



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS:
DESAFIOS E FUTURO**

Trabalho submetido por
Raquel Alexandra de Oliveira Rodrigues
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2022



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS:
DESAFIOS E FUTURO**

Trabalho submetido por
Raquel Alexandra de Oliveira Rodrigues
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Miguel Garcia

novembro de 2022

Agradecimentos:

Chega ao fim uma das etapas mais desafiantes da minha vida, e deste modo não posso deixar de agradecer a todos aqueles que me acompanharam ao longo destes 5 anos.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais, Luís e Ângela por sempre me incentivarem a não desistir, por acreditarem em mim e nas minhas capacidades, obrigada pelo apoio incondicional, paciência e carinho.

Ao meu irmão Pedro por ser a minha companhia em todos os momentos desta longa jornada. Aos meus avós que sempre apoiaram as minhas decisões e que sempre se orgulharam de tudo aquilo que fiz, e hoje vêm me concluir esta grande etapa.

Agradeço aos professores do Instituto Universitário Egas Moniz por todo o conhecimento transmitido, fundamental para a minha formação.

Às Beldades de Ciências Farmacêuticas, Bárbara, Cátia, Cristiana, Mariana e Vera por estarem sempre ao meu lado nos bons e nos maus momentos. Aos restantes colegas que levo desta Instituição por me acompanharem nesta jornada.

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor Miguel Garcia, orientador desta tese, pela sua disponibilidade, apoio e partilha de conhecimento ao longo destes meses de trabalho que tornou possível a realização desta dissertação.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento.

O conhecimento é limitado.

A imaginação envolve o mundo.”

Albert Einstein

Resumo:

Com o aumento da utilização de medicamentos biológicos em diferentes áreas terapêuticas nomeadamente oncologia, infeciologia e doenças autoimunes, surgem desafios na produção em larga escala de forma a chegar ao maior número de doentes, mas também a nível de custos dada a complexidade destes medicamentos.

A indústria biofarmacêutica tem vindo a crescer nos últimos anos quer pela maior utilização deste tipo de medicamentos quer pelo investimento em investigação em novas terapêuticas.

Com a evolução destes medicamentos, surgem desafios que a indústria biofarmacêutica enfrenta nomeadamente a nível de produção e regulamentação, no entanto, apresentam-se novas perspectivas futuras relacionado com novas tecnologias e técnicas.

A necessidade de mudança através da implementação de novas formas de fabrico tornou-se uma prioridade na medida em que só assim se conseguirá ultrapassar os obstáculos associados a estes medicamentos e para além disso se atingirá aspetos importantes como a qualidade, eficácia e segurança dos mesmos.

Esta dissertação pretende debruçar-se não só nos desafios que este setor enfrenta, como também nas tendências do mercado biofarmacêutico a nível mundial.

Palavras-chave: Biofármacos; custos de produção; biotecnologia; perspectiva futura

Abstract:

With the increasing use of biological medicines in different therapeutical areas, such as oncology, infectiology and autoimmune diseases, challenges emerge in large-scale production to reach the largest number of patients, but also in terms of costs, given the complexity of these medicines.

The biopharmaceutical industry has been growing in recent years due to the increased use of biologics, but also the investment in research and development of new therapies. As these medicines evolve, there are challenges that the biopharmaceutical industry faces, particularly in terms of production and regulation, however, there are new perspectives there are new technologies and techniques.

The need for change trough the implementation of new forms of manufacturing has become priority so far as this is the only way to overcome the obstacles associated with these medicines, and to achieve importance aspects such as quality, efficiency, and safety.

This dissertation intends to focus not only on the challenges facing this sector, but also on the trends in the biopharmaceutical market worldwide.

Keywords: Biopharmaceuticals; manufacturing costs; biotechnology; future prespective

Índice Geral:

RESUMO:	1
ABSTRACT:	2
ÍNDICE DE FIGURAS:	4
ÍNDICE DE TABELAS:	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS:	6
1. INTRODUÇÃO:.....	8
2. MERCADO DA INDÚSTRIA BIOFARMACÊUTICA NO MUNDO:	9
2.1. PORTUGAL:.....	11
2.2. EUROPA:.....	13
2.3. EUA:.....	15
2.4. JAPÃO:.....	18
2.5. ÁREAS TERAPÊUTICAS EM CRESCIMENTO:	20
3. DESAFIOS NA INDÚSTRIA BIOFARMACÊUTICA:	21
3.1. PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS:.....	21
3.1.1. <i>Upstream</i> :	21
3.1.2. Estratégia de produção:	23
3.1.3. <i>Downstream</i> :.....	24
3.2. CUSTOS ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS:	27
3.3. PROCESSOS ANALÍTICOS:	30
3.4. ASPETOS REGULAMENTARES:	32
3.4.1. FDA:	33
3.4.2. EMA:	35
4. PERSPETIVAS FUTURAS NA INDÚSTRIA BIOFARMACÊUTICA:	37
4.1. TERAPÊUTICA MRNA:.....	37
4.1.1. Aplicações clínicas:	39
4.2. TERAPIA BACTERIOFÁGICA:.....	42
4.2.1. Aspectos gerais:.....	42
4.2.2. Caracterização biológica:	43
4.2.3. Desenvolvimento de fagos:	45
4.2.4. Aplicações Terapêuticas:	47
4.3. TERAPIA GENÉTICA E CELULAR:	50
4.3.1. Terapias oligonucleótidas:.....	51
4.3.2. Células CAR-T:	54
4.3.3. Tecnologia CRISPR:	59
4.4. BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL:.....	63
5. CONCLUSÃO:.....	65
6. BIBLIOGRAFIA:.....	67

Índice de Figuras:

Figura 1: Comparação do peso molecular entre medicamentos de síntese química e biológica.....	10
Figura 2: Anticorpos monoclonais aprovados ao longo do tempo e por grupo.....	11
Figura 3: Comparação dos vários setores de biotecnologia nos anos 2005; 2010; 2015; 2020.....	14
Figura 4: Representação gráfica de novos produtos e indicadores de expansão. Categorias chave em desenvolvimento.....	15
Figura 5: Representação das empresas e medicamentos com mais vendas em 2021. a. As dez principais empresas por vendas de prescrição e venda livre. b. Os dez medicamentos mais vendidos em todo o mundo.....	16
Figura 6: À esquerda: major players do mercado farmacêutico. À direita: concentração do mercado farmacêutico.....	18
Figura 7: Número de novas moléculas químicas e biológicas aprovadas nos respetivos países.....	19
Figura 8: Etapas durante os processos de <i>upstream</i> e <i>downstream</i> ao longo do fabrico biofarmacêutico.....	26
Figura 9: Processo contínuo vs em lote na produção de anticorpos monoclonais.....	28
Figura 10: Desenvolvimento de biossimilar em comparação com o medicamento de referência.....	36
Figura 11: Comparação da estrutura molecular do mRNA com o saRNA.....	39
Figura 12: Representação de uma nanopartícula lipídica.....	41
Figura 13: Comparação entre as várias estruturas de fagos.....	44
Figura 14: Tratamentos aprovados e respetivo ano de aprovação, bem como terapias em investigação	50
Figura 15: Representação de cada constituinte da célula CAR-T.....	54
Figura 16: Representação do mecanismo da célula CAR-T de segunda geração.....	57
Figura 17: Representação do sistema CRISPR/cas9 baseado no método de plasmídeo e cas9.....	60

Índice de Tabelas:

Tabela 1: Biossimilares aprovados em Portugal com respetiva área terapêutica.....12

Tabela 2: Medicamentos biológicos aprovados pela FDA em 2022.....33

Índice de Abreviaturas:

ADN- Ácido desoxirribonucleico

CRISPR- *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

EMA- *European Medicines Agency*

EUA- Estados Unidos da América

EU- União Europeia

FDA- *Food and Drug Administration*

GMP- *Good Manufacturing Practices*

MNSRM- Medicamento não sujeito a receita médica

mRNA- Ácido ribonucleico mensageiro

MSRM- Medicamento sujeito a receita médica

PEG- Polietilenoglicol

RNA- Ácido ribonucleico

saRNA- *Self amplifying RNA*

sgRNA- *Guide RNA*

VIH- Vírus da Imunodeficiência Humana

1. Introdução:

Nos últimos anos a investigação e desenvolvimento por parte das indústrias farmacêuticas tem se centrado sobretudo na área da biotecnologia farmacêutica, pelo facto dos medicamentos biológicos apresentarem mais eficácia, segurança e por ser mais dirigida às células pretendidas.

A utilização de biotecnologia começou a ser utilizada já no século XX, nos anos 70 onde se estabeleceu a tecnologia de ADN recombinante, que consistia na capacidade de transferir unidades específicas de informação genética de um organismo para o outro.

Em 1982 foi aprovado o primeiro medicamento biológico Humulin®, insulina humana produzida com base em processos de biotecnologia (Pina et al., 2009).

Um medicamento biológico é um medicamento cuja substância ativa é uma substância biológica. Entende-se por substância biológica, uma substância extraída ou produzida a partir de uma fonte biológica e cuja caracterização e definição de qualidade requerem a combinação de ensaios físicos, químicos e biológicos, em conjunto com o processo de fabrico e respetivo controlo. Considera-se medicamento biológico os seguintes medicamentos: medicamentos imunológicos, derivados do sangue e plasma humanos (Decreto-lei , 2019).

Estes medicamentos apresentam diferenças em vários aspetos quando comparados com medicamentos compostos por substâncias químicas. Alguns dos aspetos dos medicamentos biológicos são a nível da estrutura e tamanho das moléculas, pois estes correspondem a moléculas de elevado peso molecular, como representado na figura 1. Para além disso são produzidos através de sistemas vivos, quer microrganismos quer por células animais, sendo sujeitos a um complexo processo de fabrico (Comissão Europeia , 2013).

O facto de os medicamentos biológicos apresentarem grandes diferenças aos medicamentos habitualmente utilizados, estes requerem um maior controlo, mas também melhor gestão da utilização dos mesmos, por serem medicamentos mais onerosos devido à sua parte indispensável num arsenal terapêutico, nomeadamente para doenças raras e limitantes (Makurvet et al., 2021).

Atualmente a biotecnologia farmacêutica posiciona-se como uma área em expansão que continuará a apresentar novas terapêuticas e novas abordagens de tratamento levando por isso a novos desafios na utilização e implementação (Makurvet et al., 2021).

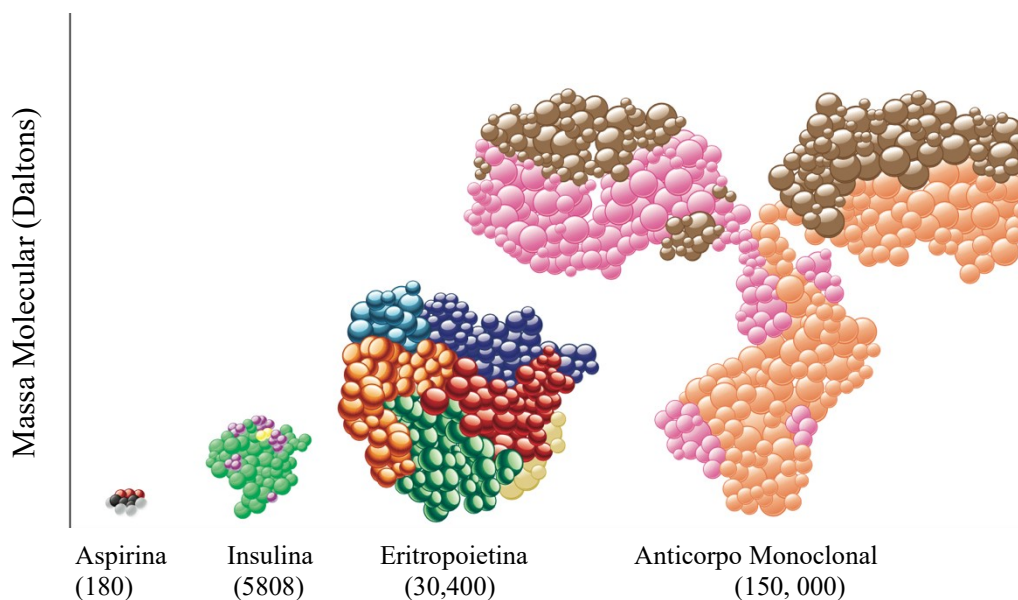


Figura 1: Comparação do peso molecular entre medicamentos de síntese química e biológica. Adaptada de Mellstedt et al., 2013

2. Mercado da indústria biofarmacêutica no mundo:

Embora no ano de 2021 tenha sido ainda bastante marcado pela pandemia da COVID-19, e dessa forma fica marcado por uma atenção especial às vacinas que foram aprovadas quer pela FDA quer pela EMA, nomeadamente Comirnaty® pela Pfizer-BioNTech®; Spikevax® pela Moderna®; JCOVDEN® pela Janssen®, Vaxzevria® pela AstraZeneca® e, mais recentemente Nuvaxovid® pela Novavax® (EMA, 2021; FDA, 2022b).

Para além das vacinas, as indústrias biofarmacêuticas foram capazes de acrescentar mais áreas terapêuticas ao seu pipeline. Produtos emergentes como terapias de fagos, terapia genética, anticorpos monoclonais, nova geração de antimicrobianos e anti-infecciosos, abrem horizontes para oportunidade ao tratamento em áreas como oftalmologia, gestão da dor, controlo de infeções e até mesmo na doença de Alzheimer (Zaki et al., 2021).

Apesar destas áreas emergentes fazerem parte do *pipeline* de empresas biofarmacêuticas, os anticorpos monoclonais são os produtos mais valorizados e que

tem se vindo a manter no mercado, sobretudo em áreas como o cancro e doenças autoimunes, como representado na figura 2.

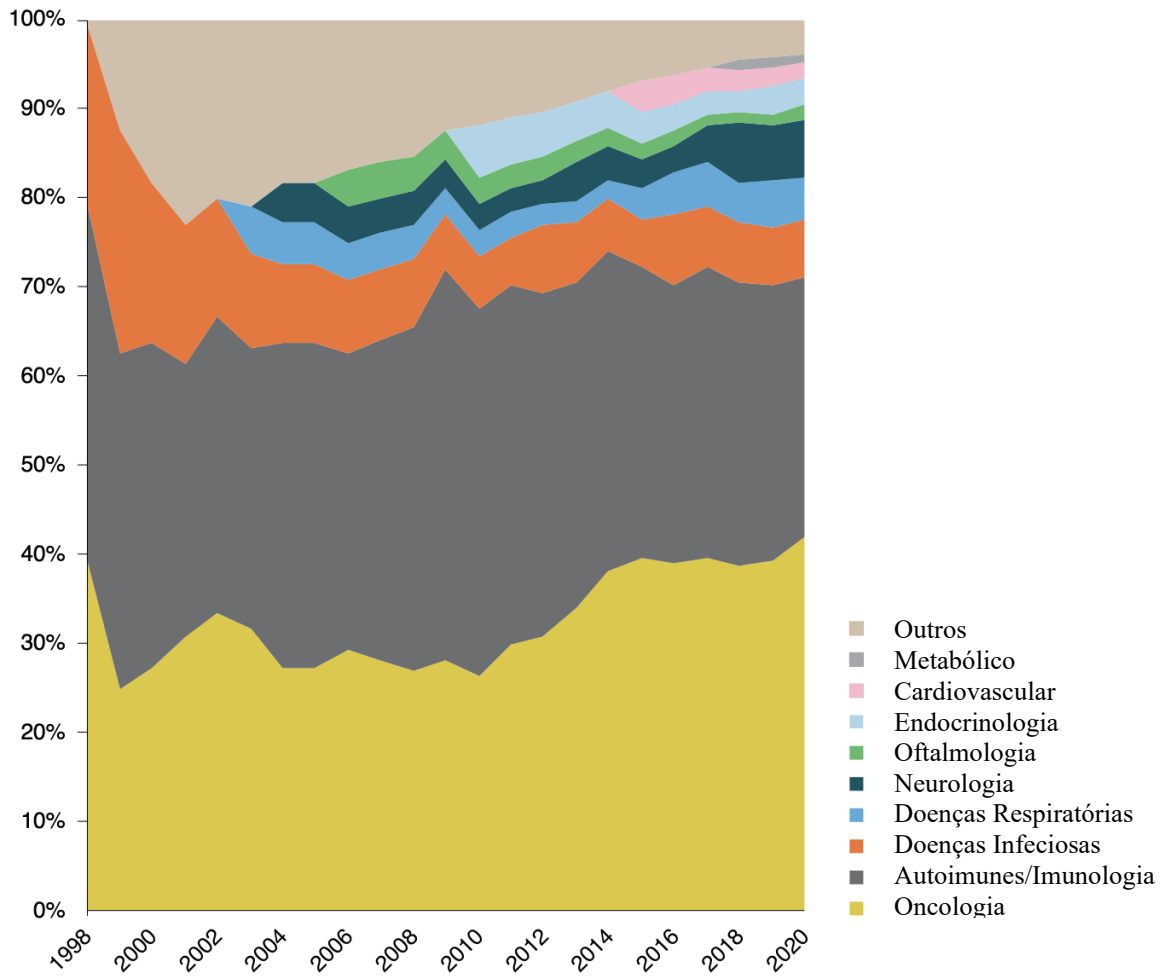


Figura 2: Anticorpos monoclonais aprovados ao longo do tempo e por grupo. Adaptado de (Hodgson et al., 2021)

2.1.Portugal:

Em Portugal o setor da biotecnologia tem crescido, embora ainda tenha uma dimensão relativamente pequena, uma vez que existem alguns desafios para o crescimento deste setor no qual se inclui a biotecnologia farmacêutica. Alguns dos desafios passam pelo acesso a financiamento, falta de investidores privados, dimensão do mercado e questões regulamentares (Sá et al., 2021).

Apesar dos desafios que este setor apresenta continua a ser um setor em crescimento e de grande importância devido às novas terapêuticas que têm surgido no mercado. Em Portugal a dispensa de medicamentos biológicos acontece sobretudo a nível hospitalar sendo que o início de tratamento deverá ser feito com o biossimilar ou medicamento de referência que tenha menor custo para a instituição (Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica et al, 2018).

O aparecimento de biossimilares permitiu mais doentes terem acesso a medicamentos eficazes e seguros, a preços acessíveis e comportáveis por parte dos sistemas de saúde. O medicamento biossimilar é um medicamento biológico desenvolvido com o objetivo de ser semelhante ao medicamento de referência já aprovado. Os biossimilares são aprovados de acordo com os mesmos padrões de qualidade, segurança e eficácia, sendo a Agência Europeia do Medicamento a responsável pela maioria dos pedidos de comercialização de biossimilares na União Europeia (EMA, 2017b).

O primeiro biossimilar a ser usado em Portugal foi em 2008 com a substância Epoetina. Atualmente existem 18 biossimilares aprovados em Portugal e 14 comercializados sendo que abrangem várias áreas terapêuticas, como representado na tabela 1.(APOGEN, 2022).

Tabela 1: Biossimilares aprovados em Portugal com respetiva área terapêutica. Adaptado de (APOGEN, 2022)

Medicamento Biossimilar	Área terapêutica
Adalimumab	Doença inflamatória do intestino/Oftalmologia/Psoríase/Reumatologia
Bevacizumab	Oncologia/Profilaxia da doença tromboembólica venosa
Enoxaparina Sódica	Profilaxia da doença tromboembólica venosa
Epoetina(alfa,beta,zeta)	Hematologia
Epoetinas liber. prolongada	Hematologia
Etanercept	Psoríase/Reumatologia
Filgastrim	Hematologia
Folitropina alfa	Infertilidade
Infliximab	Doença inflamatória do intestino/Psoríase/Reumatologia
Insulina aspártico(solúvel)	Diabetes
Insulina glargina	Diabetes
Insulina lispro(solúvel)	Diabetes
Pegfilgastrim	Hematologia
Ranibizumab	Retinopatia diabética
Rituximab	Oncologia/Reumatologia
Somatotropina	Perturbações do crescimento
Teriparatida	Osteoporose
Trastuzumab	Oncologia

Como referido anteriormente em Portugal a utilização de biossimilares tornou-se predominante tendo em conta que a sua dispensa é feita em meio hospitalar, o que implica a necessidade de uma gestão eficiente para que não acarrete um acréscimo substancial aos orçamentos públicos e de forma que o Sistema Nacional de Saúde consiga assegurar aos doentes a opção terapêutica mais custo-efetiva sem alterar a qualidade (APOGEN, 2022).

2.2. Europa:

A Europa apresenta-se como o segundo maior mercado na área da biotecnologia farmacêutica no mundo, a seguir aos Estados Unidos da América. Esta realidade deve-se ao facto do aumento da população que apresenta doenças crónicas. Sabendo da existência desta situação mais países têm apostado no tratamento recorrendo aos biofármacos por estes apresentarem uma eficácia e segurança superior quando comparados com outros medicamentos.

Atualmente a Europa Ocidental corresponde a mais de 33% da produção de biofármacos a nível mundial. Esta subida deve-se sobretudo ao investimento cada vez maior nesta área quer por parte de privados quer por apoios do estado como se tem verificado em vários países (Forecast et al., 2022).

Deste modo considera-se emergente a área da biotecnologia farmacêutica na Europa, sendo que emergente corresponde a uma empresa com capitalização inferior a 10 biliões de dólares enquanto recebe aprovação por parte da Agência Europeia do Medicamento (Deloitte, 2022).

