

BIOFÁRMACOS – DA BIOPROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS PRODUZIDAS POR MICRO-ORGANISMOS EXTREMÓFILOS ÀS ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOBETTERS

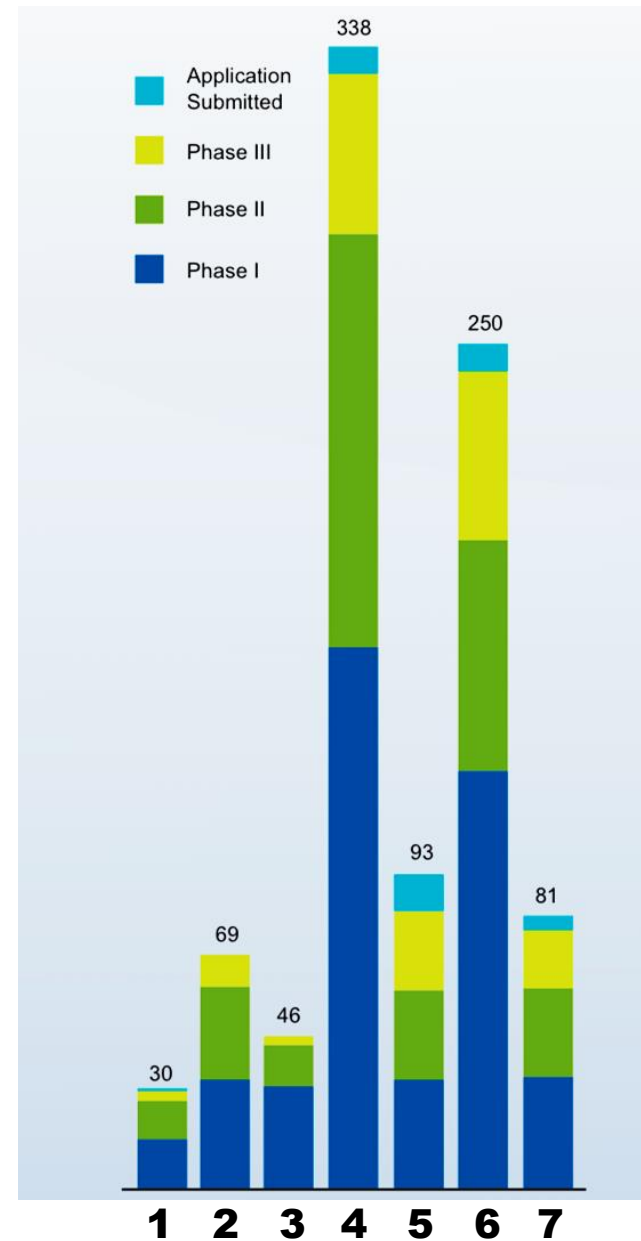
Estratégias de modificação molecular pós-expressão para o
aprimoramento do potencial farmacêutico: peguilação e outras
alternativas

Profa. Carlota Rangel Yagui
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

ANVISA - medicamentos biológicos:

“moléculas complexas de alto peso molecular obtidas a partir de fluidos biológicos, tecidos de origem animal ou procedimentos biotecnológicos por meio de manipulação ou inserção de outro material genético (tecnologia do DNA recombinante) ou alteração dos genes que ocorre devido à irradiação, produtos químicos ou seleção forçada”.

Quais as principais classes de biofármacos empregados?



- 1- Antisenso
- 2- Terapia Celular
- 3- Terapia Gênica
- 4- Anticorpos Monoclonais**
- 5- Proteínas Recombinantes**
- 6- Vacinas
- 7- Outros

BIOFÁRMACOS x FÁRMACOS TRADICIONAIS

Por que utilizar ou não biofármacos na terapêutica?

Fármacos tradicionais:

(*Small Molecule Drugs - SMD*)

- em geral menor custo de produção
- menor degradação via oral
- facilidade de atingir alvos intracelulares devido ao tamanho (capazes de penetrar nas células)

Biofármacos:

- alto custo
- instabilidade química
- problemas farmacocinéticos ($\downarrow T_{1/2}$ - rápido metabolismo sanguíneo)
- baixa penetração em tecidos
- Indução de resposta imune/alergia

ESPECIFICIDADE E POTÊNCIA

BIOFÁRMACOS x FÁRMACOS TRADICIONAIS

Fármacos tradicionais:

(Small Molecule Drugs - SMD)

- medicamento de referência
- similares
- genéricos

Biofármacos:

- **Biossimilares:** mesmo perfil molecular que os produtos de referência com evidências suficientes de que não há diferenças clínicas significativas - desenvolvimento por comparabilidade (qualidade, eficácia e segurança)
- O conceito de medicamento genérico não se aplica aos biossimilares. Não existe atualmente uma orientação da Anvisa sobre substituição de quaisquer medicamentos biológicos.

- Biossimilares

Primeiro biossimilar aprovado no Brasil

A aprovação do biossimilar Remsima (infliximabe) pela agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em junho de 2015, abriu caminho para que mais pessoas tivessem acesso a tratamentos avançados de saúde.¹

O medicamento, que já foi aprovado por órgãos reguladores em mais de 20 países, é um anticorpo monoclonal, ou seja, uma classe de moléculas que permite bloquear células específicas que deram origem a processos inflamatórios, doenças autoimunes e alguns tumores. A ação do medicamento é indicada para o combate de doenças como artrite reumatoide, doença de Crohn, colite ulcerativa, espondilite anquilosante, artrite psoriática e psoríase.¹

O Remsima é o primeiro medicamento biológico aprovado pelo regulador brasileiro, a Anvisa, por comparabilidade. Após ser desenvolvido, o biossimilar passou por testes clínicos comparativos com o Remicade, medicamento biológico de referência do Remsima.

O estudo de comparabilidade é necessário porque, de acordo com as regras previstas na resolução normativa RDC 55/2010 da Anvisa, a biossimilaridade precisa ser comprovada por comparação direta com o produto biológico de referência. De acordo com a regulamentação brasileira, o medicamento biossimilar deve ser comparado em um mesmo estudo clínico e usando os mesmos procedimentos usados como medicamento biológico de referência.²

Assim, um estudo clínico (de fase III), com 606 pacientes, demonstrou que, após 30 semanas de tratamento, 73,4% dos pacientes que receberam Remsima conseguiram uma melhora maior ou igual a 20% nos sintomas de artrite reumatoide em comparação com 69,7% dos tratados com o medicamento biológico de referência Remicade.³

BIOFÁRMACOS x FÁRMACOS TRADICIONAIS

- ❖ O desenvolvimento de um biossimilar é menos economicamente viável uma vez que estes produtos não conseguem significativa redução de custo (estima-se que o preço de mercado destes produtos esteja entre 65 e 85% do seu originador), uma queda bem menos pronunciada quando comparamos estes produtos aos genéricos químicos.

BIOBETTERS:

- ❖ contém **modificações no perfil molecular** originador com a finalidade específica de aumentar a sua eficácia terapêutica, desta maneira inserindo no mercado um **produto superior**.
- ❖ representam uma **oportunidade de inovação com riscos** reduzidos, uma vez que já se conhece bem o mecanismo de ação da molécula originadora.

REQUISITOS IDEAIS PARA BIOFÁRMACOS

- Alta afinidade pelo alvo (baixo k_b , baixo K_m);
- Alta atividade e **estabilidade em pH fisiológico**;
- **Baixa taxa de eliminação** quando injetado IV;
- **Baixa resposta imunológica** (origem, toxinas);
- **Pouca inibição/inativação** por constituintes normais de fluidos corporais;
- Para enzimas - efetiva irreversibilidade da reação catalisada em condições fisiológicas.



