no tratamento de doenças do trato gastrointestinal devido à sua baixa lipofilia, em que é aceitável uma absorção limitada. Além disso, a lactulose é utilizada no tratamento da obstipação crônica, promovendo a formação de gás intraluminal e facilitando o movimento intestinal (140). Um exemplo de um fármaco de hidratos de carbono puros é a injeção de F-fluorodeoxiglicose (^{18}F -FDG), utilizada para o diagnóstico do cancro, uma vez que este composto pode ser absorvido pelas células tumorais, permitindo a identificação dos locais de tumor e a determinação do estágio do cancro (141)

Além disso, os hidratos de carbono podem servir de conjugados noutros fármacos, aumentando a bioatividade, melhorando as propriedades

lung, colorectal, and endometrial carcinomas, as well as soft tissues and bone sarcomas (142). Carbohydrates are increasingly used as scaffolds for the development of bioactive compounds, mimicking the backbone of peptides to increase the bioavailability. The first peptidomimetic compound, based on the β -d-glucoside scaffold, exemplifies this approach (143). The application of carbohydrates extends to the development of antimicrobial vaccines and anticancer vaccines, with Prevnar 13 being a typical polysaccharide–protein conjugate vaccine (144). Furthermore, carbohydrates are integrated into nanomaterials for biomedical imaging, diagnostics, and therapeutics to enhance drug efficacy, reduce nonspecific toxicity, and improve targeting (145). Carbohydrates contribute to increased water solubility, improved biocompatibility of nanomaterial and enhanced affinity for receptors, thus optimizing the use of nanomaterials (138).

Challenges

The rapid advancement of innovative biopharmaceuticals has opened a new era, indicating promising scientific and regulatory prospects. However, challenges in biopharmaceutical development persist, including concerns such as the processing cost of biopharmaceuticals, limitations in designing injectable formulations and difficulties in predicting human toxicity based on animal studies.

The manufacturing of biopharmaceuticals is often associated with high cost, primarily due to the utilization of expensive technologies like recombinant DNA technology. Unlike other synthetic and conventional pharmaceutical products, the manufacturing process for biopharmaceuticals is intricate, involving the isolation, growth, and reproduction of living organisms. Downstream processing of biopharmaceutical production accounts for approximately 80% of the overall production costs. This complexity presents challenges in ensuring safety, quality, and efficacy. Additionally, the packaging of biopharmaceuticals must meet stringent requirements to ensure the stability of biological compounds until their administration.

físico-químicas e permitindo a administração de fármacos específicos. O ^{18}F -FDG, por exemplo, é um componente valioso para a utilização de glicoconjugados em carcinomas da mama, do pulmão, colorretais e endometriais, bem como em sarcomas dos tecidos moles e dos ossos (142). Os hidratos de carbono são cada vez mais utilizados como estruturas para o desenvolvimento de compostos bioativos, imitando a espinha dorsal dos péptidos para aumentar a biodisponibilidade. O primeiro composto peptidomimético, baseado na estrutura do β -d-glucósido, exemplifica esta abordagem (143). A aplicação dos hidratos de carbono estende-se ao desenvolvimento de vacinas antimicrobianas e anticancerígenas, sendo a Prevnar 13 uma típica vacina conjugada polissacárido-proteína (144). Além disso, os hidratos de carbono são integrados em nanomateriais para imagiologia biomédica, diagnóstico e terapêutica, afim de aumentar a eficácia dos medicamentos, reduzir a toxicidade inespecífica e melhorar a orientação (145). Os hidratos de carbono contribuem para aumentar a solubilidade em água, melhorar a biocompatibilidade dos nanomateriais e aumentar a afinidade pelos receptores, otimizando assim a utilização dos nanomateriais (138).

Desafios

O rápido avanço dos produtos biofarmacêuticos inovadores abriu uma nova era terapêutica humana, com promissoras perspectivas científicas e regulatórias. No entanto, persistem desafios no desenvolvimento biofarmacêutico, incluindo preocupações como o custo de processamento dos biofármacos, limitações na conceção de formulações injetáveis e dificuldades em prever a toxicidade humana com base em estudos em animais.

O fabrico de produtos biofarmacêuticos está frequentemente associado a custos elevados, principalmente devido à utilização de tecnologias dispendiosas como a tecnologia do ADN recombinante. Ao contrário de outros produtos farmacêuticos sintéticos e convencionais, o processo de fabrico de produtos biofarmacêuticos é turtuoso, envolvendo o isolamento, o crescimento e a reprodução de organismos vivos. O processamento a jusante da produção biofarmacêutica é responsável por cerca de 80% dos custos globais de produção. Esta complexidade apresenta desafios para garantir a segurança, a qualidade e a eficácia. Além disso, a embalagem de produtos biofarmacêuticos tem

These compounds are particularly sensitive to temperature changes and environmental factors. The implementation of continuous processing holds the potential to address these challenges by reducing capital costs, increasing profitability and productivity, and enhancing product quality and flexibility. It is important to conduct economic analyses to assess the cost-effectiveness of continuous processing and explore alternative, cost-effective innovative processes for biopharmaceutical production (146).

Given that injection is the primary administration mode for biopharmaceuticals due to their poor membrane permeation nature, the design of injectable formulation possesses challenges not commonly encountered with other small molecule drugs. The low stability of biopharmaceuticals resulting from structural modification or environmental factors necessitates the use of stabilizers in their formulation. However, careful consideration in terms of local toxicity and potential immunogenicity is essential. Understanding the inactivation mechanism of biopharmaceutical drugs and assessing the suitability of excipients used in the formulation for stabilization are critical. The high and variable viscosity of biopharmaceutical drugs containing multi-hundred-milligram per milliliter protein solutions makes drug administration challenging, thus the creation of low-viscosity formulations is a significant challenge (8).

Animal studies conducted during the development of biopharmaceutical products pose challenges in predicting human toxicity. This difficulty arises from factors such as cross-reactivity, potentially exaggerated pharmacology, and immunogenic responses observed in animals, which may not accurately predict immunogenicity in humans. The prospect of adverse immune reactions may result in clinical consequences, including the risk of anaphylaxis, reduced drug half-life, and the neutralization of both the biopharmaceuticals and their endogenous human analogues. Hence, there is a need for alternatives to animal studies, including *in vitro* tests such as tissue samples or cell lines, alternative organisms like bacteria, and advanced technologies such as organ-on-chip technologies such as computer modeling or phase 0 *in-human* microdosing trials (147).

de cumprir requisitos rigorosos para garantir a estabilidade dos compostos biológicos até à sua administração. Estes compostos são particularmente sensíveis a alterações de temperatura e a factores ambientais. A implementação do processamento contínuo tem o potencial de enfrentar estes desafios, reduzindo os custos de capital, aumentando a rentabilidade e a produtividade e melhorando a qualidade e a flexibilidade do produto. É importante realizar análises económicas para avaliar a relação custo-eficácia do processamento contínuo e explorar processos inovadores alternativos e rentáveis para a produção biofarmacêutica (146).

