



BIOLOGIA SINTÉTICA: APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Acad. Marco Antonio Stephano
stephano@usp.br

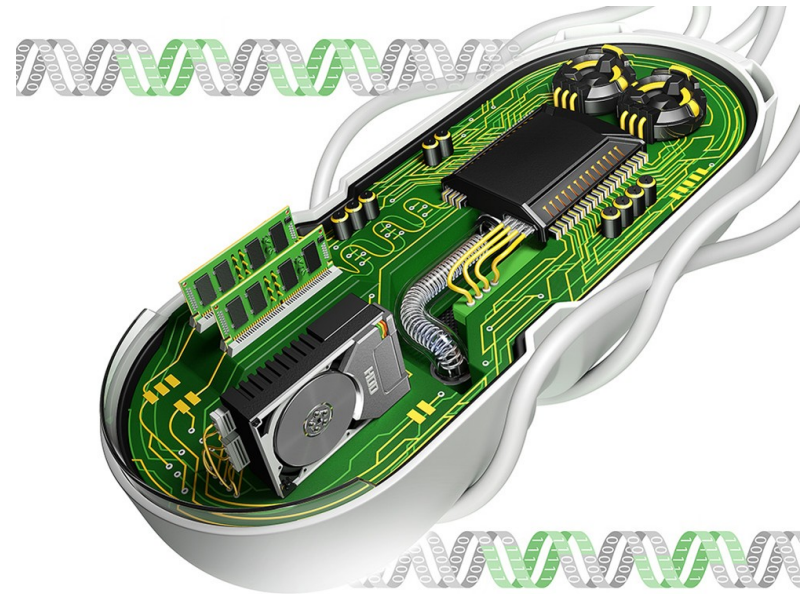


Introdução

Biologia sintética

É um novo campo da Ciência que envolve o conhecimento dos princípios de engenharia para os componentes fundamentais da biologia .

Todos os organismos tem códigos que determinam como se parecem e o que fazem. Este código se chama DNA ou código genético.



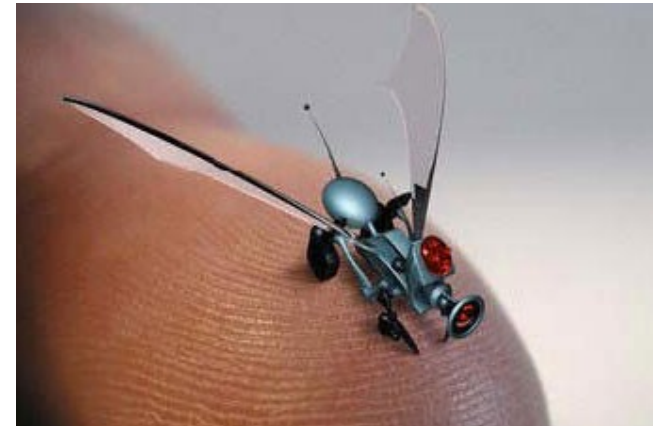


Introdução

Biologia sintética

Ao combinar os avanços das tecnologias de manipulação do DNA com os princípios da engenharia moderna tornou possível o uso de computadores, substâncias químicas e organélas para produzir diferentes materiais e substâncias.

Como a produção de dispositivos para diagnóstico e aplicações em saúde, novas terapias e novos fármacos. Esta é a base da biologia sintética na área farmacêutica.





Definições

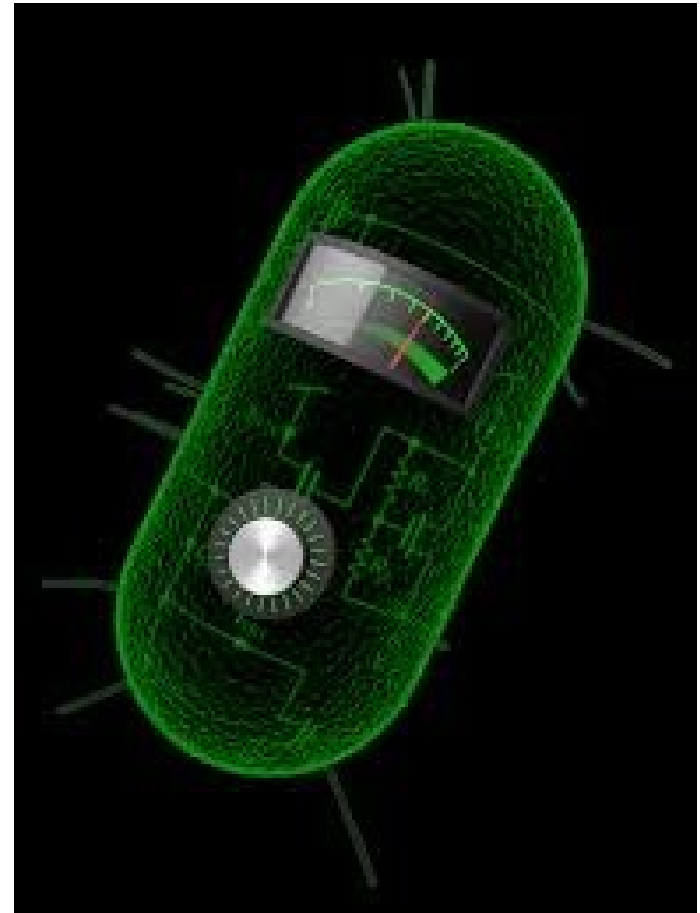
Biologia Sintética

A Biologia Sintética é: a) a concepção e construções de novas partes da biologia; b) é o uma nova concepção dos sistemas biológicos existentes para fins de aplicação.

<http://syntheticbiology.org/>

A biologia sintética é uma área emergente da pesquisa que pode ser genericamente descrita como a concepção e construção de novas vias biológicas artificiais, novos organismos ou dispositivos, ou ainda redesenho dos sistemas biológicos naturais existentes.

<https://royalsociety.org/>





Definições

Biologia Sintética

A biologia sintética é uma disciplina científica que combina a ciência biológica e a engenharia, a fim de projetar e construir novas funções e sistemas biológicos. Isso inclui a concepção e construção de novas peças biológicas, dispositivos e sistemas.

<http://www.synberc.org/>

A biologia sintética é a engenharia da biologia: a síntese de complexo, de base biológica (ou inspirados), sistemas em que a funções não se visualize na natureza. Esta perspectiva de engenharia podem ser aplicada em todos os níveis da hierarquia de estruturas biológicas - a partir de moléculas individuais de células inteiras, tecidos e organismos. Em essência, a biologia sintética irá permitir a concepção de "sistemas biológicos" de uma forma racional e sistemática.