DIFÍCIL DE ATINGIR



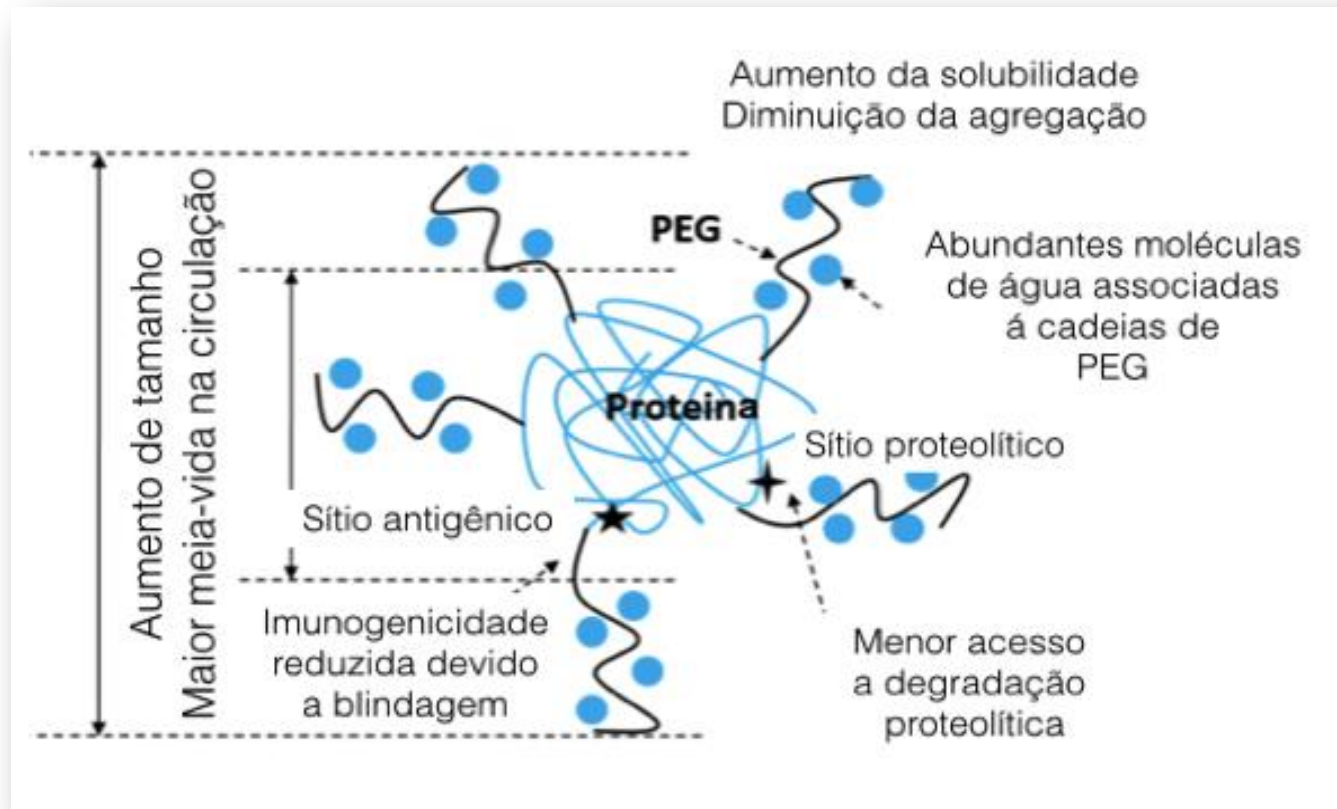
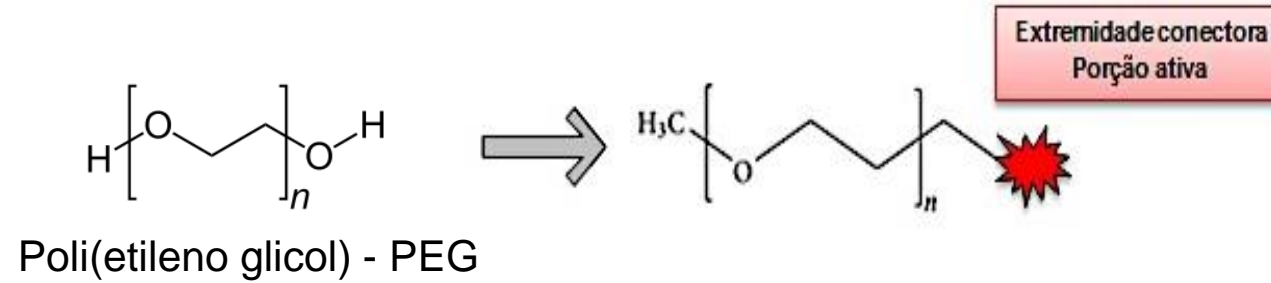
ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO
MOLECULAR

ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOFÁRMACOS E BIOBETTERS

- TRIAGENS DE NOVAS FONTES – ex: micro-organismos extremófilos
- ENGENHARIA GENÉTICA - proteínas mutantes
- MODIFICAÇÕES PÓS-EXPRESSÃO – **peguilação, glicosilação química**

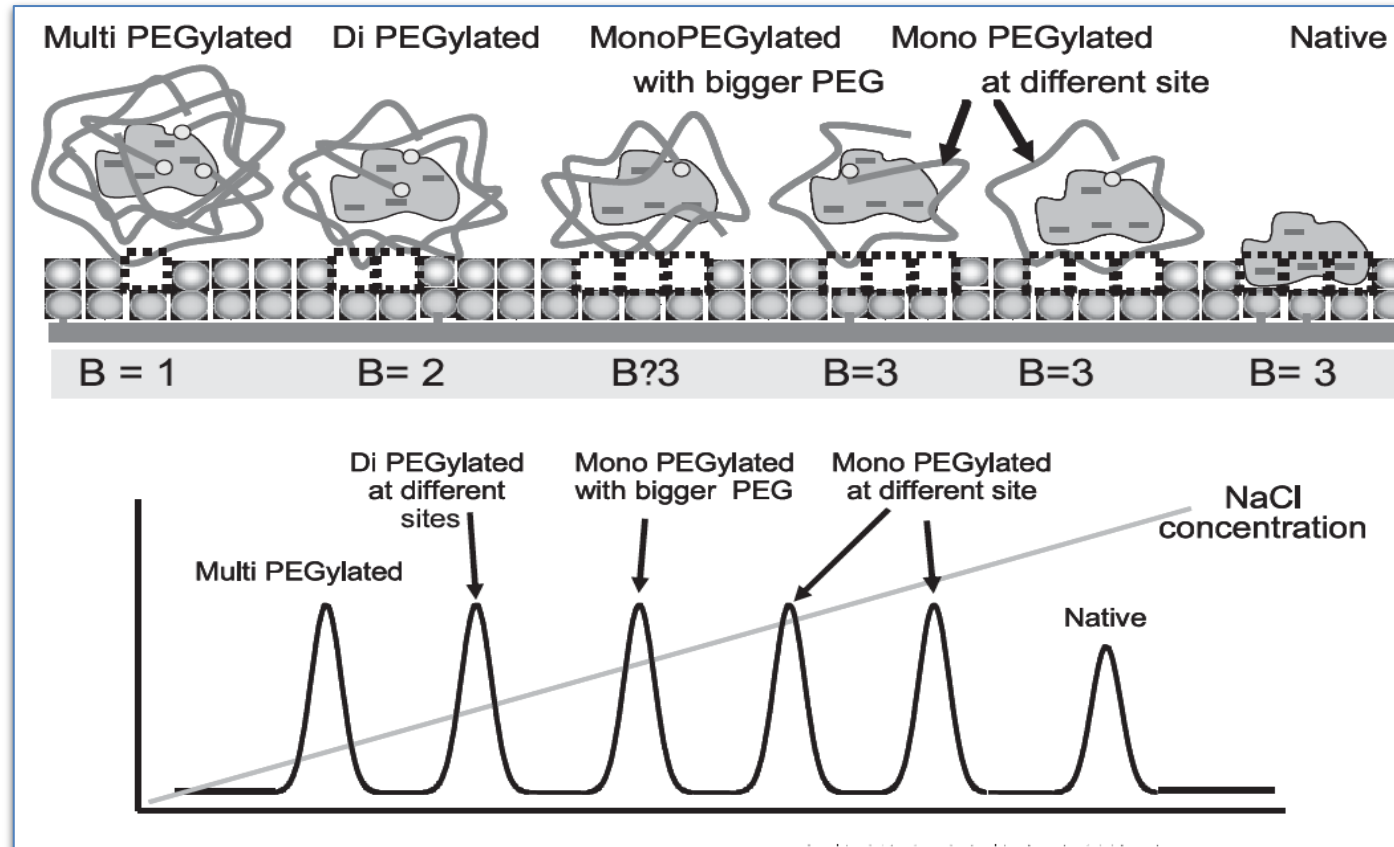
aumento de meia-vida, redução de toxicidade, redução de imunogenicidade, melhorar a farmacodinâmica.

PEGUILAÇÃO



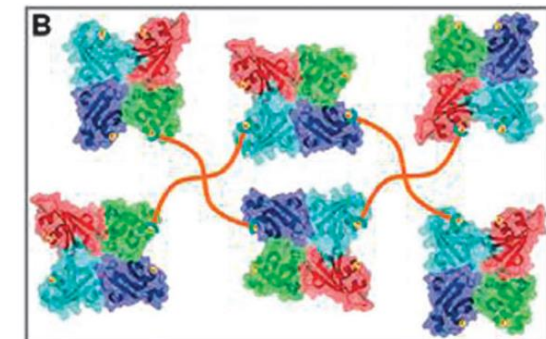
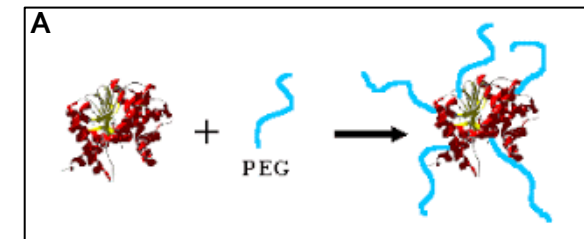
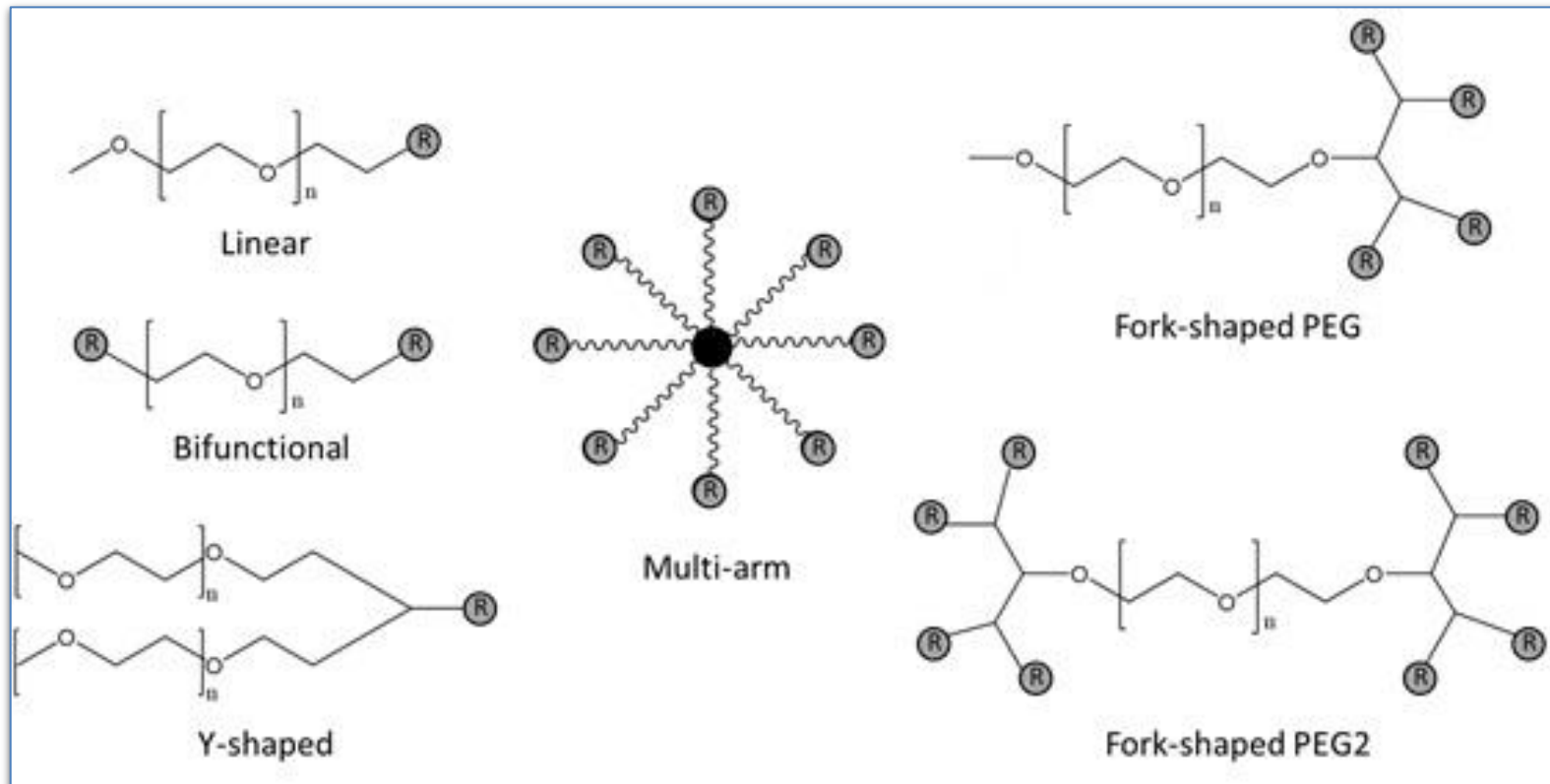
PEGUILAÇÃO

