

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**Bioencapsulação de Proteínas: Aplicações  
Terapêuticas**

**Ana Isabel Foles Gaiato Caldeira Curião**

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria Henriques Ribeiro,  
Professora Associada

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2022**



**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



# **Bioencapsulação de Proteínas: Aplicações Terapêuticas**

**Ana Isabel Foles Gaiato Caldeira Curião**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria Henriques Ribeiro,  
Professora Associada

**2022**

## Resumo

A bioencapsulação demonstrou ser eficaz em mimetizar o ambiente natural da célula e, deste modo, melhorar a eficiência da produção de vários compostos terapêuticos. Este processo tem um vasto campo de aplicação na biotecnologia e pode ser utilizado numa extensa variedade de patologias. Nas últimas décadas, a bioencapsulação apresentou uma enorme evolução. O objetivo deste trabalho é apresentar de forma detalhada, a bioencapsulação de proteínas terapêuticas e a sua aplicação na prática clínica.

A utilização da bioencapsulação em várias áreas, incluindo na biotecnologia, tem sido aplicada no desenvolvimento de sistemas de veiculação controlada de fármacos com resultados promissores no aumento da sua estabilidade e eficácia de várias substâncias.

As proteínas terapêuticas são utilizadas com o objetivo de mimetizar as funções de proteínas endógenas, como hormonas e fatores de crescimento que regulam vários processos fisiológicos no organismo. Há uma abordagem às características destas proteínas terapêuticas, a estratégias que possivelmente consigam modular a sua farmacocinética e farmacodinâmica, aos métodos e aos materiais utilizados na sua bioencapsulação.

Atualmente recorremos aos métodos de encapsulação para melhorar a estabilidade, eficácia e segurança de uma determinada substância encapsulada. Este método é escolhido tendo em conta as propriedades do material que vai ser encapsulado, a sua futura aplicação e as características idealizadas para a sua libertação. Neste trabalho, são abordados os métodos de pequificação, hiperglicosilação e formação de micro e nanopartículas, mais concretamente hidrogeles e partículas lipídicas. São descritos os seus processos de formação, as suas vantagens e limitações e, ainda as suas aplicações na terapêutica.

A utilização da bioencapsulação em várias áreas, incluindo na biotecnologia, tem sido aplicada no desenvolvimento de sistemas de veiculação controlada de fármacos com resultados promissores no aumento da sua estabilidade e eficácia de várias substâncias, que pode levar ao desenvolvimento de novos produtos inovadores em vários campos.

Palavras-chaves: Bioencapsulação, Proteínas Terapêuticas, Pequificação, Glicosilação

## **Abstract**

Bioencapsulation has been shown to be effective in mimicking the cell's natural environment and thereby improving the efficiency of production of various therapeutic compounds. This process has a wide field of application in biotechnology and can be used in a wide variety of pathologies. In recent decades, bioencapsulation has evolved enormously. The objective of this work is to present in detail the bioencapsulation of therapeutic proteins and their application in clinical practice.

The use of bioencapsulation in several areas, including biotechnology, has been applied in the development of controlled drug delivery systems with promising results in increasing the stability and efficacy of various substances.

Therapeutic proteins are used with the aim of mimicking the functions of endogenous proteins, such as hormones and growth factors that regulate various physiological processes in the body. There is an approach to the characteristics of these therapeutic proteins, to strategies that possibly manage to modulate their pharmacokinetics and pharmacodynamics, to the methods and materials used in their bioencapsulation.

Currently, we resort to encapsulation methods to improve the stability, efficacy and safety of a particular encapsulated substance. This method is chosen taking into account the properties of the material to be encapsulated, its future application and the characteristics idealized for its release. In this work, we refer to the methods of PEGylation, hyperglycosylation and formation of micro and nanoparticles, more specifically hydrogels and lipid particles. Its training processes, its advantages and limitations, and also its applications in therapy are described.

The use of bioencapsulation in several areas, including biotechnology, has been applied in the development of controlled drug delivery systems with promising results in increasing the stability and efficacy of various substances, which can lead to the development of new innovative products in various fields.

**Keywords:** Bioencapsulation, Therapeutic Proteins, PEGylation, Glycosylation

## **Abreviaturas**

C3 – Componente 3 do Complemento

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

HPN – Hemoglobinúria paroxística noturna

IL-2 – Interleucina 2

mPEG – Metox-PEG

NPs – Nanopartículas

PEG – Polietilenoglicol

PLGA – Poli(ácido D,L-láctico-glicólico)

PLA – Ácido poliacrílico

PVA – Ácido polivinílico

PVD – Glicol polietileno

PAM – Pirrolidona polivinílico

PSA – Ácido Polissialico

SLNs – Nanopartículas lipídicas sólidas

SOD – Superóxido Dismutase

UE – União Europeia

## Índice

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	10
3. PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS .....	11
3.1. CARACTERÍSTICAS .....	11
3.2. FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA.....	11
4. BIOENCAPSULAÇÃO.....	13
4.1. Encapsulação física.....	13
4.2. Encapsulação através da ligação covalente .....	14
4.3. Micropartículas e Nanopartículas .....	14
4.3.1. Hidrogeles .....	14
4.3.1.1. Mecanismo de encapsulação de proteínas em hidrogeles .....	15
4.3.1.2. Aplicações dos hidrogeles em bioencapsulação de proteínas terapêuticas..	16
4.3.2. Partículas lipídicas para encapsulação de proteínas.....	17
4.3.2.1. Formação de lipossomas .....	17
4.3.2.2. Formação de nanopartículas sólidas lipídicas.....	19
4.3.2.3. Aplicações terapêuticas da bioencapsulação em partículas lipídicas .....	21
4.4. Conjugação de proteínas com PEG .....	21
4.4.1. Processo de pegulação .....	22
4.4.2. Alterações nas propriedades farmacêuticas de proteínas conjugadas com PEG	23
4.4.3. Proteínas com PEG na terapêutica.....	24
4.5. Hiperglicosilação de proteínas.....	26
4.5.1. Processo de hiperglicosilação .....	26
4.5.1.1. Papel do ácido polissialico na hiperglicosilação.....	27
4.5.1.2. Mutagênese direcionada ao local na glicosilação .....	28
4.5.2. Aplicações da hiperglicosilação nas proteínas terapêuticas.....	28
5. CONCLUSÃO .....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31

## **Índice de Figuras**

Figura 1. Barreiras que impedem a biodisponibilidade e/ou eficácia da proteína terapêutica..	12
Figura 2. Evolução dos fármacos pequilados nos últimos anos.....	26

## 1. Introdução

A administração controlada de fármacos evoluiu rapidamente nos últimos anos com a introdução de novos biomateriais e tecnologias que podem ser aplicadas em várias áreas das ciências farmacêuticas e biomédicas. Concretamente, com o aparecimento das proteínas terapêuticas, ocorreu a necessidade de sistemas de veiculação controlada com a capacidade de melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das proteínas.

Atualmente, estas moléculas são utilizadas na terapêutica de várias doenças, mas também na área de engenharia de tecidos, onde a produção de sinais biomoleculares mimetiza as condições dos tecidos naturais e promovem a comunicação intercelular, mostrou ser importante para reparar e substituir os tecidos de forma eficaz. A engenharia de tecidos é fundamental para o seu crescimento, combinando células e materiais de engenharia com biomoléculas sinalizadoras. Estes sinais biomoleculares são constituídos por fatores de crescimento, citocinas ou proteínas de adesão que devem ser transportados na sua forma ativa e com um perfil de libertação prolongada.

A eficácia das proteínas terapêuticas na sua forma livre é limitada pela sua baixa estabilidade e permeabilidade da membrana celular, ao encapsularmos proteínas fazemos com que estas limitações sejam ultrapassadas.

Relativamente à bioencapsulação de proteínas é preciso conhecer quais são os principais métodos utilizados neste processo de encapsulação e que diferenças existem entre a administração da proteína encapsulada e da proteína livre (1).

Um dos materiais mais promissores para a engenharia de tecidos são os hidrogéis e as nanopartículas lipídicas, como os lipossomas que ao encapsularem determinados compostos conseguem fazer com que a sua veiculação seja direcionada até ao local desejado, sem que ocorra a degradação da proteína, por exemplo.

Ainda a conjugação de proteínas com o polímero PEG e a glicosilação das mesmas na bioencapsulação é uma área relevante para ultrapassar alguns dos desafios impostos pelos sistemas de veiculação, melhorando características físicas e químicas das moléculas de interesse.

