



Biofármacos: sua importância e as técnicas utilizadas em sua produção

**Ana Claudia Oliveira Carreira, Gabriel Levin, Tatiane Maldonado Coelho,
Gustavo Gross Belchior, Mari Cleide Sogayar**

Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, NUCEL-NETCEM-Faculdade de Medicina,
Universidade de São Paulo

Autor para correspondência: ancoc@iq.usp.br

Palavras-chave: proteínas recombinantes, célula de mamífero e de inseto,
bactérias e leveduras, sistemas de expressão, DNA recombinante, biossimilares

Um conjunto de metodologias e abordagens experimentais foi desenvolvido nas últimas décadas e sua compreensão é fundamental para o entendimento de como o conhecimento na área de Biologia Molecular é produzido e de como ele vem sendo utilizado de maneira aplicada para a geração de medicamentos produzidos em organismos vivos, os biofármacos.

Biofármacos são medicamentos produzidos por técnicas biotecnológicas com a utilização de um sistema vivo. Podem ser extraídos de órgãos e tecidos, microrganismo, fluidos animais ou a partir de células e microrganismos modificados geneticamente. São mais eficazes do que os medicamentos convencionais obtidos por processos de origem química, possibilitando o tratamento de doenças crônicas nas quais há a ausência, diminuição ou perda de função de uma determinada proteína.

Os biofármacos são muito similares ou idênticos às proteínas humanas sendo utilizados para reposição destas proteínas no paciente. Uma das principais vantagens do uso de Biofármacos em relação ao uso de proteínas purificadas a partir de amostras

biológicas humanas, como ocorre no caso de fatores sanguíneos de coagulação usados para hemofílicos, é que estes medicamentos são muito mais homogêneos e seguros, não apresentando o risco de possuir algum vírus ainda desconhecido, e que não foi detectado pelos testes disponíveis atualmente. A vantagem se deve ao fato destas proteínas serem produzidas dentro de um processo rigidamente controlado e com o mínimo de variabilidade entre os lotes, de forma a gerar estruturas proteicas completas e homogêneas, que minimizam ao máximo possíveis reações imunológicas nos pacientes. O primeiro biofármaco desenvolvido para uso humano foi a insulina, produzida na bactéria *Escherichia coli* e aprovado para comercialização nos Estados Unidos em 1982. O

VETORES DE CLONAGEM

Um vetor de clonagem é um pequeno pedaço de DNA proveniente de vírus, bactéria ou de células eucarióticas, capaz de ser mantido de modo estável no organismo, e no qual um fragmento de DNA pode ser inserido. Para serem usados em clonagem, os vetores devem possuir características especialmente desenhadas que permitam:

- (a) a inserção e a retirada de fragmentos de DNA, ou seja, a presença de sítios de restrição em locais adequados;
- (b) a replicação independente daquela do cromossomo da célula hospedeira;
- (c) a identificação e a seleção das células portadoras de vetores portadores de insertos, por meio de marcas específicas.

Existem diferentes tipos de vetores de clonagem e eles são escolhidos de acordo com o tamanho do fragmento de DNA a ser clonado e de acordo com a célula que será utilizada para replicar o DNA recombinante. Um dos tipos de vetores de clonagem mais utilizados é uma pequena molécula circular de DNA extracromossomal denominado plasmídeo, encontrado no interior de diversos tipos de células. Outro vetor frequentemente utilizado é fago λ , um vírus bacteriófago, que replica seu material genético utilizando a maquinaria celular de células de *Escherichia coli*. Em ambos os vetores, o DNA de interesse é replicado dentro da célula hospedeira.

Vetores podem ser especialmente preparados para possibilitar a expressão do segmento de DNA clonado, ou seja, o vetor é modificado para conter sequências regulatórias que atuam como promotores, permitindo a transcrição específica do gene nele inserido e sua posterior tradução. Por isso, os vetores de expressão são ferramentas básicas para a produção de proteínas importantes usadas em tratamentos médicos, como a insulina, por exemplo.



primeiro biofármaco produzido em célula de mamífero foi o ativador de plasminogênio tecidual (tPA), em 1986, para uso em pacientes com infarto agudo do miocárdio.

Em sequência, outros biofármacos passaram a ser produzidos em diferentes organismos para diversas doenças complexas conforme alguns exemplos descritos na tabela abaixo.

