



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Filipa Maria Almeida Casimiro Antunes

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Estudos de estabilidade de preparações farmacêuticas de anticorpos monoclonais” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Anabela Fonseca e do Professor Doutor João Leitão apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Fevereiro de 2019

Filipa Maria Almeida Casimiro Antunes

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Estudos de estabilidade de preparações farmacêuticas de anticorpos monoclonais” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Anabela Fonseca, e do Professor Doutor João Leitão e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Fevereiro 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Declaração de integridade

Eu, Filipa Maria Almeida Casimiro Antunes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013127944, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Estudos de estabilidade de preparações farmacêuticas de anticorpos monoclonais” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 07 de fevereiro de 2019.

Filipa Antunes

“The only way to do great work is to love what you do. If you haven't found it yet, keep looking. Don't settle.”

Steve Jobs

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio de muitas pessoas e entidades a quem passo a agradecer.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Professor Doutor João Leitão, por ter aceite orientar a minha monografia.

À Dra. Anabela Fonseca, por toda a orientação, incentivo e conhecimentos transmitidos durante a minha passagem pela Farmácia Gama. À restante equipa técnica pela motivação, por me proporcionarem um ambiente agradável e permitirem o meu desenvolvimento a nível profissional e pessoal.

Aos amigos, que me proporcionaram momentos de descontração e sempre me apoiaram, em especial à Ana Catarina que me ajudou nos momentos de maior aflição, à Tânia com quem partilhei a maior parte do meu percurso académico e à Mariana pela presença constante.

Por fim, não posso deixar de agradecer à minha família, pelo apoio incondicional e por nunca deixarem de acreditar que eu seria capaz.

A todos, o meu OBRIGADO!

Filipa

Índice Geral

Agradecimentos	5
Índice Geral.....	6
Parte I.....	8
Índice de Abreviaturas.....	9
1. Introdução.....	10
2. Farmácia Gama.....	10
3. Análise SWOT	11
3.1. Pontos Fortes	11
3.1.1. Localização da Farmácia.....	11
3.1.2. Equipa técnica multidisciplinar.....	12
3.1.3. Projeto <i>Kaizen</i>	13
3.1.4. Farmácia Informatizada	13
3.1.5. Autonomia das tarefas realizadas	14
3.1.6. Aconselhamento Farmacêutico.....	15
3.1.7. Gestão de encomendas.....	16
3.2. Pontos Fracos	16
3.2.1. Formações.....	16
3.2.2. Relacionamento de nomes comerciais com DCI.....	16
3.2.3. Conteúdos programáticos.....	17
3.2.4. Receitas Manuais.....	17
3.3. Oportunidades.....	17
3.3.1. Estágio de Verão.....	17
3.3.2. Cartão da Farmácia Gama.....	18
3.3.3. Serviços da farmácia	18
3.3.4. Medicamentos manipulados	19
3.4. Ameaças	19
3.4.1. Falta de medicamentos.....	19
3.4.2. Locais de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica.....	20
3.4.3. Abertura de uma nova farmácia.....	20
3.4.4. Fraco conhecimento relativamente a medicamentos genéricos pelo utente	20

4. Conclusão.....	21
Referências Bibliográficas	22
Anexos	23
Parte II	25
Índice de Abreviaturas.....	26
Resumo	28
Abstract	29
1. Introdução.....	30
2. Evolução dos anticorpos monoclonais (mAbs).....	31
2.1. mAbs de primeira geração.....	32
2.2. mAbs de segunda geração.....	33
2.3. mAbs de terceira geração.....	34
3. Mecanismo de ação dos mAbs	35
3.1. Citotoxicidade	35
3.2. Modulação da ativação/interação celular	36
3.3. Prevenção do crescimento e proliferação	36
3.4. Modulação da sinalização imunológica	36
3.5. Neutralização de corpos estranhos.....	37
4. Estabilidade dos mAbs	37
4.1. Vias de degradação	40
4.1.1. Vias de degradação física	40
Agregação.....	40
Desnaturação	41
4.1.2. Vias de degradação química	42
Fragmentação	42
Desaminação	42
Oxidação	43
Glicação	44
5. Principais métodos de detecção em “Pre-screening”	44
6. Estudos de estabilidade dos mAbs.....	45
7. Conclusão.....	49
Referências Bibliográficas	50

Parte I

**Relatório de estágio em Farmácia Comunitária
Farmácia Gama**

Índice de Abreviaturas

ANF – Associação Nacional de Farmácias

DCI – Denominação Comum Internacional

HDL – High Density Lipoprotein

LDL – Low Density Lipoprotein

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos não sujeitos a receita médica

PVP – Preço de Venda ao Público

I. Introdução

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) é uma forma de complementar e colocar em prática os conhecimentos teóricos adquiridos durante quatro anos e meio sendo, por isso, uma parte essencial do percurso académico.

O estágio foi realizado na Farmácia Gama, que por si só é uma conceituada farmácia de Viseu, sob a orientação da Dra. Anabela Fonseca, durante o período de 02 de maio de 2018 a 04 de agosto de 2018, perfazendo um total de 648 horas.

O objetivo deste estágio passa por dar uma visão global do trabalho desempenhado numa farmácia comunitária. Este vai desde a parte do *backoffice*, onde se faz a gestão de encomendas, gestão de *stocks*, verificação de prazos de validades, até ao atendimento público, em que o farmacêutico desempenha um papel fundamental nestas atividades. Como agente de saúde pública é essencial que o farmacêutico ganhe a confiança dos utentes, porque muitas vezes, tendo em consideração a proximidade à população, é o primeiro local onde o utente vai procurar aconselhamento sobre a saúde. Por esta mesma razão, cada vez mais o farmacêutico assume uma posição mais evidente na comunidade.

Neste relatório irei fazer uma análise crítica, sob a forma de uma análise SWOT, onde são tratados os pontos fortes, os pontos fracos, as oportunidades e as ameaças que surgiram ao longo do estágio.

2. Farmácia Gama

A Farmácia Gama localiza-se na Avenida Emídio Navarro, nº 94, no centro da cidade de Viseu, sendo uma das mais antigas. Atualmente é propriedade da Dra. Maria Luísa Saraiva Cabral Costa, quando em 1974 a adquiriu por trespasse ao Dr. Heitor Gama Castelo Branco.

Esta farmácia está aberta ao público de segunda a sexta-feira das 8 horas às 20 horas e das 9 horas às 19 horas ao sábado, tendo como objetivo principal a satisfação das necessidades dos utentes. Além deste horário, também está inserida num plano de atendimento permanente, juntamente com outras farmácias da cidade em que existe uma escala que determina qual o dia e qual a farmácia que estará aberta 24 horas. Nestes dias de serviço, fica apenas um funcionário da farmácia depois da meia-noite, a quem os utentes se podem dirigir.

3. Análise SWOT

Numa análise SWOT avaliam-se aspetos tanto a nível interno como a nível externo. O acrónimo SWOT significa: pontos fortes (*Strengths*), pontos fracos (*Weaknesses*), oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*), sendo que os dois primeiros estão incluídos na análise a nível interno (Tabela 1a), e os dois últimos estão incluídos na análise a nível externo (Tabela 1b).

Tabela 1a – Aspetos internos da análise SWOT relativamente ao estágio curricular.

Aspetos a nível interno	
Pontos Fortes	Pontos Fracos
Localização da Farmácia	Formações
Equipa técnica multidisciplinar	Relacionamento de nomes comerciais com denominação comum internacional (DCI)
Projeto <i>Kaizen</i>	Conteúdos programáticos
Farmácia informatizada	Receitas manuais
Aconselhamento farmacêutico	
Gestão de encomendas	

Tabela 1b – Aspetos externos da análise SWOT relativamente ao estágio curricular

Aspetos a nível externo	
Oportunidades	Ameaças
Estágio de Verão	Falta de medicamentos
Cartão da farmácia	Locais de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM)
Serviços de farmácia	Abertura de uma nova farmácia
	Fraco conhecimento relativamente a medicamentos genéricos pelo utente

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Localização da Farmácia

A Farmácia Gama está localizada numa zona privilegiada, integrada no centro da cidade de Viseu, com bons acessos, frequentada por uma população essencialmente heterogénea, ou seja, de várias faixas etárias e também de vários estratos sociais. Na área envolvente à farmácia existem outros serviços como clínicas de saúde, escolas, centros de dia,

estabelecimentos comerciais, escritórios e alguns pontos turísticos, tornando-se desta forma uma área bastante movimentada, contribuindo para a heterogeneidade da população. Contudo, como é de prever, os idosos acabam por ser os clientes mais assíduos da farmácia, uma vez que pertencem à faixa etária que está, muitas vezes, sujeita à polimedicação, vão em busca de um aconselhamento e cuidado personalizado. Muitos deles já são clientes fidelizados na farmácia, existindo alguns que o são desde a aquisição da farmácia pela atual proprietária.

Outro aspeto a realçar, é a proximidade da farmácia ao recinto onde se realiza a feira semanal (terças-feiras), o que provoca um aumento significativo de utentes nesse dia.

Assim, a Farmácia Gama apresenta uma elevada visibilidade, reputação e acessibilidade, em parte devido à sua história e localização.

3.1.2. Equipa técnica multidisciplinar

A equipa técnica de uma farmácia tem um papel fulcral para o seu sucesso. A Farmácia Gama apresenta uma ampla, diversificada e bastante cooperativa equipa, que alcança e cumpre de forma eficaz e eficiente os objetivos estabelecidos. As relações interpessoais e o ambiente no trabalho também contribuem para o bom funcionamento da farmácia e para a relação farmácia-utente.

A equipa é constituída por 12 elementos: um diretor da farmácia, três farmacêuticos, três técnicos de farmácia, uma conselheira de dermocosmética, uma gestora financeira, duas auxiliares responsáveis pela receção de encomendas e uma auxiliar de limpezas. A organização da equipa faz com que cada elemento tenha determinadas funções, desde a receção de encomendas, ao *marketing*, conferência do receituário, aconselhamento dermocosmético, entre outras. Isto permite que cada membro fique mais familiarizado com uma determinada área, possibilitando um aconselhamento com maior qualidade. Todavia, tal não significa que todos os profissionais não possuam o conhecimento e as competências adequadas para realizarem qualquer uma das outras tarefas.

Durante o meu percurso, a integração na equipa foi bastante fácil, porque estamos perante uma equipa jovem e bastante acolhedora, estando sempre disponíveis para esclarecimento de dúvidas e para ajudarem em caso de necessidade. O bom ambiente e a boa disposição que se fazia sentir na farmácia foi a grande influência para a minha integração e sucesso durante o estágio.

3.1.3. Projeto Kaizen

A Farmácia Gama tem implementada a filosofia *Kaizen*. A palavra *Kaizen* significa “melhoria contínua”, tendo como lema “mudança para melhor” e foi introduzido no Japão por Masaaki Imai. Atualmente é um pilar importante para a estratégia competitiva a longo prazo para as empresas, sendo reconhecido a nível mundial. Assim, esta filosofia tem como conceitos de modelo de gestão a organização, a produtividade, a melhoria contínua, a eficiência operacional e os algoritmos¹.

É importante definir objetivos, fazer o planeamento das tarefas dos membros da equipa e organizar o *backoffice*². Para o cumprimento destes objetivos, Kpi's, é essencial a realização de reuniões, neste caso específico feitas pelo menos 2 vezes por semana, juntando toda a equipa, de forma a haver trocas de informações, manter a comunicação e monitorizar os objetivos que foram estipulados. Existe então o quadro *Kaizen* que se encontra no *backoffice* e tem como objetivo mostrar à equipa quais as tarefas a desempenhar, o seu progresso, se houve ou não o cumprimento dos objetivos propostos, bem como as campanhas que estão em vigor naquele momento.

Na minha opinião, este sistema acaba por ser bastante importante trazendo inúmeras vantagens na organização e funcionamento de uma farmácia, uma vez que promove o espírito de equipa ao definir os objetivos que devem ser alcançados e leva também à redução de erros de *stock*.

