

NANOBIOTECCNOLOGIA FARMACÊUTICA

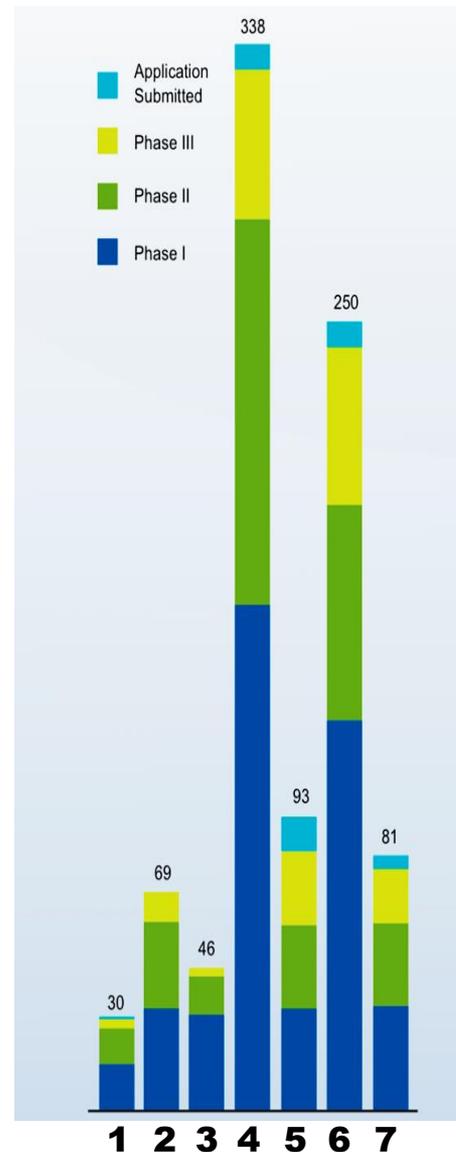
Profa. Carlota Rangel Yagui

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/em desenvolvimento?



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

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.

Primeiro biossimilar aprovado no Brasil

A aprovação do biossimilar Remsima (infiximabe) 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

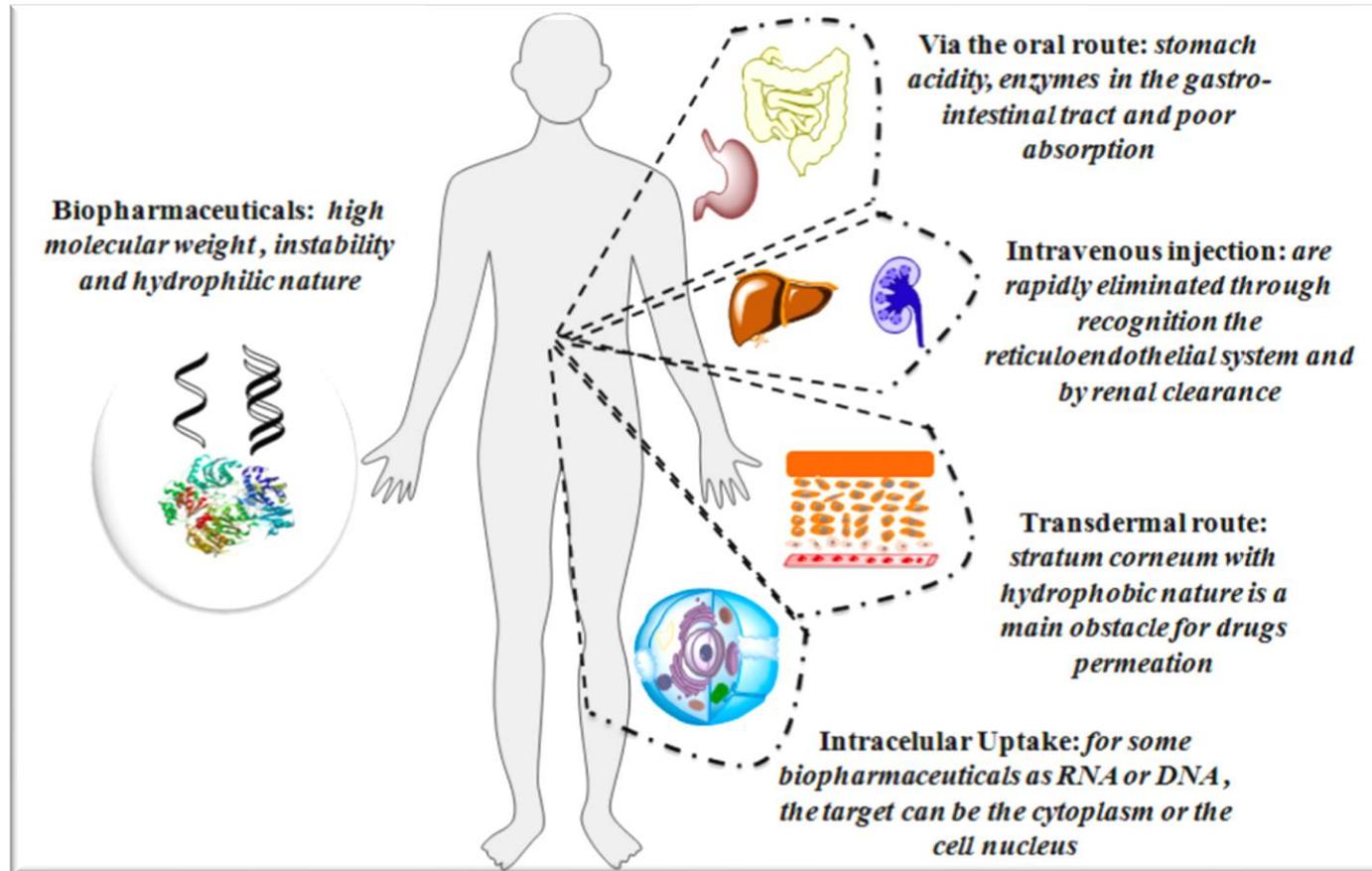
O medicamento, que já foi aprovado por órgãos reguladores em mais de 20 países, é um anticorpo monoclonal, ou seja, uma classe de moléculas que permite bloquear células específicas que deram origem a processos inflamatórios, doenças autoimunes e alguns tumores. A ação do medicamento é indicada para o 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

DESAFIOS PARA BIOFÁRMACOS



Rangel-Yagui et al., *Biomater. Sci.*, 2016,4, 205-218

**ESTRATÉGIAS
NANOBIOTECNOLÓGICAS**

O QUE É NANOBIOtecnologia?

Combinação das ideias,
ferramentas e materiais da
nanotecnologia e da
biotecnologia

Nanotecnologia aplicada às
ciências da vida



**nanotecnologia
inspirada na biologia:**

- enzimas artificiais
- nanobiosensores
- tecnologias do tipo
organ-on-chip

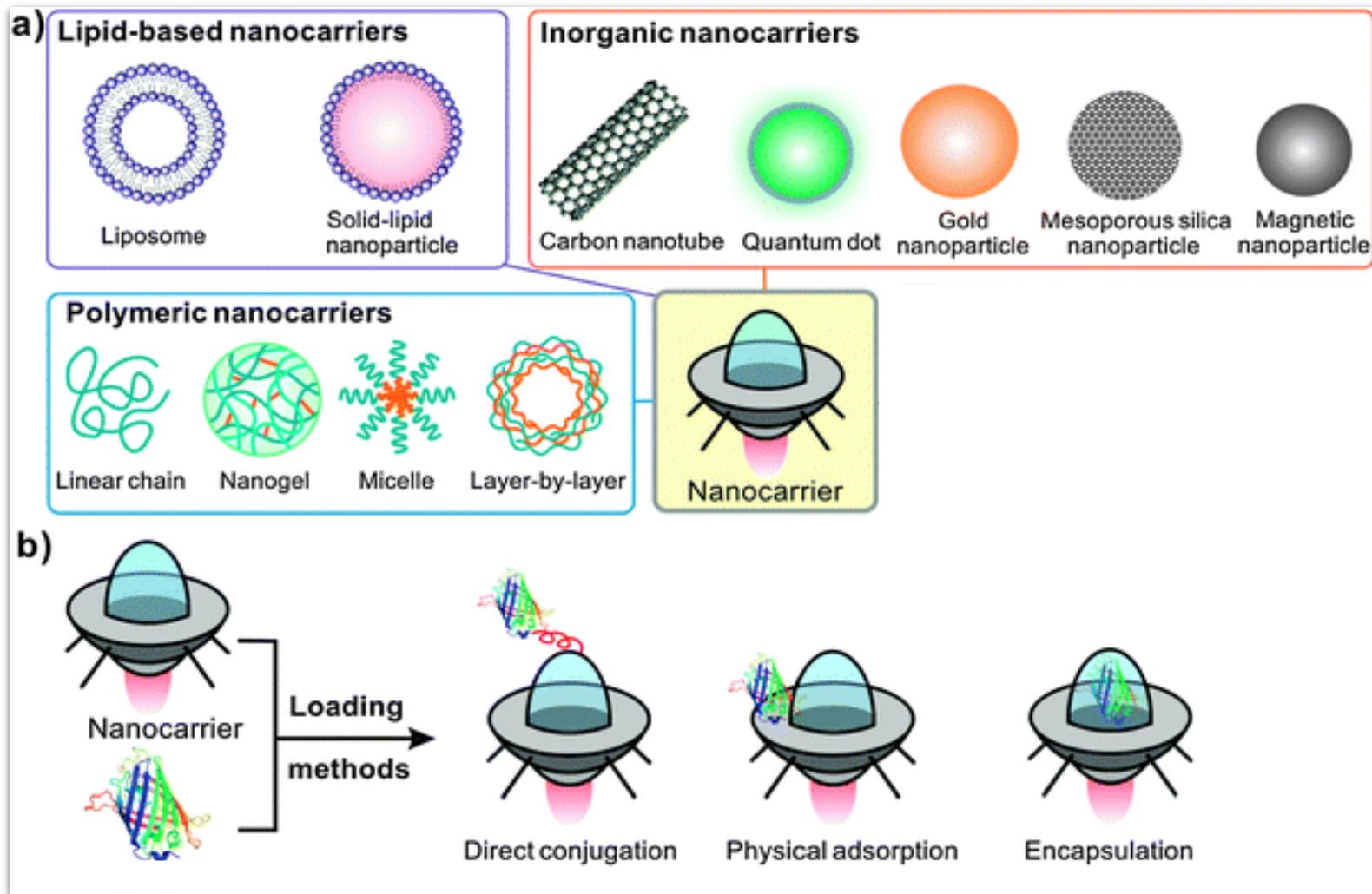
**aplicação da nanotecnologia para tratar problemas
biológicos:**