Biofármaco	Tratamento	Ano de Aprovação
Insulina	Diabetes	1982
Interferon α	Leucemia	1986
Ativador de plasminogênio tecidual (tPA)	Infarto	1986
Hormônio do crescimento humano	Deficiências no crescimento	1987
Eritropoítina	Anemia	1989
G-CSF	Neutropenia	1991
Interleucina 2	Carcinoma renal	1992
Proteína morfogenética óssea (BMP2)	Reparo ósseo	1992
Fator de coagulação VIII	Hemofilia A	1994
Hormônio folículo estimulante (FSH)	Infertilidade feminina	1995
Interferon β	Esclerose múltipla	1996
Fator de coagulação IX	Hemofilia B	1999
Anticorpo monoclonal	Câncer de mama	1998
Anticorpo monoclonal	Leucemia	2001
Anticorpo monoclonal	Asma	2003

No mundo, cerca de 300 milhões de pacientes já utilizaram biofármacos para o tratamento de diversas doenças crônicas causando um grande impacto para a saúde humana, no tratamento de doenças que não tinham cura ou que não era bem sucedido, ou para a prevenção de outras. Foi possível desenvolver produtos seguros para a cura da doença de Alzheimer, câncer, apneia do sono, artrite reumatóide, ataques cardíacos, câncer de mama, câncer renal, dermatite atópica, diabetes, doença do Crohn, esclerose múltipla, fibrose cística, hemofilia, hepatite, enfarte cerebral ou apoplexia, insuficiência cardíaca, lepra, leucemia, leucemia linfocítica crônica, linfomas, lúpus, tumores cerebrais e fraturas ósseas. Muitas das vacinas recombinantes utilizadas atualmente, tanto em saúde humana quanto em saúde animal, são produzidas pelas mesmas técnicas usadas para a produção de biofármacos. Como exemplos podem

ser citadas as vacinas recombinantes para uso humano para prevenção de Hepatite B, câncer de colo de útero, contra o Papilomavírus (HPV) e gripe (Influenza A); o uso em animais, para raiva, cinomose, leishmaniose visceral canina, dentre outras. Enquanto a maioria dos biofármacos, aprovados para uso humano, consistem de uma cópia fiel de alguma proteína de interesse, denominados “Biofármacos de primeira geração” e utilizados como proteína de reposição, um número cada vez maior de moléculas, chamadas de “Biofármacos de segunda geração”, vêm conquistando uma fatia cada vez maior do mercado farmacêutico. Esta segunda geração de biofármacos consiste em análogos ou cópias produzidas com o uso de técnicas de engenharia genética da proteína inicial, de modo que esta tem maior atividade biológica, estabilidade, ação mais rápida ou mais lenta, tempo de absorção diferente devido à mo-

dificação da molécula. As modificações dos biofármacos podem-se alterar diretamente a sequência de aminoácidos da proteína em questão, a quantidade e o tipo de glicosilação na proteína, ou adicionar um grupo químico para aumentar a estabilidade. Uma terceira classe de biofármacos envolve os “Biofármacos de terceira geração” que são os anticorpos monoclonais e proteínas de fusão. Pode-se anexar à proteína uma molécula como, por exemplo, um quimioterápico, e assim torná-la com uma função única e muito mais específica para combater determinada patologia.

A grande maioria dos biofármacos possui algum tipo de modificação na estrutura proteica, sendo a adição de uma cadeia de açúcar à sequência polipeptídica (processo denominado glicosilação) a mais comum delas. Estas modificações são fundamentais para a atividade biológica de certos biofármacos, contribuindo para o reconhecimento do receptor, meia-vida, estabilidade no plasma e dobramento correto da proteína para que ela se ligue ao seu receptor na superfície da célula.

A produção de biofármacos necessita de observação constante em diversas etapas do processo para que não haja nenhuma mudança que possa comprometer a eficácia do medicamento ou causar algum efeito adverso no paciente, já que o produto é produzido por organismos vivos. É um processo extremamente caro comparado à produção de medicamentos convencionais. Entretanto, permite a produção de medicamento para doenças de grande incidência e de grande complexidade.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é a responsável por aprovar e regulamentar a produção de biofármacos com regras rígidas e baseadas nas regulamentações da agência regulatória América, o FDA (Food and Drug Administration) e da Europa, a EMEA (European Medicines Agency).

O processo de produção de um biofármaco é complexo pois a molécula é difícil de ser copiada e caracterizada. Envolve quatro diferentes fases:

(1) construção do DNA recombinante de interesse e desenvolvimento da linhagem de célula ou microrganismo;



- (2) cultivo da célula para produção do biofármaco;
- (3) purificação do biofármaco - etapa que envolve o isolamento da proteína pura sem nenhum outro contaminante da célula;
- (4) formulação e envase do biofármaco para comercialização.