A Europa apresenta-se como um local propício a desenvolver cada vez mais empresas de biotecnologia farmacêutica por possuir vários aspetos importantes na fixação destas empresas. Alguns dos aspetos passam por: (1) ter centros de investigação e conhecimento do setor para apoiar a inovação; (2) bastantes profissionais altamente qualificados; (3) um grande foco no desenvolvimento de terapêuticas avançadas e para além disso um fator determinante que é os doentes europeus estarem dispostos a novas inovações terapêuticas e tecnológicas quando comparado com os doentes norte americanos (Deloitte, 2022).

A biotecnologia farmacêutica apresenta-se como a área mais promissora dentro da biotecnologia global, desde o ano de 2005 até ao ano de 2020 houve um grande aumento de investimento, no entanto 20% corresponde ao setor público e o restante ao setor privado. Não só o setor da biotecnologia farmacêutica tem tido reconhecimento, mas também a biotecnologia industrial. A área da biotecnologia industrial tem aumentado nos últimos anos, uma vez que, através dela é possível criar diferentes materiais e tecnologias essenciais em outras áreas, nomeadamente na medicina e indústria farmacêutica, como representado na figura 3 (Martin et al., 2021).

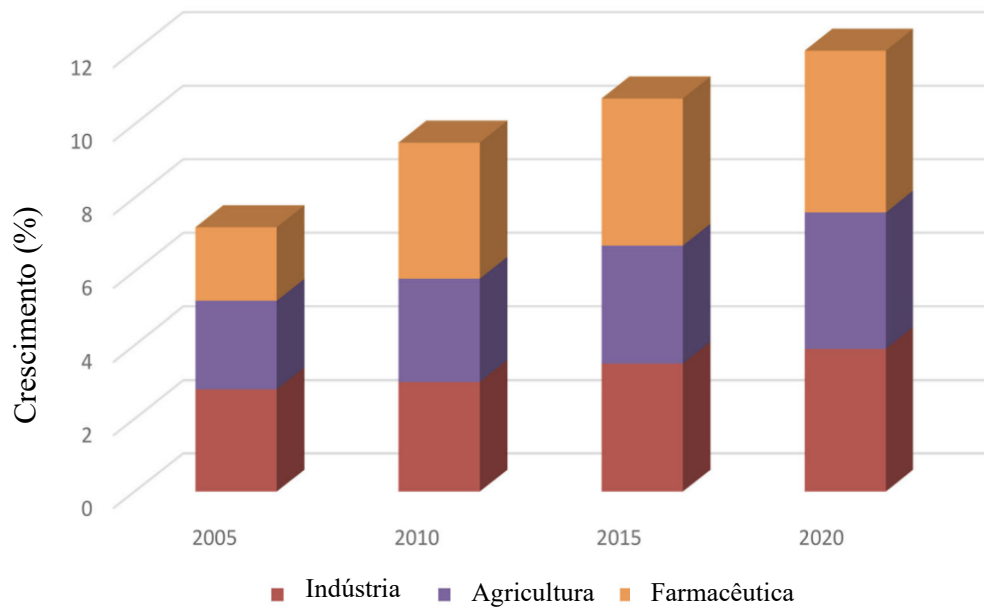


Figura 3: Comparação dos vários setores de biotecnologia nos anos 2005;2010;2015;2020. Adaptado de (Martin et al., 2021)

A Europa também tem apostado em tecnologias inovadoras para a produção destes medicamentos, nomeadamente o uso da tecnologia RNA, a aprovação europeia do medicamento Leqvio® da Novartis®, como o primeiro medicamento derivado da tecnologia siRNA para o colesterol LDL, marca uma mudança fundamental para o mercado farmacêutico, uma vez que até à data, os medicamentos siRNA tinham sido destacadas como terapias para doenças raras (Hodgson et al., 2021).

Mais de 50%, das terapêuticas em desenvolvimento são produtos novos e terapias que tendiam a ser menos estudadas passam a agora a ter uma grande importância, tais como a terapia celular, genética, nucleotídicas que continuam a aumentar, nomeadamente entre o anos de 2014 a 2019 o número de produtos mais do que triplicou, como representado na figura 4 (IQVIA, 2021).

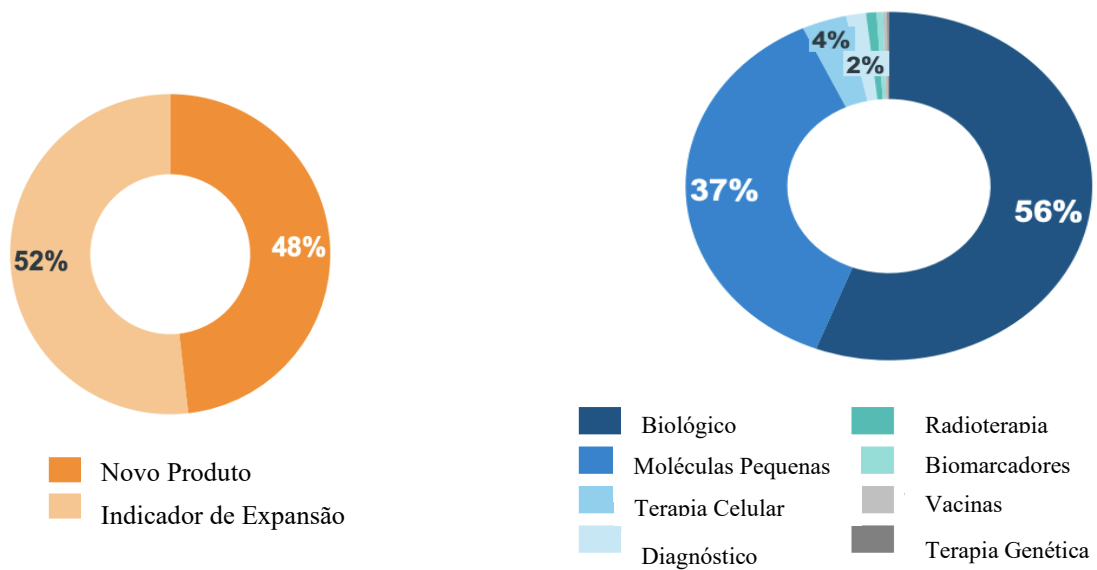


Figura 4: Representação gráfica de novos produtos e indicadores de expansão. Categorias chave em desenvolvimento. Adaptado de (IQVIA, 2020, 2021)

2.3.EUA:

Os Estados Unidos apresentam o maior mercado de produção de medicamentos biológicos a nível mundial, tendo em 2021 atingido o valor de 343 biliões de dólares (Mordor Intelligence LLP et al., 2022).

Este valor pode ser explicado com o facto de em 2020 com o aparecimento da pandemia COVID-19 várias indústrias farmacêuticas com desenvolvimento também na área da biotecnologia terem produzido as vacinas contra a COVID-19, mais tarde aprovadas por entidades reguladoras como o FDA.

O mercado norte americano realçou-se perante outros mercados durante o período de pandemia, isto porque grande parte das empresas farmacêuticas com produção biotecnológica, que têm liderado o mercado em termos de vendas serem sedeadas nos EUA, como representado na figura 5 (Urquhart et al., 2022).

Para além das vacinas em 2020 a FDA aprovou mais catorze biológicos, dos quais oito correspondiam a anticorpos monoclonais, sendo esta a classe que ainda predomina nos medicamentos biológicos. Desta lista de catorze novas moléculas aprovadas é importante destacar o biológico Aducanumab específico para as placas formadas pela proteína beta amiloide, único biológico até ao momento com indicação para a doença de Alzheimer (de la Torre et al., 2022).

O mercado de biológicos tem tido um forte crescimento pelo facto de mais moléculas terem sido aprovadas, isto deve-se às diferentes metodologias que FDA tem conseguido desenvolver ao longo dos anos de modo a acompanhar a inovação e desenvolvimento por parte de indústrias biofarmacêuticas.(Batta et al., 2017).

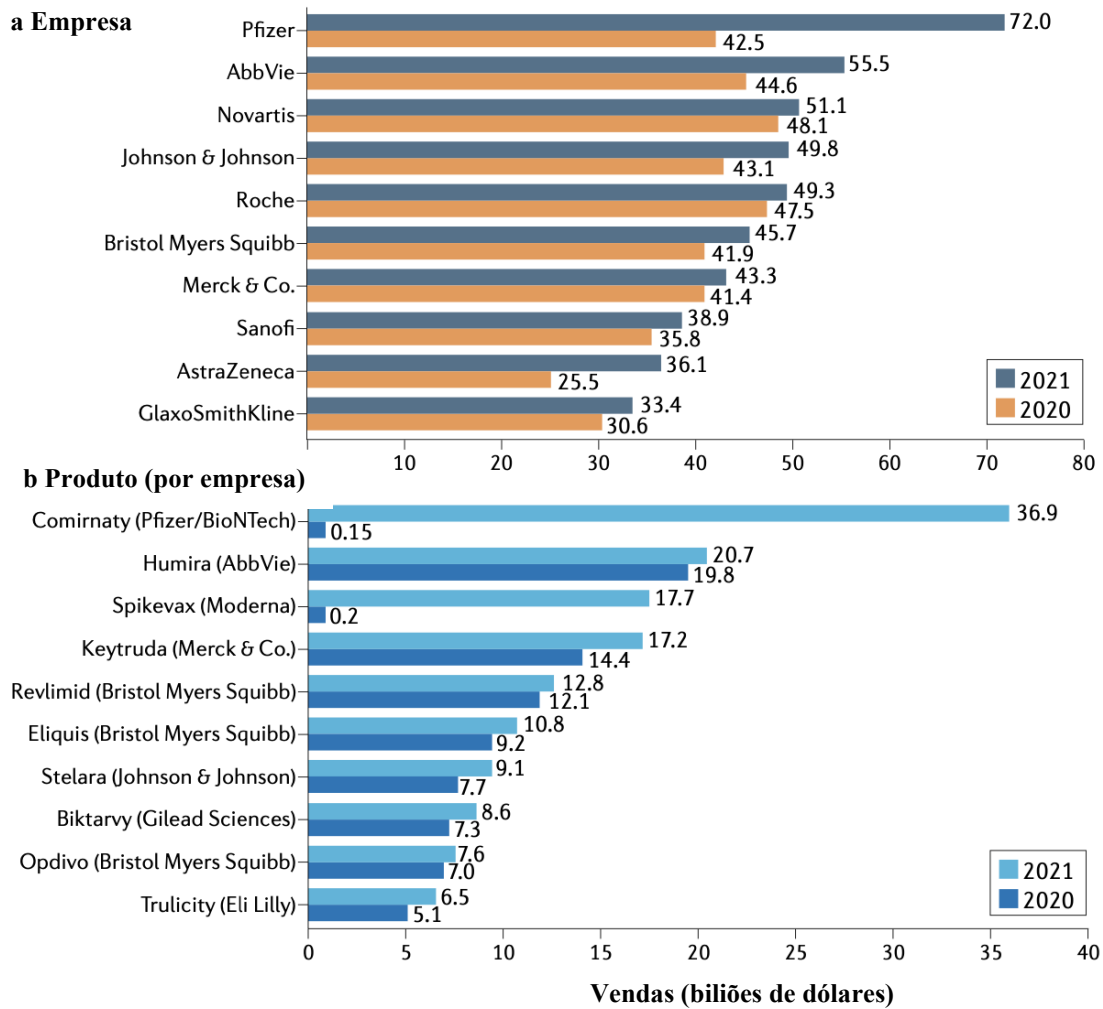


Figura 5: Representação das empresas e medicamentos com maiores vendas em 2021. a. As dez principais empresas por vendas de prescrição e venda livre. b. Os dez medicamentos mais vendidos em todo o mundo. Adaptado de (Urquhart et al., 2022)

Tendo em conta as empresas biofarmacêuticas representadas anteriormente e por estas se apresentarem como grandes *players* mundiais é necessário perceber quais são os pipelines das principais indústrias e como esta indústria irá crescer.

Até maio de 2022 a Pfizer apresenta em decurso um total noventa e seis ensaios clínicos nas mais diversas áreas terapêuticas, no entanto a destacar várias áreas como: a imunologia o desenvolvimento de biológicos para doenças como a dermatite atópica, lúpus e púrpura trombocitopénica imune. A área da oncologia recebe o maior destaque no *pipeline* da Pfizer para cancro de tumores sólidos e mieloma múltiplo. Outra área valorizada é a das doenças raras no qual se encontra em desenvolvimento biológicos como os agonistas da hormona de crescimento humano e terapia genética para hemofilia associada ao fator de coagulação VIII e IX (Husain et al., 2022).

Também a indústria farmacêutica Abbvie aposta em áreas como a imunologia nomeadamente para a colite ulcerosa, lúpus eritematoso, artrite reumatóide e doença de crohn. Outra área em destaque é a neurociência mais concretamente desenvolvimento de biológicos para a doença de Alzheimer. Também esta indústria aposta mais na oncologia que é a que apresenta maior número de moléculas em desenvolvimento, sobretudo para tumores sólidos. Na infeciologia destaca-se o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal para o VIH (Abbvie et al., 2022).

2.4.Japão:

O Japão apresenta-se como um país muito envelhecido, tendo sido publicado em setembro de 2021 o artigo intitulado “*Japan’s Older Population Hits Record High*”, no qual é mencionado que o número de pessoas com 65 ou mais anos atingiu o valor de 36,4 milhões de pessoas (The Japan Times et al., 2021).

Desta forma espera-se que o aumento da população geriátrica impulsione o mercado, uma vez que esta faixa etária é propensa a doenças crónicas.

Para além disso, é necessário compreender quem são as entidades reguladoras responsáveis por aprovarem medicamentos, dispositivos médicos e biológicos. No Japão existem duas entidades reguladoras nomeadamente: (1) Pharmaceutical and Medical Devices Agency (PMDA); (2) Ministry of Health, Labour, and Welfare (MHLF). O processo de aprovação de medicamentos no Japão é menos complexo quando comparado com outros países, sendo um fator que faz com que mais fabricantes optem pelo Japão como o seu mercado de medicamentos biológicos (Credevo et al., 2021).

O mercado japonês trata-se de um mercado competitivo sendo composto por vários intervenientes destacando: Takeda Pharmaceutical Company Limited; Pfizer Inc.; Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.; Merck & Co., Inc. e Daiichi Sankyo Company, Limited como representado na figura 6.

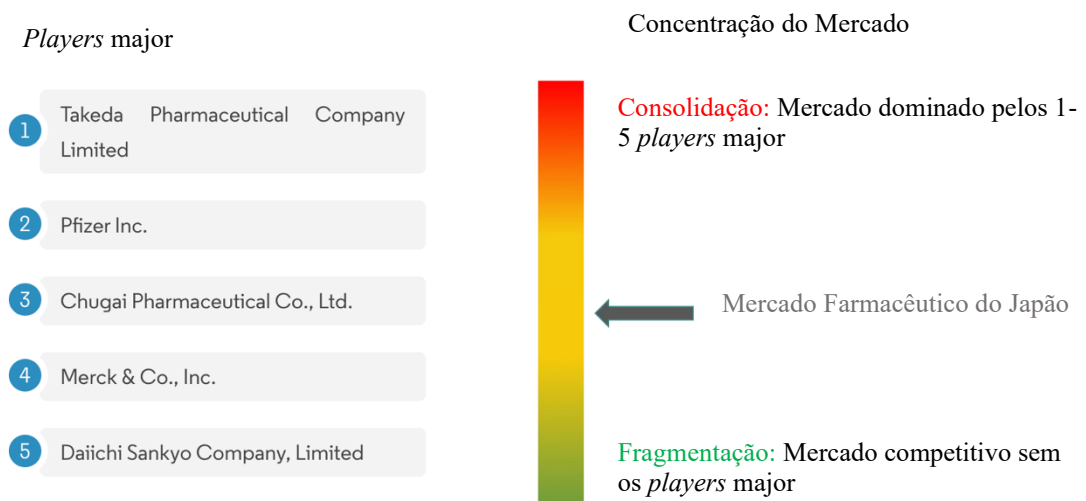


Figura 6: À esquerda: major players do mercado farmacêutico. À direita: concentração do mercado farmacêutico. Adaptado de (Mordor Intelligence LLP et al., 2021)

Destacar também novos medicamentos biológicos que receberam aprovação. Em março de 2022 a empresa Chugai Pharmaceutical Co., Ltd obteve aprovação por parte do MHLF para um anticorpo anti-VEGF/anti-Ang-2 para o tratamento da degeneração macular relacionada com a idade associada à neovascularização coróide e edema macular diabético.

Em abril de 2022 a farmacêutica Takeda Pharmaceutical Company Limited recebeu aprovação também por parte do MHLF para uma vacina contra a COVID-19 com tecnologia *protein-based* com recomendação para imunização primária e reforço em indivíduos com mais de 18 anos (Mordor Intelligence LLP et al., 2021).

Em suma, o mercado de indústria Biofarmacêutica no Japão destaca-se no continente asiático pelos fatores mencionados anteriormente, sendo um mercado em rápido crescimento com grande potencial para investimento posicionando-se no top de mercados de medicamentos biológicos ao lado dos EUA e Europa, como representado na figura 7.

Número de novas moléculas biológicas e químicas (2001-2020)

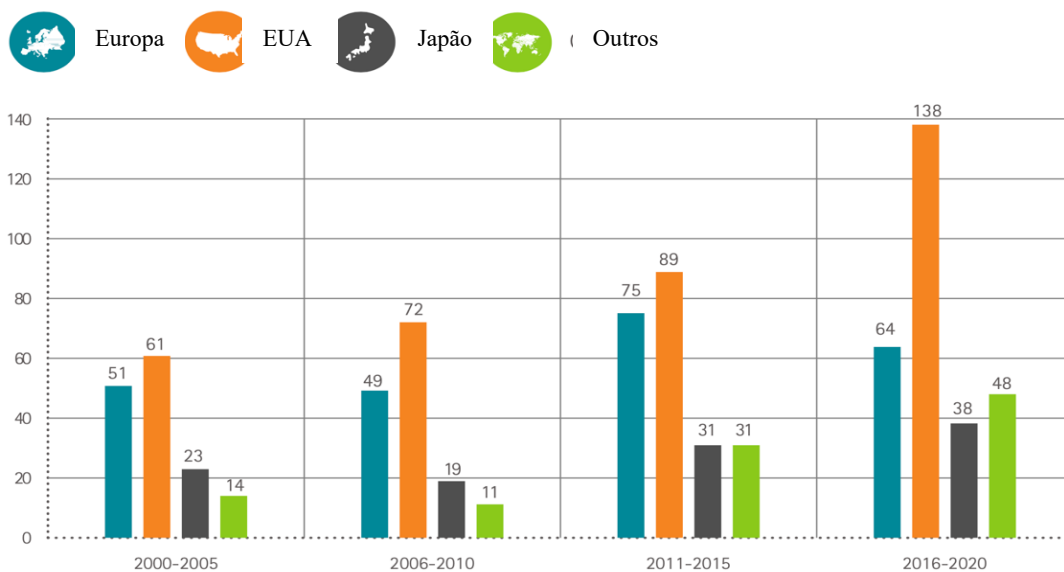


Figura 7: Número de novas moléculas químicas e biológicas aprovadas nos respectivos países. Adaptado de (Epifa et al., 2021)

2.5. Áreas terapêuticas em crescimento:

Tendo em conta a análise do mercado da indústria biofarmacêutica este encontra-se em constante mudança e por isso, é um setor com grande prioridade e que se apresenta como fator chave para a competitividade da economia mundial. A sua contribuição para o crescimento económico baseia-se no facto de promover progresso tecnológico e inovador em diversas áreas sendo a principal a medicina.

Assim, o mercado da indústria biofarmacêutica posiciona-se como um mercado que continuará a ter a crescer devido à sua diversidade e aplicações na área das ciências da vida.

As áreas terapêuticas que têm maior expressão na indústria biofarmacêutica são especificamente cinco, nomeadamente a oncologia, doenças autoimunes, imunologia (na qual se inclui os interferões, imunossuppressores e imunoglobulinas), infeciologia e neurologia (destacando-se a esclerose múltipla) (Aitken et al., 2019).

Uma das grandes melhorias e inovação que a biotecnologia farmacêutica tem surgido é na área da genética, permitindo o aumento de uso de informação genética importante na avaliação, diagnóstico e tratamento. Com o conhecimento genético é possível identificar sequências genómica podendo ser utilizado na prevenção de doenças, desta forma a terapia genética pretende ser uma terapêutica a ser utilizada num futuro próximo. Não só a genética se apresenta como uma área em crescimento, mas também a imunologia, por também ela ter grande importância na prevenção e progressão de doenças prejudiciais. Deste modo, existe um grande interesse no estudo da função das células imunológicas para que se possa perceber quais os tipos de vírus ou bactérias podem ser tratados de forma eficaz, neste ramo destacam-se a terapia celular e a utilização de bacteriófagos como novas terapêuticas (Linchpin et al., 2022).

Os exemplos dados anteriormente são algumas das aplicações que os biofármacos podem ter, sendo que mais poderá ser explorado. A importância deste conhecimento foi notória durante a pandemia COVID-19, da qual foi necessária diagnosticar infetados, ter dados epidemiológicos e obter-se uma vacina da qual foi conseguida recorrendo a tecnologia de ADN recombinante (Iniciativa et al., 2020).

3. Desafios na indústria biofarmacêutica:

3.1. Produção de medicamentos biológicos:

Como referido no capítulo anterior estes medicamentos apresentam-se como sendo mais complexos que os medicamentos provenientes por síntese química. Por essa razão apresentam mais desafios na sua produção sendo este um processo que envolve bastantes passos na diferenciação da produção industrial química, desse modo mais custos associados à sua produção (Moleirinho et al.,2019).

A produção de medicamentos biológicos envolve dois grandes passos nomeadamente: *Upstream* e *Downstream*.