3.1.4. Farmácia Informatizada

A Farmácia Gama tem um *robot*, onde a maioria dos medicamentos se encontram armazenados, o que traz inúmeras vantagens tanto a nível de armazenamento como a nível da dispensa de medicamentos. As principais vantagens a nível de armazenamento são a rentabilidade do espaço da farmácia, o controlo total do *stock* e prazos de validade e, por fim, a arrumação automática. A nível de dispensa dos medicamentos há uma maior rapidez na dispensa de uma receita, o que promove uma maior disponibilidade para o atendimento personalizado e menos erros humanos na dispensa dos mesmos. Contudo, apresenta duas desvantagens, apesar de pouco significativas, como a dispensa de um medicamento de cada vez e em caso de avaria ter que se entrar em contacto com a *Glintt*.

Os medicamentos são introduzidos no *robot* através da leitura do código de barras do medicamento e caso o prazo de validade do mesmo seja inferior ao predefinido, deve ser feita a sua introdução manual. Tal acontece desta forma, para que seja sempre dispensado primeiro o medicamento com menor prazo de validade. De seguida, coloca-se a embalagem

no tapete rolante de entrada, onde são medidas as dimensões da embalagem por infravermelhos. O *robot* arruma o medicamento conforme o espaço disponível nas prateleiras e dispensa-o automaticamente na saída principal.

A Farmácia Gama também possui o equipamento *Cashguard*, onde antes de se terminar a venda, se coloca o pagamento respetivo ao operador e logo de seguida, a máquina concede automaticamente o troco. Este equipamento também traz bastantes vantagens, uma vez que minimiza erros de troco e no final do dia acaba por facilitar a conferência das caixas. A meu ver, no que toca a estas tecnologias, estas foram uma grande ajuda porque não perdia tempo em ir à procura do medicamento, nem tinha que me preocupar com o troco, o que me permitia estar mais concentrada e dar uma maior atenção ao utente.

Sendo uma farmácia que pertence à Associação Nacional das Farmácias (ANF), utiliza o SIFARMA 2000®. Este *software* é transversal a toda a farmácia, uma vez que facilita não só os processos de emissão e receção de encomendas, consulta e anulação de vendas, controlo de prazos de validade, realização de vendas com ou sem receita médica, bem como realização de vendas suspensas, com e sem crédito, fazendo a atualização automática do *stock*, gestão do receituário e de psicotrópicos. Além destas funções, também fornece informação atualizada sobre cada medicamento, como a posologia, as indicações terapêuticas, as precauções, as interações e contraindicações, sendo bastante útil em caso de dúvidas por parte do profissional de farmácia. No meu caso específico, esta ferramenta foi uma grande ajuda, principalmente na parte inicial do estágio, durante o atendimento aos utentes. O sistema ainda emite alertas caso haja algum tipo de interações, classificando-as como leves, moderadas ou graves, juntamente com a devida justificação científica.

3.1.5. Autonomia das tarefas realizadas

Desde sempre que todos os membros da equipa da Farmácia Gama se mostraram disponíveis para me ajudar e tirar dúvidas, deixando-me sempre muito à vontade. No início do estágio, fiz algumas receções de encomendas de forma autónoma passando quase de seguida para o atendimento ao balcão. Quando iniciei o atendimento ao balcão estive sempre acompanhada por um elemento da equipa, onde aprendi de que forma como comunicar com os utentes e algumas informações relativas a determinados medicamentos, acabando por desenvolver capacidades que me ajudaram ao longo deste percurso. Desde cedo, que me deram a segurança para realizar as tarefas de forma autónoma, o que foi essencial para o meu crescimento ao longo do estágio.

3.1.6. Aconselhamento Farmacêutico

Na prática farmacêutica, o aconselhamento farmacêutico é uma das áreas de maior importância.

Os utentes dirigem-se à farmácia para pedir conselhos relativamente a alguma situação específica ou então para o aviamento de uma receita. No caso do aviamento da receita é sempre importante o farmacêutico explicar a posologia, dar indicação de alguns efeitos adversos que possam acontecer e também explicar qual a indicação do medicamento, de forma a garantir a correta utilização do mesmo. No caso de irem à farmácia à procura de ajuda e conselhos para determinada condição é essencial fazer uma avaliação da situação para perceber o que poderá ter causado os sintomas e então sugerir opções não farmacológicas, ou caso seja necessário, opções farmacológicas e, em último caso, sugerir a ida ao médico.

Assim, no meu ver é nestes momentos que o papel do farmacêutico se evidencia, podendo demonstrar o seu valor profissional. Durante o meu percurso pude aconselhar diversas pessoas e, como o meu estágio se realizou na altura da Primavera, houve muitos casos de alergias, essencialmente rinite alérgica. Assim, o aconselhamento passava por fazer um anti-histamínico H1, a cetirizina, denominado Zyrtec®, não sujeito a receita médica uma vez por dia, de preferência à noite antes do jantar³. Contudo, existe outro anti-histamínico H1 que tem um efeito menos sedativo que poderia ser cedido, o Telfast®, com igual posologia⁴. Para alívio imediato da congestão nasal e rinorreia era indicado um descongestionante tópico, como o Vibrocil®. Muitos também apresentavam comichão e ardor nos olhos pelo que eram indicadas umas gotas oftálmicas com ação calmante, como por exemplo, da Optrex®.

Também apareceram casos de diarreia aguda, sendo que é sempre importante tentar saber a causa. Deve-se aconselhar medidas não farmacológicas como a ingestão de muitos líquidos. Como medidas farmacológicas, podemos aconselhar o cloridrato de loperamida, o Imodium Rapid®, e tomar 1 após cada dejeção diarreica, sendo que o máximo são 6 por dia⁵. Também é importante aconselhar um probiótico de forma a restabelecer a flora intestinal, como o Atyflor® ou o UL-250®. Caso não haja melhoria, o ideal é ir ao médico.

Estes aconselhamentos são baseados em protocolos de aconselhamento presentes na farmácia que têm indicados os vários tipos de tratamento que se podem fazer para cada situação específica, quais os sintomas e, também algumas medidas não farmacológicas, como podemos observar nos 2 exemplos em anexo.

3.1.7. Gestão de encomendas

Como já mencionado anteriormente, surgiu a oportunidade de estar na receção de encomendas. As encomendas diárias são geradas automaticamente pelo SIFARMA2000®, consoante as vendas diárias e predefinição do *stock* máximo e mínimo para determinado produto. Contudo, no fim de cada dia, esta encomenda é confirmada por um elemento da equipa, sendo enviada depois para a Plural, Empifarma, Magium e Alliance. Assim, na manhã seguinte a encomenda é entregue, colmatando o *stock* do dia anterior.

Esta tarefa ajudou-me de certa forma a reconhecer os medicamentos e associar o princípio ativo ao medicamento de referência, bem como saber o local onde se guardava cada medicamento (*robot* ou prateleira), ter noção da gestão de *stocks*, facilitando o atendimento ao público, uma vez que permitiu familiarizar-me com os medicamentos.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Formações

Na minha opinião, as formações foram um ponto fraco, porque durante o estágio não tive nenhuma formação externa, o que não me permitiu adquirir determinados conhecimentos sobre laboratórios e algumas gamas de produtos.

Por outro lado, assisti a bastantes formações internas através de delegados de informação médica. O objetivo destas formações era muitas vezes a apresentação de novos produtos ou então relembrar as propriedades dos que já existem.

Considero que as formações são bastante importantes, principalmente para os estagiários uma vez que é com elas que ficamos a conhecer os produtos de cada laboratório e quais as suas propriedades, em áreas onde existe falta de conhecimento, como por exemplo a área de dermocosmética.

3.2.2. Relacionamento de nomes comerciais com DCI

No dia-a-dia da farmácia as marcas têm um grande peso, uma vez que é a forma mais comum de os utentes se referirem à medicação, falando-se muito pouco em princípios ativos.

Assim, como durante o percurso académico raramente foram mencionados nomes comerciais, apenas princípios ativos, esta associação acabou por se tornar numa dificuldade durante o estágio. Contudo, com o decorrer do estágio consegui ultrapassar esta dificuldade.

3.2.3. Conteúdos programáticos

O plano curricular do MICF envolve diversas áreas que vão desde a farmacologia, às químicas, passando por plantas medicinais sendo, portanto, bastante diverso, o que nos permite adquirir uma grande e variável quantidade de conhecimentos.

Porém, existem áreas de grande importância na farmácia comunitária que durante o curso são pouco exploradas. A dermocosmética, as preparações de uso veterinário, a nutrição e a puericultura são as áreas menos exploradas e, por isso, quando era abordada para o aconselhamento destas, sentia-me bastante desconfortável, tendo que ir pedir, sempre, ajuda a um membro da equipa de forma a colmatar essas limitações.

Assim, considero importantes que se façam alterações em algumas unidades curriculares, de forma a que estas se tornem mais próximas da realidade da farmácia. Desta maneira, os alunos estarão melhor preparados para realizarem o estágio curricular sem se sentirem menos confortáveis relativamente a estas áreas.

3.2.4. Receitas Manuais

Com o aparecimento das receitas eletrónicas, as receitas manuais foram postas cada vez mais de lado. As receitas eletrónicas trouxeram inúmeras vantagens, sendo que a principal foi a diminuição drástica de erros de dispensa., devido muitas vezes à caligrafia dos prescritores que era ilegível.

Ainda assim, vão aparecendo algumas receitas manuais, pelo que no início o à vontade com as mesmas não era muito, uma vez que é essencial verificar sempre se a receitas cumpre todos os parâmetros necessários para depois a farmácia receber a comparticipação do estado. Além disso, muitas vezes a caligrafia não era perceptível, sendo necessário recorrer a outro membro da equipa, para verificar o medicamento em causa, dose e posologia.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Estágio de Verão

A Farmácia Gama possibilita a realização de estágios de verão a estudantes, o que, para mim, foi uma mais-valia, porque me permitiu ter uma noção da “realidade” de farmácia comunitária mais cedo, ficando familiarizada com o funcionamento da mesma e com o *software* utilizado.

Este trouxe vantagens para o meu estágio curricular, uma vez que ao conhecer os membros da equipa consegui adquirir uma autoconfiança na realização das tarefas, ajudando

no meu progresso. Graças a isso, também passei mais tempo no atendimento ao público, estando menos tempo no *backoffice*, permitindo evoluir nesta área e na minha forma de comunicação com os utentes.

3.3.2. Cartão da Farmácia Gama

A Farmácia Gama recentemente criou um cartão de cliente de forma a fidelizar mais os utentes. Com este cartão, há acumulação de pontos para obter descontos em compras efetuadas posteriormente.

Como estive presente aquando a criação deste cartão, ajudei na associação dos cartões aos clientes já fidelizados, que se mostraram bastante recetivos ao mesmo, inclusive na sua aquisição por parte de novos clientes. Tal permitiu que estes nos dissessem que iriam voltar.

Assim, considero o cartão da farmácia, uma mais-valia, pois é uma forma de garantia e fidelização de utentes. Por isso, tornou-se uma oportunidade, uma vez que me permitiu estar em contacto com a área de *marketing* farmacêutico.

3.3.3. Serviços da farmácia

A Farmácia Gama tem inúmeros serviços à disponibilidade do utente. Apresenta os serviços comuns farmacêuticos como a medição dos parâmetros bioquímicos, como tensão arterial, perfil lipídico, glicémia, entre outros. Juntamente com estes serviços, também disponibiliza a administração de vacinas e injetáveis.

Para a medição do perfil lipídico, colesterol total, HDL (do inglês *High Density Lipoprotein*), LDL (do inglês *Low Density Lipoprotein*) e triglicéridos a farmácia adquiriu o COBAS® que faz a medição destes 4 parâmetros concomitantemente de forma rápida e eficaz dando uma informação mais detalhada ao utente. Em relação à medição da tensão arterial, por esta ser gratuita, é o parâmetro mais procurado principalmente pelos idosos, o que permite ter uma avaliação contínua da sua saúde, havendo um maior controlo, uma vez que cada medição é registada, ficando o utente com essa informação. Com estes serviços, consegui uma maior proximidade ao utente e também aplicar os conhecimentos adquiridos na faculdade.

Conta também com consultas de nutrição, podologia e estética, sendo que para estas vêm pessoas externas à farmácia de forma periódica.

É importante haver uma grande variedade de serviços, pois traz uma maior dinâmica à farmácia, possibilitando um maior cuidado para o utente e o seu bem-estar.

Tendo em conta a maior afluência de idosos, acho que seria importante a farmácia implementar serviços como preparações individualizadas de medicamentos. Por serem polimedicados, os idosos praticam a toma da medicação de forma incorreta, podendo não obter o efeito pretendido.