Dado que a injeção é o principal modo de administração dos biofármacos, devido à sua fraca permeabilidade às membranas, a conceção de uma formulação injetável apresenta desafios que não são comuns a outros medicamentos de pequenas moléculas. A baixa estabilidade dos biofármacos, resultante de modificações estruturais ou de factores ambientais, exige a utilização de estabilizadores na sua formulação. No entanto, é essencial uma análise cuidadosa em termos de toxicidade local e de imunogenicidade potencial. É fundamental compreender o mecanismo de inativação dos medicamentos biofarmacêuticos e avaliar a adequação dos excipientes utilizados na formulação para estabilização. A viscosidade elevada e variável dos fármacos biofarmacêuticos que contêm soluções proteicas de várias centenas de miligramas por mililitro torna a administração do fármaco difícil, pelo que a criação de formulações de baixa viscosidade constitui um desafio significativo (8).

Os estudos em animais efectuados durante o desenvolvimento de produtos biofarmacêuticos colocam desafios na previsão da toxicidade humana. Esta dificuldade resulta de factores como a reatividade cruzada, a farmacologia potencialmente exagerada e as respostas imunogénicas observadas em animais, que podem não prever com precisão a imunogenicidade em seres humanos. A perspectiva de reacções imunitárias adversas pode ter consequências clínicas, incluindo o risco de anafilaxia, a redução da semi-vida do medicamento e a neutralização dos biofármacos e dos seus análogos humanos endógenos. Por conseguinte, são necessárias alternativas aos estudos em animais, incluindo testes *in vitro*, como amostras de tecidos ou linhas celulares, organismos alternativos, como as bactérias, e tecnologias avançadas, como as tecnologias de órgãos em chip, como a modelação por computador ou os ensaios de microdosagem em humanos de fase 0 (147).

Conclusion

Biopharmaceuticals present numerous advantages in therapeutic applications, effectively contributing to disease prevention, treatment, and diagnosis. The current array of clinical biopharmaceutical products, including mAbs, enzymes, vaccines, stem cells, human growth hormones, cytokines, nucleic acids, and carbohydrates, underscores their versatility and potential impact. This review presents important updated knowledge on biopharmaceuticals, offering insight that can inform decision-making, policy development, and further research in the field of healthcare and pharmaceuticals.

Contribution of the authors

Kai Bin Liew: Conceptualization, Writing - Original draft, Supervision. Siew Keah Lee: Investigation, Writing-Original draft. Long Chiau Ming: Investigation, Writing - Original draft. Zaidul Islam Sarker: Formal analysis, Writing - Original draft. A.B.M. Helal Uddin: Data curation, Writing - Review and editing. Yik Ling Chew: Resources, Writing - Review and editing. Phei Er Kee: Visualization, Writing - Review and editing.

Funding

This work was supported by the Ministry of Higher Education Malaysia (MOHE) Fundamental Research Grant Scheme (FRGS) (grant no: FRGS/1/2021/SKK0/UOC/02/2).

Acknowledgments

We would like to thank all of the bodies and institutions involved that gave us the opportunity and provide their facilities to finish this study.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest with regard to the work.

Conclusão

Os produtos biofarmacêuticos apresentam inúmeras vantagens em aplicações terapêuticas, contribuindo efetivamente para a prevenção, tratamento e diagnóstico de doenças. A atual gama de produtos biofarmacêuticos clínicos, incluindo mAbs, enzimas, vacinas, células estaminais, hormonas de crescimento humano, citocinas, ácidos nucleicos e hidratos de carbono, sublinha a sua versatilidade e potencial impacto. Esta revisão apresenta conhecimentos importantes, atualizados, sobre os produtos biofarmacêuticos, oferecendo uma visão que pode informar a tomada de decisões, o desenvolvimento de políticas e a investigação futura no domínio dos cuidados de saúde e dos produtos farmacêuticos.

Contribuição dos autores

Kai Bin Liew: Conceptualização, Redação - Rascunho original, Supervisão. Siew Keah Lee: Investigação, Redação - Rascunho original. Long Chiau Ming: Investigação, Redação - Rascunho original. Zaidul Islam Sarker: Análise formal, Redação - Projeto original. A.B.M. Helal Uddin: Curadoria de dados, Redação - Revisão e edição. Yik Ling Chew: Recursos, Redação - Revisão e edição. Phei Er Kee: Visualização, Escrita - Revisão e edição.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo Ministério do Ensino Superior da Malásia (MOHE), Regime de Subvenções à Investigação Fundamental (FRGS) (subvenção n.º: FRGS/1/2021/SKK0/UOC/02/2).

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a todos os actores e instituições envolvidas que nos deram a oportunidade e disponibilizaram as suas instalações para a realização deste estudo.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses relativamente a este trabalho.