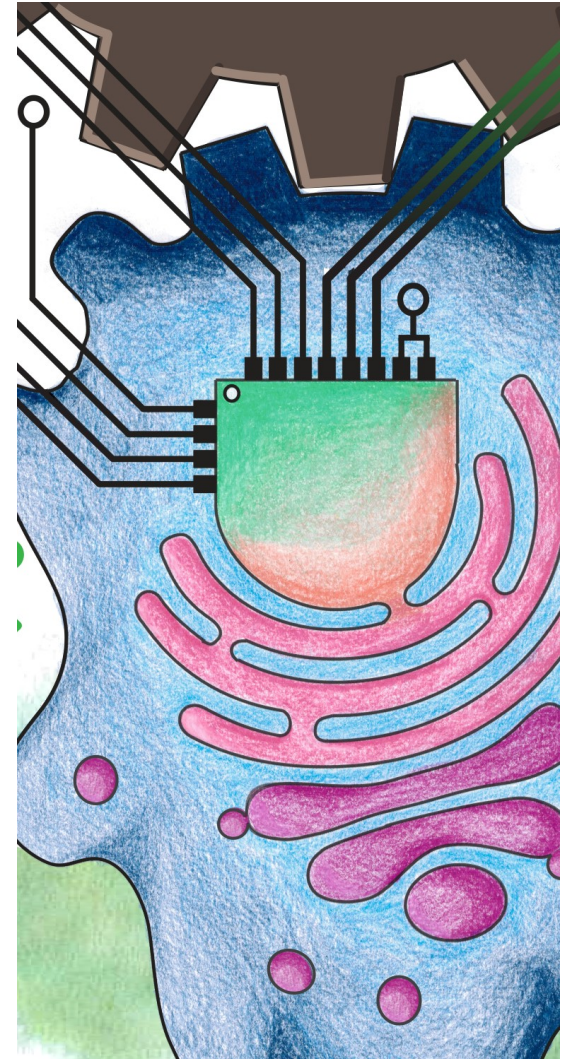
<http://www.synbiosafe.eu/>



Definições

Biologia Sintética

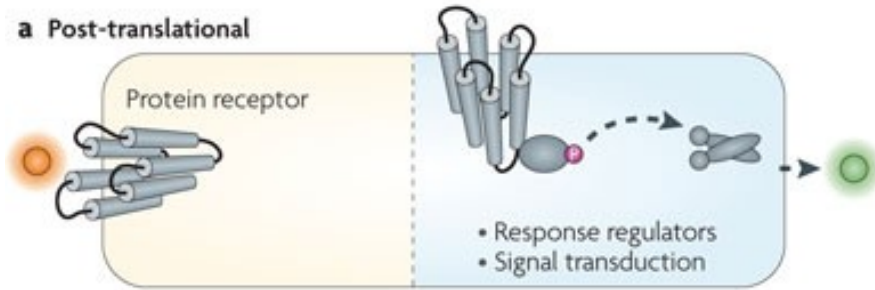
Através desse princípio, é possível redesenhar os sistemas biológicos por meio da modificação e recombinação de elementos genéticos já existentes e pela criação de partes genéticas inteiramente novas. Ela é capaz de usar um repertório de partes biomoleculares compiladas durante esses 50 anos de pesquisa em biologia molecular e genômica funcional, juntamente com a tecnologia que possibilitou analisar, sintetizar, juntar, modificar e transferir componentes genéticos para dentro de organismos vivos



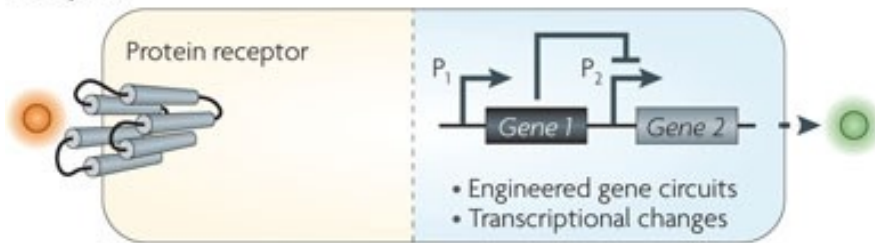
Design principle



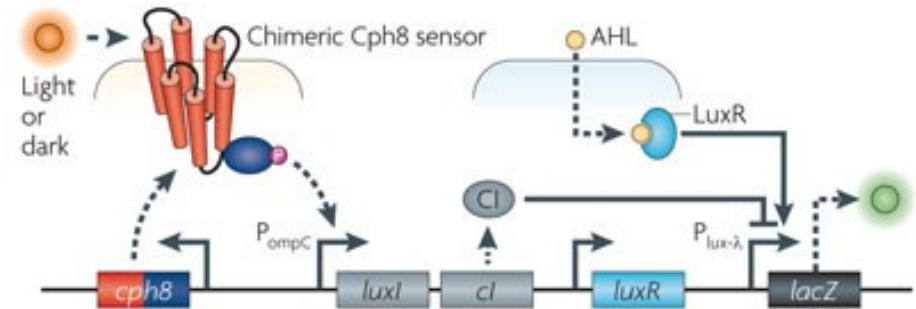
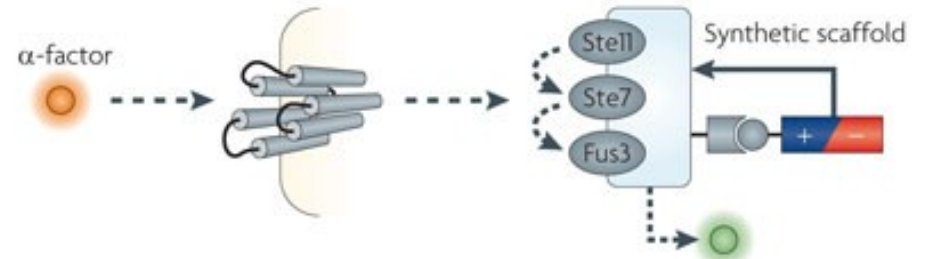
a Post-translational