3.3.4. Medicamentos manipulados

Quando os medicamentos convencionais preparados a larga escala não conseguem responder a determinadas terapêuticas específicas, usam-se preparações de medicamentos manipulados. Estas são especialmente importantes ao nível da pediatria devido aos ajustes de doses.

Durante o estágio, foi uma prática pouco recorrente, contudo preparei um manipulado de um creme, juntando dois cremes já comercializados, o Advantan® (30g) e o Metroderme® (30g) com indicação para o tratamento de rosácea. A preparação foi sempre supervisionada e seguindo as Boas Práticas de Farmácia, regulamentadas pela Portaria nº 547/2004⁶.

É importante referir sempre a posologia ou, neste caso, o modo de utilização, o prazo de validade e o método de conservação no momento da dispensa ao utente.

3.4. Ameaças

3.4.1. Falta de medicamentos

Durante o estágio deparei-me imensas vezes com a falta de medicamentos, devido a estarem esgotados nos laboratórios que os produzem, impossibilitando fazer uma encomenda instantânea. Isto acontece muitas vezes devido aos baixos Preço de Venda ao Público, PVP, dos medicamentos, tornando-os atrativos para a exportação para outros mercados, onde o PVP já é bastante superior. Por vezes, os utentes eram questionados se se podia trocar por outro genérico, mas por ter uma embalagem diferente, acabava por se tornar confuso para eles, principalmente no caso dos mais idosos.

Assim, a falta de medicamentos provoca o descontentamento dos utentes, o que pode provocar muitas vezes o afastamento do utente daquela farmácia, tornando-se por isso uma ameaça.

3.4.2. Locais de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica

A permissão, por parte do governo, da venda de medicamentos não sujeitos a receita médica, MNSRM, fora da farmácia tornou-se numa grande ameaça tanto para os farmacêuticos como para as próprias farmácias.

Muitas vezes, os locais de venda de MNSRM, conseguem praticar preços que as farmácias não, o que os torna mais atrativos para os utentes.

Assim, é importante o bom aconselhamento por parte do farmacêutico, demonstrar que tem conhecimentos e que se preocupa com a saúde dos utentes, sendo esta uma vantagem em relação aos outros locais e pela qual a farmácia se deve destacar.

3.4.3. Abertura de uma nova farmácia

Está esperada a abertura de uma nova farmácia, com localização relativamente perto da Farmácia Gama sendo, portanto, uma ameaça, uma vez que é possível que haja perda de clientes.

Contudo é importante tentar contornar esta ameaça, como por exemplo já se fez com a implementação do cartão da Farmácia Gama. Outra forma de se contornar esta ameaça poderá ser a realização de rastreios de saúde, campanhas promocionais, entre outras coisas, de forma a distinguir a Farmácia Gama pela diferença, pelo ótimo aconselhamento dado pelos profissionais e por colocar o utente sempre em primeiro lugar.

3.4.4. Fraco conhecimento relativamente a medicamentos genéricos pelo utente

Atualmente, a prescrição da medição é feita pela Denominação Comum Internacional, pelo que o farmacêutico deve sempre questionar o utente se prefere o de marca ou o medicamento genérico. Contudo, deparei-me ao longo do estágio, pelo pouco conhecimento apresentado por parte dos utentes relativamente a medicamentos genéricos, principalmente pelos idosos que muitas vezes pensam que o medicamento genérico e o de marca são medicamentos totalmente diferentes. Assim, é importante explicar que ambos têm o mesmo princípio ativo, igual dose, a mesma forma farmacêutica, indicação terapêutica, adequando a linguagem ao utente, de forma a que este entenda tudo e não fique com nenhuma dúvida. A diferença de preços muitas vezes também influencia o utente, pois ao acharem os genéricos bastante mais baratos, acham que não terá o mesmo efeito, o que demonstra que mais uma vez é importante clarificar todas as dúvidas, pois só assim, é que o utente consegue ficar totalmente esclarecido e assim tomar a sua decisão.

4. Conclusão

O estágio curricular é a etapa final do percurso académico do curso MICE, e é essencial porque é aqui que se tem o primeiro contacto com a vida profissional e o dia-a-dia de uma farmácia.

Posso dizer que contribuiu muito para o meu crescimento pessoal e profissional, tendo sido um desafio bastante gratificante. Permitiu-me perceber o impacto que o papel de farmacêutico tem na comunidade devido à sua grande proximidade farmacêutico-utente e da prestação de cuidados de saúde de grande qualidade, sendo esta bastante valorizada.

Tive a oportunidade de passar por todas as áreas que constituem a farmácia, sendo que a parte de aconselhamento farmacoterapêutico, que mais me despertou interesse, por poder aplicar os conhecimentos teóricos e também por lidar diretamente com o utente.

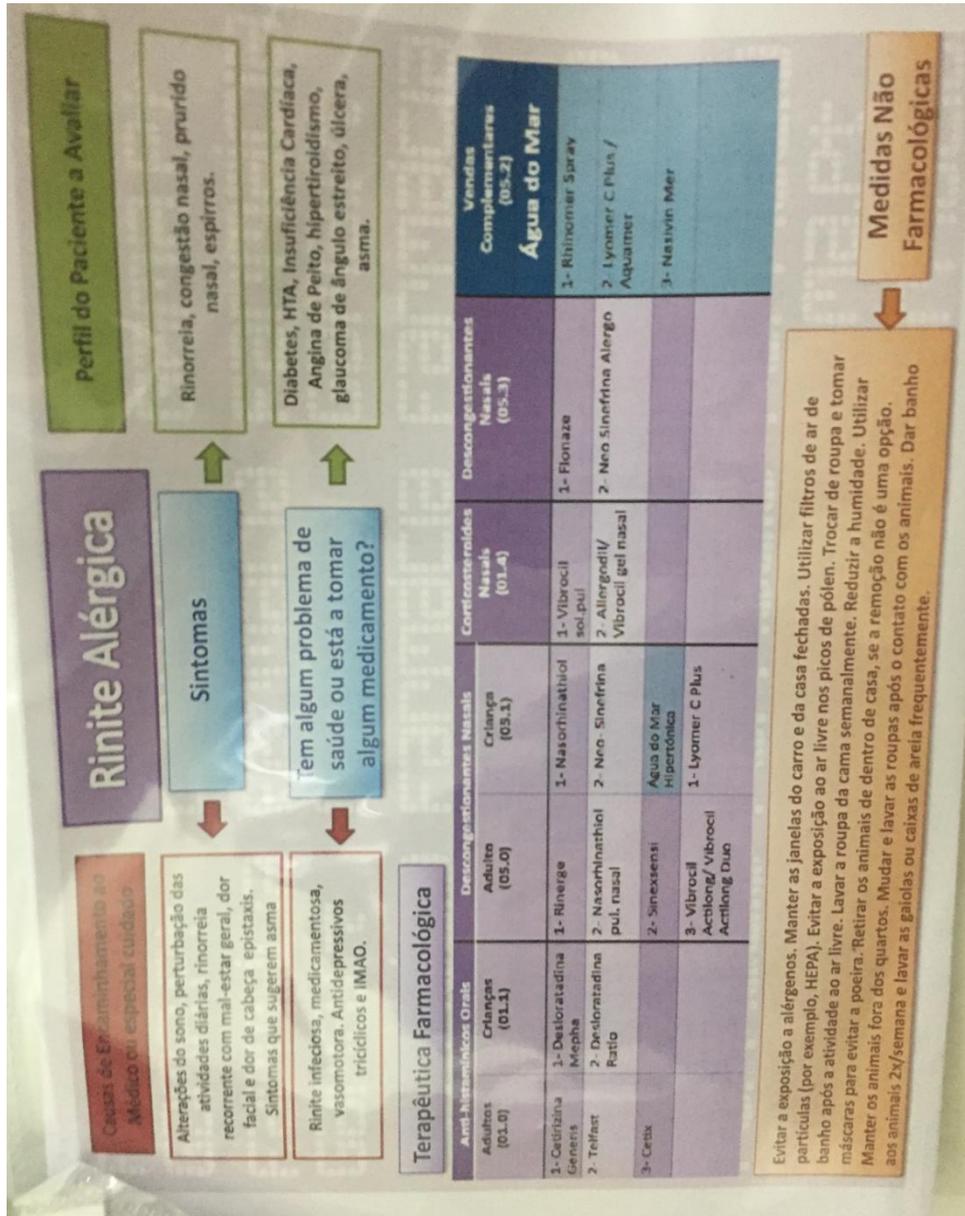
Também tive a sorte e o grande privilégio de estagiar na Farmácia Gama, com uma equipa maravilhosa e sempre disposta a ajudar e transmitir conhecimentos.

Considero assim, que o estágio foi uma das etapas mais importantes para a minha formação enquanto futura farmacêutica, tendo adquirido as principais ferramentas necessárias para a minha carreira profissional.

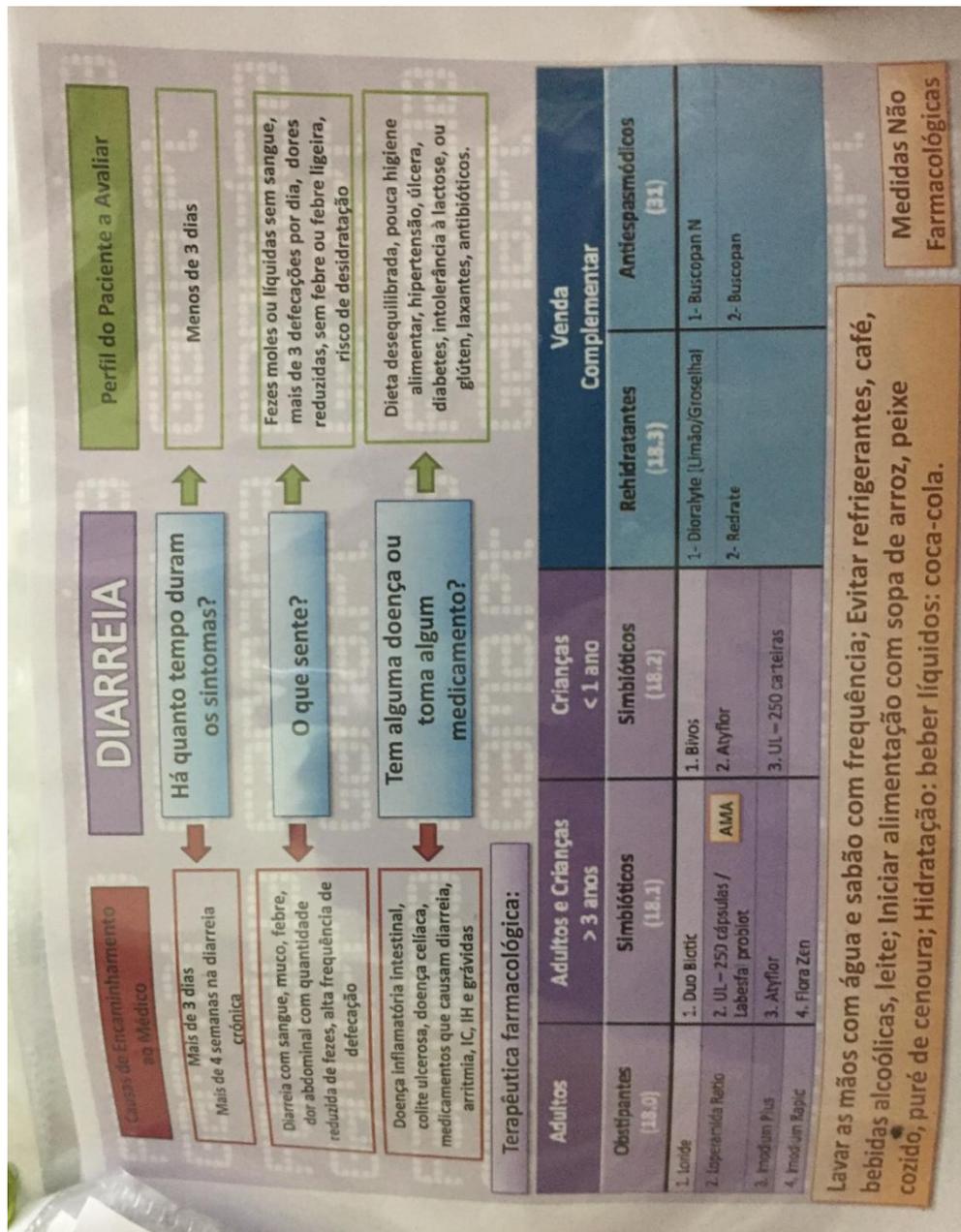
Referências Bibliográficas

1. Kaizen institute. - **Quem somos: O que é Kaizen?** [Acedido a 04 de setembro de 2018]. Disponível na internet em: <https://pt.kaizen.com/quem-somos/significado-de-kaizen.html>
2. Costa, M.J. - (2016) **Kaizen** [Acedido a 02 de setembro de 2018]. Disponível na internet em: Revista Saúde: <https://www.revistasauda.pt/noticias/Pages/Kaizen.aspx>
3. INFARMED - **Resumo das características do medicamento - Zyrtec 10 mg.** [Acedido a 02 de setembro de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9531&tipo_doc=fi.php?med_id=8350&tipo_doc=rcm
4. INFARMED - **Resumo das características do medicamento - Telfast 120 mg.** [Acedido a 02 de setembro de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=8350&tipo_doc=fi
5. INFARMED - **Resumo das características do medicamento – Imodium rapid 2 mg.** [Acedido a 02 de setembro de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4444&tipo_doc=fi
6. INFARMED - **Portaria n.º 594/2004, de 2 de Junho.** [Acedido a 01 de setembro de 2018]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a