- Aleatória x sítio-dirigida
- Polidispersão x monodispersão



PEGUILAÇÃO

- Aleatória x sítio-dirigida
- Polidispersão x monodispersão
- Massa molar e geometria do polímero (linear ou ramificado)

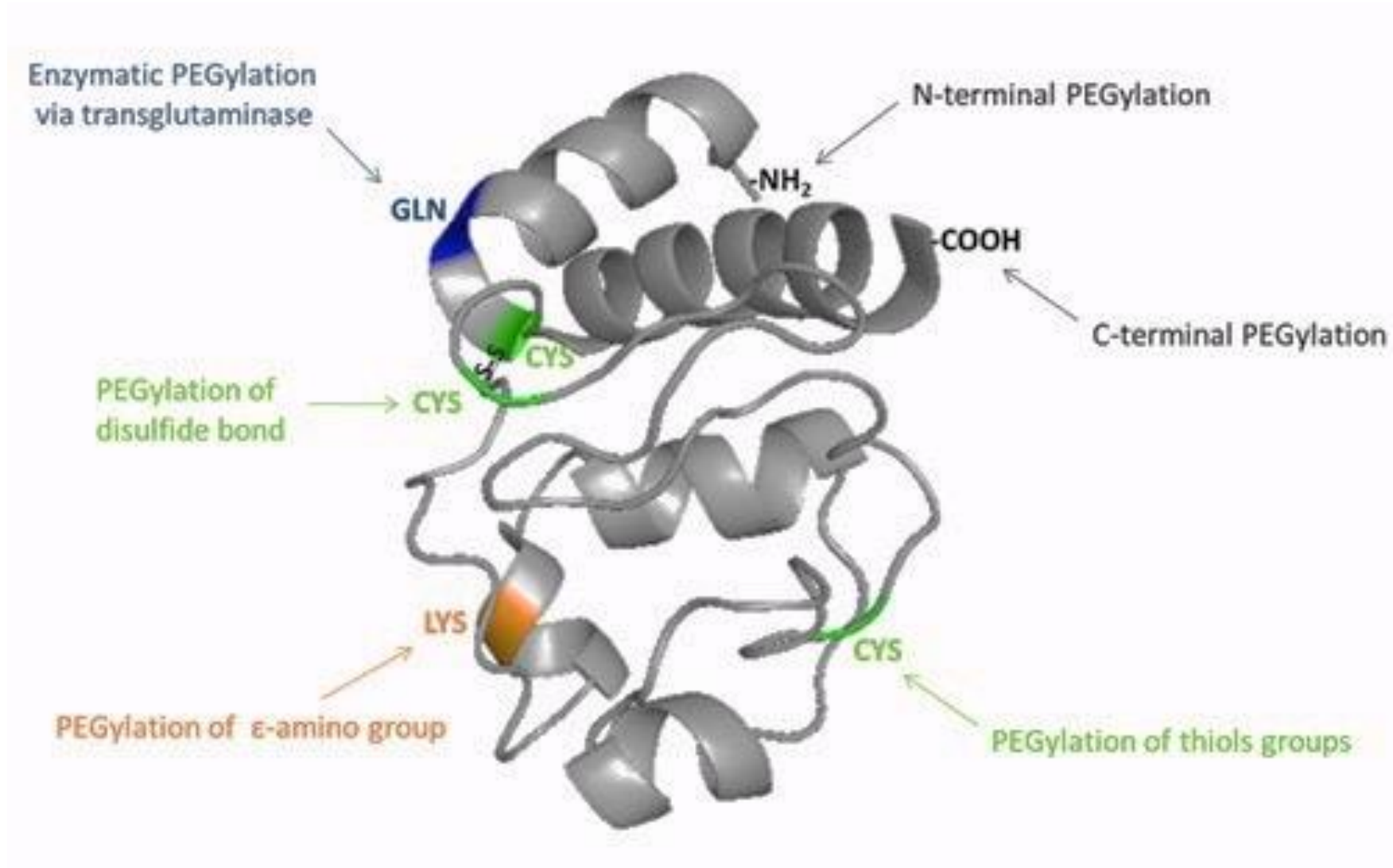


PEGUILAÇÃO

- Aleatória x sítio-dirigida
- Poldispersão x monodispersão
- Massa molecular e geometria do polímero (linear ou ramificado)
- Características da proteína

As primeiras proteínas a serem peguiladas referem-se à peguilação aleatória de resíduos de lisina com várias cadeias de PEG, levando a um alto grau de poldispersão nas preparações resultantes

PRINCIPAIS ESTRATÉGIAS DE PEGUILAÇÃO

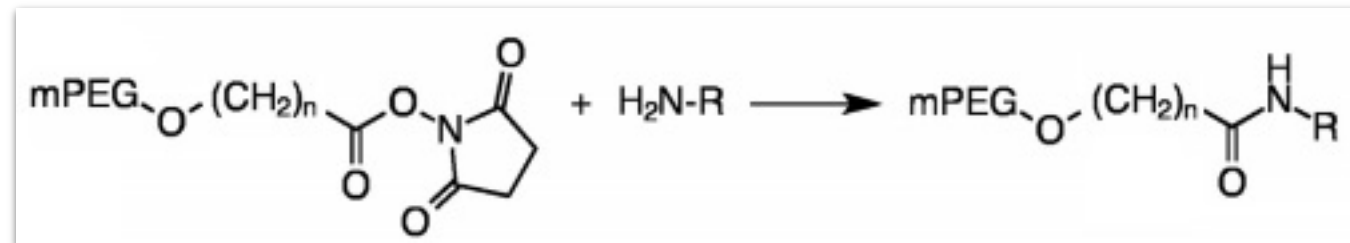


PRINCIPAIS ESTRATÉGIAS DE PEGUILAÇÃO

Grupamentos amínicos

PEG derivatives that, after amino coupling, lead to a loss of positive charge in the final conjugate with respect to starting protein

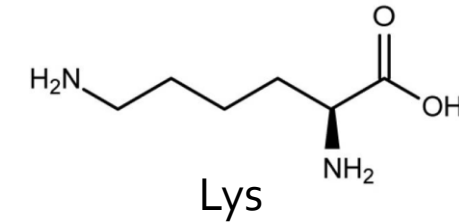
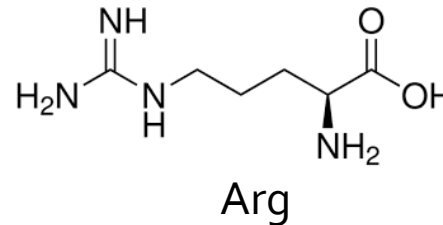
Structure	PEG-carboxylates	Properties
$\text{PEG-O}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(=\text{O})\text{OSu}$	Several PEG derivatives with one or more CH ₂ groups between the PEG and the carboxylic group	The carboxylic group is activated as N-hydroxy succinimidyl ester, imidazole or benzotriazole. The kinetic rate of conjugation depends on the numbers, and eventual ramification of CH ₂ groups linked to the carboxyl group.
$\text{PEG-O}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OSu}$	PEG-succinimidyl succinate	The ester bond between succinic acid and PEG is easily hydrolyzed.
$\text{PEG-X}-\text{C}(=\text{O})\text{OSu}$	PEG-amino acid-succinimidyl ester	Nle or βAla as amino acid moiety allows an easy quantification of the number of linked PEG chains by amino acid analysis.
$\text{PEG}-(\text{X})_n-\text{C}(=\text{O})\text{OSu}$	PEG-peptide-succinimidyl ester	The Met-Nle or Met-βAla allows the removal of PEG by CNBr treatment for an easy localization of PEGylation site. Lysosomal cleavable sequences, as H-Gly-Phe-Lue-Gly-OH, allow the release of the bound drug inside the cell.