b Hybrid

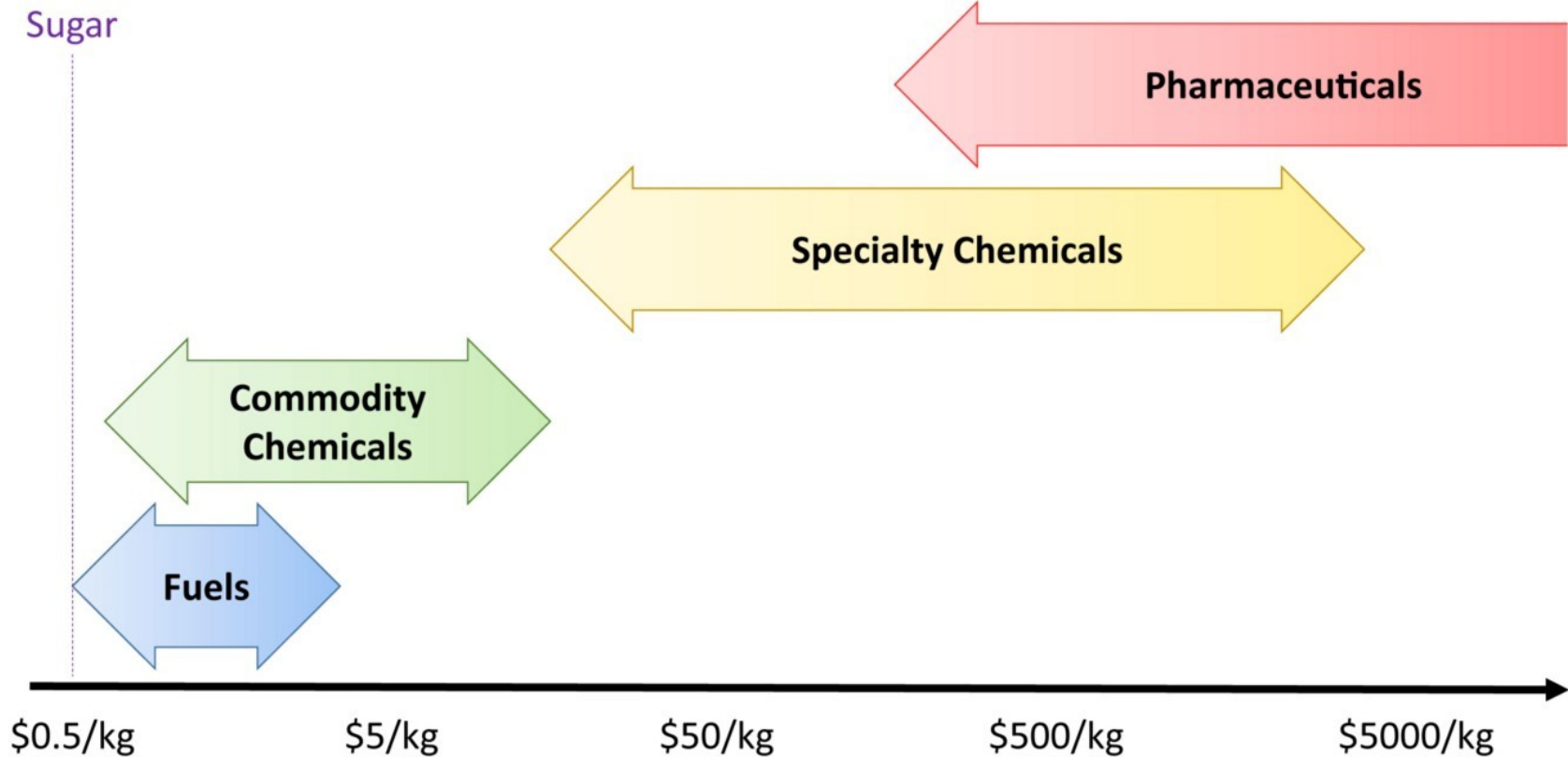


Biosensor example





Carbon Value Chain





BIOLOGIA SINTÉTICA: APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA



Biologia Sintética

Com Aplicação Farmacêutica



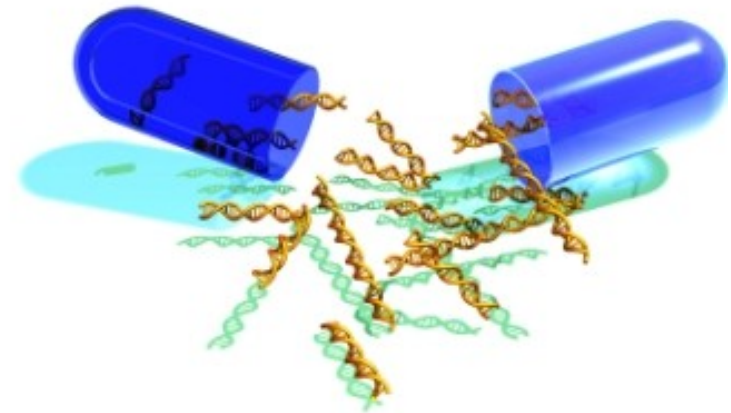
Biologia Sintética

Aplicação Farmacêutica

As principais aplicações da biologia sintética no contexto farmacêutico estão relacionadas a: 1º) fármacos inteligentes (smart drug), 2º) Complexo molecular para regeneração de tecido; 3º) Sistema biológico de fornecimento, vetores para terapia e medicamentos personalizados.

Hoje iremos contextualizar apenas os fármacos inteligentes.

Neste caso: Aptâmeros, Peptídeos e Síntese de Proteína Cell-Free.



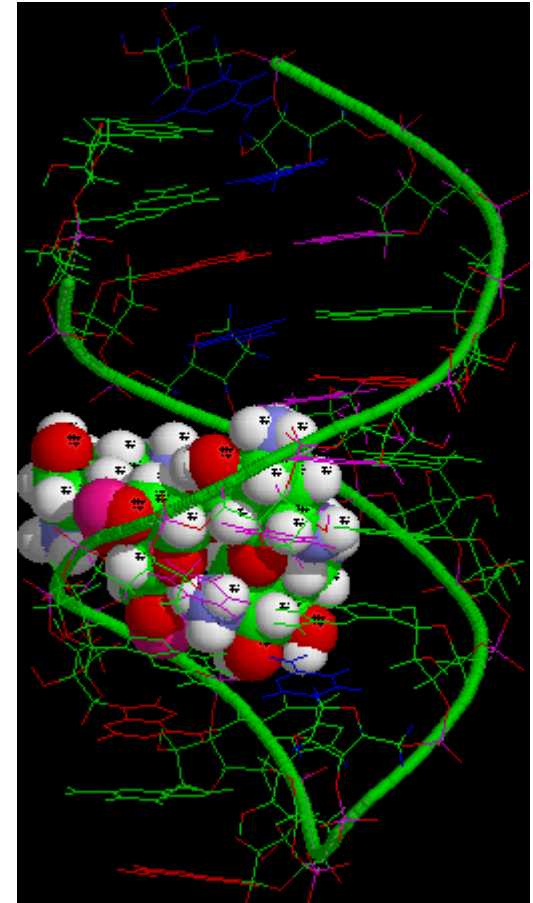


Aptâmeros



Aptâmeros

- O termo Aptâmero é derivado da palavra grega “apto”, que significa “ajuste” e “mero” que significa “parte”.
- Aptâmeros são RNA ou DNA de fita simples ou dupla, selecionados para alta afinidade e especificidade contra alvos de interesse.
- Aptâmeros são selecionados a partir de vastas bibliotecas de moléculas (10^{15} ligantes) em um processo evolutivo que permite a maturação do ligante para alcançar as características desejadas de ligação.