Destacando os processos de *Upstream* e *Downstream*, pois estes têm uma grande importância na sua eficiência e qualidade do produto final (Moleirinho et al., 2019).

3.1.1. *Upstream*:

O processo *upstream* tem evoluído significativamente nos últimos anos, devido ao aumento de conhecimento de melhores formulações para culturas de células e também a biorreatores com funcionalidade apropriada aos vários processos.

Existem fatores importantes a ter em conta de modo a obter-se um bom processo de *upstream*, nomeadamente o tipo de cultura de células e os biorreatores utilizados (Benyahia et al.,2020).

Cultura de Células:

Para a cultura de células estas devem ser escolhidas com base no seu crescimento e estabilidade de forma que seja reprodutível entre vários lotes.

Para além disso deve sempre ter em conta as necessidades comerciais e regulamentares, a presença de materiais instáveis, variações de lote para lote, compatibilidade com os sistemas de produção, facilidade de formulação, e o impacto no processo de *downstream*(Grosvenor et al., 2012).

Até 2010 muitas empresas biofarmacêuticas seguiram a política de desenvolverem as suas próprias linhas celulares para produção, no entanto na última década assistiu-se a uma mudança nesta abordagem. Atualmente as empresas biofarmacêuticas tendem a

utilizar a mesma linha de células para a produção e ensaios clínicos, pois desta forma simplifica o ciclo de desenvolvimento da linha de células e otimiza a sua produção. Para além disso reduz o risco de problemas de comparabilidade do produto e ajuda os fabricantes a satisfazer os requisitos de qualidade do produto (Brian et al., 2018).

Para a cultura de células o sistema de expressão mais utilizado são as células animais, da qual fazem parte ovário de hamster chinês (CHO) e rim de hamster bebé (BHK). Cerca de 70% dos anticorpos monoclonais são produzidos através de células de hamster de ovário chinês, sendo estas as células mais utilizadas na indústria biofarmacêutica. A sua escolha deve-se ao facto de terem uma elevada produtividade, exibirem um rápido crescimento adequado à escala industrial, e poderem ser facilmente adaptados (Tihanyi et al., 2020).

Biorreatores:

- Stirred-Tank:

Corresponde ao bioreator mais utilizado e o mais convencional por apresentar várias vantagens tais como: fácil crescimento celular, boa capacidade de mistura de fluídos e transferência de oxigénio, bem como a facilidade no cumprimento das GMP necessárias por parte das entidades reguladoras. No entanto, apresenta algumas desvantagens como o elevado consumo de energia bem como a estabilidade da mistura (Zhong et al., 2011).

- Airlift:

Apresentam vantagens sobre os biorreatores stirred tank, uma vez que são mais simples, mais suave na mistura por não terem na sua composição uma turbina, e apresentam um menor custo. Contudo, por não possuírem a turbina não são indicados para culturas celulares altamente viscosas, resultando numa mistura de fluídos mais pobre (Zhong et al., 2011).

- Bioreator de Membrana:

Neste tipo de biorreatores utiliza-se uma membrana específica com capacidade para reter células. São produzidos de modo a realizarem a separação in situ de células do meio e para além disso integram a separação e produção numa única etapa. Algumas das vantagens na utilização deste tipo de biorreatores são: a alta produtividade em termos de volume e ser adequados a células de elevada densidade. No entanto

apresentam desvantagens tais como: pouca estabilidade durante o processo devido à obstrução da membrana, dificuldade na homogeneidade do produto e gradientes de difusão que limitam em grande escala. Apesar das desvantagens têm sido utilizados para processos de fermentação (Zhong et al., 2011).

- **Fixed Bed:**

Estes biorreatores são utilizados com o propósito de imobilizarem células ou enzimas, ou seja, existem áreas específicas de elevado contacto entre sólidos e líquidos resultando em menos resistência facilitando a mistura. Porém este tipo de bioreator é propenso a acumular bolsas de gás o que dificulta a distribuição de líquidos, por essa razão não tem sido muito utilizado em processos de fermentação microbiana (Zhong et al., 2011).

3.1.2. Estratégia de produção:

Quanto à estratégia de produção utilizada esta também se apresenta como um fator relevante e desafiante, pois o produto final obtido será determinado através do processo de crescimento e fermentação utilizado.

Deste modo, existem três protocolos de fermentação, nomeadamente: batch, fed-batch e fermentação contínua (Ochoa et al., 2019).

A produção em fed-batch tem sido amplamente utilizada no processo de fermentação para vários organismos tais como: aminoácidos, enzimas, antibióticos, proteínas e vários produtos produzidos a partir de tecnologia de ADN recombinante. Este tipo de produção é preferível, visto que combina a segurança e estabilidade entre lotes com elevada produtividade de culturas de células. (Ochoa et al., 2019).

Quando comparado com a produção em batch esta classifica-se como sendo a mais simples porque inicialmente são colocados todos os componentes necessários sem haver adição a meio do processo e no fim é que se recupera o produto final. No entanto apresenta a desvantagem de lote para lote poder obter-se resultados diferentes pelo facto das células exibirem um comportamento aleatório (Ochoa et al., 2019).

A fermentação contínua corresponde a um processo com fluxo constante do meio de cultura através do bioreator. A fermentação começa como um processo descontínuo, que a determinada altura quando a cultura atinge a fase de crescimento exponencial,

inicia-se uma nova alimentação do meio de crescimento e um mesmo volume de cultura é removido. A fermentação em contínuo é limitada uma vez que apresenta riscos tais como: contaminação, variabilidade genética na cultura e para além disso é um processo de difícil controlo (Lindskog et al., 2018).

3.1.3. *Downstream*:

A etapa *downstream* inclui todos os passos que isolam o produto desde a sua produção inicial, esses passos correspondem sobretudo à purificação e acabamento do produto final. Dado que estes medicamentos necessitam um elevado grau de pureza exigido por parte de entidades reguladoras o processo de *downstream* é normalmente responsável por 60% a 80% dos custos totais de produção (Benyahia et al., 2020).

O processo de *downstream* apresenta várias etapas tais como: purificação primária, purificação intermediária, formulação e esterilização.

Purificação Primária:

A eliminação de contaminantes é o objetivo principal para a obtenção de um medicamento seguro. A estabilidade do produto, a densidade das células bem como a variabilidade das células têm um enorme impacto nas etapas de purificação. Existem várias técnicas de purificação, no entanto a escolha de eleição para a produção em grande escala passa pela lise celular. A lise celular corresponde à adição de surfactantes em pequenas concentrações que mais tarde são removidos. Com a etapa da lise celular existe uma acumulação de contaminantes proteicos e ADN celular.

Deste modo, segue-se a etapa de filtração e centrifugação muitas vezes as duas combinadas. Um dos tratamentos aplicados à cultura de células ainda nesta fase é a nucleasse, uma vez que para ser reduz o tamanho ADN de modo a atingir os valores impostos pelas autoridades reguladoras, no entanto este passo leva ao aumento do custo de produção pois a enzima utilizada é dispendiosa (Moleirinho et al., 2019).

Purificação intermediária:

Nesta fase de *downstream* pode ser aplicado o processo de ultrafiltração ou cromatografias. A ultrafiltração apresenta-se como uma técnica robusta embora de custo relativamente baixo e geralmente alcança em termos de produto obtido um rendimento moderado a elevado. Porém a cromatografia tem sido o processo mais utilizado nos últimos anos para a purificação de pequenas proteínas e anticorpos monoclonais. A cromatografia é uma técnica vantajosa, uma vez que pode ser utilizada em diferentes fases, como representado na figura 8.

O tipo de cromatografia mais utilizada é de troca-iónica mais específica para partículas de maior dimensão e pode ser aplicada em função da carga líquida e pH da partícula a ser purificada. Vírus como adenovírus, retrovírus e baculovírus foram purificados com sucesso utilizando a cromatografia de troca-iónica (M. Zhao et al., 2019).

A cromatografia de afinidade tem sido estudada, visto que os vírus adeno-associados têm sido explorados como vetor viral para terapia génica. Assim o desenvolvimento de resinas para se aplicar neste tipo de cromatografia tem sido prioridade. Porém a utilização da cromatografia de afinidade ainda é reduzida devidos ao custo económico associado ao desenvolvimento e fabrico deste tipo de resinas, de modo que esta cromatografia apresenta uma elevada produtividade (M. Zhao et al., 2019) (Moleirinho et al., 2019).

Formulação/ Esterilização:

Esta etapa final é crucial, dado que as *guidelines* para pureza/qualidade exigidas para o produto final devem ser as mais elevadas possíveis bem como exequíveis. Assim a cromatografia de exclusão por tamanho ainda é uma técnica muito utilizada na formulação para remover impurezas de baixo peso molecular. A formulação do produto final destina-se não só a manter a estrutura, mas também a função das partículas ao longo do tempo, mas também a melhorar as respostas imunitárias através da utilização de adjuvantes. A sacarose, trealose e dextrose são alguns dos exemplos de utilização de adjuvantes na formulação das vacinas.

A última etapa corresponde à esterilização, é a etapa que depende muito do tamanho das partículas obtidas, uma vez que partículas com mais do que 200nm não podem ser filtradas segundos parâmetros regulamentares. O tempo de material utilizado na

membrana de filtração é um fator fundamental de modo a não perder o máximo de partículas possíveis (Moleirinho et al., 2019).

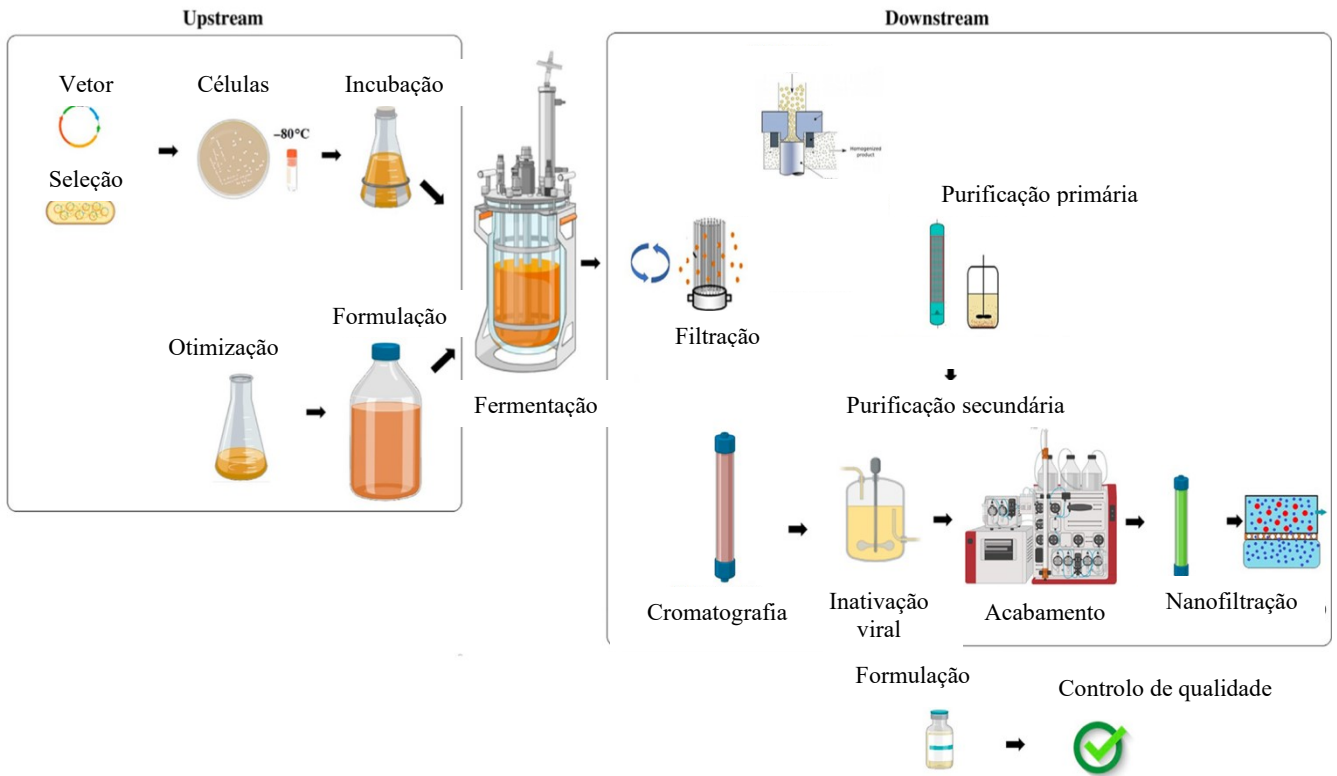


Figura 8: Etapas durante os processos de upstream e downstream ao longo do fabrico biofarmacêutico. Adaptado de (Benyahia et al., 2020)

3.2.Custos associados à produção de medicamentos biológicos:

O custo de produção associado aos medicamentos biológicos apresenta-se como um desafio para a indústria biofarmacêutica, pois sendo esta etapa a mais dispendiosa durante o desenvolvimento de um biológico irá limitar os custos noutras operações também elas importantes para a obtenção de um produto de qualidade.

A fase III do desenvolvimento de um medicamento biológico apresenta-se como o principal fator de custo do portfólio de novos produtos biofarmacêutico cerca de 37%, enquanto a revisão regulamentar apresenta um gasto de 6% dos custos totais (Farid et al., 2020).

Deste modo, novos métodos de produção e desenvolvimento estão a ser estudados nomeadamente a aposta em produção em contínuo. A produção em contínuo apresenta várias vantagens tais como: a redução de custos, aumento da produtividade, melhoria da qualidade do produto e flexibilidade, como representado na figura 9 (Han et al., 2019).

O processo em contínuo permite que os fluxos de alimentação do bioreator seja contínuo, ou seja, existe sempre o fornecimento da quantidade correta e contínua do substrato e nutrientes necessários. Do ponto de vista do controlo desta mistura, é a desejável, visto que existe a possibilidade de atingir um estado estacionário da operação, mantendo assim o volume constante durante o processo, reduzindo a variabilidade do substrato dentro do reator (Ochoa et al., 2019).

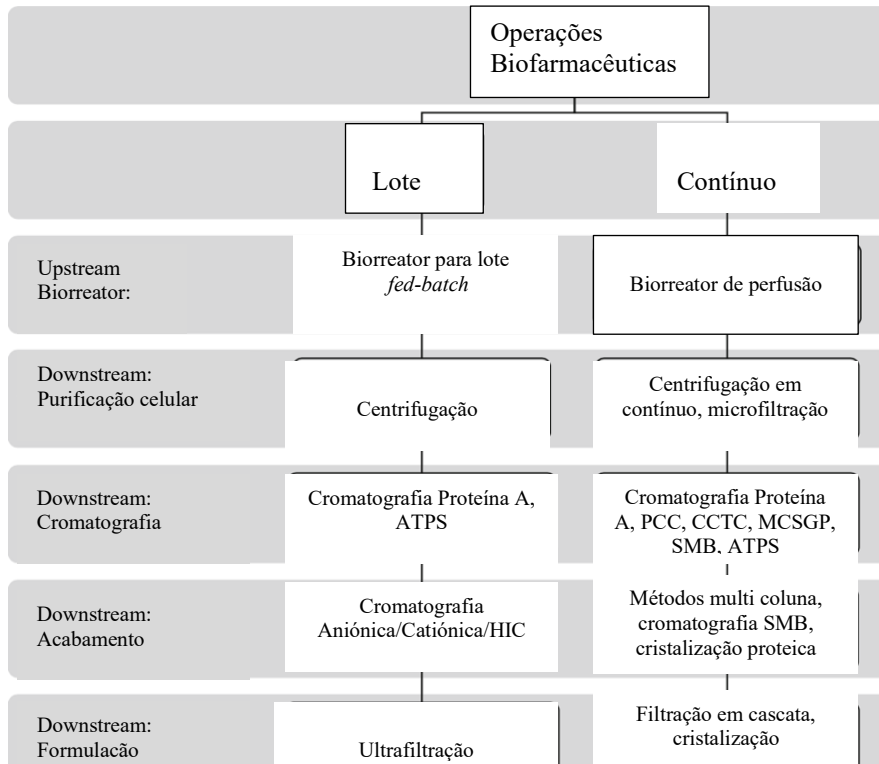


Figura 9: Processo contínuo vs em lote na produção de anticorpos monoclonais. Adaptado de (Yang et al., 2020)

De uma forma comparativa à produção por lote corresponde a múltiplas etapas, aumento do tempo e controlo frequente após cada conclusão. Por outro lado, a produção em contínuo, como o próprio nome indica trata-se de uma operação em contínuo, não necessita de uma rotina de *shutdown* e *startup* e o controlo faz-se no fim de cada processo.

Em termos de flexibilidade a produção em lote torna-se mais fácil de implementar, mas mais dispendioso, permite um aumento de *stock*, e menor manutenção a longo prazo. Em processo contínuo existe mais dificuldade em adaptar a cada etapa para diferentes produtos, é necessária uma estratégia de controlo adequada, para além disso trata-se de um aumento de produção custo-efetivo (Jonathan et al., 2016).

Quanto a qualidade a produção em lote torna-se mais fácil de responder quando existe uma falha, no entanto trata-se de um processo mais lento e requer mais intervenção humana. Quando comparado com a produção em contínuo este é mais rápido, necessita de menos intervenção humana e é apropriado para produtos mais sensíveis.

De um ponto de vista de segurança a produção em contínuo responde melhor num caso de escassez de produtos, nomeadamente em situações de pandemias, guerras ou catástrofes naturais (Jonathan et al., 2016).

Por último um dos aspetos importantes a comprar é o custo-efetividade das produções, uma vez que é um ponto crítico e determinante para perceber quais o tipo de produção deve ser utilizado tendo em conta o produto a produzir. Assim, a produção em lote utiliza um capital intensivo, apresenta um maior custo de mão-de -obra e equipamento a longo prazo, estando mais adequado a produção de escala mais reduzida.

Contrariamente o processo em continuo adequa-se à produção em larga escala, no entanto requer um maior investimento inicialmente, mas que a longo prazo apresenta um menor custo de mão de obra e equipamento(Khanal et al.,2021).

Apesar das vantagens que este processo as indústrias biofarmacêuticas ainda se mostram reticentes no investimento no processo de produção continua que ainda apresenta riscos financeiros, lacunas técnicas e incertezas a nível de entidades reguladoras(Khanal et al., 2021).

3.3. Processos Analíticos:

A tecnologia analítica de processos (PAT) foi definida pela FDA através da guideline “*Framework for Innovation Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance*” de modo a servir de ferramenta que permite orientar a análise, o controle e o design da produção e desenvolvimento farmacêutico. (Administration et al., 2004)

A importância da utilização de processos analíticos nos biofármacos é relevante devido à natureza dos produtos serem bastante dinâmicos e complexas o que torna difícil a implementação destes processos. Esta abordagem permite testar a qualidade do produto em diferentes fases de fabrico para garantir o *Quality by Design* desde as matérias-primas até ao produto final (Gerzon et al., 2022).

Deste modo, o foco é desenvolver e integrar soluções de PAT, que acabarão por melhorar o controlo de produção de medicamentos biológicos ao longo do processo de fabrico. Assim, os principais objetivos da integração de PAT no processo de fabrico do produto podem ser resumidos em três pontos: redução dos tempos de ciclo do produto através de sistemas de medição e controlo em tempo real, a redução de desperdícios do produto final, e a possibilidade de libertação em tempo real (Gerzon et al., 2022).

Recentemente o desenvolvimento destes processos analíticos tem sido investigado para compreender bioprocessos mais complexos, como o caso das vacinas. Existem vários tipos de tecnologia de vacinas, tais como vacinas vivas, atenuadas, toxóides, proteínas, RNA/ADN entre outras. Concretamente nas vacinas a aplicação destes processos analíticos permite fornecer parâmetros críticos como avaliação de pureza do antigénio; a formulação da substância farmacêutica, ou seja, a absorção de adjuvante; e por último o produto final neste caso a vacina (Mei et al., 2019).

Destacar dois processos analíticos que têm vindo a ser estudados e que apresentam vantagens a serem usados pela indústria biofarmacêutica de forma a otimizarem a produção de biofármacos. Os processos são: espectroscopia infravermelha; ressonância magnética nuclear (Gerzon et al., 2022).

Para além dos processos mencionados anteriormente, a implementação da digitalização, automatização e testes em tempo real num laboratório de controlo de qualidade nos medicamentos biológicos é capaz de aumentar a produtividade entre 30 a 40% e reduzir em 50% os custos. Como as ferramentas PAT e as técnicas de automatização de ensaios

eliminam a necessidade de testes *off-line*, ou seja, a preparação manual de amostras, o que significa que capacidade de suportar/analisar o número de amostras aumenta drasticamente(Han et al., 2019).

Deste modo, o controlo eficiente dos processos torna-se cada vez mais uma necessidade com a atual situação das indústrias biofarmacêuticas que avançam para processos contínuos e intensificados na produção de biológicos. A produção em contínuo requer uma monitorização em tempo real de operações de unidades críticas de forma a assegurar o produto de qualidade consistente(Zydney et al., 2015).

Em suma, apesar das vantagens já mencionadas sobre a produção em contínuo também o uso da transformação digital é necessário no desenvolvimento de biológicos, no entanto, existe uma desconexão entre o impacto empresarial e o recurso atribuído para a implementação de plataformas centradas em dados nas empresas farmacêuticas, ou seja, é necessária uma aposta maior em ciências de dados que visam alcançar e desenvolver tecnologias necessárias para a produção destes medicamentos(Lucia et al.,2018).

3.4.Aspetos Regulamentares:

Para além dos desafios apresentados na produção e desenvolvimento de medicamentos biológicos, estes também apresentam dificuldades a nível regulamentar.