Anexos



Protocolos presentes na Farmácia Gama, Viseu, Portugal



Protocolos presentes na Farmácia Gama, Viseu, Portugal

Parte II

**Estudos de estabilidade de preparações
farmacêuticas de anticorpos monoclonais**

Índice de Abreviaturas

- ADCC** – Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
- ADCP** – Fagocitose celular dependente de anticorpo
- ADCs** – Conjugado de anticorpo-fármaco
- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- ASN** – Asparagina
- ASP** – Ácido aspártico ou Aspartato
- BZV** – Bevacizumab
- CDC** – Citotoxicidade dependente do complemento
- CDR** – Região determinante de complementaridade
- CE-SDS** – Eletroforese capilar com dodecyl sulfato de sódio [sob condições redutoras, rCE-SDS e sob condições não redutoras, nrCE-SDS]
- CEX** – Cromatografia troca catiónica
- CH** – Domínio da região constante da cadeia pesada
- CL** – Domínio da região constante da cadeia leve
- CTX** – Cetuximab
- Cys** – Cisteína
- EGFR** – Recetores do fator e crescimento epidérmico
- EMA** - Agência Europeia do Medicamento (*European Medicines Agency*)
- Fab** – Fragmento de ligação ao antigénio
- Fc** – Fragmento cristalino
- FDA** – Food and Drug Administration
- Gln** – Glutamina
- Glu** – Ácido glutâmico
- Gly** – Glicina
- HAMAs** – Anticorpos humanos anti-murino (Human antimouse antibodies)
- HAT**- Hipoxantina, aminopterina timidina
- HER2** – Human Epidermal growth factor Receptor-type 2
- HGPRT** – Hipoxantina – guanina fosforibosiltransferase
- ICH** – Conferência internacional de harmonização (*International Conference on Harmonisation*)
- IEF** – Eletroforese de focalização isoelétrica
- IFX** – Infliximab
- Igs** – Imunoglobulinas

IL – Interleucina

LC-MS – Cromatografia líquida com espectrometria de massa

mAbs – Anticorpos monoclonais

Met – Metionina

NK – Células exterminadoras naturais (*Natural killer cell*)

RTX – Rituximab

SEC – Cromatografia de exclusão molecular

SE-HPLC/DAD – cromatografia líquida de exclusão molecular associada à detecção de matriz de díodo

Ser – Serina

TCR – Recetor das células T

Thr – Treonina

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

Trp – Triptofano

TTZ – Trastuzumab

Tyr – Tirosina

Val – Valina

VH – Domínio da região variável da cadeia pesada;

VL – Domínio da região variável da cadeia leve

Resumo

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são imunoglobulinas (Igs) pertencentes à classe dos produtos biofarmacêuticos, que são bastante usados no tratamento de várias doenças e também como uma ferramenta poderosa no diagnóstico laboratorial.

A sua descoberta já tem mais de 4 décadas, desde a sua produção, pela primeira vez, de uma linha celular de hibridoma. Graças aos avanços da tecnologia conseguiu-se que os mAbs passassem a ser de origem totalmente humana e, por isso, menos imunogénicos e com menos efeitos adversos.

Por serem bastantes suscetíveis a fatores de *stress* quer extrínsecos quer intrínsecos, existem estudos sobre as diferentes vias de degradação, tanto física como química, que acabam por ajudar a perceber quais os mecanismos que afetam a estabilidade e, de certa forma, diminuir a exposição destas moléculas a esses mesmos fatores.

Assim, nesta monografia é feita uma revisão bibliográfica, em que numa primeira parte se descreve a história e evolução dos mAbs, e o seu mecanismo de ação e, numa segunda parte é referida a estabilidade destas moléculas e as diferentes vias de degradação.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais, imunoglobulinas, estabilidade, vias de degradação, condições de *stress*, agregação.

Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) are immunoglobulins (Igs) belonging to the class of biopharmaceuticals, being widely used in the treatment of various diseases and also as a powerful tool in laboratory diagnosis.

Its discovery has more than 4 decades, from the production, for the first time, of a hybridoma cell line. Thanks to the advances in technology it has been possible for the mAbs to become fully human and therefore less immunogenic and with fewer adverse effects.

As they are quite susceptible to extrinsic and intrinsic factors, there are studies on the different degradation pathways, both physical and chemical, that helps to understand which mechanisms affect stability and somehow tries to decrease the exposure of these molecules to that factors.

Thus, in this monograph, a bibliographic review is made, in which the first part describes the history and evolution of the mAbs, the mechanism of action and then, in a second part the stability of these molecules and the different degradation pathways are mentioned.

Keywords: Monoclonal antibodies, immunoglobulins, stability, degradation pathways, stress conditions, aggregation.

I. Introdução

O desenvolvimento e a produção de produtos biofarmacêuticos tem-se tornado numa área de rápido crescimento dentro da indústria farmacêutica. Isto deve-se essencialmente à elevada melhoria nos procedimentos biotecnológicos, como por exemplo as tecnologias de ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante e de hibridoma, como também ao aumento do conhecimento a nível da química das proteínas.¹

Os anticorpos monoclonais (mAbs), produtos biofarmacêuticos, são glicoproteínas pertencentes à grande família de imunoglobulinas (Igs) que são secretadas por células B.² A sua descoberta e caracterização tem uma longa história, tal como a da própria imunologia, que remonta ao final do século XIX.³ Estes anticorpos têm como finalidade a identificação e neutralização de substâncias estranhas ao organismo, como bactérias e vírus, ou antígenos.^{2,4}

Relativamente à sua estrutura, cada molécula de um anticorpo é composta por 4 cadeias, 2 leves e 2 pesadas, idênticas entre si. Estas cadeias estão ligadas por pontes de dissulfeto, formando uma estrutura espacial semelhante a um Y (Figura I).

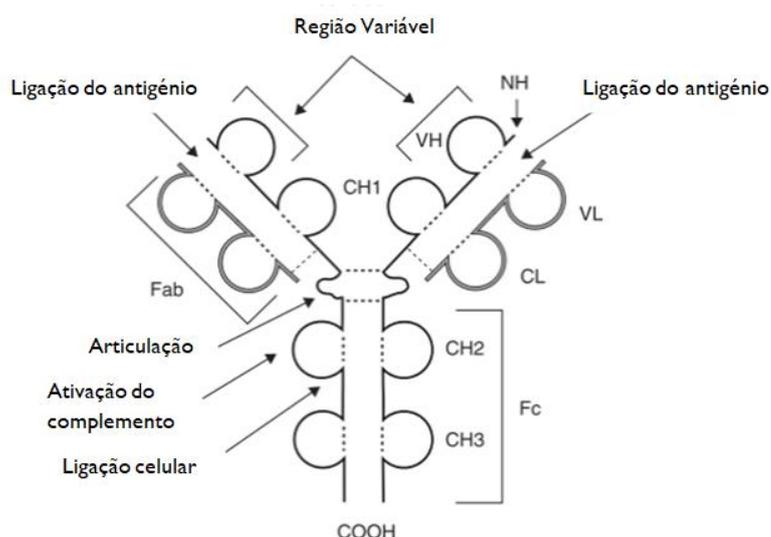


Figura I – Estrutura de uma molécula de imunoglobulina. Adaptado da referência 3. As cadeias pesadas aparecem em preto e as leves em cinza claro. CH: domínio da região constante da cadeia pesada; CL: domínio constante da cadeia leve; COOH: extremidade do terminal carboxilo; NH: extremidade terminal amino; VH: domínio da região variável da cadeia pesada; VL: domínio da região variável da cadeia leve; - - -: pontes de dissulfeto. A estrutura das Igs também se pode dividir na região de ligação ao fragmento de antígeno (Fab) composta por um domínio constante e um domínio variável tanto da cadeia leve (VL e CL) como da pesada (VH e CH1) e do domínio do fragmento cristalino (Fc) que é composto por 2 domínios constantes (CH2 e CH3). A especificidade dos anticorpos é mediada pelos domínios variáveis, representados pela região Fab.²

As cadeias leves apresentam uma região variável que vai determinar a especificidade para o antígeno, bem como uma região constante que difere de acordo com o facto de serem cadeias leves κ ou λ . O mesmo acontece com as cadeias pesadas que também têm

uma região variável e uma região constante que determinará as principais classes ou isotipos de Igs: λ , μ , α , δ , ϵ , que irão formar IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro da estrutura das cadeias de Ig, os domínios são estruturas repetidas de 110 aminoácidos com uma dobra beta. As cadeias leves apresentam 1 domínio na VL e 1 na CL, enquanto que as cadeias pesadas apresentam 1 domínio na VH e 3 ou 4 na CH, dependendo da classe de Ig. Os domínios CH1 e CH2 contêm uma área conhecida como a área de articulação da cadeia constante que vai conferir flexibilidade e permitir um acoplamento espacial adaptável.³

Dentro da região variável das cadeias leves e pesadas existem 3 segmentos hipervariáveis com 10 aminoácidos justapostos que formam o local de ligação ao antigénio, denominado de região determinante de complementaridade (*complementarity determining region*, CDR) 1, 2 e 3, sendo a mais variável o CDR3. As seis regiões hipervariáveis estão próximas, na superfície da imunoglobulina, o que permite uma maior interação com os antigénios.

Estas moléculas têm então duas funções principais, em que uma é reconhecer e fazer a ligação aos antigénios pela parte terminal – amino das cadeias (região variável), e a outra é a função efetora, realizada pelo terminal – carboxilo da cadeia pesada (região constante).³

2. Evolução dos anticorpos monoclonais (mAbs)

Como já anteriormente referido a descoberta, caracterização e evolução dos mAbs têm uma longa história, desde o início da era da imunologia.³

Em 1975, Köhler e Milstein desenvolveram métodos para o isolamento de anticorpos monoclonais a partir de células de hibridoma.⁵ A obtenção de hibridomas envolve a imunização de uma determinada espécie contra um epitopo específico de um antigénio e a obtenção de linfócitos B do baço de um animal (Figura 2). Os linfócitos B são depois fundidos com uma linha celular de mieloma que não contenha nenhuma célula produtora de Igs e sem a presença do gene hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT), ou seja, sem capacidade de sintetizar purinas pela via exógena. Estes investigadores aproveitaram esta deficiência e usaram-na como marcador de seleção de hibridomas. Estas células são então cultivadas, *in vitro*, num meio seletivo que contém hipoxantina – aminopterina – e timidina (HAT), onde apenas os hibridomas sobrevivem, uma vez que herdaram a capacidade de crescer indefinidamente das células de mieloma e a resistência seletiva dos linfócitos B primários.^{6,7}

Após a seleção, as culturas apropriadas são clonadas para obter um clone celular homogéneo de forma a produzir mAbs.⁸