PRINCIPAIS ESTRATÉGIAS DE PEGUILAÇÃO

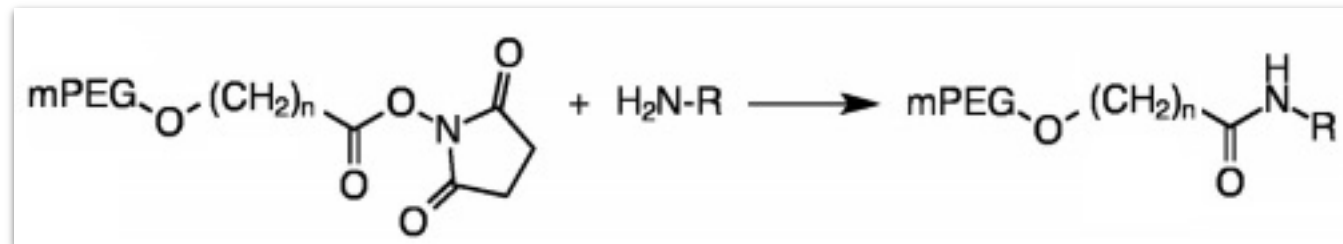
Grupamentos amínicos

- Argininas são menos reativas que lisinas

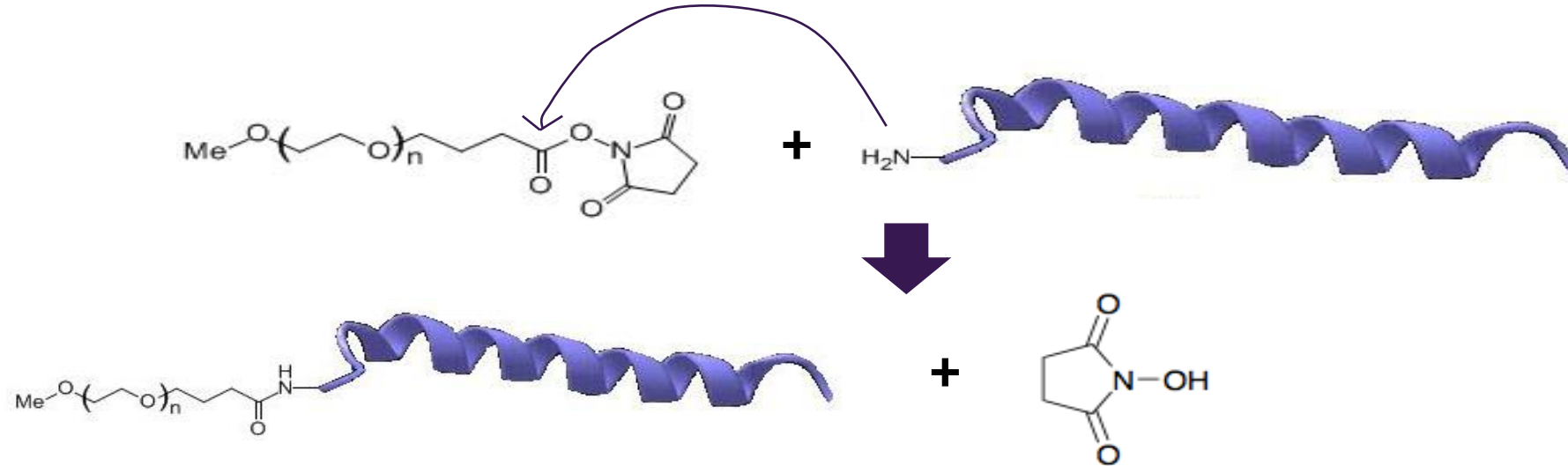


Estratégias moleculares empregadas:

- substituição de lisinas por argininas em regiões próximas ao sítio ativo para evitar a perda de atividade.
- inserção de lisinas em regiões específicas para adicionar sítios de PEGuilação.



PEGUILAÇÃO N-TERMINAL

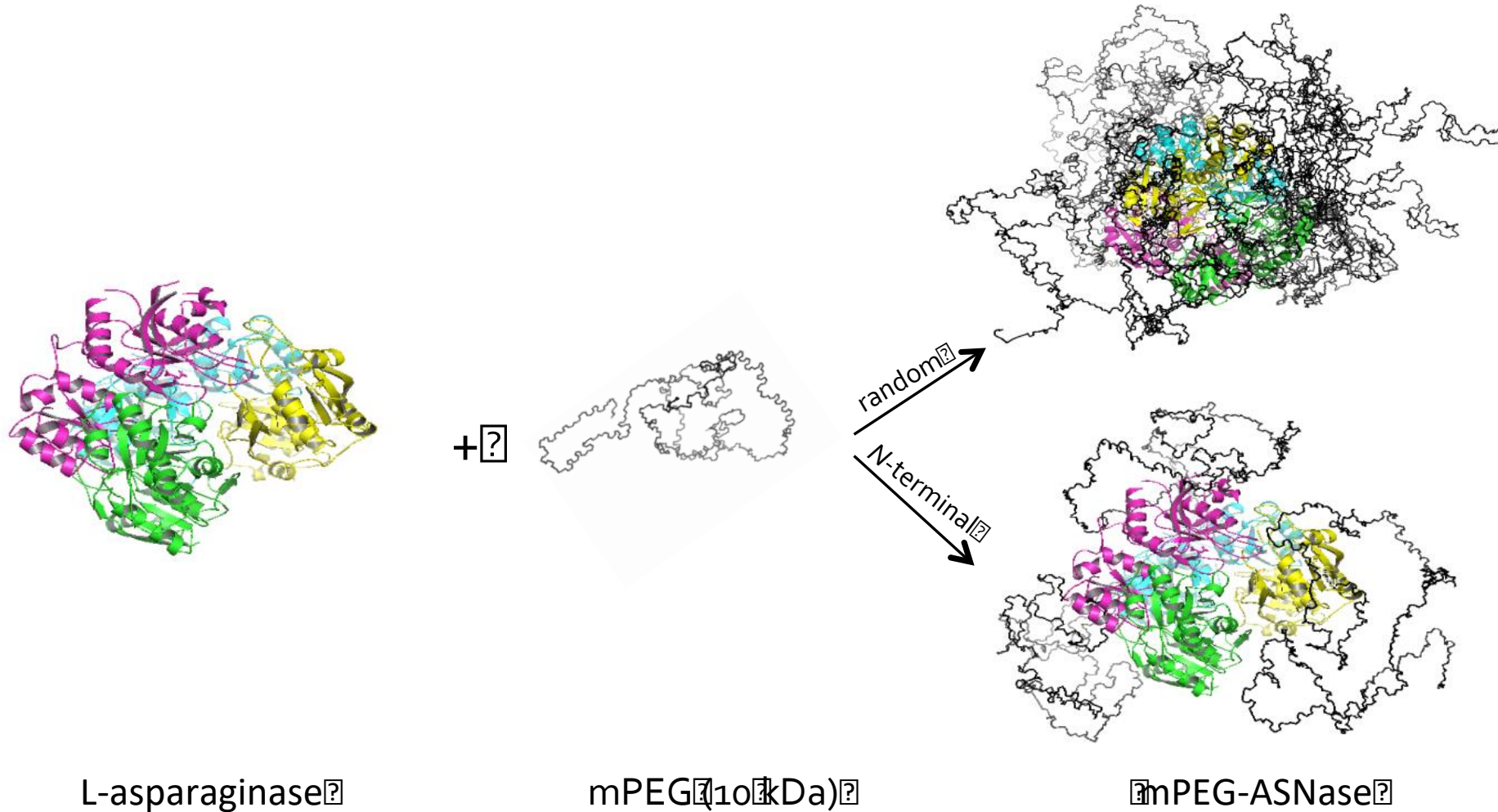


A peguilação N-terminal é considerada sítio-específica – **uma cadeia de PEG por monômero da proteína** – sendo que o número de cadeias de PEG é significativamente reduzido.

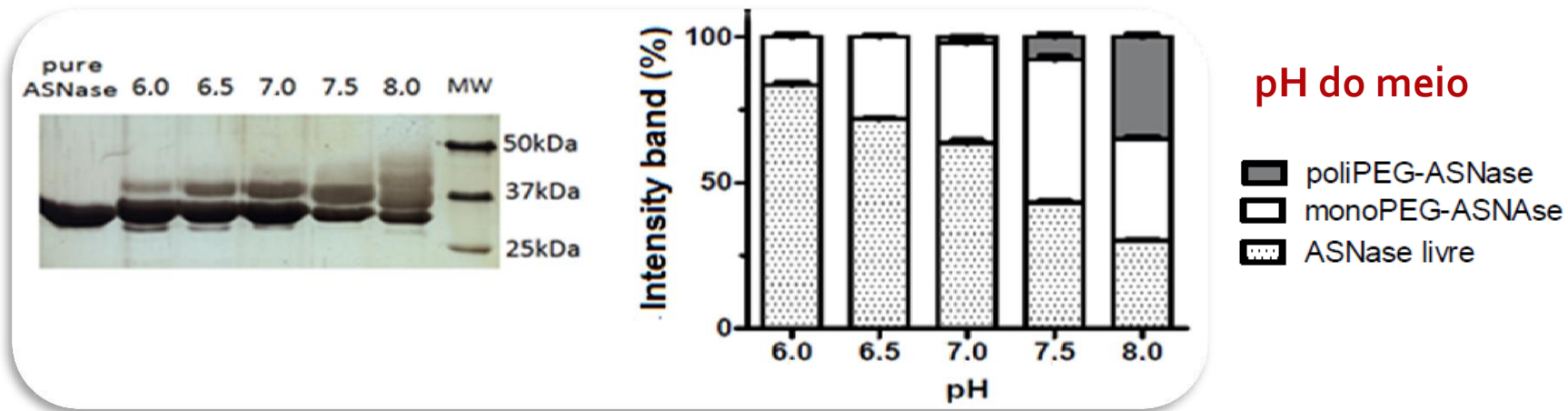
A seletividade é baseada na **diferença de pKa** entre resíduos de lisina (pKa ≈ 10,5) e a região N-terminal (pKa ≈ 7,7).

A determinação do pH ótimo de reação é extremamente importante.