Esta classe de medicamentos tem a capacidade de revolucionar a medicina moderna, as terapias avançadas e terapias regenerativas. Algumas destas terapias mais inovadoras começam a surgir no mercado tais como: terapêuticas com células estaminais, terapia génica e recetores de quiméricos de antigénios CAR-T. Em 2017 a Novartis® recebeu a primeira aprovação por parte da FDA para este tipo de terapia, um exemplo em que as células T do doente são removidas e modificadas para expressar recetores específicos do cancro desde individuo, criando assim um tratamento personalizado(Auclair et al.,2019)(FDA , 2017).

Nos últimos anos tem havido uma tentativa de acordo entre entidades reguladoras nomeadamente FDA e EMA, no sentido de reconhecimento mútuo de boas práticas de fabrico de cada entidade. Embora, estes acordos sejam passos promissores, e esta convergência seja um pouco complexa, é necessário destacar os objetivos desta convergência que são: desenvolvimento, adoção e diretrizes internacionais e esforços na formação baseada nas guidelines ou boas práticas. Em concreto, estes esforços no desenvolvimento de guidelines e formação devem basear-se em regulamentação científica e baseada no risco (EMA, 2017c).

Tendo em conta o panorama global, o medicamento biológico não apresenta a mesma definição segundo a legislação de outros países. Por exemplo na Austrália, em que os biológicos referem-se apenas a células e tecidos humanos, deste modo as vacinas (que não contém células humanas), produtos recombinantes e produtos derivados do sangue não são considerados biológicos e são tratados pela autoridade australiana “*Therapeutic Good Administration*” como medicamentos e dispositivos médicos. Outros países como Suíça e Nova Zelândia, o pedido para novas entidades biológicas pode ocorrer após aprovação numa jurisdição de referência (como na Europa) ou em paralelo com candidaturas da União Europeia e dos EUA, esta abordagem gera uma redução de custos(Thomas et al., 2019).

Dadas a diferenças demonstradas nos exemplos anteriores na classificação do que são medicamentos biológicos, a aprovação destes biofármacos torna-se uma tarefa difícil. Deste modo, uma das soluções apresentadas passa pela utilização de tecnologias como Inteligência artificial no processo de aprovação de modo a tornar mais assertivo e eficaz a decisão do regulador. Assim é necessário criar e manter um fórum de dados de saúde que incluam toda a informação ética, legal e científica(ICMRA et al., 2021).

3.4.1. FDA:

O centro de avaliação e investigação de medicamentos (CDER) da FDA tem como responsabilidade proteger e promover a saúde dos cidadãos norte americanos, assegurando que os medicamentos são seguros e eficazes, cumprem os padrões de qualidade estabelecidos e estão disponíveis para os doentes(FDA , 2020).

As terapias inovadoras em desenvolvimento aumentaram em complexidade devido ao conhecimento na área da genética, nos avanços da medicina personalizada e ao progresso científico que permitiu uma maior concentração nas doenças raras. Isto criou uma necessidade de novos conhecimentos na área regulamentar e de novas técnicas analíticas. A maior disponibilidade de dados, incluindo dados observacionais e dados do mundo real, provocou mudanças na forma como a FDA gere e utiliza dados para fazer revisão e vigilância de medicamentos(Bugin et al.,2021).

Para além destes avanços a FDA atualizou os seus regulamentos para eliminar requisitos biológicos desatualizados, permitindo assim as indústrias biofarmacêuticas de utilizarem novas tecnologias de fabrico e capacidades de ensaio. Um exemplo é o facto das preparações padrão, ou seja, solução padrão contendo uma concentração precisamente conhecida desse elemento, poderem agora ser obtidas de outras fontes sem ser do Centro de Avaliação e Pesquisa Biológica da FDA (CEBR).

A FDA também eliminou uma regra que especifica limites mínimos de potência a serem cumpridos para certos anticorpos e antigénios; para além desta secção a FDA também atualizou os regulamentos relativos aos períodos e condições de armazenamento de biológicos.

Com estas alterações pretende-se aumentar a flexibilidade regulamentar, permitindo à Indústria biofarmacêutica e à FDA incorporar as tecnologias científicas atuais no fabrico de produtos biológicos (Market Research Blog et al., 2022).

Todos os anos o CDER da FDA (*Center of Drug and Evaluation na Research*) aprova uma vasta gama de novos medicamentos e produtos biológicos. No ano de 2022 e até ao momento foram aprovadas nove novas moléculas biológicas como se encontram representadas na tabela 2.

Tabela 2: Medicamentos biológicos aprovados pela FDA em 2022. Adaptada de (FDA et al., 2022a)

Nome Comercial	Substância Ativa	Classe Terapêutica	Indicações
Amvuttra®	Vutrisiran	Tecnologia siRNA	Polineuropatia amiloidose hereditária
Mounjaro®	Tirzepatide	Análogo da GPL-1	Diabetes
Opdualag®	Nivolumab e Relatimab-rmbw	Anticorpo Monoclonal	Melanoma Metastático
Vonjo®	Pacritinib	Anticorpo Monoclonal	Mielofibrose em adultos com plaquetas baixas
Pyrukynd®	Mitapivat	Ativador do piruvato kinase	Anemia Hemolítica
Enjaymo®	Sutimlimab-jome	Anticorpo Monoclonal	Transfusão de eritrócitos devido a hemólise de aglutinina fria
Vabysmo®	Faricimab-svoa	Anticorpo Monoclonal	Degeneração macular e edema macular diabético
Kimmtrk®	Tebentafusp-teben	T-Cell	Melanoma Metastático
Cibingo®	Abrocitinib	Anticorpo Monoclonal	Dermatite Atópica

3.4.2. EMA:

Para acompanhar a evolução dos medicamentos biológicos também a EMA propôs implementar novas estratégias regulamentares, uma das estratégias passa por haver integração entre ciência e tecnologia no desenvolvimento de medicamentos, nomeadamente facilitar novas tecnologias de fabrico. Atualmente nas tecnologias de fabrico existem novas formas mais eficientes que incluem por exemplo o fabrico em contínuo. Estas novas tecnologias podem não se enquadrar nos modelos regulamentares atuais e exigem alteração nos requisitos das GMP. Para além disso é mencionado a importância de desenvolver e compreender a resposta regulamentar para nanotecnologia e novos materiais em produtos farmacêuticos, ou seja, compreender os atributos críticos de qualidade de um determinado medicamento, a relação entre estes e a atividade biológica e comportamento *in vivo* do medicamento (EMA, 2020).

Também a EMA prevê a utilização de tecnologia digital e inteligência artificial nos processos de aprovação de novos medicamentos. Com o aumento de dados sobre os biológicos a partir de uma vasta gama de fontes onde se criam oportunidades. Novos métodos, incorporando inteligência artificial e infraestruturas digitais. Deste modo, a EMA tenciona explorar esses métodos para aumentar a eficiência e tomada de decisão. O grande desafio da utilização destas novas técnicas nos medicamentos biológicos centra-se sobretudo nos aspetos associados à privacidade e ética (EMA, 2020).

Embora a EMA tenha destacado novas tecnologias para se aplicar nos medicamentos biológicos, uma área que continuará a estar em destaque são os biossimilares. O mercado de medicamentos biossimilares europeu é bastante experiente, especialmente quando comparado com os EUA (Allocati et al., 2020).

A EMA é responsável pela aprovação de biossimilares na UE, seguindo um caminho regulamentar formal e com guidelines científicas extensivas que existem desde 2001, e que esboçam os requisitos gerais para aprovação e comercialização (European Parliament, 2009) (Allocati et al., 2020).

O desenvolvimento e monitorização de biossimilares necessita de novas formas para melhorar a eficiência, de forma a acelerar o acesso destes medicamentos e reduzir as incertezas sobre a sua utilização, particularmente importante para a imunogenicidade. Métodos analíticos inovadores e sensíveis podem ajudar sobretudo em parâmetros como a farmacocinética e farmacodinâmica, de forma a reduzir a incerteza e possivelmente a necessidade de ensaios clínicos comparativos (Allocati et al., 2020).

Assim, um dos maiores avanços dos biossimilares tem sido a melhoria na consistência de fabrico, para além disso os métodos para avaliar se os biossimilares são equivalentes aos medicamentos de referência melhoraram consideravelmente. Existe uma crescente confiança nos testes analíticos para a caracterização funcional e estrutural de biossimilares que permitiu aos reguladores baixar os requisitos para os ensaios de eficácia clínica comparativa que não são tão sensíveis, como representado na figura 10 (Tony et al., 2021).

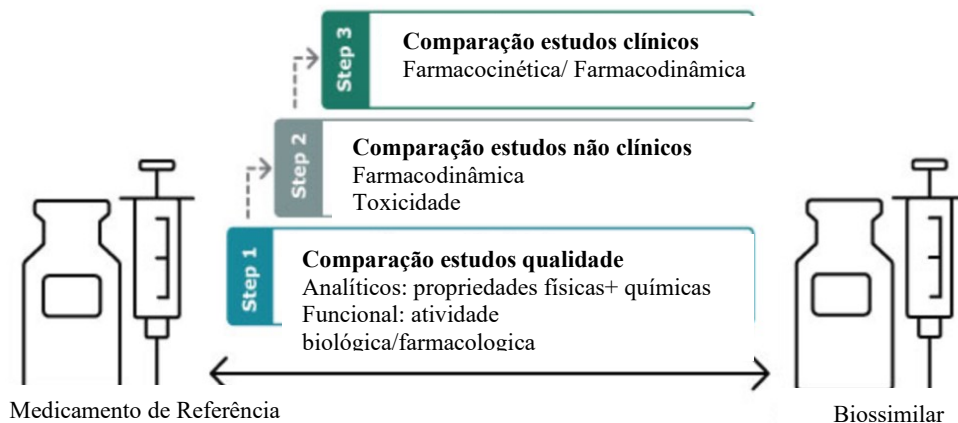


Figura 10: Desenvolvimento de biossimilar em comparação com o medicamento de referência. Adaptado de (EMA, 2017a)

4. Perspetivas futuras na indústria biofarmacêutica:

4.1. Terapêutica mRNA:

A utilização de RNA mensageiro (mRNA) começa a ser investigada por apresentar vantagens em comparação com o ADN na abordagem da terapia genética. Uma das vantagens do mRNA é que a sua atividade ser temporária sendo mais fácil de controlar, permitindo assim uma alta flexibilidade e uma ampla atividade terapêutica (Ugur et al., 2014).

Ao contrário de ADN, o mRNA não se integra com o genoma, reduzindo o risco de mutagénese e carcinogénese, melhorando a segurança na aplicação clínica. Outra vantagem que a tecnologia mRNA apresenta é o facto de a sua ação ocorrer no citoplasma, ultrapassando a necessidade de entregar o mRNA ao núcleo, uma grande barreira nos medicamentos baseados em vetores (Ibba et al., 2021).

Para o sucesso desta aplicação é necessário uma compreensão mais aprofundada da função e do perfil farmacológico dos medicamentos baseados em mRNA e o desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármaco à célula. Deste modo existe um aumento de utilização de partículas como os polímeros, lípidos e péptidos (Patil et al., 2019).

A utilização de terapias e vacinas baseadas em mRNA estão a emergir como uma nova classe de medicamentos e têm revolucionado o tratamento de várias doenças incluindo a oncologia e doenças infecciosas (Fenge et al., 2020).

Este tipo de terapêutica tem também atraído muito atenção nas áreas associadas a doenças genéticas, degenerativas e também na vacinação.

A recente utilização da abordagem baseada em tecnologia mRNA também permitiu uma resposta mais rápida a surtos/pandemias como foi notório no desenvolvimento da vacina mRNA contra a COVID-19 (L. A. Jackson et al., 2020).

Devido aos recentes avanços desta tecnologia, tem havido um grande interesse para o uso de vacinas mRNA para doenças infecciosas.

O mRNA é obtido através da transcrição do molde de ADN sintetizado, a partir desse modelo genético criado é possível replicar. O fabrico de vacinas mRNA é possível em semanas a partir do momento que a sequência de antígenos se torna disponível. A

utilização desta tecnologia apresenta inúmeras vantagens a nível de segurança, eficácia e produção em comparação com outras abordagens mais convencionais.

A utilização de mRNA em vacinas não apresenta os mesmos riscos, uma vez que não são utilizados elementos infecciosos e não existe o risco de integração no genoma da célula hospedeira(Kowalzik et al., 2021).

Deste modo, as vacinas mRNA podem ser classificadas como convencionais, não replicantes, e auto-amplificadoras, também referido como *self-amplifying*.

Para as vacinas não replicantes a estrutura do mRNA é de pequeno tamanho, simples e sem proteínas adicionais.

As vacinas auto-amplificadoras têm sido estudadas sobretudo para estratégias de vacinação ativa para prevenção de doenças infecciosas, em que as células do hospedeiro produzem um antígeno patogénico codificado em saRNA (*self-amplifying RNA*) de modo a produzir uma resposta imunitária humoral e celular(Kowalzik et al., 2021) (A. K. Blakney et al., 2021).

As vacinas com recurso a saRNA demonstram induzir mais síntese proteica durante um período mais longo e uma resposta imunitária maior quando comparado com mRNA não replicante(Brito et al., 2014).

Embora, o mRNA convencional e não replicante produzem eficazmente respostas imunitárias, estes apresentam um tempo de semivida mais curto, quando comparado com o mRNA auto amplificante, como representado na figura 11 (N. A. C. Jackson et al., 2020).

No entanto, como a estrutura do saRNA é maior do que a não replicante de mRNA, torna a produção e a estabilidade mais desafiante e possivelmente mais limitações na incorporação por exemplo de uma vacina(Kowalski, et al.,2019).

Este saRNA é um tipo de RNA que tem muitas semelhanças estruturais com o mRNA. A principal diferença é que o saRNA é ser uma molécula muito maior, pois codifica quatro proteínas extra para além do antígeno ou gene de interesse. A replicação permite a amplificação do RNA original quando chega à célula alvo, produzindo uma quantidade muito maior de proteínas, com uma dose mínima.(A. Blakney et al., 2021) O avanço recente das vacinas saRNA contra doenças infecciosas incluem o desenvolvimento de vacinas contra uma variedade de agentes virais tais como: SARS-COV-2, vírus respiratório sincicial e Influenza(Samsa et al. 2019).

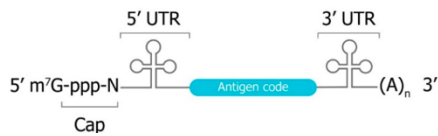
A . mRNA convencional não amplificante**B . mRNA *self-amplifying* (replicação)**

Figura 11: Comparação da estrutura molecular do mRNA com o saRNA. Adaptado de (A. K. Blakney et al., 2021)

4.1.1. Aplicações clínicas:Anticorpos Monoclonais:

Uma vez que os anticorpos monoclonais são dispendiosos na sua produção, a tecnologia mRNA pode ser uma alternativa.

Têm sido realizados estudos na qual se utiliza mRNA codificado contra vírus influenza, sendo o atual problema a dosagem. Sendo esta uma estratégia vantajosa para doenças infecciosas na qual é utilizado um anticorpo neutralizante, também esta técnica poderá ser utilizada em tratamentos que utilizam anticorpos monoclonais contra cânceros ou doenças raras(Kose et al., 2019).

Oncologia:

A utilização de vacinas contra o cancro envolve a indução de respostas de células T tumorais potencialmente capazes de rejeição tumoral, fornecendo antígenos cancerígenos no contexto de imunostimulação. Algumas das vacinas contra o cancro que têm como célula alvo os antígenos expostos à superfície de forma a induzir uma resposta das células B do tumor(Beck et al., 2021).

A viabilidade da vacinação contra o cancro baseada na tecnologia mRNA foi demonstrada pela primeira vez há vinte e cinco anos.(Boczkowski et al.,1996)

Desde então, vários estudos de ensaios pré-clínicos, para a vacinação anticancerígena, nomeadamente através de células dendríticas. As células dendríticas funcionam como um vetor que está carregado com mRNA sendo depois injetado num linfócito particular

ou nódulo. A utilização destas células requer que se isolem as células hematopoiéticas ou monócitos de uma amostra de sangue. Estas células são depois sujeitas a processos de diferenciação, sendo depois escolhido o tumor-antígeno(Perez et al., 2019).

Vacinas mRNA:

As vacinas baseadas na tecnologia mRNA têm vários benefícios em relação a outro tipo de vacinas. As vacinas mRNA têm elevada precisão e por isso, exprimem um antígeno específico que leva à produção de uma resposta imunitária. Para além disso, as modificações nucleotídicas na sequência mRNA reduz a capacidade inflamatória, e por essa razão esta abordagem torna-se mais segura(Fang et al., 2022).

Embora apresentem benefícios as vacinas mRNA, estão associadas a vários desafios nomeadamente relacionado com o sistema de entrega na célula. O desenvolvimento de uma entrega à célula eficiente continua a ser uma área de investigação. A escolha do sistema é essencial para determinar a eficácia da vacina, assim existem vários tipos de formulações atualmente em decurso(Zeng et al.,2020).

As formulações destas vacinas contêm maioritariamente polímeros, tais como protamina, e lípidos com ou sem derivados de polietilenoglicol (PEG), para permitir a mistura com mRNA através de interações electrostáticas e condensação de moléculas de RNA(Zeng et al., 2020).

Dos vetores mais utilizados destacam-se as nanopartículas lipídicas, como exemplo os lipossomas. Estas nanopartículas correspondem a formulações de mRNA baseadas numa mistura de colesterol, ionizáveis e derivadas de PEG, como representado na figura 12 (Guan et al.,2017).

Quanto à estrutura das nanopartículas lipídicas estas são constituídas por cabeças hidrofílicas e caudas hidrofóbicas unidas através de ligações éster, éter, e amida que determinam a biodegradação do composto.

Os grupos hidrofílicos mais frequentemente utilizados são as aminas primárias, secundárias e terciárias ou sais de amónio quaternário. As caudas hidrofóbicas são principalmente constituídas por componentes hidrofóbicos, e esteroides. Desta forma, criam-se complexos eletrostáticos com o mRNA levando à formação de lipossomas(Aldosari et al.,2021).

Este tipo de nanopartículas administradas por via intramuscular ganham atenção, uma vez que foi utilizado nas duas primeiras (COMIRNATY® e Spikevax®) contra o

SARS-COV-2, que demonstram a sua eficácia contra a COVID-19(Mulligan et al., 2020; Sahin et al., 2020).

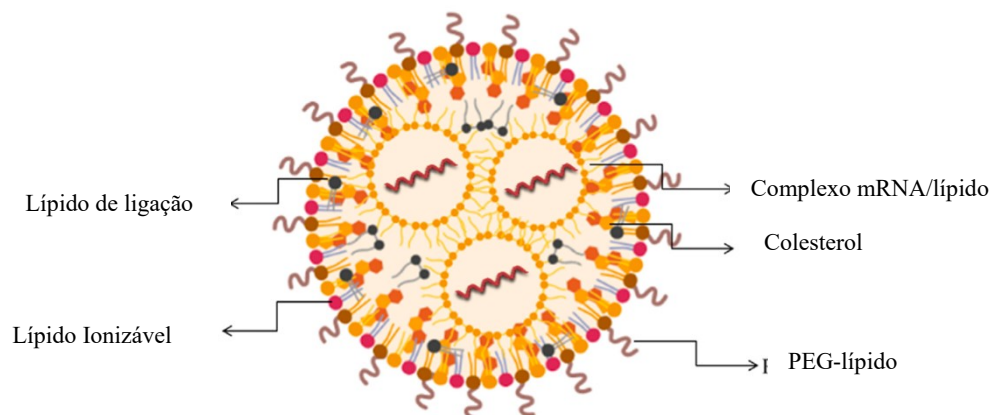


Figura 12: Representação de uma nanopartícula lipídica. Adaptado de (Ibba et al., 2021)

Embora as nanopartículas lipídicas sejam os sistemas de veiculação de fármaco à célula mais avançados, os polímeros também têm sido amplamente estudados. Dos vetores poliméricos mais utilizados destacam-se os polímeros catiónicos como a polietilenoimina. Estes polímeros cobrem a carga negativa do mRNA permitindo a absorção celular por endocitose e saída por via endossômica(Maugeri et al., 2019). Porém a utilização de polímeros é limitada devido à toxicidade associada principalmente à interação com proteínas séricas como por exemplo a albumina. Nos últimos anos, foram dedicados esforços de modo a desenvolver diferentes formulações na polietilenoimina de modo a melhorar a segurança e eficácia dos sistemas de mRNA (M. Li et al., 2017).

Para além da polietilenoimina, outros materiais poliméricos têm sido explorados, nomeadamente nano micelas poliméricas contendo mRNA no núcleo rodeado por uma camada de PEG(Crowley et al.,2019).

Para além dos vetores poliméricos e das nanopartículas lipídicas, é possível fornecer mRNA vetores à base de péptidos. Estes sistemas de distribuição são altamente biocompatíveis, devido à sua composição química. A protamina é um exemplo de um péptido que tem na sua composição arginina que permite fazer interações electrostáticas com o mRNA permitindo assim proteger da degradação(Jarzebska et al., 2020).

Em suma, o desenvolvimento e estratégia deste tipo de sistemas apresentam-se com um dos desafios para acelerar o desenvolvimento clínico terapêutico do mRNA, uma vez

que estes sistemas de veiculação de fármaco à célula necessitam de ser específicos à célula alvo reduzindo os efeitos indesejados(Ibba et al., 2021).