References / Referências

- González Peña, O.I., López Zavala, M. Á., & Cabral Ruelas, H. (2021). Pharmaceuticals Market, Consumption Trends and Disease Incidence Are Not Driving the Pharmaceutical Research on Water and Wastewater. *International journal of environmental research and public health*, 18(5), 2523. [10.3390/ijerph18052532](https://doi.org/10.3390/ijerph18052532)
- O'Flaherty, R., Bergin, A., Flampouri, E., Mota, L.M., Obaidi, I., Quigley, A., Xie, Y., & Butler, M. (2020). Mammalian Cell Culture for Production of Recombinant Proteins: A review of the Critical Steps in Their Biomanufacturing. *Biotechnology advances*, 1(43), 107552. [10.1016/j.biotechadv.2020.107552](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552)
- Ghanemi, K., & Yan, S. (2017). Biopharmaceutical Innovation: Benefits and Challenges. *Open access journal of science*, 1(1), 00004. [10.15406/oajs.2017.01.00004](https://doi.org/10.15406/oajs.2017.01.00004)
- Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical Benchmarks 2018. *Nature biotechnology*, 36(12), 1136-45. [10.1038/nbt.4305](https://doi.org/10.1038/nbt.4305)
- Misra, M. (2012). Biosimilars: Current Perspectives and Future Implications. *Indian journal of Pharmacology*, 44(1), 12-14. [10.4103/0253-7613.91859](https://doi.org/10.4103/0253-7613.91859)
- Kesik-Brodacka, M. (2018). Progress in Biopharmaceutical Development. *Biotechnology and applied biochemistry*, 65(3), 306-322. [10.1002/bab.1617](https://doi.org/10.1002/bab.1617)
- Skalko-Basnet, N. (2014). Biologics: The Role of Delivery Systems in Improved Therapy. *Biologics*, 8, 107-114. [10.2147/BTT.S38387](https://doi.org/10.2147/BTT.S38387)
- Mitragotri, S., Burke, P.A., & Langer, R. (2014). Overcoming the Challenges in Administering Biopharmaceuticals: Formulation and Delivery Strategies. *Nature reviews drug discovery*, 13(9), 655-672. [10.1038/nrd4363](https://doi.org/10.1038/nrd4363)
- Gronemeyer, P., Ditz, R., & Strube, J. (2014). Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering (Basel)*, 1(4), 188-212. [10.3390/bioengineering1040188](https://doi.org/10.3390/bioengineering1040188)
- Jozala, A.F., Geraldés, D.C., Tundisi, L.L., Feitosa, V.A., Breyer, C.A., Cardoso, S.L., Mazzola, P.G., de Oliveira-Nascimento, L., de Oliveira Rangel-Yagui, de Oliveira Magalhães, P., de Oliveira, M.A., & Jr A.P. (2016). Biopharmaceuticals from Microorganisms: From Production to Purification. *Brazilian journal of microbiology*, 47 (Suppl 1), 51-63. [10.1016/j.bjm.2016.10.007](https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.007)
- Tavares, A.P.M., Neves, M.C., Trindade, T., & Freire, M.G. (2020). Recovery and Purification of (Bio)Pharmaceuticals Using (Nano) Materials. *Recent advances in analytical techniques*, 4, 58-93. [10.2174/9789811405112120040005](https://doi.org/10.2174/9789811405112120040005)
- Zhang, Z.X., Nong, F.T., Wang, Y.Z., Yan, C.X., Gu, Y., Song, P., & Sun, X.-M. (2022). Strategies for Efficient Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*: Alleviating the Host Burden and Enhancing Protein Activity. *Microbial cell factories*, 21(1), 191. [10.1186/s12934-022-01917-y](https://doi.org/10.1186/s12934-022-01917-y)
- Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y.I., Abraham, N., Li, X.Z., & Zhou, T. (2021). Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 630551. [10.3389/fbioe.2021.630551](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551)
- Baeshen, N.A., Baeshen, M.N., Sheikh, A., Bora, R.S., Ahmed, M.M., Ramadan, H.A., Saini, K.S., & Redwan, E.M. (2014). Cell Factories for Insulin Production. *Microbial cell factories*, 13, 141. [10.1186/s12934-014-0141-0](https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0)
- Hou, J., Tyo, K.E.J., Liu, Z., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2014). Metabolic Engineering of Recombinant Protein Secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 12(5), 491-510. [10.1111/j.1567-1364.2012.00810.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00810.x)
- Polez, S., Origi, D., Zahariev, S., Guarnaccia, C., Tsiminetzky, S.G., Skoko, N., & Baralle, M. (2016). A Simplified and Efficient Process for Insulin Production in *Pichia pastoris*. *PLoS one*, 11(12), e0167207. [10.1371/journal.pone.0167207](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167207)
- Nielsen, J. (2013). Production of Biopharmaceutical Proteins By Yeast: Advances Through Metabolic Engineering. *Bioengineered*, 4(4), 207-211. [10.4161/bioe.22856](https://doi.org/10.4161/bioe.22856)
- Kantargjieff, A., & Zhou, W. (2013). Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing Preface, Advance in biochemical engineering and biotechnology, 139, 1-9. [10.1007/10_2013_255](https://doi.org/10.1007/10_2013_255)
- Dumont, J., Ewart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human Cell Lines for Biopharmaceutical Manufacturing: History, Status, and Future Perspectives. *Critical reviews in biotechnology*. 36(6), 1110-1122. [10.3109/07388551.2015.1084266](https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266)
- Glinšek, K., Bozovičar, K., & Bratkovič, T. (2023). CRISPR Technologies in Chinese Hamster Ovary Cell Line Engineering. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 8144. [10.3390/ijms24098144](https://doi.org/10.3390/ijms24098144)
- Mitra, S., & Tomar, P.C. (2021). Hybridoma Technology; Advancements, Clinical Significance, and Future Aspects. *Journal of genetic engineering and biotechnology*, 19(1), 159. [10.1186/s43141-021-00264-6](https://doi.org/10.1186/s43141-021-00264-6)
- Parray, H.A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., Sharma, C., & Kumar, R. (2020). Hybridoma Technology A Versatile Method for Isolation of Monoclonal Antibodies, Its Applicability Across Species, Limitations, Advancement and Future Perspectives. *International immunopharmacology*, 85, 106639. [10.1016/j.intimp.2020.106639](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639)
- Muyldermans, S., & Smider, V.V. (2016). Distinct Antibody Species: Structural Differences Creating Therapeutic Opportunities. *Current opinion in immunology*, 40, 7-13. [10.1016/j.coi.2016.02.003](https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.02.003)
- Weber, J., Peng, H., & Rader, C. (2017). From Rabbit Antibody Repertoires To Rabbit Monoclonal Antibodies. *Experimental & molecular medicine*, 49(3), e305. [10.1038/emm.2017.23](https://doi.org/10.1038/emm.2017.23)
- Fields, C., Li, P., O'Mahony, J.J. & Lee, G.U. (2016). Advances in Affinity Ligand-Functionalized Nanomaterials for Biomagnetic Separation. *Biotechnology & bioengineering*, 113(1), 11-25. [10.1002/bit.25665](https://doi.org/10.1002/bit.25665)
- Yamaguchi, H., & Miyazaki, M. (2014). Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*, 4(1), 235-251. [10.3390/biom4010235](https://doi.org/10.3390/biom4010235)
- Liu, H.F., Ma, J., Winter, C., & Bayer, R. (2010). Recovery and Purification Process Development for Monoclonal Antibody Production. *MAbs*, 2(5), 480-499. [10.4161/mabs.2.5.12645](https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12645)
- Faria, R.P.V., & Rodrigues, A.E. (2015). Instrumental Aspects of Simulated Moving Bed chromatography. *Journal of chromatography A*, 1421, 82-102. [10.1016/j.chroma.2015.08.045](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.045)
- Rosa, P.A.J., Ferreira, I.F., Azevedo, A.M., & Aires-Barros, M.R. (2010). Aqueous Two-Phase Systems: A Viable Platform in the Manufacturing of Biopharmaceuticals. *Journal of chromatography A*, 1217(16), 2296-2305. [10.1016/j.chroma.2009.11.034](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.034)
- Dutra, G., Komuczki, D., Jungbauer, A., & Satzer, P. (2020). Continuous Capture of Recombinant Antibodies by ZnCl₂ Precipitation Without Polyethylene Glycol. *Engineering in life sciences*, 20(7), 265-274. [10.1002/elsc.201900160](https://doi.org/10.1002/elsc.201900160)
- Burgstaller, D., Jungbauer, A., & Satzer, P. (2019). Continuous Integrated Antibody Precipitation With Two-Stage Tangential Flow Microfiltration Enables Constant Mass Flow. *Biotechnology and bioengineering*, 116(5), 1053-1065. [10.1002/bit.26922](https://doi.org/10.1002/bit.26922)