A escolha da célula para expressar o biofármaco tem profunda influência sobre estas propriedades do medicamento. Os sistemas de produção mais utilizados para a produção de biofármacos incluem células de mamífero, especialmente a célula CHO (*Chinese Hamster Ovary*), e bactérias, como *Escherichia coli*. Células de mamífero são preferencialmente utilizadas para a produção de biofármacos mais complexos, consis-

tindo de mais de uma cadeia polipeptídica e contendo modificações pós-traducionais, tais como glicosilação. Já as bactérias são utilizadas para produzir biofármacos mais simples, que não precisam de modificações complexas para ter atividade biológica, ou para a produção de peptídeos. Outros organismos bastante comuns e de menor custo para a expressão de biofármacos são leveduras, tais como *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris*, células de inseto transformadas com baculovírus, sendo a *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) a mais utilizada, além de plantas (folhas de tabaco), animais transgênicos e em fluidos de animais como, por exemplo, na urina, no sangue ou leite de cabras ou coelhos.

Outra estratégia bastante utilizada na fabricação dos biofármacos modernos é a construção de proteínas de fusão, quando as sequências codificadoras para duas proteínas distintas são clonadas lado a lado, sob o controle de uma única região promotora, de modo que o produto proteico final é constituído por duas proteínas unidas e com funções complementares. Um exemplo desta tecnologia é o medicamento Etanercept, utilizado no tratamento da artrite reumatóide. Ele é composto por um fragmento do receptor para TNF (fator de necrose tumoral, uma proteína pró-inflamatória muito presente nas articulações afetadas) ligado a um fragmento de IgG humano (Imunoglobulina G, um anticorpo). Este biofármaco compete com o TNF produzido pelo paciente, diminuindo assim a resposta inflamatória. A porção do anticorpo anexo a este biofármaco tem, por função, o aumento da meia-vida do medicamento.

Atualmente, em torno de 350 biofármacos estão em fase de testes clínicos para a aprovação e comercialização, sendo muitos deles bioequivalentes (cópias do produto referência). O mercado de biofármacos representa aproximadamente 10% das vendas do mercado farmacêutico mundial e tende a crescer em torno de 10 a 15% ao ano nos próximos anos, com novos e inovadores produtos sendo lançados anualmente. Os produtos proteicos tendem a estar dentre os cinco produtos mais lucrativos de toda a indústria farmacêu-

tica. No entanto, muito ainda é necessário ser feito em termos de regularização destes produtos, especialmente quando o mercado dos mesmos está crescendo em países consumidores economicamente emergentes, tais como a Índia e a China. O foco atual desta indústria são os produtos produzidos por organismos geneticamente modificados, especialmente aqueles contendo modificações complexas que conferem maior atividade biológica ao medicamento. Desta maneira, investimentos em pesquisa e inovação nesta área tão próspera tendem a trazer ao mercado produtos cada vez mais tecnológicos, com melhores respostas dos pacientes e a preços mais acessíveis.

Apesar das dificuldades na aprovação dos novos produtos e dos altos preços que limitam uma expansão do consumo, o setor de biofármacos representa uma parcela significativa e crescente das vendas do setor farmacêutico. Dentre os biofármacos mais vendidos encontram-se, Anticorpos Monoclonais (MAbs) para o tratamento de diversos tipos de câncer, e anti-TNF α (Fator de necrose tumoral α) para o tratamento de doenças auto-imunes reumatológicas. O próximo grupo de biofármacos mais lucrativos inclui insulina e seus análogos, utilizados no tratamento de diabetes, seguido por eritropoietina (EPO), que estimula a produção de glóbulos vermelhos do sangue, requisitada no tratamento de diversas patologias. Outros biofármacos na lista dos mais vendidos incluem fatores de coagulação sanguíneos, vacinas e hormônios reprodutivos. No Brasil, atualmente, são produzidos 14 biofármacos que são utilizados para tratamentos de doenças como hemofilia, esclerose múltipla, artrite reumatoide e diabetes. O Ministério da Saúde do Brasil gasta, em média, 43% da sua verba anual (cerca de 4 bilhões de reais) para a compra de biofármacos. O governo tem investido na produção nacional de outros biofármacos e pretende atingir a produção de 25 até 2017, inserindo novos medicamentos que são muito necessários para o tratamento de câncer de mama, leucemia, diabetes, problemas oftalmológicos, cicatrização em procedimentos cirúrgicos e deficiências no crescimento.