- Nanoestruturas em *drug delivery*
- Nanoestruturas em embalagens ativas e/ou inteligentes
para alimentos
- Nanoestruturas para biodefensivos agrícolas

NANOBIOTECNOLOGIA



NANOTRANSPORTADORES



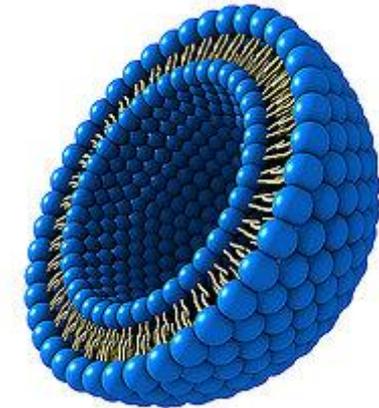
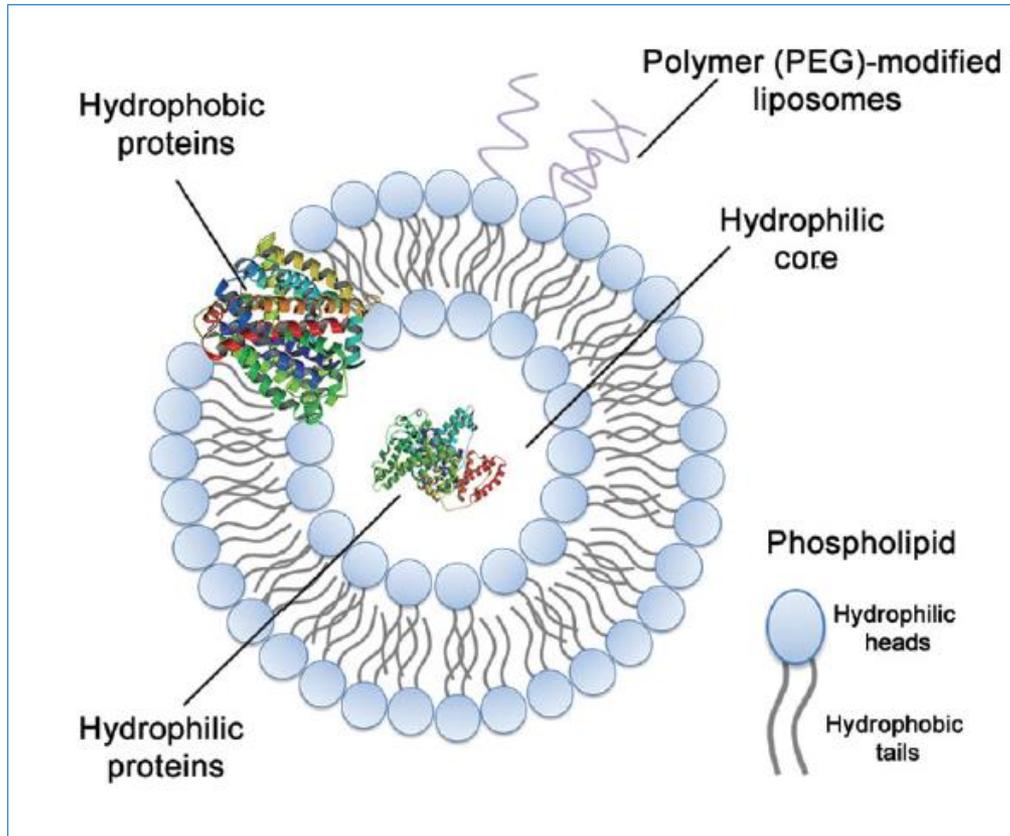
BIOMOLÉCULAS

- sensíveis ao pH e temperatura – limitação quanto ao processo de manufatura de certos nanotransportadores e métodos de encapsulação;
- Geralmente são grandes e hidrofílicas, portanto nanotransportadores de interior hidrofóbico não são adequados para encapsulação.

NANOTRANSPORTADORES PROMISSORES (para encapsulação)

Ex: Lipossomos, virossomos, polimerossomos, nanopartículas de hidrogel, nanocápsula de proteína única.

LIPOSSOMOS



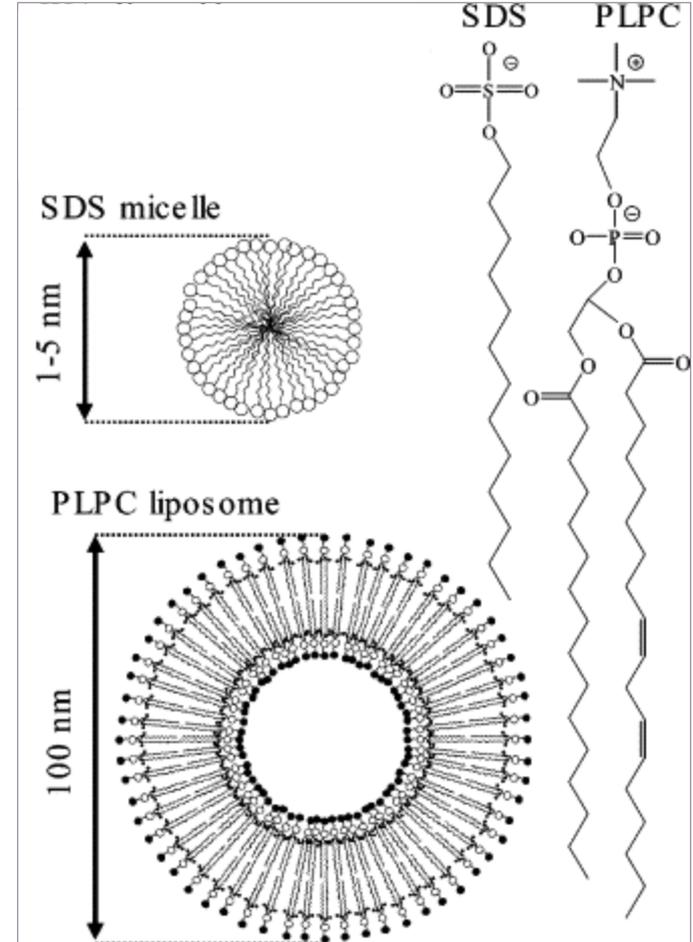
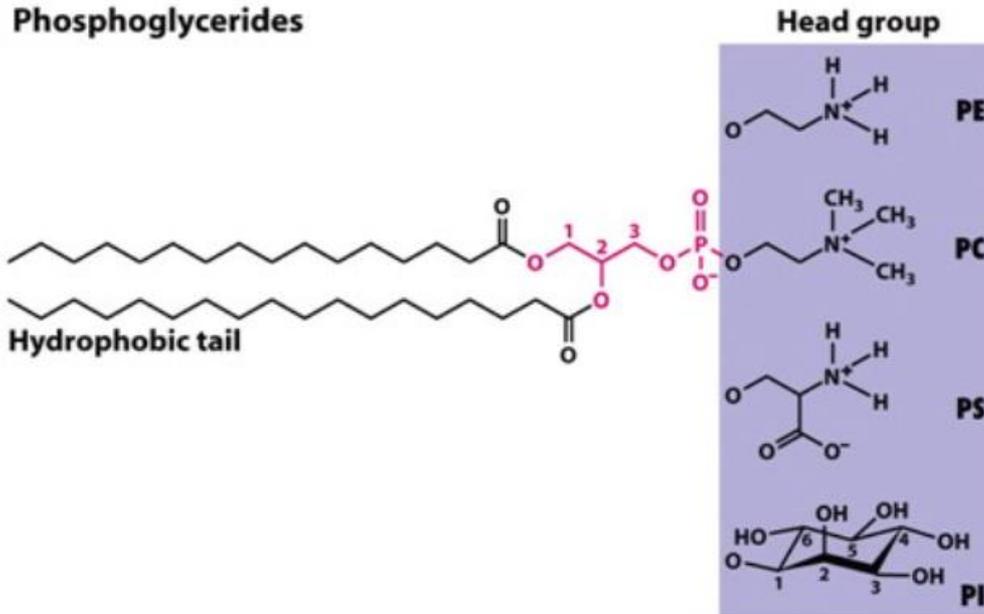
Rangel-Yagui et al., *Biomater. Sci.*, 2016,4, 205-218