PEGUILAÇÃO N-TERMINAL DA ASPARAGINASE

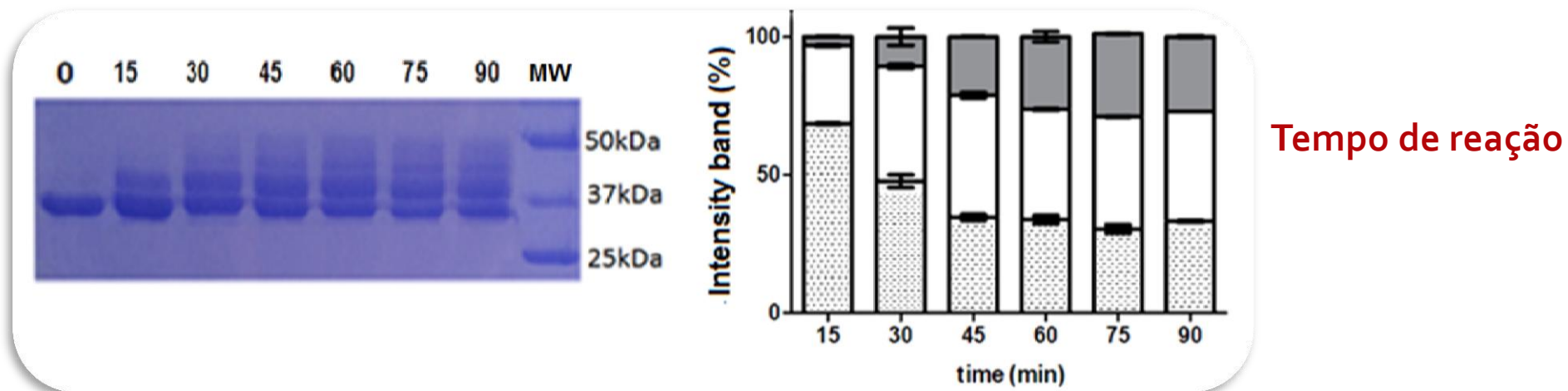


PEGUILAÇÃO N-TERMINAL DA ASPARAGINASE



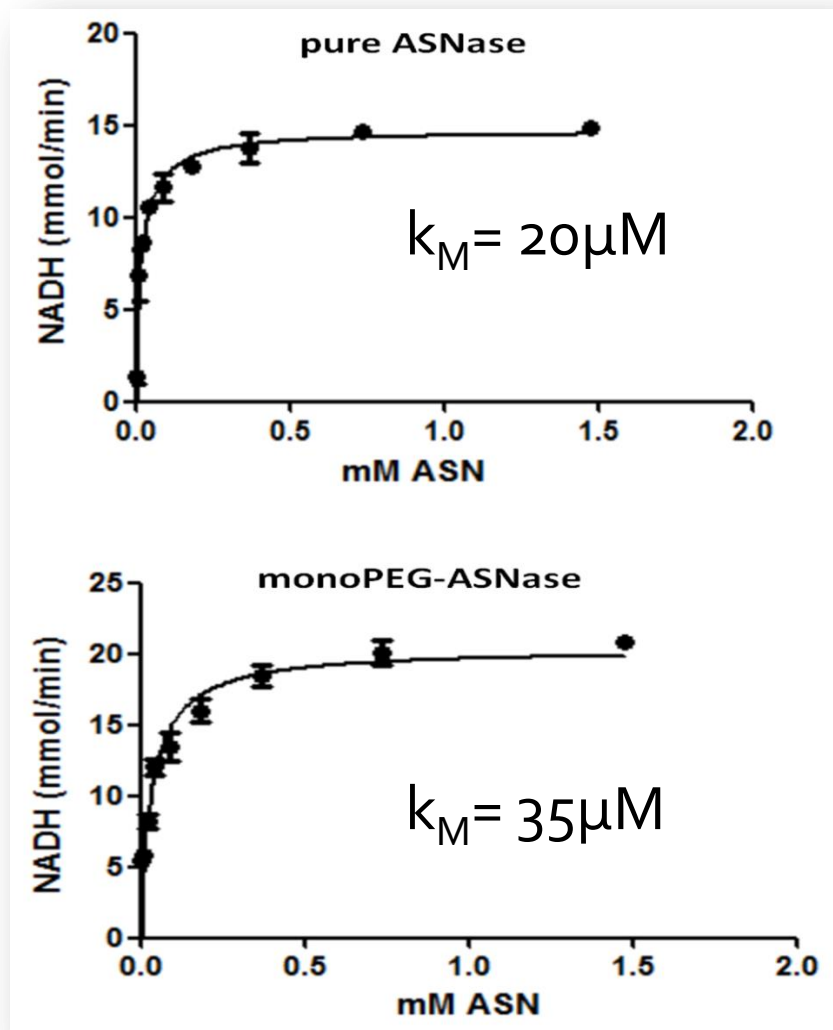
(tampão fosfato de sódio 100 mM, razão PEG:ASNase 25:1)