32. Li, Z., Gu, Q., Coffman, J.L., Przybycien, T., & Zydney, A.L. (2019). Continuous Precipitation For Monoclonal Antibody Capture Using Countercurrent Washing by Microfiltration. *Biotechnology progress*, 235(6), e2886. [10.1002/btpr.2886](https://doi.org/10.1002/btpr.2886)
33. Thakur, G., & Rathore, A.S. (2021). Modelling and Optimization of Single-Pass Tangential Flow Ultrafiltration for Continuous Manufacturing of Monoclonal Antibodies. *Separation and purification technology*, 276, 119341. [10.1016/j.seppur.2021.119341](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119341)
34. Chen, W., Li, X., Guo, M., Link, F.J., Ramli, S.S., Ouyang, J., Rosbottom, I., & Heng, J.Y.Y. (2021). Biopurification of Monoclonal Antibody (mAb) Through Crystallisation. *Separation and purification technology*, 263, 118358. [10.1016/j.seppur.2021.118358](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118358)
35. Kruse, T., Kampmann, M., Rüdell, I., & Greller, G. (2020). An Alternative Downstream Process Based on Aqueous Two-Phase Extraction for the Purification of Monoclonal Antibodies. *Biochemical engineering journal*, 161, 107703. [10.1016/j.bej.2020.107703](https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107703)
36. Ornelas-González, A., Reisenauer, S.U., González-González, M., & Rito-Palomares, M. (2020). Characterization and Optimization of Immunoaffinity Aqueous Two-Phase Systems with PEGylated CD133/2-Biotin Antibody in Route to Stem Cell Separation. *Journal of chemical technology & biotechnology*, 95(1), 123-131. <https://doi.org/10.1002/jctb.6213>
37. Zanker, A.A., Stargardt, P., Kurzbach, S.C., Turrina, C., Mairhofer, J., Schwaminger, S.P., & Borensmeier, C. (2022). Direct Capture and Selective Elution of A Secreted Polyglutamate-tagged Nanobody Using Bare Magnetic Nanoparticles. *Biotechnology journal*, 17(5):2100577. [10.1002/biot.202100577](https://doi.org/10.1002/biot.202100577)
38. Schwaminger, S.P., Blank-Shim, S.A., Scheifele, I., Pipich, V., Fraga-García, P., & Berensmeier, S. (2019). Design of Interactions Between Nanomaterials and Proteins: A Highly Affine Peptide Tag to Bare Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Protein Separation. *Biotechnology journal*, 14(3), 1800055. [10.1002/biot.201800055](https://doi.org/10.1002/biot.201800055)
39. Gerstweiler, L., Bi, J., Middelberg, A.P.J. (2021). Continuous Downstream Bioprocessing for Intensified Manufacture of Biopharmaceuticals and Antibodies. *Chemical engineering science*, 231, 116272. [10.1016/j.ces.2020.116272](https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.116272)
40. Strube, J., Ditz, R., Kornecki, M., Huter, M., Schmidt, A., Thiess, H., & Zobel-Roos, S. (2018). Process Intensification in Biologics Manufacturing. *Chemical engineering and processing - process intensification*, 133, 278-293. [10.1016/j.cep.2018.09.022](https://doi.org/10.1016/j.cep.2018.09.022)
41. Lu, R.-M., Hwang, Y.-C., Liu, I.J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J., & Wu, H.-C. (2020). Development of Therapeutic Antibodies for the Treatment of Diseases. *Journal of biomedical science*, 27(1), 1. [10.1186/s12929-019-0592-z](https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z)
42. Ryman, J.T., & Meibohm, B. (2017). Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 6(9), 576-588. [10.1002/psp4.12224](https://doi.org/10.1002/psp4.12224)
43. Hu, Y., Turner, M.J., Shields, J., Gale, M.S., Hutto, E., Roberts, B.L., Siders, W.M., & Kaplan, J.M. (2009). Investigation of the Mechanism of Action of Alemtuzumab in A Human CD52 Transgenic Mouse Model. *Immunology*, 128(2), 260-270. [10.1111/j.1365-2567.2009.03115.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03115.x)
44. Ramsköld, D., Parodis, I., Lakshminanth, T., Sippl, N., Khademi, M., Chen, Y., Zickert, A., Mikeš, J., Achour, A., Amara, K., Piehl, F., Brodin, P., Gunnarsson, I., & Malmström, V. (2019). B Cell Alterations During BAFF Inhibition With Belimumab in SLE. *EBioMedicine*, 40, 517-527. [10.1016/j.ebiom.2018.12.035](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.035)
45. Ghazi, A., Trikha, A., Calhoun, W.J. (2012). Benralizumab--A Humanized mAb to IL-5Ra With Enhanced Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity--A Novel Approach for the Treatment of Asthma. *Expert opinion biological therapy*, 12(1), 113-118. [10.1517/14712598.2012.642359](https://doi.org/10.1517/14712598.2012.642359)
46. Kuemmerle-Deschner, J.B., & Haug, I. (2013). Canakinumab in Patients With Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome: An Update for Clinicians. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 5(6), 315-329. [10.1177/1759720X13502629](https://doi.org/10.1177/1759720X13502629)
47. Curtis, J.R., Mariette, X., Gaujoux-Viala, C., Blauvelt, A., Kvien, T.K., Sandborn, W.J., Winthrop, K., de Longueville, M., Huybrechts, I., & Bykerk, V.P. (2019). Long-Term Safety of Certolizumab Pegol in Rheumatoid Arthritis, Axial Spondyloarthritis, Psoriatic Arthritis, Psoriasis and Crohn's Disease: A Pooled Analysis of 11 317 Patients Across Clinical Trials. *RMD open*, 5(1), e000942. [10.1136/rmdopen-2019-000942](https://doi.org/10.1136/rmdopen-2019-000942)
48. Demirel Ögüt, N., Koç Yıldırım, S., Erbağcı, E., & Hapa, F.A. (2022). Ixekizumab Treatment in Patients With Moderate-To-Severe Plaque Psoriasis in A Real-World Clinical Setting. *Journal of cosmetic dermatology*, 21(11), 6215-6224. [10.1111/jocd.15217](https://doi.org/10.1111/jocd.15217)
49. Gon, Y., Maruoka, S., & Mizumura, K. (2022). Omalizumab and IgE in the Control of Severe Allergic Asthma. *Frontiers in pharmacology*, 13, 839011. [10.3389/fphar.2022.839011](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.839011)
50. Walsh, G.M. (2013). Profile of Reslizumab in Eosinophilic Disease and Its Potential in the Treatment of Poorly Controlled Eosinophilic Asthma. *Biologics*, 7, 7-11. [10.2147/BTT.S30133](https://doi.org/10.2147/BTT.S30133)
51. Kolbinger, F., Di Padova, F., Deodhar, A., Hawkes, J.E., Huppertz, C., Kuiper, T., McInnes, I.B., Ritchlin, C.T., Rosmarin, D., Schett, G., Carballido, J.M., Häusermann, P., Calonder, C., Vogel, B., Rondeau, J.-M., & Bruin, G. (2022). Secukinumab for the Treatment of Psoriasis, Psoriatic Arthritis, and Axial Spondyloarthritis: Physical and Pharmacological Properties Underlie the Observed Clinical Efficacy and Safety. *Pharmacology & therapeutics*, 229, 107925. [10.1016/j.pharmthera.2021.107925](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107925)
52. Cherry, L.N., Yunker, N.S., Lambert, E.R., Vaughan, D. & Lowe, D.K. (2015). Vedolizumab: An $\alpha\beta7$ Integrin Antagonist for Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Therapeutic advances in chronic disease*, 6(5), 224-233. [10.1177/2040622315586970](https://doi.org/10.1177/2040622315586970)
53. Ameri, A., Tavakoli-Far, B., Rostami, M., Abedi Kiasari, B., Sakhaei, D., Saad Ahmed, O., Forouzani, F., & Fazli, Y. (2022). Recent Advances in Atezolizumab-Based Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade Therapy for Breast Cancer. *International immunopharmacology*, 113(Pt A), 109334. [10.1016/j.intimp.2022.109334](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109334)
54. Hegde, P.S., Jubb, A.M., Chen, D., Li, N.F., Meng, Y.G., Bernaards, C., Elliott, R., Scherer, S.J., & Chen, D.S. (2013). Predictive Impact of Circulating Vascular Endothelial Growth Factor in Four Phase III Trials Evaluating Bevacizumab. *Clinical cancer research*, 19(4), 929-937. [10.1158/1078-0432.CCR-12-2535](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2535)
55. Raedler, L.A. (2016). Darzalex (Daratumumab): First Anti-CD38 Monoclonal Antibody Approved for Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *American health & drug benefits*, 9(Spec Feature), 70-73. [27668047](https://doi.org/10.27668047)
56. Ploessl, C., Pan, A., Maples, K.T., & Lowe, D.K. (2016). Dinutuximab: An Anti-GD2 Monoclonal Antibody for High-Risk Neuroblastoma. *Annals of pharmacotherapy*, 50(5), 416-422. [10.1177/1060028016632013](https://doi.org/10.1177/1060028016632013)
57. Wang, Y., Sanchez, L., Siegel, D.S., & Wang, M.L. (2016). Elotuzumab for the Treatment of Multiple Myeloma. *Journal of hematology & oncology*, 9(1), 55. [10.1186/s13045-016-0284-z](https://doi.org/10.1186/s13045-016-0284-z)
58. Savoia, P., Astrua, C., & Fava, P. (2016). Ipilimumab (Anti-Ctla-4 Mab) in the Treatment of Metastatic Melanoma: Effectiveness and Toxicity Management. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(5), 1092-1101. [10.1080/21645515.2015.1129478](https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1129478)
59. Thakur, M.K. & Wozniak, A.J. (2017). Spotlight on Necitumumab in the Treatment of Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Lung Cancer (Auckl)*, 8, 13-19. [10.2147/LCTT.S104207](https://doi.org/10.2147/LCTT.S104207)
60. Barth, M.J., & Czuczman, M.S. (2013). Ofatumumab: A Novel, Fully Human Anti-CD20 Monoclonal Antibody for the Treatment of