ENTENDENDO AS TÉCNICAS USADAS NA PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS

A Engenharia Genética através do uso da técnica de DNA recombinante permitiu a geração de medicamentos produzidos em organismos vivos, os chamados biofármacos, que têm como princípio ativo uma proteína. Por isso, os segmentos de DNA que codificam as proteínas de interesse devem ser manipulados, caracterizados e expressos para a obtenção dos produtos desejados.

São muitas as técnicas desenvolvidas nas últimas décadas que permitem o estudo de trechos específicos do DNA. Um requisito importante que permite a realização de tais estudos é a obtenção, em grandes quantidades, do segmento específico de DNA que se deseja estudar. A técnica mais utilizada para este fim é a da clonagem molecular, também chamada genericamente de técnica do DNA recombinante ou engenharia genética ou ainda de clonagem gênica, quando o segmento a ser amplificado corresponder a um

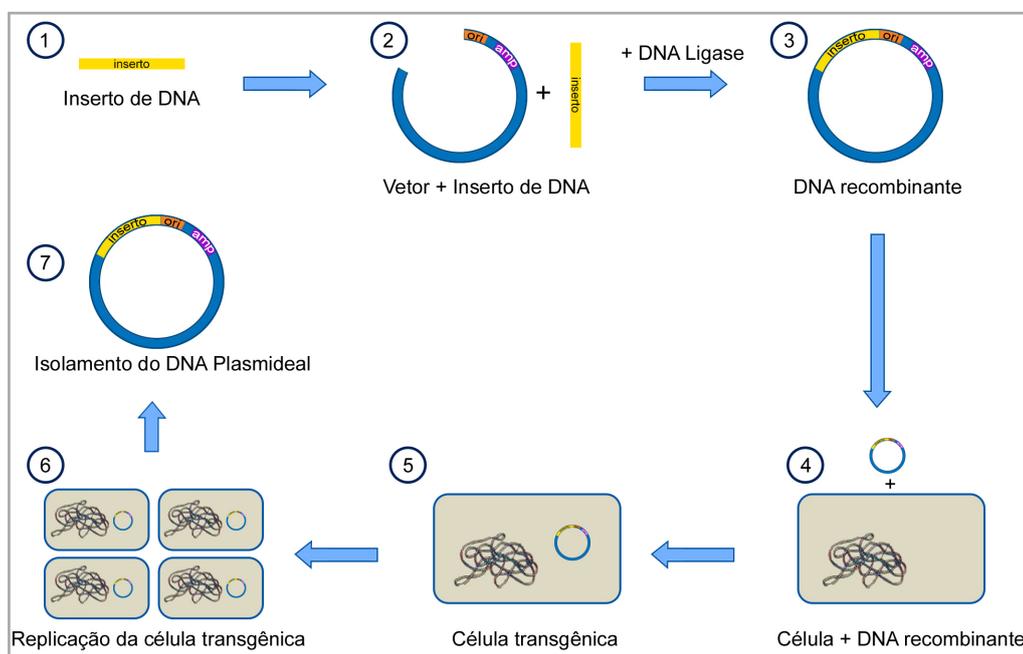
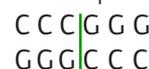
gene. A clonagem molecular, resumidamente apresentada na Figura 1, é um conjunto de métodos usados para construir moléculas de DNA recombinante e fazer com que elas se dupliquem dentro de organismos hospedeiros. O DNA recombinante é originado a partir de DNA de diferentes organismos e sua construção é possível graças ao fato do DNA de todos os seres vivos possuírem a mesma estrutura química.

Mas, como conseguir o segmento de DNA que se deseja clonar? Uma das possibilidades, usada principalmente quando não se tem informações sobre a sequência do DNA a ser clonado, é a digestão do DNA genômico por uma **enzima de restrição**, o que gera uma coleção de fragmentos com extremidades iguais. Todos os fragmentos gerados na digestão podem então ser misturados a moléculas de um **vetor de clonagem** (ver box), também digeridos com a mesma enzima de restrição. Isto garante que todas as moléculas envolvidas no processo de clonagem tenham as extremidades compatíveis e possam ser covalentemente unidas entre si pela enzima **DNA ligase**.

As **enzimas de restrição** cortam o DNA em locais específicos, conhecidos como sítios de restrição. Para cortar o DNA, as enzimas fazem duas incisões no esqueleto de açúcar-fosfato de cada uma das fitas do DNA. Os cortes de diferentes enzimas ocorrem sempre em sequências palindrômicas produzindo extremidades que são compatíveis, ou seja, podem ser unidas covalentemente por ação da DNA ligase. A seguir, dois exemplos de locais de corte por enzimas de restrição. A enzima *EcoRI* corta nos locais indicados em verde na figura e produz as extremidades coesivas: AATTC e TTAAG (complementares entre si).