- Facilmente reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear – alternativa = lipossomos peguados (furtivos ou *stealth*)
- Podem ser funcionalizados com anticorpos, glicoproteínas, aptâmeros, etc.

LIPOSSOMOS

- Fosfolipídios empregados

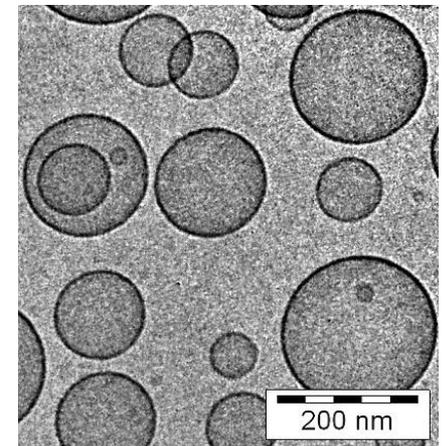
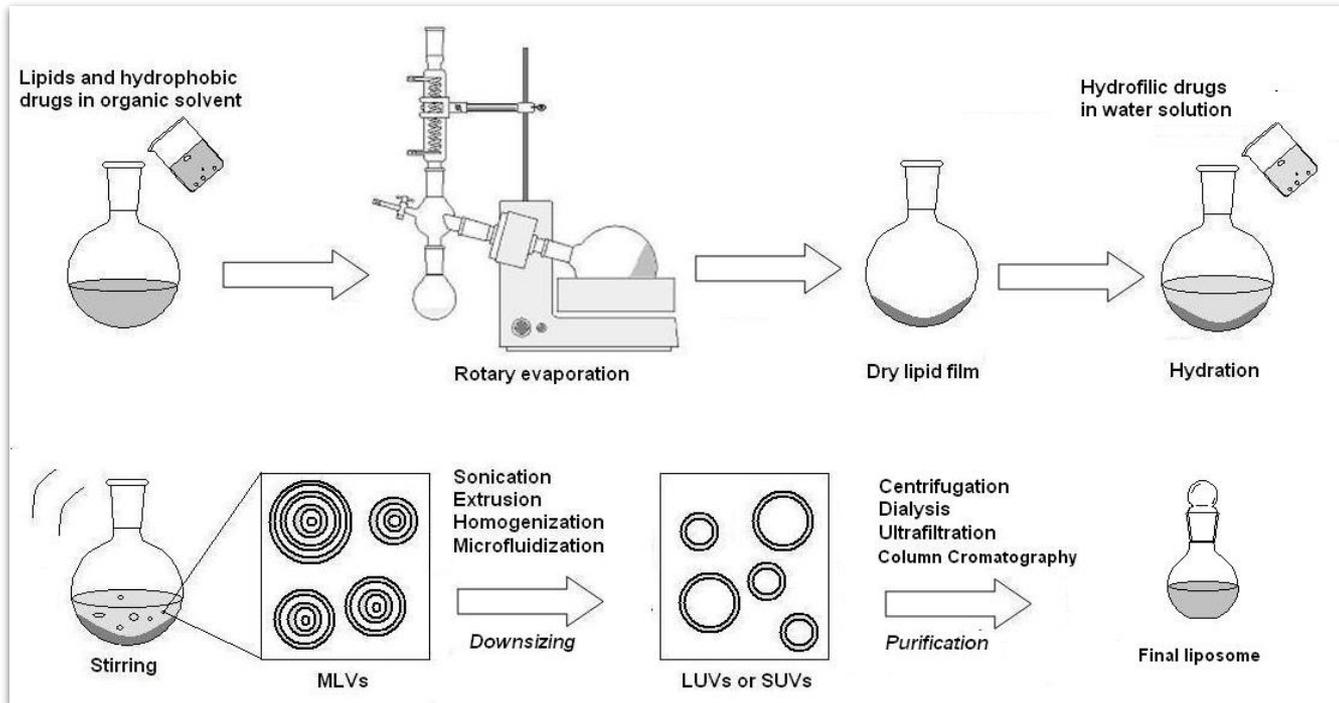
Phosphoglycerides



<https://slideplayer.com/slide/9254012/>

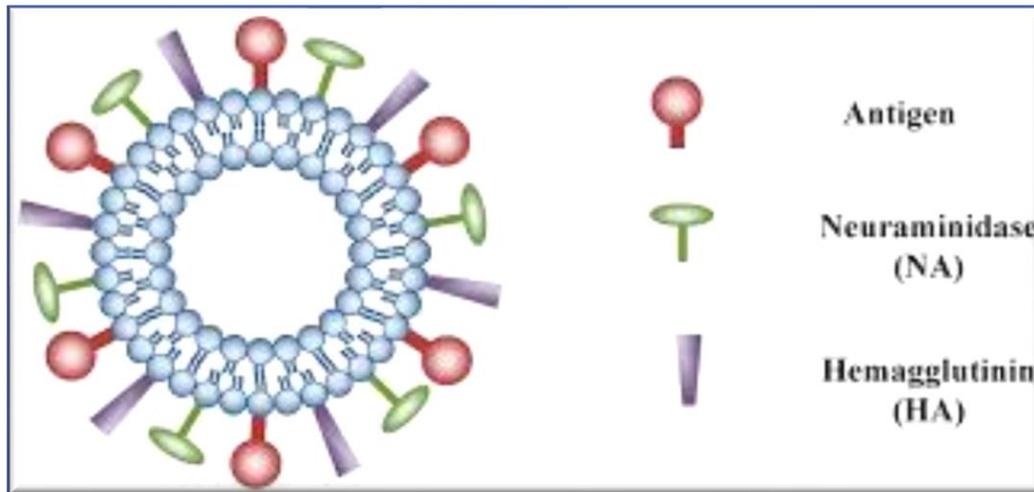
LIPOSSOMOS

- Ex. de Método de Preparo – hidratação do filme lipídico



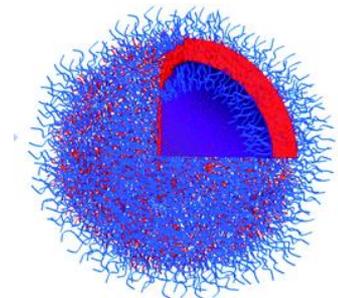
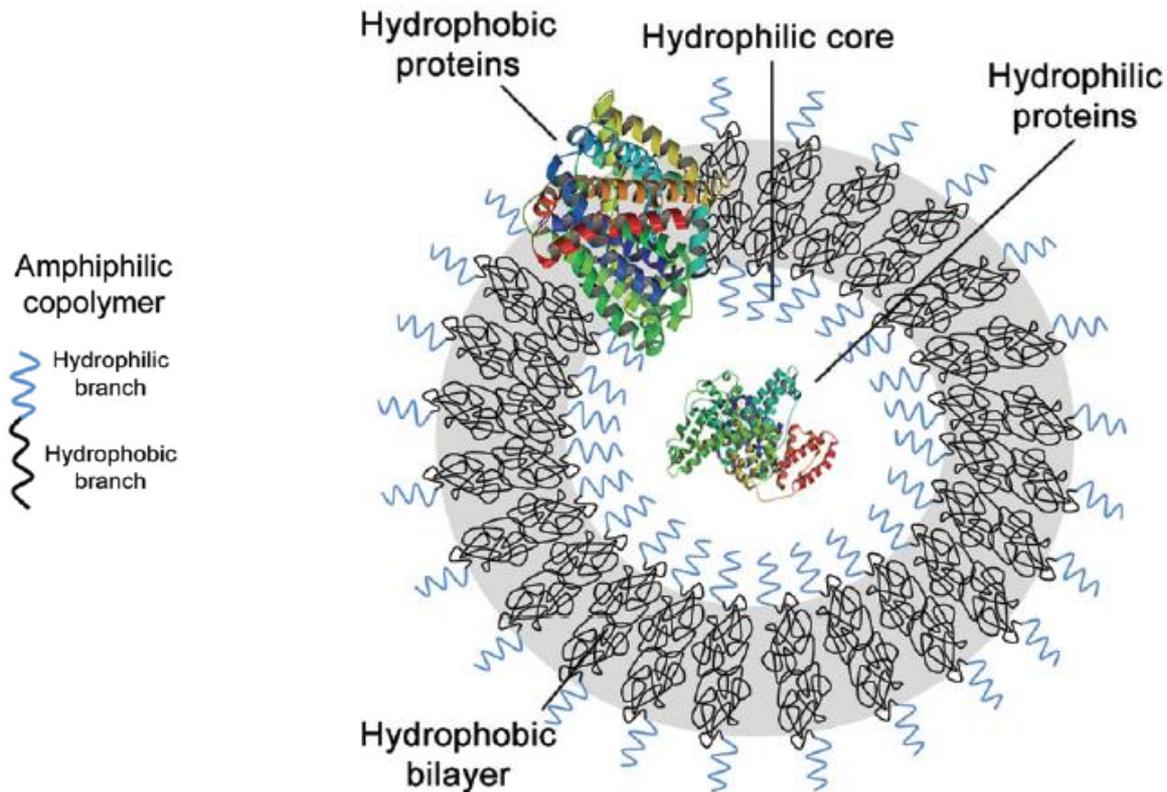
VIROSSOMOS