- Chronic Lymphocytic Leukemia. *Future oncology*, 9(12), 1829-1839. [10.2217/fon.13.219](https://doi.org/10.2217/fon.13.219)
61. Burns, M.C., O'Donnell, A., & Puzanov, I. (2016). Pembrolizumab for the Treatment of Advanced Melanoma. *Expert opinion on orphan drugs*, 4(8), 867-873. [10.1080/21678707.2016.1191348](https://doi.org/10.1080/21678707.2016.1191348)
 62. Ross, J.S., & Mulcahy, M. (2011). HER2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Adenocarcinomas: Unique Features of a Familial Test. *Gastrointestinal Cancer Research*, 4(2), 62-66. [10.1152/ajpcell.00650.2009](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00650.2009)
 63. Navalkele, B.D., & Chopra, T. (2018). Bezlotoxumab: An Emerging Monoclonal Antibody Therapy for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Biologics*, 12, 11-21. [10.2147/BTT.S127099](https://doi.org/10.2147/BTT.S127099)
 64. Emu, B., Fessel, J., Schrader, S., Kumar, P., Richmond, G., Win, S., Weinheimer, S., Marsolais, C., & Lewis, S. (2018). Phase 3 Study of Ibalizumab for Multidrug-Resistant HIV-1. *The new England journal of medicine*, 379(7), 645-654. [10.1056/NEJMoa1711460](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1711460)
 65. Liu, X., Li, Y., Li, J., Zhou, J., Guo, J., Pu, Y., Jiang, Y., Zhou, Y., Jiang, Z., Shu, Q., Wang, C., Wang, J., Zhao, Y., Zhao, W., Wang, H., Wei, J., Yu, H., Gao, J., & Li, X. (2023). Comparing Recombinant Human Rabies Monoclonal Antibody (Ormutivimab) With Human Rabies Immunoglobulin (HRIG) for Postexposure Prophylaxis: A Phase III, Randomized, Double-blind, Non-inferiority Trial. *International journal of infectious diseases*, 134, 53-62. [10.1016/j.ijid.2023.05.017](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.05.017)
 66. Kummerfeldt, C.E. (2014). Raxibacumab: Potential Role in the Treatment of Inhalational Anthrax. *Infection and drug resistance*, 7, 101-109. [10.2147/IDR.S47305](https://doi.org/10.2147/IDR.S47305)
 67. Bruno, V., Battaglia, G., & Nicoletti, F. (2011). The Advent of Monoclonal Antibodies in the Treatment of Chronic Autoimmune Diseases. *Neurological Sciences*, 31 Suppl 3, 283-288. [10.1007/s10072-010-0382-6](https://doi.org/10.1007/s10072-010-0382-6)
 68. Ellis, C.R., & Azmat, C.E. (2023). Adalimumab. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.
 69. Zahavi, D., & Weiner, L. (2020). Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)*, 9(3), 34. [10.3390/antib9030034](https://doi.org/10.3390/antib9030034)
 70. Castelli, M.S., McGonigle, P., & Hornby, P.J. (2019). The Pharmacology and Therapeutic Applications of Monoclonal Antibodies. *Pharmacology research & perspective*, 7(6), e00535. [10.1002/prp2.535](https://doi.org/10.1002/prp2.535)
 71. Lee, J.Y., Lee, H.T., Shin, W., Chae, J., Choi, J., Kim, S.H., Lim, H., Heo, T.W., Park, K.Y., Lee, Y.J., Ryu, S.E., Son, J.Y., Lee, J.U., & Heo, Y.-S. (2016). Structural Basis of Checkpoint Blockade by Monoclonal Antibodies in Cancer Immunotherapy. *Nature communications*, 7(1), 13354. [10.1038/ncomms13354](https://doi.org/10.1038/ncomms13354)
 72. Rogovik, A.L., Carleton, B., Solimano, A., & Goldman, R.D. (2010). Palivizumab for the prevention of respiratory syncytial virus infection. *Canadian family physician*, 56(8), 769-772.
 73. Aditya, S., & Rattan, A. (2023). Advances in CGRP Monoclonal Antibodies as Migraine Therapy: A Narrative Review. *Saudi journal of medicine & medical sciences*, 11(1), 11-18. [10.4103/sjms.sjms_95_22](https://doi.org/10.4103/sjms.sjms_95_22)
 74. Li, M. (2018). Enzyme Replacement Therapy: A Review and Its Role in Treating Lysosomal Storage Diseases. *Pediatric Annals*, 47(5), e191-e197. [10.3928/19382359-20180424-01](https://doi.org/10.3928/19382359-20180424-01)
 75. Vachher, M., Sen, A., Kapila, R., & Nigam, A. (2021). Microbial Therapeutic Enzymes: A Promising Area of Biopharmaceuticals. *Current research in biotechnology*, 3, 195-208. [10.1016/j.crbiot.2021.05.006](https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.05.006)
 76. Yari, M., Ghoshoon, M.B., Vakili, B., & Ghasemi, Y. (2017). Therapeutic Enzymes: Applications and Approaches to Pharmacological Improvement. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18(7), 531-540. [10.2174/1389201018666170808150742](https://doi.org/10.2174/1389201018666170808150742)
 77. Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *Biomed research international*, 2013, 329121. [10.1155/2013/329121](https://doi.org/10.1155/2013/329121)