A enzima *SmaI* corta na sequência indicada na figura e gera extremidades retas, que também podem ser religadas.



DNA ligase é uma enzima que realiza a ligação de fitas de DNA catalizando a formação da ligação fosfodiéster. Em organismos vivos ela realiza reparo de DNA de uma das fitas da molécula de DNA e algumas formas podem reparar também a quebra das duas fitas da molécula. DNA ligase pode também ser usada *in vitro* nos processos de clonagem molecular.

Figura 1.

Técnica de construção de DNA recombinante. O fragmento de DNA de interesse (1) é inserido no vetor de clonagem, um plasmídeo, molécula de DNA circular que possui uma origem de replicação independente do DNA genômico (2). Tanto o vetor de clonagem quanto o segmento de DNA a ser clonado devem ter extremidades compatíveis, isto é, devem ter sido digeridos pela mesma enzima de restrição. Por ação da enzima ligase, o DNA de interesse é ligado ao DNA do vetor de clonagem gerando uma molécula de DNA recombinante (3). A molécula recombinante é inserida em uma célula bacteriana hospedeira (4) utilizando um método denominado transformação bacteriana que aumenta a eficiência de entrada do material genético (5). O material genético introduzido não se insere no genoma da célula hospedeira e passa a se replicar de modo independente deste. As células transformadas são colocadas para se multiplicarem em meio de cultura apropriado permitindo assim a obtenção de grande quantidade de células contendo o DNA recombinante. O passo seguinte é a extração do DNA plasmidial contendo o material genético de interesse.

Outra maneira de se obter DNA para clonagem é isolar inicialmente os fragmentos específicos de DNA após a digestão do DNA

com enzima de restrição e separação dos fragmentos gerados por meio de eletroforese (Figura 2).

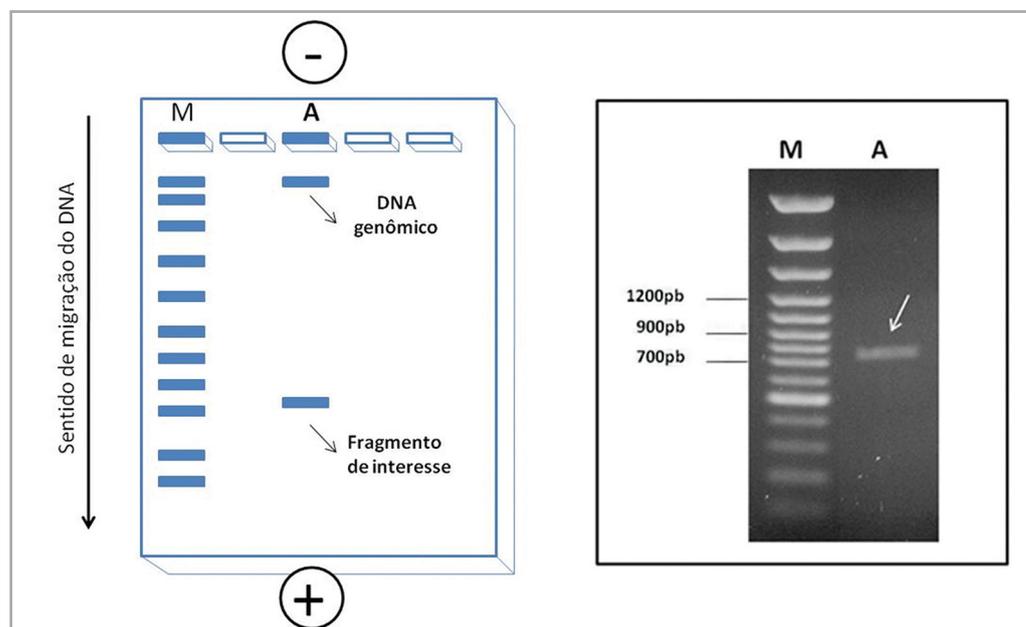


Figura 2.