- ~ 150 nm
- Contém proteínas do envelope viral – permitem fusão com as células alvo – ligam-se à resíduos de ác. siálico na membrana cel.
- ideal para vacinação (antígeno viral) ou *delivery* de DNA/siRNA.
- Biodegradáveis, biocompatíveis.
- Ex - virossomo de influenza:



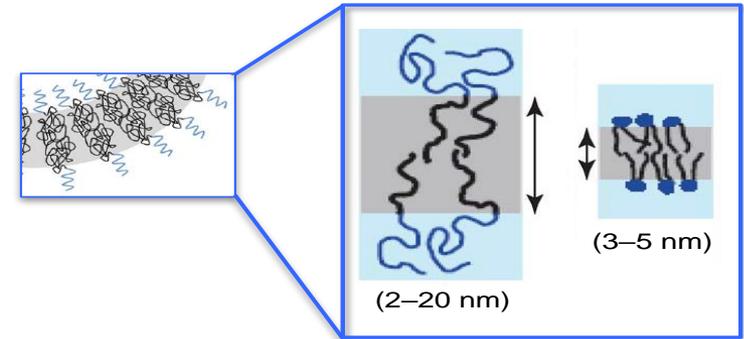
POLIMEROSSOMOS

- Vesículas constituídas por copolímeros anfifílicos
- Preparo semelhante à lipossomos



POLIMEROSSOMOS x LIPOSSOMOS

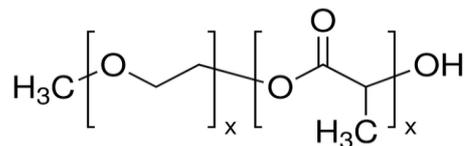
- polimerossomos são mais estáveis, robustos e menos permeáveis devido ao alto valor de MW dos copolímeros sintéticos empregados em sua constituição;



- facilidade de controle das propriedades como volume interior, espessura da membrana polimérica e permeabilidade;
- Polimerossomos são mais resistentes - cinética de desagregação mais lenta. São aproximadamente 10 x mais resistentes à micromanipulação do que lipossomos (importante para liofilização);
- Desenvolvimento de PS estímulo-responsíveis para o controle de liberação da carga (por permeabilidade da membrana) – responsíveis ao pH, temperatura, condições redox, campo magnético, força iônica, concentração de glicose.

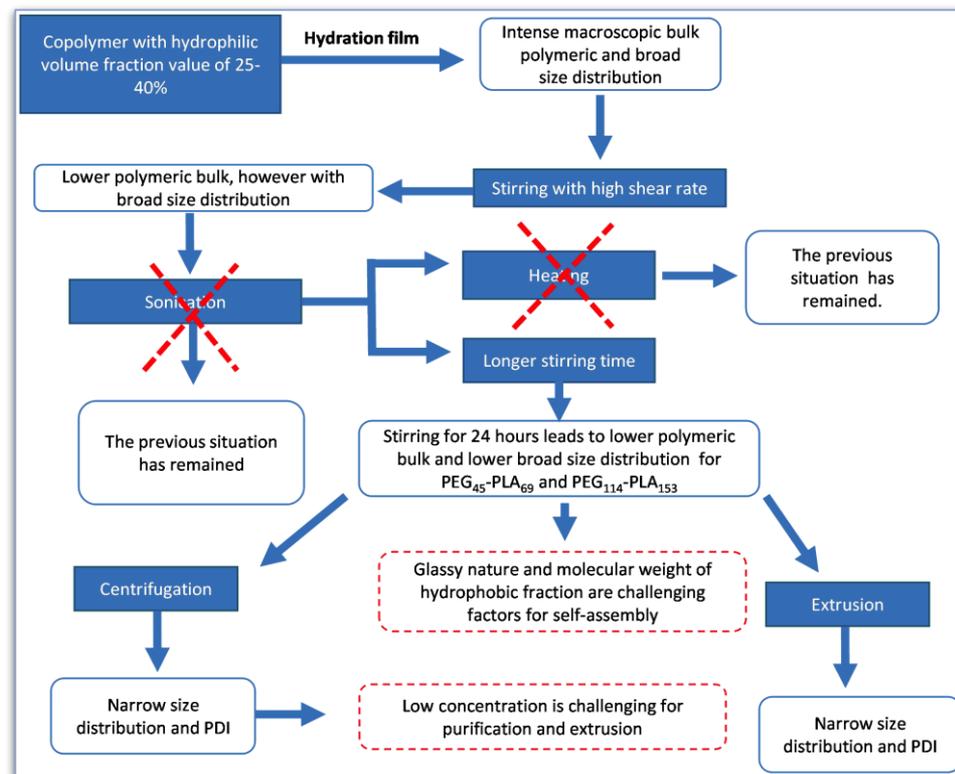
Challenges for the self-assembly of poly (ethylene glycol)–poly (lactic acid) (PEG-PLA) into polymersomes: beyond the theoretical paradigms

Alexsandra Conceição Apolinário¹, Monika S. Magoń², Adalberto Pessoa Jr.¹ and Carlota de Oliveira Rangel-Yagui^{1,*}

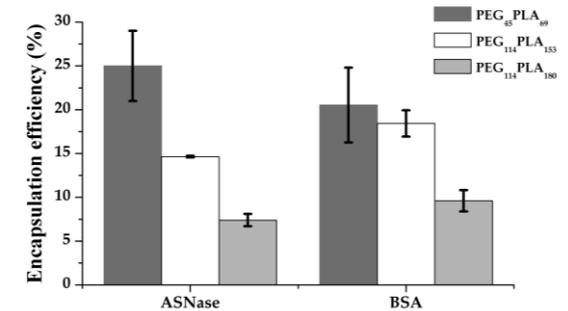
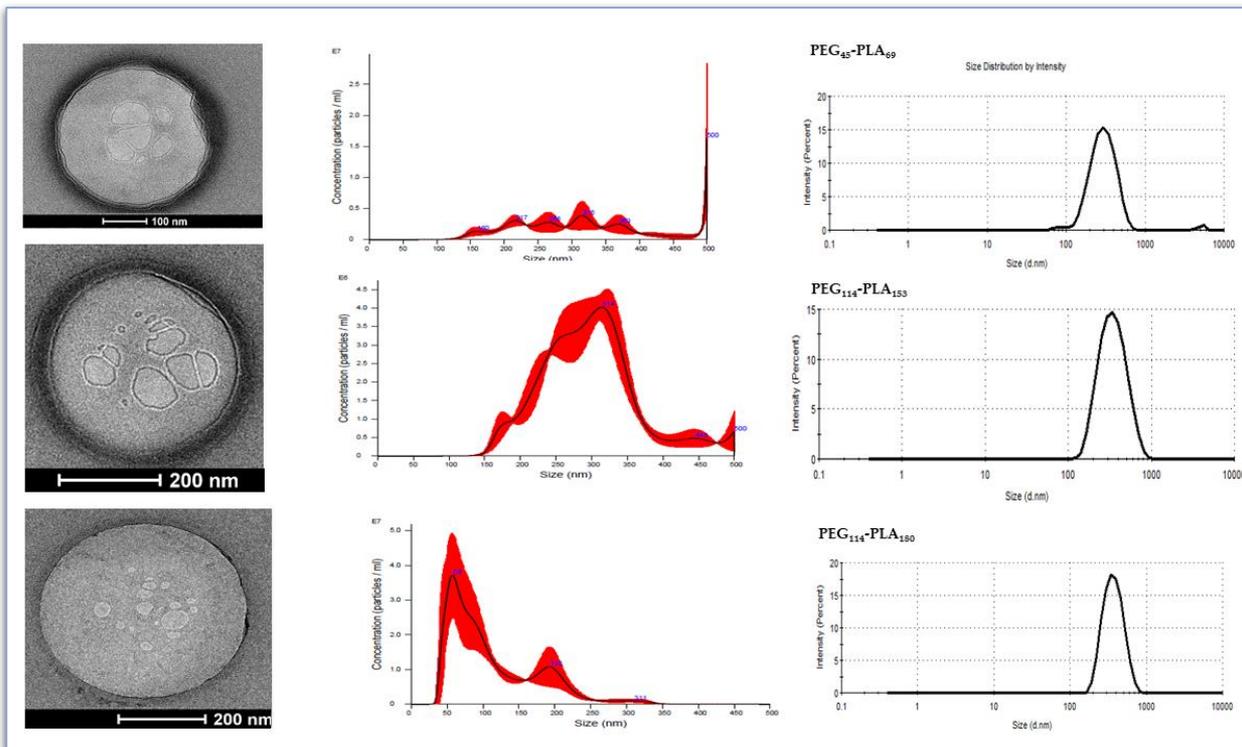