## **2. Materiais e Métodos**

Para a elaboração desta monografia recorri à plataforma do Pubmed e do Google Académico, onde obtive informação credível e com impacto científico proveniente de artigos, livros e revistas.

Um dos objetivos foi utilizar bibliografia o mais recente possível, para manter esta monografia atualizada. No entanto, recorri a alguns artigos mais antigos, tendo sempre em conta a sua veracidade atual, para consultar definições e ter termo de comparação em alguns métodos de produção utilizados.

A utilização de determinadas palavras-chave como proteínas terapêuticas, bioencapsulação, hidrogel, lipossoma, nanopartículas lipídicas sólidas, pequiação, glicosilação e aplicação terapêutica foi fundamental para obter informação precisa e focada no objetivo deste trabalho.

## **3. Proteínas Terapêuticas**

### **3.1. Características**

As proteínas apresentam inúmeras vantagens na sua utilização na terapêutica, daí serem um dos principais focos na indústria biotecnológica. Incluem anticorpos monoclonais, citocinas, fatores de crescimento e hormonas.

Da perspetiva terapêutica, a elevada especificidade e a relação dose/eficácia relativamente baixa conferem vantagem na utilização das proteínas.

Para além de todos os benefícios, também apresentam desvantagens que têm que ser abordadas para não limitarem a aceitação do médico e do doente nesta terapêutica. A baixa biodisponibilidade oral e transdérmica, reduzida semi-vida e instabilidade físico-química são exemplos disso. Uma maneira de ultrapassar estes problemas, seria criar um sistema que disponibilize a proteína continuamente, mantendo assim a sua concentração dentro do intervalo terapêutico durante um período de tempo prolongado. Esta solução apresenta vantagens, como a proteção da proteína da degradação ou eliminação (1,2)

As proteínas terapêuticas ficam à disposição das barreiras significativas que são impostas pela administração oral. Assim, a hipótese predominante para o desenvolvimento de sistemas de veiculação de substâncias ativas à base de proteínas é que a sua administração seja parentérica (3)

Existe uma grande dificuldade no desenvolvimento de sistemas de veiculação das proteínas, visto que são moléculas com alguma instabilidade, complexas, apresentam ligações lábeis e vários grupos quimicamente reativos. A rutura destas estruturas, como por exemplo a sua desnaturação, ou a alteração das suas cadeiras laterais pode levar à perda da sua atividade ou ao aumento da sua imunogenicidade.

Para uma proteína ser um bom composto terapêutico, deve apresentar uma elevada pureza e integridade física.

O desenvolvimento das formulações requer a estabilidade destas moléculas durante a purificação, no armazenamento do produto acabado, durante a sua encapsulação e após a sua administração(4)

### **3.2. Farmacocinética e farmacodinâmica**

Para melhorar as limitações que existem no uso destas proteínas na terapêutica, como podemos reconhecer algumas na Figura 1, desenvolveram-se estratégias para modificar as características que limitam os fármacos, melhorando as suas propriedades farmacocinéticas e

farmacodinâmicas. Há duas abordagens a que podemos recorrer: modificar o composto terapêutico, através da alteração da sua estrutura ou associá-lo a outra molécula; ou recorrer a uma alteração na formulação do fármaco, associada ao desenvolvimento de possíveis partículas responsáveis pelo transporte destas proteínas (5)

A conjugação das proteínas com compostos químicos como o polietilenoglicol ou o ácido polissialílico é uma estratégia com resultados comprovados na terapêutica. Também existem outras formulações, como lipossomas, micro e nanopartículas, que apresentam uma abordagem para veicular as proteínas com a vantagem de que aumenta a sua estabilidade e melhora as suas características físicas e químicas. Estes sistemas têm sido desenvolvidos para evitar a degradação enzimática e aumentar o tempo de semi-vida das proteínas terapêuticas (6)

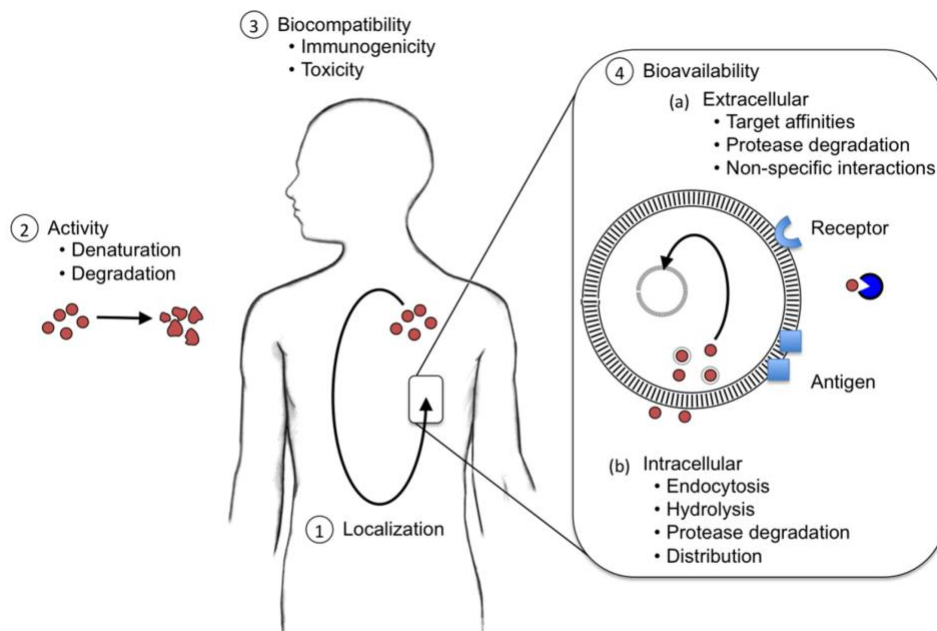


Figura 3. Barreiras que impedem a biodisponibilidade e/ou eficácia da proteína terapêutica (1,3).

## **4. Bioencapsulação**

A bioencapsulação envolve a gelificação ou a formação de uma membrana à volta de gotas com biocatalisadores, que originam grânulos de hidrogel ou microcápsulas. Inicialmente, as técnicas de bioencapsulação envolviam a formação de grânulos de gel dispensando gotículas da suspensão do pré-gel que apresentava o imobilizante numa solução endurecedora. A dispersão mais fina foi obtida emulsificando o gel numa fase oleosa e o endurecimento das gotas através da gelificação interna. A microencapsulação através da membrana envolveu a distribuição de gotículas de uma solução de gel com carga iónica numa solução de polímero com carga contrária (7,8)

A primeira fase do processo de bioencapsulação requer a dispersão da fase interna na solução de endurecimento do gel ou a formação da membrana, seguida de gelificação ou formação da membrana. Há dois processos de dispersão que são, normalmente, aplicados na imobilização das células: extrusão e emulsificação. Na extrusão, as soluções são extrudadas através de um pequeno orifício ou agulha, que permite que as gotículas formadas caiam livremente na solução de endurecimento. Na emulsificação, as soluções são misturadas e dispersas numa fase não miscível. Quando se alcança o equilíbrio da dispersão, inicia-se o endurecimento ou a formação da membrana através do arrefecimento ou da adição de um componente à emulsão (7,8)

Nos últimos anos, uma das estratégias para aumentar a eficácia terapêutica das proteínas foi o desenvolvimento de sistemas de libertação prolongada, onde ocorre uma libertação contínua no tempo e de administração única sendo mais apelativa a um maior número de administrações. Também apresenta desvantagens como reações de hipersensibilidade e utilização de medidas invasivas, que pode levar a uma diminuição na adesão à terapêutica (3,9). A produção e desenvolvimento da encapsulação será discutida detalhadamente mais à frente.

### **4.1. Encapsulação física**

A encapsulação física pode ser conseguida através da incubação do gel pré-formado com a proteína em estudo ou através da sua adição a uma solução que contem o monómero que irá formar o hidrogel. Este processo de encapsulação é relativamente simples, conferindo-lhe uma vantagem (10).

O desenvolvimento atual de sistemas de gelificação *in situ*, que são soluções antes da administração e realizam o processo de gelificação no local da administração está em crescimento. Neste tipo de hidrogel, a encapsulação pode ser definida pela dissolução da

proteína de interesse na solução de polímero que forma o gel, previamente à administração (10,11).