4.2.Terapia bacteriofágica:

4.2.1. Aspectos gerais:

O tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias patogênicas tem sido baseado no uso de antibióticos. No entanto, a antibioterapia de forma massiva tem se tornado progressivamente menos eficaz, devido ao desenvolvimento de resistências bacterianas. A resistência aos antibióticos apresenta-se como uma ameaça à saúde humana(Harada et al., 2018).

As bactérias oportunistas resistentes aos antibióticos são uma questão séria e preocupante sobretudo a nível hospitalar, as bactérias altamente resistentes são geralmente gram positivas como *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, mas também por bactérias gram negativas tais como, *Pseudomonas aeruginosa*, e outras enterobactérias(Knoll & Mylonakis, 2014).

Para combater esta problemática uma alternativa passa pela utilização de bacteriófagos. Os bacteriófagos são vírus que infetam bactérias utilizando mecanismos celulares de replicação. Embora os bacteriófagos tenham sido amplamente utilizados em diferentes áreas como por exemplo veterinária, segurança alimentar, tratamento de água residuais; a sua utilização como alternativa aos antibióticos tem atraído uma atenção considerável por parte comunidade científica e médica(Sharma et al., 2017).

Os fagos foram identificados pela primeira vez em 1896 por Ernest Hankin, que reportava propriedades anti cólera nas águas dos rios indianos. Em 1917 Félix d'Herelle observou o fenómeno de um fago em cultura de bactérias que causam disenteria, da qual se formaram zonas claras e pequenas, que ele inicialmente denominou por placas que resultavam de um vírus a infetar uma bactéria. Desta observação surgiu o nome de bacteriófagos, ou seja, a junção de bactérias e fagos(Orlova et al., 2012).

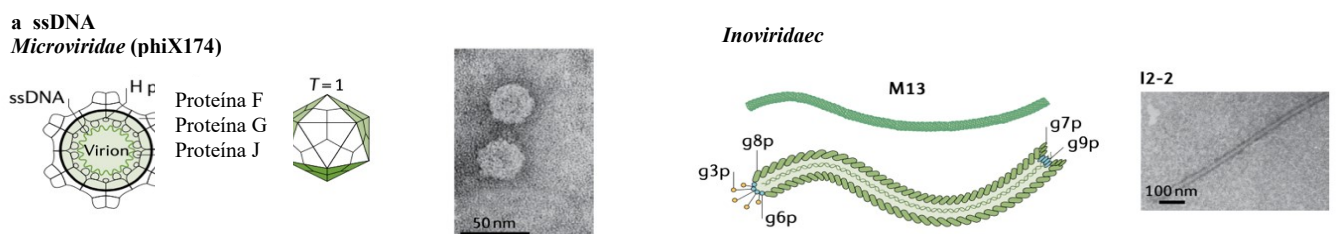
A utilização de bacteriófagos apresenta vantagens como, (1) a capacidade de os fagos aumentarem o seu número quando o hospedeiro está presente; (2) os bacteriófagos determinam a sua própria dose através de uma auto dosagem, o que evita a necessidade de administração repetida de fagos no local de tratamento; (3) os fagos apresentam uma

vantagem sobre os antibióticos de largo espectro, uma vez que, apresentam uma natureza específica, os fagos infetam apenas algumas estirpes bacterianas deixando todas as outras intactas e inatas; (4) os fagos podem usar-se sozinhos ou em conjunto de modo a alargarem o seu espectro(Hyman et al., 2019).

Para ser possível aproximar a terapia bacteriofágica do mercado, é necessário desenvolver processos de fabrico adequados à escala industrial, outro aspeto importante é a investigação sobre processos de fabrico de fagos eficazes em termos de custos(João et al.,2021).

4.2.2. Caraterização biológica:

Os bacteriófagos são constituídos pela partícula típica do fago que compreende uma cápsula proteica que envolve um genoma do ácido nucleico (ADN ou RNA). Pode existir também elementos adicionais que permitem a interação entre o fago e a bactéria, nomeadamente uma cauda em espiral ou uma cauda com fibras salientes. Os bacteriófagos que apresentam fibras salientes exibem proteínas que reconhecem e ligam recetores específicos na superfície da membrana bacteriana(Harada et al., 2018). Quanto á sua estrutura os fagos podem ser classificados como fagos de cauda, fagos icosaédricos, e fagos polimórficos como representados na figura 13. Os genomas dos fagos são compostos por ADN ou RNA que podem ser em cadeia dupla ou cadeia simples. Este material genético é mantido numa cápsula que pode ser poliédrico (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* e *Cystoviridae*), filamentoso (*Inoviridae*), polimórfico (*Plasmaviridae*) ou ligado a uma cauda. Até à data a maioria dos fagos são compostos por cauda(Dion et al., 2020).



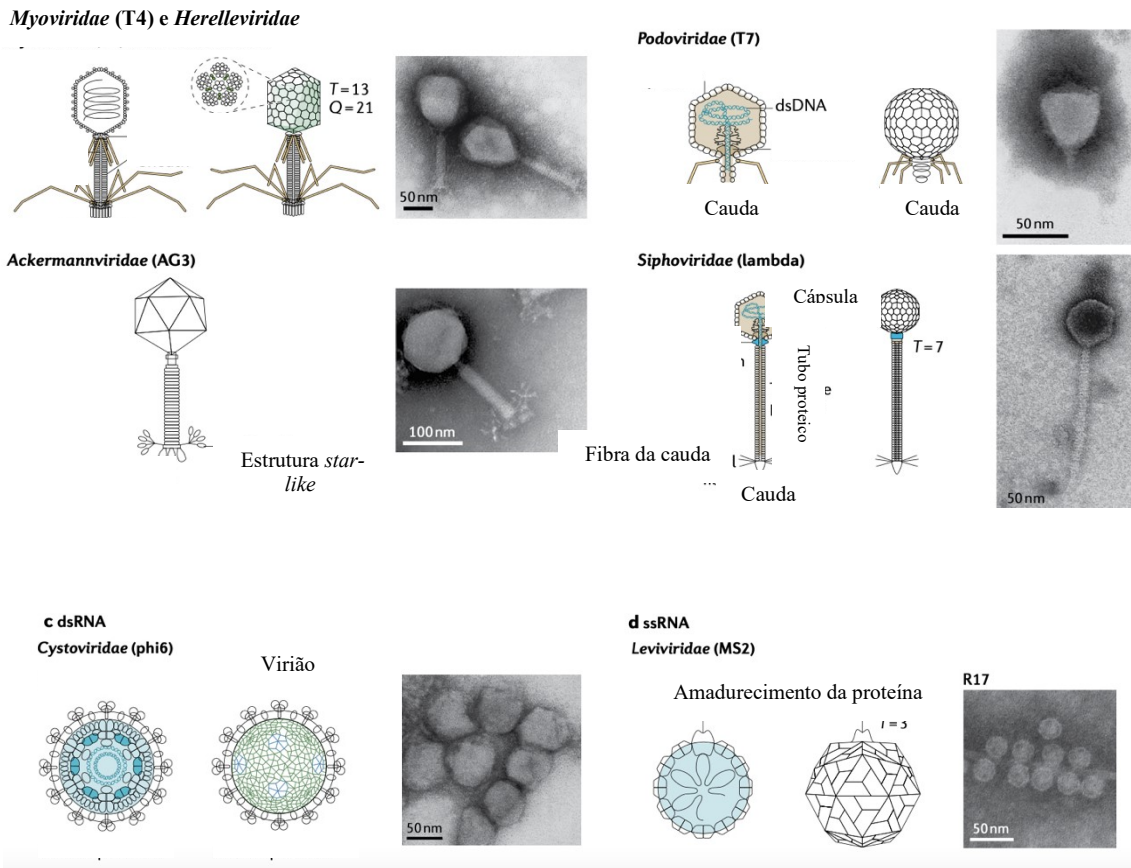


Figura 13: Comparação entre as várias estruturas de fagos. Adaptado de (Dion et al., 2020)

Os fagos compostos por cauda são altamente sofisticados com capacidade para desenvolverem ferramentas e mecanismos para superar eficazmente todas as barreiras da camada que envolve as células bacterianas, em duas etapas cruciais: ciclo de replicação, ou seja, a entrada de vírus em bactérias e restantes viriões que escapam às células infetadas (Fernandes et al., 2018).

4.2.3. Desenvolvimento de fagos:

Até ao momento nenhum fago foi aprovado para comercialização pela Agência Europeia do Medicamento nem pela Food and Drug Administration, sendo que o número de ensaios clínicos autorizados até à data permanecem limitados. No entanto, em setembro de 2020 durante a pandemia de SARS-COV-2 uma empresa norte americana decidiu tratar oito pacientes com coinfeção de COVID-19 e pneumonia, à qual a FDA autorizou um ensaio clínico, mas apenas para estirpes como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. O resultado deste ensaio clínico ainda não foi divulgado (Wu et al., 2022).

Para além dos ensaios clínicos que se têm realizado, a utilização de bacteriófagos já acontece por parte de países da Europa Oriental tais como Rússia, Geórgia e Polónia. O Instituto de bacteriófagos, microbiologia e virologia da Geórgia é uma das instituições mais antigas onde a terapêutica com bacteriófagos tem sido utilizada em doenças bacterianas relacionadas com urologia, ginecologia, medicina interna e pediatria. Mais de 95% apresenta melhorias e recuperação significativa após a terapia bacteriófaga com efeitos adversos quase nulos (Kutateladze et al., 2015).

Atualmente ainda não existe regulamentação específica para terapia bacteriófaga. Os bacteriófagos são classificados como medicamentos biológicos quer pela EMA quer pela FDA. Para além disso foi estabelecido que os fagos naturais não são classificados como um medicamento de terapia avançada e que os ácidos nucleicos recombinantes de expressão dos fagos não são categorizados como terapia genética (Brives et al., 2020). Contudo qualquer produto biológico, da qual se incluem os fagos devem ser fabricados de acordo com as regras atuais de boas práticas de fabrico (GMP), de modo a assegurar a qualidade do produto final. Para além disso, os fagos devem demonstrar segurança e eficácia durante todas as fases de ensaios clínicos (Brives et al., 2020).

As formulações terapêuticas irão por norma conter um cocktail de diferentes fagos de modo a aumentar o espectro de atividade e evitar a seleção de bactérias resistentes. Quanto à administração destes fagos irá depender do tipo de infeção, de acordo com os estudos mais recentes as patologias estendem-se desde feridas abertas a lesões causadas por queimaduras passando por patologias gastrointestinais (Jault et al., 2019). Cada fago presente nos *cocktails* devem ser caracterizados, produzidos e purificados individualmente. Como outros biológicos, os fagos têm uma produção que envolve uma

série de atividades que são desenvolvidas com o objetivo de produzir um determinado número de partículas biologicamente ativas. Estas atividades podem ser agrupadas em processos de *upstream* e *downstream* (Pirnay et al., 2018).

Biológicos complexos como os fagos são intrinsecamente variáveis em termos de composição, estabilidade e atividade biológica. Assim, é preciso uma caracterização completa para que o produto final obtido possa demonstrar que um determinado lote tenha: (1) consistência em termos de composição, (2) livre de impurezas e contaminantes como por exemplo endotoxinas, (3) apresenta uma estabilidade físico-química e biológica a longo prazo.(Pirnay et al., 2018).

Um dos pontos críticos na produção de fagos é a presença de endotoxinas, enquanto a administração oral ou dérmica destes fagos é considerada segura, a administração de injeção de baixas doses de endotoxinas (1 ng.mL⁻¹) é suficiente para causar reações imunitárias(Sarker et al., 2012).

Processo *Upstream*:

Cada lote de fagos deve ser fabricado a partir da mesma fonte de fago e célula para assegurar a reprodutibilidade e consistência tanto do processo como do produto. Este requisito de boas práticas de fabrico exige a produção, caracterização e armazenamento a frio. Para além disso, para serem totalmente conforme as regras de boas práticas de fabrico, todas as matérias utilizadas precisam de cumprir critérios específicos como não serem derivados de componentes animais(Bretonneau et al., 2020).

A produção de fagos por infecção de culturas de células bacterianas em biorreatores é uma tarefa difícil, uma vez que é fundamental uma investigação específica e aprofundada das interações e do mecanismo de replicação do par/fago da bactéria alvo(Jurač et al., 2019).

Os biorreatores para a produção de fagos podem ser utilizados em modo contínuo, semi contínuo, e descontínuo. Os processos em contínuo podem ultrapassar algumas das limitações das operações em lote. Neste modo de operação, o meio de cultura é continuamente fornecido, enquanto o meio gasto em células com células e fagos é continuamente retirado do biorreator. As principais vantagens incluem a maior produtividade, custos reduzidos, e maior facilidade de controlo, que contribui para uma

melhor qualidade e consistência do fago. Contudo, a criação de um processo contínuo de produção de fagos é um desafio e complexo (Jurač et al., 2019)(Rathore et al.,2015).

Processo *Downstream*:

O objetivo do processo de *downstream* é isolar, concentrar e purificar os fagos alvos de modo a obter um produto final que cumpra as especificações estabelecidas. O processo global deve compreender um número limitado de etapas curtas e de alto rendimento de forma a reduzir a complexidade e minimizar os custos. Para além disso não devem ser utilizados métodos que dependem de reagentes e agentes separadores de massa que não sejam considerados seguros pelas agências reguladoras, como por exemplo o cloreto de cério, gradiente de ultracentrifugação(Nasukawa et al., 2017).

Durante este processo para além dos fagos, o fluxo resultante irá conter quantidades variáveis de ADN, RNA e proteínas que devem ser removidos. Para este fim, são utilizadas combinações de operações unitárias que podem incluir a precipitação, e cromatografia. No final, a utilização de um tampão e a concentração será realizada para corresponder ao tampão específico e à concentração de fago necessário para o produto final (João et al., 2021).

4.2.4. Aplicações Terapêuticas:

A maioria dos estudos recentes da utilização de bacteriófagos como terapêutica centra-se nas infeções agudas. Nas infeções agudas, a infeção específica causadora da bactéria pode ser identificada através de métodos de diagnóstico. Nestes casos, os antimicrobianos de espectro estreito como os bacteriófagos podem ser uma alternativa adequada quando os microrganismos são resistentes aos antibióticos. Um exemplo disto é nos casos de infeção do trato urinário em que uma proporção significativa de casos é causada por *Escherichia coli* com fatores de virulência específicos.(Ulett et al., 2013) Estudos em animais são outro exemplo que demonstram que o fago pode ser eficaz em certos casos, como por exemplo infeções respiratórias agudas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e no tratamento de infeções sistémicas causadas por *Staphylococcus aureus*(Capparelli et al., 2011).

Outros estudos in vivo de fagos sugerem que o uso de bacteriófagos pode ser benéfico no tratamento de infeções pulmonares resistentes a antibióticos (por exemplo na fibrose

cística e pneumonia)(Singla et al., 2015) , infecções tópicas e de feridas (McVay et al., 2007) e infecções gastrointestinais(Sarker et al., 2016a).

Infeções Respiratórias:

A utilização de bacteriófagos por inalação foi reportada na década de 1960 e a sua utilização foi continuamente melhorada nos países da Europa Oriental como a Rússia e a Polónia (Hoe et al., 2013).

Com o recente interesse na terapêutica de bacteriófagos, tem havido esforços significativos na sua compreensão e desenvolvimento de sistemas de formulação.

Formular bacteriófagos em sistemas inalatórios é um duplo desafio que requer tanto o desempenho aerossol como a estabilidade bioquímica dos fagos. O progresso tem sido dificultado pela falta de compreensão do mecanismo responsável pela estabilização dos fagos tanto em formulações líquidas como sólidas (Chang et al., 2018).

A maioria da investigação de fagos para infecções respiratórias tem sido focada sobretudo no fornecimento de formulações intranasais e nebulizações(K. Liu et al., 2016).

Isto deve-se principalmente ao facto de as preparações líquidas de fago serem relativamente simples com o pouco desenvolvimento de formulação necessária. As formulações de fagos líquidos são facilmente aerossolizadas em gotículas finas utilizado na maioria dos nebulizadores comercialmente disponíveis. Até ao momento recomenda-se a utilização de produtos contendo vários fagos com diferentes mecanismos de infeção contra o agente patogénico alvo, para se conseguir uma melhor terapêutica, reduzindo a probabilidade de células resistentes(Chang et al., 2018).

Infeções Gastrointestinais:

O papel dos bacteriófagos na maioria das doenças gastrointestinais permanece desconhecido. Muitos estudos centram-se no papel que desempenham na doença inflamatória intestinal, como a doença de Crohn e colite ulcerosa (Babickova et al., 2015; Łusiak-Szelachowska et al., 2017).

Os bacteriófagos conseguem induzir a lise bacteriana que leva à libertação de ácidos nucleicos, proteínas e lípidos que são fontes estimulantes de estímulos pró-inflamatórios e são capazes de provocar alterações na doença de Crohn e colite ulcerosa. Por norma, os bacteriófagos possuem um estreito espectro de ação tanto sobre as células bacterianas como no sistema imunitário(Kommineni et al. 2015; Norman et al. 2015).

Um recente ensaio clínico realizado em humanos para um fago de terapia oral em 120 crianças com episódios de diarreia causada por bactérias no Bangladesh, não detetou nenhum efeito adverso, mas não conseguiu atingir toda a porção intestinal ou melhorar os sintomas. Isto pode ser resultado de uma quantidade insuficiente de fago e/ou bactéria *Escherichia coli* insuficiente. No entanto, é de realçar que os bacteriófagos fazem parte da microbiota intestinal humana e porque são altamente específicos, é provável que tenham um perfil de segurança melhor do que a terapia antibiótica (Sarker et al., 2016b).

4.3. Terapia genética e celular:

A terapia genética engloba múltiplas abordagens para manipular material genético, de forma a tratar doenças específicas. Esta terapia pode ser alcançada com a substituição de um gene mutante por um gene saudável, a introdução de um novo gene para ajudar a combater a doença ou a edição de um gene existente para alterar a sua função (Steffin et al., 2019).

Do ponto de vista clínico, a terapia genética tem como potencial de inverter as sequelas clínicas de uma condição, um conceito que durante algum tempo foi recebido com ceticismo. Na área da pediatria, estas estratégias tem um impacto especial, uma vez que muitas doenças infantis eram consideradas incuráveis antes das recentes inovações da terapia genética (Steffin et al., 2019).

A terapia genética pode ser dividida em 2 tipos principais: linha germinal e somática. Na linha somática, os genes somáticos são introduzidos nas células somáticas dos pacientes, e desse modo a terapia é limitada ao paciente em causa e não pode ser herdada ou transmitida. Quanto à linha germinal esta envolve a introdução de um novo gene em espermatozoides ou óvulos, o que permite que as alterações introduzidas sejam herdadas ou transmitidas. A terapia genética recorrendo à linha germinal é menos comum, e também mais desafiante devido à capacidade de transmissão de efeitos terapêuticos.

Deste modo, a terapia genética utilizando a linha somática tem tido mais sucesso clínico até à data (Smith et al., 2017).

Nos últimos cinco anos houve um aumento de desenvolvimento na área da terapia genética e celular, chegando ao mercado as primeiras terapias depois de décadas de esforço. Foram aprovadas três terapias com oligonucleótidos (Spinraza, Exondys 51, Vyondys 53), três terapias celulares (Kymriah, Yescarta, Tescartus), e duas terapias genéticas in vivo (Luxturna e Zolgensma) sendo que mais terapias se aproximam do mercado nos próximos anos, como representado na figura 14.

Apesar destas terapêuticas terem impacto na vida dos doentes afetados, tem também um grande impacto na forma como demonstram serem a base para futuros tratamentos (Pasi et al., 2020)(Mendell et al., 2020).

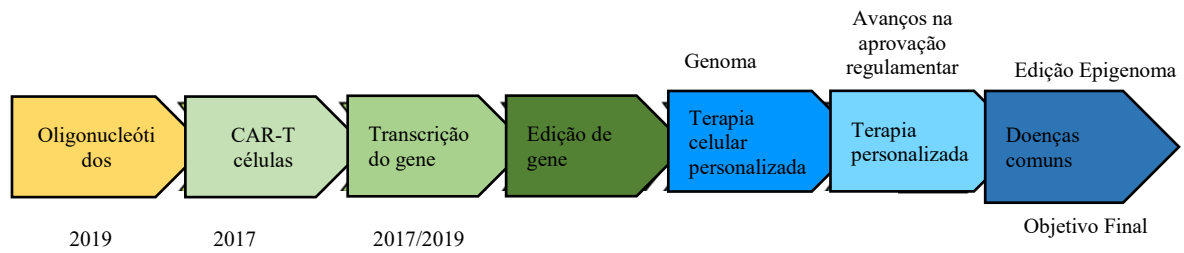


Figura 14: Tratamentos aprovados e respetivo ano de aprovação, bem como terapias em investigação. Adaptado de (Bulaklak et al., 2020)

4.3.1. Terapias oligonucleótidas:

Spinraza®:

Classificada como uma doença rara, a atrofia muscular espinal é uma condição genética que afeta principalmente os neurónios motores e é a principal causa genética de morte em bebés de todo o mundo. Mais de trinta anos de investigação e o esforço de várias partes interessadas trouxe mais conhecimento sobre esta patologia e levou à aprovação da primeira terapia de sempre para a atrofia muscular espinal, o fármaco tem como nome

Spinraza®.

Os resultados dos testes clínicos iniciais e a aprovação deste fármaco não só encoraja os pacientes, mas também toda a comunidade científica. Para além disso é um caso de sucesso para a investigação de doenças raras (Prakash et al., 2017).