 78. Tiwari, M. (2017). The Role of Serratiopeptidase in the Resolution of Inflammation. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 12(3), 209-215. [10.1016/j.ajps.2017.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.01.003)
 79. Jadhav, S.B., Shah, N., Rathi, A., Rathi, V., & Rathi, A. (2020). Serratiopeptidase: Insights into the Therapeutic Applications. *Biotechnol reports*, 28, e00544. [10.1016/j.btre.2020.e00544](https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00544)
 80. Ünlü, A.E., & Takaç, S. Improvement of Superoxide Dismutase Activity Using Experimental Design and Radical Promoters. *Biotechnology & biotechnological equipment*, 31(5), 1046-1054. [10.1080/13102818.2017.1353923](https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1353923)
 81. Ghose, C., & Euler, C.W. (2020). Gram-Negative Bacterial Lysins. *Antibiotics (Basel)*, 9(2), 74. [10.3390/antibiotics9020074](https://doi.org/10.3390/antibiotics9020074)
 82. Rodríguez-Cerrato, V., García, P., Huelves, L., García, E., Del Prado, G., Gracia, M., Ponte, C., López, R., & Soriano, F. (2007). Pneumococcal LytA Autolysin: A Potent Therapeutic Agent in Experimental Peritonitis-Sepsis Caused by Highly Beta-Lactam-Resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), 3371-3373. [10.1128/AAC.00137-07](https://doi.org/10.1128/AAC.00137-07)
 83. Nawaz, N., Wen, S., Wang, F., Nawaz, S., Raza, J., Iftikhar, M., & Usman, M. (2022). Lysozyme and Its Application as Antibacterial Agent in Food Industry. *Molecules*, 27(19), 6305. [10.3390/molecules27196305](https://doi.org/10.3390/molecules27196305)
 84. Gil-Montoya, J.A., Guardia-López, I., & González-Moles, M.A. (2008). Evaluation of the Clinical Efficacy of A Mouthwash And Oral Gel Containing the Antimicrobial Proteins Lactoperoxidase, Lysozyme and Lactoferrin in Elderly Patients with Dry Mouth – A Pilot Study. *Gerodontology*, 25(1), 3-9. [10.1111/j.1741-2358.2007.00197.x](https://doi.org/10.1111/j.1741-2358.2007.00197.x)
 85. Chen, Q., Li, W., Wang, J., Qu, X., & Wang, G. (2018). Lysozyme-Antimicrobial Peptide Fusion Protein Promotes the Diabetic Wound Size Reduction in Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Rats. *Medical science monitor*, 24, 8449-8458. [10.12659/MSM.912596](https://doi.org/10.12659/MSM.912596)
 86. Altaf, F., Wu, S., & Kasim, V. (2021). Role of Fibrinolytic Enzymes in Anti-Thrombosis Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 680397. [10.3389/fmolb.2021.680397](https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.680397)
 87. Chen, H., McGowan, E.M., Ren, N., Lal, S., Nassif, N., Shad-Kaneez, F., Qu, X., & Lin, Y. (2018). Nattokinase: A Promising Alternative in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases. *Biomark Insights*, 13, 1177271918785130. [10.1177/1177271918785130](https://doi.org/10.1177/1177271918785130)
 88. Kurosawa, Y., Nirengi, S., Homma, T., Esaki, K., Ohta, M., Clark, J.F., Hamaoka, T. (2015). A Single-Dose of Oral Nattokinase Potentiates Thrombolysis and Anti-Coagulation Profiles. *Scientific reports*, 5(1), 11601. [10.1038/srep11601](https://doi.org/10.1038/srep11601)
 89. Ghattas, M., Dwivedi, G., Lavertu, M., & Alameh, M.G. (2021). Vaccine Technologies and Platforms for Infectious Diseases: Current Progress, Challenges, and Opportunities. *Vaccines (Basel)*, 9(12), 1490. [10.3390/vaccines9121490](https://doi.org/10.3390/vaccines9121490)
 90. Kayser, V., & Ramzan, I. (2021). Vaccines and Vaccination: History and Emerging Issues. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 17(12), 5255-5268. [10.1080/21645515.2021.1977057](https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1977057)
 91. Saxena, M., van der Burg, S.H., Melief, C.J.M., & Bhardwaj, N. (2021). Therapeutic Cancer Vaccines. *Nature reviews cancer*, 21(6), 360-378. [10.1038/s41568-021-00346-0](https://doi.org/10.1038/s41568-021-00346-0)
 92. Aldossary, A.M., Ekweremadu, C.S.M., Offe, I.M., Alfassam, H.A., Han, S., Onyali, V.C., Ozoude, C.H., Ayeni, E.A., Nwagwu, C.S., Halwani, A.A., Almozain, N.H., & Tawfil, E.A. (2022). A Guide to Oral Vaccination: Highlighting Electrospraying as A Promising Manufacturing Technique Toward a Successful Oral Vaccine Development. *Saudi pharmaceutical journal*, 30(6), 655-668. [10.1016/j.jsps.2022.03.010](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.03.010)
 93. Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z.S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A.J., & Ahmadian, G. (2021). Virus-Like Particles:

- Preparation, Immunogenicity and Their Roles as Nanovaccines and Drug Nanocarriers. *Journal of nanobiotechnology*, 19(1), 59. [10.1186/s12951-021-00806-7](https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7)
94. Milligan, R., Paul, M., Richardson, M., & Neuberger, A. (2018). Vaccines for Preventing Typhoid Fever. *Cochrane database of systematic reviews*, 5(5), Cd001261. [10.1002/14651858.CD001261.pub4](https://doi.org/10.1002/14651858.CD001261.pub4)
95. Clark, S.A., & Borrow, R. (2020). Herd Protection against Meningococcal Disease through Vaccination. *Microorganisms*, 8(11), 1675. [10.3390/microorganisms8111675](https://doi.org/10.3390/microorganisms8111675)
96. Daniels, C.C., Rogers, P.D., & Shelton, C.M. (2016). A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics*, 21(1), 27-35. [10.5863/1551-6776-21.1.27](https://doi.org/10.5863/1551-6776-21.1.27)
97. Wang, S., Liang, B., Wang, W., Li, L., Feng, N., Zhao, Y., Wang, T., Yan, F., Yang, S., & Xia, Z. (2023). Viral Vected Vaccines: Design, Development, Preventive and Therapeutic Applications in Human Diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 149. [10.1038/s41392-023-01408-5](https://doi.org/10.1038/s41392-023-01408-5)
98. Silveira, M.M., Moreira, G.M.S.G., & Mendonça, M. (2021). DNA Vaccines Against COVID-19: Perspectives and Challenges. *Life sciences*, 267, 118919. [10.1016/j.lfs.2020.118919](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118919)
99. Hoang, D.M., Pham, P.T., Bach, T.Q., Ngo, A.T.L., Nguyen, Q.T., Phan, T.T.K., Nguyen, G.H., Le, P.T.T., Hoang, V.T., Forsyth, N.R., Heke, M., & Nguyen, L.T. (2022). Stem Cell-Based Therapy for Human Diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 272. [10.1038/s41392-022-01134-4](https://doi.org/10.1038/s41392-022-01134-4)
100. Cabral, J.M.S., da Silva, C.L., & Diogo, M.M. (2020). Stem Cell Bioprocessing and Manufacturing. *Bioengineering (Basel)*, 7(3), 84. [10.3390/bioengineering7030084](https://doi.org/10.3390/bioengineering7030084)
101. Jin, Y., Li, S., Yu, Q., Chen, T., & Liu, D. (2020). Application of Stem Cells in Regeneration Medicine. *MedComm*, 4(4), e291. [10.1002/mco2.291](https://doi.org/10.1002/mco2.291)
102. Wang, J., Sun, M., Liu, W., Li, Y., & Li, M. (2019). Stem Cell-Based Therapies for Liver Diseases: An Overview and Update. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 16(2), 107-118. [10.1007/s13770-019-00178-y](https://doi.org/10.1007/s13770-019-00178-y)
103. Li, L., Ngo, H.T.T., Hwang, E., Wei, X., Liu, Y., Liu, J., & Yi, T.-H. (2019). Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents UVB-Induced Skin Aging in Human Keratinocytes and Dermal Fibroblasts. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 49. [10.3390/ijms21010049](https://doi.org/10.3390/ijms21010049)
104. Rezaei, M., & Zarkesh-Esfahani, S.H. (2012). Optimization of Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Escherichia coli*. *Journal of research in medical sciences*, 17(7), 681-685. [PMC3685787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23685787/)
105. Gilpin, D.A., Barrow, R.E., Rutan, R.L., Broemeling, L., & Herndon, D.N. (1994). Recombinant Human Growth Hormone Accelerates Wound Healing in Children With Large Cutaneous Burns. *Annals of surgery*, 220(1), 19-24. [10.1097/0000658-199407000-00004](https://doi.org/10.1097/0000658-199407000-00004)
106. Rigi, G., Rostami, A., Ghomi, H., Ahmadian, G., Mirbagheri, V.S., Jeiranikhameneh, M., Vahed, M., & Rahimi, S. (2021). Optimization of Expression, Purification and Secretion of Functional Recombinant Human Growth Hormone in *Escherichia coli* Using Modified Staphylococcal Protein A Signal Peptide. *BMC biotechnology*, 21(1), 51. [10.1186/s12896-021-00701-x](https://doi.org/10.1186/s12896-021-00701-x)
107. Annerén, G., Tuvemo, T., Carlsson-Skwirut, C., Lönnnerholm, T., Bang, P., Sara, V.R., & Gustafsson, J. (1999). Growth Hormone Treatment in Young Children With Down's Syndrome: Effects on Growth and Psychomotor Development. *Archives of disease in childhood*, 80(4), 334-338. [10.1136/adc.80.4.334](https://doi.org/10.1136/adc.80.4.334)
108. Frokjaer, S., & Otzen, D.E. (2015). Protein Drug Stability: A Formulation Challenge. *Nature reviews drug discovery*, 4(4), 298-306. [10.1038/nrd1695](https://doi.org/10.1038/nrd1695)
109. Lipiäinen, T., Peltoniemi, M., Sarkhel, S., Yrjönen, T., Vuorela, H., Urtti, A., & Juppo, A. (2015). Formulation and Stability of Cytokine Therapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(2), 307-326. [10.1002/jps.24243](https://doi.org/10.1002/jps.24243)
110. Murer, P., & Neri, D. (2019). Antibody-Cytokine Fusion Proteins: A Novel Class of Biopharmaceuticals for the Therapy of Cancer and of Chronic Inflammation. *New biotechnology*, 52, 42-53. [10.1016/j.nbt.2019.04.002](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.04.002)
111. Arenas-Ramirez, N., Woytschak, J., & Boyman, O. (2015). Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends in immunology*, 36(12), 763-777. [10.1016/j.it.2015.10.003](https://doi.org/10.1016/j.it.2015.10.003)
112. Wang, X., & Lin, Y. (2008). Tumor Necrosis Factor and Cancer, Buddies or Foes? *Acta pharmacologica sinica*, 29(11), 1275-1288. [10.1111/j.1745-7254.2008.00889.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00889.x)
113. Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the Regulation of Innate Resistance and Adaptive Immunity. *Nature reviews immunology*, 3(2), 133-146. [10.1038/nri1001](https://doi.org/10.1038/nri1001)
114. Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B.K. (2018). Interferon-Gamma (IFN-γ): Exploring Its Implications in Infectious Diseases. *Biomolecular concepts*, 9(1), 64-79. [10.1515/bmc-2018-0007](https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0007)
115. Shaldzhyan, A., Zabrodskaya, Y., Yolshin, N., Kudling, T., Lozhkov, A., Plotnikova, M., Ramsay, E., Taraskin, A., Nekrasov, P., Grudin, M., & Vasin, A. (2021). Clean and Folded: Production of Active, High Quality Recombinant Human Interferon-λ1. *Process biochemistry*, 111, 32-39. [10.1016/j.procbio.2021.08.029](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.08.029)
116. Hermant, P., & Michiels, T. (2014). Interferon-λ in the Context of Viral Infections: Production, Response and Therapeutic Implications. *Journal of innate immunity*, 6(5), 563-574. [10.1159/000360084](https://doi.org/10.1159/000360084)
117. Ido, A., Numata, M., Kodama, M., Tsubouchi, H. (2005). Mucosal Repair and Growth Factors: Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor as An Innovative Therapy for Inflammatory Bowel Disease. *Journal of gastroenterology*, 40(10), 925-931. [10.1007/s00535-005-1705-x](https://doi.org/10.1007/s00535-005-1705-x)
118. Henry, T.D., Rocha-Singh, K., Isner, J.M., Kereiakes, D.J., Giordano, F.J., Simons, M., Losordo, D.W., Hendel, R.C., Bonow, R.O., Eppler, S.M., Zioncheck, T.F., Holmgren, E.B., & McCluskey, E.R. (2001). Intracoronary Administration of Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor to Patients With Coronary Artery Disease. *American heart journal*, 142(5), 872-880. [10.1067/mhj.2001.118471](https://doi.org/10.1067/mhj.2001.118471)
119. Simons, M., Annex, B.H., Laham, R.J., Kleiman, N., Henry, T., Dauerman, Udelson, J.E., Gervino, E.V., Pike, M., Whitehouse, M.J., Moon, T., & Chronos, N.A. (2002). Pharmacological Treatment of Coronary Artery Disease With Recombinant Fibroblast Growth Factor-2. *Circulation*, 105(7), 788-793. [10.1161/hc0802.104407](https://doi.org/10.1161/hc0802.104407)
120. Ivan, D.C., Berve, K.C., Walthert, S., Monaco, G., Borst, K., Bouillet, E., Ferreira, F., Lee, H., Steudler, J., Buch, T., Prinz, M., Engelhardt, B., & Locatelli, G. (2023). Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Controls the Function of CNS-Resident Macrophages and Their Contribution to Neuroinflammation. *Acta neuropathologica communications*, 11(1), 35. [10.1186/s40478-023-01535-8](https://doi.org/10.1186/s40478-023-01535-8)
121. Yamakawa S, & Hayashida K. (2019). Advances in Surgical Applications of Growth Factors for Wound Healing. *Burns & trauma*, 7(1), 10. [10.1186/s41038-019-0148-1](https://doi.org/10.1186/s41038-019-0148-1)