#### **4.2. Encapsulação através da ligação covalente**

As proteínas podem formar ligações covalentes com matrizes poliméricas através de grupos funcionais, como os grupos hidroxilo, amina e carboxilo que, não fazendo parte da estrutura do polímero, são introduzidos através de reações de funcionalização ou de copolimerização (12)

Depois destas reações, a liberação da proteína pode ser mediada por reações de hidrólise, de redução ou de clivagem enzimática. Este mecanismo leva a uma liberação dependente da necessidade do composto terapêutica. Apesar disto, a estabilidade e a manutenção da atividade biológica da proteína de interesse podem apresentar problemas neste tipo de encapsulação (1,12)

#### **4.3. Micropartículas e Nanopartículas**

Durante muitos anos, as partículas poliméricas foram estudadas como sistemas de liberação da substância ativa. Aqui incluímos os hidrogéis, as micelas poliméricas, os derivados de celulose, as micropartículas e os polímeros biodegradáveis. Vamos focar-nos mais nos hidrogéis, microesferas de PLGA e nanopartículas porque são muito utilizadas como materiais biocompatíveis, aprovados pela FDA. A evolução da nanotecnologia nos últimos anos teve um grande impacto na área farmacêutica, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade e a estabilidade destas proteínas utilizadas em terapêutica (3).

As nanopartículas apresentam extensas aplicações na prática clínica, na investigação e no desenvolvimento de novos fármacos. As NPs têm um grande interesse no futuro dos sistemas de liberação de fármacos, podendo ser utilizados tanto no diagnóstico como na terapêutica. Mais à frente, iremos abordar especialmente as nanopartículas lipídicas sólidas (6).

##### **4.3.1. Hidrogéis**

As proteínas de adesão, citocinas e fatores de crescimento devem ser disponibilizados na sua forma ativa no local de ação, com um perfil de liberação adequado. Entre os vários biomateriais que podem ser usados com a finalidade de atingir esse objetivo, estão os hidrogéis. São redes poliméricas interconectadas, tridimensionais, hidrofílicas e com a capacidade de *swelling* em água. Surgiram como sistemas de veiculação de proteínas

terapêuticas, mas também apresentam benefícios na área de engenharia de tecidos atuando como materiais de suporte ou como matrizes na encapsulação e libertação de substâncias (10). Os hidrogéis com uma elevada concentração de água, de natureza macia e com poros na sua estrutura permitem mimetizar os tecidos biológicos, biocompatíveis e adequá-los na encapsulação de proteínas terapêuticas e com uma libertação adequada.

Estes sistemas podem ser classificados como macro, micro ou nanogéis, dependendo do tamanho das partículas que obtemos. Se o tamanho das partículas for superior a 100 $\mu$ m, estamos perante um macrogel, caso o tamanho esteja localizado entre este valor e a faixa dos micrómetros, é microgel; por último, caso as partículas sejam inferiores a 100nm, referimo-nos a um nanogel (13)

O sistema de nanogel constitui um dos sistemas de veiculação de fármacos mais flexíveis, principalmente na veiculação para um local específico e/ou controlada por tempo de agentes biologicamente ativos, tendo em conta as suas características da associação das nanopartículas com o hidrogel. A formação de nanogéis inclui a sua reticulação física e química. Os nanogéis sintetizados fisicamente conseguem encapsular vários compostos, incluindo fármacos hidrofóbicos e biomacromoléculas, mas apresentam uma baixa estabilidade, enquanto os que são preparados por reticulação química apresentam uma utilização mais extensa e uma maior versatilidade (9)

Os nanogéis como sistema de veiculação apresentam uma ótima capacidade de transportar proteínas, uma estabilidade elevada e conseguem responder a uma enorme variedade de estímulos do ambiente em que se encontram. Normalmente, existem dois trajetos para encapsular as proteínas no nanogel, através da difusão ou da via *in situ* (9).

A maioria dos polímeros bioativos naturais constituem a matriz do organismo e apresentam uma elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade. Os mais utilizados são os alginatos, quitosano, dextrano, colagénio, PLGA e o ácido hialurónico (14)

Os polímeros solúveis em água como o PLA, PVA, PVD, PEG e alguns polissacáridos são os sistemas mais comuns na formação de hidrogéis. Normalmente, os polímeros sintéticos como PVA, PAM e PEG apresentam uma maior resistência mecânica do que os naturais referidos em cima (14)

#### **4.3.1.1. Mecanismo de encapsulação de proteínas em hidrogéis**

As proteínas podem ser incorporadas em hidrogéis através de diversos mecanismos, como por exemplo, serem fisicamente retidas no hidrogel ou adsorvidas à matriz através de interações específicas, ligações não covalentes ou ligações covalentes através de ligantes

degradáveis e, posteriormente, libertados por difusão, erosão, degradação, *swelling* ou através de um estímulo específico, como a temperatura ou o pH. Ainda podemos associar vários sistemas de veiculação para modular a liberação de uma extensão de proteínas. Dependendo do mecanismo de liberação, vários perfis podem ser obtidos (10)

A veiculação pode ser direta, como já foi referido anteriormente, através de encapsulação física, não covalente ou covalente; ou indireta que é utilizada na terapêutica genética e no transplante de células (1)

#### **4.3.1.2. Aplicações dos hidrogéis em bioencapsulação de proteínas terapêuticas**

Atualmente existe uma vasta quantidade de proteínas conhecidas com ação terapêutica para doenças como o cancro, doenças autoimunes e doenças inflamatórias (2)

Vários estudos revelaram que hidrogéis compostos por co-polímeros de 3 segmentos de PEG hidrofílico incorporado no PLGA foram utilizados na encapsulação de várias proteínas como a ovalbumina, a toxina do tétano e o citocromo C, com uma percentagem de imobilização no intervalo dos 72 aos 92%, obtendo um tempo de semi-vida no plasma maior e, para a toxina do tétano, a capacidade de suporte para a imobilização de vacinas (1,15)

Várias micropartículas de PLGA foram aprovadas pela FDA para serem utilizadas como suporte na imobilização e já existem vários fármacos que as utilizam para obterem uma liberação prolongada que se encontram comercializados, como a triptorrelina (Trelstar®) e leuprolide (Lupron Depot®). Estas partículas de PLGA caracterizam-se por uma determinada flexibilidade ao apresentarem eficácia quando o fármaco é administrado por via intramuscular, através da inalação ou até mesmo por via oral (16)

O tamanho das partículas é uma característica fundamental que influencia o tempo de semi-vida, a captação celular, a biodistribuição e a sua farmacocinética. Foi demonstrado que partículas mais pequenas, especialmente no intervalo dos 100nm, são provavelmente as que apresentam mais vantagens pela sua maior absorção pelas células, levando à diferença entre a captação ser específica ou não específica (16)

O único sistema de administração de fármacos que apresente na sua constituição o fator de crescimento derivado das plaquetas é o Regranex® Gel, tendo indicação no tratamento de feridas e na remissão de úlceras (10)

#### **4.3.2. Partículas lipídicas para encapsulação de proteínas**

A utilização de partículas lipídicas na encapsulação de proteínas terapêuticas é outro setor que se tem revelado muito interessante na veiculação e libertação destas proteínas. Este processo de veiculação pode recorrer a lípidos mais tradicionais, como os lipossomas e as emulsões lipídicas, ou a sistemas mais recentes como os microtúbulos lipídicos, microcilindros lipídicos e nanopartículas lipídicas sólidas (17)

Estes sistemas de veiculação são baseados em lípidos fisiológicos, como os fosfolípidos, colesterol e triglicéridos que, devido à sua origem biológica, apresentam vantagens. Alguns exemplos são a elevada biocompatibilidade após a administração, as suas matrizes lipofílicas não são tão suscetíveis a fenómenos de erosão, a sua produção é relativamente simples através da compressão ou moldagem e absorvem a água mais lentamente (17)

Como todos os sistemas, também apresentam limitações. O facto de a homogeneização de alta pressão ser a técnica de preparação mais utilizada que leva à degradação da substância ativa em compostos de maior peso molecular e moléculas de cadeia longa, a sua cinética variável nos processos de distribuição e ainda a cristalização lipídica que resulta em várias formas polimórficas com diferentes comportamentos de fusão originando diferentes capacidades de incorporar a substância ativa, são alguns exemplos dessas limitações (17)

##### **4.3.2.1. Formação de lipossomas**

Os lipossomas são estruturas esféricas fechadas, formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas circulares que contêm uma fase aquosa encapsulada dentro e entre as bicamadas lipídicas (1)

Podem ser preparados através de vários processos, na maioria dos quais se foca na hidratação de filmes lipídicos secos num ambiente aquoso. Após esta fase, o tamanho das partículas que obtemos pode ser definido pela extrusão dos lipossomas pelas membranas com um tamanho específico do seu poro (18)

Os lipossomas são caracterizados pelo seu tamanho, carga superficial e número de bicamadas lipídicas.