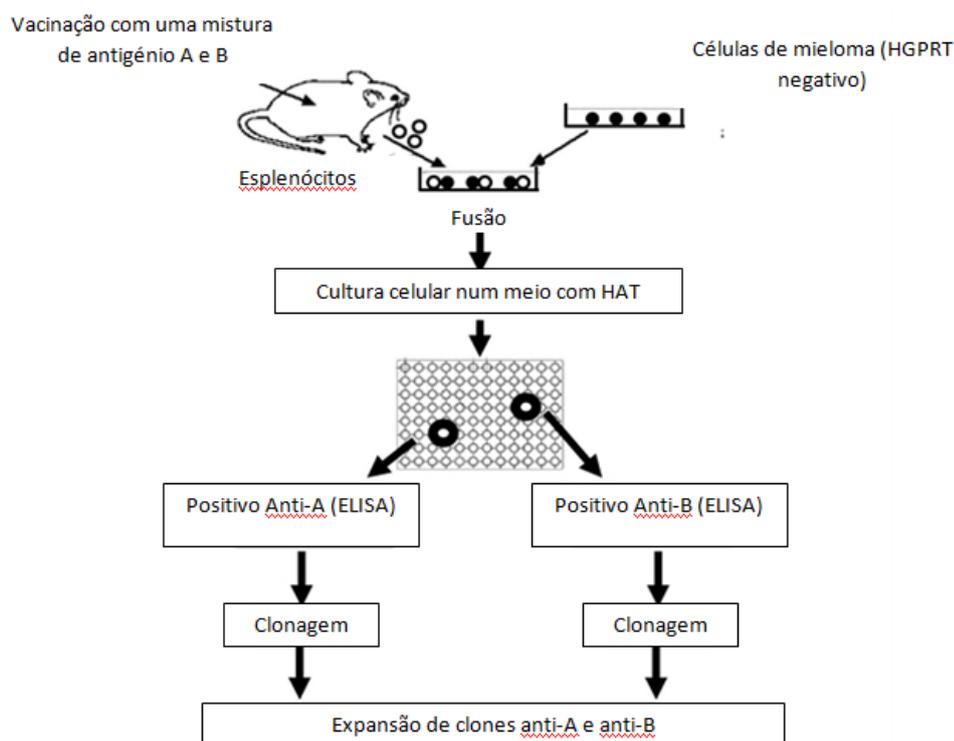


Figura 2 – Esquema ilustrativo da hibridização celular. Adaptado da referência 5

A formação de hibridomas tornou-se na base de produção de anticorpos monoclonais, o que levou à aprovação do primeiro mAb terapêutico pela *Food and Drug Administration* (FDA), após apenas uma década, denominado de muromonab-CD3 (OKT3), usado para a prevenção da rejeição de órgãos transplantados. É um anticorpo anti-CD3 IgG2a de rato que se liga ao CD3 expresso nos linfócitos T, bloqueando os seus efeitos. Contudo, o seu uso foi limitado a casos agudos devido aos efeitos colaterais relatados, como por exemplo, o desenvolvimento de anticorpos humanos anti-murino (HAMAs).^{6,9}

Antecipou-se que esta terapia fosse revolucionar a medicina, contudo o seu início ficou aquém das expectativas.¹⁰

Atendendo à evolução posterior na obtenção de mAbs estes são divididos em mAbs de primeira, segunda e terceira geração.

2.1. mAbs de primeira geração

Os mAbs de primeira geração por serem totalmente murinos, acabaram por ser problemáticos por duas razões principais: o complemento humano e os recetores Fc não se ligavam bem à região Fc das Igs dos murinos, o que levava a uma incapacidade de direccionar os componentes imunológicos humanos para o alvo pretendido para eliminação; e os pacientes desenvolviam HAMAs.⁷ O aparecimento dos HAMAs deve-se principalmente às diferenças entre o sistema imune humano e o dos murinos, o que origina uma *clearance*

rápida, hipersensibilidade, baixa capacidade de penetração no alvo pretendido e diminuição da eficácia.¹⁰

Como resultado destas complicações, a maioria dos mAbs terapêuticos de primeira geração foram retirados e devido a isso houve a necessidade de tornar os mAbs menos imunogênicos, ou seja, uma constituição mais humana, recorrendo-se à engenharia genética.^{7,10}

2.2. mAbs de segunda geração

A segunda geração de mAbs é caracterizada por terem na sua constituição uma parte de origem humana e engloba duas classes principais: os mAbs quiméricos e os mAbs humanizados.⁷

A quimerização envolve a produção de anticorpos monoclonais em que apenas a região variável é de origem animal, enquanto que as restantes cadeias pesadas e leves são de origem humana.³ Com esta substituição de sequências de murinos por sequências humanas esperava-se que houvesse uma diminuição significativa nas reações imunes contra o mAb, mantendo-se a afinidade e especificidade original do anticorpo.¹¹ Embora estes mAbs sejam 75% de origem humana e, por isso, menos imunogênicos que os mAbs murinos, a sua administração continuava a induzir, no entanto, anticorpos anti-quiméricos humanos.⁷

Os mAbs humanizados têm sequências Fab, constituídas por baixas porções de origem animal fundidas com domínios constantes de origem humana.¹⁰ Estas moléculas são produzidas por engenharia de proteínas e durante este processo, as CDRs de Ig do murino são transferidas para a região variável da cadeia pesada de Ig humana.¹²

Assim, em comparação com os mAbs de primeira geração, estas moléculas, como contêm uma maior percentagem de sequências humanas reduzem, por isso, o aparecimento de HAMAs. No entanto, em muitos casos, pode resultar na diminuição da afinidade de ligação com o alvo terapêutico, o que requer a necessidade de uma engenharia adicional de forma a aumentar a afinidade através da mutação de aminoácidos que constituem as regiões determinantes de complementaridade que ligam o alvo.¹⁰

2.3. mAbs de terceira geração

Mais recentemente, produziram-se mAbs totalmente humanos, mAbs de terceira geração, que, em comparação com os das gerações anteriores, são o que apresentam menor imunogenicidade. Estes podem ser produzidos a partir de sistemas *in vitro*, como por exemplo bibliotecas de exibição de fagos que envolve a expressão recombinante de Fabs humanos num bacteriófago e a posterior seleção de mAbs com base nas propriedades requeridas de ligação ao antigénio. Esta tecnologia permite então a seleção de fragmentos de anticorpos com elevada afinidade, especificidade e funções efectoras contra vários alvos. Também podem ser produzidos através de sistemas *in vivo*, recorrendo a murinos transgênicos, envolvendo a introdução de genes de Ig humana no genoma dos murinos. O murino é então imunizado contra um antigénio específico o que vai estimular a produção de mAbs humanos, sendo estes depois isolados e clonados a partir das células B do murino.^{9,10}

Em suma, os mAbs totalmente humanos oferecem mais vantagens em relação aos outros, uma vez que são menos imunogénicos e, por isso, com tolerância superior. Além disso, apresentam um maior tempo de circulação no organismo.³

Na Figura 3 podemos observar a evolução dos anticorpos monoclonais, bem como exemplos de mAbs.

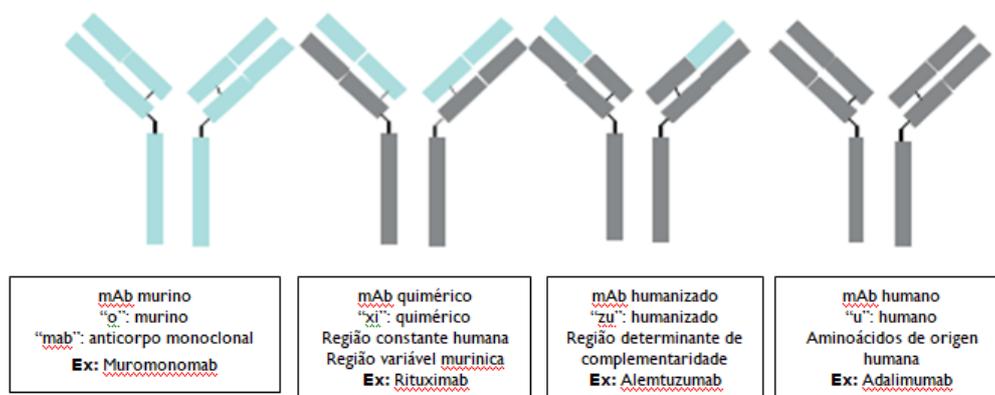


Figura 3 – Diagrama da evolução dos anticorpos monoclonais. Adaptado da referência 13.

3. Mecanismo de ação dos mAbs

Desde sempre que os mAbs são utilizados para tratar uma ampla gama de doenças, incluindo doenças auto-imunes, cancro, hiperlipidémia e distúrbios sanguíneos, tendo por isso diversos mecanismos de ação.⁷ Como apresentam baixos perfis de toxicidade e potencial para terem uma doença específica como alvo, faz com que estas moléculas se tornem bastante atrativas.¹³ Devido à natureza complexa e interconectada de várias vias de sinalização, estas moléculas usam muitas vezes múltiplos mecanismos de ação que podem ser classificados com base em cinco características: citotoxicidade; modulação da ativação/interação celular; prevenção do crescimento e proliferação; modulação da sinalização imunológica e neutralização de corpos estranhos.⁷

3.1. Citotoxicidade

No tratamento do cancro e de doenças auto-imunes o principal objetivo é eliminar as células malignas, em que os mAbs podem induzir a morte celular através de diversos mecanismos.

Os mAbs devem ser quimicamente modificados para se administrarem como agentes quimioterápicos para a morte celular programada.

Além disso, os mAbs também podem ativar vias imunes endógenas de forma a desencadear a morte celular. Os mAbs do tipo IgG interagem com vários tipos de recetores Fcγ para induzir diferentes tipos de resposta mediadas por anticorpos, dependendo da subclasse de anticorpos e do tipo de recetor de Fc. Por exemplo, os anticorpos IgG1 e IgG3 podem interagir com os recetores FcγR11a expressos nas células exterminadoras naturais, do inglês “*natural killer cell*” (NK) ou nos granulócitos, o que vai originar a sua morte. Este processo denomina-se de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

Estes mAbs do tipo IgG também podem promover a fagocitose, fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP), ao interagirem com vários recetores Fcγ (R1, R11a, R11b2) de monócitos, macrófagos ou neutrófilos.

Além dos mecanismos mencionados anteriormente, existe um outro denominado de citotoxicidade dependente de complemento (CDC), em que os mAbs do tipo IgG, especialmente o IgG1 e o IgG3, ativam as proteínas do complemento, particularmente o C1q, o primeiro subcomponente do complexo C1 da via clássica de ativação do complemento, o que vai promover a formação do complexo de ataque à membrana, levando a uma eventual morte celular.⁷

3.2. Modulação da ativação/interação celular

Neste mecanismo de ação, as células T são um alvo comum, que requerem a co-estimulação do *cluster* de diferenciação 28 (CD) e do recetor das células T (TCR) por CD80/CD86 e o principal complexo de histocompatibilidade em células apresentadoras de antígeno, respetivamente, para se tornarem ativadas. Por exemplo, o muromonab-CD3, o primeiro mAb terapêutico, ao ligar-se à subunidade do TCR, CD3, suprime a ativação das células T.

No tratamento de doenças auto-imunes, como por exemplo a artrite reumatóide, e na prevenção da rejeição de transplante de órgãos o bloqueio destas células foi bem sucedido. Relativamente ao tratamento do cancro, um dos objetivos é a ativação do sistema imune endógeno de forma a atacar as células neoplásicas. Existem vários mAbs que foram delineados para bloquear as vias repressoras das células T, como a proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico (ipilimumab) e a proteína 1 de morte celular programada (nivolumab e pembrolizumab). São conhecidos como “inibidores do *checkpoint* imunológico” e preparam as células T para exercer efeitos anti-tumorais.⁷

3.3. Prevenção do crescimento e proliferação

Alguns mAbs inibem as vias de sinalização necessárias para o crescimento e proliferação celular, sendo esta uma das vias preferíveis para o tratamento do cancro. Os fatores de crescimento e respetivos recetores são alvos comuns nesta classe de mAbs. Por exemplo, alguns mAbs como o pertuzumab, trastuzumab são dirigidos contra o recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*Human Epidermal growth factor receptor-type 2*, HER2), pertencente à família dos recetores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), sobre expresso em alguns cancros da mama, pensando-se que o bloqueio desse recetor regula negativamente as vias de sinalização intracelular proliferativa.⁷

3.4. Modulação da sinalização imunológica

Cada vez há mais mAbs que conseguem atingir as proteínas do sistema imunológico, como as citocinas pró-inflamatórias. Ao neutralizar estas citocinas e as suas vias efetoras, há supressão da ativação celular imune, sendo assim uma estratégia eficaz para o tratamento de muitas doenças autoimunes e inflamatórias.