A eletroforese de DNA é uma técnica que permite a separação de moléculas de diferentes tamanhos em um gel ou matriz, quando submetida a um campo elétrico. As amostras de DNA (A) são aplicadas em pequenos poços existentes na parte superior da matriz ou gel, como esquematizado na parte esquerda da figura. Tais amostras geralmente são compostas por fragmentos de DNA de diferentes tamanhos que serão separados de acordo com seus tamanhos. Uma vez que o DNA apresenta carga negativa, a migração ocorre sempre na direção do polo positivo e a velocidade de migração dependerá do tamanho dos diferentes fragmentos. Após um tempo de migração, é possível observar bandas no gel ou matriz. Cada banda, representada no esquema por uma faixa azul, corresponde a um conjunto de moléculas que têm como característica comum o tamanho. Geralmente, na margem esquerda da matriz são aplicadas amostras de DNA compostas por fragmentos cujos tamanhos são conhecidos e que servem de referência para a estimativa dos fragmentos de DNA gerados após digestão e migração eletroforética. Tais amostras são denominadas marcadores e alguns dos tamanhos de tais marcadores (M) estão representados na figura. A foto à direita contém apenas uma banda de DNA humano com cerca de 800 pares de bases (pb). A técnica de eletroforese pode ser visualizada em detalhes no vídeo situado no endereço: <http://www.youtube.com/watch?v=TZ-K13Y4ffw>

As polimerases do DNA são enzimas capazes de realizar a duplicação desta molécula. A **Taq polimerase** é uma polimerase do DNA que atua em altas temperaturas, ou seja, em temperaturas em que outras polimerases seriam degradadas pelo calor. Ela está presente na bactéria *Thermus aquaticus*, que vive em temperaturas extremas de gêiseres e fontes termais.

Fragmentos de DNA, cuja sequência de bases é conhecida, podem ser obtidos em grande quantidade pela técnica da PCR (iniciais da sigla em inglês *Polymerase Chain Reaction*). A PCR, está esquematizada na Figura 3. Milhões de cópias da molécula desejada podem ser obtidas muito rapidamente, em cerca de 2 horas. A sequência que se deseja amplificar deve estar localizada entre dois iniciadores sintéticos de duplicação de DNA, denominados *primers*. Tais iniciadores delimitam assim o trecho da molécula de DNA genômico que se deseja amplificar.

Para a obtenção de milhões de moléculas são necessários vários ciclos de replicação de DNA. Cada ciclo consiste da desnaturação da molécula de DNA pelo calor, permitin-

do assim que as fitas abertas da dupla-hélice possam servir de molde para as novas moléculas que serão sintetizadas pela enzima **Taq polimerase**, tendo como locais de início de duplicação os dois iniciadores (*primers*). Desse modo, apenas o trecho entre os dois iniciadores será duplicado. Após diversos ciclos de replicação, a coleção de fragmentos resultantes pode ser visualizada e separada do restante do genoma utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose (Figura 3).

Após o isolamento do inserto de DNA, este deve ser inserido em um vetor de clonagem (Ver BOX), e, para isso, são utilizadas enzimas capazes de ligar covalentemente o inserto ao vetor, denominadas DNA ligases.