Geralmente, as proteínas sofrem encapsulação dentro do lipossoma ou conjugadas com grupos de superfície no lipossoma, através de ligações químicas.

A encapsulação passiva pode ser obtida incubando a proteína com os lipossomas a uma temperatura pouco inferior à temperatura de transição dos lípidos que constituem a formulação. Por outro lado, a carga da substância ativa da proteína pode ser obtida expondo os lipossomas

a temperaturas mais elevadas na presença de um tampão etanólico, realizando uma agitação suave por determinado tempo (19).

Normalmente as proteínas ficam no núcleo aquoso deste sistema, mas as regiões hidrofóbicas expostas da proteínas podem interagir com a membrana lipídica que pode levar à retenção da sua atividade terapêutica e a manter a sua estabilidade. A conjugação de proteínas diretamente na superfície dos lipossomas melhorou o seu desenvolvimento como os imunolipossomas, que são conjugados com anticorpos ou com os seus fragmentos, os lipossomas associados a PEG, que formam uma camada protetora impedindo o reconhecimento da proteína encapsulada pelas opsoninas diminuindo a sua purificação, os imunolipossomas de semi-vida longa revestidos com um polímero protetor e anticorpos, e os chamados lipossomas de última geração que permitem a modificação da superfície através de muito compostos, isoladamente ou em associação, incluindo partículas lipídicas sensíveis a estímulos, proteínas ou diagnósticos (1)

A estabilidade *in vivo*, a biodistribuição do fármaco e a sua taxa de libertação são características que podem ser reguladas pelo controlo do tamanho do lipossoma, carga superficial, hidrofobicidade sua superfície e fluidez da membrana. As formulações de péptidos e proteínas em lipossomas alteram o seu perfil farmacocinético e melhoram a sua eficácia terapêutica, ultrapassando as limitações do uso desses compostos não encapsulados (18,19)

Devido à sua carga e ao elevado peso molecular, as proteínas terapêuticas apresentam dificuldade em atravessar as membranas das células. A sua administração intravenosa por longos períodos de tempo é um dos fatores que contribui para o possível desenvolvimento de imunogenicidade. Ao incorporarmos as proteínas nestas formulações de lipossomas, ajuda a contornar essa limitação. A maior parte dos fosfolípidos utilizados são biocompatíveis e protegem as proteínas encapsuladas dos efeitos inativadores, como a agregação durante o armazenamento ou outro tipo de inativação física durante o manuseio do produto antes da sua administração, sem efeitos adversos adicionais (18,19)

A natureza anfipática dos fosfolípidos, mais especificamente a formação subsequente do núcleo aquoso e da bicamada hidrofóbica, torna-os adequados para a sua função de suporte na encapsulação das proteínas terapêuticas. A principal vantagem do uso de lipossomas é a redução da necessidade de modificação da proteína ou da sua conjugação covalente com o suporte da encapsulação, evitando assim a posterior perda de atividade que é a principal limitação no uso de PEG e do PSA (1).

Os lipossomas, sozinhos ou com outros grupos de direcionamento adicionais, têm a capacidade de direcionar a veiculação das proteínas diretamente para determinados tipos de células ou mesmo para compartimentos individuais das mesmas (19,20).

A fagocitose, embora menos problemática quando se utilizam lipossomas destinados a evitar a opsonização, é um forte argumento contra a utilização deste tipo de encapsulamento, uma vez que são facilmente fagocitados pelas células do sistema retículo endotelial (SRE), que podem levar ao desaparecimento rápido da proteína terapêutica no organismo (20).

A combinação de veículos de encapsulamento lipídico com excipientes adicionais oferece inúmeras vantagens, no entanto, o uso desses aditivos em formulações para administração parentérica apresenta desafios consideráveis (21). Ao longo dos anos, a FDA e a EMA trabalharam para desenvolver padrões e diretrizes para o uso de lipossomas como suportes de encapsulamento, resultando desses esforços em publicações, como diretrizes para a investigação farmacêutica nesta área.

#### **4.3.2.2. Formação de nanopartículas sólidas lipídicas**

As nanopartículas sólidas lipídicas têm inúmeras características que lhes conferem benefícios para a encapsulação das proteínas terapêuticas e como potenciais sistemas de veiculação de fármacos. Entre as suas características mais vantajosas está a sua alta biocompatibilidade, a capacidade inerente das partículas de aumentar a estabilidade da proteína terapêutica encapsulada e o aumento claro na biodisponibilidade dos componentes encapsulados (22,23). Além disso, os processos de formação das nanopartículas sólidas lipídicas mostraram-se fáceis de reproduzir e capazes de suportar as etapas de esterilização necessárias. As nanopartículas sólidas lipídicas também apresentam tempos de semi-vida plasmática longos, podendo ser úteis nos casos em que é necessária uma libertação muito prolongada da proteína terapêutica (18)

No entanto, as nanopartículas sólidas lipídicas também apresentam algumas desvantagens, nomeadamente a dificuldade de controlar o tamanho da partícula de encapsulamento e a possibilidade de coalescência e agregação in vivo. Além disso, os lípidos utilizados podem apresentar dinâmicas de transição polimérica de difícil controlo, o que pode levar a uma degradação precoce das partículas (20).

Vários processos para a formação destas nanopartículas são descritos na literatura, tais como homogeneização de alto cisalhamento, microemulsão, extração de fluido supercrítico, evaporação/emulsificação de solventes, emulsificação/difusão de solvente, emulsão dupla e secagem por pulverização. Todos estes processos mostraram bons resultados não só em termos

de rendimento de produção, mas também em termos da sua capacidade de reter e encapsular compostos terapêuticos (23).

A homogeneização de alto cisalhamento foi inicialmente utilizada na produção de nanoemulsões lipídicas sólidas. Este é um processo de homogeneização de alta pressão (100-2000 bar) que empurra os componentes líquidos através de uma malha estreita de alguns micrómetros de diâmetro. Foram estudadas duas abordagens para o processo, a homogeneização a quente e a homogeneização a frio. A homogeneização a quente é geralmente realizada a temperaturas acima do ponto de fusão do lípido. O produto resultante é uma emulsão o/a quente e o seu arrefecimento leva à cristalização lipídica e à formação de SLNs. Este processo, embora seja adequado para a formação de SLNs, leva a um aumento na taxa de degradação da proteína terapêutica e do próprio veículo de encapsulamento (23).

A homogeneização a frio foi desenvolvida para mitigar os problemas de degradação relacionados com a temperatura, perda de fármaco para a fase aquosa e fracionamento associados ao método de homogeneização a quente. Neste processo, o fármaco é incorporado à massa lipídica fundida, que posteriormente é arrefecida rapidamente, através de gelo seco ou nitrogénio líquido. O material sólido é então moído e as micropartículas lipídicas preparadas são dispersas numa solução emulsificante fria. A temperatura deve ser efetivamente regulada para garantir o estado sólido do lípido durante a homogeneização (23).

Para a produção de dispersões de nanopartículas por evaporação/emulsificação do solvente, o material lipofílico é dissolvido num solvente orgânico imiscível em água, como o ciclohexano, que é emulsificado numa fase aquosa. Após a evaporação do solvente, a dispersão de nanopartículas é formada pela precipitação do lípido no meio aquoso (23,24).

As SLNs também podem ser produzidas pela técnica de emulsificação/difusão de solvente. Nesta técnica, a matriz lipídica é dissolvida num solvente orgânico imiscível com água, seguida de emulsificação em fase aquosa. O solvente é evaporado sob pressão reduzida, dando origem a uma dispersão de nanopartículas formadas pela precipitação do lípido no meio aquoso (22).

No método de dupla emulsão o fármaco é encapsulado com um estabilizador, para evitar a sua compartimentação para a fase aquosa externa, durante a evaporação do solvente na fase aquosa externa da dupla emulsão a/o/a.

O Spray Drying é uma técnica alternativa de liofilização, com o objetivo final de transformar uma dispersão de SLNs num produto de interesse farmacológico. Uma mistura lipídica com um ponto de fusão superior a 70°C deve ser usada neste método. Este método tem

como principal desvantagem a agregação de partículas, devido a forças de cisalhamento e altas temperaturas, que causam uma fusão parcial da massa lipídica nas SLNs (23).