Existem muitas moléculas direcionadas ao fator de necrose tumoral Alfa (TNF- α) sendo, por isso, designados de agentes anti-TNF. Estes agentes impedem que as proteínas

secretadas ativem os seus recetores e vias efetoras. Para além de terem como alvo o TNF- α , também se ligam a outras citocinas como por exemplo, as IL-1, IL-5, IL-6, fator de ativação das células B, entre outros.

Por outro lado, existem mAbs que têm como alvo os recetores, bloqueando-os e assim impedem a sua interação com as citocinas.

Outro aspeto indispensável do sistema imunológico são os anticorpos com origem endógena, provenientes do sistema imune humoral. Cada uma das 5 classes modula a função de diferentes células imunes, tornando-se um bom alvo para doenças com etiologia bem caracterizada. O primeiro mAb a ter como alvo uma imunoglobulina endógena, o omalizumab, liga-se à IgE, que medeia a ativação dos mastócitos e basófilos em respostas de hipersensibilidade, como a asma alérgica.⁷

3.5. Neutralização de corpos estranhos

Outro tipo de mAbs destina-se à eliminação de corpos estranhos e o primeiro a ser aprovado pela FDA foi o palivizumab que tem como alvo a proteína de fusão do vírus respiratório sincicial, acabando por neutralizar o vírus.

Com este mecanismo de ação o mAb aprovado mais recentemente foi o idarucizumab, desenvolvido para neutralizar o dabigatran que é um anticoagulante oral usado para diminuir o risco de acidente vascular cerebral e a formação de trombos em pacientes com fibrilação atrial não valvular. Os efeitos farmacológicos deste fármaco, em caso de maior hemorragia, não são revertidos facilmente e, por isso, há alguma relutância para serem prescritos. Contudo, o tratamento com o idarucizumab rapidamente reverte o efeito deste fármaco, tornando-se como um antídoto para os seus efeitos colaterais indesejados.⁷

4. Estabilidade dos mAbs

Os mAbs, pertencentes à classe dos produtos biofarmacêuticos, são moléculas grandes e com uma complexidade físico-química inerente. Por terem uma grande variedade de grupos funcionais, estes estão mais suscetíveis à instabilidade através de diversas vias de degradação quando expostas a diferentes ambientes e em condições de *stress*, durante o processo de produção, manuseio, transporte, armazenamento e até mesmo após administração nos pacientes.¹

O que é mais preocupante na instabilidade destas moléculas é a eventual presença dos produtos de degradação, uma vez que estes são um importante fator de risco na

imunogenicidade da terapêutica formulada. Contudo, a sua instabilidade também pode afetar a qualidade, eficácia, potência e segurança dos mAbs e, por isso, esta deve ser detetada caso ocorra.^{1,14}

Desta forma, os estudos de estabilidade são umas das partes mais cruciais no controlo de qualidade destes produtos biofarmacêuticos.¹

De forma a testar a estabilidade dos mAbs são feitos estudos de degradação ou decomposição forçada também conhecidos como testes ou estudos de *stress*. Estes estudos estão em prática na indústria há muito tempo mas tornaram-se um requisito formal com a introdução em 1993 da *guideline* intitulada “*Stability testing of new drugs substances and Products*” da conferência internacional de harmonização (*International conference on Harmonisation*, ICH). Este tipo de estudos são definidos como investigações a que se sujeitam medicamentos, produtos não embalados e/ou produtos embalados que contenham o medicamento em condições extremas provocadas por fatores de *stress* externos e internos. Durante estes estudos são recolhidas amostras regularmente e submetidas a análises, de forma a identificar os produtos de degradação formados.¹⁵

A degradação forçada é, então, uma parte fundamental da pesquisa e desenvolvimento destas moléculas. Desde a seleção dos candidatos em fase inicial até depois de serem aprovados, são realizados frequentemente estudos, de forma a sustentarem avaliações de manufacturabilidade, desenvolvimento de formulação, estabelecimento de métodos de indicação de estabilidade e comparabilidade. Assim, através destes estudos, ao perceber-se as vias de degradação do produto, conseguem estabelecer-se métodos indicadores de estabilidade que permitem monitorizar a deterioração, caso esta ocorra, dentro do prazo de validade.¹⁴

A instabilidade pode ser de origem física ou química.^{1,15} A instabilidade física abrange a instabilidade térmica e conformacional, que envolve alterações no ponto de transição ideal (temperatura de desdobraimento) e em estruturas globulares tridimensionais nativas de proteínas, respetivamente. Este tipo de instabilidade pode ocorrer devido a diferentes tipos de degradação, tais como: desdobraimento, dissociação, desnaturação, adsorção, agregação e precipitação. Por exemplo, no caso de desdobraimento da proteína, poderá haver perturbação da estrutura terciária e, por vezes, da secundária, podendo prejudicar a atividade biológica do mAb e induzir a sua agregação irreversível.¹

Por outro lado, a instabilidade química está associada à formação e/ou quebra de ligações covalentes e desencadeada por vários tipos de degradação como oxidação, redução,

desaminação, hidrólise, conversão de arginina, β -eliminação, racemização e troca de dissulfeto.¹

Os resultados obtidos com estes estudos podem ser usados para:

- a determinação da estabilidade intrínseca de substâncias farmacológicas;
- a seleção de possíveis candidatos biofarmacêuticos;
- o desenvolvimento de formulações;
- estudos de comparabilidade;
- criação do perfil de degradação dos princípios ativos e dos produtos acabados;
- identificação de produtos de degradação e elucidação das suas estruturas;
- investigação dos mecanismos e vias de degradação;
- seleção de possíveis estabilizadores para bloquear essas vias;
- desenvolvimento de métodos de indicação de estabilidade.

É de extrema importância selecionar quais as condições de *stress* a serem aplicadas, como por exemplo o tempo a que se devem ser submetidas o *stress* e a extensão de degradação necessária para obter de forma mais realista as diferentes vias de degradação, tendo como base a tendência de instabilidade de determinados fármacos. Estes parâmetros são importantes de forma a não submeter as amostras a um *stress* excessivo, o que poderá causar degradação extrema e, conseqüentemente, levará à formação de produtos que nunca se formarão em condições reais¹.

A ICH apresenta umas *guidelines* específicas para estudos de estabilidade, mais concretamente a *guideline* ICH Q5C que é direcionada para produtos biológicos e biotecnológicos. Esta *guideline* recomenda que as condições de *stress* devem ser escolhidas de acordo com a substância em estudo, uma vez que não existem nem protocolos nem critérios disponíveis para posterior interpretação e comparação com os resultados obtidos através destes testes. Por este motivo, a responsabilidade dos testes de *stress* efetuados é dos investigadores e fabricantes da indústria farmacêutica.^{1,15}

Em relação a estes estudos é sempre importante ter tudo descrito e segundo a ICH e a agência europeia do medicamento (EMA) deve-se sumariar os tipos de estudos realizados, os protocolos que foram usados bem como os resultados obtidos. Estes resultados devem ser descritos numa tabela com a respetiva fase de desenvolvimento em que o produto se encontra. Para além disso, os parâmetros críticos para a estabilidade e as potenciais vias de degradação desse mesmo produto devem ser apresentados.¹⁵

4.1. Vias de degradação

A escolha certa das condições de *stress* para os estudos de forças de degradação é de grande importância, pois é o primeiro passo para que os testes experimentais sejam bem-sucedidos. Existe uma grande variedade de condições que podem ser aplicadas, contudo é evidente que nem todas as condições existentes seriam úteis. Assim, a escolha de uma ou várias condições de *stress* para uma determinada finalidade, deve ser baseada nas propriedades físico-químicas do produto em estudo e na tendência deste se decompor perante tal condição.¹

4.1.1. Vias de degradação física

Agregação

Dentro da degradação física, a agregação de proteínas é a mais comum.¹⁶ A agregação pode ser definida como a auto associação da proteína que origina um agregado grande e insolúvel.¹⁷ Esta condição pode ocorrer em todas as fases de produção, durante o armazenamento de longo termo, durante o transporte ou durante a sua administração, havendo perda de atividade e, por vezes, em alguns casos, pode levar à formação de produtos imunogénicos.^{1,16,18,19}

Existem dois tipos de agregação: a reversível (agregados não covalentes) e a irreversível (agregados covalentes). A agregação reversível pode ser formada por interações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas, sendo promovida pelo aumento da concentração de proteínas acima dos valores da sua concentração crítica ou do seu limite de solubilidade. Ao passo que a agregação irreversível é, geralmente, formada por ligações dissulfeto que são difíceis de reverter, devido à concentração das proteínas ser superior ao limite crítico associado a mudanças nas estruturas tridimensionais.^{1,16}

Quanto maior for a concentração da proteína, maior é a probabilidade de haver a formação de agregados. Como as proteínas são estáveis na sua estrutura ou em determinados estados transacionais sob certas condições de solução, a sua exposição a fatores ambientais diferentes dos normais, poderá levar a alterações na sua estrutura. Assim, as alterações nas condições extrínsecas como temperatura, pH, força iónica, agitação, viscosidade e concentração podem expor de forma temporária os domínios hidrofóbicos. Esta exposição promove interações proteína-proteína, levando à formação de agregados^{1,16}.

Por exemplo, ao submeter a amostra a ciclos de congelamento e descongelamento, também poderá induzir agregação, sendo normalmente reversível. É altamente dependente do pH, da concentração do tampão, dos excipientes, da concentração da proteína e dos

parâmetros operacionais (velocidade de aquecimento e arrefecimento). O objetivo desta condição é determinar a suscetibilidade dos mAbs a um determinado ciclo de temperatura, uma vez que é um fator a que são expostos frequentemente.

O mesmo acontece quando se submete a amostra a um *stress* mecânico como a agitação, uma vez que esta condição aumenta a probabilidade de os mAbs entrarem em contacto com interfaces hidrofóbicas, originando agregados reversíveis e irreversíveis.¹⁴

Assim, é bastante importante ter uma noção do mecanismo de agregação e das causas que aumentam a probabilidade de isso ocorrer. Porém, por terem múltiplas vias, influenciadas por inúmeros fatores, faz com que haja diferentes graus de agregação, sendo por isso um grande desafio²⁰.

Desnaturação

Quando se fala de desnaturação, refere-se ao desdobramento parcial ou completo da estrutura tridimensional da proteína.¹⁶ As proteínas, de forma a se adequarem ao ambiente, dobram-se. Por exemplo em soluções aquosas, elas organizam-se de forma a exporem os grupos hidrofílicos para a solução e a esconderem os grupos hidrofóbicos no centro, tendo assim uma maior estabilidade. Contudo, quando expostas a situações de *stress* ambientais, como temperaturas elevadas ou alterações de pH, por exemplo, elas acabam por sofrer mudanças estruturais, o que origina o desdobramento e a desnaturação. A presença de desnaturantes químicos como ureia, dietilamina, tiocianato, entre outros, e solventes orgânicos (álcoois) também irá provocar a desnaturação das proteínas em meio aquoso. Isto poderá prejudicar o seu funcionamento biológico, tornando-as mais instáveis e levando à formação de agregados solúveis ou insolúveis e precipitados.¹

É importante referir que as proteínas maiores e com vários domínios, na sua maioria, sofrem desdobramentos irreversíveis, uma vez que sofrem uma grande influência das interações do domínio e das propriedades de conectividade dos domínios vizinhos na reversibilidade do desdobramento. Por outro lado, as proteínas com um único domínio e pequenas sofrem normalmente desdobramentos reversíveis.¹

Também existem vários estados intermediários entre a estrutura nativa dobrada de um anticorpo e o estado desnaturado, sendo que alguns intermediários atuam como percussores, atraindo outras espécies de proteínas para zonas hidrofóbicas, dando origem à formação de agregados irreversíveis.

Em geral, sabe-se que o domínio CH3 dos mAbs é mais estável contra a desnaturação provocada por elevadas temperaturas, enquanto o domínio CH2 é o menos estável e acaba por ser o primeiro a desnaturar.¹⁶

Assim, é de elevada importância a avaliação da desnaturação e desdobraimento dos mAbs, pois esses estudos ajudam a caracterizar as estruturas de proteínas tridimensionais ou no estado nativo, compreendendo o impacto que as diferentes condições ambientais têm na estrutura. Além disso, dão algumas informações sobre a termodinâmica e cinética do desdobraimento.¹

4.1.2. Vias de degradação química

Fragmentação

A fragmentação dos anticorpos é resultante da hidrólise enzimática ou não enzimática. A taxa de hidrólise depende da sequência de péptidos e da flexibilidade na articulação.