**RENDIMENTO DE 57%
EM monoPEG-ASNase**

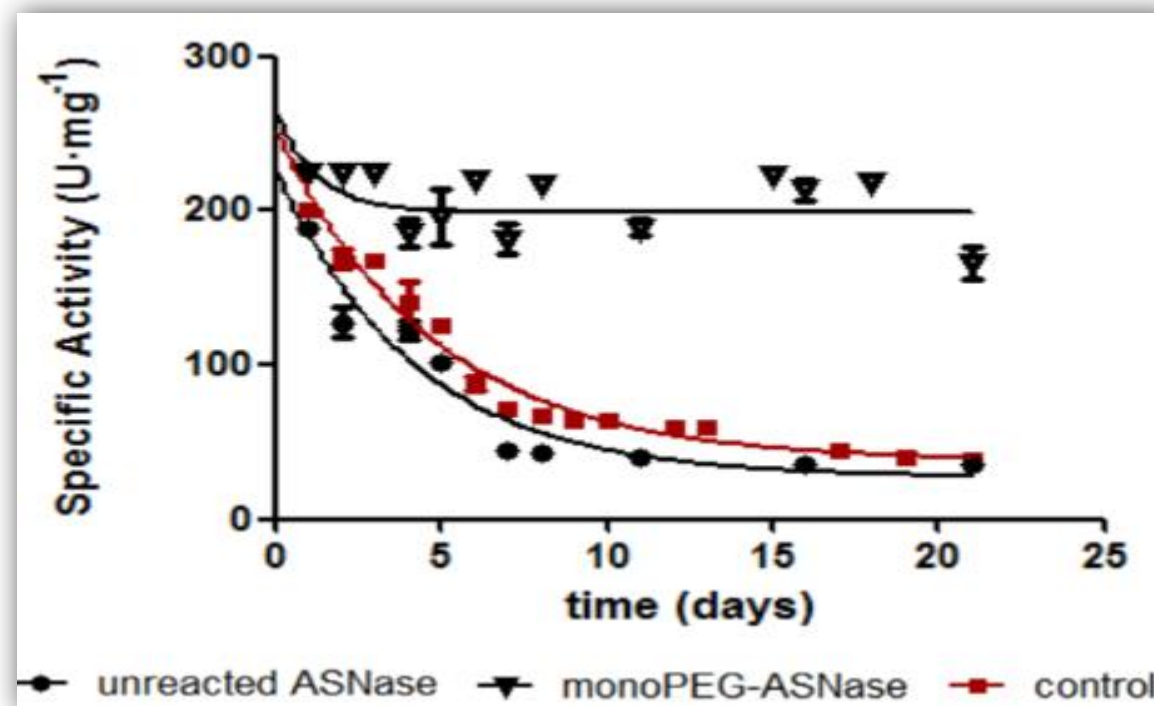


PEGUILAÇÃO N-TERMINAL DA ASPARAGINASE

Cinética enzimática

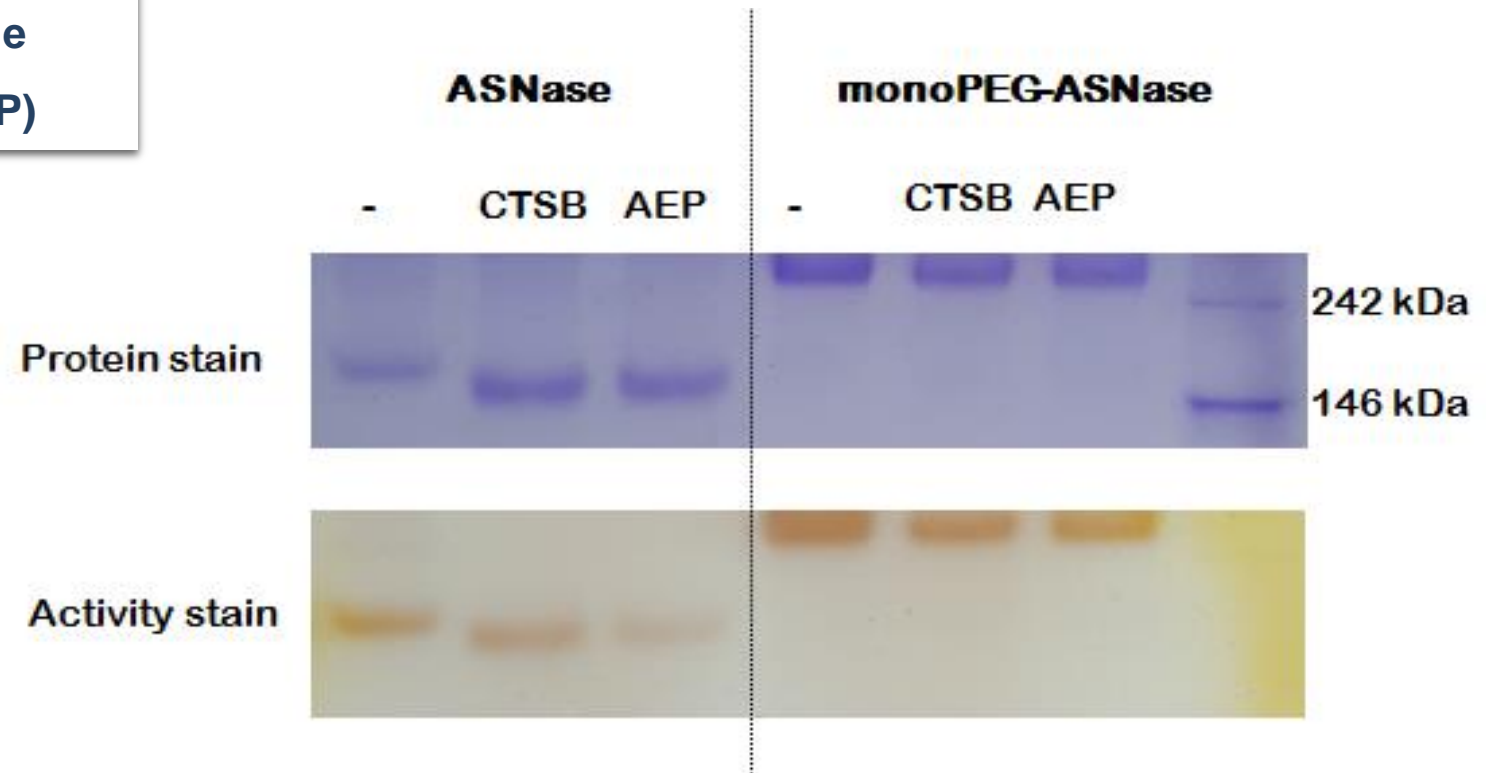


Estabilidade por 21 dias (4 °C)



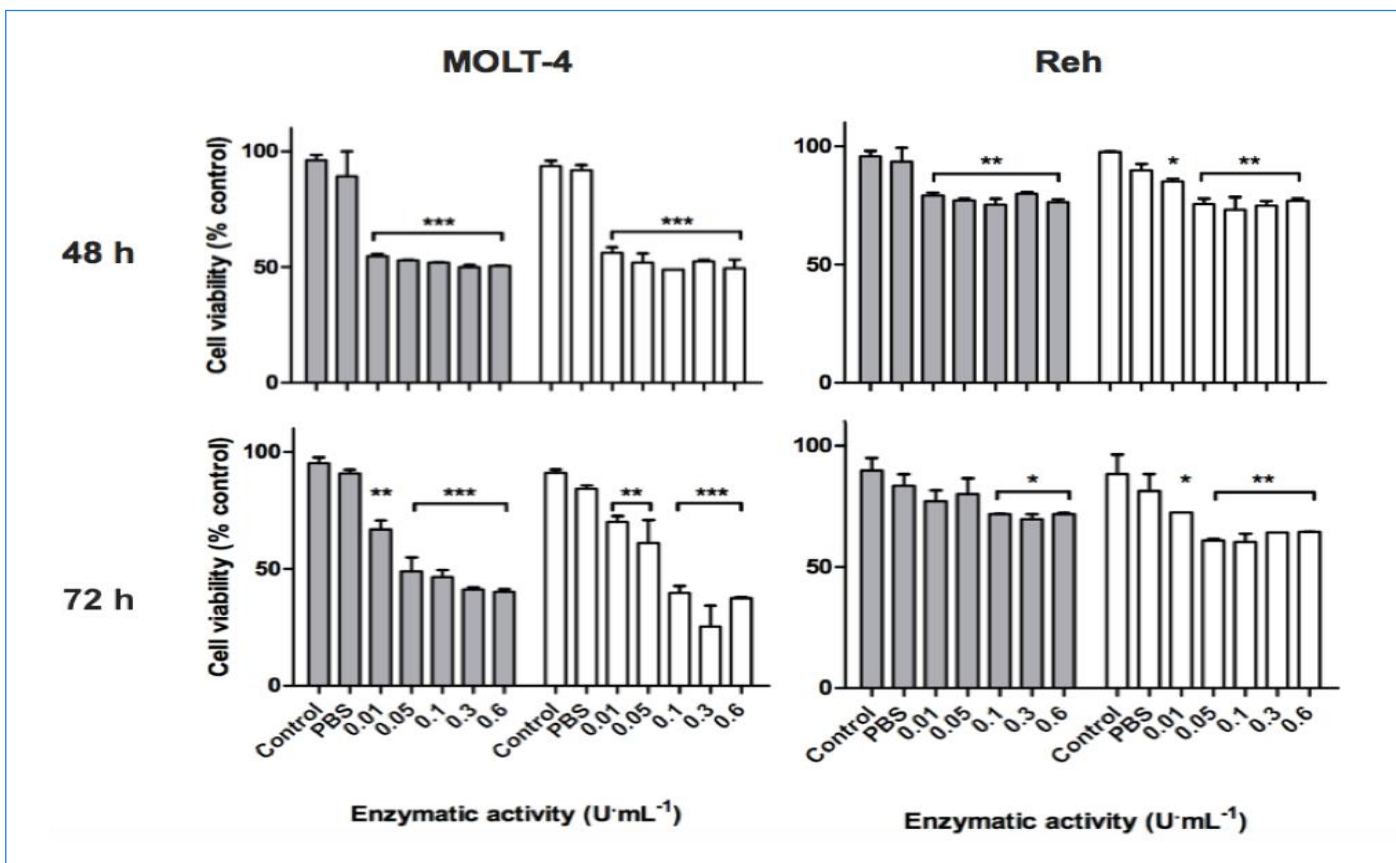
PEGUILAÇÃO N-TERMINAL DA ASPARAGINASE

A peguilação confere resistência às proteases catepsina B (CTSB) e asparaginil endopeptidase (AEP)



Gel nativo - 4 μ g de ASNase/monoPEG-ASNase, 2 μ g de CTSB ou 1.8 μ g de AEP, 37°C, 132 h.

PEGUILAÇÃO N-TERMINAL DA ASPARAGINASE

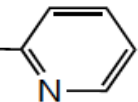
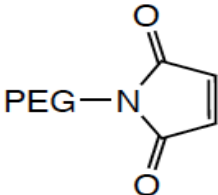


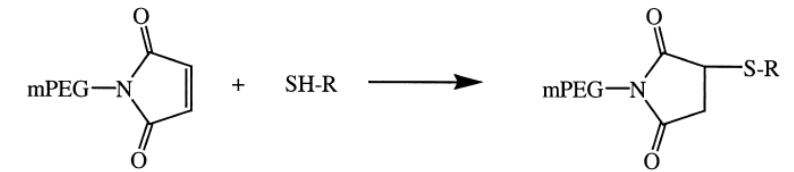
Citotoxicidade da monoPEG-ASNase frente a linhagens leucêmicas. As barras de erro representam o desvio padrão. Probabilidade de significância menor do que 0,05 (*), menor do que 0,01 (**), e menor do que 0,001 (***) em relação ao controle.

PRINCIPAIS ESTRATÉGIAS DE PEGUILAÇÃO

Grupamentos tiol

PEGs reactive towards a thiol group

Structure	Thioreactive PEGs	Properties
PEG-S-S- 	PEG-pyridyl disulphide	The most specific towards thiol but yields a cleavable linkage by a reducing agent also <i>in vivo</i> .
	PEG-maleimide	Gives stable linkage by double bond addition but can also react with amines at pH >8.
$\text{PEG-S(=O)}_2\text{-CH=CH}_2$	PEG-vinylsulfone	
$\text{PEG-NH-C(=O)-CH}_2\text{-I}$	PEG-iodo acetamide	Less reactive, not much used



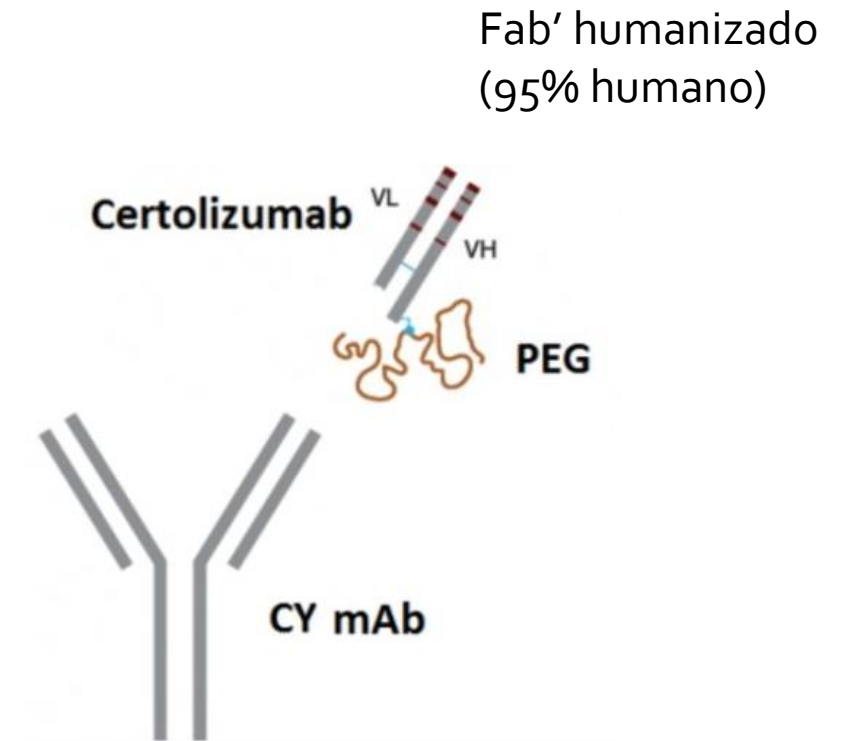
Limitação da técnica = proteínas em geral não apresentam cisteínas expostas geralmente estão envolvidas em pontes dissulfeto ou em domínios hidrofóbicos inacessíveis.