#### **4.3.2.3. Aplicações terapêuticas da bioencapsulação em partículas lipídicas**

A área de oncologia é a área onde o estudo da encapsulação de proteínas terapêuticas tem sido mais intenso, especialmente no tratamento de tumores sólidos, que estão associados a uma elevada taxa de mortalidade. O tratamento de alguns destes tumores baseava-se na atividade da enzima asparaginase, o que a tornava um alvo potencial em termos de processos de encapsulamento para terapia antineoplásica. Um estudo mostrou que a asparaginase encapsulada em lipossomas melhora a sobrevivência de animais com tumores P53 dependentes de asparaginase e reduz a formação de anticorpos neutralizantes contra a enzima quando comparada a administrações intravenosas da enzima nativa livre (1)

Outro estudo na literatura mostra que a interleucina-2 pode ser um composto terapêutico em algumas neoplasias agressivas, como o cancro do ovário, reduzindo o número de metástases associadas a este tipo de tumor. A incorporação de IL-2 recombinante em lipossomas aumentou a semi-vida plasmática. Outro estudo envolvendo esta proteína mostrou que o encapsulamento lisossômico de IL-2 é significativamente mais eficaz do que a IL-2 livre na inibição de metástases associadas ao cancro do ovário em camundongos (25,26)

A superóxido dismutase é uma enzima responsável pela neutralização pró-inflamatória e citotóxica do anião superóxido que participa na fagocitose. Esta enzima tem características interessantes como agente terapêutico em doenças inflamatórias associadas a altas quantidades do anião superóxido. A encapsulação de SOD em lipossomas demonstrou aumentar a atividade biológica da enzima, prolongando sua semi-vida plasmática e diminuindo a peroxidação da membrana em várias regiões afetadas por processos inflamatórios a decorrer. Os lipossomas mostraram a capacidade de melhorar a atividade anti-inflamatória da SOD quando comparados à administração de SOD livre (27–29)

#### **4.4. Conjugação de proteínas com PEG**

Na década de 1970 foi descrito pela primeira vez o desenvolvimento do processo de pequiação em estudos pioneiros de Abuchowski et al., que foram seguidos por várias melhorias por outros grupos (30) Este processo desencadeou o verdadeiro avanço na tentativa de melhorar as propriedades farmacêuticas das proteínas de forma viável e reprodutível (31) Vários ensaios realizados com o objetivo de estudar aspetos relacionados à libertação de fármacos através da

pequilação mostraram uma melhoria na estabilidade, farmacocinética e potencial terapêutico das biomoléculas pequiladas (32,33).

#### ***4.4.1. Processo de pequilação***

A pequilação é o processo de ligação de cadeias poliméricas de PEG a uma proteína, péptido ou outra molécula bioativa. Esta modificação é realizada pela ligação covalente do PEG à proteína, muitas das vezes através de grupos reativos na molécula de PEG, como uma amina ou um grupo tiol, ou através de resíduos específicos na proteína, como cisteína ou lisina (31)

As proteínas são normalmente moléculas lábeis, o que leva a que as suas reações de conjugação ocorram em condições químicas suaves como, por exemplo, a uma baixa temperatura e pressão e um uso reduzido de solventes orgânicos (33)

Existem vários métodos para a pequilação de proteínas incluindo a pequilação reativa, a pequilação não reativa, a pequilação enzimática e a pequilação quimioenzimática. A escolha do método a utilizar depende de vários fatores como a natureza da proteína, o local onde vai ocorrer a modificação, o grau de pequilação e as propriedades farmacocinéticas que pretendemos obter (34)

Devido à sua natureza simples e direta, os primeiros processos de pequilação ultrapassaram vários obstáculos, principalmente devido à grande quantidade de grupos hidroxilo presentes no meio reacional, obtendo-se produtos finais frequentemente contaminados com impurezas. A conjugação restrita com PEG de baixo peso molecular deu origem a ligações relativamente instáveis e inespecíficas com alta probabilidade de gerar respostas imunes à substância ativa (31,33). Especificamente, o uso de metoxi-PEG (mPEG) teve uma elevada capacidade de formar agregados irreversíveis com a proteína devido à contaminação inerente com diol (35) Com o objetivo de contornar estas limitações, desenvolveram-se moléculas de segunda geração do processo de pequilação, decorrentes de uma química mais otimizada, que permitiram melhorar a conjugação PEG-proteína. O uso de intermediários PEG carboxilados permitiu a remoção de quase 97% de todas as impurezas associadas ao diol. O resíduo de conjugação muda de lisina para cisteína melhorando a conjugação, devido ao facto do grupo tiol da cisteína ser menos reativo que o grupo amino da lisina. A incorporação de ligações facilmente degradáveis forneceu uma forma eficiente de libertação das proteínas, dentro dos endossomas celulares (35). A utilização de derivados de PEG heterobifuncionais e ramificados também permitiu um maior controlo no rearranjo espacial da molécula de conjugação, reduzindo a possibilidade de que a proteína em estudo fosse significativamente alterada após a conjugação (35)

A pequiação enzimática, por exemplo, foi desenvolvida para estabelecer ligações em sítios específicos, utilizando enzimas da natureza, como a transglutaminase específica ou não específica (TGase), cujo substrato natural é a glutamina. A TGase catalisa a transglutaminação entre o grupo amina do PEG e o grupo amida da glutamina. Outras enzimas também têm sido utilizadas, como a tirosinase para a conjugação PEG-tirosina (34,36)

Alguns dos benefícios da pequiação incluem o aumento do tempo de circulação (a pequiação pode aumentar o tempo de semi-vida das proteínas na corrente sanguínea, reduzindo a sua depuração pelos rins e fígado. Isto permite uma dosagem menos frequente e uma toxicidade potencialmente menor), imunogenicidade reduzida (proteínas modificadas com PEG têm menos probabilidade de serem reconhecidas como estranhas pelo sistema imunológico, reduzindo a probabilidade de respostas imunes, como a formação de anticorpos) e uma melhor solubilidade e estabilidade (a pequiação pode melhorar a solubilidade e a estabilidade das proteínas, reduzindo sua suscetibilidade à desnaturação ou agregação) (31)

#### ***4.4.2. Alterações nas propriedades farmacêuticas de proteínas conjugadas com PEG***

A pequiação de proteínas resulta em várias alterações nas suas propriedades farmacêuticas, o que acaba por ser benéfico para a administração de fármacos e aplicações terapêuticas. Algumas das alterações mais importantes são o aumento do tamanho e peso molecular da proteína, redução da imunogenicidade das proteínas diminuindo o seu reconhecimento pelo sistema imunológico, alteração da sua distribuição, metabolismos e excreção, e modificação da sua atividade afetando diretamente a sua estrutura ou alterando as suas interações com outras moléculas no organismo (35).

A alteração mais perceptível causada pela pequiação é o aumento do tempo de circulação das proteínas conjugadas, devido à diminuição da taxa de filtração renal e redução da proteólise e opsonização. As moléculas de PEG são altamente hidratadas, o que aumenta o raio hidrodinâmico do conjugado em aproximadamente 5 a 10 vezes mais do que seria esperado, considerando apenas o seu peso molecular (37)

O aumento da estabilidade da proteína conjugada com PEG também está bem descrita na literatura, o que resulta da capacidade da molécula de PEG em cobrir sítios hidrofóbicos presentes na superfície da proteína, normalmente envolvidos em interações não covalentes que levam a uma consequente agregação, perda de atividade ou aumento da imunogenicidade (38)

No geral, a pequiação pode melhorar as propriedades farmacêuticas das proteínas, tornando-as mais eficazes e convenientes para aplicações terapêuticas. No entanto, existem algumas desvantagens potenciais, como o potencial de respostas imunes contra a própria

molécula de PEG e a possibilidade de alterações na atividade ou antigenicidade da proteína. Portanto, otimização e caracterização cuidadosas são necessárias para garantir a segurança e eficácia das proteínas conjugadas com PEG (34)

Devido ao impedimento estérico associado à pequilação excessiva, como costuma acontecer com proteínas grandes, ocorre uma perda de atividade e afinidade na ligação ao alvo da proteína terapêutica. Mesmo em proteínas menores, a pequilação foi associada a uma redução moderada na atividade. Porém, com o aumento do tempo de exposição sistêmica ao fármaco, potencializado pela redução da taxa de filtração glomerular e pela redução da proteólise enzimática, essa redução da capacidade de ligação ao alvo acaba por ser equilibrada.