Nos Estados Unidos a FDA aprovou em 2016 a utilização de Spinraza®, produzido pela farmacêutica Biogen®, este medicamento de terapia genética está indicado para dois tipos de atrofia muscular espinal. A FDA colaborou junto da empresa farmacêutica durante o desenvolvimento do medicamento de forma a conseguir implementar a análise necessária para a aprovação. A eficácia foi demonstrada num ensaio de cento e doze doentes com atrofia muscular espinal infantil que foram diagnosticados antes dos seis meses na altura da primeira dose do fármaco. O ensaio foi aleatório sendo que o grupo de doentes em que foi administrado o medicamento é o dobro do grupo placebo. No final o ensaio avaliou a percentagem de doentes com melhorias na função motora (FDA , 2016).

O Spinraza® é composto por oligonucleótidos anti senso, ou seja, nucleótidos curtos que são capazes de modificar a expressão genética e o processo de splicing do mRNA no sistema nervoso. Estes nucleótidos são constituídos por dez a trinta nucleótidos de comprimento que ligam RNAs celulares através de emparelhamento e complementaridade das bases. A especificidade da sequência de ligação destes oligonucleótidos resulta numa elevada eficácia e baixos efeitos adversos. Os oligonucleótidos podem ter como alvo proteínas que tenham sido consideradas “não compatíveis”, regulando diretamente a sua expressão (Hill et al., 2021).

Exondys 51® / Vyondys 53®:

O Exondys 51® também conhecido como Eteplirsén é composto por oligonucleótidos está indicado para a patologia que causa distrofia muscular de Duchenne. Esta doença está ligada ao cromossoma x e é encontrada em 1/3,500 – 1/5,000 nascimentos masculinos e caracteriza-se por mutações tais como deleções, e duplicações (Robinson-Hamm et al., 2016).

As crianças e jovens que sofrem desta distrofia perdem progressivamente a função neuromuscular à medida que envelhecem o que culmina com uma incapacidade de andar na adolescência.

Cerca de 13% dos doentes com distrofia muscular de Duchenne não apresentam o exão na posição cinquenta e um. Com este fármaco o objetivo de se direccionar nesta região de modo que a proteína distrofina não perca a função (Aartsma-Rus et al., 2014).

A aprovação deste fármaco foi controversa, uma vez que, o painel de reguladores da FDA não ficou convencido pois a aprovação foi feita com base num ensaio onde participaram onze doentes. Devido ao reduzido número de doentes a FDA pediu novo estudo com mais doentes, da qual a empresa farmacêutica concordou, de modo, a garantir que era produzida proteína suficiente nas células musculares (Angus Liu et al., 2021).

Em dezembro de 2019, outro oligonucleótido designado por golodirsén (Vyondys 53®), foi aprovado pela FDA também com indicação para distrofia muscular de Duchenne, em doentes que têm confirmado a mutação no gene que leva o exão 53 a saltar (fda & cder et al., 2019).

Esta indicação foi aprovada sob aprovação acelerada, com base num aumento de produção de distrofina no músculo esquelético observado nos doentes. A aprovação

continuada deste medicamento pode estar dependente da verificação de um benefício em ensaios confirmatórios. Este recente lançamento do Vyondys 53® para a comunidade neuromuscular mostra um caminho promissor, no entanto este tipo de terapia genética deve ser acompanhado de perto para avaliar a segurança e eficácia a longo prazo (Iftikhar et al. 2021).

4.3.2. Células CAR-T:

As células estaminais são células não especializadas no corpo humano, são capazes de se especializar em qualquer célula num organismo e têm a capacidade de autorrenovação. As células estaminais existem tanto nos embriões como em células adultas. As células estaminais totipotentes são capazes de se dividir e diferenciar em células de todo o organismo. Para além das células totipotentes existem também pluripotentes e multipotentes, a diferença encontra-se na capacidade de diferenciação e a localização (Zakrzewski et al., 2019).

O potencial transformador das células como agentes terapêuticos foi realizada pela primeira vez nos meados do século XX, com a disponibilidade generalizada das transfusões de glóbulos vermelhos, melhorou drasticamente nos resultados pós trauma, cirurgia e outras condições médicas (Weber et al., 2020a).

Na era moderna, os avanços fundamentais em imunologia, biologia molecular, virologia e na engenharia genética, levaram ao progresso bastante promissor no desenvolvimento de terapias celulares imunológicas; como as células CART- T (Weber et al., 2020a).

As células CAR-T consistem num domínio ligante extracelular, composto por um fragmento variável de cadeia única, um domínio espaçador, um domínio transmembrana, e um ou mais domínios citoplasmáticos. Estas células apresentam quatro gerações, sendo que a primeira geração contém um único domínio ativador que na maioria dos casos é um domínio citoplasmático, como representado na figura 15. Os de segunda geração contêm geralmente um domínio ativador ligado a domínios co-estimuladores. A diferença entre gerações contribui para os mecanismos de sinalização da célula CAR-T, bem como a eventual eficácia e toxicidade (Jayaraman et al., 2020).

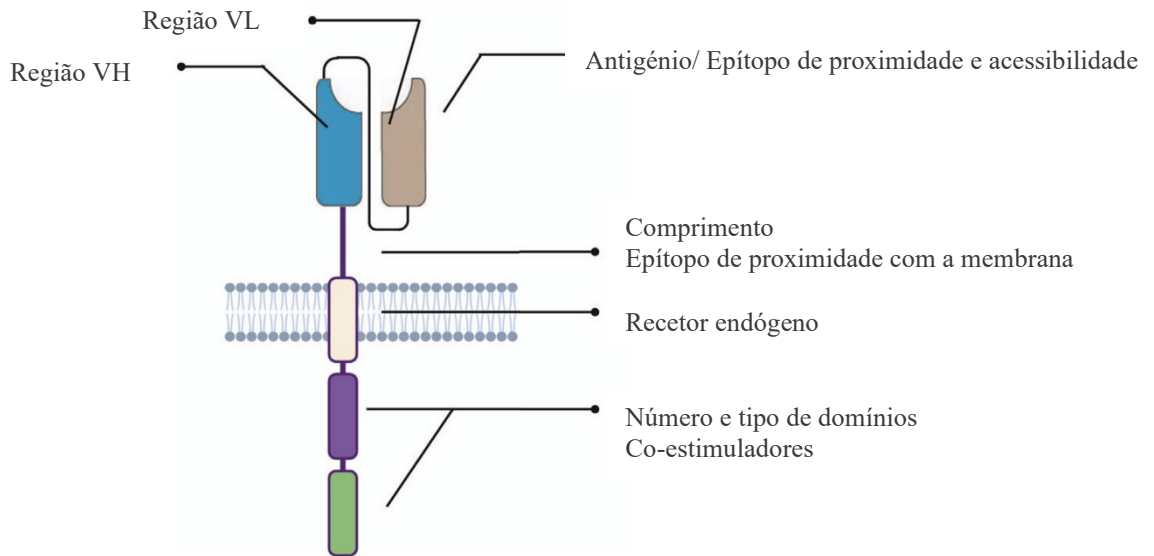


Figura 15: Representação de cada constituinte da célula CAR-T. Adaptado de(Jayaraman et al., 2020)

A compreensão entre a relação do sistema imunitário e as células tumorais proporcionaram o desenvolvimento acelerado de estratégias contra o cancro tais como, o rejuvenescimento da imunidade do hospedeiro, e o treino de células imunológicas contra as células cancerígenas. Aproximar células imunológicas contra células cancerígenas, quer através de terapêutica mediada por anticorpos quer por reintrodução de células imunológicas treinadas num doente com cancro são exemplos de imunoterapia oncológica (Klebanoff et al., 2012).

Uma vez que, as células tumorais utilizam vários mecanismos de fuga, a questão vital é como as células imunológicas podem ser geneticamente reprogramadas para reconhecer e eliminar células tumorais(D. Li et al., 2019).

Entre todas as terapias baseadas em células as CAR T são as visam células cancerígenas, esta tecnologia tornou-se um sucesso em áreas como hematologia oncológica. Em 2017 duas terapias celulares anti- CD19 CART-T foram aprovadas pela FDA, Kymriah, Novartis® e Yescarta, Kite Pharma® (Weber et al.,2020b).

O medicamento Kymriah da Novartis, tornou-se uma das primeiras terapias celulares a serem aprovadas pela EMA. Este medicamento corresponde a uma terapia autóloga, imunocelular do cancro que envolve a reprogramação de células T do próprio doente através de um recetor quimérico de antígenos CAR, de modo a identificar e eliminar células CD-19 (Ali et al., 2020).

Outro medicamento recorrendo a terapia celular foi o Yescarta, foi o segundo medicamento desta classe a ser aprovado no ano de 2017 pela FDA. O modo de ação centra-se na alteração genética de uma linha de células imunológicas de um doente de modo a torná-las mais eficazes na resposta contra as células tumorais. Este medicamento teve aprovação para o tratamento de doentes com linfoma não Hodgking que previamente não tinham respondido a quimioterapia convencional (Viardot et al., 2019).

Linfoma Hodgking e não Hodgking:

O linfoma Hodgking trata-se de uma neoplasia do sistema linfático, a doença manifesta-se em adolescentes e jovens adultos, mas também pode surgir em pessoas com 80 ou mais anos. O diagnóstico envolve sempre a biópsia imunohistoquímica de um nódulo. Os linfomas são compostos por células malignas de *Reed Sternberg* dentro de um extenso sistema inflamatório e de células imunes. As células *Reed Sternberg*, que derivam de células B, criam a sua própria rede de suporte tendo como funções a inibição da apoptose e a supressão da toxicidade de outras células (Brice et al., 2021). Quanto aos linfomas não Hodgking estes surgem de células linfócitos B maduras bem como de linfócitos T e células *natural killer* (NK). O linfoma não Hodgking desenvolve-se devido às alterações genéticas do ADN resultante da amplificação ou deleção (Bowzyk Al-Naeef et al., 2018).

A aplicação das células CAR-T em linfomas desta natureza deve-se ao facto de as células T poderem ser geneticamente modificadas *ex vivo* para direcionar antígenos a tumor. As células T podem ser manipuladas para expressar um novo recetor de células T (TCR) ou através de um recetor de antígeno quimérico (CAR) de modo a direcionar antígenos associados ao tumor (Shah et al., 2019).

Existem vários antígenos tumorais sob investigação clínica, no entanto a terapia recorrendo a células CAR-T contra o recetor CD19 em células B é clinicamente mais avançado. Este recetor CD19 corresponde a uma glicoproteína presente na superfície da célula B desde o desenvolvimento inicial até à diferenciação em células plasmáticas. A sua função normal está relacionada com a regulação da tradução de sinal através do recetor de células B (Scheuermann et al., 1995).

CD19 foi o primeiro alvo a ser investigado, dado à sua expressão restrita às células da linhagem B e por não ser encontrada na maioria dos tecidos normais.

Estas células anti-CD19 CAR-T (CAR-19-T) demonstraram eficácia significativa no tratamento de doentes com células B recidivas ou refratárias para linfomas malignos (Journal of Clinical Oncology et al., 2015)(Park et al., 2018).

Embora estas tecnologias se apresentem como promissoras e cada vez mais próximas dos doentes, ainda existem muitas dificuldades e lacunas sendo uma delas a produção de terapia celular, uma vez que os processos ótimos de fabrico da produção de células CART T consistem na colheita de células T e a seleção das mesmas (Robert set al., 2018).

Uma das limitações mais desafiantes da célula CAR-T é o desenvolvimento de resistência do tumor a antigénios. Embora inicialmente um único antigénio que vise as células CAR-T possa fornecer elevadas taxa de resposta, as células malignas de uma porção significativa de doentes tratados com esta células apresentam uma perda parcial da expressão antigénica alvo(Majzner et al.,2018).

Em suma, as células CAR são recetores sintéticos que consistem em quatro componentes principais: um fragmento variável de cadeia única, um domínio espaçador, um domínio transmembrana, e um ou mais domínios citoplasmáticos. As CAR-T revolucionaram a maneira como se trata doenças oncológicas, sobretudo cancros hematológicos como por exemplo linfoma de Hodgking e linfoma não Hodgking. No entanto, ainda persistem limitações para a evolução do uso destes medicamentos, sendo uma dessas limitações a seleção de antigénios é fundamental para a função das células CAR-T. As células tumorais podem ter a capacidade de regular os antigénios devido à pressão exercida pelas células CAR-T (Sternner et al., 2020).

Para além disso, mesmo com a utilização do antigénio específico, os efeitos fora do tumor alvo podem ocorrer e causar toxicidade associada.

Em tumores sólidos, obter células CAR-T que consigam movimentar-se e infiltrar-se no tumor é um desafio, com representado na figura 16. Este obstáculo pode ser agravado pelo ambiente imunossupressor de neoplasias que existe nas células.

Embora existam desafios associados a esta terapia, novas estratégias e soluções potenciais continuam a evoluir e podem permitir um caminho para futuras terapias mais eficazes e seguras(Sternner et al., 2020).

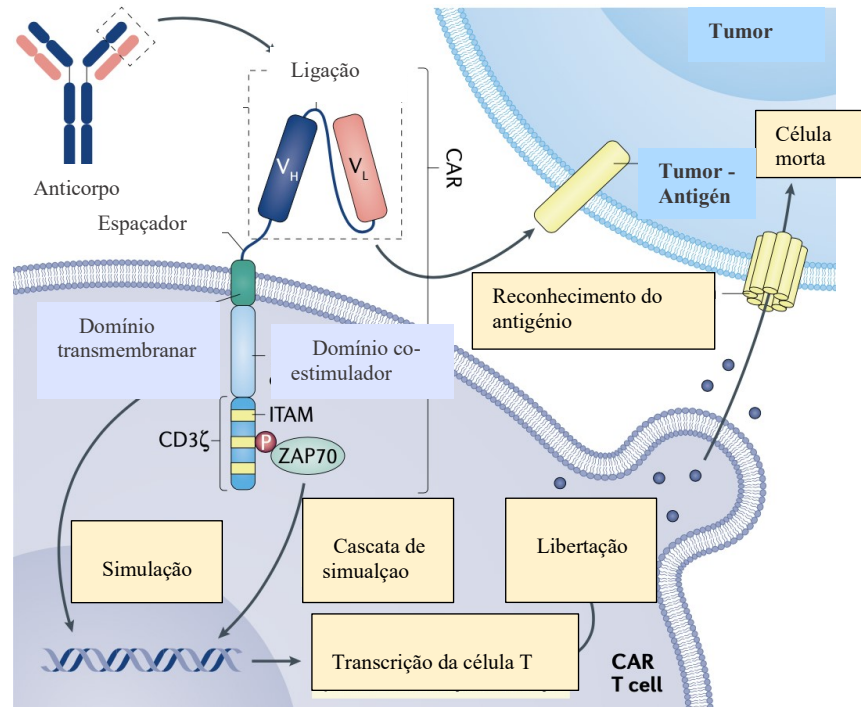


Figura 16: Representação do mecanismo da célula CAR-T de segunda geração. Adaptado de (Larson et al., 2021)

4.3.3. Tecnologia CRISPR:

O surgimento de tecnologias adaptadas a sequências capazes de corrigir, substituir e eliminar sequências específicas de ADN nas células transformou a indústria farmacêutica.

A tecnologia principal por de trás destes avanços são as nucleases direcionadas, que estimulam o processo de edição de genes introduzindo uma quebra na dupla cadeia de ADN, que por sua vez ativa as diferentes vias para reparar o ADN (Kim et al., 2014). Embora várias tecnologias tenham surgido no mercado para atuar neste sentido, a tecnologia CRISPR tem sido a escolha por parte da engenharia genética, uma vez que, os sistemas CRISPR são versáteis, eficientes e fáceis de usar(Cho et al.,2013).

A tecnologia CRISPR tradicional consiste em dois componentes: uma proteína CAS que cliva ácidos nucleicos e um único RNA guia (sgRNA) que se liga à proteína CAS e a direciona para uma sequência de ácido nucleico específica (Jinek et al., 2012).

O sistema CRISPR como importante ferramenta na edição de genomas, podem ser divididos em vários tipos de sistemas tais como; cas9 tipo II, cas12a tipo V, sendo estes os mais amplamente utilizados na engenharia genética e metabólica de bactérias.

As bactérias apresentam uma elevada taxa de crescimento, e para além disso são metabolicamente diversas, que produzem moléculas complexas que não se podem obter através de síntese química(Choi et al., 2016).

Com o desenvolvimento da engenharia genética e metabólica muitas linhagens de bactérias que apresentam elevada taxa de rendimento e têm sido utilizadas industrialmente.

Nos últimos anos os sistemas CRISPR associados a proteínas cas foram vastamente utilizados em engenharia genética de bactérias, o que tem promovido muito a sua utilização (Becker et al., 2020).

A forma como estes sistemas CRISPR chegam às células depende também do mecanismo de veiculação, existem três grandes grupos de como se pode fazer chegar a edição de genes até às células. Os métodos podem ser através de processos físicos, vetores virais e vetores não virais. Os métodos físicos mais comuns são a microinjeção, e correntes elétricas de alta voltagem, sendo esta última menos dependente do tipo de célula(Lino et al., 2018).

Quanto aos vetores virais estes podem ser através de adenovírus associados, e lentivírus, até ao momento os vetores virais são os que geram mais consenso na sua utilização e para além disso os mais comuns na técnica CRISPR/cas9.

A utilização de vetores não virais não é tão notório quando comparados com os vetores virais, no entanto têm sido investigados nomeadamente as nanopartículas lipídicas, pépticas, e nanopartículas de ouro (Lino et al., 2018).

CRISPR/cas9:

A tecnologia CRISPR cas-9 tem sido uma das mais estudadas, também esta é composta por dois componentes principais; sendo um deles a proteínas cas-9 uma endonuclease capaz de clivar o ADN, o outro elemento é a molécula de RNA guia (sgRNA), que forma um complexo com a proteína cas9 encaminhando para o local específico do genoma formando o emparelhamento das bases complementares com a sequência alvo, como representado na figura 17.(Doudna et al., 2014).

O sistema CRISPR/cas9 é originário de um componente do sistema imunitário bacteriano, onde existe a formação de memória para a resposta imune do hospedeiro. Várias variantes da cas9 foram identificadas de diferentes estirpes bacterianas, deste sistema as mais amplamente utilizadas são derivadas de *Streptococcus pyogenes* e expresso em *Escherichia coli* como proteína recombinante(Mout et al., 2017).

A tecnologia CRISPR cas9 apresenta várias aplicações tais como; tratamento com imunoterapia no cancro, manipulação da sequenciação do genoma cancerígeno, e mapeamento do epigenoma(Mollanoori et al., 2018).

A imunoterapia é uma terapêutica emergente com resultados clínicos promissores em tumores, uma das aplicações mais atrativas da edição do genoma recorrendo à utilização de CRISPR cas9 é a terapia genética sobretudo na formação de células recetores do antígeno T quimérico (CAR-T). Habitualmente as células T são recolhidas do doente e geneticamente modificadas, de modo a atacar antígenos cancerígenos e em seguida as células são transferidas de volta para o doente, sendo um passo crítico na terapia com células CAR-T.

Com a utilização do sistema CRISPR cas9 pode ser ampliado a utilização da terapia genética a mais doentes, uma vez que, este sistema consegue melhorar o funcionamento das células CAR-T através da interrupção dos genes que codificam para células T inibitórias (Qasim et al., 2015).

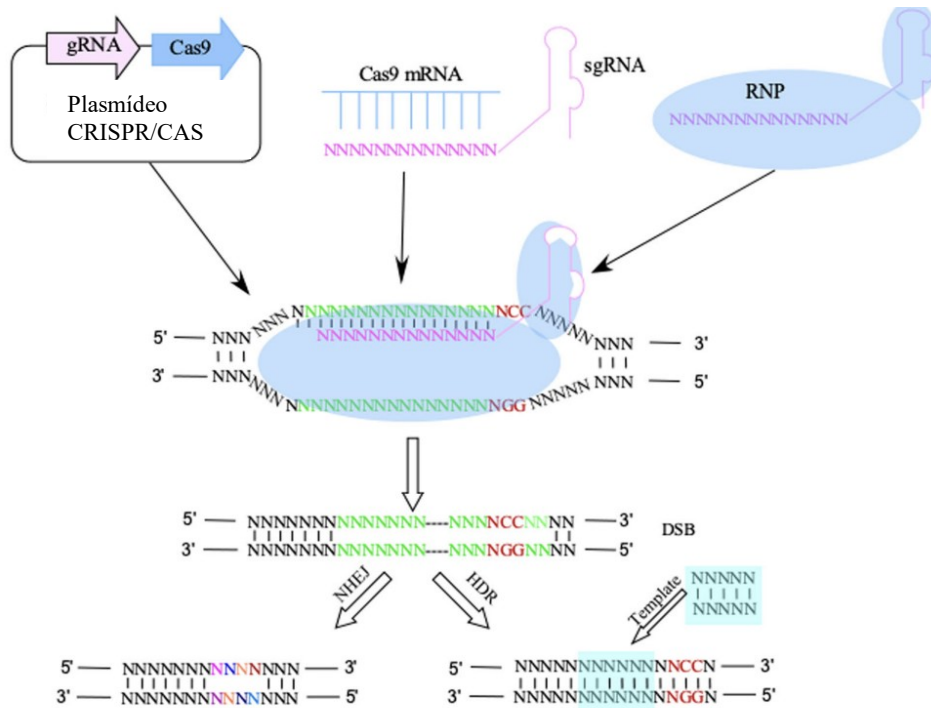


Figura 17: Representação do sistema CRISPR/cas9 baseado no método de plasmídeo e cas9. Adaptado de (Tian et al., 2019)

Limitações da Tecnologia CRISPR:

Apesar do progresso recente na utilização da edição de genes com recurso a CRISPR/cas para aplicações terapêuticas existem ainda muitos desafios, como por exemplo a eficácia da edição de genes, efeitos fora do alvo, e imunogenicidade. A eficácia da edição de genes é determinada por vários parâmetros, incluindo a sequência de sgRNA, a duração da exposição à nuclease e o mecanismo de veiculação à célula. Outro desafio na eficácia da edição de genes diz respeito a esta apresentar valores inferiores *in vivo* quando comparada com *in vitro*, devido à falta de mecanismo eficazes de entrega à célula alvo (Ran et al., 2015).