PRINCIPAIS ESTRATÉGIAS DE PEGUILAÇÃO

Grupamentos tiol

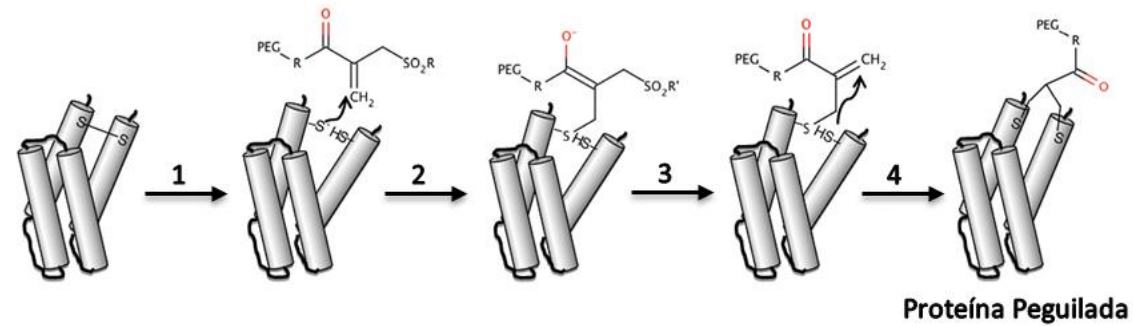
- Inserção de Cys exposta por meio de mutação sítio-dirigida.
- CIMZIA® = certolizumabe pegol – fragmento Fab de anticorpo anti-TNF α peguilado com PEG ramificado de 40 kDa – tratamento de artrite reumatóide e doença de Crohn (única proteína peguilada em grupo tiol aprovada).

(Turecek *et al.* 2016)



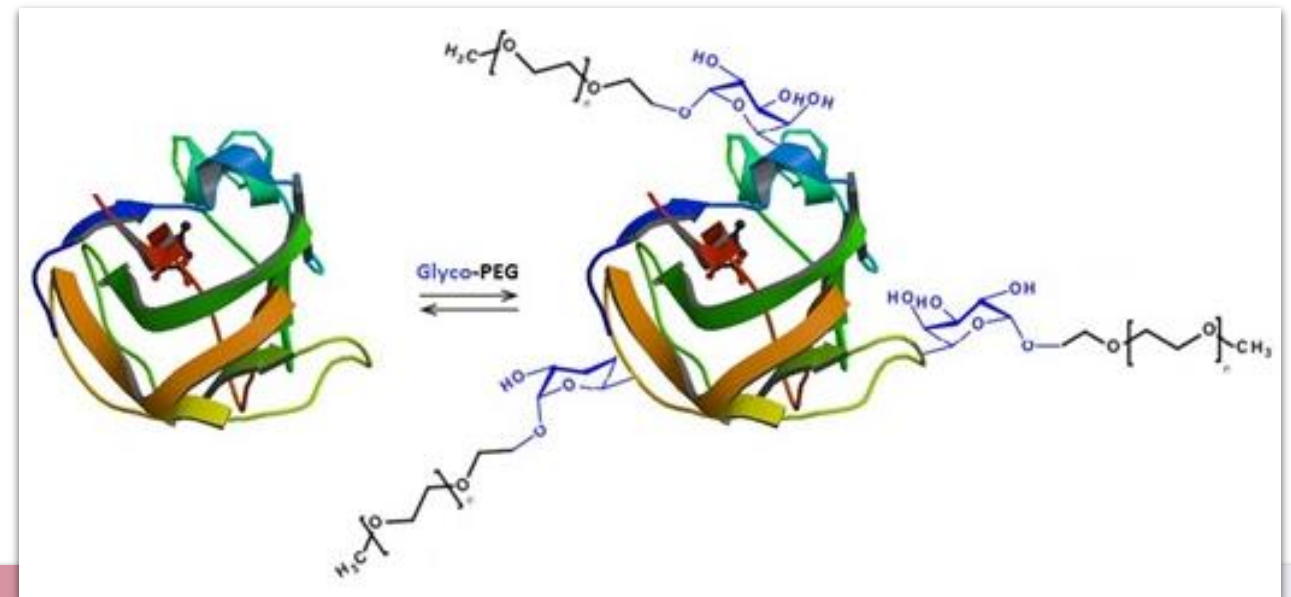
OUTRAS ESTRATÉGIAS DE PEGUILAÇÃO

- peguilação em pontes dissulfeto;



- Peguilação enzimática (transglutaminase catalisa reação entre Glu e grupamento amínico do PEG reativo)

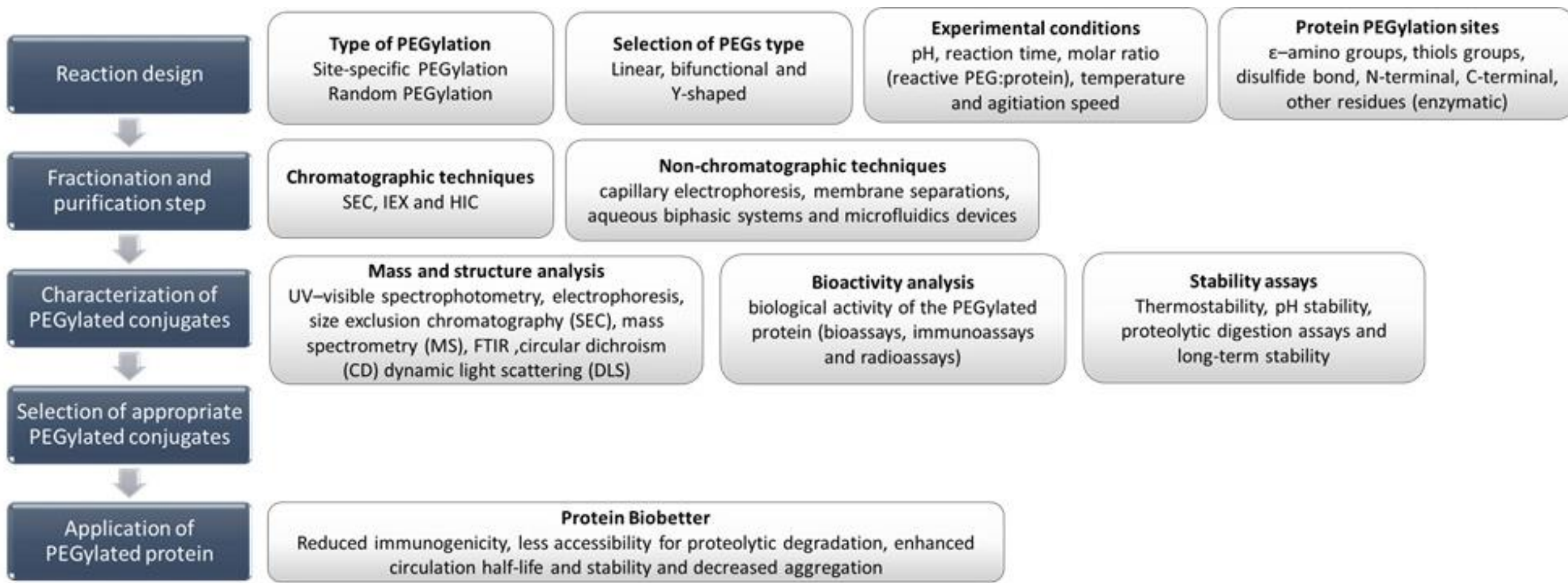
- Peguilação reversível (ex: glicoPEG)



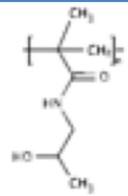
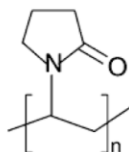
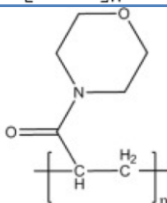
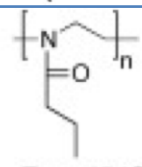
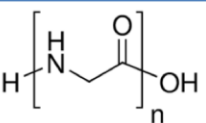
Brand name®	Company	PEG conjugates	PEGylation Type	Indication	Year of approval	
					USA	EU
Adagen	Sigma-Tau	Pegademase bovine	Random (5kDa linear PEG)	Severe combined immunodeficiency disease	1990	-
Oncaspar	Shire	Pegaspargase	Random (PEG linear 5kDa)	Leukemia	1994	-
PegIntron	Schering-Plugh	Peginterferon alfa-2b	Random (PEG linear 12kDa)	Hepatitis C	2001	2000
Pegasys	Hoffman- La Roche	Peginterferon alfa-2a	Random (PEG branched 40 kDa)	Hepatitis C	2002	2002
Neulasta	Amgen	Pegflgrastim	Selective N-terminal (PEG linear 20kDa)	Neutropenia	2002	2003
Somavert	Pfizer	Pegvisomant	Random (PEG linear 5kDa)	Acromegaly	2002	2003
Macugen	Eyeteck and Pfizer	Pegaptanib sodium	Selective one Lysine (PEG branched 40 kDa)	Neovascular age-related macular degeneration	2004	2006
Mircera	Hoffman -La Roche	mPEG-epoetin beta	Random (PEG linear 30kDa)	Anemia associated with chronic kidney disease	2007	2007
Cimzia	UCB Pharma	Certolizumab pegol	Selective Cys (PEG branched 40kDa)	Rheumatoid arthritis and Crohn's disease	2008	-
Krystexxa	Savient	Pegloticase (Uricase)	Random (PEG linear 10kDa)	Chronic gout	2010	2013
Omontys	Takeda Pharm. America	PEGinesatide	Random (PEG branched 40 kDa)	Anemia associated with chronic kidney disease	2012	-
Movantik	AstraZeneca	Naloxegol	Random (PEG linear 339Da)	Constipation induced by Opioids	2014	-
Plegridy	Biogen	Peginterferon beta-1	Selective N-terminal (PEG linear 20 kDa)	Multiple sclerosis	2014	-