Poly(ethylene oxide)-poly-L-(lactic acid)

Copolymer	PEG-PLA Mn ^a	Glass transition temperature of hydrophobic block ^b	f ^{PEG}
PEG ₄₅ PLA ₆₉	PEG 2000: PLA 5000	23°C	0.28
PEG ₁₁₄ PLA ₁₅₃	PEG 5000: PLA 11000	39°C	0.30
PEG ₁₁₄ PLA ₁₈₀	PEG 5000: PLA 13000	40°C	0.27



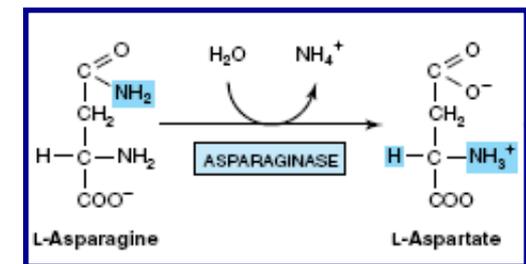
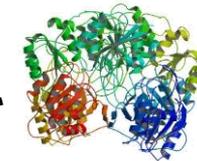
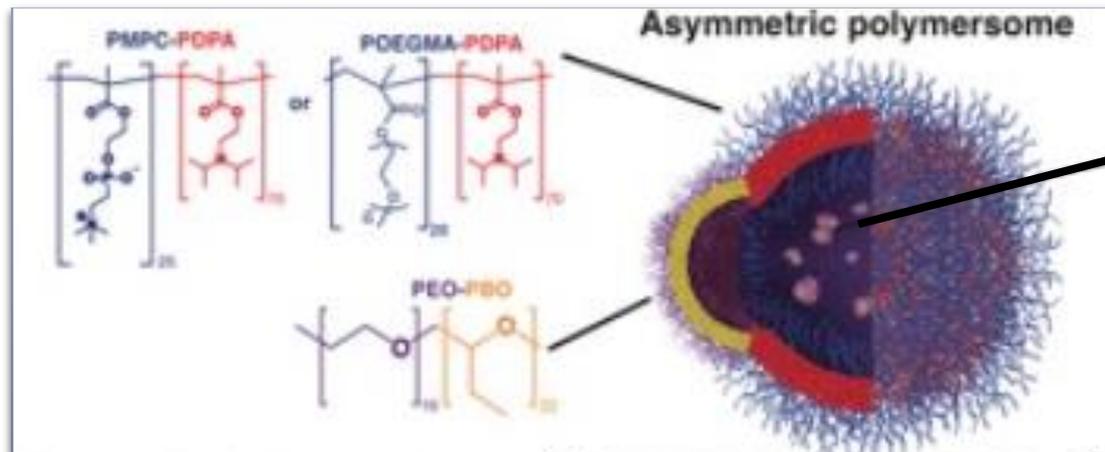
Challenges for the self-assembly of poly (ethylene glycol)–poly (lactic acid) (PEG-PLA) into polymersomes: beyond the theoretical paradigms



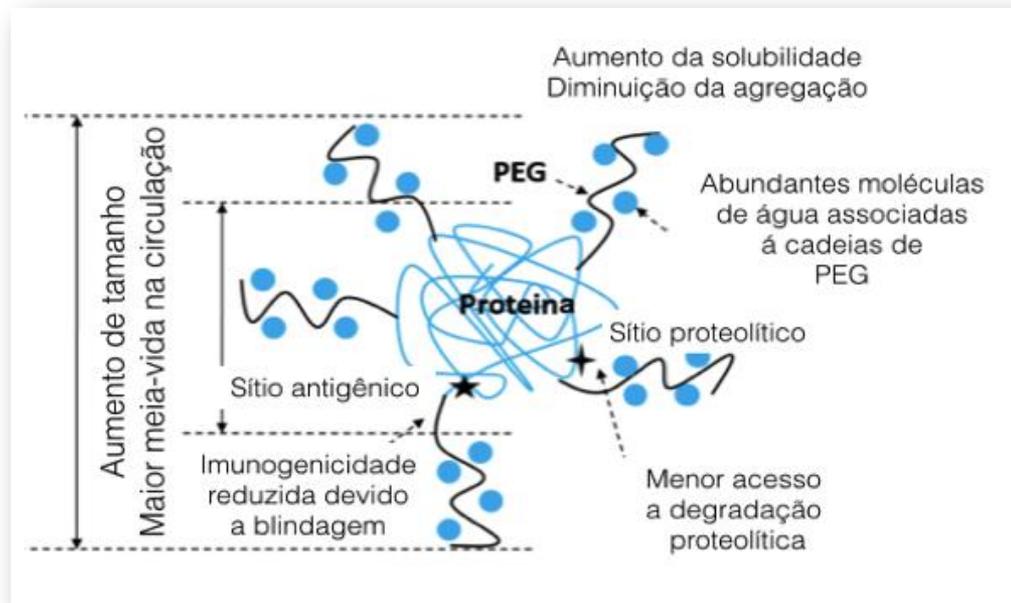
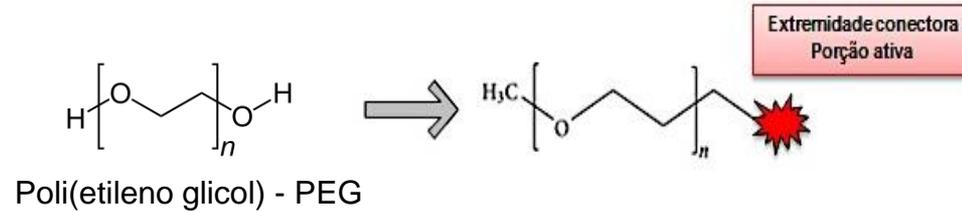
Copolímeros com valores de f_{PEG} menores resultaram em vesículas maiores e, portanto, maior EE% devido ao maior volume aquoso interno.

POLIMEROSSOMOS PERMEÁVEIS (NANORREACTORES)

- Vesículas assimétricas:
 - PMPC₂₅-PDPA₇₀ (Mw=21600 Da) (90% mol)
 - PEO₁₆-PBO₂₂ (Mw=1910 Da) (10% mol)