122. Park, J.W., Hwang, S.R., & Yoon, I.S. (2017). Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules*, 22(8), 1259. [10.3390/molecules22081259](https://doi.org/10.3390/molecules22081259)
123. Ingle, R.G., & Fang, W.J. (2023). An Overview of the Stability and Delivery Challenges of Commercial Nucleic Acid Therapeutics. *Pharmaceutics*, 15(4), 1158. [10.3390/pharmaceutics15041158](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041158)
124. Baker, D.E., & Demaris, K. (2016). Defibrotide. *Hospital pharmacy*, 51(10), 847-854. [10.1310/hpj5110-847](https://doi.org/10.1310/hpj5110-847)
125. Chambergo-Michilot, D., Alur, A., Kulkarni, S., & Agarwala, A. Mipomersen in Familial Hypercholesterolemia: An Update on Health-Related Quality of Life and Patient-Reported Outcomes. *Vascular health and risk management*, 18, 73-80. [10.2147/VHRM.S191965](https://doi.org/10.2147/VHRM.S191965)
126. Vinores, S.A. (2006). Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration. *International journal of nanomedicine*, 1(3), 263-268. [17717967](https://doi.org/10.17717967)
127. Wilton-Clark, H., & Yokota, T. (2021). Casimersen for Duchenne Muscular Dystrophy. *Drugs today (Barc)*, 57(12), 707-717. [10.1358/dot.2021.57.12.3352740](https://doi.org/10.1358/dot.2021.57.12.3352740)
128. Robinson, C., Pham, C., Zamarripa, A.M., Dugay, C.S., Lee, C.A., Berger, A.A., Landman, A., Cornett, E.M., Kassem, H., Kaye, A.D., Urits, I., Viswanath, O., & Ganti, L. (2022). Inotersen to Treat Polyneuropathy Associated with Hereditary Transthyretin (hATTR) Amyloidosis. *Health psychology research*, 10(5), 67910. [10.52965/001c.67910](https://doi.org/10.52965/001c.67910)
129. Errico, F., Marino, C., Grimaldi, M., Nuzzo, T., Bassareo, V., Valsecchi, V., Panicucci, C., Schiavi, E.D., Mazza, T., Bruno, C., D'Amico, A., Carta, M., D'Ursi, A.M., Bertini, E., Pellizzoni, L., & Usiello, A. (2022). Nusinersen Induces Disease-Severity-Specific Neurometabolic Effects in Spinal Muscular Atrophy. *Biomolecules*, 12(10), 1431. [10.3390/biom12101431](https://doi.org/10.3390/biom12101431)
130. Witztum, J.L., Gaudet, D., Freedman, S.D., Alexander, V.J., Digenio, A., Williams, K.R., Yang, Q., Hughes, S.G., Geary, R.S., Arca, M., Stroes, E.S.G., Bergeron, J., Soran, H., Civeira, F., Hemphill, L., Tsimikas, S., Blom, D.J., O'Dea, L., & Bruckert, E. (2019). Volanesorsen and Triglyceride Levels in Familial Chylomicronemia Syndrome. *The new England journal of medicine*, 381(6), 531-542. [10.1056/NEJMoa1715944](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1715944)
131. Yasuda, M., & Keel, S., & Balwani, M. (2023). RNA Interference Therapy in Acute Hepatic Porphyrins. *Blood*, 142(19), 1589-1599. [10.1182/blood.2022018662](https://doi.org/10.1182/blood.2022018662)
132. Cupido, A.J., & Kastelein, J.J.P. (2020). Inclisiran for the Treatment of Hypercholesterolaemia: Implications and Unanswered Questions from the ORION Trials. *Cardiovascular research*, 116(11), e136-e139. [10.1093/cvr/cvaa212](https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa212)
133. Scott, L.J., & Keam, S.J. (2021). Lumasiran: First Approval. *Drugs*, 81(2), 277-282. [10.1007/s40265-020-01463-0](https://doi.org/10.1007/s40265-020-01463-0)
134. Adams, D., Tournev, I.L., Taylor, M.S., Coelho, T., Planté-Bordeneuve, V., Berk, J.L., González-Duarte, A., Gillmore, J.D., Low, S.-C., Sekijima, Y., Obici, L., Chen, C., Badri, P., Arum, S.M., Vest, J., & Polydefkis, M. Efficacy and Safety of Vutrisiran for Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis With Polyneuropathy: A Randomized Clinical Trial. *Amyloid*, 30(1), 1-9. [10.1080/13506129.2022.2091985](https://doi.org/10.1080/13506129.2022.2091985)
135. Weng, Y., Li, C., Yang, T., Hu, B., Zhang, M., Guo, S., Xiao, H., Liang, X.-J., & Huang, Y. (2020). The Challenge and Prospect of mRNA Therapeutics Landscape. *Biotechnology advances*, 40, 107534. [10.1016/j.biotechadv.2020.107534](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107534)
136. Yang, Y., Qin, Z., Zeng, W., Yang, T., Cao, Y., Mei, C., & Kuang, Y. (2016). Toxicity Assessment of Nanoparticles in Various Systems and Organs. *Nanotechnology reviews*, 6(3), 279-289. [10.1515/ntrev-2016-0047](https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0047)
137. Thi, T.T.H., Suys, E.J.A., Lee, J.S., Nguyen, D.H., Park, K.D., & Truong, N.P. Lipid-Based Nanoparticles in the Clinic and Clinical Trials: From Cancer Nanomedicine to COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel)*, 9(4), 359. [10.3390/vaccines9040359](https://doi.org/10.3390/vaccines9040359)
138. Wang, J., Zhang, Y., Lu, Q., Xing, D., & Zhang, R. (2021). Exploring Carbohydrates for Therapeutics: A Review on Future Directions. *Frontiers in pharmacology*, 12, 756724. [10.3389/fphar.2021.756724](https://doi.org/10.3389/fphar.2021.756724)
139. Tovar, A.M.F., Santos, G.R.C., Capillé, N.V., Piquet, A.A., Glauser, B.F., Pereira, M.S., Vilanova, E., & Mourão, P.A.S. (2016). Structural and Haemostatic Features of Pharmaceutical Heparins from Different Animal Sources: Challenges to Define Thresholds Separating Distinct Drugs. *Scientific reports*, 6(1), 35619. [10.1038/srep35619](https://doi.org/10.1038/srep35619)
140. Bae, S.H., Kim, M.R. (2020). Subtype Classification of Functional Constipation in Children: Polyethylene Glycol Versus Lactulose. *Pediatrics international*, 62(7), 816-819. [10.1111/ped.14235](https://doi.org/10.1111/ped.14235)
141. Ben-Haim, S., & Ell, P. (2009). 18F-FDG PET and PET/CT in the Evaluation of Cancer Treatment Response. *Journal of nuclear medicine*, 50(1), 88-99. [10.2967/jnumed.108.054205](https://doi.org/10.2967/jnumed.108.054205)
142. Bensinger, S.J., & Christofk, H.R. (2012). New Aspects of the Warburg Effect in Cancer Cell Biology. *Seminars in cell & developmental biology*, 23(4), 352-361. [10.1016/j.semcdb.2012.02.003](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.02.003)
143. Lenci, E., & Trabocchi, A. (2020). Peptidomimetic Toolbox for Drug Discovery. *Chemical society reviews*, 49(11), 3262-3277. [10.1039/D0CS00102C](https://doi.org/10.1039/D0CS00102C)
144. Mettu, R., Chen, C.-Y., & Wu, C.-Y. (2020). Synthetic Carbohydrate-Based Vaccines: Challenges and Opportunities. *Journal of biomedical science*, 27(1), 9. [10.1186/s12929-019-0591-0](https://doi.org/10.1186/s12929-019-0591-0)
145. Delorme, V., Lichon, L., Mahindad, H., Hunger, S., Laroui, N., Daurat, M., Godefroy, A., Coudane, J., Gary-Bobo, M., & Berghe, H.V.D. (2020). Reverse Poly(ε-caprolactone)-g-dextran Graft Copolymers. Nano-Carriers for Intracellular Uptake of Anticancer Drugs. *Carbohydrate polymers*, 232, 115764. [10.1016/j.carbpol.2019.115764](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115764)
146. Yang, O., Qadan, M., & Ierapetritou, M. (2019). Economic Analysis of Batch and Continuous Biopharmaceutical Antibody Production: A Review. *Journal of pharmaceutical innovation*, 14, 1-19. [10.1007/s12247-018-09370-4](https://doi.org/10.1007/s12247-018-09370-4)
147. Van Norman, G.A. (2019). Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach? *JACC: basic to translational science*, 4(7), 845-854. [10.1016/j.jacbts.2019.10.008](https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.10.008)