Esta fragmentação ocorre no esqueleto peptídico em várias regiões, como por exemplo, no local de dobradiça (principal), na ligação CH2 com CH3 ou em regiões que contenham resíduos de ácido aspártico (Asp) ou triptofano (Trp). A probabilidade de ocorrer hidrólise é maior na presença de resíduos de serina (Ser), valina (Val) ou tirosina (Tyr) adjacentes a um resíduo de Asp. Em relação à dobradiça, a sua hidrólise depende do valor de pH, verificando-se uma taxa mínima de hidrólise para valores de pH próximos de 6.¹⁶

Assim, apesar das ligações peptídicas serem cineticamente estáveis, a presença de alguns aminoácidos na estrutura primária dos mAbs, podem tornar a molécula mais vulnerável à fragmentação.¹

Desaminação

A desaminação resulta da hidrólise da cadeia lateral da amida da glutamina (Gln) e da asparagina (Asn) e é a via mais comum de degradação química deste tipo de moléculas.^{1,16,21} Assim, a presença destes dois resíduos num mAb torna-o mais vulnerável à desaminação.

A conversão de Asn em Asp e de Gln em ácido glutâmico (Glu) dá-se quando a hidrólise da cadeia lateral ocorre em condições de pH inferiores a 4. Contudo, se o pH for mais elevado há a formação, através da desaminação, de uma imida cíclica intermediária. Em relação à Asn, a succinimida (intermediário cíclico) origina Asp ou um isómero de Asp. Quanto à Gln, o processo é semelhante para dar origem ao Glu, sendo este menos frequente devido à instabilidade do intermediário cíclico formado de 6 membros. Como há a

aquisição de grupos de ácido carboxílico, a desamidação origina então anticorpos mais ácidos.

A desaminação pode ser causada tanto por fatores extrínsecos como intrínsecos. Dentro dos extrínsecos estão o pH, a temperatura, a composição e a concentração da solução tampão. Por exemplo, temperaturas altas associadas a pH ácido ou alcalino estimulam o processo de desaminação em solução aquosa. Em relação aos fatores intrínsecos, por exemplo, se os resíduos de Asn estiverem em regiões estruturalmente flexíveis ou acessíveis a solventes ou, ainda, se estiverem seguidas por um resíduo pequeno e flexível como glicina (Gly), Ser, treonina (Thr) ou Asn serão mais afetados pela desamidação.^{1,16}

Com este tipo de degradação demonstrou-se que há diminuição da atividade, da estabilidade mas também da potência dos mAbs.¹⁶

Oxidação

A oxidação é a via de degradação que ocorre frequentemente durante as fases de produção, formulação ou armazenamento dos anticorpos.¹⁶

Como os resíduos de metionina (Met) e cisteína (Cys) têm na sua composição átomos de enxofre reativos, acabam por estar mais propensos à oxidação. A sua oxidação, em meio alcalino, resulta na ligação Met-sulfóxido e ligações de dissulfeto intra e inter-moleculares, respetivamente.

Além dos resíduos anteriores, existem mais 2 resíduos, a tirosina (Tyr) e o triptofano (Trp), que também são suscetíveis à oxidação, devido à presença do anel aromático na sua estrutura.

A presença de iões metálicos como catalisadores juntamente com agentes redutores como o ácido ascórbico aumenta a probabilidade de ocorrer oxidação.¹

A ocorrência de oxidação também depende de fatores extrínsecos como a composição da solução tampão, a exposição à luz, o pH (contudo, sabe-se que o pH não tem grande influência na oxidação do resíduo Met) e de fatores intrínsecos como por exemplo, a quantidade de resíduos que estão expostos à superfície do anticorpo.¹⁶

De forma a desencadear a oxidação forçada, são aplicadas diferentes condições de stress que ajudam a identificar as regiões mais suscetíveis a esta via de degradação e também a determinar a cinética que leva à sua degradação.¹⁴

Glicação

A glicação, reação não enzimática, ocorre entre os açúcares redutores e a cadeia lateral de lisina e os grupos amina primários N-terminais das cadeias leves e pesadas do anticorpo, provocando o aumento do peso molecular nos sítios em que ocorre.

Este tipo de degradação está dependente de vários fatores extrínsecos como a concentração de proteína, o pH, a temperatura, o tipo e concentração do açúcar e o período de exposição.

Pode ocorrer nas diferentes fases de produção, principalmente durante a cultura de células, porque é quando os açúcares são usados como nutrientes. Apesar de se usarem açúcares não reativos, estes, muitas vezes, podem converter-se em reativos, acabando por reagir com o grupo amina. É igualmente importante salientar que os mAbs podem-se tornar reativos durante a sua administração, consoante o diluente que se use ou após a sua administração ao paciente, devido a uma possível reação com açúcares presentes no sangue.

Caso existam resíduos de lisina à superfície do anticorpo, a glicação deve ser considerada durante os estudos de degradação forçada, o que irá afetar a eficácia e ligação da molécula. A molécula também se poderá tornar mais ácida e originar agregados.¹⁴

5. Principais métodos de deteção em “Pre-screening”

O “pre-screening” tem como objetivo a identificação das condições que dão origem a resultados significativos de degradação, ou seja, tem de haver um meio-termo, uma vez que se houver pouca degradação não é significativo, não demonstrando eficazmente as vias de degradação e a sua cinética, enquanto que a degradação excessiva acaba por não ser representativa do que acontece na realidade.¹⁴

Em relação aos métodos, a cromatografia de exclusão molecular, do inglês *Size Exclusion Chromatography*, SEC, separa proteínas de acordo com o seu raio hidrodinâmico numa coluna de fase estacionária. Esta coluna consiste em partículas esféricas porosas com tamanho de poros bem definidos. A resolução ótima entre as variantes do tamanho do anticorpo só é alcançada quando as variantes diferem no tamanho do anticorpo por um fator próximo de 2. Como a SEC é uma técnica de separação baseada em colunas, a interação entre os mAbs e os locais de superfície carregados ou hidrofóbicos da fase estacionária acaba por afetar a resolução, particularmente com compostos derivados de anticorpos como os conjugados de anticorpo-fármaco (ADCs). Assim, é sempre importante a seleção cuidadosa da fase estacionária.^{22,23}

A SEC é normalmente o método de escolha para a deteção de agregação, uma vez que é o mais sensível, pois deteta agregados covalentes e não covalentes e, por vezes, também é usada para a deteção de fragmentação.^{14,19}

Outro método muito utilizado é a eletroforese capilar com dodecilsulfato de sódio (*Capillary electrophoresis with sodium dodecylsulfate*, CE-SDS), que promove a desnaturação do SDS de forma a dissociar os componentes proteicos que se encontram ligados por interações não covalentes. Aqui a migração da proteína é impulsionada pela carga de superfície induzida pela ligação SDS, que é proporcional ao peso molecular da proteína. Tem uma ótima resolução e é usado para separar uma ampla gama de fragmentos de mAbs. A CE-SDS é utilizada sob condições não redutoras (nrCE-SDS) ou sob condições redutoras (rCE-SDS). A primeira é mais utilizada para monitorizar a pureza de anticorpos intactos desnaturados, enquanto a segunda usa-se para avaliar cadeias pesadas, cadeias leves e cadeias pesadas não glicosiladas intactas. Para avaliar os fragmentos destas moléculas podem ser usados ambos os tipos de CE-SDS.²²

A cromatografia de troca catiónica (CEX) e eletroforese de focalização isoeétrica (IEF) são métodos que se baseiam na carga da molécula. Estes métodos são bastante sensíveis na deteção de alterações na molécula, principalmente quando provocadas por desaminação.

Quando ocorre oxidação e glicação, por exemplo, o método usado para a sua deteção é análise por cromatografia líquida com espectrometria de massa (LC-MS).

A escolha dos métodos mais adequados é importante, uma vez que cada método tem os seus próprios benefícios e limitações.¹⁴

6. Estudos de estabilidade dos mAbs

Uma das principais preocupações dos estudos de estabilidade dos mAbs é a formação de agregados que se podem formar em diferentes fases de vida da molécula. Como já foi referido anteriormente, estes agregados podem originar respostas imunes indesejadas e diminuir a sua atividade biológica^{24,25,26}. Algumas das reações adversas que podem provocar são falha renal grave, reações anafiláticas, como dores de cabeça, febre, arrepios, entre outros²⁷. Desta forma, tornou-se numa das áreas de maior foco na produção de mAbs²⁸.

Foi realizado um estudo em que se submeteu alguns dos mAbs mais usados a nível mundial, a diferentes condições de *stress*, de forma a analisar a formação de agregados através da análise de perfis obtidos por SEC. Os mAbs estudados foram 5: o bevacizumab (BZV), o cetuximab (CTX), o infliximab (IFX), rituximab (RTX) e o trastuzumab (TTZ),

tendo indicações para o tratamento de diferentes tipos de cancro, entre outras doenças como psoríase, doença de Crohn.^{27,20,29,30} São todos do tipo IgG1, tendo portanto a mesma estrutura geral, diferindo apenas na região variável, que é a zona onde se encontra a região determinante de complementaridade, que confere a identidade específica a cada mAb.²⁷ Os diferentes padrões de glicação determinam certas características que poderão estar relacionadas com a tendência de formar agregados.²⁰

Estes mAbs foram também testados nas formulações medicamentosas em que se encontravam presentes e avaliados por uma técnica bastante precisa, o SE-HPLC/DAD (Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular associada à Detecção de Matriz de Iódio).^{27,20}

Inicialmente, obtiveram-se os perfis de agregação de controlo, ou seja, obtidos e caracterizados em condições estáveis. Foram feitas várias diluições aos medicamentos e a essas também se traçou o seu perfil de agregação para se comparar com os perfis obtidos após as condições de *stress*.

De seguida, as alíquotas com as amostras foram submetidas a estudos de degradação forçada durante 24 horas, como exposição a elevadas temperaturas (50°C), a meio ácido (HCl 0,1 M), a meio alcalino (NaOH 0,1) e a meio oxidativo (H₂O₂ 1% e 10%). Como já era de prever, todos os mAbs formaram agregados e/ou houve rutura de cadeias proteicas, havendo portanto degradação.

Os mAbs BVZ (25 mg/mL), CTX (5 mg/mL) E TTZ (15 mg/mL) foram estudados apenas na forma de medicamento, enquanto que o IFX e o RTX, foram estudados tanto na forma de medicamento como também na forma de diluição com cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% do medicamento, nas concentrações de 0,5 e 2,0 mg/mL e de 1 e 4 mg/mL, respetivamente (tipicamente usadas na prática clínica em farmácias hospitalares). Nestas concentrações mais diluídas, os 2 mAbs comportaram-se de forma idêntica quando submetidos às diferentes condições. Em relação ao meio ácido e básico não houve a deteção de nenhum pico, o que indica que estes meios provocaram a total degradação dos anticorpos, ou seja, o peso molecular dos produtos de degradação estava fora da faixa do peso molecular que pode ser separado pela coluna. Em meio oxidativo, já houve o aparecimento de agregação, tal como no aumento da temperatura.

Em todas as condições de *stress* aplicadas houve a formação de degradação no caso do BZV, na forma de medicamento. A presença de agregados apenas foi detetada no meio básico e na temperatura elevada.

O TTZ apesar de não ser o mais concentrado, foi o mais resistente às condições de *stress* aplicadas, podendo ser devido à sua estrutura tridimensional específica e/ou à

estabilidade do medicamento em que se encontra presente (Herceptin®). Estes resultados estão resumidos na tabela I.