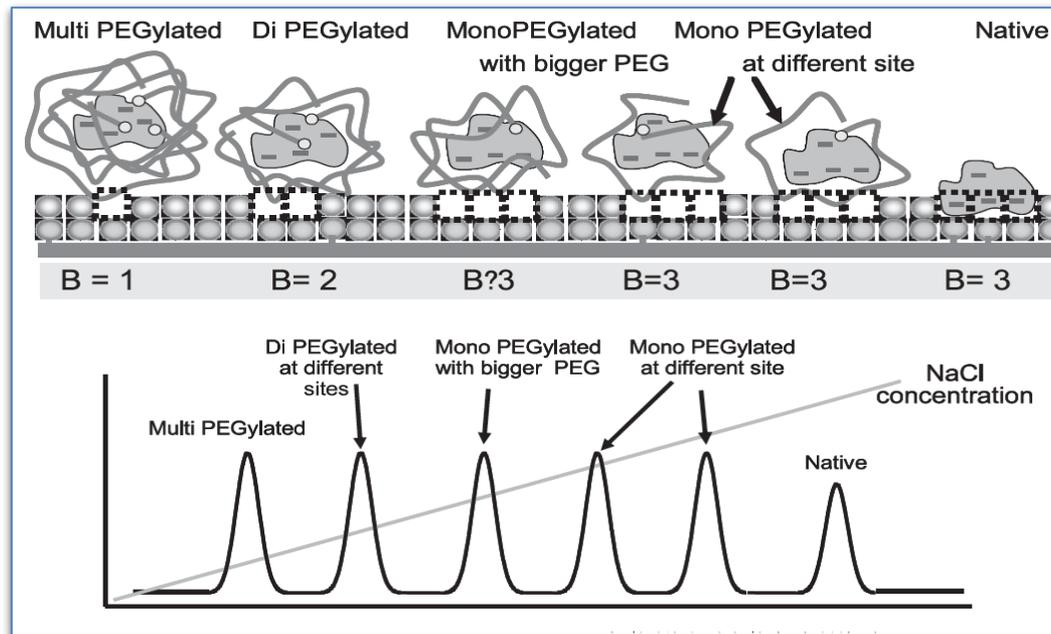


PEGUILAÇÃO



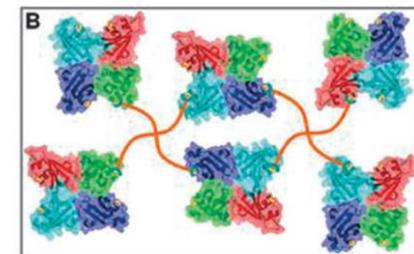
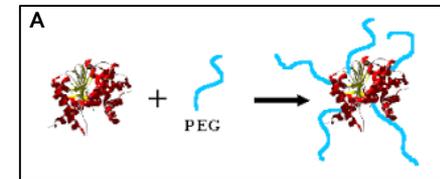
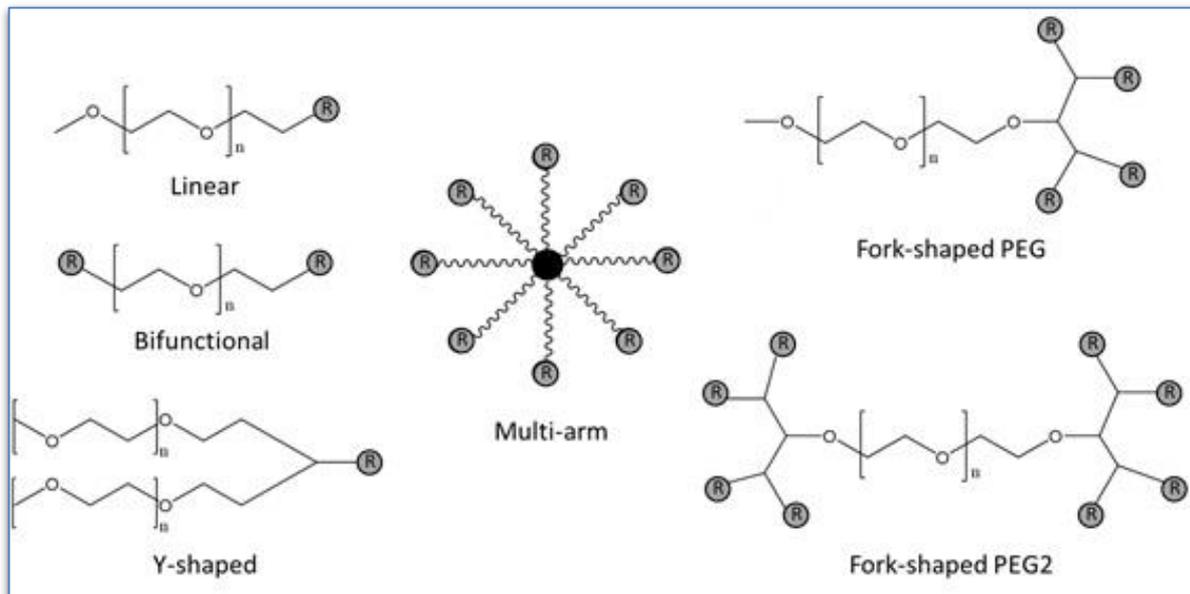
PEGUILAÇÃO

- Aleatória x sítio-dirigida
- Polidispersão x monodispersão

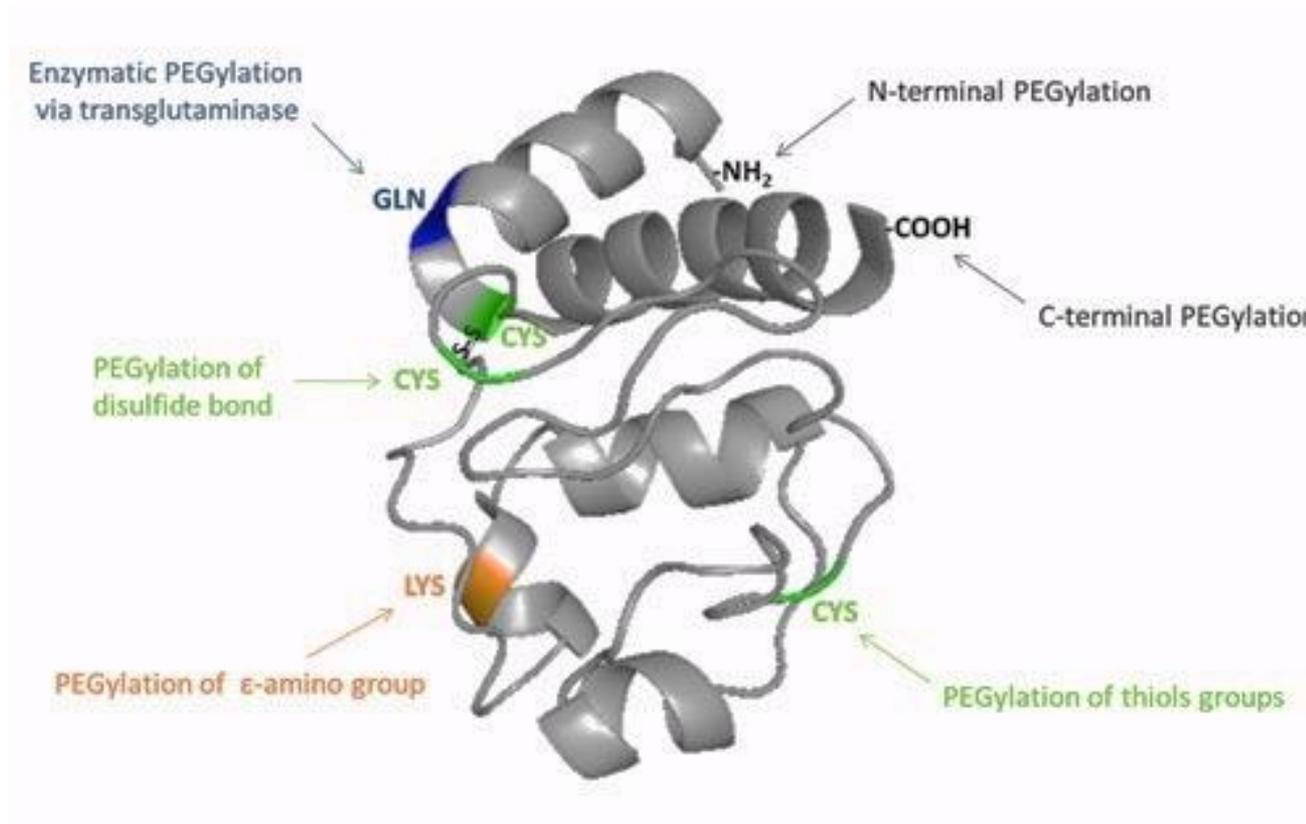


PEGUILAÇÃO

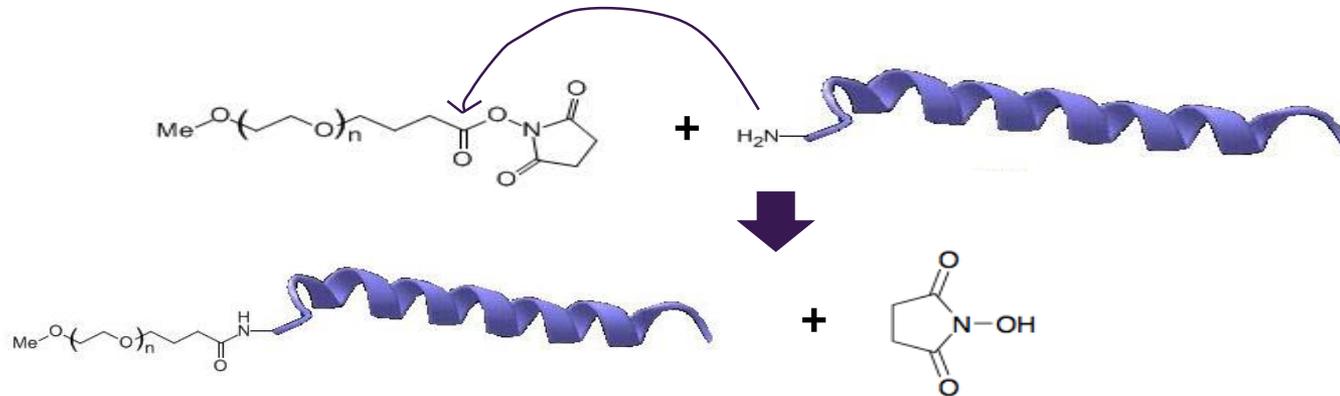
- Aleatória x sítio-dirigida
- Polidispersão x monodispersão
- Massa molar e geometria do polímero (linear ou ramificado)