Aptâmeros

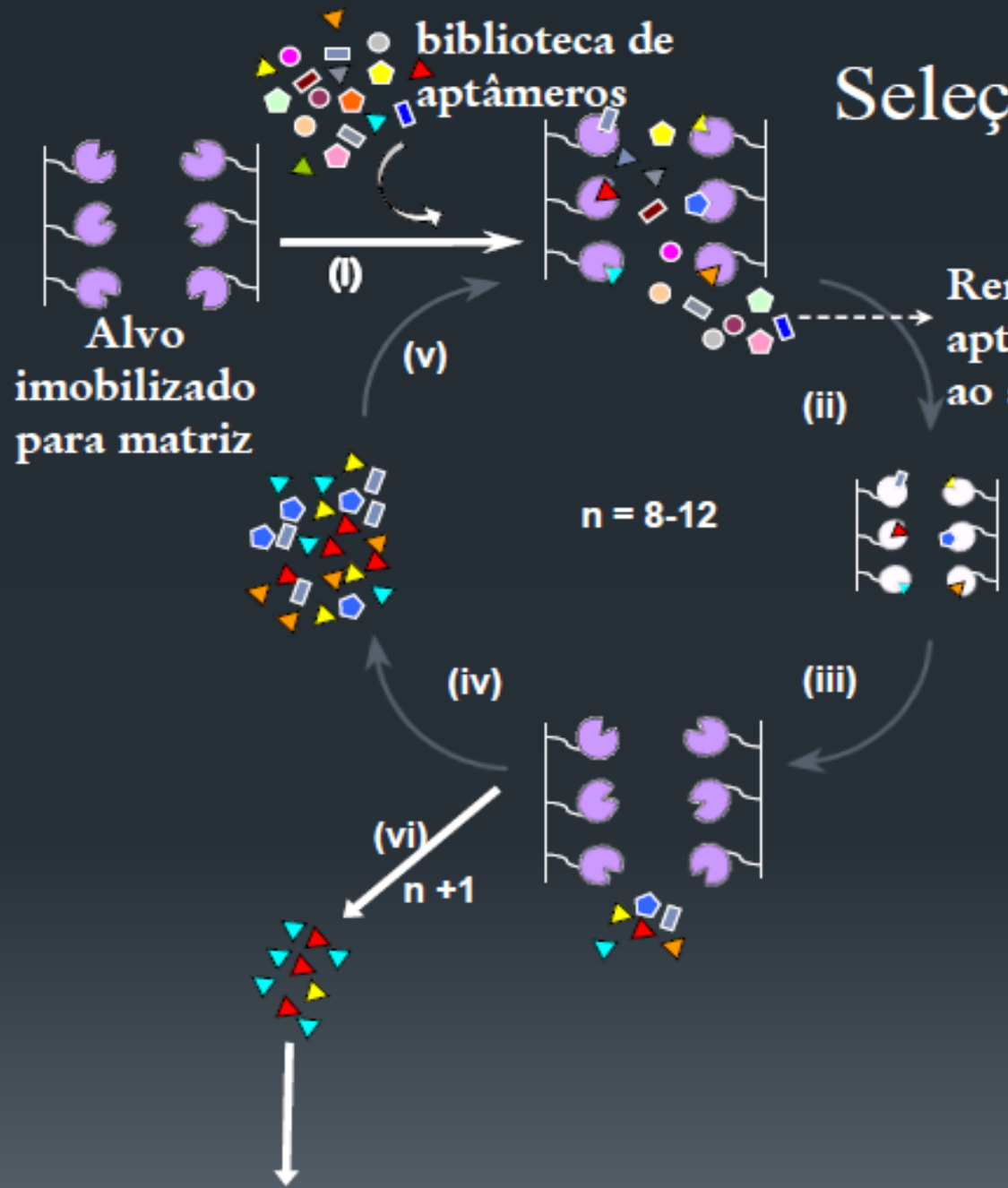
1. O que é SELEX? Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment SELEX (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial)
2. SELEX é um método de química combinatória empregando bibliotecas de ácidos nucleicos para a seleção de oligonucleotídeos como ligantes de alta afinidade e especificidade, chamados aptâmeros, baseados em rodadas consecutivas de seleção e amplificação.
3. Bibliotecas normalmente são oligonucleotídeos sintéticos (RNA ou DNA) de número n de bases degeneradas. Uma biblioteca com região aleatória de 25 bases degeneradas é capaz de produzir um total de $4^{25} = 10^{15}$ ligantes diferentes.



Aptâmeros

1. Como o SELEX é feita? Bibliotecas SELEX
2. As bibliotecas podem ser:
 - a. oligonucleotídeos sintéticos (RNA or DNA)
 - b. DNA genômico digerido
3. Tamanho da biblioteca: 4^n , onde n = número de bases degeneradas; por exemplo, para um oligonucleotídeo com 25 bases degeneradas: $4^{25} = 10^{15}$ ligantes diferentes.
4. 25 bases degeneradas permitirão a formação de todas as estruturas nucleotídicas secundárias comuns.

Seleção de Aptâmeros



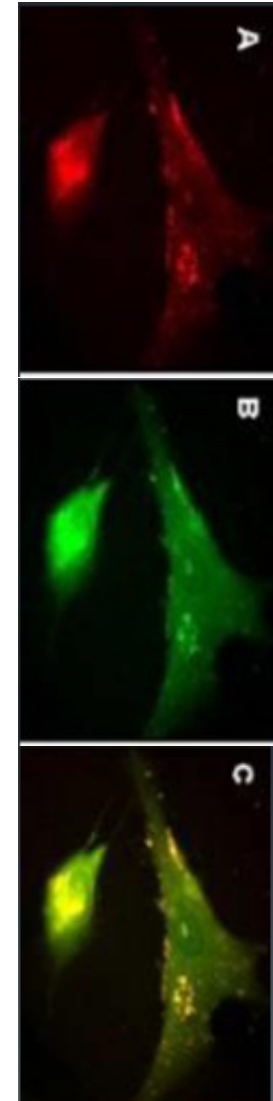
- i) Incubar a biblioteca de aptâmeros com o alvo imobilizado
- ii) Lavar amostra para remover seqüências que não se ligam
- iii) Eluir aptâmeros ligados do alvo
- iv) PCR de aptâmeros selecionados
- v) Incubar aptâmeros selecionados com alvo
- vi) Depois de $n + 1$ rodadas, aptâmeros selecionados são clonados e sequenciados



Aptâmeros

Aplicações de aptâmeros

1. Aptâmeros como inibidores ou antagonistas.
2. Sistema de entrega para inibidores não-específicos.
3. Drogas ligadas ao aptâmeros
4. Radionucleotídeos ligados ao aptâmeros
5. Terapêuticos direcionados
 1. Macugen® (atividade anti-angiogênica).
6. Diagnóstico por imagem.
7. Ensaio de diagnósticos.
8. Sensores (biosensores/químiosensores).