Também há relatos na literatura em que foi observado um aumento da capacidade de agregação de proteínas após a conjugação com PEG (34). Outro problema associado ao processo de pequilação é a polidispersão das moléculas de PEG associadas a proteínas.

Menos frequente, também foi descrita a possível formação de anticorpos anti-PEG, geralmente associada à exposição crônica a elevadas concentrações de proteínas pequiladas. Esses anticorpos podem aumentar a depuração da proteína terapêutica ou mesmo do sistema de liberação controlada conjugado com PEG (39)

#### ***4.4.3. Proteínas com PEG na terapêutica***

Os primeiros produtos farmacêuticos pequilados a obterem aprovação pela FDA na década de 1990, foram o Adagen® e o Oncaspar®, que são misturas complexas de várias espécies pequiladas (40,41)

A primeira proteína terapêutica pequilada aprovada, pegadamase (Adagen ®), com indicação terapêutica na reposição enzimática associada à depleção de adenosina desaminase (ADA), principalmente para doentes com imunodeficiências graves, embora possa ser utilizada em outros casos (30,40).

A pegaspargase (Oncaspar®) era utilizada no tratamento de várias leucemias e referiu-se ao problema dos anticorpos neutralizantes associados à utilização da asparaginase nativa. A sua pequilação resultou num aumento da sua semi-vida plasmática e mostrou eficácia na proteção da enzima contra a degradação proteolítica aumentada pela tripsina e na diminuição da resposta imune associada à sua administração (40,42).

A pequilação, através de métodos gerais, do interferão  $\alpha 2A$  (IFN- $\alpha 2A$ ) não resultou numa grande vantagem clínica em termos do efeito terapêutico do interferão, visto que ocorreu uma redução da sua atividade. No entanto, a utilização de uma estratégia de pequilação direcionada, com PEG ramificado de 40 kDa, levou a uma diminuição da depuração renal da

proteína em cerca de 100 vezes com um aumento considerável da sua semi-vida no plasma. Este facto, associado à redução de efeitos adversos e toxicidade, levou a FDA a aprovar, em 2001, o peginterferão- $\alpha$ 2A para o tratamento da Hepatite C com o nome comercial PEGASYS® (36,43)

Pegcetacoplan, com o nome comercial Empaveli™, é um pentadecapéptido pequilado desenvolvido pela Apellis Pharmaceuticals para o tratamento de doenças mediadas pelo complemento. Liga-se ao componente 3 do complemento (C3) e o seu fragmento de ativação C3b, controlando a clivagem de C3 e a produção dos efetores a jusante da ativação do complemento. Pegcetacoplan é o primeiro medicamento direcionado para C3 para a terapia da hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) a ser aprovado (em maio de 2021) nos EUA, onde é indicada para o tratamento de adultos com HPN. Atualmente, na UE e na Austrália, está a ser efetuada uma avaliação por entidades reguladoras para o tratamento da HPN (44)

A pegvaliase representou um desenvolvimento nas opções de tratamento na fenilcetonúria para muitos doentes, mas ainda existe uma necessidade de pesquisa e aperfeiçoamento contínuos. A procura de novas formas farmacêuticas e vias de administração é importante para que ocorra um aumento da adesão à terapêutica visto que, questionários recentes a doentes indicaram que a grande maioria aguardava por novas opções de tratamento e preferiam a terapia oral às injeções. Estas injeções subcutâneas diárias de pegvaliase e os seus efeitos secundários subsequentes podem ser um motivo de afastamento de doentes elegíveis para esta terapêutica. Futuros ensaios clínicos são necessários para avaliar a segurança e eficácia a longo prazo da pegvaliase (45)

A peginesatide é um novo mimético sintético pequilado da eritropoietina que se liga especificamente e ativa o recetor da eritropoietina. Como a sua sequência de aminoácidos não está relacionada com a da eritropoietina, não há reação imunológica cruzada com anticorpos anti-eritropoietina, excluindo teoricamente a aplasia eritrocitária pura como complicação do tratamento. Os dados clínicos disponíveis indicam que a peginesatide pode induzir e manter os níveis de hemoglobina em doentes com doença renal crónica com não inferioridade a outros agentes estimuladores da eritropoiese disponíveis, embora todos os estudos publicados tenham várias limitações e riscos imunogénicos não pode ser conclusivamente determinado. A peginesatide é aprovada para injeção intravenosa ou subcutânea uma vez por mês para tratar anemia em doentes adultos com doença renal crónica em diálise. Possui um perfil de segurança hematológica semelhante ao de outros agentes estimuladores da eritropoiese disponíveis, mas em doentes com doença renal crónica sem diálise, a peginesatide foi associada a um risco cardiovascular aumentado, também razões subjacentes que ainda não são claras (46)

Resumindo, a Figura 2 apresenta a evolução que ocorreu nos fármacos utilizando PEG produzidos desde 1990, incluindo alguns que já foram abordados acima.

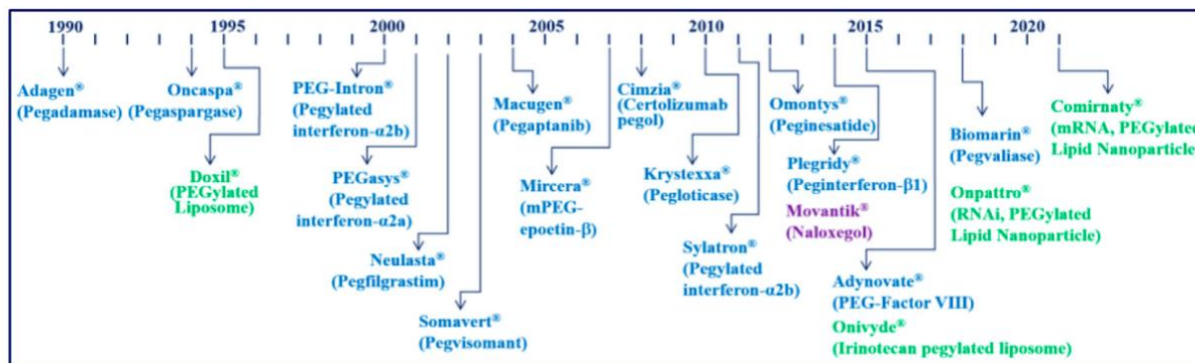


Figura 4. Evolução dos fármacos pequilados nos últimos anos (41).

#### 4.5. Hiperglicosilação de proteínas

A glicosilação de proteínas é uma modificação pós-traducional em que as cadeias laterais dos aminoácidos das proteínas são associadas a carboidratos. Esta alteração vai influenciar várias propriedades da proteína modificada, como a sua solubilidade, estabilidade e a sua veiculação, afetando também as vias bioquímicas em que a glicoproteína participa como a sinalização, comunicação e interação com alguns recetores. A maioria das glicoproteínas apresentam glicanos complexos ligados em posições específicas (como os anticorpos) e a sua modificação ou ausência pode influenciar a sua função e os processos que ocorrem a partir dela. Por outro lado, temos glicoproteínas em que o número elevado de modificações dos carboidratos parece ser mais importante para a sua atividade biológica do que o seu local específico (47)

No caso particular das proteínas terapêuticas de origem biotecnológica, o número de glicosilações e os sítios de glicosilação são altamente dependentes da linha celular em que são produzidos. Por exemplo, uma proteína terapêutica que é produzida pela maquinaria enzimática de uma bactéria não é, em princípio, capaz de glicosilação, uma vez que as bactérias não exibem naturalmente esse tipo de modificação pós-traducional (48)

##### 4.5.1. Processo de hiperglicosilação

Para além de mimetizar os padrões de glicosilação de proteínas endógenas, a hiperglicosilação de proteínas terapêuticas tem sido usada como uma estratégia que se assemelha à pequilação. Ao contrário do PEG, que é uma molécula não endógena e lentamente degradada, a maioria dos carboidratos usados na hiperglicosilação são expressos de forma ubíqua e disseminados pelo corpo, sendo facilmente degradados. Carboidratos adicionais

podem ser acoplados às proteínas de interesse, seja por reações químicas específicas *in situ* ou através de mutagênese dirigida ao sítio, com o objetivo de introduzir novos sítios de glicosilação na estrutura primária da proteína. A ligação dos carboidratos à proteína causa uma redução da interação da proteína com os mecanismos de depuração do organismo, além de diminuir a sua interação com as células apresentadoras de antígenos, na tentativa de aumentar o tempo de semi-vida plasmática e reduzir a imunogenicidade (1,47,49)