PRINCIPAIS ESTRATÉGIAS DE PEGUILAÇÃO



PEGUILAÇÃO N-TERMINAL

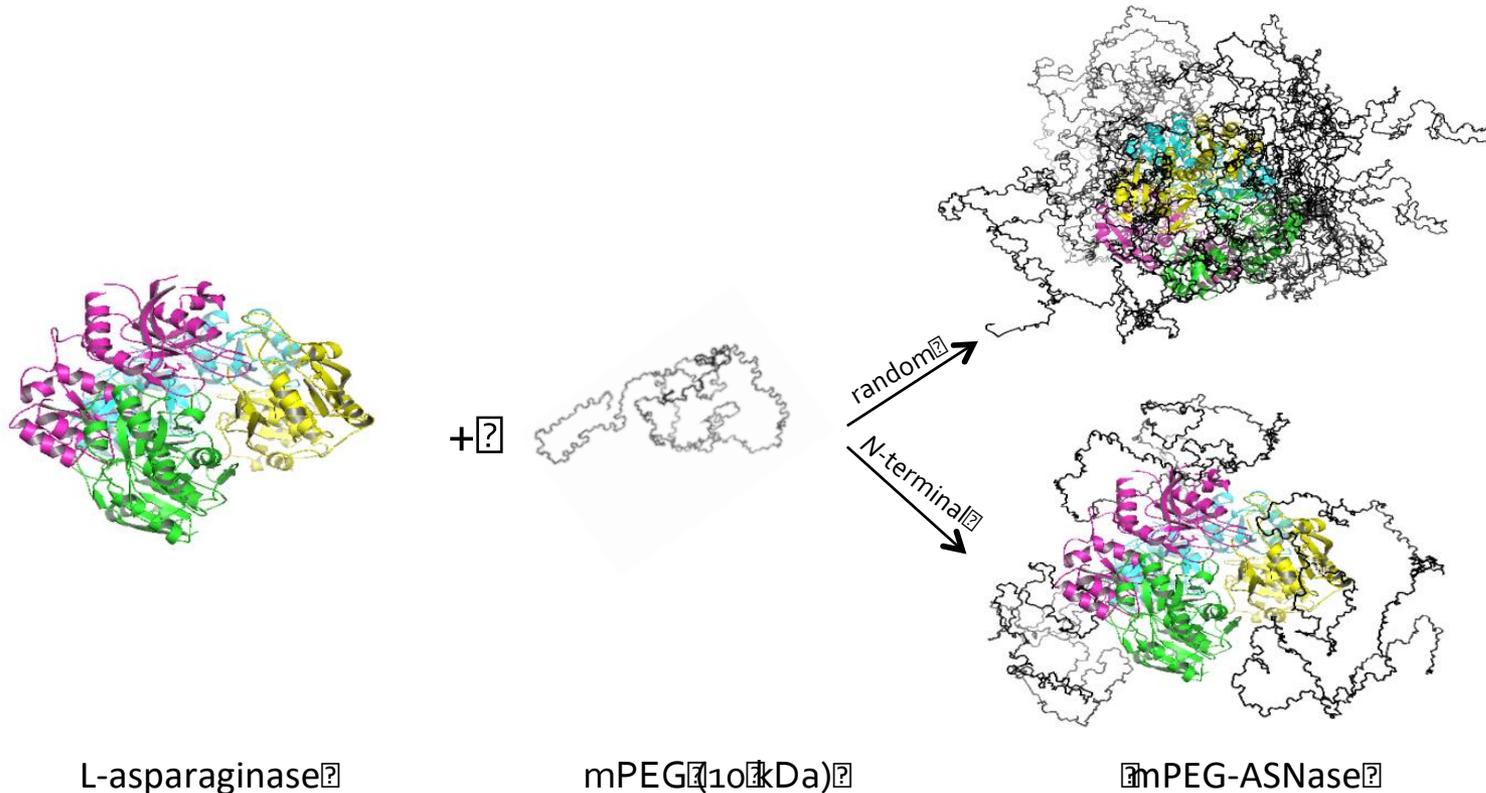


A peguilação N-terminal é considerada sítio-específica – **uma cadeia de PEG por monômero da proteína** – sendo que o número de cadeias de PEG é significativamente reduzido.

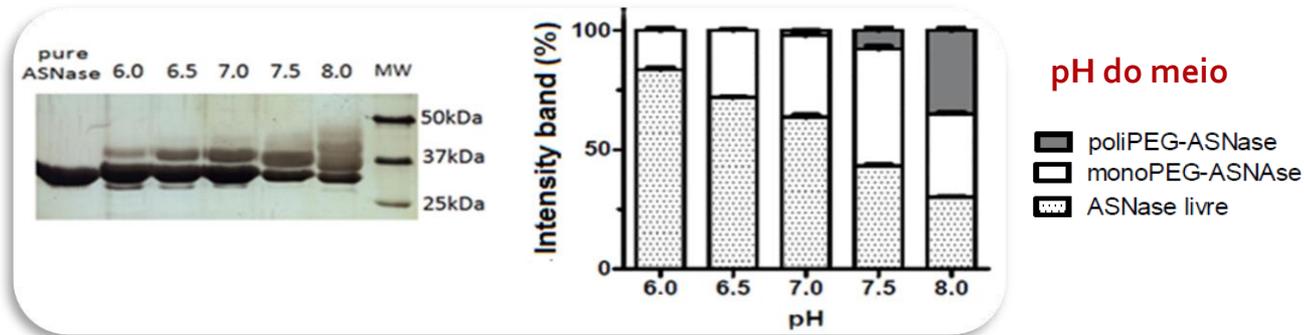
A seletividade é baseada na **diferença de pKa** entre resíduos de lisina ($pK_a \approx 10,5$) e a região N-terminal ($pK_a \approx 7,7$).

A determinação do pH ótimo de reação é extremamente importante.

PEGUILAÇÃO N-TERMINAL DA ASPARAGINASE

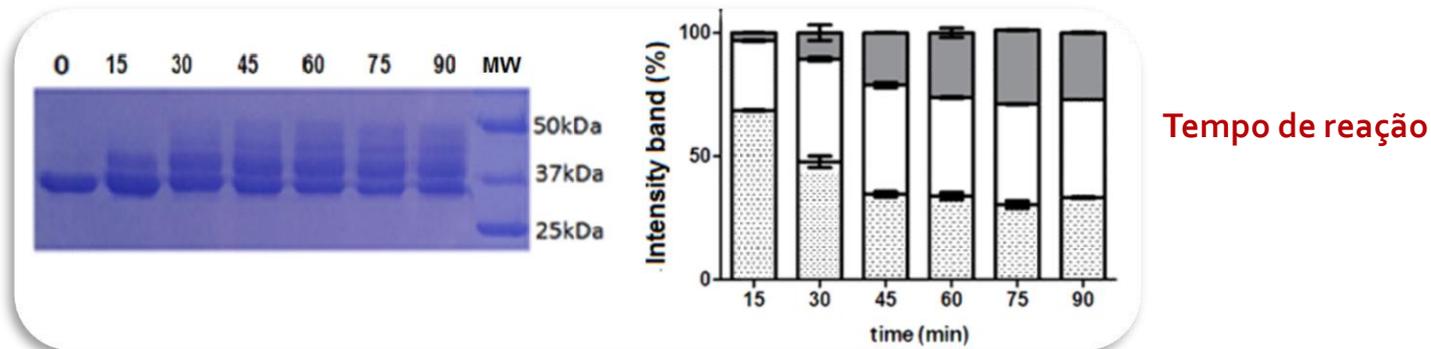


PEGUILAÇÃO N-TERMINAL DA ASPARAGINASE



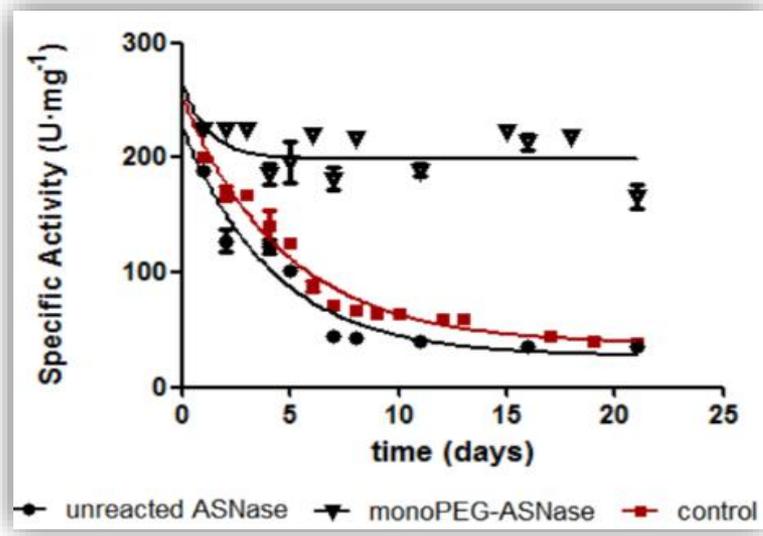
(tampão fosfato de sódio 100 mM, razão PEG:ASNase 25:1)