Aptâmeros

Subtítulo do Capítulo

Por que usar aptâmeros?

1. Baratos, eficientes, reprodutível e fácil de produzir.
2. Estável em armazenamento a longo prazo, transportados em temperatura ambiente.
3. Alteração de propriedades de acordo com a necessidade.
4. Tamanho pequeno logo menos imunogenicidade e com maior penetração do tecido
5. Bom como inibidores ou antagonistas (VEGF NX1838), agentes de entrega, sondas moleculares e unidades de reconhecimento de sensor.
6. Mais específicos do que pequenas moléculas e peptídeos, menores e mais flexíveis do que os anticorpos.
7. Aptâmeros são versáteis e fáceis de modificar.
8. Aptâmeros podem ser selecionados contra qualquer alvo



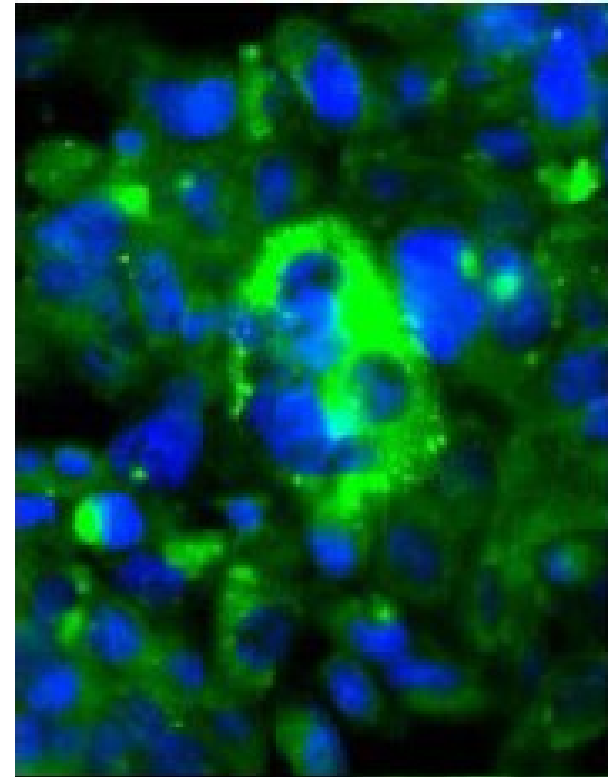
Aptâmeros

Conclusões

Aptâmeros podem desempenhar um papel importante na luta contra o câncer e outras doenças.

Conseguimos selecionar aptâmeros contra uma variedade de alvos, incluindo enzimas e receptores de superfície celular que podem agir como inibidores ou agentes de distribuição na radioterapia e quimioterapia.

Modificações apropriadas podem alterar as propriedades farmacocinéticas dos aptâmeros segundo as necessidades, ou incluí-los em superfícies para torná-los agentes ideais para ensaios diagnósticos, terapias ou produção de imagens.





Peptídeos



Peptídeos

Introdução

Os medicamentos utilizados podem ser divididos em duas categorias: fármacos tradicionais ou fármaco-químicos <500 Da e com biodisponibilidade por via oral na maioria das vezes.

E medicamentos biológicos, muito maiores com massa molecular >5000 Da. Que são biodisponíveis, em sua maioria, por via injetável (raras exceções por outras vias).

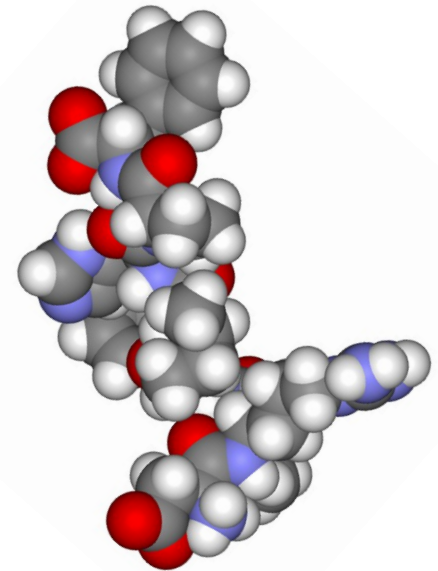




Peptídeos

Introdução

Uma nova categoria de medicamentos vem sendo investigada. Os peptídeos se encaixam entre os dois extremos de massa molecular com o objetivo de combinar as vantagens moléculas pequenas (custo, resistência conformacional, permeabilidade, estabilidade e biodisponibilidade oral) com as vantagens dos produtos biológicos (componente natural, elevada especificidade e alta potência).





Peptídeos

A cada dia mais medicamentos baseados em peptídeos vêm sendo aprovados: estes, derivados de venenos ou proteólise celular tem sido a base terapêutica para muitas doenças: hipertensão, câncer, diabetes tipo II dor neuropática e angina.





Peptídeos

Mercado Farmacêutico

Lupron® - medicamento antineoplásico

US\$ 2,3 bilhões.

Lantus® – insulina glargina

US\$ 7,9 bilhões.

Victoza® – tratamento da diabetes

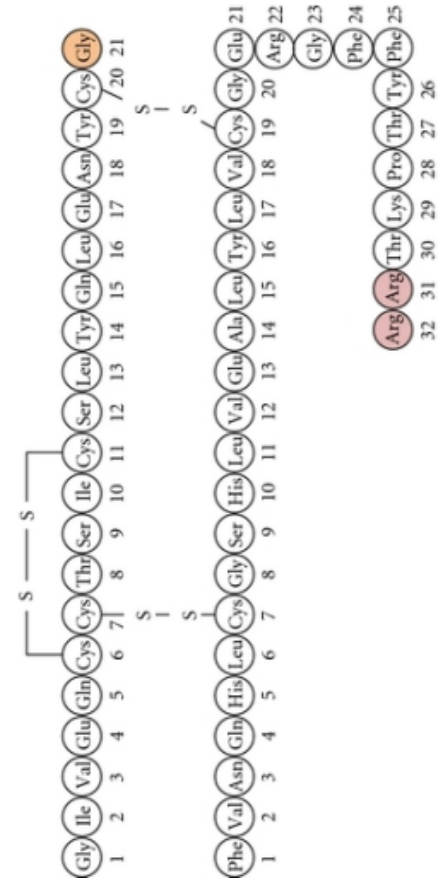
US\$ 2,3 bilhões.

2014

60 peptídeos aprovados na FDA

140 peptídeos em ensaio clínico

+ 500 em ensaios pré-clínicos.