Tabela I – Comportamento dos mAbs consoante as diferentes condições de stress

mAbs	Condições de stress			
	Meio Ácido	Meio Básico	Meio Oxidativo	Temperatura elevada
BZV (25 mg/mL)	Degradação	Agregação e Degradação	Degradação	Agregação e Degradação
CTX (5 mg/mL)	Agregação	Agregação	Agregação	Agregação
IFX (0,5 e 2,0 mg/mL)	Degradação	Degradação	Agregação	Agregação
RTX (1,0 e 4,0 mg/mL)	Degradação	Degradação	Agregação	Agregação
TTZ (15 mg/mL)	Agregação	Agregação	Agregação	Sem agregação

Também foi avaliada a estabilidade dos mAbs durante 15 dias e, no geral, o BVZ, RTX, TTZ mostraram grande estabilidade quando armazenados a 4°C e quando sujeitos a 3 ciclos de congelamento-descongelamento (-20°C). Foram realizados no SEC-HPLC/DAD, perfis de controlo de todas as amostras, no dia 0, ou seja, logo após a preparação das amostras e antes data de validade das mesmas. De seguida, estes perfis foram comparados com os obtidos após os 15 dias de estudo, de forma a perceber se a amostra se mantinha estável. Durante estes estudos, as amostras estiveram sempre protegidas da luz.

Relativamente ao RTX, os resultados indicaram grande estabilidade para todas as amostras. O pico principal do cromatograma permanece constante tanto na forma como na área, o que indica que não houve alterações nas amostras provocadas devido à agregação. Isto é importante, uma vez que como o RTX já demonstrou ter uma importante imunogenicidade clínica em pacientes com artrite reumatoide, a mínima presença de agregados poderia aumentar essa resposta perigosa nos pacientes.

Quando analisados os cromatogramas do BVZ, estes revelaram pequenas alterações nas percentagens dos agregados para as duas condições de armazenamento testadas. Por exemplo, no dia de controlo, a percentagem era de 1,22% e até ao dia 15 a percentagem aumentou para 2,93% na amostra refrigerada e para 2,79% na amostra congelada, o que demonstra uma ligeira tendência para formar agregados ao longo do tempo. Comparativamente às outras amostras, esta formação foi ligeiramente maior, o que pode ser explicado pelo facto de esta formulação apresentar uma maior concentração de mAb (25 mg/mL).

O TTZ, apesar de apresentar uma grande estabilidade comprovada pela elevada semelhança entre todos os perfis de agregação cromatográfica, no último dia apresentou uma ligeira cauda nos perfis de agregação para as amostras refrigeradas. Nas amostras congeladas, o aparecimento da cauda deu-se no 7º dia e pensa-se que está relacionado com o stress de congelamento/descongelamento e não à estabilidade ao longo do tempo. Assim, a presença desta cauda pode representar algum tipo de modificação do mAb que se deve ter em consideração quando usado para fins de reutilização para além dos 15 dias quando armazenado refrigerado, ou quando submetido a um ciclo de congelamento/descongelamento.

As amostras de IFX armazenadas 4°C mostraram-se sempre estáveis. Contudo, na amostra de maior concentração (10 mg/mL), registou-se uma deformação no pico cromatográfico no 15º dia, o que sugere o início da formação de agregados. Quando armazenadas congeladas, não se detetou nenhum sinal de agregação, apesar de haver um ligeiro aumento do tempo de retenção do pico principal, devido provavelmente a algum tipo de instabilidade não relacionada com agregação.

Um dos mais instáveis foi o CTX com o aparecimento de um pico, não devido à agregação, mas sim devido à rutura das cadeias proteicas. Este pico apareceu no 2º dia de teste nas amostras refrigeradas e no 7º dia de teste nas amostras congeladas.

Na tabela 2, pode-se verificar um resumo da estabilidade dos diferentes mAbs estudados.

Tabela 2 – Estabilidade dos mAbs durante 15 dias, consoante o tipo de armazenamento

mAbs	Condições de Armazenamento	
	Refrigeração (4°C)	Congelamento/Descongelamento (-20°C)
BZV (25 mg/mL)	Ligeira tendência para a formação de agregados	Ligeira tendência para a formação de agregados
CTX (5 mg/mL)	Instável, possível rutura da cadeia proteica no 2º dia	Instável, possível rutura da cadeia proteica no 7º dia
IFX (10, 0,5 e 2,0 mg/mL)	Estável, contudo na maior concentração formação de agregados no 15º dia	Estável
RTX (1,0 e 4,0 mg/mL)	Estável	Estável
TTZ (15 mg/mL)	Estável, contudo no 15º dia, ocorre algum tipo de modificação	Estável, contudo no 7º dia, ocorre algum tipo de modificação

Como já foi dito anteriormente, os diferentes resultados obtidos devem-se principalmente à diversidade das composições químicas, juntamente com a formulação de cada medicamento que também tem grande influência na estabilidade do anticorpo ao longo do tempo²⁰.

7. Conclusão

Desde a descoberta do primeiro anticorpo monoclonal através da tecnologia de hibridomas, que se têm feito grandes avanços no uso destas moléculas, com a diminuição da sua imunogenicidade. Tal deve-se à evolução da sua composição, passando por serem constituídas apenas por sequências de murinos a serem totalmente constituídas por sequências humanas.

Atualmente são usados em inúmeras terapêuticas, que vão desde o tratamento de vários tipos de cancro até doenças autoimunes, transplantes, doenças infecciosas, entre outras. Desta forma, tornaram-se uma opção bastante atrativa, representando uma janela de oportunidades na medicina moderna.

Contudo, estas moléculas são bastante instáveis, podendo causar efeitos adversos nos pacientes, sendo a agregação uma das vias de degradação mais comum. É, por isso, essencial saber quais os fatores que influenciam a estabilidade das mesmas e a forma como eles atuam através de diferentes métodos de deteção da sua instabilidade.

Apesar de algumas contrariedades, estas moléculas, com o avanço da tecnologia, terão um futuro promissor, existindo neste momento diversos mAbs em estudos clínicos e pré-clínicos.

Referências Bibliográficas

1. TAMIZI, E. and JOUYBAN, A. **Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions.** *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 98, (2016) 26–46.
2. BUSS, N. A. P. S., HENDERSON, S. J., MCFARLANE, M., SHENTON, J. M. and DE HAAN, L. **Monoclonal antibody therapeutics: History and future.** *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, (2012) 615–622.
3. GARCÍA MERINO, A. **Monoclonal antibodies. Basic features.** *Neurol. (English Ed.* 26, (2011) 301–306.
4. BARIRIAN, N. **Monoclonal Antibodies : Clinical Pharmacology Keys.** (2018) 24–28.
5. YAMADA, T. **Therapeutic monoclonal antibodies.** *Keio J. Med.* 60, (2011) 37–46.
6. LIU, J. K. H. **The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations.** *Ann. Med. Surg.* 3, (2014) 113–116.
7. RODGERS, K. R. and CHOU, R. C. **Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions.** *Biotechnol. Adv.* 34, (2016) 1149–1158.
8. LITTLE, M., KIPRIYANOV, S. M., LE GALL, F. and MOLDENHAUER, G. **Of mice and men: Hybridoma and recombinant antibodies.** *Immunol. Today* 21, (2000) 364–370.
9. RIBATTI, D. **From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: An historical reappraisal.** *Immunol. Lett.* 161, (2014) 96–99.
10. CATAPANO, A. L. and PAPADOPOULOS, N. **The safety of therapeutic monoclonal antibodies: Implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway.** *Atherosclerosis* 228, (2013) 18–28.
11. TANNER, J. E. **Designing antibodies for oncology.** *Cancer Metastasis Rev.* 24, (2005) 585–598.
12. CASANOVA ESTRUCH, B. **Safety profile and practical considerations of monoclonal antibody treatment.** *Neurol. (English Ed.* 28, (2013) 169–178.
13. MIEDANY, Y. EL. **MABS: targeted therapy tailored to the patient's need.** *Br. J. Nurs.* 24, (2015) S4–S13.
14. NOWAK, C., K. CHEUNG, J., M. DELLATORE, S., KATIYAR, A., BHAT, R., SUN, J., PONNIAH, G., NEILL, A., MASON, B., BECK, A. and LIU, H. **Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide.** *MAbs* 9, (2017) 1217–1230.

15. SINGH, S., JUNWAL, M., MODHE, G., TIWARI, H., KURMI, M., PARASHAR, N. and SIDDURI, P. **Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products.** *TrAC - Trends Anal. Chem.* 49, (2013) 71–88.
16. ELGUNDI, Z., RESLAN, M., CRUZ, E., SIFNIOTIS, V. and KAYSER, V. **The state-of-play and future of antibody therapeutics.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 122, (2017) 2–19.
17. TRAINOR, K., BROOM, A. and MEIERING, E. M. **Exploring the relationships between protein sequence, structure and solubility.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 42, (2017) 136–146.
18. PAUL, A. J., BICKEL, F., RÖHM, M., HOSPACH, L., HALDER, B., RETTICH, N., HANDRICK, R., HEROLD, E. M., KIEFER, H. and HESSE, F. **High-throughput analysis of sub-visible mAb aggregate particles using automated fluorescence microscopy imaging.** *Anal. Bioanal. Chem.* 409, (2017) 4149–4156.
19. TELIKEPALLI, S. N., KUMRU, O. S., KALONIA, C., ESFANDIARY, R., JOSHI, S. B., MIDDAUGH, C. R. and VOLKIN, D. B. **Structural characterization of IgG1 mAb aggregates and particles generated under various stress conditions.** *J. Pharm. Sci.* 103, (2014) 796–809.
20. HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, J., MARTÍNEZ-ORTEGA, A., SALMERÓN-GARCÍA, A., CABEZA, J., PRADOS, J. C., ORTÍZ, R. and NAVAS, N. **Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles.** *Int. J. Biol. Macromol.* 118, (2018) 511–524.
21. ROBINSON, N. E. **Protein deamidation.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, (2002) 5283–5288.
22. DADA, O. O., RAO, R., JONES, N., JAYA, N. and SALAS-SOLANO, O. **Comparison of SEC and CE-SDS methods for monitoring hinge fragmentation in IgG1 monoclonal antibodies.** *J. Pharm. Biomed. Anal.* 145, (2017) 91–97.
23. GOYON, A., D’ATRI, V., COLAS, O., FEKETE, S., BECK, A. and GUILLARME, D. **Characterization of 30 therapeutic antibodies and related products by size exclusion chromatography: Feasibility assessment for future mass spectrometry hyphenation.** *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1065–1066, (2017) 35–43.
24. WU, H., KROE-BARRETT, R., SINGH, S., ROBINSON, A. S. and ROBERTS, C. J. **Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies.** *FEBS Lett.* 588, (2014) 936–941.
25. SAITO, S., HASEGAWA, J., KOBAYASHI, N., TOMITSUKA, T., UCHIYAMA, S. and FUKUI, K.

- Effects of ionic strength and sugars on the aggregation propensity of monoclonal antibodies: Influence of colloidal and conformational stabilities.** *Pharm. Res.* 30, (2013) 1263–1280.
26. JOSHI, V. S., KUMAR, V. and RATHORE, A. S. **Enhanced product understanding in the QbD paradigm: linkage between charge heterogeneity and stability of monoclonal antibody therapeutic products.** *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93, (2018) 2102–2110.
27. HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, J., SALMERÓN-GARCÍA, A., CABEZA, J., VÉLEZ, C., CAPITÁN-VALLVEY, L. F. and NAVAS, N. **The Effects of Light-Accelerated Degradation on the Aggregation of Marketed Therapeutic Monoclonal Antibodies Evaluated by Size-Exclusion Chromatography with Diode Array Detection.** *J. Pharm. Sci.* 105, (2016) 1405–1418.
28. VAN DER KANT, R., KAROW-ZWICK, A. R., VAN DURME, J., BLECH, M., GALLARDO, R., SEELIGER, D., ABFALG, K., BAATSEN, P., COMPERNOLLE, G., GILS, A., STUDTS, J. M., SCHULZ, P., GARIDEL, P., SCHYMKOWITZ, J. and ROUSSEAU, F. **Prediction and Reduction of the Aggregation of Monoclonal Antibodies.** *J. Mol. Biol.* 429, (2017) 1244–1261.
29. OLIVA, A., LLABRÉS, M. and FARIÑA, J. B. **Fitting bevacizumab aggregation kinetic data with the Finke-Watzky two-step model: Effect of thermal and mechanical stress.** *Eur. J. Pharm. Sci.* 77, (2015) 170–179.
30. MARTÍNEZ-ORTEGA, A., HERRERA, A., SALMERÓN-GARCÍA, A., CABEZA, J., CUADROS-RODRÍGUEZ, L. and NAVAS, N. **Validated reverse phase HPLC diode array method for the quantification of intact bevacizumab, infliximab and trastuzumab for long-term stability study.** *Int. J. Biol. Macromol.* 116, (2018) 993–1003.