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

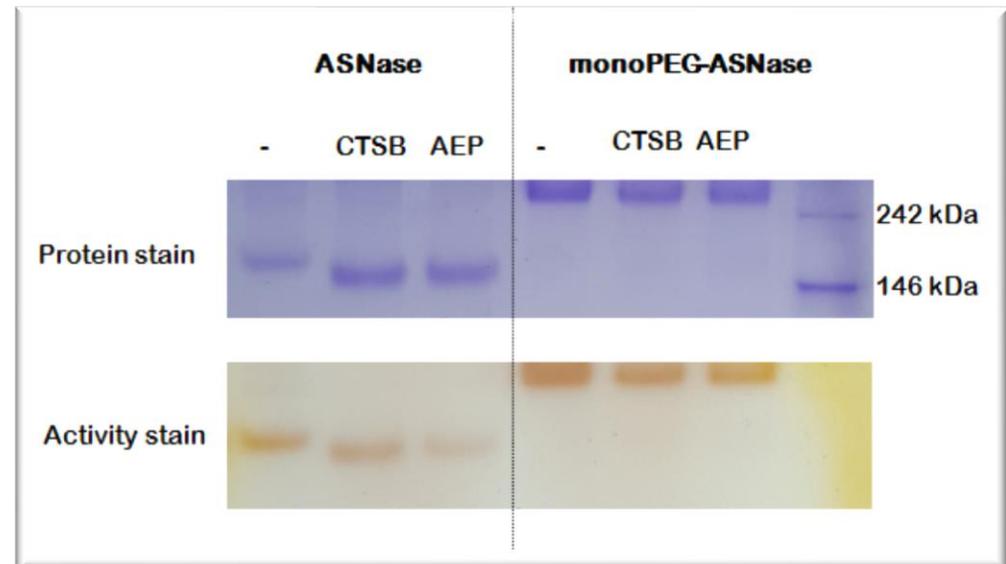


PEGUILAÇÃO N-TERMINAL DA ASPARAGINASE

Estabilidade por 21 dias (4 °C)

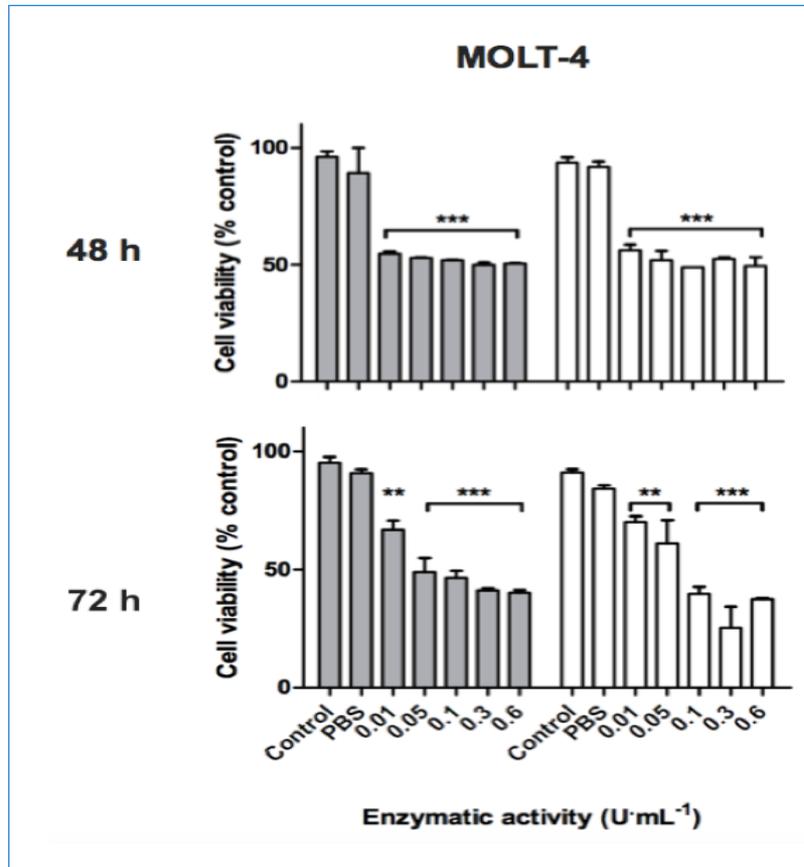


A peguilação confere resistência às proteases
catepsina B (CTSB) e asparaginil endopeptidase (AEP)



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

PEGUILAÇÃO N-TERMINAL DA ASPARAGINASE

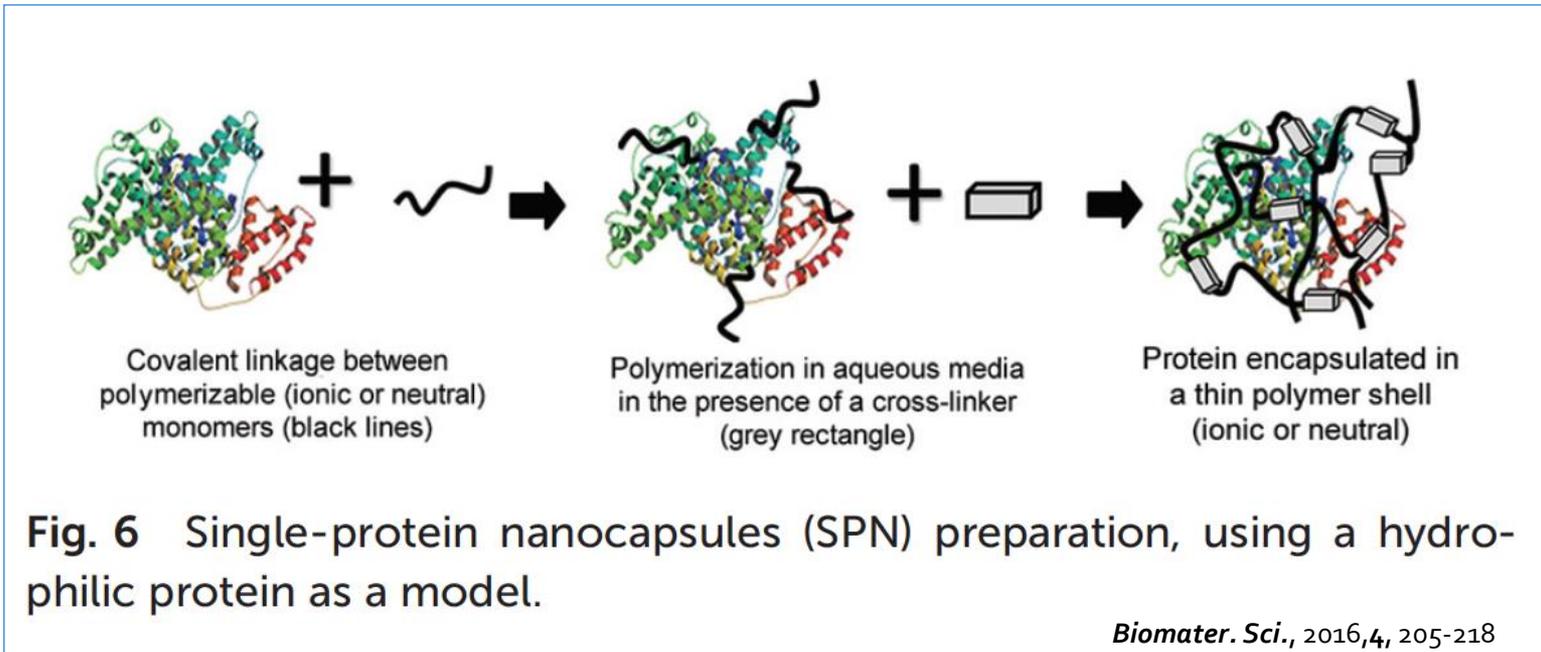


□ MonoPEG -ASNase

■ ASNase livre

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.

NANOCÁPSULA DE PROTEÍNA ÚNICA



- Do ponto de vista diagnóstico, SPN não degradáveis podem ser empregadas para detecção de tumores.
- Do ponto de vista da terapia, pode-se empregar um polímero positivamente carregado que confere penetração celular à proteína.

OBRIGADA!