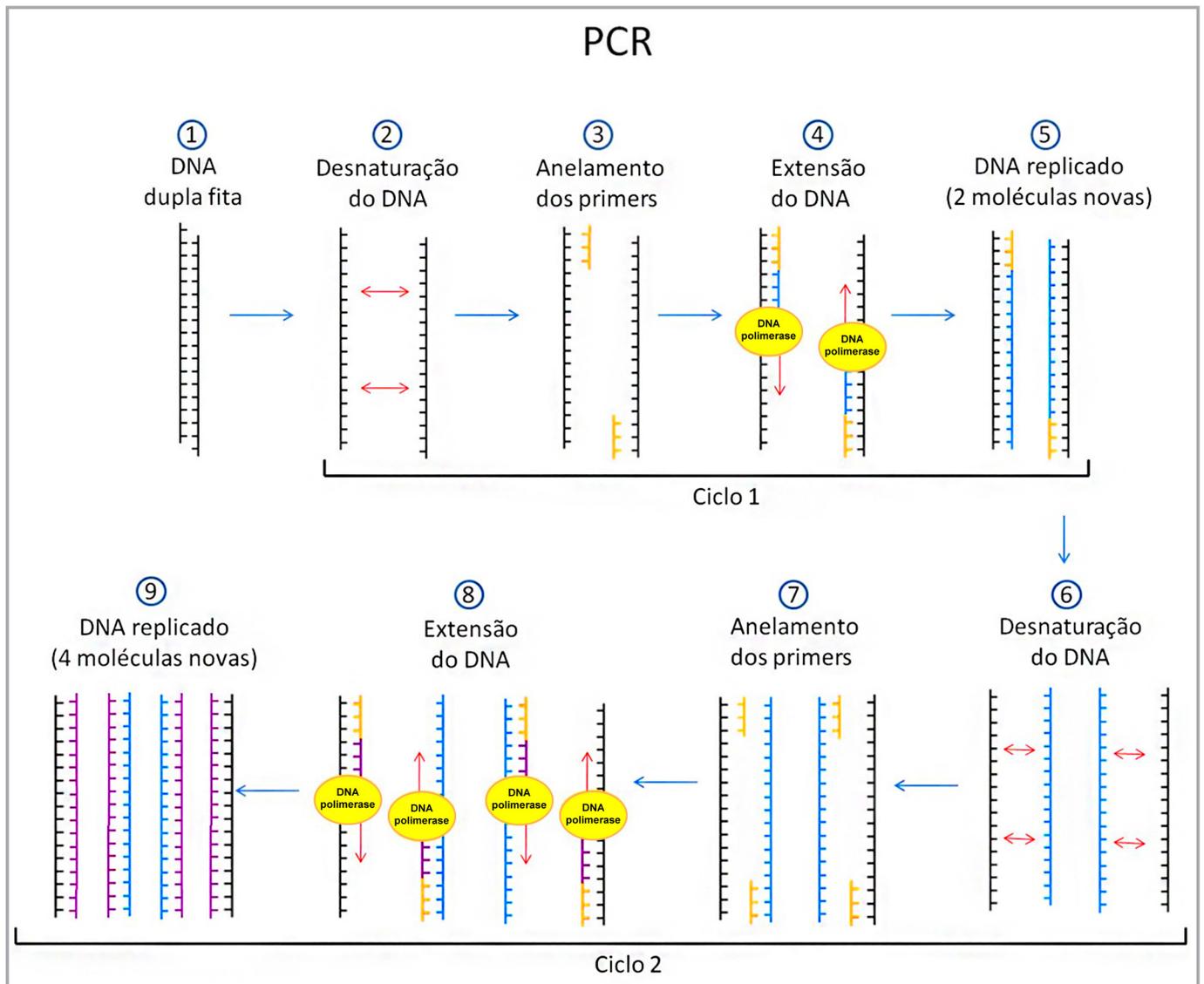


Figura 3.

Reação de PCR. Na figura estão apresentados 2 ciclos da reação de PCR. A cada ciclo de amplificação, o DNA é copiado de forma exponencial. Em (1) está representado um DNA dupla fita. Com o início da reação de PCR (2), a temperatura é aumentada para 95° C e as fitas do DNA são separadas (desnaturadas). Após a separação das fitas do DNA, a temperatura da reação é diminuída para cerca de 50° a 60° C e os primers são anelados ou emparelhados nos locais da fita molde onde houver complementaridade de bases (3). Na etapa (4), a temperatura da reação é elevada para cerca de 72° C e a enzima Taq polimerase sintetiza a nova cadeia de DNA (representada em azul, no ciclo 1, e em lilás no ciclo 2), estendendo o primer emparelhado na fita que servirá de molde para a duplicação do DNA. Ao final deste processo, o DNA está copiado e foram obtidas 2 novas fitas filhas (em azul), representados no item 5 da figura. As fitas mães (em preto) e as fitas filhas, resultantes do ciclo 1 de PCR (em azuis), são submetidas a um novo ciclo. As moléculas do ciclo 1 servem como molde para mais síntese de DNA do ciclo seguinte (ciclo 2). Em (6), as fitas são novamente desnaturadas; (7) os primers são anelados na fita a ser copiada; (8) a Taq Polimerase sintetiza novas fitas (lilás) a partir das fitas mães (preto) e filhas (azul). Todas as fitas de DNA (pretas, azuis, lilás) servirão como molde para um novo ciclo de PCR. Sugestões de vídeos: <http://www.youtube.com/watch?v=ZmqqRPISg0g>; <http://www.youtube.com/watch?v=2KoLnlwoZKU>

INSERÇÃO DO DNA RECOMBINANTE NA CÉLULA

O DNA recombinante pode ser introduzido na célula por uma série de métodos, a citar os mais utilizados por choque elétrico (eletroporação) ou choque térmico (eleva-se a temperatura a 42° C), permitindo assim a entrada do transgene por estes, pela

formação de micelas hidrofílicas capazes de se fundir à membrana celular (lipofecção) e por transdução viral. Além disso, a replicação do DNA recombinante pode ocorrer em uma grande diversidade de células, e a escolha desta está relacionada com o objetivo da clonagem. Dentre as células utilizadas para a replicação e expressão estão: leveduras, célu-

las bacterianas, células de mamíferos, células de insetos, entre outros (Figura 4). As células bacterianas normalmente são utilizadas para replicação do DNA recombinantes por serem de fácil manipulação, alta taxa de replicação e baixo custo de manuseio com relação às demais células, mas também são utilizadas para a expressão de biofármacos menos complexos, como por exemplo a insulina. Já

células de mamíferos, por exemplo, são frequentemente utilizadas para expressão de proteínas recombinantes, visto que tais proteínas apresentam um padrão de modificação pós-traducional (modificação que ocorre após a síntese da cadeia polipeptídica, processo conhecido como tradução) mais complexo neste tipo de células, e que são fundamentais para a atividade biológica destas.