Biofármacos peguilados aprovados

PEGUILAÇÃO – ESTABELECIMENTO DO PROCESSO IDEAL

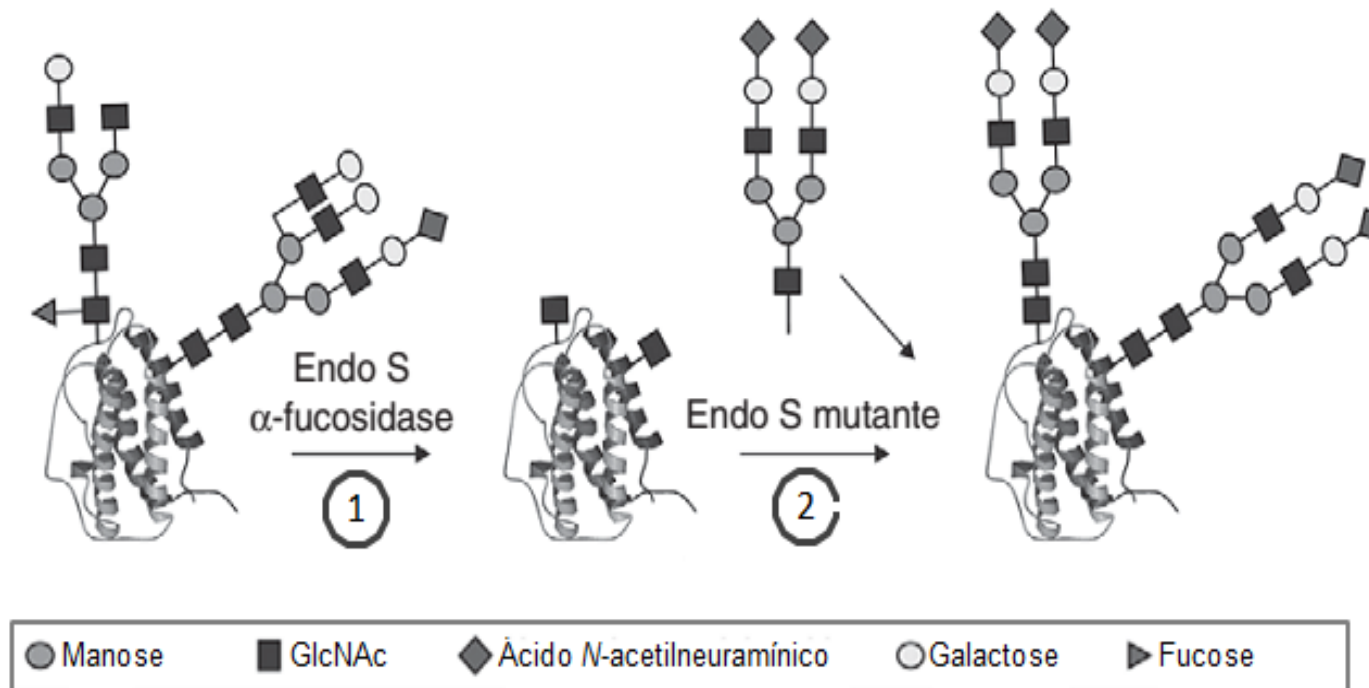


OUTROS POLÍMEROS EM ESTUDO PARA LIGAÇÃO A BIOFÁRMACOS

POLYMER	STRUCTURE	ADVANTAGE	DISADVANTAGE
HPMA		well circulation in blood plasma FDA approved stability against heat and autolysis	chronic toxicity associated with non-biodegradable polymers
PVP		water-soluble polymer FDA-approved	antibody production
pNAcM		easily modifiable thermoreponsive	antibody production
POx		high quality (low dispersity) not influenced in metabolic macrophages and phagocytic activity	chronic toxicity associated with non-biodegradable polymers
PG		water soluble low polydispersity linear or (hyper)branched longer in vivo circulation time compared to PEG	linear PG have rapid clearance

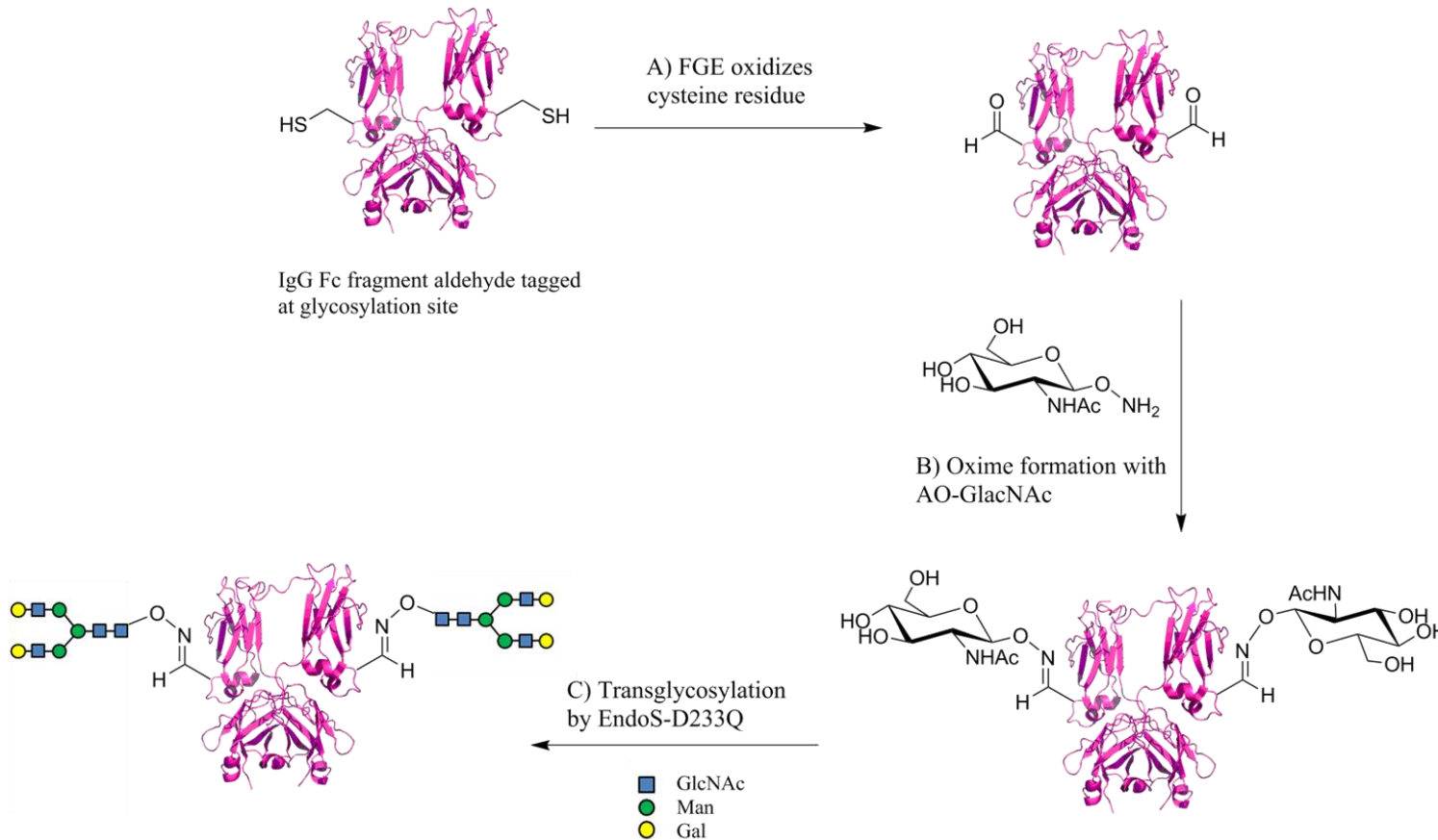
GLICOSILAÇÃO QUÍMICA

1- Glicosilação quimioenzimática *in vitro* por transglicosidase mutante:



GLICOSILAÇÃO QUÍMICA

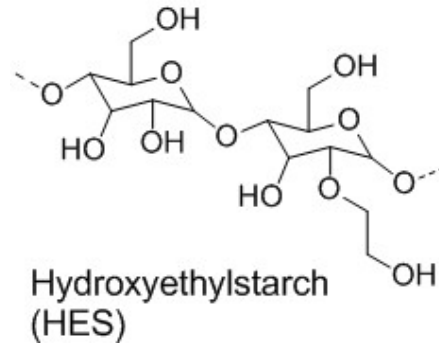
2- São identificados os sítios críticos para a atividade biológica, que são marcados via mutagênese sítio-dirigida (usualmente introdução de Cys) - Estes locais são então submetidos a uma reação seletiva com glicanos modificados, contendo grupos funcionais apropriados.



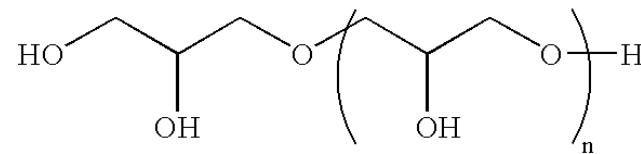
EXEMPLO: Aranesp® - eritropoietina alfa recombinante glicosilada (5 resíduos glicosilados ao invés de 3) – $T_{1/2}$ 3 vezes maior que a nativa quando administrada IV (Elliot et al., 2003).

CONJUGAÇÃO A OUTROS CARBOIDRATOS

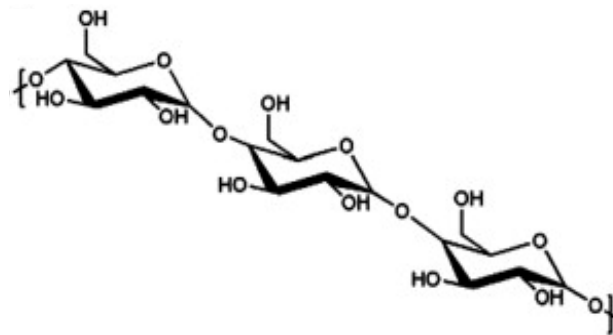
❖ HIDROXIETILAMIDO



❖ POLIGLICERÓIS



❖ DEXTRINAS



OBRIGADA!



<https://www.facebook.com/Nanobiolabusp/>