Para além disso, vários estudos abordam o facto da tecnologia CRISPR/cas 9 poder gerar inserções e deleções em *loci* indesejados devido à incompatibilidade da proteína cas9 com sgRNA. O risco de clivagem fora do alvo e especificidade reduzida está relacionada com a exposição mais longa da proteína cas, possivelmente resultando mutações indesejadas e toxicidade (Lattanzi et al. 2019; Senturk et al. 2017).

4.4. Biotecnologia industrial:

A biotecnologia industrial define-se como o uso de enzimas ou microrganismos para fabricar produtos de base biológica, em setores como os produtos químicos, alimentares e bioenergia. O uso de enzimas ou microrganismos são usados como sistemas naturais de modo a maximizar e otimizar as vias bioquímicas existentes usadas no fabrico (Clarke et al., 2020).

Este ramo depende principalmente do cultivo de diferentes tipos de bactérias, leveduras e fungos. As fermentações microbianas controladas e usadas por humanos existem desde o início da civilização para a produção de alimentos e bebida fermentadas (Nielsen et al., 2019).

Durante o século XX os primeiros processos de fermentação em escala industrial foram estabelecidos para a produção de produtos químicos tais como; o butanol, acetona, e ácido cítrico. A produção de ácido cítrico em 1919 por *Aspergillus niger*, foi um grande avanço pois foi o primeiro processo de fermentação aeróbica, esse avanço permitiu abrir caminho para a produção de penicilina em escala industrial durante a segunda guerra mundial (Nielsen et al., 2019).

Com a introdução da engenharia genética na década de 70, a indústria biotecnologia focou-se na produção de proteínas para o uso farmacêutico, a indústria biofarmacêutica cresceu substancialmente ao longo dos anos e a maioria dos medicamentos mais vendidos agora como insulinas e hormonas, são produzidos por fermentação recorrendo a culturas de células (Nielsen et al., 2013).

No início dos anos 2000 e com o surgimento de mais conhecimento na área da genómica, onde foi adquirida mais informação à cerca das células microbiológicas o que levou a uma melhor compreensão sobre as suas redes metabólicas e fisiológicas (di Bartolomeo et al., 2020).

Todos estes métodos até à engenharia metabólica que até hoje é utilizada, esta consiste na modificação genética direcionadas ao núcleo da célula com o objetivo de produzir novos químicos e/ou melhorar o produto.

Todas estas abordagens conceituais, computacionais e experimentais deram origem a fábricas de células usadas para a produção de produtos químicos, solventes, produtos farmacêuticos, nutracêuticos e antibióticos (Nielsen et al., 2019).

Assim, a biotecnologia industrial surge como um apoio à biotecnologia farmacêutica, visto que a biotecnologia industrial permite a otimização dos processos de medicamentos biológicos.

Um dos exemplos é a utilização de biotecnologia industrial para a produção de proteínas, uma importante classe de medicamentos onde se incluem os anticorpos monoclonais, proteínas grandes ou de fusão geralmente com pesos moleculares acima de 100KDa (Lagassé et al., 2017).

No entanto, são descritos vários desafios na produção em larga escala de anticorpos monoclonais, o desempenho de produção abaixo do ideal tem sido observado devido a condições que não são as ideais no fabrico destes medicamentos. Algumas das condições que afetam esta produção dizem respeito ao substrato usado, aos limites de oxigénio, ao stress celular associados a algumas estirpes, entre outros.

Recorrendo à engenharia metabólica podem ser melhorados alguns parâmetros, dado que tem a capacidade de aprimorar as proteínas terapêuticas, as leveduras e fungos filamentosos têm sido alternativas dado as suas características fisiológicas (J. Zhao et al., 2020).

Outra aplicação da biotecnologia industrial com relevância são os biomarcadores, estes têm a capacidade de transmitir melhor informação o rendimento durante a produção de anticorpos monoclonais (de Ruijter et al., 2018).

O objetivo principal da biologia sintética é otimizar o processo de conversão de substrato em produto e reduzir as vias metabólicas desnecessárias, a junção da biologia sintética com a engenharia metabólica permitiu a melhoria de sistemas e aumento do rendimento do processo, aspetos importantes na produção de medicamentos biológicos. Deste modo, a utilização de mais processos e técnicas recorrendo à biotecnologia industrial permitirá contornar obstáculos presentes na produção de vários medicamentos biológicos. Com o aumento da investigação em ciência de dados conquistou uma grande atenção que pode ser aplicada na compreensão do metabolismo celular, e que servirá para automatizar a biologia sintética e um bio fabrico mais assertivo (Oyetunde et al., 2018).

5. Conclusão:

Com o desenvolvimento desta monografia, foi possível identificar várias adversidades com as quais a indústria biofarmacêutica se depara. Estas adversidades devem-se não só à complexidade dos fármacos em causa, mas também pelo facto deste setor se encontrar em expansão, e a utilização destes fármacos ser superior.

Relativamente ao mercado constata-se que em Portugal a utilização é sobretudo de biossimilares por estes serem mais custo-efetivos e por isso, menos onerosos para o Serviço Nacional de Saúde, embora seja possível o uso de medicamentos de referência. Também na Europa o uso de biossimilares parece ser o caminho adotado, uma vez que os países europeus pretendem que mais destes medicamentos cheguem com mais facilidade os doentes. Outro facto é que a Europa se apresenta como o segundo maior mercado de medicamentos biológicos, a seguir aos Estados Unidos da América, isto deve-se a vários aspetos importantes como a existência de centros de investigação e conhecimento do setor para apoiar a inovação; profissionais altamente qualificados e literacia em saúde por parte dos doentes que cada vez mais apoiam a utilização de medicamentos biológicos.

Pelo contrário o mercado dos Estados Unidos da América está tendencialmente mais inclinado na aposta dos medicamentos de referência e não nos biossimilares. A tendência do mercado norte americano é sobretudo em áreas terapêuticas inovadoras, dado ao investimento feito em desenvolvimento e investigação. Para além disso, o mercado dos EUA apresenta os maiores *players* mundiais como é o caso da Pfizer, Johnson & Johnson, GSK, entre outros.

Outro aspeto determinante para a evolução deste setor é o processo de desenvolvimento destes medicamentos, pois envolvem mais passos sendo que dois destes grandes passos correspondem ao *upstream* e *downstream*. Nestas duas etapas são utilizados vários equipamentos como biorreatores, mas também matérias-primas essenciais como as cultura de células.

Tanto os equipamentos como as matérias-primas devem ser escolhidos criteriosamente dado que os custos de produção são um desafio para o valor final dos medicamentos biológicos.

Por outro lado, também as entidades reguladoras representam um desafio para as empresas deste ramo, pois sendo este um setor bastante regulamentado, entidades como FDA e EMA precisam de se adaptar a novas formas de fabrico e ensaios clínicos, pois muitas das novas terapêuticas destinam-se a doenças raras e terapêuticas cada vez mais individualizadas.

Para uma melhor adaptação destes novos medicamentos as entidades reguladoras mostram-se interessadas em colaborar entre elas de forma a aumentarem os dados que possuem de modo a haver uma avaliação mais fácil. Também a utilização de tecnologias digitais demonstra ser cada vez mais certo, de modo a garantir maior segurança no momento de aprovação.

No que diz respeito às perspectivas futuras no setor da indústria biofarmacêutica as indústrias continuaram a apostar nos anticorpos monoclonais, visto que estes já estão no mercado há alguns anos e existe mais confiança na sua utilização.

Ao mesmo tempo a aposta em terapias genéticas e celulares tem aumentado, pela sua importância sobretudo na área oncológica e pelos resultados promissores.

Outra área em expansão é a terapia bacteriofágica, embora já esteja a ser estudada há alguns anos, começa agora a dar os primeiros passos com o início de ensaios clínicos.

Nesta medida considero que o mercado da indústria biofarmacêutica continuará em rápido crescimento visto que este mercado é influenciado por outras áreas também elas em crescimento tais como a biologia molecular, o conhecimento sobre sistemas de expressão, melhor compreensão de processos operacionais e aspetos tecnológicos relacionado com a produção destes medicamentos.

A existência de várias inovações neste setor faz com que sejam oportunidades de investimento e por isso maior interesse neste mercado.

6. Bibliografia:

- Aartsma-Rus, A., Ferlini, A., Goemans, N., Pasmooij, A. M. G., Wells, D. J., Bushby, K., ... Balabanov, P. (2014). Translational and Regulatory Challenges for Exon Skipping Therapies. *Human Gene Therapy*, 25(10), 885–892.
<https://doi.org/10.1089/hum.2014.086>
- Abbvie. (2022, September). Advanced medicines that demonstrate both strong clinical performance and benefits to patients. Retrieved October 20, 2022, from Abbvie website: <https://www.abbvie.com/our-science/pipeline.html>
- Aitken, M., Kleinrock, M., Simorellis, A., & Nass, D. (2019). The Global Use of Medicine in 2019 and Outlook to 2023. *IQVIA Institute for Human Data Science*, (January), 1–56.
- Aldosari, B. N., Alfagih, I. M., & Almurshedi, A. S. (2021). Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for RNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics*, 13(2), 206.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020206>
- Ali, S., Kjekken, R., Niederlaender, C., Markey, G., Saunders, T. S., Opsata, M., ... Pignatti, F. (2020). The European Medicines Agency Review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The Oncologist*, 25(2), e321–e327.
<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0233>
- Allocati, E., Bertele', V., Gerardi, C., Garattini, S., & Banzi, R. (2020). Clinical evidence supporting the marketing authorization of biosimilars in Europe. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 76(4), 557–566.
<https://doi.org/10.1007/s00228-019-02805-y>
- Angus Liu. (2021, February 26). FDA waves through a 3rd Sarepta DMD drug, once again based on questionable biomarker data. Retrieved September 28, 2022, from Fierce Pharma website: <https://www.fiercepharma.com/marketing/fda-waves-through-third-sarepta-dmd-drug-once-again-based-questionable-biomarker-data>
- APOGEN. (2022). *Determinantes, Barreiras e facilitadores da utilização de medicamentos biossimilares nos hospitais públicos*.
- Auclair, J. R. (2019). Regulatory Convergence for Biologics through Capacity Building and Training. *Trends in Biotechnology*, 37(1), 5–9.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.06.001>

- Babickova, J. (2015). Pathological and therapeutic interactions between bacteriophages, microbes and the host in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 21(40), 11321. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11321>
- Batta, A., Kalra, B. S., & Raj Khirasaria. (2017). Trends in FDA drug approvals over last 2 decades: An observational study. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 6(2), 169–170. <https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe>
- Beck, J. D., Reidenbach, D., Salomon, N., Sahin, U., Türeci, Ö., Vormehr, M., & Kranz, L. M. (2021, December 1). mRNA therapeutics in cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*, Vol. 20. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01348-0>
- Becker, J., & Wittmann, C. (2015). Advanced Biotechnology: Metabolically Engineered Cells for the Bio-Based Production of Chemicals and Fuels, Materials, and Health-Care Products. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(11), 3328–3350. <https://doi.org/10.1002/anie.201409033>
- Benyahia, B., Brumano, L. P., Pessoa, A., & Santos da Silva, F. V. (2020). Biopharmaceutical development, production, and quality. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biomolecules: Properties, Relevance, and Their Translational Applications*. BV. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64301-8.00003-2>
- Blakney, A. (2021). *The next generation of RNA vaccines: self-amplifying RNA*. Retrieved from http://portlandpress.com/biochemist/article-pdf/43/4/14/919237/bio_2021_142.pdf
- Blakney, A. K., Ip, S., & Geall, A. J. (2021). An update on self-amplifying mRNA vaccine development. *Vaccines*, 9(2), 1–26. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020097>
- Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D., & Gilboa, E. (1996). Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 184(2), 465–472. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.465>
- Bowzyk Al-Naeeb, A., Ajithkumar, T., Behan, S., & Hodson, D. J. (2018). Non-Hodgkin lymphoma. *BMJ (Online)*, 362. <https://doi.org/10.1136/bmj.k3204>
- Bretonneau, L., Tremblais, K., Aubrit, F., Meichenin, M., & Arnaud, I. (2020). Good Manufacturing Practice (GMP) Compliance for Phage Therapy Medicinal Products. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01161>

- Brian Kelley, Robert Kiss, L. M. (2018). A Different Perspective: How Much Innovation Is Really Needed for Monoclonal Antibody Production Using Mammalian Cell Technology? *New Bioprocessing Strategies: Development and Manufacturing of Recombinant Antibodies and Proteins*, 443–462.
- Brice, P., de Kerviler, E., & Friedberg, J. W. (2021, October 23). Classical Hodgkin lymphoma. *The Lancet*, Vol. 398, pp. 1518–1527. Elsevier B.V.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32207-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32207-8)
- Brito, L. A., Chan, M., Shaw, C. A., Hekele, A., Carsillo, T., Schaefer, M., ... Geall, A. J. (2014). A Cationic Nanoemulsion for the Delivery of Next-generation RNA Vaccines. *Molecular Therapy*, 22(12), 2118–2129.
<https://doi.org/10.1038/mt.2014.133>
- Brives, C., & Pourraz, J. (2020). Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. *Palgrave Communications*, 6(1), 100. <https://doi.org/10.1057/s41599-020-0478-4>
- Bugin, K., Woodcock, J., Stein, P., Sharma, K., & Tyberg, Y. (2021). New Drugs Regulatory Program Modernization: Vision, Strategic Objectives, and Impact. *Therapeutic Innovation and Regulatory Science*, 55(2), 440–446.
<https://doi.org/10.1007/s43441-020-00234-z>
- Bulaklak, K., & Gersbach, C. A. (2020). The once and future gene therapy. *Nature Communications*, 11(1), 5820. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19505-2>
- Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P., & Iannelli, D. (2007). Experimental Phage Therapy against *Staphylococcus aureus* in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), 2765–2773.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01513-06>
- Chang, R. Y. K., Wallin, M., Lin, Y., Leung, S. S. Y., Wang, H., Morales, S., & Chan, H. K. (2018, August 1). Phage therapy for respiratory infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 133, pp. 76–86. Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.001>
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M., & Kim, J.-S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31(3), 230–232. <https://doi.org/10.1038/nbt.2507>
- Choi, K. R., & Lee, S. Y. (2016). CRISPR technologies for bacterial systems: Current achievements and future directions. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1180–1209.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.002>

- Clarke, L., & Kitney, R. (2020). Developing synthetic biology for industrial biotechnology applications. *Biochemical Society Transactions*, Vol. 48, pp. 113–122. Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20190349>
- Comissão Europeia. (2013). *O que precisa saber sobre medicamentos biossimilares*. 48.
- Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica, P. (2018). Orientações - Utilização de medicamentos biossimilares e mudança de medicamento biológico de referência para um biossimilar (Portugal). *Infarmed*, (5), 1–3.
- Credevo. (2021). The Drug Approval Process In Japan. Retrieved from Credevo website: <https://credevo.com/articles/2020/04/15/the-drug-approval-process-in-japan/>
- Crowley, S. T., Fukushima, Y., Uchida, S., Kataoka, K., & Itaka, K. (2019). Enhancement of Motor Function Recovery after Spinal Cord Injury in Mice by Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 17, 465–476. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.06.016>
- de la Torre, B. G., & Albericio, F. (2022). The Pharmaceutical Industry in 2021. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. *Molecules*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27031075>
- de Ruijter, J. C., Koskela, E. v., Nandania, J., Frey, A. D., & Velagapudi, V. (2018). Understanding the metabolic burden of recombinant antibody production in *Saccharomyces cerevisiae* using a quantitative metabolomics approach. *Yeast*, 35(4), 331–341. <https://doi.org/10.1002/yea.3298>
- Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O., ... Touqui, L. (2010). Bacteriophages Can Treat and Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(7), 1096–1104. <https://doi.org/10.1086/651135>
- Decreto-lei, C. (2019). *Legislação Farmacêutica Compilada Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto*. 1–210.
- Deloitte. (2022). *On the right path Nunavik*.
- di Bartolomeo, F., Malina, C., Campbell, K., Mormino, M., Fuchs, J., Vorontsov, E., ... Nielsen, J. (2020). Absolute yeast mitochondrial proteome quantification reveals trade-off between biosynthesis and energy generation during diauxic shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(13), 7524–7535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918216117>

- Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020, March 1). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 18, pp. 125–138. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- EMA. (2017a). Biosimilar medicines: marketing authorisation. Retrieved September 24, 2022, from EMA website: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/marketing-authorisation/biosimilar-medicines-marketing-authorisation>)
- EMA. (2017b). *Biosimilar medicines: Overview*.
- EMA. (2017c, March 2). Mutual Recognition promises new framework for pharmaceutical inspections for United States and European Union. Retrieved August 30, 2022, from EMA website: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/mutual-recognition-promises-new-framework-pharmaceutical-inspections-united-states-and-european>
- EMA. (2020). EMA Regulatory Science to 2025. *Strategic Reflection*, 1–79. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ema-regulatory-science-2025-strategic-reflection_en.pdf
- EMA. (2021, December 20). EMA recommends Nuvaxovid for authorisation in the EU . Retrieved October 19, 2022, from EMA website: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-nuvaxovid-authorisation-eu>
- Epifa. (2021). *the Pharmaceutical Industry : a Key Asset To Scientific and Medical Progress the Pharmaceutical Industry*. 28.
- European Parliament. (2009). Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001. *Pharmaceuticals, Policy and Law*, 11(4), 411–499. <https://doi.org/10.3233/pp1-2009-0234>
- Fang, E., Liu, X., Li, M., Zhang, Z., Song, L., Zhu, B., ... Li, Y. (2022). Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 94. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00950-y>
- Farid, S. S., Baron, M., Stamatis, C., Nie, W., & Coffman, J. (2020). Benchmarking biopharmaceutical process development and manufacturing cost contributions to R&D. *MAbs*, 12(1). <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1754999>
- FDA. (2004). Guidance for Industry, PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance. (September). Retrieved from

- <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070305.pdf>
- FDA. (2016). FDA approves first drug for spinal muscular atrophy. Retrieved September 27, 2022, from FDA website: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-spinal-muscular-atrophy>
- FDA. (2017, August 30). FDA approval brings first gene therapy to the United States.
- FDA. (2020, January 17). Modernizing FDA's New Drugs Regulatory Program.
- FDA. (2022a, September 22). Novel Drug Approvals for 2022. Retrieved September 24, 2022, from FDA website: <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2022>
- FDA. (2022b, October 18). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Retrieved October 19, 2022, from FDA website: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/counterterrorism-and-emerging-threats/coronavirus-disease-2019-covid-19>
- fda, & cder. (2019). *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION FULL PRESCRIBING INFORMATION: CONTENTS* 1 INDICATIONS AND USAGE 2 DOSAGE AND ADMINISTRATION 2.1 Monitoring to Assess Safety 2.2 Dosing Information 2.3 Preparation Instructions 2.4 Administration Instructions 3 DOSAGE FORMS AND STRENGTHS 4 CONTRAINDICATIONS 5 WARNINGS AND PRECAUTIONS 5.1 Hypersensitivity Reactions 5.2 Renal Toxicity*. Retrieved from www.fda.gov/medwatch.
- Feng Wang, Travis Zuroske, J. K. W. (2020). RNA therapeutics on the rise. *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Fernandes, S., & São-José, C. (2018, August 1). Enzymes and mechanisms employed by tailed bacteriophages to breach the bacterial cell barriers. *Viruses*, Vol. 10. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v10080396>
- Forecast, M. D. (2022). Europe Biopharmaceuticals Market Research Report – Segmented By Product Type, Therapeutic Type & Country (UK, France, Spain, Germany, Italy, Russia, Sweden, Denmark, Switzerland, Netherlands, Turkey, Czech Republic and Rest of Europe) - Industry Analysis,. Retrieved from Europe Biopharmaceuticals Market website: <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/europe-bio-pharmaceuticals-market/tables-figures>

- Gerzon, G., Sheng, Y., & Kirkitadze, M. (2022). Process Analytical Technologies – Advances in bioprocess integration and future perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 207, 114379.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114379>
- Grosvenor, S. (2012). A new era in cell culture media development. *BioPharm International*, 25(7), 28–35.
- Guan, S., & Rosenecker, J. (2017). Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems. *Gene Therapy*, 24(3), 133–143.
<https://doi.org/10.1038/gt.2017.5>
- Han, Y., Makarova, E., Ringel, M., & Telpis, V. (2019). Digitization, automation, and online testing: The future of pharma quality control Emerging technologies can make quality control (QC) faster and more efficient. What do pharma companies need to do to become QC leaders? In *PHARMACEUTICALS & MEDICAL PRODUCTS PRACTICE*.
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., ... Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, 212–213, 38–58.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>
- Hill, S. F., & Meisler, M. H. (2021, September 1). Antisense Oligonucleotide Therapy for Neurodevelopmental Disorders. *Developmental Neuroscience*, Vol. 43, pp. 247–252. S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000517686>
- Hodgson, J. (2021, February 1). Refreshing the biologic pipeline 2020. *Nature Biotechnology*, Vol. 39, pp. 135–143. NLM (Medline).
<https://doi.org/10.1038/s41587-021-00814-w>
- Hoe, S., Semler, D. D., Goudie, A. D., Lynch, K. H., Matinkhoo, S., Finlay, W. H., ... Vehring, R. (2013). Respirable Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Lung Infections. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 26(6), 317–335. <https://doi.org/10.1089/jamp.2012.1001>
- Husain, & Arifa. (2022). *Breakthroughs that change patients' lives Pfizer Pipeline*. Retrieved from www.pfizer.com/pipeline,
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). *Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- Ibba, M. L., Ciccone, G., Esposito, C. L., Catuogno, S., & Giangrande, P. H. (2021, October 1). Advances in mRNA non-viral delivery approaches. *Advanced Drug*