Síntese de Proteína Cell-free

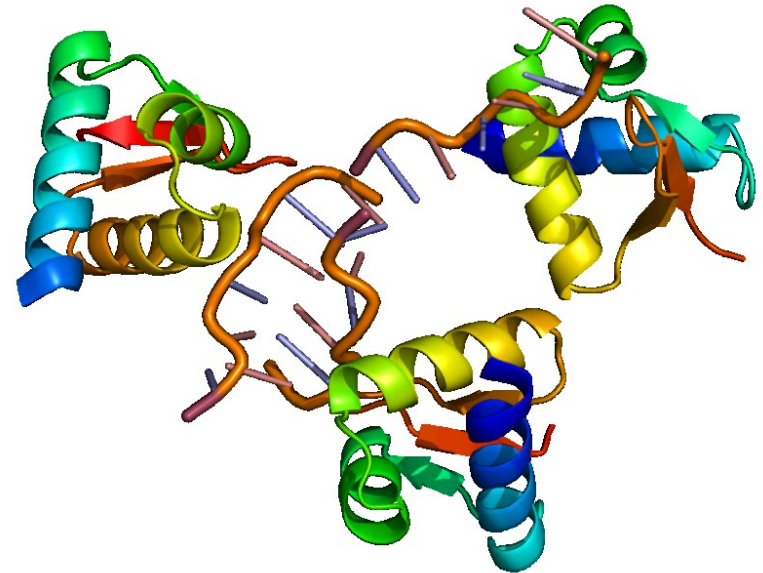


Síntese de Proteína Cell-Free

Introdução

No início da década de 50 muitos grupos independentes demonstraram que a síntese de proteína não necessitava de uma célula com a parede íntegra. E que a síntese continuava após o rompimento da membrana celular.

Somente em 1955 que a partícula de ribonucleoproteína (ribossoma) foram identificadas e isoladas das células e foram estudadas as suas propriedades físico-químicas.





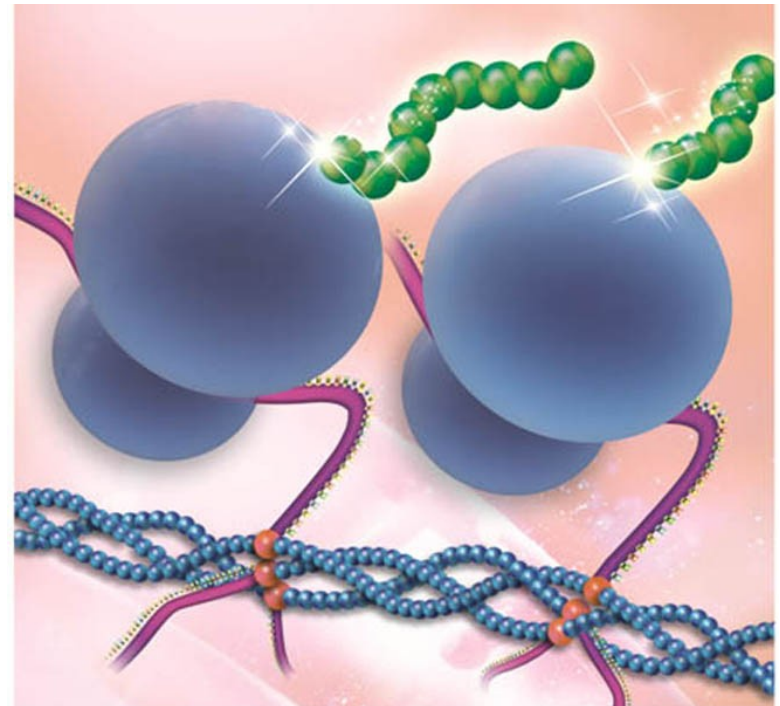
Síntese de Proteína Cell-Free

Introdução

Em meados de 1956 viram que a ribonucleoproteína era capaz de realizar a síntese de proteína na ausência de mitocôndrias celulares. Necessitando um alto grau de energia para transformar ATP em ADP.

Os primeiros extratos celulares a serem estudados foram:

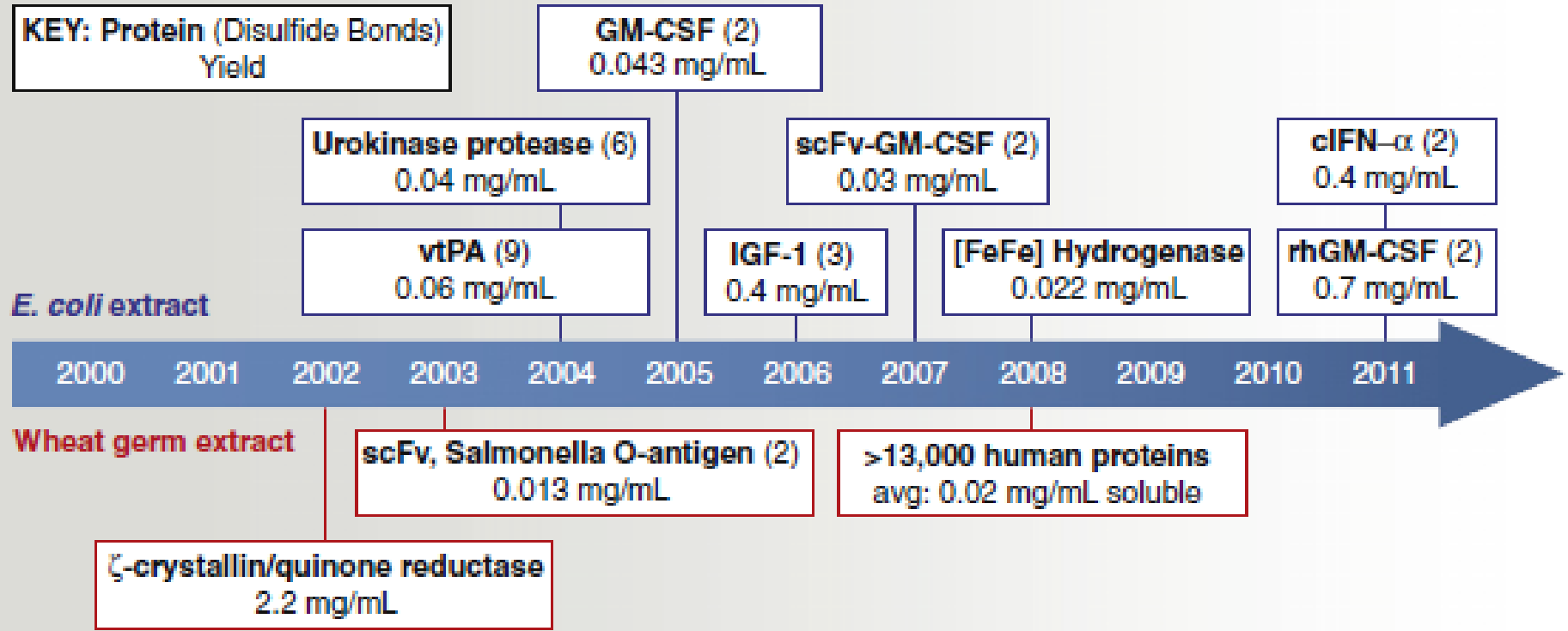
- Extrato de *E. coli*;
- Extrato de germe de trigo
- Extrato de Lisado de reticulócito de coelho