O mecanismo da hiperglicosilação, glicosilação em vários sítios, das proteínas e como as glicosiltransferases controlam a eficiência da modificação da superfície ainda é pouco conhecido. A maior parte dos processos biossintéticos que levam à formação de glicoproteínas podem ser divididos em duas categorias, enzimas envolvidas na N-glicosilação e enzimas responsáveis pela glicosilação associada ao oxigênio (47)

#### **4.5.1.1. Papel do ácido polissialico na hiperglicosilação**

O ácido polissialico (PSA) é um oligossacárido endógeno que, como o PEG, está disponível comercialmente em vários pesos moleculares e com várias ramificações, definido pelo número de subunidades repetidas, fortemente hidrofílico e capaz de se ligar covalentemente ao grupo amino da lisina através de uma reação de aminação reductiva. O PSA é predominantemente encontrado nas glicoproteínas e glicolípidos da superfície celular e desempenha um papel crítico na regulação de vários processos biológicos, como adesão, migração e diferenciação celular (50,51).

A associação de proteínas ao PSA revela ser tão eficaz como a pegulação, mas sem a sua toxicidade potencial. Esta conjugação com várias proteínas terapêuticas levou a uma proteólise drasticamente mais reduzida, à retenção da sua atividade *in vivo*, ao aumento do tempo de semi-vida e à redução da imunogenicidade, com o objetivo de obter perfis farmacológicos significativamente melhorados (50).

O PSA é pode ser clivado em várias unidades de ácido siálico após sofrer endocitose. Este polímero é composto por várias subunidades monoméricas, com a mesma estrutura básica de 9 átomos de carbono, com substituições heterogêneas em algumas delas. A subunidade mais comum em humanos é o ácido 5-N-acetilneuramínico (Neu5Ac), polimerizado através de ligações 2,8-glicosídicas (52).

#### **4.5.1.2. Mutagênese direcionada ao local na glicosilação**

Outro processo de glicosilação, a mutagênese dirigida ao local é uma ferramenta muito útil na biologia molecular que permite a manipulação específica de sequências de DNA. Pode ser utilizado para introduzir mutações específicas num determinado gene, incluindo os que afetam a glicosilação. Ao alterar a sequência de aminoácidos de uma proteína, a mutagênese direcionada ao local pode modular os padrões de glicosilação e afetar a função e as propriedades da mesma (12,53).

Um exemplo de mutagênese dirigida ao sítio na glicosilação é a introdução de um sítio de glicosilação numa proteína que normalmente não sofre glicosilação. A proteína resultante pode ser expressa num sistema que pode modificar o local de glicosilação introduzido. A mutagênese dirigida ao local também pode ser usada para modificar os locais de glicosilação existentes numa proteína. Ao alterar a sequência de aminoácidos perto de um local de glicosilação, a eficiência da glicosilação ou o tipo de glicano adicionado pode ser alterado. Por exemplo, mutações que criam ou interrompem a sequência de reconhecimento de glicosiltransferases específicas podem levar a alterações na estrutura do glicano adicionado à proteína (12,53)

Além de modificar os locais de glicosilação, a mutagênese dirigida ao local também pode ser usada para projetar funções independentes de glicosilação numa proteína. Por exemplo, ao introduzir mutações que alteram as propriedades eletrostáticas de uma proteína, pode ser possível alterar a sua afinidade de ligação para ligantes ou a sua capacidade de sofrer alterações conformacionais (12).

#### **4.5.2. Aplicações da hiperglicosilação nas proteínas terapêuticas**

Devido às claras semelhanças entre o processo de hiperglicosilação e o de pequiação, há muitas vantagens que têm em comum. A hiperglicosilação pode aumentar a semi-vida plasmática da proteína terapêutica, reduzir a sua imunogenicidade inerente e melhorar a sua solubilidade. Um possível aumento da eficácia terapêutica é provavelmente decorrente do aumento do tempo de permanência no organismo, pois as proteínas terapêuticas hiperglicosiladas devem ter atividade terapêutica menor ou equivalente às proteínas nativas e não maior, pelos factos descritos acima. A grande vantagem deste processo em relação à pequiação reside no facto de que os oligossacáridos utilizados são, na sua maioria, endógenos e facilmente biodegradáveis (1,54).

Foi discutido que os derivados de PSA mais curtos podem ter uma maior utilidade quando recorremos às proteínas terapêuticas. Descobriu-se em estudos que a polissialização da

asparaginase através da aminação, levou a um tempo de semi-vida maior e uma imunogenicidade reduzida enquanto a atividade permanece entre 82 a 86% da forma nativa.

A darbepoetina alfa, uma forma hiperglicosilada da eritropoietina, já está aprovada para comercialização nos EUA. A mutagênese dirigida ao local foi utilizada para alterar cinco aminoácidos individualmente, introduzindo dois locais adicionais de N-glicosilação na estrutura primária, obtendo um total de cinco locais. A seleção clonal permitiu o isolamento de uma forma em que todas as cinco sequências foram glicosiladas com sucesso. Este análogo exibiu um tempo de semi-vida três vezes mais longo, mostrando que possivelmente as três administrações semanais na terapêutica usual de eritropoietina podem passar para uma única administração por semana. Atualmente, estão a decorrer investigações com vários compostos na área da hiperglicosilação, como interferão-alfa- 2b e a insulina (1,54).

A anemia é geralmente definida como uma diminuição na quantidade de glóbulos vermelhos ou hemoglobina no sangue ou, também pode ser definida como, uma capacidade diminuída do sangue para transportar oxigênio. Na evolução da anemia, os sintomas geralmente incluem astenia, dispneia e adinamia. Pode haver sintomas adicionais, dependendo da causa subjacente (1).

O tratamento da anemia geralmente não é feito com proteínas terapêuticas, muitas vezes utilizamos medicamentos com ferro na sua composição. No entanto, em casos graves de anemia (por exemplo, anemia de doenças crônicas e anemia associada a processos neoplásicos), pode-se usar a eritropoietina, que estimula a produção de eritrócitos na medula óssea. Esta molécula é o foco de muitos estudos de encapsulação que envolvem proteínas (1).

## 5. Conclusão

A comparação entre moléculas farmacêuticas, proteínas e péptidos terapêuticos precisa de estratégias de formulação especiais para que seja aceitável na terapêutica atualmente utilizada.

Como vimos ao longo do trabalho, existe uma extensão enorme de sistemas de veiculação e suporte para a encapsulação na entrega de proteínas terapêuticas que foram apresentados em diferentes formas, tamanhos e composições para que se adapte ao maior número de situações possíveis.

Atualmente, encontram-se muitas proteínas terapêuticas em desenvolvimento que prometem revolucionar a área da terapêutica através de processos como a pequiação, partículas lipídicas como os lipossomas, micro ou nanocápsulas e conjugação de macromoléculas.

Futuramente, os produtos à base de hidrogel representarão uma grande percentagem de sistemas de administração de fármacos no local desejado com a eficácia precisa.

Apesar do estudo destes sistemas tenha começado há algumas décadas, apenas recentemente foram aprovadas algumas abordagens terapêuticas. Já existem no mercado proteínas terapêuticas encapsuladas que são um sucesso, apesar de ainda não estar em plena funcionalidade a capacidade de disponibilizar a proteína no local desejada com a concentração necessária sem reações adversas significativas. Isto conduz a compostos mais seguros e eficazes, com melhorias clínicas significativas, aumentando a adesão à terapêutica pelos doentes.