- Delivery Reviews*, Vol. 177. Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113930>
- ICMRA. (2021). *Horizon Scanning Assessment Report - Artificial Intelligence*.
- Iftikhar, M., Frey, J., Shohan, M. J., Malek, S., & Mousa, S. A. (2021, April 1). Current and emerging therapies for Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 220. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107719>
- Iniciativa, U. M. A. (2020). *Bio-Saúde 2030*.
- IQVIA. (2020). New product launches, clinical trial activity, and investments. *IQVIA*. Retrieved from <https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports/2019-r-and-d-achievements>
- IQVIA. (2021). *EFPIA Pipeline Review 2021 Update*.
- Jackson, L. A., Anderson, E. J., Roupheal, N. G., Roberts, P. C., Makhene, M., Coler, R. N., ... mRNA-1273 Study Group. (2020). An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *The New England Journal of Medicine*, 383(20), 1920–1931. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022483>
- Jackson, N. A. C., Kester, K. E., Casimiro, D., Gurunathan, S., & DeRosa, F. (2020). The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *Npj Vaccines*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0159-8>
- Jarzebska, N. T., Lauchli, S., Iselin, C., French, L. E., Johansen, P., Guenova, E., ... Pascolo, S. (2020). Functional differences between protamine preparations for the transfection of mRNA. *Drug Delivery*, 27(1), 1231–1235.
<https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1790692>
- Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y.-A., Resch, G., ... Gabard, J. (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 35–45. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30482-1)
- Jayaraman, J., Mellody, M. P., Hou, A. J., Desai, R. P., Fung, A. W., Pham, A. H. T., ... Zhao, W. (2020, August 1). CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine*, Vol. 58. Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102931>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive

- Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- João Cerejeira, Elisabete Sá, J. S. (2021). *Portugal BIOTECH: TRENDS, OPPORTUNITIES AND CHALLENGES OF THE PORTUGUESE BIOTECHNOLOGY SECTOR*.
- João, J., Lampreia, J., Prazeres, D. M. F., & Azevedo, A. M. (2021, July 1). Manufacturing of bacteriophages for therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, Vol. 49. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107758>
- John Carroll. (2016, May 25). UPDATED: The FDA decides that it can't decide yet on Sarepta's eteplirsen. Retrieved September 28, 2022, from Fierce Biotech website: <https://www.fiercebiotech.com/fda-decides-it-can-t-decide-yet-sarepta-s-eteplirsen>
- Jonathan Hummel, Mark Pagkaliwangan, Xhorxhi Gjoka, Terence Davidovits, Rick Stock, Thomas Ransohoff, Rene Gantier, M. S. (2016). *Modeling the downstream processing of monoclonal antibodies reveals cost advantages for continuous methods for a broad range of manufacturing scales*. (July), 1–23.
- Journal of Clinical Oncology. (2015). Phase IIa trial of chimeric antigen receptor modified T cells directed against CD19 (CTL019) in patients with relapsed or refractory CD19+ lymphomas. *Journal of Clinical Oncology*, 33(15).
- Jurač, K., Nabergoj, D., & Podgornik, A. (2019). Bacteriophage production processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 685–694.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9527-y>
- Khanal, O., & Lenhoff, A. M. (2021). Developments and opportunities in continuous biopharmaceutical manufacturing. *MAbs*, 13(1).
<https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1903664>
- Kim, H., & Kim, J.-S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 15(5), 321–334.
<https://doi.org/10.1038/nrg3686>
- Klebanoff, C. A., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2016). Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers. *Nature Medicine*, 22(1), 26–36. <https://doi.org/10.1038/nm.4015>
- Knoll, B. M., & Mylonakis, E. (2014). Antibacterial Bioagents Based on Principles of Bacteriophage Biology: An Overview. *Clinical Infectious Diseases*, 58(4), 528–534. <https://doi.org/10.1093/cid/cit771>

- Kommineni, S., Bretl, D. J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayward, M., Simpson, P., ... Salzman, N. H. (2015). Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*, *526*(7575), 719–722. <https://doi.org/10.1038/nature15524>
- Kose, N., Fox, J. M., Sapparapu, G., Bombardi, R., Tennekoon, R. N., Dharshan De Silva, A., ... Crowe, J. E. (2019). A lipid-encapsulated mRNA encoding a potently neutralizing human monoclonal antibody protects against chikungunya infection. In *Sci. Immunol* (Vol. 4). Retrieved from <http://immunology.sciencemag.org/>
- Kowalski, P. S., Rudra, A., Miao, L., & Anderson, D. G. (2019). Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Molecular Therapy*, *27*(4), 710–728. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.02.012>
- Kowalzik, F., Schreiner, D., Jensen, C., Teschner, D., Gehring, S., & Zepp, F. (2021). Mrna-based vaccines. *Vaccines*, Vol. 9. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040390>
- Kutateladze, M. (2015). Experience of the Eliava Institute in bacteriophage therapy. *Virologica Sinica*, *30*(1), 80–81. <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3557-0>
- Kutateladze, M., & Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, *28*(12), 591–595. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.08.001>
- Lagassé, H. A. D., Alexaki, A., Simhadri, V. L., Katagiri, N. H., Jankowski, W., Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C. (2017). Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research*, *6*, 113. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9970.1>
- Larson, R. C., & Maus, M. v. (2021, March 1). Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 21, pp. 145–161. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00323-z>
- Lattanzi, A., Meneghini, V., Pavani, G., Amor, F., Ramadier, S., Felix, T., ... Miccio, A. (2019). Optimization of CRISPR/Cas9 Delivery to Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Therapeutic Genomic Rearrangements. *Molecular Therapy*, *27*(1), 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.10.008>
- Li, D., Li, X., Zhou, W.-L., Huang, Y., Liang, X., Jiang, L., ... Wang, W. (2019). Genetically engineered T cells for cancer immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *4*(1), 35. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0070-9>

- Li, M., Li, Y., Peng, K., Wang, Y., Gong, T., Zhang, Z., ... Sun, X. (2017). Engineering intranasal mRNA vaccines to enhance lymph node trafficking and immune responses. *Acta Biomaterialia*, 64, 237–248.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.10.019>
- Lindskog, E. K. (2018). The Upstream Process: Principal Modes of Operation. In *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00031-1>
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, Vol. 25, pp. 1234–1257. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Liu, K., Yang, W., Dong, X., Cong, L., Li, N., Li, Y., ... Li, J. (2016). Inhalation Study of Mycobacteriophage D29 Aerosol for Mice by Endotracheal Route and Nose-Only Exposure. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 29(5), 393–405. <https://doi.org/10.1089/jamp.2015.1233>
- Liu, Z., Dong, H., Cui, Y., Cong, L., & Zhang, D. (2020, September 3). Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial Cell Factories*, Vol. 19. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01431-z>
- Lucia Darino, A. K. N. M. and D. T. (2018, January 8). How pharma can accelerate business impact from advanced analytics.
- Łusiak-Szelachowska, M., Weber-Dąbrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Wojciechowska, R., & Górski, A. (2017). Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications. *Gut Pathogens*, 9(1), 44.
<https://doi.org/10.1186/s13099-017-0196-7>
- Majzner, R. G., & Mackall, C. L. (2018). Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discovery*, 8(10), 1219–1226. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0442>
- Makurvet, F. D. (2021). Biologics vs. small molecules: Drug costs and patient access. *Medicine in Drug Discovery*, 9, 100075.
<https://doi.org/10.1016/j.medidd.2020.100075>
- Market Research Blog. (2022, February 1). Top 3 Biologics Market Trends That Boost Industry Growth. Retrieved August 30, 2022, from

- <https://blog.marketresearch.com/top-3-biologics-market-trends-that-boost-industry-growth>
- Martin, D. K., Vicente, O., Beccari, T., Kellermayer, M., Koller, M., Lal, R., ... Dundar, M. (2021). A brief overview of global biotechnology. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 35(1), 354–363.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1878933>
- Maugeri, M., Nawaz, M., Papadimitriou, A., Angerfors, A., Camponeschi, A., Na, M., ... Valadi, H. (2019). Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nature Communications*, 10(1), 4333.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12275-6>
- McVay, C. S., Velásquez, M., & Fralick, J. A. (2007). Phage Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Mouse Burn Wound Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 1934–1938. <https://doi.org/10.1128/AAC.01028-06>
- Mei, C., Deshmukh, S., Cronin, J., Cong, S., Chapman, D., Lazaris, N., ... Kirkitadze, M. (2019). Aluminum Phosphate Vaccine Adjuvant: Analysis of Composition and Size Using Off-Line and In-Line Tools. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1184–1194. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.08.003>
- Mellstedt, H. (2013). Clinical considerations for biosimilar antibodies. *European Journal of Cancer, Supplement*, 11(3), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S1359-6349\(13\)70001-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6349(13)70001-6)
- Mendell, J. R., Sahenk, Z., Lehman, K., Nease, C., Lowes, L. P., Miller, N. F., ... Rodino-Klapac, L. R. (2020). Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Children With Duchenne Muscular Dystrophy. *JAMA Neurology*, 77(9), 1122.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1484>
- Moleirinho, M. G., Silva, R. J. S., Alves, P. M., Carrondo, M. J. T., & Peixoto, C. (2019). Current challenges in biotherapeutic particles manufacturing. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 00(00), 1–15.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1693541>
- Mollanoori, H., & Teimourian, S. (2018). Therapeutic applications of CRISPR/Cas9 system in gene therapy. *Biotechnology Letters*, 40(6), 907–914.
<https://doi.org/10.1007/s10529-018-2555-y>
- Mordor Intelligence LLP. (2021). JAPAN PHARMACEUTICAL MARKET - GROWTH, TRENDS, COVID-19 IMPACT, AND FORECASTS (2022 - 2027).

- Retrieved from <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/japan-pharmaceutical-market>
- Mordor Intelligence LLP. (2022). *Biologics Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2022 - 2027)*. 181.
- Morello, E., Saussereau, E., Maura, D., Huerre, M., Touqui, L., & Debarbieux, L. (2011). Pulmonary Bacteriophage Therapy on *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Strains: First Steps Towards Treatment and Prevention. *PLoS ONE*, *6*(2), e16963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016963>
- Mout, R., Ray, M., Lee, Y.-W., Scaletti, F., & Rotello, V. M. (2017). In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. *Bioconjugate Chemistry*, *28*(4), 880–884. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00057>
- Mulligan, M. J., Lyke, K. E., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., ... Jansen, K. U. (2020). Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature*, *586*(7830), 589–593. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2639-4>
- Nasukawa, T., Uchiyama, J., Taharaguchi, S., Ota, S., Ujihara, T., Matsuzaki, S., ... Sakaguchi, M. (2017). Virus purification by CsCl density gradient using general centrifugation. *Archives of Virology*, *162*(11), 3523–3528. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3513-z>
- Nielsen, J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast. *Bioengineered*, *4*(4), 207–211. <https://doi.org/10.4161/bioe.22856>
- Nielsen, J. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. *Biotechnology Journal*, *14*(9), 1800421. <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>
- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldrige, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., ... Virgin, H. W. (2015). Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell*, *160*(3), 447–460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>
- Ochoa, S. (2019). Fed-batch fermentation - design strategies. *Comprehensive Biotechnology*, *2*(April 2018), 586–600. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00093-8>
- Orlova, E. V. (2012). Bacteriophages and Their Structural Organisation. In *Bacteriophages*. InTech. <https://doi.org/10.5772/34642>
- Oyetunde, T., Bao, F. S., Chen, J.-W., Martin, H. G., & Tang, Y. J. (2018). Leveraging knowledge engineering and machine learning for microbial bio-manufacturing.

- Biotechnology Advances*, 36(4), 1308–1315.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.008>
- Park, J. H., Rivière, I., Gonen, M., Wang, X., Sénéchal, B., Curran, K. J., ... Sadelain, M. (2018). Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 378(5), 449–459.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709919>
- Pasi, K. J., Rangarajan, S., Mitchell, N., Lester, W., Symington, E., Madan, B., ... Wong, W. Y. (2020). Multiyear Follow-up of AAV5-hFVIII-SQ Gene Therapy for Hemophilia A. *New England Journal of Medicine*, 382(1), 29–40.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908490>
- Patil, Gao, Lin, Li, Dang, Tian, ... Qian. (2019). The Development of Functional Non-Viral Vectors for Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5491. <https://doi.org/10.3390/ijms20215491>
- Perez, C. R., & de Palma, M. (2019). Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. *Nature Communications*, 10(1), 5408.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13368-y>
- Pina, A. S., Hussain, A., & Roque, A. C. A. (2009). An historical overview of drug discovery. *Methods in Molecular Biology*, 572(1), 3–12.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-244-5_1
- Pirnay, J.-P., Merabishvili, M., van Raemdonck, H., de Vos, D., & Verbeken, G. (2018). *Bacteriophage Production in Compliance with Regulatory Requirements*.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_18
- Prakash, V. (2017, September 1). Spinraza-a rare disease success story. *Gene Therapy*, Vol. 24, p. 497. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.59>
- Qasim, W., Amrolia, P. J., Samarasinghe, S., Ghorashian, S., Zhan, H., Stafford, S., ... Pule, M. (2015). First Clinical Application of Talen Engineered Universal CAR19 T Cells in B-ALL. *Blood*, 126(23), 2046–2046.
<https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.2046.2046>
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., ... Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, 520(7546), 186–191. <https://doi.org/10.1038/nature14299>
- Rathore, A. S. (2015). Continuous Processing for Production of Biotech Therapeutics. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 69(3), 333–333.
<https://doi.org/10.5731/pdajpst.2015.01072>

- Rehman, S., Ali, Z., Khan, M., Bostan, N., & Naseem, S. (2019, July 1). The dawn of phage therapy. *Reviews in Medical Virology*, Vol. 29. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmv.2041>
- Roberts, Z. J., Better, M., Bot, A., Roberts, M. R., & Ribas, A. (2018). Axicabtagene ciloleucel, a first-in-class CAR T cell therapy for aggressive NHL. *Leukemia & Lymphoma*, 59(8), 1785–1796. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1387905>
- Robinson-Hamm, J. N., & Gersbach, C. A. (2016). Gene therapies that restore dystrophin expression for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Human Genetics*, 135(9), 1029–1040. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1725-z>
- Sahin, U., Muik, A., Derhovanessian, E., Vogler, I., Kranz, L. M., Vormehr, M., ... Türeci, Ö. (2020). COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*, 586(7830), 594–599. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7>
- Samsa, M. M., Dupuy, L. C., Beard, C. W., Six, C. M., Schmaljohn, C. S., Mason, P. W., ... Yu, D. (2019). Self-Amplifying RNA Vaccines for Venezuelan Equine Encephalitis Virus Induce Robust Protective Immunogenicity in Mice. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 27(4), 850–865. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.013>
- Sarker, S. A., McCallin, S., Barretto, C., Berger, B., Pittet, A.-C., Sultana, S., ... Brüssow, H. (2012). Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. *Virology*, 434(2), 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.002>
- Sarker, S. A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., Charton, F., ... Brüssow, H. (2016a). Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine*, 4, 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.12.023>
- Sarker, S. A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., Charton, F., ... Brüssow, H. (2016b). Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine*, 4, 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.12.023>
- Scheuermann, R. H., & Racila, E. (1995). CD19 Antigen in Leukemia and Lymphoma Diagnosis and Immunotherapy. *Leukemia & Lymphoma*, 18(5–6), 385–397. <https://doi.org/10.3109/10428199509059636>

- Senturk, S., Shirole, N. H., Nowak, D. G., Corbo, V., Pal, D., Vaughan, A., ... Sordella, R. (2017). Rapid and tunable method to temporally control gene editing based on conditional Cas9 stabilization. *Nature Communications*, 8(1), 14370. <https://doi.org/10.1038/ncomms14370>
- Shah, N. N., Maatman, T., Hari, P., & Johnson, B. (2019). Multi targeted CAR-T cell therapies for B-cell malignancies. *Frontiers in Oncology*, Vol. 9. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00146>
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, 62(1), 17–55. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x>
- Singla, S., Harjai, K., Katare, O. P., & Chhibber, S. (2015). Bacteriophage-Loaded Nanostructured Lipid Carrier: Improved Pharmacokinetics Mediates Effective Resolution of *Klebsiella pneumoniae* –Induced Lobar Pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, 212(2), 325–334. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv029>
- Smith, E., & Blomberg, P. (2017). [Gene therapy – from idea to reality]. *Lakartidningen*, 114.
- Steffin, D. H. M., Hsieh, E. M., & Rouce, R. H. (2019, August 1). Gene Therapy: Current Applications and Future Possibilities. *Advances in Pediatrics*, Vol. 66, pp. 37–54. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2019.04.001>
- Stern, R. M., Hedin, K. E., Hayden, R. E., Nowakowski, G. S., Wyles, S. P., Greenberg-Worisek, A. J., ... Kenderian, S. S. (2020). A Graduate-Level Interdisciplinary Curriculum in CAR-T Cell Therapy. *Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes*, 4(2), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2019.12.006>
- TEAM LINCHPIN. (2022). Biotechnology Marketing & Industry Trends Shaping 2022. Retrieved from <https://linchpinseo.com/trends-biotechnology-industry/>
- The Japan Times. (2021). Japan's older population hits record high. *The Japan Times*.
- Thomas, F. (2019). Going Global in Biopharma Regulatory Affairs. *BioPharm International*, 32(4), 42–45. Retrieved from <https://www.biopharminternational.com/view/going-global-biopharma-regulatory-affairs>
- Tian, X., Gu, T., Patel, S., Bode, A. M., Lee, M.-H., & Dong, Z. (2019). CRISPR/Cas9 – An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology. *Npj Precision Oncology*, 3(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0080-7>

- Tihanyi, B., & Nyitray, L. (2020). Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today: Technologies*, 38(xx), 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>
- Tony Hagen. (2021, May 7). Regulators Look Back on 15 Years of Biosimilars in Europe. Retrieved September 13, 2022, from The center for Biosimilars website: <https://www.centerforbiosimilars.com/view/regulators-look-back-on-15-years-of-biosimilars-in-europe>
- Ugur Sahin, K. K. & Ö. T. (2014). mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 759–780.
- Ulett, G. C., Totsika, M., Schaale, K., Carey, A. J., Sweet, M. J., & Schembri, M. A. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current Opinion in Microbiology*, 16(1), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.005>
- Urquhart, L. (2022). Top companies and drugs by sales in 2021. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(4), 251. <https://doi.org/10.1038/d41573-022-00047-9>
- Viardot, A., Wais, V., Sala, E., & Koerper, S. (2019). Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy as a treatment option for patients with B-cell lymphomas: perspectives on the therapeutic potential of Axicabtagene ciloleucel. *Cancer Management and Research, Volume 11*, 2393–2404. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S163225>
- Weber, E. W., Maus, M. v., & Mackall, C. L. (2020a, April 2). The Emerging Landscape of Immune Cell Therapies. *Cell*, Vol. 181, pp. 46–62. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.001>
- Weber, E. W., Maus, M. v., & Mackall, C. L. (2020b, April 2). The Emerging Landscape of Immune Cell Therapies. *Cell*, Vol. 181, pp. 46–62. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.001>
- Weiner, L. M., Murray, J. C., & Shuptrine, C. W. (2012). Antibody-Based Immunotherapy of Cancer. *Cell*, 148(6), 1081–1084. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.034>
- Wu, N., Chen, L.-K., & Zhu, T. (2022). Phage therapy for secondary bacterial infections with COVID-19. *Current Opinion in Virology*, 52, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.11.001>
- Yang, O., Qadan, M., & Ierapetritou, M. (2020). Economic Analysis of Batch and Continuous Biopharmaceutical Antibody Production: a Review. *Journal of*

- Pharmaceutical Innovation*, 15(1), 182–200. <https://doi.org/10.1007/s12247-018-09370-4>
- Zaki, M. (2021). *LEADERSHIP Pharmaceutical Executive December 2021 ONCOLOGY OPTIMISM A Hopeful Outlook for Cancer Treatment* (Vol. 41). Retrieved from www.pharmexec.com/pe_p/digital_transformation
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019, February 26). Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy*, Vol. 10. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zeng, C., Zhang, C., Walker, P. G., & Dong, Y. (2020). *Formulation and Delivery Technologies for mRNA Vaccines*. https://doi.org/10.1007/82_2020_217
- Zhao, J., Wang, G., Chu, J., & Zhuang, Y. (2020, January 1). Harnessing microbial metabolomics for industrial applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 36. Springer. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2775-x>
- Zhao, M., Vandersluis, M., Stout, J., Haupts, U., Sanders, M., & Jacquemart, R. (2019). Affinity chromatography for vaccines manufacturing: Finally ready for prime time? *Vaccine*, 37(36), 5491–5503. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.090>
- Zhong, J. J. (2011). Bioreactor Engineering. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00097-0>
- Zydney, A. L. (2015). Perspectives on integrated continuous bioprocessing - opportunities and challenges. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 10, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2015.07.005>