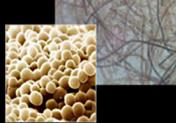
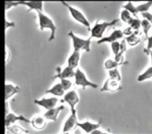
Sistemas de Expressão de Biofármacos						
Sistema	Bactérias	Leveduras e Fungos	Células de Inseto	Células de Mamífero	Plantas Transgênicas	Animais Transgênicos
						
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> - Genética e fisiologicamente bem caracterizadas - Rápido crescimento <i>in vitro</i> - Processos fermentativos bem descritos e controlados - Facilidade de manipulação gênica - Custo de produção baixo 	<ul style="list-style-type: none"> - Meio de cultivo simples e barato - Rápido crescimento <i>in vitro</i> - Livre de endotoxinas, oncogenes e partículas virais - Bem-caracterizado geneticamente - Alta eficiência de produção 	<ul style="list-style-type: none"> - Facilidade de manutenção das células - Rápida obtenção da proteína de interesse - Livre de endotoxinas, oncogenes e partículas virais - Modificações pós-traducionais e dobramento protéico mais complexos - Facilidade na purificação 	<ul style="list-style-type: none"> - Permite a expressão de proteínas complexas e com alta massa molecular - Padrão de glicosilação idêntico ou muito similar ao das proteínas humanas - Correto dobramento e processamento da proteína - Baixa imunogenicidade da proteína produzida 	<ul style="list-style-type: none"> - Maior economia e biossegurança - Escalonamento bastante viável - Padrão de glicosilação similar ao das proteínas humanas - Produto livre de pirógenos, endotoxinas e prions - Maior estabilidade da proteína produzida 	<ul style="list-style-type: none"> - Maior produtividade em comparação à expressão em células de mamífero - Padrão de glicosilação similar ao das proteínas humanas
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> - Ausência de maquinaria para adição de modificações pós-traducionais - Deficiência no dobramento protéico - Necessidade da eliminação de toxinas e pirógenos durante o processo de purificação - Possibilidade de agregação protéica 	<ul style="list-style-type: none"> - Padrão de glicosilação diferente do esperado, podendo tornar a proteína não-funcional - Alta degradação proteolítica - Processo de escalonamento para produção industrial ainda é desconhecido no caso dos fungos 	<ul style="list-style-type: none"> - Padrão de glicosilação diferente de proteínas de mamíferos, podendo tornar a proteína pouco funcional - Expressão transitória da proteína - Degradação protéica - Proteínas processadas incorretamente 	<ul style="list-style-type: none"> - Longo período para a seleção de células superprodutoras - Cultivo de alto-custo e trabalhoso - Necessidade de equipamentos dispendiosos - Rendimento modesto - Possibilidade de contaminação viral 	<ul style="list-style-type: none"> - Longo período para a seleção de células transgênicas - Baixo nível de expressão - Cultivo difícil e trabalhoso - Variabilidade na expressão - Tecnologia pouco estudada 	<ul style="list-style-type: none"> - Longo período para a seleção de animais transgênicos - Altos custos com manutenção dos animais - Purificação da proteína é complicada devido à presença de outras proteínas do animal - Questões éticas (bem-estar animal) e de biossegurança (transmissão de patógenos) são entraves

Figura 4. Sistemas de Expressão para Biofármacos: Vantagens e Desvantagens.

PARA SABER MAIS

MATASCI, M.; HACKER, D.L.; BALDI, L.; WURM, F.M. Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discovery Today: Technologies* 5, 1-6, 2008.

MHASHILKAR, A. M.; ATALA, A. Advent and Maturation of Regenerative Medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*, v. 7, n. 6, p 430-45, 2012.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature Biotechnology*, v. 28, p. 917-924, 2010.

WALSH, G.; JEFFERIS, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*, v. 24, p. 1241-1252, 2006.

<http://pfarma.com.br/noticia-setor-farmaceutico/mercado/461-medicamentos-biofarmaco.html#ixzz2agENAr8s> - Biofármaco é a aposta para o futuro e já são 5 vezes mais testados que medicamentos químicos - PFARMA

<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/11454/162/brasil-amplia-producao-de-medicamentos-biologicos.html> - Brasil amplia produção de medicamentos biológicos