BIOLOGIA SINTÉTICA: APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Síntese de Proteína Cell-Free



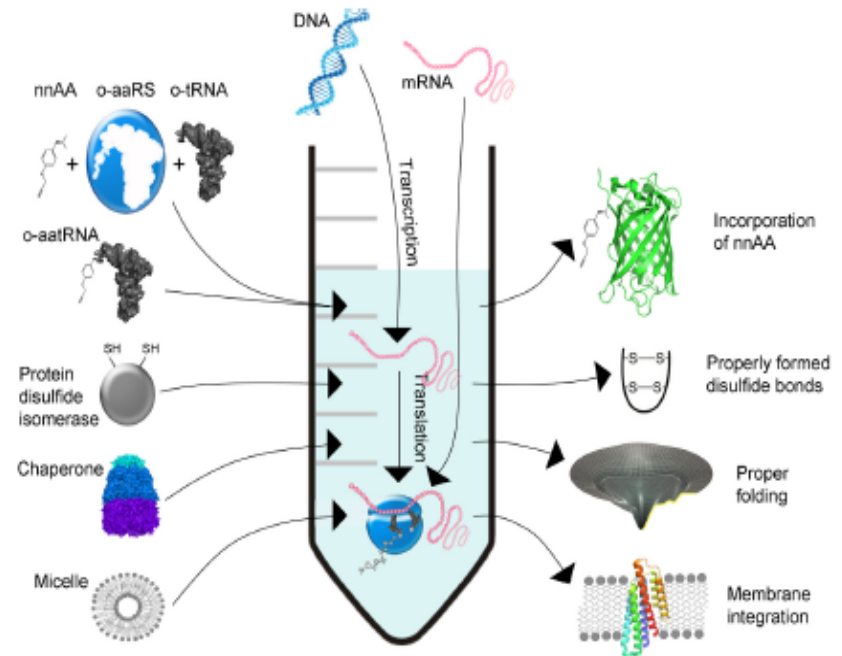


Síntese de Proteína Cell-Free

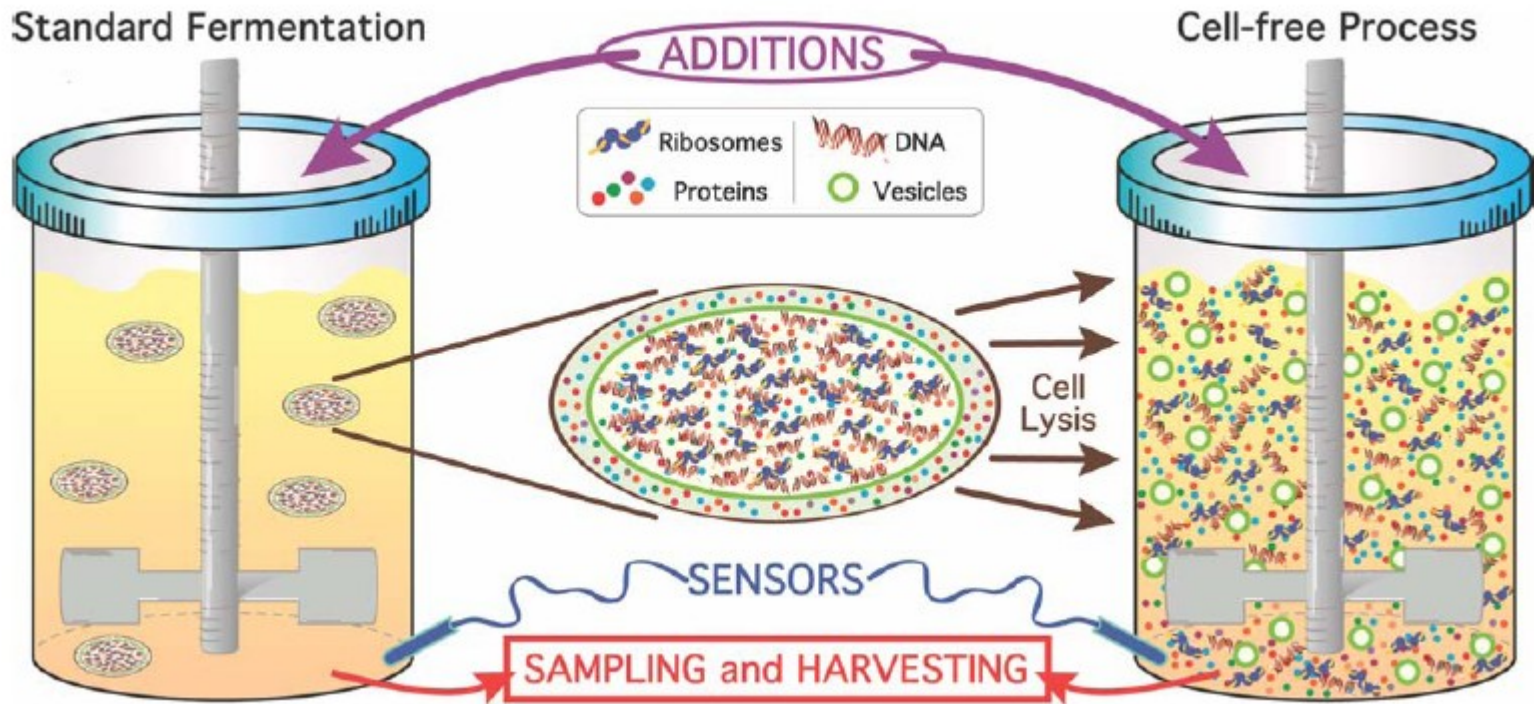
O que é a Plataforma “Cell-Free”