## 6. Referências Bibliográficas

1. Castro GR, Kumar A, Nguyen TA, Sharma S, Gupta R, Ribeiro MH, et al. Project: Smart Nanomaterials for Bioencapsulation 16. Bioencapsulation of Proteins in Therapeutics. In 2022.
2. Dimitrov DS. Therapeutic proteins. *Methods in Molecular Biology*. 2012;899:1–26.
3. Yin L, Yuvienco C, Montclare JK. Protein based therapeutic delivery agents: Contemporary developments and challenges. Vol. 134, *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2017. p. 91–116.
4. Putney SD, Burke PA. Putney & Burke. 1998;
5. Soderquist RG, Milligan ED, Sloane EM, Harrison JA, Douvas KK, Potter JM, et al. PEGylation of brain-derived neurotrophic factor for preserved biological activity and enhanced spinal cord distribution. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Dec;91(3):719–29.
6. Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. Vol. 59, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007. p. 478–90.
7. Wijffels RH, Buitelaar RM, Bucke C, Tramper J, Poncelet D, Neufeld RJ. *Fundamentals of dispersion in encapsulation technology*. 1996.
8. Majewski RL, Zhang W, Ma X, Cui Z, Ren W, Markel DC. Bioencapsulation technologies in tissue engineering. Vol. 14, *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*. Wichtig Publishing Srl; 2016. p. e395–403.
9. Zhang H, Zhai Y, Wang J, Zhai G. New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. Vol. 60, *Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd; 2016. p. 560–8.
10. Censi R, di Martino P, Vermonden T, Hennink WE. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. Vol. 161, *Journal of Controlled Release*. 2012. p. 680–92.
11. van Tomme SR, Storm G, Hennink WE. In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. Vol. 355, *International Journal of Pharmaceutics*. 2008. p. 1–18.
12. Blixt O, Head S, Mondala T, Scanlan C, Huflejt ME, Alvarez R, et al. Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins [Internet]. 2004. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0407902101](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0407902101)
13. Mathew AP, Uthaman S, Cho KH, Cho CS, Park IK. Injectable hydrogels for delivering biotherapeutic molecules. Vol. 110, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V.; 2018. p. 17–29.
14. Zhang A, Liu Y, Qin D, Sun M, Wang T, Chen X. Research status of self-healing hydrogel for wound management: A review. Vol. 164, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V.; 2020. p. 2108–23.
15. Zhai Y, Zhao Y, Lei J, Su Z, Ma G. Enhanced circulation half-life of site-specific PEGylated rhG-CSF: Optimization of PEG molecular weight. *J Biotechnol*. 2009 Jul 15;142(3–4):259–66.
16. Xie H, Smith JW. Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system [Internet]. 2010. Available from: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/18>
17. Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Lipid Carriers: A Versatile Delivery Vehicle for Proteins and Peptides. Vol. 128, *YAKUGAKU ZASSHI*. 2008.

18. Martins S, Sarmento B, Ferreira DC, Souto EB. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery-liposomes versus lipid nanoparticles. Vol. 2, *International Journal of Nanomedicine*. 2007.
19. Ramani K, Miclea RD, Purohit VS, Mager DE, Straubinger RM, Balu-Iyer S v. Phosphatidylserine containing liposomes reduce immunogenicity of recombinant human factor VIII (rFVIII) in a murine model of hemophilia A. *J Pharm Sci*. 2008;97(4):1386–98.
20. Patil YP, Jadhav S. Novel methods for liposome preparation. Vol. 177, *Chemistry and Physics of Lipids*. Elsevier Ireland Ltd; 2014. p. 8–18.
21. Chen ML. Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: A regulatory perspective. Vol. 60, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008. p. 768–77.
22. Muller R, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art [Internet]. 2000. Available from: [www.elsevier.com/locate/ejphabio](http://www.elsevier.com/locate/ejphabio)
23. Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications [Internet]. Vol. 47, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001. Available from: [www.elsevier.com/locate/drugdeliv](http://www.elsevier.com/locate/drugdeliv)
24. Ahlin P, Kristl J, Kristl A, Vrečer F. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration [Internet]. Vol. 239, *International Journal of Pharmaceutics*. 2002. Available from: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)
25. Kanaoka E, Takahashi K, Yoshikawa T, Jizomoto H, Nishihara Y, Hirano K. A novel and simple type of liposome carrier for recombinant interleukin-2. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010 Feb 18;53(3):295–302.
26. Kanaoka E, Takahashi K, Yoshikawa T, Jizomoto H, Nishihara Y, Uchida N, et al. Rapid communication A significant enhancement of therapeutic effect against hepatic metastases of M5076 in mice by a liposomal interleukin-2 (mixture) [Internet]. Vol. 82, *Journal of Controlled Release*. 2002. Available from: [www.elsevier.com/locate/jconrel](http://www.elsevier.com/locate/jconrel)
27. Rosa AC, Bruni N, Meineri G, Corsi D, Cavi N, Gastaldi D, et al. Strategies to expand the therapeutic potential of superoxide dismutase by exploiting delivery approaches. Vol. 168, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V.; 2021. p. 846–65.
28. Corvo ML, Jorge JCS, Van't Hof R, Eugénia M, Cruz M, Crommelin JA, et al. Superoxide dismutase entrapped in long-circulating liposomes: formulation design and therapeutic activity in rat adjuvant arthritis [Internet]. 2002. Available from: [www.bba-direct.com](http://www.bba-direct.com)
29. Stanimirovic DB, Markovic M, Micic D v, Spatz M, Mrsulja BB. Liposome-Entrapped Superoxide Dismutase Reduces Ischemia/Reperfusion “Oxidative Stress” in Gerbil Brain. Vol. 19, *Neurochemical Research*. 1994.
30. Veronese FM, Mero A. The Impact of PEGylation on Biological Therapies. Vol. 22, *Biodrugs*. 2008.
31. Veronese FM. Veronese 2002. 2002;
32. Milton Harris J, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. Vol. 2, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003. p. 214–21.
33. Roberts M, Harris J. Chemistry for peptide and protein PEGylation [Internet]. Vol. 54, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002. Available from: [www.elsevier.com/locate/drugdeliv](http://www.elsevier.com/locate/drugdeliv)

34. Veronese F, Pasut G. Veronese 2005. 2005;
35. Jain A, Jain SK, Caliceti P. PEGylation: An Approach for Drug Delivery. A Review [Internet]. Vol. 25, Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems. 2008. Available from: [www.begellhouse.com](http://www.begellhouse.com)
36. Zeuzem S, Welsch C, Herrmann E. Pharmacokinetics of Peginterferons. 2003.
37. Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Sep 26;55(10):1261–77.
38. Rajan RS, Li T, Aras M, Sloey C, Sutherland W, Arai H, et al. Modulation of protein aggregation by polyethylene glycol conjugation: GCSF as a case study. *Protein Science.* 2006 May;15(5):1063–75.
39. Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials.* 2007 Feb;28(5):869–76.
40. Jevševar S, Kunstelj M, Porekar VG. PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnol J.* 2010 Jan;5(1):113–28.
41. Park H, Otte A, Park K. Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond. *Journal of Controlled Release.* 2022 Feb 1;342:53–65.
42. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, Natural History, Treatment, and Prevention of Hepatitis C [Internet]. 2000. Available from: <http://annals.org/>
43. Hershfield MS. PEG-ADA Replacement Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency: An Update after 8.5 Years 1. Vol. 76, CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY. 1995.
44. Hoy SM. Pegcetacoplan: First Approval. Vol. 81, *Drugs.* Adis; 2021. p. 1423–30.
45. Mahan KC, Gandhi MA, Anand S. Pegvaliase: a novel treatment option for adults with phenylketonuria. Vol. 35, *Current Medical Research and Opinion.* Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 647–51.
46. Schmid H. Peginesatide for the treatment of renal disease-induced anemia. *Expert Opin Pharmacother.* 2013 May;14(7):937–48.
47. Yakovlieva L, Ramírez-Palacios C, Marrink SJ, Walvoort MTC. Semiprocessive Hyperglycosylation of Adhesin by Bacterial Protein N-Glycosyltransferases. *ACS Chem Biol.* 2021 Jan 15;16(1):165–75.
48. Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. Vol. 65, *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2004. p. 363–72.
49. Eichler J. Protein glycosylation. Vol. 29, *Current Biology.* Cell Press; 2019. p. R229–31.
50. Gregoriadis G, Jain S, Papaioannou I, Laing P. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: A role for polysialic acids. *Int J Pharm.* 2005 Aug 26;300(1–2):125–30.
51. Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. Vol. 9, *Nature Reviews Neuroscience.* 2008. p. 26–35.
52. Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: Implications for biology and disease. Vol. 87, *Laboratory Investigation.* 2007. p. 851–7.
53. Petrescu AJ, Milac AL, Petrescu SM, Dwek RA, Wormald MR. Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: Implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology.* 2004;14(2):103–14.

54. Pisal DS, Kosloski MP, Balu-lyer S v. Delivery of therapeutic proteins. Vol. 99, Journal of Pharmaceutical Sciences. John Wiley and Sons Inc.; 2010. p. 2557–75.