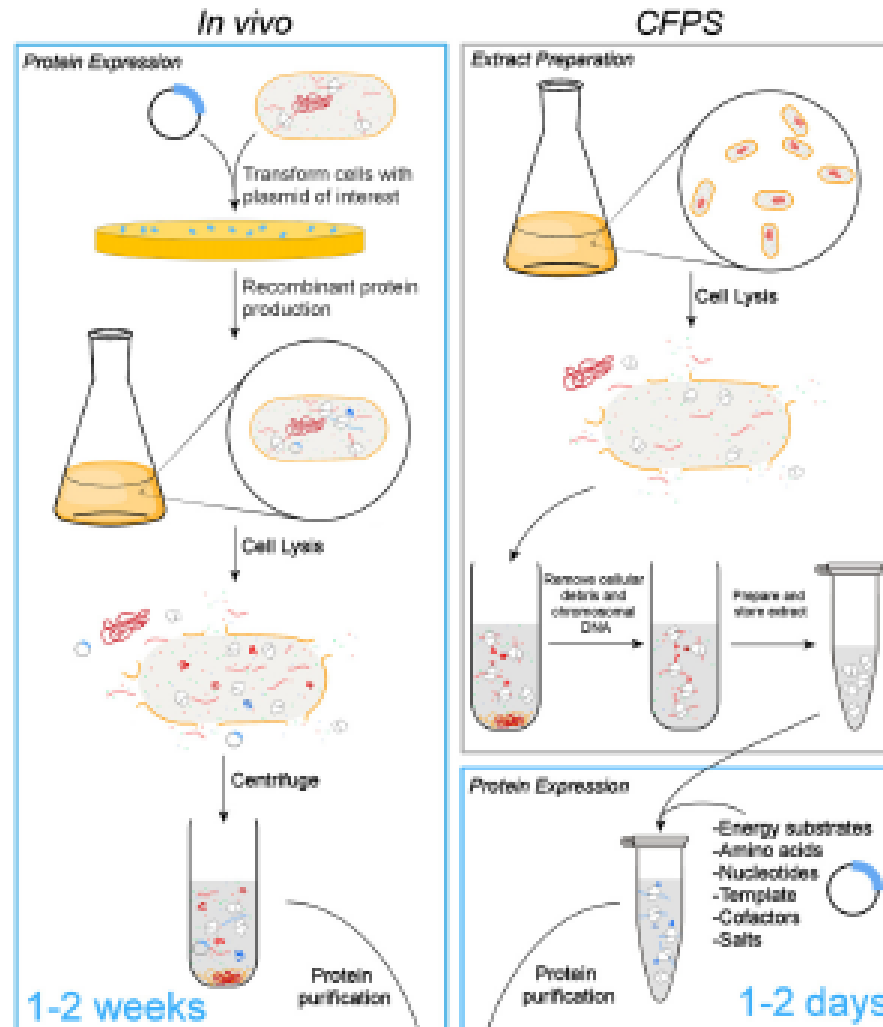
É uma nova forma de produzir proteínas recombinantes, sem uso de OGMs. Usando extratos de células comuns. Que podem ser bactéria, leveduras ou células de mamíferos.

Consiste em fazer o crescimento de células em reatores comuns, a destruição da parede celular e aproveitamento do conteúdo citoplasmático, inserção de uma molécula de DNA ou RNA sintético e uma mistura de substâncias, tais como: enzimas, açúcares e sais.



Síntese de Proteína Cell-Free





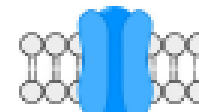
Síntese de Proteína Cell-Free



VLP



scFv



MBP



Síntese de Proteína Cell-Free

Desvantagens do Sistema Cell-free

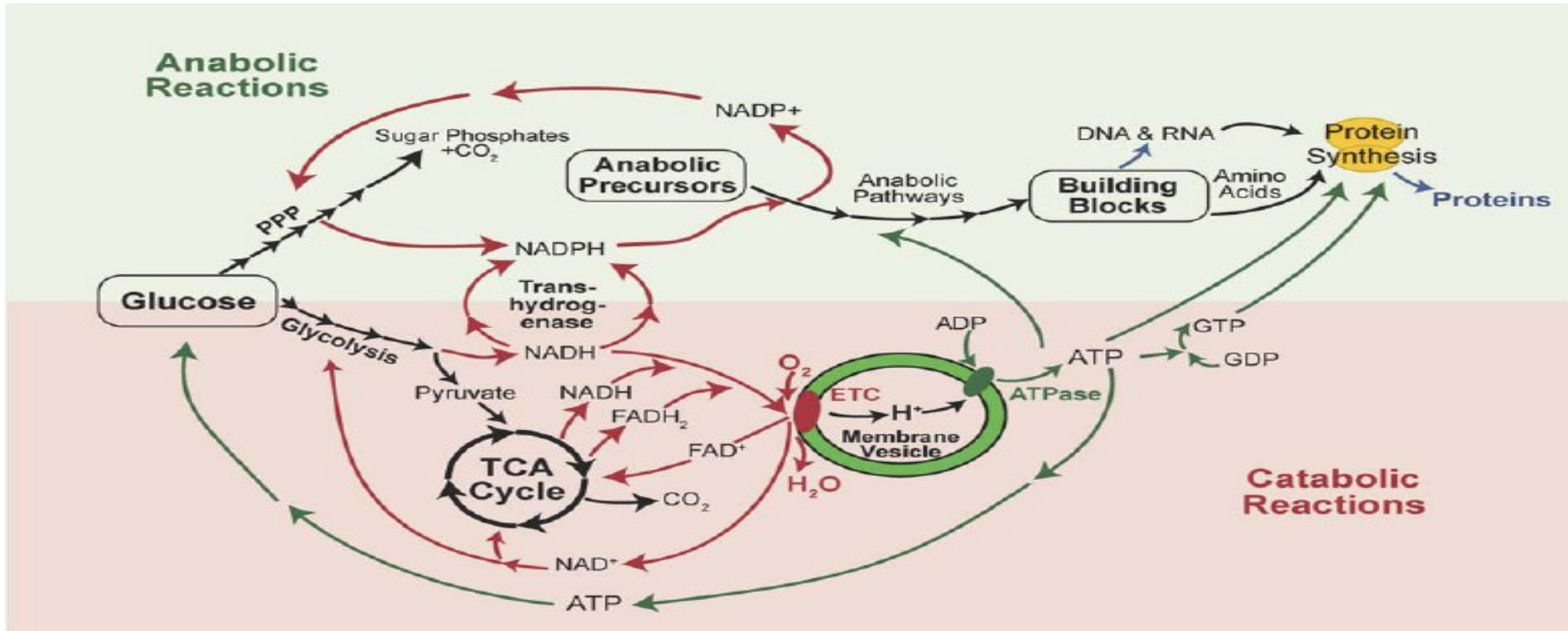
- Construção do DNA Linear Plasmídeo
- Produtividade
- Escalonamento
- Custo do processo
- Registro no MAPA

Vantagens do Sistema Cell-free

- Sem barreiras para acesso ao produto
- Produto em condições de solubilidade
- Produtividade até 100mg/mL
- Escalonamento em reatores até 100L
- Estabilidade do sistema catalítico
- Habilidade no foco metabólico
- Efeitos de toxicidade reduzido
- Influência direta do complexo reacional



Síntese de Proteína Cell-Free





ДЗКУЙ
Я
С
Д
И
К
У
Й
Х
Т
Р
Д
Ж
Т
А
С
К
О
MON
Z
S
O
K
ASKO
R
I
K
A
S
K
O
ESKER
R
I
K
A
S
K
O
OBRIGADO
THANK YOU
DANKIE
CẢM ƠN BẠN
MERCID
GRAZIE
TAKK
DIOLCH
DZIĘKUJĘ
GRATIAS AGIMUS TIBI
DĚKUJI
شكرا
ありがとう
СПАСИБО
TAK
FALEMINDERIT